

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790156

研究課題名(和文)ピロリ菌の持続感染力と薬剤耐性に関わる鉄獲得システム依存的抗酸化能発現機序

研究課題名(英文) Characterization of bacterial iron transporter for the antioxidant ability in *Helicobacter pylori*

研究代表者

津川 仁 (TSUGAWA HITOSHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30468483

研究成果の概要(和文): ピロリ菌の抗酸化能力である鉄イオン共役型 Superoxide Dismutase(SodB)は胃粘膜上皮への持続感染の樹立に必須な遺伝子であり、さらに、SodB の強発現はメトロニダゾール(Mtz)耐性を誘導する(Tsugawa et al., *Antioxid. Redox Signal.* 14:15-23, 2011)。SodB 強発現による Mtz 耐性ピロリ菌は鉄トランスポーターFecA1 発現も亢進しており、*fecA1* 遺伝子を欠損させると、SodB 活性が低下すると共に、Mtz 耐性は解除された。さらに、*fecA1* 遺伝子は転写制御因子 Fur により転写制御されるが、SodB 強発現 Mtz 耐性ピロリ菌が保持する変異型 Fur によって、*fecA1* 発現が亢進状態にある事を明確にした。また、*fecA1* 遺伝子欠損ピロリ菌は、SodB 活性の低下に伴い、胃粘膜上皮への感染能力が低下することをスナネズミに対する感染実験で明確にした。以上の結果は、鉄トランスポーターFecA1 は、SodB 活性発現に寄与し、胃粘膜上皮への持続感染に必須な遺伝子であり、さらに、FecA1 発現亢進は Mtz 耐性化にも寄与する事を意味しており、新規除菌治療戦略の構築に向けたターゲット分子としての可能性を提示した。

研究成果の概要(英文): *Helicobacter pylori* encodes a single iron-cofactored superoxide dismutase (SodB), which is regulated by the ferric uptake regulator (Fur). Ferrous ion (Fe^{2+}) is necessary for the activation of SodB. The activity of SodB is an important determinant of the capability of *H. pylori* for long-term colonization of the stomach and of the development of metronidazole (Mtz) resistance of the bacterium. It was demonstrated that *fecA1*, a Fe^{3+} -dicitrate transporter homolog, is an essential gene for SodB activation, but not for the biogenic activity of *H. pylori*. *H. pylori* with SodB inactivation by *fecA1* deletion showed reduced resistance to H_2O_2 , reduced gastric mucosal-colonization ability in *Mongolian gerbils*, and also reduced resistance to Mtz. Taken together; FecA1 is an important determinant of the host-colonization ability and Mtz resistance of *H. pylori* through Fe^{2+} supply to SodB, suggesting that FecA1 may be a possible target for the development of a novel bactericidal drug.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：酸化ストレス、抗酸化能、慢性感染、薬剤耐性、鉄トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

胃上皮細胞へ感染・定着したピロリ菌は、宿主異物排除応答である好中球由来の活性酸素種(ROS)及び二次除菌療法として用いら

れるメトロニダゾール(Mtz)由来の活性酸素等種々の ROS 攻撃に曝される。従って、これらの ROS 攻撃に抵抗するピロリ菌の抗酸化能は、宿主異物排除応答抵抗性に寄与し、胃

上皮細胞への持続感染を樹立させ、且つ、Mtz耐性化にもつながる重要な能力である。従って、ピロリ菌の抗酸化能を担う鉄イオン共役型 superoxide dismutase (SodB)は、胃上皮細胞への持続感染の樹立に必須であるだけでなく、SodB の機能亢進は Mtz 耐性にも寄与する (*Infect.Immun.*,61;5315,1993, *Antioxid. Redox Signal.*, 14:15, 2011)。ピロリ菌の SOD サブタイプは鉄イオン共役型 SodB しかないことと、ピロリ菌の SOD 活性の亢進は、鉄イオン制限下で有意に抑制されることから、SOD 活性の発動には十分な鉄イオンが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

臨床分離された SodB 強発現型 Mtz 耐性ピロリ菌株は、*sodB* の promoter 領域(Fur-Box)に結合し *sodB* の転写を抑制する Fe²⁺結合性転写制御因子 Ferric uptake regulator(Fur)にアミノ酸変異を示す変異型 Fur 保持菌株であるが故に、*sodB* 遺伝子の転写制御が正に破綻している。(*Antioxid. Redox Signal.*, 14:15-23, 2011)。また、SodB は慢性感染の樹立に必須遺伝子でもある(*Infect.Immun.*,61;5315,1993)。そこで、研究代表者は、「ピロリ菌の Fur によって転写制御を受ける SodB 発現を封じ込めば、持続感染能を喪失させ、且つ、Mtz 耐性をも解除できるのではないかと考えた。ピロリ菌の Fur 依存的 SodB 活性発現には十分な鉄イオンが必要であると考えられたため、本研究課題では、ピロリ菌の鉄トランスポーターに注目し、SodB 発現に寄与する鉄トランスポーターの同定及びその役割を明確にし、同分子阻害が持続感染能の喪失及び Mtz 耐性の解除をもたらすかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 使用 *H. pylori* 菌株 ; *H. pylori* ATCC700392 および SodB 強発現型 Mtz 耐性ピロリ菌株(Fur 変異株)として KS0048 (mutant Fur; P114S, N118H) 及び KS0145(mutant Fur; C78Y, N118H) を用いた (*Antioxid. Redox Signal.*, 14:15-23, 2011)。また、臨床分離野生型 Fur ピロリ菌株として KS0189 を用いた。

(2) SodB 強発現株及び *fecA1* 遺伝子欠損株の構築 ; *H. pylori* に安定的に保持される pHel3 発現 vector を用いた。pHel3 発現 vector に *sodB* 遺伝子の ORF 領域をサブクローニングし、エレクトロポレーションにて *H. pylori* ATCC700392 株へ形質転換した。また、pCR2.1-TOPO vector を用いて、*fecA1* 遺伝子欠損株構築用ターゲット vector を構築し、エレクトロポレーションにて *H. pylori* ATCC700392 株へ形質転換後、相同組み換え法により *fecA1* 遺伝子欠損 *H. pylori* を樹立した。

(3) recombinant Fur タンパク質発現と精製 ; 発

現 vector pET30b(+)へ Fur 遺伝子の ORF 領域をサブクローニングし、*E. coli* BL21 (DE3)へ形質転換した。0.5 mM IPTG 添加後 8 h 培養することで recombinant Fur 蛋白質を発現誘導させた。Recombinant Fur は His タグを標識とし、ニッケルカラムで精製した。

(4) promoter DNA と Fur タンパク質の結合解析 ; 精製 recombinant Fur とピオチン標識した *fecA1* promoter 領域 (Fur-Box) の PCR products を用いて、Fur-Box への Fur の結合能を surface plasmon resonance assay (BIAcore2000 分子間相互作用解析装置)により検討した。

(5) スナネズミへの *H. pylori* 感染実験 ; 6 週令スナネズミ(MON/Jms/Gbs Slc)に *fecA1* 欠損 *H. pylori* ATCC700392、*fecA1* 欠損 KS0048、*fecA1* 欠損 KS0145、*H. pylori* ATCC700392、KS0048、KS0145 株をそれぞれ 10⁹ cfu/mL(600 µL)で感染させ、12 週間後に解剖し、感染菌数を分離培養法にて測定した。

4. 研究成果

H. pylori ATCC700392 の SodB 強発現株 (ATCC700392 pHel3::*sodB*) は H₂O₂ 抵抗性が *H. pylori* ATCC700392 に比べて有意に亢進したが、鉄イオン制限環境下 (20 µM deferoxamine mesylate 添加) で、H₂O₂ 抵抗性の亢進はキャンセルされた。一方で、アミノ酸変異型 Fur のコードによりメトロニダゾール (Mtz) 耐性を示す SodB 強発現臨床分離株 KS0048 (mutant Fur; P114S, N118H) 及び KS0145 (mutant Fur; C78Y, N118H) は、ATCC700392 pHel3::*sodB* 同様に H₂O₂ 抵抗性が亢進したが、鉄イオン制限環境においてもキャンセルされなかった。また、KS0048 及び KS0145 の SodB 活性は、*H. pylori* ATCC700392 及び KS0189 に比べて有意に亢進しており(図1)、これは鉄イオン制限環境下でも変わらず亢進していた。

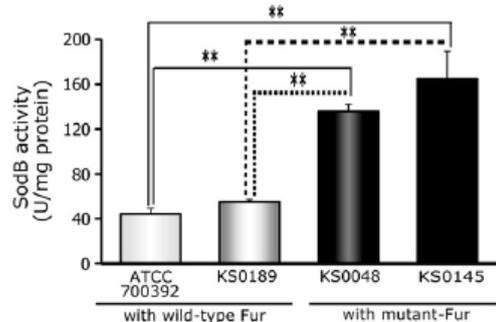


図1. 各ピロリ菌株の SodB 活性

(Tsugawa et al., *Free Radical Biology & Medicine*, 52: 1003–1010, 2012 の Fig. 2. より引用)

上記の結果から、「変異型 Fur コードにより、

KS0048及びKS0145では、外界鉄イオン獲得能及び鉄貯蔵能を亢進させ、鉄イオン制限環境下でもSodBへ安定した鉄イオンを供給するシステムが整備されており、持続的なSodB活性亢進をサポートすることができている」と仮説した。そこで、外界鉄イオン取り込みトランスポーターである、 Fe^{3+} -dicitrate transporter homologのFecA1及びFecA2の発現変化に注目した。KS0048及びKS0145では、FecA1のmRNA発現が*H. pylori* ATCC700392及びKS0189に比べ有意に亢進していた。一方で、FecA2のmRNA発現の亢進は認められなかった(図2)。

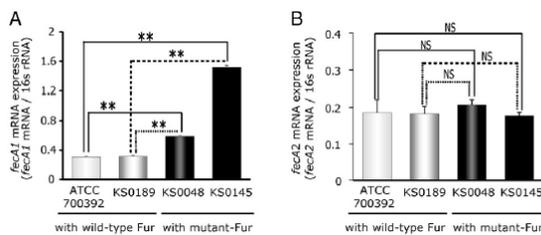


図2. 各ピロリ菌株の *fecA1* 及び *fecA2* の mRNA 発現レベルの比較. A. *fecA1* mRNA 発現レベル. B. *fecA2* mRNA 発現レベル. (Tsugawa et al., Free Radical Biology & Medicine, 52: 1003–1010, 2012 の Fig. 3より引用)

fecA1 及び *fecA2* 遺伝子の promoter 領域には転写制御因子Furの結合領域が確認されており、いずれもFurによる転写制御を受ける。そこで、変異型FurのFecA1及びFecA2それぞれのFur-boxへの結合能の変化を解析した。*fecA1* promoter (Fur-box)への変異型Furの結合活性は有意に低下したが(図3)、*fecA2* promoter (Fur-box)への結合能は、Fur変異による影響を受けなかった。

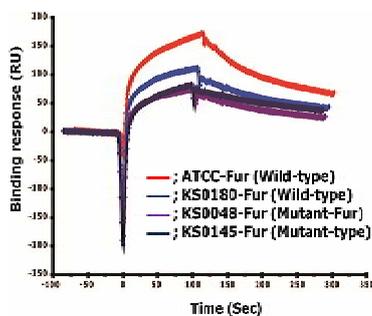


図3. Surface Plasmon Resonance Assay (BIAcore2000)による野生型 Fur(ATCC-Fur及びKS0189-Fur)と変異型 Fur(KS0048-Fur及びKS0145-Fur)の *fecA1* promoter (Fur-box)への結合親和性解析

つまり、Furのアミノ酸変異によって、*fecA1* 遺伝子制御機構が正に破綻し、*fecA1*発現が亢進状態にあることが示された。これらの結果から、KS0048及びKS0145が示すSodB活性の亢進は、FecA1による外界鉄イオン取り込み亢進によってサポートされていると考えられた。従って、ピロリ菌のSodB活性発現に必要な鉄イオンは、FecA1を介して取り込まれていると仮説できた。さらに、KS0048及びKS0145では、ピロリ菌の鉄貯蔵タンパク質であるPfrの発現レベルも*H. pylori* ATCC700392に比べて有意に亢進しており、鉄貯蔵能も亢進していることが示された。そこで、相同組み換え法により、*fecA1* 遺伝子欠損株を構築し、SodB活性

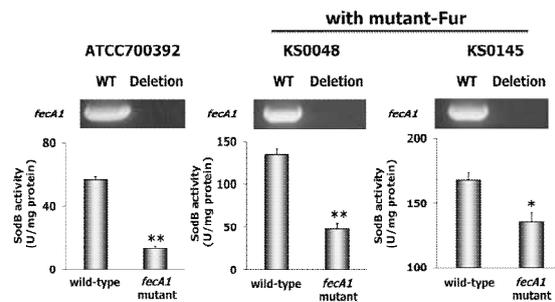


図4. 各ピロリ菌株における *fecA1* 遺伝子欠損に伴う SodB 活性発現の変化 (Tsugawa et al., Free Radical Biology & Medicine, 52: 1003–1010, 2012 の Fig. 5改訂)

発現の変化及び H_2O_2 感受性変化について検討した。*fecA1* 遺伝子欠損により、*H. pylori* ATCC700392のSodB活性は有意に低下し(図4)、 H_2O_2 感受性は有意に亢進した。つまり、*fecA1* 遺伝子欠損によりSodB活性は維持できなくなり、その結果、ピロリ菌の酸化ストレス抵抗性が破綻することが明らかとなった。

さらに、KS0048株及びKS0145株も*fecA1* 遺伝子を欠損させることによって、SodB活性は有意に低下し(図4)、 H_2O_2 感受性も亢進した。また、*fecA1* 遺伝子欠損によって、Mtzに対するMIC値も、KS0048株では32から4 $\mu\text{g/mL}$ へ、KS0145株では128から32 $\mu\text{g/mL}$ へとそれぞれ低下し、特にKS0048株のMtz耐性はキャンセルされた。

sodB 遺伝子の欠損はピロリ菌の感染能力を消失させることが知られている(*Infect.Immun.*,61;5315,1993)。上記結果より、KS0048株及びKS0145株も、*fecA1* 遺伝子欠損により、SodB活性の低下により抗酸化能が減弱したことから、*fecA1* 欠損により、酸化ストレスを介した宿主異物排除応答抵抗性を失い、慢性感染能を失うと推測された。そこで、ス

ナネズミを用いて、感染能の変化を検討した。その結果、*H. pylori* ATCC700392、KS0048株及びKS0145株において、*fecA1*遺伝子欠損により定着ピロリ菌数は減弱し、感染能力を失うことが示された(図5)。

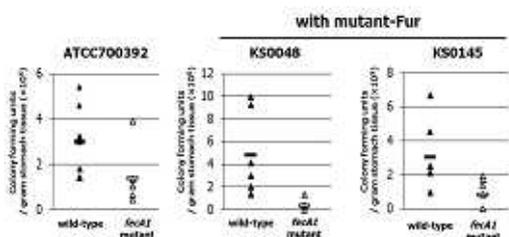


図5. 各ピロリ菌株における *fecA1* 遺伝子欠損に伴う感染・定着能力の変化 (Tsugawa et al., Free Radical Biology & Medicine, 52: 1003–1010, 2012 の Fig. 6 改訂)

以上の成果をまとめると、ピロリ菌の慢性感染の樹立に寄与する抗酸化能力は主に SodB 活性発現によって発揮されているが、SodB の活性維持には、活性中心への Fe²⁺ 供給が必須である。ピロリ菌は、Fur による転写制御を介して、外界鉄イオントランスポーター FecA1 を調節し、SodB 活性中心へ Fe²⁺ を供給している。そのため、FecA1 機能不全により、SodB を介したピロリ菌の抗酸化能は破綻し、慢性感染能力は消失し、且つ、Mtz への感受性も亢進する。これらの成果から、ピロリ菌の持続感染能の喪失と Mtz 耐性解除をもたらす新規除菌治療戦略として、細菌固有の菌体外膜鉄トランスポーター FecA1 がターゲット分子として有効的である可能性が示された。

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 14 件)

- Saito Y., Suzuki H., Imaeda H., Matsuzaki J., Hirata k., Tsugawa H., Hibino S., Kanai Y., Saito H., Hibi T. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. *Int. J. Cancer*, 15: 1751-1760, 2013. (査読有り)
- 津川仁, 鈴木秀和. ピロリ菌のもつがん蛋白質 CagA は酸化ストレスにより誘導されるオートファジーにより分解される. ライフサイエンス新着論文レビュー (<http://first.lifesciencedb.jp/>) 2012 年 12 月 28 日 (査読無し)
- Tsugawa H., Suzuki H., Saya H., Hatakeyama M., Hirayama T., Hirata K., Nagano O., Matsuzaki J., Hibi T. Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe*, 13: 764-777, 2012. (査読有り)
- Saito Y., Suzuki H., Tsugawa H., Imaeda H., Matsuzaki J., Hirata K., Hosoe N., Nakamura M., Mukai M., Saito H., Hibi T. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS One*, 7: e47396, 2012. (査読有り)
- Saito Y., Suzuki H., Taya T., Nishizawa M., Tsugawa H., Matsuzaki J., Hirata K., Saito H., Hibi T. Development of a novel microRNA promoter microarray for ChIP-on-chip assay to identify epigenetically regulated microRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 33-37, 2012. (査読有り)
- 津川仁, 鈴木秀和, 畠山昌則, 平山壽哉, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. ミトコンドリア由来 ROS 依存性 autophagy による胃粘膜上皮の *H. pylori* 由来がん蛋白質 CagA 排除システム. *G.I.Reserch.* 20:98-99, 2012. (査読無し)
- Tsugawa H., Suzuki H., Matsuzaki J., Hirata K., Hibi T. FecA1, a bacterial iron transporter, determines the survival of *Helicobacter pylori* in the stomach. *Free Radic. Biol. Med.* 52: 1003-1010, 2012. (査読有り)
- Matsuzaki J., Suzuki H., Nishizawa T., Hirata K., Tsugawa H., Saito Y., Okada S., Fukuhara S., Hibi T. Efficacy of sitafloxacin-based rescue therapy for *Helicobacter pylori* after failures of first- and second-line therapies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 1643-1645, 2012. (査読有り)
- Suzuki H., Nishizawa T., Tsugawa H., Hibi T. Molecular approaches and modern clinical strategies for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Keio J. Med.*, 61: 109-119, 2012. (査読有り)
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Mogami S., Hibi, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50: 35-39, 2012. (査読有り)
- 津川仁, 鈴木秀和, 畠山昌則, 平山壽哉, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. *Helicobacter pylori* 感染細胞の oncoprotein CagA 排除システム. 日本

ヘリコバクター学会誌.13(2):40-43,2012.
(査読無)

12. Nishizawa T., Suzuki H., Matsuzaki J., Muraoka H., **Tsugawa H.**, Hirata K. Hibi, T. *Helicobacter pylori* resistance to rifabutin in the last 7 Years. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55; 5374-5375, 2011. (査読有り)
13. Nishizawa T., Suzuki H., **Tsugawa H.**, Muraoka H., Matsuzaki J., Hirata K., Ikeda F., Takahashi M., Hibi T. Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55;3012-3014, 2011.(査読有り)
14. **津川仁**, 鈴木秀和, 日比紀文. 酸化ストレス研究により明らかになった *Helicobacter pylori* 薬剤耐性獲得機構. *G.I.Reserch.* 19:38-43, 2011. (査読無)

[学会発表](計14件)

1. **津川仁**, 鈴木秀和, 佐谷秀行, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 正岡建洋, 畠山昌則, 平山壽哉, 日比紀文. Specific accumulation of CagA oncoprotein in CD44v9 expressing cancer stem cells. 第86回日本細菌学会総会. 幕張. 3月20日2013年
2. **Tsugawa H.**, Suzuki H., Saya H., Hatakeyama M., Hirayama T., Hirata K., Matsuzaki J., Hibi T. Accumulation of *Helicobacter pylori*-derived CagA oncoprotein in CD44-variant expressing cancer stem-like cells by escaping autophagy. The 6th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), Tokyo, Japan, 26th January, 2013
3. **津川仁**, 鈴木秀和, 畠山昌則, 平山壽哉, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 日比紀文. *H. pylori* 感染細胞内 ROS 依存性 autophagy 発現による CagA 分解機序. 第85回日本生化学学会. 福岡. 12月15日, 2012年
4. **津川仁**, 鈴木秀和, 畠山昌則, 平山壽哉, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. m1VacA 依存性 ROS 産生亢進による oncoprotein CagA 分解性 autophagy 発動機構. 第18回日本ヘリコバクター学会. 岡山. 6月29日2012年
5. **津川仁**, 鈴木秀和, 畠山昌則, 平山壽哉, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. *H. pylori* 感染宿主の細胞内 ROS 亢進依存的がん蛋白 CagA 排除メカニズム. 第65回日本酸化ストレス学会. 徳島. 6月7日2012年
6. **Tsugawa, H.**, Suzuki, H., Hatakeyama, M., Hirayama, T., Matsuzaki, J., Hirata, K., Fukuhara, S., Okada, S., Hibi, T. Specific amino acid mutation of p53 enhanced the stability of intracellular CagA by inhibiting autophagy induction. Digestive Disease Week 2012, Research forum, San Diego, USA, 21th May, 2012
7. **津川仁**, 鈴木秀和, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. Degradation response of oncoprotein CagA by autophagy in host cell. 第85回日本細菌学会総会. 長崎. 3月28日2012年
8. **Tsugawa, H.**, Suzuki, H., Kanekawa, M., Matsuzaki, J., Hirata, K., Okada, S., Fukuhara, S., Saito, Y., Hibi, T. Essential role of FecA1, iron-uptake transporter, in *Helicobacter pylori* for host colonization and metronidazole resistance. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, Sapporo, Japan, 7th September, 2011
9. **Tsugawa, H.**, Suzuki, H., Matsuzaki, J., Hirata, K., Okada, S., Fukuhara, S., Hibi, T. Essential role of FecA1, iron-uptake transporter, in *Helicobacter pylori* for antioxidant ability associated with survival within human stomach. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, Kagoshima, Japan, 3rd September, 2011
10. **津川仁**, 鈴木秀和, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. 病原細菌の慢性感染解除論の新機軸構築に向けた *H. pylori* の SodB 発現維持システム解析. 第64回日本酸化ストレス学会. 北海道ルスツリゾート. 7月2日2011年
11. **津川仁**, 鈴木秀和, 畠山昌則, 平山壽哉, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. *Helicobacter pylori* 感染細胞の oncoprotein CagA 排除システム. 第17回日本ヘリコバクター学会. 富山. 6月25日2011年
12. **津川仁**, 鈴木秀和, 日比紀文. 酸化ストレス型宿主異物排除応答に抵抗する *H. pylori* の鉄奪取機構. 第97回日本消化器病学会. 東京. 5月13日2011年
13. **Tsugawa, H.**, Suzuki, H., Hirata, K., Matsuzaki, J., Okada, S., Fukuhara, S., Saito, Y., Hibi, T. The iron-uptake system for the antioxidant ability of *Helicobacter pylori* regulated by Ferric uptake regulator (Fur). Digestive Disease Week 2011, Chicago, USA, 8th May, 2011
14. **Tsugawa, H.**, Suzuki, H., Hatakeyama, M., Matsuzaki, J., Hirata, K., Okada, S., Fukuhara, S., Hibi, T. *H. pylori*-derived oncoprotein, CagA is degraded by autophagy in human

gastric epithelial cells. Digestive Disease
Week 2011, Research forum, Chicago, USA,
7th May, 2011

〔図書〕(計2件)

1. 鈴木 秀和, 津川 仁, 日比 紀文. ピロリ
菌の薬剤耐性機序とその対策. Annual
Review 消化器. 13-18, 2012.
2. 鈴木 秀和, 津川 仁, 日比 紀文. ヘリコ
バクター・ピロリ感染症の徹底検証. *H.
pylori* の病原・薬剤耐性機序～慢性持続性
感染による宿主応答から～ ライフ・サイ
エンス. 39-53, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.keio-med.jp/gastro/ugt/membe
r/tugawa.html](http://www.keio-med.jp/gastro/ugt/member/tugawa.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津川 仁 (TSUGAWA TUGAWA)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 30468483