

## 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27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580132

研究課題名（和文） 疾患感受性遺伝子としてのヒスタミンH1受容体の発現を制御する機能性食品成分の探索

研究課題名（英文） Exploring natural resources-derived compounds that suppress up-regulation of histamine H1 receptor gene expression as a diseases-sensitive gene.

研究代表者

水口 博之（MIZUGUCHI HIROYUKI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：40247838

研究成果の概要（和文）：

天然物医薬由来ヒスタミンH1受容体(H1R)遺伝子発現抑制化合物を探索し、マーキアインなどを同定した。HeLa細胞におけるH1R遺伝子発現亢進は、PKC $\delta$ /ERK/PARP-1シグナルを介し、PKC $\delta$ のゴルジ体への移行が遺伝子発現に重要であった。マーキアインの標的分子としてHsp90を同定した。マーキアインはHsp90とPKC $\delta$ の結合を阻害することで、PKC $\delta$ のゴルジ体への移行を抑制、遺伝子発現を抑制した。既存Hsp90阻害薬はH1R遺伝子発現亢進を抑制しアレルギー症状を軽減した。

研究成果の概要（英文）：

We explored natural resources-derived compounds that suppress histamine H1R gene expression and identified (-)-maackiaain as one of the active compounds. H1R gene expression was mediated through the PKC $\delta$ /ERK/PARP-1 signaling pathway and translocation of PKC $\delta$  to the Golgi in response to PMA stimulation was found to be very important for H1R gene expression in HeLa cells. We identified Hsp90 as a target protein for (-)-maackiaain. (-)-Maackiaain inhibited binding of PKC $\delta$  to Hsp90 and suppressed PKC $\delta$  translocation to the Golgi, resulting the suppression of H1R gene expression. Hsp90 inhibitors suppressed the up-regulation of H1R gene expression and alleviated allergic symptoms in allergy model rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ヒスタミンH1受容体遺伝子、アレルギー疾患感受性遺伝子、転写調節、天然医薬

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は遺伝子発現異常を伴う難治性多因子疾患であり、疾患感受性遺伝子

発現を制御する治療薬は有効であると考えられる。しかし、現在アレルギー疾患治療薬は抗ヒスタミン薬などアレルギーシグナル

遮断薬が主流で遺伝子発現抑制を標的とする薬物はない。ヒスタミンはアレルギー疾患の主要メディエーターであり、その作用は主にヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (HIR) を介する。HIR を介するシグナル量は受容体の発現レベルに依存すること、アレルギー疾患患者において HIR 遺伝子発現亢進が見られること、HIR 遺伝子発現を抑制する薬物がアレルギー症状を緩和させることから、HIR 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることが示唆された。我々は、ラット及びスギ花粉症患者において、HIR 遺伝子発現と症状との間に正の相関があり、HIR 遺伝子発現状態がアレルギー症状の重篤性に深く関わることを世界に先駆けて明らかにし、HIR 遺伝子発現を制御する薬物がこれまでとは異なる新規作用機序を持つ抗アレルギー薬として有効であることが示唆された。そこで抗アレルギー効果が伝承されている漢方薬やアユルヴェーダ薬、機能性食品などの天然物医薬資源を材料に HIR 遺伝子発現抑制効果の有無を検討し、いくつかの和漢薬や機能性食品に HIR 遺伝子発現抑制効果をもつ成分の存在を見だし、これらがアレルギー症状の緩和に有効であることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本課題における研究項目は以下の通りである。

### (1)天然物医薬からの HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を有する化合物の同定及びその標的分子の同定と作用機序解明

和漢薬、桑葉、茶葉、ツクシ、スギナ及びインド伝承医薬のアユルヴェーダなど、アレルギーに効くという伝承はあるが、その科学的検証はほとんどない天然物医薬から生薬学的手法により含有化合物を抽出・分離し、まず、鼻過敏症アレルギーモデルラットを用いた *in vivo* 試験によりアレルギー症状を抑制し、HIR 遺伝子発現抑制作用を持つものを選別する。次に、選別したものについて、HeLa 細胞における HIR 遺伝子発現亢進抑制活性を指標に目的の化合物の精製を行う。精製した化合物について、*in vitro* における細胞試験および、*in vivo* 試験により、そのアレルギー抑制作用や細胞毒性などの再評価を行うとともに、構造を決定し、有機合成経路を確立する。また、HIR 遺伝子発現調節シグナルにおけるこれらの化合物の標的分子を同定し、遺伝子発現抑制作用のメカニズムを分子レベルで明らかにする。

### (2) HIR 遺伝子発現の調節メカニズムの解明

我々は、HeLa 細胞において、ヒスタミン刺激により HIR が *up-regulation* を受け、受容体数を増加させることを初めて見出した。ヒスタミン刺激に伴う HIR 遺伝子発現亢進機構についてはこれまでに、プロテインキナ

ーゼ Cδ(PKCδ)-extracellular signal-regulated kinase (ERK)シグナルを介することを明らかにしてきた。また、転写に関与するプロモーター領域が2カ所存在することを見いだし、本研究では、転写調節に関わる転写因子を同定し、ヒスタミン刺激から HIR 遺伝子発現へ至る経路を詳細に明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 天然物医薬からの HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を有する化合物の同定及びその標的分子の同定と作用機序解明

①鼻過敏症アレルギーモデルラットを用いた HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を持つ天然物医薬資源のスクリーニング: 和漢薬、桑葉、茶葉、ツクシ、スギナ及びアユルヴェーダなどには科学的根拠はないが、伝承的にアレルギー疾患に用いられているものがある。これらの天然物医薬の粗抽出液を作成し、鼻過敏症アレルギーモデルラットを用いた *in vivo* 試験により、アレルギー症状を抑制し、かつ発作誘発に伴う HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を有する天然物を探索する。

②発掘した天然物医薬資源からの HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を有する化合物の単離・精製: ①により見出した天然物医薬を原料に HeLa 細胞を用いた HIR 遺伝子発現亢進抑制活性を指標にして、以下の手法により有効成分の単離・精製を行う。まず、粗抽出液について pH による分配クロマトを行う。次に有効成分を含む画分を種々カラムクロマトにより分画する。展開溶媒の組成は TLC を用いた予備試験から決定する。各画分の遺伝子発現抑制活性を測定し活性画分を回収する。活性画分は HW40EC や HP20 カラム等を用いた HPLC によりさらに精製を行う。精製した有効成分の構造を NMR 等により決定し、有機合成を試みる。

③HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を有する化合物の標的分子の同定及び作用機序の解明: 有効成分の標的分子を同定しその作用機序を分子薬理的に明らかにする。HIR 転写調節は PKCδ-ERK シグナルを介するため、PMA による HIR 遺伝子発現亢進に対する化合物の影響を明らかにする。影響がある場合、PKCδ の down-stream 側に、影響がない場合は PKCδ の up-stream 側に化合物の標的分子が存在すると考えられる。また、転写調節に関与するシグナル分子のリン酸化状態への影響を明らかにし、影響を受けたシグナル分子に相互作用するタンパクを免疫沈降法や Two-Hybrid 法により同定する。リコンビナントタンパクを用いて酵素活性などの生理活性への直接的影響を明らかにする。シグナル分子と化合物との分子間相互作用を BIACORE や等温滴定カロリーメーターを用いて明らかにする。同定した標的分子を細胞内

で過剰発現もしくは siRNA により遺伝子をノックダウンさせ、HIR 遺伝子発現亢進への影響を明らかにする。

#### (2) HIR 遺伝子発現の調節メカニズムの解明

HIR 遺伝子発現の調節メカニズムに関して、PKC $\delta$ -ERK 経路を介すること、ヒスタミンもしくは PKC 活性化剤の PMA に応答するプロモーター領域がヒト HIR 遺伝子第一エクソン上流約 2 kb 内に 2カ所存在することを明らかにした。そこで、これらのプロモーター領域に結合する転写因子の同定、転写因子の活性化の調節機構を明らかにし、HIR 遺伝子発現の調節機構を詳細に明らかにする。

①HIR 遺伝子におけるヒスタミン及び PMA 応答配列に結合する転写因子の同定：2カ所のプロモーター領域それぞれについて、さらに詳細な欠失変異体を用いたレポーターアッセイを行い、転写因子最小結合領域を明らかにし、バイオインフォマティクス的手法によりこの領域に結合する転写因子を探索する。(i) 既存の転写因子が結合する場合、転写因子が結合できない変異 DNA を作製し、レポーターアッセイにより転写因子の転写活性への影響を明らかにする。(ii) 未知の転写因子が結合する場合、そのヌクレオチド配列をもつ DNA を固相化したアフィニティカラムを用いて転写因子を精製・同定する。(iii) 複数の DNA 領域が転写活性に関与する場合、免疫沈降法や結合領域を段階的に欠失した種々変異 DNA を用いたレポーターアッセイにより転写因子間の相互作用及び転写活性への影響を明らかにする。転写因子の DNA への結合は、EMSA および特異抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより明らかにする。また、*in vivo* における転写因子の関与をクロマチン免疫沈降法により明らかにする。転写因子を過剰発現もしくは siRNA によるノックダウンさせることによる転写活性への影響を明らかにする。

②HIR 転写調節を制御するシグナル分子の解明：ヒスタミンもしくは PMA 刺激に伴い転写因子及び PKC $\delta$  と相互作用するタンパクを免疫沈降法や Two-Hybrid 法などを用いて明らかにする。PKC $\delta$ -ERK シグナルに関与するシグナル分子はリン酸化・脱リン酸化により活性が調節されるが、刺激に伴うシグナル分子のリン酸化状態の変化を抗リン酸化抗体によるウエスタンブロット法により明らかにする。また、シグナル分子のリン酸化できない変異体を過剰発現し、シグナルへの影響を明らかにする。さらに、シグナル分子に GFP などの蛍光タンパクをつけた融合タンパクを作製し、これらタンパクの刺激に伴う細胞内移行を明らかにし、リアルタイム共焦点イメージングによる HIR 転写シグナルの時間的空間的制御を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1)天然物医薬からの HIR 遺伝子発現亢進抑制作用を有する化合物の同定及びその標的分子の同定と作用機序解明

和漢薬苦参、桑葉、つくし、阿波晩茶茶葉、レンコン、及びインド伝承医薬アユルバーダなど、抗アレルギー作用を有すると伝承される天然物医薬から HeLa 細胞におけるホルボールエステル (PMA) 刺激に伴う HIR 遺伝子発現亢進、及び RBL-2H3 細胞における抗原抗体刺激に伴う IL-4 遺伝子発現亢進に対する抑制活性を指標に有効成分の単離・同定に成功した。このうち、苦参、ツクシ、及び桑葉の有効成分であるマーキアイン、アピゲニン、及びケルセチンについて、その遺伝子発現抑制機序の解明を行った。

研究成果(2)に示すように、HeLa 細胞におけるヒスタミンや PMA 刺激に伴う HIR 遺伝子発現亢進には、PKC $\delta$ /ERK/PARP-1 (poly(ADP)ribose polymerase-1)シグナル経路が関与する。ヒスタミン刺激もしくは PMA 刺激に伴い PKC $\delta$  が細胞質から Golgi 体に移行することを明らかにした。PKC $\delta$  選択性阻害薬の rottlerin の前処理により Golgi 体への移行は抑制された。マーキアイン、アピゲニン及びケルセチンは PKC $\delta$  の活性化に必要な Tyr<sup>311</sup> のリン酸化を抑制した。また、ヒスタミンや PMA 刺激に伴う PKC $\delta$  の Golgi 体への移行を抑制した。さらに、苦参から単離したマーキアインの分子薬理機構について更なる解析を行った。結合に伴う内在性トリプトファンに由来する蛍光のクエンチング活性を指標として、マーキアインの標的タンパクとして Hsp90 を同定した。マーキアインは、Hsp90 と PKC $\delta$  の結合を阻害することで、PKC $\delta$  が Golgi 体へ移行することを抑制し、遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。既存の Hsp90 阻害薬は HeLa 細胞及びアレルギーモデルラットにおいて HIR 遺伝子発現亢進を抑制し、アレルギー症状を軽減することを明らかにした。Hsp90 は分子シャペロンであり、ステロイドホルモン受容体など多くのシグナル分子と結合することが知られているが、アレルギーに関連するという報告はほとんどなく、本研究により Hsp90 がアレルギー疾患の細胞内創薬ターゲットとなることを初めて明らかにできた。

##### (2)HIR 遺伝子発現の調節メカニズムの解明

HeLa 細胞におけるヒスタミンや PMA 刺激に伴う HIR 遺伝子発現亢進には、PKC $\delta$ /ERK/PARP-1 シグナル経路が関与し、刺激に伴い PKC $\delta$  が細胞質から Golgi 体に移行することが HIR 遺伝子発現に重要であることを明らかにした。また、ヒト HIR 遺伝子には 2カ所のヒスタミン及び PMA に応答するプロモ-

ターが2カ所存在し、上流に存在するプロモーターには2分子のAP-1とEts-1の結合が必須であり、下流のプロモーターでは、PARP-1によりKu86がポリADPリボシル化されることでDNAから解離することにより転写が促進するという極めてユニークな転写調節機構が存在することが明らかとなった。

#### 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 12 件)

1. Mizuguchi H, Ono S, Hattori M, Sasaki Y, Fukui H. Usefulness of HeLa cells to evaluate inverse agonistic activity of antihistamines. *Int Immunopharmacol.* 2013; 15:539-543. 査読有
2. Hattori M, Mizuguchi H, Baba Y, Ono S, Nakano T, Zhang Q, Sasaki Y, Kobayashi M, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Quercetin inhibits transcriptional up-regulation of histamine H(1) receptor via suppressing protein kinase C- $\delta$ / extracellular signal-regulated kinase/ poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling pathway in HeLa cells. *Int Immunopharmacol.* 2013 15: 232-239. 査読有
3. Mizuguchi H, Miyagi K, Terao T, Sakamoto N, Yamawaki Y, Adachi T, Ono S, Sasaki Y, Yoshimura Y, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. PMA-induced dissociation of Ku86 from the promoter causes transcriptional up-regulation of histamine H(1) receptor. *Sci Rep.* 2012;2:916. doi: 10.1038/srep00916. 査読有
4. Kitamura Y, Mizuguchi H, Ogishi H, Kuroda W, Hattori M, Fukui H, Takeda N. Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses IL-5 but not IL-33 mRNA expression in the nasal mucosa of patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. *Acta Otolaryngol.* 2012 132:434-438. 査読有
5. Mizuguchi H, Ono S, Hattori M, Fukui H. Inverse agonistic activity of antihistamines and suppression of histamine H1 receptor gene expression. *J Pharmacol Sci.* 2012; 118:117-121. 査読有
6. Nurul IM, Mizuguchi H, Shahriar M, Venkatesh P, Maeyama K, Mukherjee PK, Hattori M, Choudhuri MS, Takeda N, Fukui H. *Albizia lebeck* suppresses histamine signaling by the inhibition of histamine H(1) receptor and histidine decarboxylase gene transcriptions. *Int Immunopharmacol.* 2011 11:1766-1772. 査読有
7. Dev S, Mizuguchi H, Das AK, Baba Y, Fukui H. Transcriptional microarray analysis reveals suppression of histamine signaling by Kujin alleviates allergic symptoms through down-regulation of FAT10 expression. *Int Immunopharmacol.* 2011 11:1504-1509. 査読有
8. Mizuguchi H, Terao T, Kitai M, Ikeda M, Yoshimura Y, Das AK, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Involvement of Protein Kinase C $\delta$ /Extracellular Signal-regulated Kinase/Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Signaling Pathway in Histamine-induced Up-regulation of Histamine H1 Receptor Gene Expression in HeLa Cells. *J Biol Chem.* 2011 286:30542-30551. 査読有
9. Mizuguchi H, Kitamura Y, Kondo Y, Kuroda W, Yoshida H, Miyamoto Y, Hattori M, Takeda N, Fukui H. Histamine H(1) Receptor Gene as an Allergic Diseases-sensitive Gene and Its Impact on Therapeutics for Allergic Diseases. *Yakugaku Zasshi.* 2011 131:171-178. 査読有

[学会発表] (計 34 件)

1. 水口博之、服部将史、馬場祐子、張□倩、小林□誠、小野将平、石丸直澄、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行 タンパクキナーゼ C $\delta$  シグナル抑制化合物ケルセチンのストレプトゾトシン誘発□細胞破壊に対する効果 日本薬学会 第 133 回年会 2013 年 3 月 27-30 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 水口博之、宮城恒平、寺尾拓馬、坂本典子、山脇洋輔、吉村好之、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行 ヒスタミン H $_1$  受容体遺伝子発現の分子機構第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日 福岡国際会議場 (福岡県)
3. 水口博之、成相祐希、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行 苦参由来抗アレルギー性化合物マーキアインの標的タンパク質の同定 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2012 年 11 月 10-11 日 島根県民会館 (島根県)
4. 宮城恒平、水口博之、寺尾拓馬、坂本典子、武田憲昭、福井裕行 ヒトヒスタミン H $_1$  受容体発現シグナルにおける Ku86 の関与 第 122 回日本薬理学会近畿部会 2012 年 11 月 16 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
5. 水口博之、福井裕行 : HeLa 細胞におけるヒスタミン H1 受容体遺伝子発現調節, 第 16 回日本ヒスタミン学会, 2012 年 10 月 19-20 日岡山プラザホテル (岡山県)

6. Hiroyuki Mizuguchi, Masashi Hattori, Asish Kumar Das, Yoshiaki Kitamura, Noriaki Takeda, and Hiroyuki Fukui. Macrophage-derived protein kinase C- $\alpha$  is a key molecule for pancreatic  $\beta$ -cell destruction in streptozotocin-induced diabetes. The 2<sup>nd</sup> Kinshukai International Symposium Inflammatory Bowel Diseases: Science, safety, and clinical care in IBD. Osaka, Oct 27, 2012. ホテルニューオオタニ (大阪府)
7. 水口博之、福井裕行：天然物由来抗アレルギー化合物を用いた細胞内創薬ターゲットの探索 第31回分子病理学研究会 2012年7月21-22日 恵那峡グランドホテル (岐阜県)
8. 水口博之, Dev Shrabanti, Das K Asish, 馬場嘉信, 福井裕行：和漢薬苦参はヒスタミンシグナル抑制を介したFAT10/NF- $\kappa$ Bシグナルの抑制により抗アレルギー作用を示す 日本薬学会 第132回年会 2012年3月28-31日 北海道大学 (北海道)
9. Hiroyuki Mizuguchi and Hiroyuki Fukui : Exploring the drug targets using natural resources-derived anti-allergic compounds that suppress up-regulation of allergic diseases sensitive gene expression. 第85回日本薬理学会年会 2012年3月14-16日 京都国際会館 (京都府)
10. Hattori Masashi, Hiroyuki Mizuguchi, Matsushita Chiyo, Niino Hitoshi, Sagesaka Yuko, Masuyama Keisuke and Hiroyuki Fukui: Identification of anti-pollenosis compound in tea extract that suppresses gene expression of histamine H<sub>1</sub> receptor (H1R). 12<sup>th</sup> International Congress of Ethnopharmacology India 2012 February 17-19.
11. Yamamoto Sayaka, Hiroyuki Mizuguchi, Nurul Mohammed Islam, Shahriar Masum, Venkatesh Pichairajan, Kazutaka Maeyama, Mukherjee K. Pulok, Hattori Masashi, Choudhuri Sahabuddin Kabir Mohamed, Noriaki Takeda and Hiroyuki Fukui: ALBIZIA LEBBECK ALLEVIATED ALLERGY SYMPTOMS BY INHIBITING HISTAMINE SIGNALING AT THE TRANSCRIPTIONAL LEVEL 12<sup>th</sup> International Congress of Ethnopharmacology India 2012 February 17-19.
12. 水口博之, S. Dev, Asish K Das, 馬場嘉信, 福井裕行：和漢薬苦参はFAT10遺伝子発現の抑制を介してアレルギー症状を緩和する。第120回日本薬理学会近畿部会 2011年11月11日 ホテルグラ

ンピア京都 (京都府)

13. 水口博之, 寺尾拓馬, 坂本典子, 山脇洋輔, 吉村好之, 藤本勝巳, 武田憲昭, 福井裕行：HeLa細胞におけるヒスタミンもしくはPMA刺激に伴うヒスタミンH<sub>1</sub>受容体の転写亢進の分子機構 第84回日本生化学会大会 2011年9月21-24日 京都国際会館 (京都府)

〔図書〕 (計1件)

1. Fukui H, Mizuguchi H. Histamine H<sub>1</sub> Receptor Gene Expression Mechanism as a Novel Therapeutic Target of Allergy. In Biomedical Aspects of Histamine: Current Perspectives. Eds Khardori N, Shahid M, Khan RA, Tripathi T; pp 285-295 Springer 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称：鼻粘膜検体内部標準遺伝子  
 発明者：福井裕行、水口博之、武田憲昭  
 権利者：徳島大学  
 種類：特許  
 番号：特願 2010-258476  
 出願年月日：平成 22 年 11 月 19 日  
 国内外の別：国内

名称：抗アレルギー組成物、抗アレルギー物質セット、及び抗アレルギー物質セットの製造方法  
 発明者：福井裕行、水口博之、武田憲昭  
 権利者：徳島大学  
 種類：特許  
 番号：特願 2011-011472  
 出願年月日：平成 23 年 1 月 22 日  
 国内外の別：国内

名称：鼻過敏症予防・治療剤  
 発明者：福井裕行、武田憲昭、水口博之  
 権利者：徳島大学  
 種類：特許  
 番号：特願 2012-040703  
 出願年月日：平成 24 年 2 月 27 日  
 国内外の別：国内

○取得状況 (計2件)

名称：アレルギー疾患感受性遺伝子発現抑制物質  
 発明者：福井裕行、水口博之、高石喜久、柏田良樹、根本尚夫  
 権利者：徳島大学  
 種類：特許  
 番号：公開特許公報(A)、特開2011-126791  
 取得年月日：平成 23 年 6 月 30 日  
 国内外の別：国内

名称：アレルギー疾患感受性遺伝子発現抑制物質

発明者：福井裕行、水口博之、高石喜久、  
柏田良樹、根本尚夫

権利者：徳島大学

種類：特許

番号：PCT/KR2010/008995, WO2011/074881

取得年月日：平成 23 年 6 月 23 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://150.59.84.2/?&rf=113>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

水口 博之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：40247838

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：