

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 5月 7日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570142

研究課題名（和文） 植物シトクロム b561 の膜貫通電子伝達反応制御機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of transmembrane electron transfer catalyzed by a plant cytochrome b561

研究代表者

鏑木 基成 (TSUBAKI MOTONARI)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00145046

研究成果の概要（和文）：植物液胞膜に存在するシトクロム b561 の生理的役割とアスコルビン酸由来膜貫通電子伝達の分子機構を明らかにするため、アルコール資化性酵母 *Pichia pastoris* 細胞を用いた異種発現系を利用したトウモロコシシトクロム b561 の研究を行った。精製した部位特異的の変異体について stopped-flow 法及び pulse-radiolysis 法によるアスコルビン酸、モノデヒドロアスコルビン酸ラジカルとの電子伝達反応を詳細に解析し、動物神経系 b561 に類似した分子メカニズムの存在を証明し、保守性アミノ酸がアスコルビン酸特異的膜貫通電子伝達反応において重要な役割を持っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated *Zea mays* cytochrome b561 by employing the *Pichia pastoris* expression system to clarify the physiological roles of plant vacuole cytochromes b561 and the molecular mechanisms of their ascorbate-specific transmembrane electron transfer. We succeeded in expression and purification of *Zea mays* cytochrome b561. The detailed analyses of the electron transfer reactions with ascorbate and monodehydroascorbate radical by stopped-flow and pulse-radiolysis methods indicated that *Zea mays* cytochrome b561 has a similar molecular mechanism with that of animal neuroendocrine cytochrome b561 and that conserved amino acid residues have important roles for such ascorbate-specific transmembrane electron transfer reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：金属タンパク質、アスコルビン酸、シトクロム b561、ヘムタンパク質、電子伝達反応、ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

①シトクロムb561プロテインファミリー
植物では液胞が細胞内に取りこまれた金属

イオンの貯蔵において重要な役割を果たしていると考えられる。実際、Ctr1に相同性のあるCtr2が酵母液胞膜に、また、植物液胞膜

(tonoplast)にはABCトランスポーターの鉄 Fe^{2+} キレート輸送タンパク質IDI7が存在していることが報告されており、またFre1に相同な液胞膜特異的な酸化型金属還元酵素の存在も報告されている。これらのFreファミリーによる酸化型金属還元酵素反応は、細胞質中のNADPHの電子当量に由来する膜貫通電子伝達反応により遂行されている。これらの液胞膜に存在する金属還元酵素は液胞内に水酸化鉄(III) oxyhydroxide polymerとして蓄積していると思われる Fe^{3+} を還元することにより細胞質への輸送を促進することであると考えられる。このように植物での金属イオンの獲得、輸送、蓄積という機能発現において膜貫通電子伝達による金属イオンの酸化還元は非常に重要な役割を持っている。最近、これらFreファミリー型金属還元活性を持つ酵素とは全く異なったタンパク質ファミリーであるシトクロム b561 (以下b561)によるアスコルビン酸(以下、AsA)由来膜貫通電子伝達系の存在が注目されている。b561は分子中に2個のb型ヘムを持つ6回膜貫通タンパク質であり、元来は動物副腎髄質クロマフィン小胞膜に見出され、神経伝達物質ノルアドレナリンやアミド化神経ペプチドの生合成に必要な電子当量の膜貫通輸送を行うことが知られていた。細胞質のAsAが電子当量の源泉となる。しかし近年のゲノムプロジェクトの進行に伴い、種々のシトクロムb561が存在することが明らかとなり、これらのb561は真核細胞において一大タンパク質ファミリーを形成していることが明らかとなった。高等動物には通常6種類のb561が存在している。非常に興味深いことに、動物小腸絨毛細胞膜に存在するb561のDeytbは細胞質AsA由来の電子当量を用いて、絨毛細胞外部の Fe^{3+} を還元する酸化鉄還元活性を示し、同じ細胞膜中に存在する2価の金属イオンを輸送するDMT1による鉄イオンの細胞内への取り込みに関与することが報告されている。この他に網状赤血球膜にもDeytb、動物細胞中のlysosome膜中に存在するLb561の存在が報告されている。後者2つが直接に鉄イオンの取り込み・保存・細胞内での輸送過程に関与しているという証拠は今のところ乏しいが、何れのb561種も酸化鉄還元活性を持っていることが報告されている。

②植物シトクロムb561の存在と生理的役割
植物では動物細胞より遙かに多数種のシトクロムb561が存在している。例えば*A. thaliana*の場合15種類のb561が存在し、*O. saliva*(イネ)の場合にも同程度の種類の存在が知られている。これらの植物のb561も

おそらく酸化鉄還元活性を持つと思われる。しかしこれら多数の分子種が実際上どのような生理的役割をもっているのか、細胞膜、ER膜、液胞膜のどこに存在するのか、各植物組織での分布はどうか、多数の分子種が存在する理由は何なのか、といった基本的な問に対する知見はほとんど得られていない。本研究は植物b561の生理的役割とAsA由来膜貫通電子伝達のメカニズムを、メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を用いた大量発現系を利用して得られたトウモロコシ(*Zea mays*)由来b561を用いて分子生物学的・生化学的・生物物理学的に解析しようとするものである。このb561は元来トウモロコシの芽生えの根部分に由来するcDNAライブラリーより得られた分子種であり、この分子種と非常に相溶性の高い*A. thaliana*の分子種が液胞膜に存在していると報告されていることから、同様に液胞膜中に存在している可能性が高い。このことはこの*Zea mays* b561がその酸化鉄還元活性により液胞における Fe^{3+} の還元反応に関与している可能性が考えられる。この*Zea mays* b561が植物液胞中での鉄イオンの貯蔵と利用(細胞内移動)の過程に深く関与するとの仮説に基づいて本研究計画を提案した。

2. 研究の目的

植物細胞膜あるいは液胞膜に多数種存在するシトクロム b561 の生理的役割とアスコルビン酸 (AsA) 由来膜貫通電子伝達の分子機構を明らかにするため、アルコール資化性酵母 *Pichia pastoris* 細胞を用いた異種発現系を利用した研究を行う。トウモロコシ *Zea mays* におけるシトクロム b561 がその酸化鉄還元活性により液胞における Fe^{3+} の還元反応に関与している可能性が考えられる。この *Zea mays* シトクロム b561 が植物液胞中での鉄イオンの貯蔵と利用(細胞内移動)の過程に深く関与するとの仮説を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

上記の研究目的を解明するため、下記の研究項目を行った。

- ① X線結晶構造解析に基づく膜貫通電子伝達機構の解明
- ② 部位特異的変異導入によるトウモロコシ *Zea mays* b561 電子伝達の分子機構の解明
- ③ *Zea mays* b561 の生理的役割の解明
- ④ 組織特異的分布、細胞内分布の解明
- ⑤ シトクロム b561 プロテインファミリーに属する動物 b561 (特にヒト由来の 101F6 及び CYB561D1) との比較検討

4. 研究成果

- ① X線結晶構造解析のための結晶化を行ったが、十分量の標品を得る事ができなかったため、初期的な試みのみを行うに留まった。
- ② 位特異的変異導入によるトウモロコシ *Zea mays* b561 電子伝達の分子機構解明については、下記の2項目について詳細な研究を行い、新たな研究成果を得た。2つの項目に分けて、詳細に成果を記述する。
- ③ 「*Zea mays* b561 の細胞質側部位における AsA との結合部位は存在するのか?」 動物神経系と植物に存在する b561 に共通する細胞質側モチーフが見出されており、この保存性配列 (Tyr71 等) は同じく細胞質側に存在する保存性塩基性アミノ酸残基 (Lys83, Arg72 等) と共に AsA 結合部位を形成していると考えられる。これらの残基の持つ正荷電が負に荷電している AsA 分子の特異的結合に重要と考えられる。既に我々はこれらの保存性部位を置換した変異体を作製・精製し、主に、stopped-flow 法 (及び pulse radiolysis 法) による測定・解析結果を報告している。K83A, K83D, K83E の変異体での AsA からの電子受容の顕著な遅れが観測された。しかし、R72A, R72D, R72E の変異体の場合には野生型で見られた pH 依存性の極端な電子伝達の遅れ (AsA からのプロトンの引き抜きが遅れる結果、AsA からヘム鉄への電子伝達に極端な遅れが見られるようになる) が観測されなくなることが分かった。このことは、Arg72 残基が AsA との直接の結合よりもむしろプロトンの移動に関与している可能性が高いことを示している。また Tyr71 も AsA からのプロトン脱離・輸送において、重要な機能をもつことが推定された。これらの分子メカニズムの詳細を部位特異的変異体についてのモデル構造を用いて議論した。
- ④ 「*Zea mays* b561 において細胞質側ヘムから小胞内側ヘムへの電子伝達反応はどの様に遂行されるのか?」 AsA から細胞質側ヘムに渡された電子当量は b561 を構成する 6 本の \cdot -helix の束を通して小胞内側のヘムに伝達される。これら 2 つのヘムは膜の両側に位置するためヘム間距離は相当大きく、生理的に意味のある電子伝達が起こりうるとされるエッジ-エッジ間距離 16Å 以内とされるぎりぎりの距離程度であると推定される。pulse radiolysis の実験において、ヘムの再還元過程は実際上、細胞質側ヘムから小胞内側ヘムへの電子伝達過程を観測していると推定される。このことを検証するため、6 本の \cdot -helix の束の内部に位置する保存性残基 Trp, Phe, Gln の部位特異的変異体の作製と pulse radiolysis 法 (及び stopped-flow 法) による解析を行うこととした。これにより、膜貫通電子伝達が bond-to-bond でおこなわれているのか、あるいはこれら芳香族ア

ミノ酸残基をつなぐ space-to-space の形をおこなわれているのかの判定も可能となると推定された。

本研究での具体的な変異導入箇所としては、2 つのヘムの中間に位置し、分子内電子伝達に関与していると思われる膜貫通ヘリックス 4 において高度に保存されている Gln134 残基、Trp135 残基、及び Phe142 残基を選んだ。それぞれの部位について 3 種、ないしは 4 種、合計 10 種の部位特異的変異体 (Q134Y, Q134F, Q134A, W135A, W135L, W135F, W135Y, F142Y, F142W, F142A) を発現するための遺伝子発現用プラスミドの構築を行い、各変異体について酵母 *Pichia pastoris* での発現・精製・解析を行った。pulse radiolysis 法 (及び、stopped-flow 法) による電子伝達解析においては、どの変異体においても、MDA ラジカルへの電子伝達速度についてわずかながらの速度低下が見られた。特に W135A が顕著であった。一方、一旦 MDA ラジカルにより酸化したヘムが周囲の AsA により再び還元される過程においても電子伝達速度のわずかの低下が見られた。この再還元過程は実際上は 2 つのヘムの間のヘム間電子伝達反応に相当する過程であることが分かっている。今回注目した Gln134 残基、Trp135 残基、Phe142 残基の側鎖はいずれも、その芳香環を小さな側鎖に置換した場合であっても、あるいは逆に新たな芳香環を導入した場合であっても、その置換に伴う ϵ_2 への影響が予想よりも小さいものであった。このような予想外の結果が得られた原因として次の様な可能性が考えられた。芳香族アミノ酸から類似のアミノ酸への置換では Trp 残基のかさ高さによる影響 (特に W135A 変異体の場合) が見られたことから、膜貫通電子伝達反応に直接的に影響するものではなく、むしろ保存性芳香環側鎖が b561 タンパク質全体の構造維持 (特に \cdot -helix の束を維持する役割) への寄与が大きいのではないかと考えられた。よって、シトクロム b561 における膜貫通電子伝達の際の経路は芳香環を space-to-space でホッピングする機構よりむしろ、ペプチド主鎖をトンネル効果により伝達する機構をとっている可能性が大きいことが示唆された。

⑤ *Zea mays* b561 の生理的役割の解明 この項目については、部位特異的変異体の解析に重点をおいたために十分な解明を行うことができなかった。しかし、動物神経系に存在するシトクロム b561 と同様な分子メカニズムにより細胞質 AsA に由来する電子当量の膜貫通電子伝達反応を行っていることは十分に証明できたと考えられる。

⑥ 組織特異的分布、細胞内分布の解明 この項目については、得られた特異的抗体の活性・及び特異性・量が不十分であったため、十分な解析を行う事ができなかった。

⑦ シトクロム b561 プロテインファミリーに属する動物 b561 (特にヒト由来の 101F6 及び CYB561D1) との比較検討 この項目については、ヒト由来の 101F6 及び CYB561D1 の酵母 *Pichia pastoris* での大量発現・及び精製方法の確立に成功したので、かなり詳細な比較検討を行う事ができた。101F6 及び CYB561D1 は *Zea mays* b561 (あるいは動物神経系 b561) とは異なるサブファミリー (前者 2 つは A-サブファミリーに属するが、後者 2 つは E-サブファミリー) に属し、互いの間のアミノ酸配列の相同性は 30% 以下程度であるためか、相当に異なった分子的・機能的性質を示した。具体的な研究成果については下記の発表論文を参照していただきたい。

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 6 件)

- ① “Electron transfer reactions of candidate tumor suppressor 101F6 protein, a cytochrome b_{561} homologue, with ascorbate and monodehydroascorbate radical”, Mariam C. Recuenco, Md. Motiur Rahman, Fusako Takeuchi, Kazuo Kobayashi, and Motonari Tsubaki, *Biochemistry*, 査読有り, (2013) (in press).
- ② “Roles of conserved Arg⁷² and Tyr⁷¹ in the ascorbate-specific transmembrane electron transfer reactions catalyzed by *Zea mays* cytochrome b_{561} ”, Motiur Md. Rahman, Nobuyuki Nakanishi, Toshiharu Hase, Sam-Yong Park and Motonari Tsubaki, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有り, 115(5), 497-506 (2013), doi:10.1016/j.jbiosc.2012.11.013.
- ③ “Functional characterization of the recombinant human tumor suppressor 101F6 protein, a cytochrome b_{561} homologue”, Mariam C. Recuenco, Md. Motiur Rahman, Yoichi Sakamoto, Fusako Takeuchi, Hiroshi Hori, and Motonari Tsubaki (2013) *J. Biochem.*, 査読有り, 153(2), 233-242, doi:10.1093/jb/mvs139
- ④ “Interaction of modified tail-anchored proteins with liposomes: effect of extensions of hydrophilic segment at the COOH-terminus of holo-cytochromes b_5 ”, Yoichi Sakamoto, Masahiro Miura, Fusako Takeuchi, Sam-Yong Park, Motonari Tsubaki, *J. Biosci. Bioeng.* 査読有り, 113 (3), 322-331 (2011), doi:10.1016/j.jbiosc.2011.11.004.

- ⑤ “Properties of human tumor suppressor 101F6 protein as a cytochrome b561 and its preliminary crystallization trials”, Mariam C. Recuenco, Suguru Watanabe, Fusako Takeuchi, Sam-Yong Park, and Motonari Tsubaki; in “*Tumor Suppressor Genes*” (ISBN 978-953-307-879-3) (In-Tech), 査読有り, DOI: 10.5772/29306, pp. 295-308 (2011).
- ⑥ “Direct electrochemical analyses of human cytochromes b_5 with a mutated heme pocket at a gold electrode modified with γ -mercaptopropionic acid”, Tomomi Aono, Yoichi Sakamoto, Masahiro Miura, Fusako Takeuchi, Hiroshi Hori, and Motonari Tsubaki (2010), *J. Biomed. Sci.*, 査読有り, 17, 90 (15 pages), doi:10.1186/1423-0127-17-90.

[学会発表] (計 26 件)

- ① “線虫 cytochrome b_{561} ファミリーの生理機能解析”, 平野友里恵、三浦雅央、鏗木基成、[若手フロンティア研究会 2012] 神戸大学研究基盤センター、(P003) (神戸、2012. 12. 25)
- ② “キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の生合成に必須なペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素の機能解析”, 中井忠志、伊藤寛人、岡嶋俊英、小林一雄、高橋康弘、堀洋、鏗木基成、谷澤克行、第 85 回日本生化学会大会、(3T03-08) (2P-370) (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012. 12. 15)
- ③ “ヒト癌抑制遺伝子候補タンパク質 101F6 の分子機能”, 鏗木基成、岡野弘明、武内総子、Mariam C. Recuenco、小林一雄、堀洋、第 85 回日本生化学会大会、(2P-327) (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012. 12. 15)
- ④ “ヒト cytochrome b_{561} ファミリータンパク質 CYB561D1 の発現・精製とその性質”、田中涼、朝田晃一、鏗木基成、第 85 回日本生化学会大会、(2P-352) (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012. 12. 15)
- ⑤ “新規アドレノドキシシン類似タンパク質 Adx3L のクローニングとその細胞内局在”、古家圭人、三浦雅央、朝田晃一、堀洋、鏗木基成、第 85 回日本生化学会大会、(2P-351) (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012. 12. 15)
- ⑥ “線虫 cytochrome b_{561} ファミリーの生理機能解析”, 平野友里恵、三浦雅央、鏗木基成、第 85 回日本生化学会大会、(2P-350) (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012. 12. 15)
- ⑦ “鉄の取り込みにおける線虫 cytochrome b561 の生理的役割”, 三浦雅央、鏗木基成、

第 85 回日本生化学会大会、(2P-364) (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、2012. 12. 15)

⑧ “膜貫通部位特異的変異体を用いた植物 cytochrome b_{561} の電子伝達機構解析”, 三浦雅央、田中涼、亀井美奈、藤戸優充、小林一雄、鏝木基成、第 39 回生体分子科学討論会、東北大学 (宮城県仙台市・東北大学・片平キャンパス、2012. 6. 9-10)

⑨ “バイオナノ空間場における反応活性種のダイナミクス”、鏝木基成、平成 23 年度物質・デバイス共同研究拠点特定研究[B-4] 研究集会 【バイオメディカルデバイス・システム創製に資する要素技術の開発研究】大阪大学 産業科学研究所 講堂、2012 年 3 月 13 日 (13:30-19:00)

⑩ “*Zea mays* cytochrome b561 膜貫通部位変異体における電子伝達機構の解析”、田中涼、亀井美奈、鏝木基成、「若手フロンティア研究会 2011」神戸大学研究基盤センター、(P061) (神戸、2011. 12. 22)

⑪ “ヒト癌抑制遺伝子候補タンパク質 101F6 の機能と構造”、渡邊優、レクエンコマリアム、武内総子、小林一雄、鏝木基成、第 84 回日本生化学会大会、(2P-0246)、京都国際会館(京都、2011. 9/21-9/24)

⑫ “肝臓特異的アドレノドキシソニン類似タンパク質 hAdx3L のクローニングと発現”、古家圭人、三浦雅央、鏝木基成、第 84 回日本生化学会大会、(2P-629)、京都国際会館(京都、2011. 9/21-9/24)

⑬ “線虫 *C. elegans* を用いた cytochrome b561 ファミリーの生理機能解析”、三浦雅央、鏝木基成、第 84 回日本生化学会大会、(4T10a-8, 4P-0199)、京都国際会館(京都、2011. 9/21-9/24)

⑭ “The novel functions of the cytochrome b_{561} protein family in *Caenorhabditis elegans*”, Masahiro Miura, Motonari Tsubaki, in “Structure, function, folding and assembly of membrane proteins - Insight from Biophysics A Satellite Conference of the 8th European Biophysics Congress”, Tata, Hungary, (27-31 August, 2011)

⑮ “Cytochrome b_5 の tail-anchor domain の膜結合様式”、坂本洋一、三浦雅央、武内総子、鏝木基成、第 38 回生体分子科学討論会、筑波大学(茨城県つくば市、2011. 6. 23-24)

⑯ “Structure and electron transfer mechanism of human tumor suppressor 101F6 protein: A cytochrome b561 homologue”, Motonari Tsubaki (Keynote speech; BC 3-1) 26th Philippine Chemistry Congress, April 13-15, Cebu City, Philippine (2011. 4. 14) (invited talk)

⑰ “Cytochrome b561 ファミリータンパク質

の機能解析”、三浦雅央、鏝木基成、「若手フロンティア研究会 2010」神戸大学研究基盤センター、(P080) (神戸、2010. 12. 24)

⑱ “Cyclic voltammetry を用いた cytochrome b_5 の電子伝達機構の研究”、安田由夏、青野友美、鏝木基成、「若手フロンティア研究会 2010」神戸大学研究基盤センター、(P037) (神戸、2010. 12. 24)

⑲ “Analyses on the expression and function of the cytochrome b_{561} protein family in *Caenorhabditis elegans*”, Masahiro Miura, and Motonari Tsubaki, BMB2010 (Kobe) 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 (4P-0350), (2010. 12. 10)

⑳ “Structure and electron transfer mechanism of human tumor suppressor 101F6 protein, a cytochrome b561 homologue” Mariam C. Recuenco, Sugure Watanabe, Fusako Takeuchi, Kazuo Kobayashi, Yoshito Furuie, Hiroshi Hori, Motonari Tsubaki, BMB2010 (Kobe) 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 (4T17-2, 4P-0349) (2010. 12. 10)

㉑ “*Zea mays* cytochrome b561 膜貫通部位特異的変異体の電子伝達機構解析”, 亀井美奈、藤戸優充、Md. Motiur Rahman, 小林一雄、鏝木基成, BMB2010 (Kobe) 日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 (4P-0348), (2010. 12. 10)

㉒ “Analyses on the novel function of the cytochrome b561 protein family in *Caenorhabditis elegans*”, Masahiro Miura, Motonari Tsubaki, 第 48 回生物物理学会年会、(3P114) (仙台、9/20-9/22)

㉓ “Direct electrochemical analyses of cytochrome b_5 with a mutated heme pocket at a gold electrode modified with γ -mercaptopropionic acid”, Yoichi Sakamoto, Tomomi Aono, Masahiro Miura, Fusako Takeuchi, Hiroshi Hori, Motonari Tsubaki, 第 48 回生物物理学会年会、(3P110) (仙台、9/20-9/22)

㉔ “Functional characterization of the recombinant human tumor suppressor 101F6 protein, a cytochrome b561 homologue”, Mariam C. Recuenco, Md. Motiur Rahman, Yoichi Sakamoto, Fusako Takeuchi, Hiroshi Hori, Sam-Yong Park, Motonari Tsubaki, 第 48 回生物物理学会年会、(1P101; 1G1310) (仙台、9/20-9/22)

㉕ “Analyses on the expression and function of a cytochrome b_{561} homolog *C. eIeI*, in *Caenorhabditis elegans*” Masahiro Miura, and Motonari Tsubaki, 4th East Asia *C. elegans* Meeting, July 11(Sun)-14(Wed), 2010, National Olympic Memorial Youth Center, Shibuya-ku, Tokyo, Japan

②⑥ “線虫C. elegansにおけるcytochrome b561ホモログの機能解析” 三浦雅央、鏝木基成、第37回生体分子科学討論会、山口大学(山口、2010. 6. 18-19)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

鏝木研究室

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/sci-ts-ubaki/Pages/aboutus.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鏝木 基成 (TSUBAKI MOTONARI)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00145046

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

武内 総子 (TAKEUCHI FUSAKO)

神戸大学・大学教育推進機構・助教

研究者番号：00448169