

平成22年5月13日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790060
研究課題名（和文） 遺伝子配列特異的組換え酵素の創製と感染細胞でのHIV失活への展開
研究課題名（英文） Development of sequence-specific DNA recombinase towards silencing HIV-1 proviral gene activation.
研究代表者
野村 渉（NOMURA WATARU）
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号：80463909

研究成果の概要（和文）：本研究では亜鉛フィンガータンパク質融合型 DNA 組換え酵素を用いた標的遺伝子配列の切除反応について、反応効率の向上に向けた酵素デザインの検討を行った。ZFP モジュール数および DNA 結合親和性、もしくは酵素のリンカー長が反応効率に影響することが明らかになった。これらの知見に基づき、活性の高い DNA 組換え酵素のデザインに応用することで様々な遺伝子関連疾患の治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The gene knockout by the RecZFP would be a powerful tool for creation of knockout animal models or in regenerative medicine. For the design of efficient RecZFPs, effects of linker sequences between ZFPs and catalytic domains or binding affinity of ZFPs on recombination efficiency were addressed. The results implicate that turn over of the reaction have to be optimized by DNA binding of ZFPs to design efficient recombinases. The obtained information from this study would be important for the design of RecZFPs, which are useful for sequence-specific genome editing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学
キーワード：生化学

1. 研究開始当初の背景

| これまでの研究から、ほぼ全てのコドン配

列に対応する亜鉛フィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein; ZFP) のモジュールが作成されているため標的とする遺伝子配列に対して特異的に結合するドメインをデザインすることが可能である。DNA 修飾酵素の DNA 結合ドメインを ZFP に置換することで配列特異的に働く酵素の作製が注目されている。例として、Type IIS 制限酵素 *FokI* の DNA 結合ドメインを ZFP とした融合型酵素 (Zinc Finger Nuclease; ZFN) はこれまでに盛んに研究が行われている。ZFN はゲノム配列中のターゲット部位で二量体を形成後に二本鎖切断を起こす。切断後は短い挿入や欠損によって修復が行われる NHEJ (Non-Homologous End Joining)、または donor template を基に修復が行われる HR (Homologous Recombination) がある。ZFN による遺伝子ターゲティングは部位特異的に、また永久に植物や哺乳類細胞のゲノム上で二本鎖切断を介したゲノム修飾がなされる。X 連鎖重症複合免疫不全症の原因となる IL2R γ 遺伝子上に生じた変異部位を ZFN の標的とした研究では、変異ヒト細胞において 18% という反応効率 DNA の相同組換えを起こし、遺伝子修復されたヒト細胞が選択条件なしに得られ、そのうちの約 3 分の 1 では 2 対の染色体の両方で組換えを起こした。

また、HIV-1 侵入の主要なコレセプターである CCR5 の $\Delta 32$ の欠損が HIV-1 に対する耐性を獲得するという知見から ZFN で CCR5 の標的部位に変異を起こすことによる HIV-1 耐性の CD4 陽性 T 細胞を構築する研究も行われている。しかし、ZFN によるゲノム修飾においては触媒ドメインが非特異的に二量体を形成すると切断によって DNA 配列へ欠損や挿入などの変異が起こることから、細胞毒性や二本鎖切断後の配列の制御が難しい点が問題となっている。

そこで DNA 組換え酵素の働きに着目し、組換え酵素の DNA 結合ドメインを ZFP とした融合型酵素 (RecZFP) による特異的組換え反応を評価することを構想した。DNA 組換え酵素である Tn3 resolvase をはじめ部位特異的 DNA 組換え反応を行う酵素には Tyrosine recombinase family と Serine recombinase family がある。これら 2 つのファミリーは反応中間体としてタンパク質と DNA の共有結合を形成するアミノ酸残基にちなんで命名されている。Tyrosine recombinase は Holiday 結合中間体を形成するペア中で一本鎖切断と再結合を行うのに対して Serine recombinase はストランド交換と再結合に先立って二本鎖切断を行う。Tyrosine recombinase family には Cre や Flp などがある。Serine recombinase family には Tn3 や $\gamma\delta$ のようなトランスポゾンにコードされている *cointegrate-resolving recombinase* の resolvase と、*Salmonella* の鞭毛

の状態変化の役割をする Hin invertase や phage Mu が感染する際に働く Gin invertase などが存在する。これら 4 種類は触媒に直接関わる部位の配列や活性部位の構造などに関わる配列の保存性が高いことが明らかにされている。

Tn3 や $\gamma\delta$ は最初に resolvase の部位特異的組換えシステムが発見され、これまでに最も研究が行われてきた。 $\gamma\delta$ resolvase は X 線結晶構造解析がなされており、アミノ酸一次配列の相同性が非常に高い Tn3 においても同様の反応機構であると考えられている。resolvase が反応するためには、組換え部位の複合体と基質がネガティブスーパーコイル構造をとっている必要がある。

resolvase の典型的な反応では、繰り返しの 114 bp の *res sites* を含むスーパーコイル状態のプラスミドが 2 つの環状分子に分解され、それぞれが一カ所の *res site* を含む構造になる。次にアクセサリ結合部位の site II と site III が絡み合ったシナプス状の中間体の構造が 2 つの部位を近接させて 2 つの site I での鎖交換反応を進行させることにより分解が起こる。この反応機構では組換えに先立って 2 コピーの *res* を会合させて保持することが重要であり、結果としてシナプス状の複合体を形成する。アクセサリ部位の特異的な絡みつきは組換え中間体の選択に関与しており、その構造は resolvase が site I に結合することを活性化するために必要であると考えられる。この活性化が構造的なものであるか、もしくは site I に結合するとともに site II と site III への resolvase の接触がサブユニットを直接的に活性化するかについては明らかになっていない。

Tn3 resolvase の変異体解析により、反応条件を選択することで 2 つの *res sites* の必要性がなくなることが示され、28 bp のみの site I の切断で組換えを起こす変異体の単離に成功している。さらに野生型の resolvase と異なりこれらの変異体の活性は site への結合や基質 DNA のネガティブスーパーコイル状態に依存しないことが示された。このような特徴をもつ Tn3 変異体は遺伝子マニピュレーション、人為的な遺伝子編集のためのツールとしての応用が期待されている。

その応用例の一つとして HIV-1 プロウイルス遺伝子が挙げられる。HIV-1 の LTR 配列を標的として Cre 変異体を用いてプロウイルス遺伝子の除去を行った研究が報告されているが、この例では Cre の認識配列が標的配列に含まれているモデル遺伝子を使用しているため、本来のプロウイルス遺伝子を標的にはできない。HIV はレトロウイルス科レンチウイルスに属しており、宿主細胞に対して感染をした場合に逆転写酵素によってウイルス RNA から遺伝子が合成され、それが宿主

のゲノム遺伝子に挿入される。このようなレトロウイルスの特性に対して、標的とする遺伝子配列を切除できる組換え酵素技術を用いることでウイルス活性の抑制が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、RecZFP の標的配列に特異的な組換え反応をゲノム遺伝子に対して応用することで新たな遺伝子抑制方法を開発することを目的として最適な活性を有する組換え酵素デザインを行うための基礎研究を目的とした。

応用例として挙げている HIV-1 感染症における治療法として現在では薬剤を用いた HAART 療法が成果を上げているが、耐性ウイルスの出現や、体内からウイルスを完全に除去することが困難であり根本的な治療法が未だに開発されていないことが問題とされる。RecZFP を用いたプロウイルス遺伝子を標的とする遺伝子抑制法ではこれらの問題の解決につながると考えられる。RecZFP による反応では、反応後の遺伝子配列が制御可能な点、また能動的組換え反応が可能で宿主細胞内の HIV-1 プロウイルスの除去に適していると考えられるため、体内ウイルス量を減少させることが期待される。

本論ではまず、HIV-1 プロウイルス遺伝子の中で比較的保存性の高い gag 遺伝子を標的配列として、標的配列に結合する ZFP の遺伝子の作製を行い、それらの融合酵素として RecZFP を構築する。RecZFP の活性に対して影響を与える要素として、特に ZFP の DNA 結合親和性、および酵素ドメインと ZFP をつなぐリンカー配列が重要であると考えられるため、さまざまな変異体を構築し、大腸菌内、および哺乳類細胞内での反応効率を評価することを計画した。最終的にはゲノム遺伝子に対して高い反応効率で働く融合酵素を理論的かつ容易に設計するにたる組み立てだった知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

RecZFP の標的配列については当研究室で既に探索済みの配列候補から選択した。これまでに構築された ZFP モジュールを組み合わせた標的配列候補の探索は、HIV-1 プロウイルス株の HIV NL4-3 M19921 の gag 遺伝子領域内より計算ソフト (Zinc Finger Tools) を用いて行った。標的配列候補のうち HIV NL4-3 M19921 と 4 種の変異株 (HIVJRCF M38429, HIVJRFL U63632, HIVLAIJ19 A04321, HXB2 AF033819) の gag 遺伝子において相同性の高い配列中で ZFP との結合親和性が確認できていた Site 6 を標的配列とした。本研究で構築した組換え反応系では Site 6 を ZFP 結合部位とし、組換え酵素 Tn3 が活性

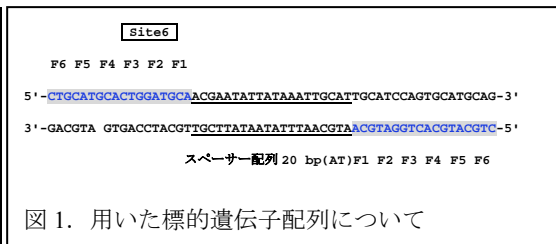


図 1. 用いた標的遺伝子配列について

を示すことが明らかにされている既知配列をスペーサー配列とした (図 1)。標的配列に結合する ZFP の作製は各コドン配列に対応する ZFP モジュールをコードした pc3 XB プラスミドベクターを基にして 2~6 個の ZFP モジュール遺伝子を連結したプラスミドを作製した。pc3 XB ベクターは Addgene の pc3 XB ZF58-106 (Barbas modules) を使用した。まず、F1 遺伝子をコードするプラスミド pc3 XB-F1 を *AgeI/BamHI* で制限酵素切断した後に脱リン酸化処理を行った。これに pc3 XB-F2 より *XmaI/BamHI* フラグメントとして切り出した F2 遺伝子を T4 ligase により挿入し、F1 遺伝子の 3' 側に F2 遺伝子を持つ pc3 XB F1/F2 を得た。同様の操作を繰り返し、2F~6F の配列を持つプラスミドを作製した (図 2.3)。

ZFP と標的配列の結合親和性を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により評価するためにマルトース結合タンパク質 (Maltose binding protein: MBP) と ZFP の融合タンパク質 (MBP-ZFP) の発現と精製を行った。タンパク質発現用の pMAL-p4x プラスミドベクターに ZFP 遺伝子配列を導入するために、マルチクローニングサイト (Multi cloning site; MCS) を改変して ZFP 遺伝子配列が N 末端側から挿入可能にした。目的とする MBP-ZFP を発現後に大腸菌を破碎して抽出したタンパク質溶液から MBPTrap™ HP 1 mL (GE Healthcare) により MBP-ZFP を精製し、SDS-PAGE によりタンパク質の精製度を確認した。精製したタンパク質の濃度測定は Bradford 法で行った。得られた MBP-ZFP を用いて、2F~6F の ZFP と標的 DNA 配列との結合親和性をサンドウィッチ ELISA 法により評価した。ストレプトアビジンをコーティングした 96 穴プレート上に、ヘアピン構造によって二重らせん構造をとる標的配列 (Zinc finger Binding Site: ZBS) を 5' 末端に導入したビオチンで固定した。標的配列に結合した MBP-ZFP を一次抗体の anti-MBP 抗体で検出し、さらに二次抗体の anti-IgG 抗体で検出する。二次抗体には alkaline phosphatase が付加されているので、基質の *p*-nitrophenyl phosphate を添加してその発光を分光光度計によって検出した。測定は反応 30 分後にプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定した。また、それを基に各 MBP-ZFP の DNA 結合親和性を定量的に求めた。

ELISA 法によって標的配列に対する結合

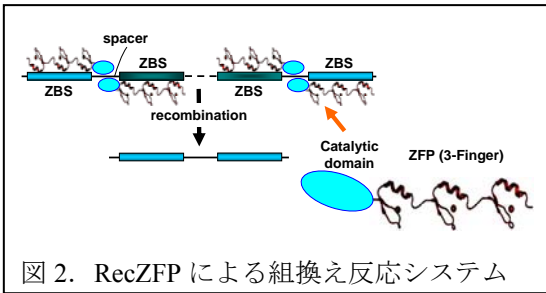


図 2. RecZFP による組換え反応システム

親和性が確認された ZFP を用いて大腸菌内での組換え反応系を構築し、反応効率の評価を行った。RecZFP は組換え酵素 Tn3 resolvase の触媒ドメインと ZFP を融合した。Tn3 は 2 つのドメインに機能が独立している。N 末端の 140 アミノ酸の触媒ドメインに短いリンカー配列によって 40 アミノ酸から構成される DNA 結合ドメインが付加されている。触媒ドメインと DNA 結合ドメインの機能が独立しているため、DNA 結合ドメインを ZFP に置換して新たな標的配列特異性を有する融合型酵素を創製できる。RecZFP による組換え反応の概略は図 2 に示した。RecZFP の ZFP が標的部位に結合することで、触媒ドメインが spacer で二量体を形成し、四量体に会合する際に組換えが起こった結果 zinc finger binding site (ZBS) の間に存在する配列が切除される。構築した組換え反応システムでは、作製したプラスミドを大腸菌に導入し、シングルコロニーを一定時間培養することでプラスミドの上流にコードされている RecZFP が発現し、下流の標的配列で組換えが起きて生成した短いプラスミドを PCR と制限酵素処理によって評価した。Tn3 resolvase の触媒ドメインは R2A, E56K, G101S, D102Y, M103I, Q105L という 6 箇所の変異が導入された NM-resolvase を用いており、3 アミノ酸 (GSG) から成るリンカー配列を介して ZFP を融合させた。

作製したプラスミドは大腸菌 Top10 にエレクトロポレーションにより形質転換し、得られたシングルコロニーを一定時間培養後、精

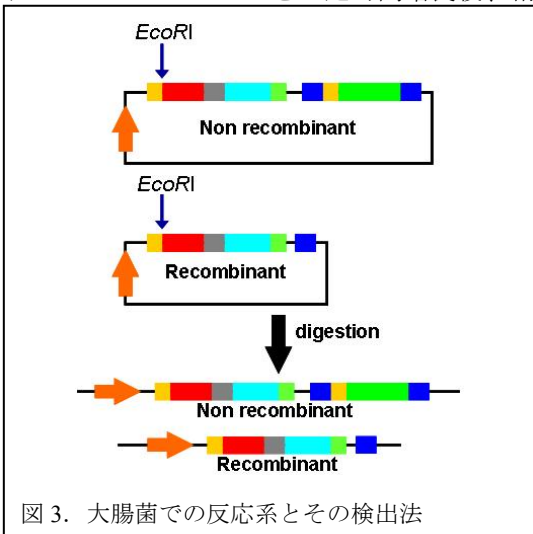


図 3. 大腸菌での反応系とその検出法

製したプラスミドを RecZFP ドメインと標的配列の外側のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物の長さの違いにより組換え反応の進行を判断できる。また、定量的な検出として制限酵素による切断で生成するフラグメント量で検討を行った (図 3)。

6F の RecZFP において、リンカー長を変化させた変異体の組換え効率について検討を行った。検討した長さは、-6, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 アミノ酸で構成される 8 種類のリンカーを用意した。-3, -6 アミノ酸リンカーは酵素の触媒ドメイン配列から欠損させている。組換え反応効率の評価は同様に PCR と制限酵素切断を用いて行った。

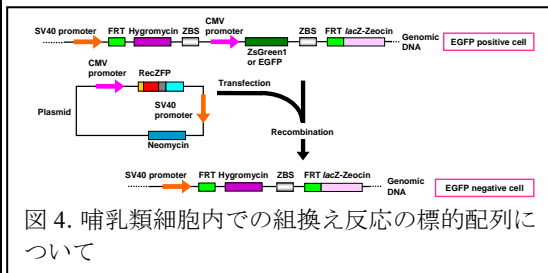


図 4. 哺乳類細胞内での組換え反応の標的配列について

哺乳類細胞細胞内での組換え反応評価では、Invitrogen 社の Flp-In システムを用いてゲノム遺伝子に標的配列と蛍光タンパク質 (EGFP) のコード配列を有する CHO-K1 細胞株を樹立した (図 4)。樹立した細胞株へ RecZFP をコードするプラスミド DNA をトランスフェクションすると細胞内で発現した RecZFP が標的配列で組換え反応を起こし、EGFP 遺伝子が除去され、蛍光タンパク質の発現が失われる。細胞内ゲノムには 1 コピーの標的配列と蛍光タンパク質のみが存在するため、蛍光タンパク質遺伝子がノックアウトされて蛍光が消失している細胞数をカウントすることで組換え効率を定量できる。こ

	2-Finger (2F)	3-Finger (3F)	4-Finger (4F)	5-Finger (5F)	6-Finger (6F)
K_d (nM)	160 ± 19	24 ± 4	13 ± 1	14 ± 2	13 ± 1
R^2	0.92	0.87	0.94	0.94	0.94

表 1. 標的配列に対する ZFP の DNA 結合親和

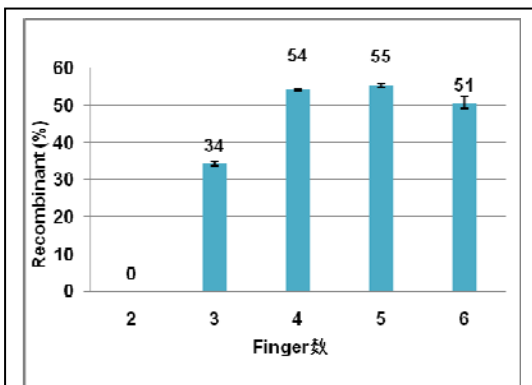


図 5. 亜鉛フィンガー数の違いによる組換え反応効率の変化について

の解析にはフローサイトメトリー (Flow Cytometry; FACS) を用いた。

4. 研究成果

ELISA 法の結果より、ZFP モジュール数によって DNA 結合親和性 (K_d) が 10~200 nM であることが明らかになった (表 1)。また ZFP モジュール数の増加に従って DNA の結合親和性が上昇する傾向が示された。特に ZFP モジュール数が 4~6 個で $K_d = 13$ nM 程度の高い結合親和性が得られた (表 1)。

これらの ZFP と Tn3 酵素ドメインの融合体を構築した後に大腸菌にプラスミド遺伝子を導入して組換え効率の定量を行った結果、2F 以外では組換え反応が確認できた。特に 4F~6F では 50% 前後の組換え効率を示された。この結果から組換え反応効率と DNA 結合親和性と間に正の相関があることが考えられた (図 5)。組換え反応を確認するために反応後に回収したプラスミド遺伝子のシーケンス解析を行った結果、ZBS 間の遺伝子が組換えによって除去されていることがわかった。

リンカー長を変化させた RecZFP についても同様の反応を行い、シーケンス解析によって -3, -6 アミノ酸リンカー以外の変異体で組換え反応が確認された。Restriction enzyme assay の結果から 0 アミノ酸リンカーの時に組換え効率が最大になることが明らかになった (図 6)。

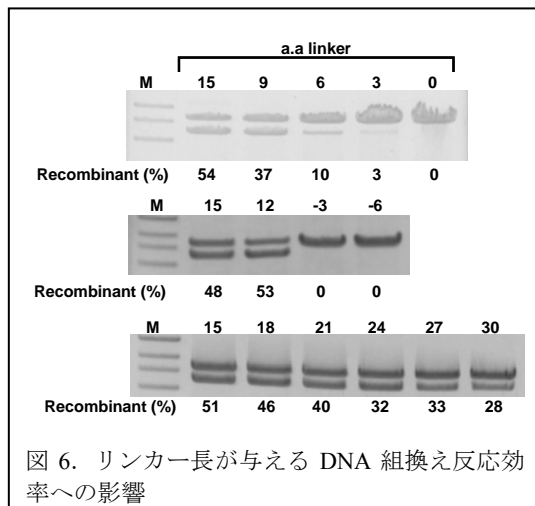


図 6. リンカー長が与える DNA 組換え反応効率への影響

哺乳類細胞内への RecZFP の導入は核移行シグナル (NLS) 配列と FLAG タグ配列を C 末端に付与したコード遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに導入したものをトランスフェクションにて細胞内へと導入した。CHO-K1 細胞内での RecZFP の発現はウエスタンブロッティング法で anti-FLAG 抗体によって検出した。

RecZFP の細胞内導入効率はプラスミドベクターに IRES 配列を介して DsRed monomer 遺伝子を導入しているため、DsRed の発現に

て確認できる。プラスミド遺伝子導入後、42 時間後にフローサイトメーターにて EGFP および DsRed の発現を定量し、EGFP の発現量をノーマライズすることで定量した。RecZFP にはコントロールとして標的配列に結合しない RecZFP を用い、また標的配列に結合する 2F~6F の recZFP を用いた。その結果、大腸菌での反応と同様、DNA 結合親和性の向上に従って、組換え反応効率も向上することが示された (図 7)。

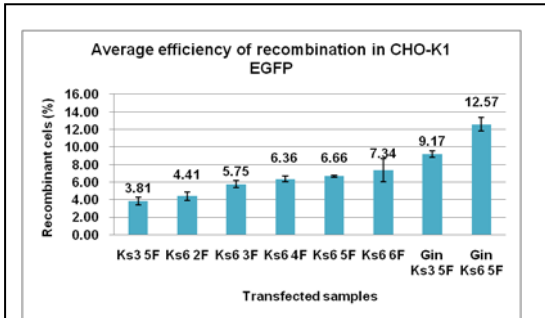


図 7. 哺乳類細胞内での組換え反応効率について

RecZFP による組換え反応は能動的反応が行えること、また確実なノックアウトが行えることから本研究に最適であると考えられた。本論では HIV-1 プロウイルス遺伝子の中で比較的保存性の高い gag 遺伝子に組換え酵素が反応性を示すスペーサー配列を予め導入したモデル配列を用いた。まず標的配列に結合する 2~6 個の ZFP モジュールを作製した。結合親和性を確認した ZFP を DNA 組換え酵素 Tn3 の DNA 結合ドメインと置換した融合型酵素がプラスミド上のモデル配列に対して組換え反応を行うのかについて大腸菌内で評価した。2~6 個の ZFP モジュールの RecZFP ならびに酵素のリンカー長を変化させた変異体を用いて組換え効率の検討を行った結果 50% 程度の組換え効率を得ることができた。プラスミド DNA による一過性の RecZFP の発現によって哺乳類細胞内での組換え反応が確認されたことから、今後はさらに効率の高い組換え反応を行う RecZFP の最適化が期待できる。

このような哺乳類細胞内での標的配列特異的な DNA 組換え反応を HIV-1 プロウイルス遺伝子の除去に応用することで HIV-1 感染症の新規治療法の開発への貢献が期待できる。また HIV-1 感染症の治療法にとどまらず、RecZFP を用いた組換え反応は遺伝子ノックアウトによる遺伝子抑制法が期待できることから幅広い遺伝子治療法への応用が可能であると考えられる。

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9件)

- 1) Yamada Y, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H, *et al.* CD4 mimics targeting the mechanism of HIV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20; 354-358, 2010.
- 2) Tsutsumi H, Nomura W, Tamamura H, *et al.* Fluorogenically Active leucine zipper peptides as new tag-probe pairs for protein imaging in living cells. *Angew Chem., Int. Ed.* 48; 9164-9166, 2009.
- 3) Tanaka T, Nomura W, Fujii N, Tamamura H, *et al.* Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. *Org. Biomol. Chem.* 7; 3805-3809, 2009.
- 4) Ohashi N, Nomura W, Tamamura H, *et al.* Synthesis of protein kinase C δ C1b domain by native chemical ligation methodology and characterization of its folding and ligand binding. *J. Pept. Sci.* 15; 642-646, 2009.
- 5) Nomura W, *et al.* Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-based Screening *Bioconjugate Chem.* 19; 1917-1920, 2008.
- 6) Tanaka T, Nomura W, Tamamura H, *et al.* Structure-activity Relationship Study of CXCR4 Antagonists Bearing the Cyclic Pentapeptide Scaffold: Identification of the New Pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6; 4374-4377, 2008.
- 7) Tamamura H, Nomura W, *et al.* A Future Perspective on the Development of Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 1155-1166, 2008.
- 8) Tamamura H, Nomura W, *et al.* Exploratory Studies on Development of the Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists Toward Downsizing *Perspectives in Medicinal Chemistry* 2; 1-9, 2008.
- 9) Nomura W, *et al.* Site-Selective Cytosine Methylation By A Split DNA Methylase *Peptide Science* 2008 1; 491-492, 2008.

[学会発表] (計12件)

- 1) Tanaka T, Nomura W, *et al.* Chemical biology approach utilizing novel bivalent ligands for GPCR CXCR4 leads to the elucidation of a dimeric structure. The 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium 2009年11月8-11日 Jeju Island, Korea
- 2) 玉村啓和, 野村 渉など ペプチドミメティックを基盤とした阻害剤と新規概念によるワクチン 第82回日本生化学会大会

シンポジウム 2009年10月21日 神戸

- 3) Ochiai C, Nomura W, Tamamura H, *et al.* Development of CD4 mimic small molecules targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV entry 第10回熊本エイズセミナー 2009年9月28-29日 熊本
- 4) 田中智博, 野村 渉, 玉村啓和など リバースからフォワードへケミカルゲノミクスを基盤とした抗HIV剤の創製第46回ペプチド討論会 2009年11月4-6日 北九州
- 5) 中西勇太, 野村 渉, 玉村啓和などペプチドライブラリーを基にしたHIV-1インテグラーゼに対する阻害剤の創製 第28回メディシナルケミストリーシンポジウム 2009年11月25-27日 東京
- 6) 野村 渉, 玉村啓和など 合成抗原ペプチドによるHIV-1 gp41の三量体構造を認識する抗体の誘導 日本薬学会第130年会 2010年3月28-30日 岡山
- 7) 鳴海哲夫, 野村 渉, 玉村啓和など HIV-1 外被タンパク質gp120の構造変化誘起を指向した低分子CD4ミミックの構造活性相関研究 日本薬学会第130年会 2010年3月28-30日 岡山
- 8) 橋本知恵, 野村 渉, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和など エイズワクチンを指向した宿主受容体CXCR4 由来抗原分子の創製 日本薬学会第130年会 2010年3月28-30日 岡山
- 9) 野村 渉 Development of Site-Specific Split DNA Methylase 日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会 2008年5月20日 学術総合センター・東京
- 10) 野村 渉 分子進化法による配列特異的DNA組換え酵素の機能最適化 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム2008年9月18日 東京工業大学・神奈川
- 11) 野村 渉 Site-Selective Cytosine Methylation By A Split DNA Methylase 第45回ペプチド討論会 2008年10月30日 船堀タワーホール・東京
- 12) 野村 渉 配列特異的DNA組換え酵素におけるDNA結合親和性が及ぼす組換え反応効率への影響 日本薬学会第129年会2008年3月26日 京都国際会館・京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 渉 (NOMURA WATARU)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：80463909

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし