

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22279

研究課題名（和文）接着斑細胞膜は特殊な膜領域で細胞機能を調節するか？

研究課題名（英文）Does the membrane at focal adhesions differ from other membrane and regulate cellular function?

研究代表者

木岡 紀幸（Kioka, Noriyuki）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90234179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞外基質の種類や濃度、硬さなどの細胞外環境の感知とそれによる細胞機能の制御には、接着斑が重要である。これまでに、接着斑局在タンパク質の機能はよく解析されているが、接着斑の細胞膜についてはよくわかっていない。本研究では、接着斑の細胞膜に含まれる脂質について調べた。単離した接着斑から抽出する実験系を構築し、その含有脂質を調べたところ、接着斑細胞膜は細胞膜全体と組成が異なることが示唆された。また、接着斑細胞膜を改変する実験系の構築も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外環境は接着斑を介して、間葉系幹細胞の分化の方向性やがんの悪性化に影響を与えています。本研究により、接着斑領域にある細胞膜は他の細胞膜とは組成が異なることが示唆されました。このことは接着斑の働きに細胞膜が関与している可能性を示しており、さらに今後接着斑細胞膜の重要性を示すことで、再生医療のための新しい仕組みの開発につながることを期待されます。

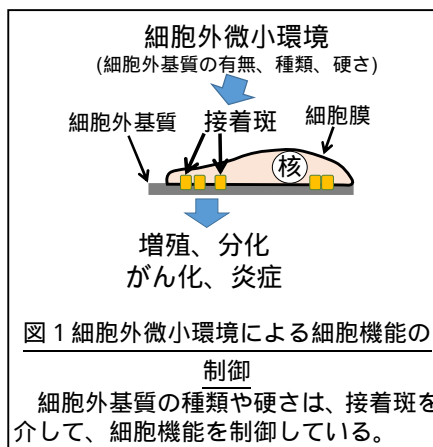
研究成果の概要（英文）：Focal adhesions are important for sensing the extracellular environment, including type, concentration, and stiffness of extracellular matrix, and thereby regulating cellular function. Although the functions of focal adhesion proteins have been well characterized, the plasma membrane within the focal adhesions is not well characterized. In this study, we investigated the lipids within the plasma membrane of focal adhesions. We established an experimental system for extracting lipids from isolated focal adhesion fractions and examined their lipid composition, suggesting that the plasma membrane of focal adhesions has a different composition from that of the entire plasma membrane. We also tried to establish an experimental system to modify the lipid composition of focal adhesion membrane.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：接着斑 細胞膜 コラーゲン リン脂質

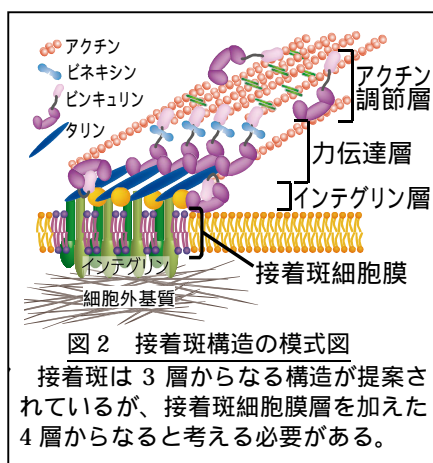
### 1. 研究開始当初の背景

体内ではコラーゲンをはじめとする細胞外基質が動物細胞を取り囲んでいる。この細胞外基質の種類や濃度、硬さなどの細胞外環境が、炎症や脂肪細胞分化、がん細胞遊走などの細胞機能を調節している。細胞外環境の感知と情報伝達には、細胞と細胞外基質との接着部位に形成される巨大複合体接着斑(図1)が重要であり、これまでに、接着斑局在タンパク質(細胞外基質受容体やキナーゼ)の重要性が示され、接着斑タンパク質を抑制することでがんや炎症性疾患、硬化症の治療が試みられている。一方で接着斑のもう一つの主要な構成因子である接着斑細胞膜はこれまでほぼ完全に見過ごされてきた(図2)。



### 2. 研究の目的

最近、接着斑を構成する細胞膜は脂質ラフト様(ordered membrane)であることが顕微鏡観察により報告された。また私たちはこれまでに細胞外基質の硬さにより接着斑タンパク質が脂質ラフト膜(界面活性剤不溶性膜)に増加することを示し、そのことが細胞外基質の硬さによる細胞遊走の調節に必要なことを見出している。このこと



から接着斑細胞膜は他の細胞膜に比べて特殊で、それを介して細胞機能を制御しているのではないかと考え、本研究では接着斑の細胞膜の組成について生化学的手法、細胞生物学的手法を用いて検証を試みた。

### 3. 研究の方法

これまでに接着斑を単離し、それを用いて接着斑プロテオームを行っている例が報告されている。そこで単離した接着斑から接着斑細胞膜も単離ができ、その生化学的解析が可能であると考えた。まず接着斑プロテオームで利用されている手法を改変し、接着斑単離を行う実験系の確立を行った。さらに単離した接着斑画分から脂質を抽出できる条件を検討した。また、細胞全体の細胞膜の単離を行う手法として複数の実験系を検討した。脂質の定量には、これまでに確立している高感度酵素蛍光法を用いた。さらに得られた脂質について、質量分析によりリン脂質の疎水性尾部であるアシル鎖の解析も行った。

脂質修飾/輸送タンパク質を接着斑に局在させることで、接着斑細胞膜の脂質組成を変える実験系の構築を目指した。脂質修飾/輸送タンパク質としては、1) 予備的結果で接着斑にコレステロールが多いこと、2) コレステロール輸送体 ABCA1 の発現が脂質ラフト膜(ordered membrane)を破壊することから、まずは ABCA1 を用いた。また、その他の脂質合成酵素、脂質分解酵素を用いて接着斑への局在化を行った。脂質の接着斑への濃縮は、イメージングをベースとした細胞生物学的手法の利用を検討した。

#### 4. 研究成果

プロテオームで用いられる水流を利用した接着斑単離手法について、水流の強さや時間などの条件検討を行い、細胞から接着斑を単離できる条件を探索した。単離した接着斑画分は、免疫染色とウエスタンブロット法で確認した。さらに、単離した接着斑画分から脂質の抽出の可否について検討したところ、全細胞面積に対する接着斑領域の面積の割合に見合う程度の脂質が抽出できていることが確認できた。さらに、単離した細胞膜脂質のコレステロールとホスファチジルコリンを酵素法により定量したところ、接着斑細胞膜のコレステロール/ホスファチジルコリン比は細胞全体の脂質に比べが高いことが示された。一方で、接着斑細胞膜を細胞全体の脂質ではなく、細胞膜の脂質と比較するために、細胞膜を単離する手法についても検討した。いくつかの手法について細胞膜の単離について検討し、一つの手法に決定した。細胞膜の単離は免疫染色法により行った。さらに得られた得られた接着斑画分、細胞膜画分、細胞全体の各画分について酵素法と質量分析法によりそれぞれの画分に含まれる脂質の定量を行った。接着斑画分は他画分に比べコレステロール/コリンリン脂質比が高いことが分かった。加えて、ホスファチジルエタノールアミンの持つアシル鎖については接着斑画分の脂質は他画分と大きな違いは検出できなかったが、ホスファチジルコリンの持つアシル鎖については他画分に比べて長さの不飽和度の割合が異なるアシル鎖を持つ傾向があることが分かった。本研究成果は、接着斑細胞膜は細胞膜全体とは異なる組成であることを示唆している。

次に、接着斑細胞膜を改変する実験系を構築するために、脂質修飾/輸送タンパク質を接着斑に局在させる手法について検討した。まず、予備実験として蛍光タンパク質を、接着斑局在化をさせる領域や接着斑タンパク質との融合タンパク質として発現させ、効率よく接着斑に局在化させる接着斑局在化領域を検討し、蛍光タンパク質を接着斑に局在化させることに成功した。つぎにコレステロール輸送体であり脂質ラフトを破壊する能力を持つ ABCA1 を接着斑局在化シグナルに融合して発現させたが、ABCA1 は接着斑に局在化できなかった。局在化させたいタンパク質自体の(別の場所への)局在能力が強いと、これまでに作成していた接着斑局在化システムでは接着斑に濃縮させられないことがわかった。そこで次に脂質修飾酵素の活性部位のみを接着斑局在化システムに用いたところ、一部の脂質修飾酵素を接着斑に局在化させることに成功した。次に接着斑での局所的な脂質の変化を調べるために、接着斑に濃縮することがすでに報告されている PIP2 について GFP-PH プローブを用いてその可視化と定量を試みた。しかし、発現量や観察条件を様々に変化させたが、用いた細胞では PIP2 の接着斑への濃縮は観察できず、本実験系では接着斑脂質の定量が困難であることが判明した。前述のように本研究により接着斑への脂質修飾酵素の局在化については成功しているので、局在化させた脂質修飾酵素の活性とそれによる接着斑細胞膜の脂質の変化を評価する実験系を今後さらに検討することで、接着斑細胞膜を改変する実験系の確立が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takata Kyoko, Goto Tsuyoshi, Kuroda Mito, Kimura Yasuhisa, Harada Ichiro, Ueda Kazumitsu, Kawada Teruo, Kioka Noriyuki | 4. 巻<br>532           |
| 2. 論文標題<br>Stiffness of the extracellular matrix regulates differentiation into beige adipocytes                                 | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>205~210 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2020.08.032  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>木岡紀幸                         | 4. 巻<br>70            |
| 2. 論文標題<br>細胞 - 細胞外マトリックス間接着のメカノセンサー   | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>生体の科学                        | 6. 最初と最後の頁<br>290-295 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし          | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計61件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>坂田和樹、木岡紀幸、植田和光、木村泰久    |
| 2. 発表標題<br>リボソームを用いたABCA1の脂質特異性解析 |
| 3. 学会等名<br>第16回トランスポーター研究会年会      |
| 4. 発表年<br>2022年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>立花大、鎌田一希、黒田美都、木村泰久、木岡紀幸             |
| 2. 発表標題<br>接着斑タンパク質ピネキシンとホスファチジン酸の相互作用とその意義の解明 |
| 3. 学会等名<br>メカノバイオロジー討論会2022                    |
| 4. 発表年<br>2022年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kazuki Sakata, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda, Yasuhisa Kimura   |
| 2. 発表標題<br>Biochemical analysis of phospholipid-dependent sterol recognition by ABCA1   |
| 3. 学会等名<br>ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease, FEBS2023 Advanced Course (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>立花大、鎌田一希、黒田美都、木村泰久、木岡紀幸       |
| 2. 発表標題<br>ホスファチジン酸はピネキシン を接着斑に安定して局在させる |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2023年度広島大会             |
| 4. 発表年<br>2023年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤原萌衣、高橋真助、黒田美都、木村泰久、榎本篤、木岡紀幸     |
| 2. 発表標題<br>接着斑タンパク質ピンキュリン、CAP はメフリンの発現を抑制する |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2023年度広島大会                |
| 4. 発表年<br>2023年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Noriyuki Kioka   |
| 2. 発表標題<br>Membrane of cell-ECM adhesion site has a high level of cholesterol and PC with saturated fatty acids |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Mechanobiology for Human Health (国際学会)                                    |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松山大輝、黒田美都、木村 泰久、古寺 哲幸、木岡紀幸     |
| 2. 発表標題<br>高速原子間力顕微鏡によるピンキュリン/Sobrs1の動態解析 |
| 3. 学会等名<br>第7回日本メカノバイオロジー学会学術大会           |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木岡紀幸                                 |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞の分化における細胞外マトリックスの硬さによる調節と硬さの感知機構 |
| 3. 学会等名<br>第164回日本獣医学会学術集会（招待講演）                |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木岡紀幸                           |
| 2. 発表標題<br>接着斑を介した細胞外マトリックスの硬さの感知と細胞機能の制御 |
| 3. 学会等名<br>第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）           |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>立花大、長尾耕治郎、木村泰久、木岡紀幸   |
| 2. 発表標題<br>接着斑領域の細胞膜は特殊な脂質組成を有する |
| 3. 学会等名<br>第73回日本細胞生物学会大会        |
| 4. 発表年<br>2021年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>増元亮裕、木村泰久、木岡紀幸                       |
| 2. 発表標題<br>化学誘導性二量体化を用いた脂質修飾酵素の接着斑一過的局在化システムの構築 |
| 3. 学会等名<br>第73回日本細胞生物学会大会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂田和樹、木岡紀幸、植田和光、木村泰久             |
| 2. 発表標題<br>脂質輸送体ABCA1によるコレステロール認識機構の生化学的解析 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本生化学会大会                    |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鎌田一希、木村泰久、木岡紀幸                          |
| 2. 発表標題<br>哺乳類細胞を用いたピネキシン の精製系構築及びホスファチジン酸との相互作用解析 |
| 3. 学会等名<br>第44回日本分子生物学会年会                          |
| 4. 発表年<br>2021年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>増元亮裕、木村泰久、木岡紀幸              |
| 2. 発表標題<br>接着斑の脂質組成改変を目指した酵素局在化システムの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会関西支部第518回講演会         |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>立花大、長尾耕治郎、黒田美都、木村泰久、木岡紀幸               |
| 2. 発表標題<br>ヒト骨肉腫細胞とヒト骨髓由来間葉系幹細胞の接着斑細胞膜の単離と脂質組成の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2022年度京都大会                      |
| 4. 発表年<br>2022年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鎌田一希、木村泰久、木岡紀幸                               |
| 2. 発表標題<br>哺乳類細胞で発現している接着斑タンパク質ピネキシン は脂質ホスファチジン酸と相互作用する |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2022年度京都大会                            |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>増元亮裕、木村泰久、木岡紀幸              |
| 2. 発表標題<br>脂質修飾酵素の接着斑及び細胞膜への局在化システムの構築 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2022年度京都大会           |
| 4. 発表年<br>2022年                        |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>松山大輝、小段篤史、木村泰久、木岡紀幸        |
| 2. 発表標題<br>哺乳類細胞における接着斑タンパク質CAPの精製系構築 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2022年度京都大会          |
| 4. 発表年<br>2022年                       |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂田和樹、木岡紀幸、植田和光、木村泰久                 |
| 2. 発表標題<br>巨大リボソーム(GUV)を用いたヒトABCA1の新規機能解析手法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本脂質生化学会                        |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>立花大, 柴原正和, 阿部雄一, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸 |
| 2. 発表標題<br>細胞外マトリックスの硬さ感知機構の解明を目指した接着斑プロテオーム |
| 3. 学会等名<br>第72回日本細胞生物学会大会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>木岡紀幸                          |
| 2. 発表標題<br>接着斑を介した細胞外マトリックスの硬さによる細胞機能の制御 |
| 3. 学会等名<br>第72回日本細胞生物学会大会(招待講演)          |
| 4. 発表年<br>2020年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>倉田淳代, 高橋真助, 阿部雄一, 植田和光, 木村泰久, 木岡紀幸      |
| 2. 発表標題<br>SORBSファミリータンパク質が間葉系幹細胞の分化を調節するシグナル経路の探索 |
| 3. 学会等名<br>第72回日本細胞生物学会大会                          |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>増元亮裕、木村泰久、木岡紀幸                               |
| 2. 発表標題<br>光誘導性二量体化及び化学誘導性二量体化を用いた接着斑へのタンパク質の一過的局在化システム |
| 3. 学会等名<br>第93回日本生化学会大会                                 |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>鎌田一希、木村泰久、木岡紀幸            |
| 2. 発表標題<br>接着斑タンパク質ピネキシン は相分離に関与するか？ |
| 3. 学会等名<br>第93回日本生化学会大会              |
| 4. 発表年<br>2020年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>柴原正和、立花大、阿部雄一、木村泰久、植田和光、木岡紀幸          |
| 2. 発表標題<br>硬さ感知・応答に関する新規接着斑タンパク質の探索を目指したプロテオーム解析 |
| 3. 学会等名<br>第43回日本分子生物学会年会                        |
| 4. 発表年<br>2020年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田辺修平、柴原正和、立花大、木村泰久、木岡紀幸          |
| 2. 発表標題<br>細胞の細胞外マトリックスの硬さ感知に関与する新規タンパク質の同定 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>立花大、箕浦広大、長尾耕治郎、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題<br>接着斑細胞膜とGPMV法で単離した細胞膜の脂質組成の比較  |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会               |
| 4. 発表年<br>2020年                          |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>倉田淳代、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸        |
| 2. 発表標題<br>がん細胞の増殖と遊走に対するコラーゲンペプチドの効果 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会            |
| 4. 発表年<br>2020年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>増元亮裕、木村泰久、木岡紀幸                        |
| 2. 発表標題<br>化学誘導性二量体化を用いた PIP5K の接着斑一過的局在化システムの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                       |
| 4. 発表年<br>2020年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂田和樹、木岡紀幸、植田和光、木村泰久         |
| 2. 発表標題<br>リポソームを用いたヒトABCA1のステロール特異性解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会             |
| 4. 発表年<br>2020年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田辺修平、柴原正和、立花大、木村泰久、木岡紀幸          |
| 2. 発表標題<br>細胞の細胞外マトリックスの硬さ感知に關与する新規タンパク質の同定 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>坂田和樹、木岡紀幸、植田和光、木村泰久          |
| 2. 発表標題<br>ヒトABCA1の巨大リポソーム(GUV)再構成手法の確立 |
| 3. 学会等名<br>第14回トランスポーター研究会              |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木岡紀幸                         |
| 2. 発表標題<br>細胞外マトリックスの硬さと細胞遊走、分化の制御メカニズム |
| 3. 学会等名<br>第92回日本生化学会大会（招待講演）           |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>立花大、柴原正和、大町朋弘、箕浦広大、木村泰久、木岡紀幸  |
| 2. 発表標題<br>接着斑の細胞膜脂質の単離手法の確立と細胞内張力の影響の検討 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会  |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Noriyuki Kioka, Kodai Minoura, Tomohiro Omachi, Takafumi Ichikawa, Yasuhisa Kimura, Nozomu Kono, Yuta Shimanaka, Toshihide Kobayashi, Hiroyuki Arai, Kazumitsu Ueda |
| 2. 発表標題<br>Analysis on the lipid composition of plasma membrane in cell-ECM adhesion region  |
| 3. 学会等名<br>Gordon Research Conference "Cell Contact and Adhesion" (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋真助、黒田美都、阿部雄一、木村泰久、木岡紀幸              |
| 2. 発表標題<br>ピネキシンファミリータンパク質が間葉系幹細胞の分化を調節する分子基盤の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会          |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>立花大、柴原正和、大町朋弘、箕浦広大、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 |
| 2. 発表標題<br>接着斑細胞膜の単離手法の確立とピンキュリンの接着斑細胞膜への影響  |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会                    |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>柴原正和、阿部雄一、木村泰久、木岡紀幸                |
| 2. 発表標題<br>ピネキシン / CAP依存的に接着斑に局在するタンパク質の単離と解析 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2020年度大会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>倉田淳代、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸  |
| 2. 発表標題<br>がん細胞に対するコラーゲンペプチドの効果 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2020年度大会      |
| 4. 発表年<br>2020年                 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 京都大学細胞生化学研究室ホームページ<br><a href="http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/">http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/</a> |
|---|

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 |                           |                       |    |
|         | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|