

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 6月10日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590428

研究課題名（和文）HIV-1 Vpu 蛋白の抗ウイルス宿主因子 BST-2 に対する抑制機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of the defensive mechanisms of HIV-1 Vpu against the antiviral host factor BST-2

研究代表者

徳永 研三 (TOKUNAGA KENZO)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：50342895

研究成果の概要（和文）：HIV-1 Vpu 蛋白は抗ウイルス宿主因子 BST-2 を細胞表面から消失させることによりウイルス粒子の細胞外放出を促進させる機能を有する。本研究では Vpu の抗 BST-2 活性における宿主補助因子を探索することを目的とした。Vpu 結合蛋白を免疫沈降法にて調整、プロテオーム解析により複数の候補蛋白を同定した。各候補蛋白の発現ベクターを作製、Vpu と共発現させて免疫沈降及び細胞内局在性実験を行った。Vpu との結合性及び共局在性が確認できた候補蛋白についてノックダウン実験を行った結果、Vpu の抗 BST-2 活性に影響を与えなかったことから、これらの候補蛋白が Vpu の他の機能に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：HIV-1 Vpu enhances virion production by downregulating the antiviral host factor BST-2 from the cell surface. In this study, we attempted to identify host cofactors that play a supporting role in the anti-BST-2 activity of Vpu. We first prepared Vpu-binding proteins by performing immunoprecipitation assay, and identified multiple candidate proteins by proteome analyses. The candidate proteins were cloned into expression plasmids and then co-expressed with Vpu, followed by immunoprecipitation and subcellular localization assays. Knocking-down the gene expression of the candidate proteins that proved to interact with and colocalize with Vpu revealed no effect on Vpu's anti-BST-2 activity, implying that those proteins might be involved in other functions of Vpu.

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	0	1,500,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
2012年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV-1、Vpu、BST-2、宿主因子

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の高病原性に関わることが示唆されているアクセサリ蛋白 Vpu は、ウイルス粒子の放出促進、及び小胞体での CD4 degradation の二大機能を有している。後者の機能は 90

年代に分子レベルで詳細に解析されてきたが、前者の機能についてはつい先頃まで世界的に殆ど研究が進展していなかった。2008 年に、HIV-1 粒子の放出を細胞表面で抑える抗ウイルス宿主因子 BST-2 が発見されたこと

(Nature 451:425-430. 2008) で、Vpu がこの宿主因子の活性を抑えることにより HIV-1 ウイルス粒子が効率良く放出されることが明らかになった。我々も、Vpu が細胞表面上の BST-2 を、両者の膜貫通領域の相互作用を介してエンドサイトーシスにより細胞内に internalize させて、宿主蛋白 β TrCP に部分的に依存してライソゾーム分解へと導くこと、Vpu はその膜貫通 (transmembrane; TM) 領域を介して BST-2 と TM-to-TM による相互作用を行っていることを明らかにしてきた (J. Biol. Chem. 284: 35060-72. 2009)。

2. 研究の目的

Vpu による BST-2 の down-regulation に関するメカニズムについては未だ明らかになっていない部分が多い。しかしながら、少なくとも Vpu TM のみでは BST-2 には結合できるものの、抗 BST-2 活性を有しないことから、Vpu の抗 BST-2 活性には、TM のみならず、細胞質内 (cytoplasmic tail; CT) 領域も重要であると考えられる。この CT 領域の 52/56 番目のリン酸化セリンに既知の宿主蛋白でユビキチンライゲース複合体のサブユニットである β TrCP が結合することが、Vpu の抗 CD4 活性における場合と同様、抗 BST-2 活性にも重要であることが分かっている。しかし、Vpu の β TrCP 結合不全変異体においても抗 BST-2 活性が半分程度残っていることから、Vpu の β TrCP 要求性は部分的であり、それ以外の未知の宿主因子が相互作用して BST-2 の down-regulation に関与している可能性が考えられる。我々は今回この宿主補助因子を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

Vpu の宿主補助因子の要求性を検討する為に、Vpu の安定発現 HeLa 細胞株を作製・大量調整、抗 BST-2 抗体を用いた Vpu 蛋白の免疫沈降により、Vpu に結合する蛋白を調製、mass spectrometry (MS) にて結合蛋白を同定した。得られた標的宿主因子と Vpu の相互作用が直接的かあるいは間接的かを検証すると共に、Vpu との細胞内共局在性についても検討した。また標的宿主因子のノックダウン実験により、Vpu の BST-2 downregulation における標的宿主因子の要求性を検討した。

4. 研究成果

(2010) Vpu の cofactor の検索を試みるべく、Vpu 野生型 (WT)、 β TrCP 結合不全変異体 (2/6) または CT 欠損変異体 (Δ CT) を、BST-2 発現ベクターとコトランスフェクトした細胞を用いて免疫沈降法を行った。Vpu-WT と Vpu2/6 のみで認められた約 80 kDa のバンドを用いて、MS 解析を行った結果、候補蛋白としてミトコンドリア膜蛋白

HADHA が同定された。この蛋白は実際に Vpu と相互作用し、更に Vpu と共局在したが、ノックダウン実験では Vpu の抗 BST-2 活性に全く影響が出ないことから、BST-2 を抑制する機能には関係しないことが判った。ここまで行った cofactor 同定実験において (i) 従来の免疫沈降法を使用している為、IgG heavy/light chain (55 kDa、25 kDa) 付近に存在する候補蛋白を見逃す可能性がある、(ii) BST-2 を標的とした免疫沈降である為、BST-2 と相互作用する Vpu に更に相互作用する cofactor を得るうえでは非効率である、という問題点があった。これらを解消すべく、Vpu に HaloTagTM を付加させた発現ベクターを作製し、HeLa 細胞にトランスフェクションした後に、抗体フリーの方法である HaloLinkTM Resin を用いた沈降法の導入を始めた。

(2011) 前年の免疫沈降実験において IgG heavy/light chain (55 kDa、25 kDa) 付近に存在する候補蛋白を見逃した可能性を考慮して、Vpu に HaloTagTM を付加させた発現ベクターを作製して抗体フリーの方法である HaloLinkTM Resin を用いた沈降法による cofactor 検索を試みた。HaloTag 付加型の β TrCP 結合不全変異体 (2/6) または CT 欠損変異体 (Δ CT) Vpu 発現ベクターを作製して HeLa 細胞にトランスフェクトした後に免疫沈降反応を行ったが、Vpu 結合蛋白の収量が不十分であった。その改良型として恒常発現系で行うべくレンチベクター版を作製し、293T 細胞にトランスフェクトして大量調製したベクターウイルスを用いて HeLa 細胞へのトランスダクションを行った。その後、細胞を溶解して HaloLink Resin を加えて免疫沈降反応を行った。免疫沈降物を精製して二次元電気泳動を行い、Cy3/Cy5 染色によるスポット比較を 2/6 及び Δ CT Vpu 間で行った。その結果、2/6 Vpu において有意に結合していると考えられる候補蛋白 70 種類ほどをピックアップして MS 解析を行ったが、残念ながら判定不能であった。

(2012) 前年度に樹立した安定発現細胞からの抗体フリー沈降法を以下の通り実施した。レンチベクターにより Vpu-HaloTag 融合蛋白を安定発現させた HeLa 細胞の大量培養を行い、その細胞融解液を用いて HaloLink Resin 沈降法により調整した沈降物を SDS-PAGE で分離、ゲルの銀染色後に切り出したバンドのプロテオーム解析を行った。得られた 9 種類の候補蛋白の発現ベクターを作製、それらを用いて各候補蛋白と Vpu との相互作用の有無について免疫沈降法により検討したところ、3 種類の蛋白 (CNTNAP1、RPL11、SNRPD1) 及び (他のグループの論文で) 既出の SCAMP3 が Vpu と結合活性を示すことが分かった。更に間接蛍光抗体法に

より細胞内局在性を検討したところ、一部の蛋白で Vpu との共局在性が認められた。候補蛋白のノックダウン実験の為に各 shRNA 発現レンチベクターを作製して、標的蛋白の発現低下を確認した後、ウイルス産生実験を行った。その結果、Vpu の抗 BST-2 活性の減弱化が特に認められなかったことから、前述の HADHA を含めたこれら候補蛋白の全てあるいは幾つかは抗 BST-2 以外の Vpu の機能に参与している可能性が示唆された。尚、本研究期間中に、HIV 専門誌 *Current HIV Research* において、特集号 “HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin” の Guest Editor を務め、本研究課題に関連する総説 (全 8 編) を、欧米の著名な研究者達と共に総勢 8 グループで共同執筆した。

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 19 件)

1. Utachee, P., Nakamura, S., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Two N-linked glycosylation sites in V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for CD4 binding domain. *J. Virol.* 査読有 84:4311-20. 2010.
2. Mitsuishi, T., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Kaneko, T., Ohara, K., Ohsawa, I., Oda, F., Kato, T., Yamada, Y., Kawana, S., Ozaki, K., Nakatake, M., and Yamada, O. Combined analysis of cell growth and apoptosis-regulating proteins in HPVs associated anogenital tumors. *BMC cancer* 査読有 10:118. 2010.
3. Iwabu, Y., Fujita, H., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. (corresponding author). Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. *Commun. Integr. Biol.* 査読有 3:366-369. 2010.
4. Kameoka, M., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Kameoka, Y., Sapsutthipas, S., Soonthornsata, B., Nakamura, S., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., and Auwanit, W. The role of lysine residue at amino acid position 165 of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE Gag in reducing viral drug susceptibility to protease inhibitors. *Virology* 査読有 405:129-38. 2010.
5. Iwabu, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M., Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., and Tokunaga, K. (corresponding author). Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J. Biol. Chem.* 査読有 285: 35350-35358. 2010.
6. Sapsutthipas, S., Kitagawa, Y., Tokunaga, K., Ikuta, K., and Kameoka, M. Viral factors involved in adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 査読有 42:311-319. 2011
7. 徳永研三 (corresponding author)、足立昭夫、高折晃史、中山英美、岩部幸枝、岩谷靖雄：HIV-1 感染阻害因子 (HIV-1 Restriction Factors). *日本エイズ学会誌 The Journal of AIDS Research.* 13: 56-62, 2011.
8. Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., Tokunaga, K., Shimura, M., and Ishizaka, Y. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Neuroimmune Pharm.* 査読有 6:177-87. 2011.
9. Ikeda, T., Abd El Galil, K., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Harada, S., Heidmann, T., and Koito, A. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* 査読有 39: 5538-5554. 2011.
10. Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., and Ishizaka, Y. Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *J. Cell Biol.* 査読有 194:721-35. 2011.
11. Arias, J.F., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. (corresponding author). Structural basis for antiviral activity of BST-2/tetherin and its viral antagonisms. *Front Microbiol.* 査読有 2: 250, 2011.
12. Tokunaga, K. (Guest Editor). HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: Enemies at the Gates. *Current HIV Res.* 10: 275-276. 2012.
13. Arias, J.F., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. (corresponding author). Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV Res.* 査読有

- 10: 283-291. 2012.
14. Fujita, H., Fujimoto, K., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin. *Current HIV Res*, 査読有 10: 321-326. 2012.
 15. Arias, J.F., Koyama, T., Kinomoto, M., and Tokunaga, K. (corresponding author). Retroelements versus APOBEC3 family proteins: No great escape from the magnificent seven. *Front Microbiol*, 査読有 3, 275, 2012.
 16. Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. Host Restriction Factors in Retroviral Infection: Promises in Virus-Host Interaction. *Retrovirology* 査読有 9:112 2012.
 17. Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 査読有 10:21, 2013.
 18. Chutiwitonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect.* 査読有 15:280-90, 2013.
 19. Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Tanaka, Y. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 査読有 *in press*.
- [学会発表] (計 25 件)
1. Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga: Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by HIV-1 Vpu. Centennial Retroviruses Meeting (CRM2010). Prague, Czech Republic, 2010. 5.
 2. Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka: Integration into DNA double-strand break sites of HIV-1 is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor. 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, 2010.10.
 3. Kenzo Tokunaga: Battles between Host and Viruses: Molecular Mechanisms of the Inactivation of Antiviral Host Factors by HIV-1 Accessory Proteins. National Institute of Health, Thailand. Bangkok, Thailand. 2010.10.
 4. Hideaki Fujita, Yukie Iwabu, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki Matsumoto, Keiichi I Nakayama, and Yoshitaka Tanaka: Targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow requires ubiquitylation of membrane proteins. Biochemistry and Cell Biology of ESCRTs in Health and Disease (ASBMB Special Meeting), Utah, USA. 2010.10.
 5. 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎, 徳永研三: HIV-1 Vpu による BST-2/tetherin の機能阻害に関与する cofactor の検索. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
 6. 徳永研三, 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎: HIV-1 Vpu による細胞表面 BST-2/tetherin の直接的な internalization. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
 7. 亀岡正典, Panasda Isarangkura-na-ayuthaya, 亀岡陽子, Sompong Sapsutthipas, Bongkot Soonthornsata, 中村昇太, 徳永研三, Pathom Sawanpanyalert, 生田和良, Wattana Auwanit: CRF01_AE Gag 165 番目のリジン残基がプロテアーゼ阻害剤に対するウイルスの薬剤感受性を低下させる分子機構. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
 8. Piraporn Utachee, 中村昇太, Panasda Isarangkura-na-ayuthaya, 徳永研三, Pathom Sawanpanyalert, 生田和良, Wattana Auwanit, 亀岡正典: Two N-linked glycosylation sites in Env gp120 regulate the susceptibility of CRF01_AE viruses to the CD4 binding domain antibody, IgG1 b12. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
 9. 池田輝政, Abd El Galil Khaled Hussein, 徳永研三, 前田和彦, 佐多徹太郎, 阪口薫雄, Thierry Heidman, 小糸厚: 哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント制御機構の解析. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
 10. 岩部幸枝, 佐多徹太郎, 徳永研三: BST-2/tetherin. 第 24 回日本エイズ学会シンポジウム[Restriction Factor] (東京) 2010. 11.
 11. 岩部幸枝, 佐多徹太郎, 徳永研三: APOBEC3G の抗 Alu レトロ転移活性に関わる責任領域の同定. 第 33 回日本分子生物学会 (神戸) 2010. 12.
 12. 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎, 徳永研三: BST-2/tetherin の downregulation における HIV-1 Vpu の cofactor 要求性. 第 33 回日本分子生物学会 (神戸) 2010. 12.
 13. Hideaki Fujita, Yukie Iwabu, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki Matsumoto, Keiichi I Nakayama, and Yoshitaka Tanaka: Targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow requires ubiquitylation of membrane proteins. Biochemistry and Cell Biology of ESCRTs in Health and Disease (ASBMB Special Meeting), Utah, USA. 2010.10.

- Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki Matsumoto, Keiichi I Nakayama, and Yoshitaka Tanaka: The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis. 第33回日本分子生物学会(神戸) 2010. 12.
14. Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka: Site-Specific Integration of a Lentiviral Vector in the Human Genome via DNA Double-Strand Breaks. 第33回日本分子生物学会(神戸) 2010. 12.
15. Nii-Trebi, N., Kinomoto, M., Brandful, J., Barnor, J., Tatsumi, M., Sata, T., Ampofo, W., Osei-Kwasi, M., Tokunaga, K.: Infectivity of HIV-1 Subtypes Isolated from Ghanaian Patients. WSU Joint International Conference. East London, South Africa, 2011.9.
16. Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka: HIV-1 DNA integration into host chromosomal double-strand break sites is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor. IUMS 2011, Sapporo, Japan, 2011.9.
17. 藤田英明、岩部幸枝、佐多徹太郎、徳永研三、田中嘉孝: 膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 によるトランスフェリン受容体のユビキチン化およびダウンレギュレーションの分子機構。第84回日本生化学会大会(京都) 2011.9.
18. Yukie Iwabu, Juan F. Arias, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Tetsutaro Sata and Kenzo Tokunaga: Homodimerization of APOBEC3G is required for inhibition of Alu retrotransposition. Frontiers of Retrovirology Conference 2011, Amsterdam, The Netherlands, 2011. 10.
19. Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Yukihito Ishizaka: HIV-1 integraion into host DNA double-strand break sites is the majority event in integrase inhibitor-treated cells. 第34回日本分子生物学会(横浜) 2011. 12.
20. T. Kikuchi, Y. Iwabu, A. Kawana-Tachikawa, M. Koga, N. Hosoya, S. Nomura1, Z.L. Brumme, H. Jessen, A. Kelleher, M. Markowitz, F. Pereyra, A. Trocha, B.D. Walker, A. Iwamoto, K. Tokunaga, and T. Miura: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, Washington D.C., USA, 2012. 7.
21. 張 延昭、岩部 幸枝、立川(川名) 愛、中村仁美、David Nolan、Simon Mallal、長谷川秀樹、山岡 昇司、岩本 愛吉、徳永 研三: HIV-1 感染者における抗ウイルス宿主因子の発現レベルと病態進行との相関性の有無。第59回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
22. 小山貴芳、Juan F. Arias、岩部幸枝、徳永研三: HIV-2 Vpx に不活化される抗ウイルス宿主因子の探索。第59回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
23. Juan F. Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、長谷川秀樹、徳永研三: APOBEC3G による Alu 転移抑制の分子生物学的および構造学的解析。第59回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
24. 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀道子、野村滋、細谷紀彰、Zabrina L. Brumme、Heiko Jessen、Anthony D. Kelleher、Martin Markowitz、Florencia Pereyra、Alicja Trocha、Bruce D. Walker、岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之: HIV-1 elite controller における HIV-1 Vif の抗 APOBEC3G 活性の低下。第59回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
25. 小山貴芳、Juan F Arias、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三: APOBEC3G の抗 Alu レトロ転移活性に寄与するアミノ酸の同定。第35回日本分子生物学会(福岡) 2012. 12.
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計0件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況(計0件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:
- [その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 研三 (TOKUNAGA KENZO)
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究
官
研究者番号：50342895

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

巽 正志 (TATSUMI MASASHI)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・
室長
研究者番号：00133629

藤田 英明 (FUJITA HIDEAKI)
九州大学・薬学研究科・助教
研究者番号：80291524