

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570148

研究課題名(和文) 不安定な鉄硫黄クラスターの生合成を担う超分子マシナリーの作動機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the supramolecular machinery involved in biosynthesis of labile iron-sulfur clusters

研究代表者

高橋 康弘 (TAKAHASHI, Yasuhiro)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10154874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：鉄硫黄(Fe-S)タンパク質のコファクターであるFe-Sクラスターの生合成には複雑な多成分酵素系(マシナリー)が関与している。本研究では、大腸菌の2種類の生合成マシナリー(ISCとSUF)についてin vivo機能解析と構造解析を進めることにより、以下の知見を得た。1) 大腸菌のイソプレノイド生合成経路を代謝改変することによってFe-Sクラスター生合成系の必須性を回避し、Fe-Sクラスターが無くても生きられることを見出した。2) 関連遺伝子群を自在に操作することによって、マシナリー成分の新たな特性を明らかにした。3) SUFマシナリーの中心成分SufBCD複合体の結晶構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Biological assembly of iron-sulfur (Fe-S) clusters is mediated by complex systems consisting of multiple proteins. In this study, we have characterized two distinct systems called the ISC and SUF machineries in *Escherichia coli*. We found that modification of the isoprenoid biosynthetic pathway in *E. coli* can offset the indispensability of the Fe-S cluster biosynthetic systems and show that the resulting *isc suf* double mutants can grow without detectable Fe-S cluster containing proteins. We constructed and characterized a series of mutants and found hitherto unrecognized roles of some ISC components. We also determined the first crystal structure of the *E. coli* SufBCD complex that functions in the SUF machinery as a scaffold for the de novo Fe-S cluster assembly.

研究分野：分子生物学

キーワード：鉄硫黄タンパク質 鉄硫黄クラスター 生合成 マシナリー

1. 研究開始当初の背景

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は、コファクターとして [2Fe-2S]、[4Fe-4S] などの Fe-S クラスターを持つタンパク質の総称である。全体では 3000 種類以上と見積もられており、光合成や呼吸などのエネルギー代謝から、アミノ酸やヌクレオチドの代謝、DNA の修復、RNA の修飾、遺伝子発現の制御にいたるまで、生命活動の根幹を担っている。これら Fe-S タンパク質の機能を支えているのが、Fe-S クラスターの生合成系である。研究代表者 (高橋) は 1999 年から 2002 年に世界に先駆けて、2 種類の独立した Fe-S クラスター生合成系、ISC と Suf マシナリーを発見した。いずれも多成分から構成される複雑な酵素系で、作動機構の詳細は未だに不明である。

分子レベルでの理解が進まない要因として、生合成マシナリーで新規に形成される Fe-S クラスターが非常に不安定なことが挙げられる。さらに、鉄イオンの非特異的な結合や Fe-S クラスターの非酵素的な形成も障害となり、*in vitro* の再構成系で *in vivo* の反応を忠実に再現することは未だ困難である。一方、*in vivo* では関連する遺伝子のほぼすべてが生育に必須なため、遺伝学的な解析はこれまで、発現抑制や温度感受性などの条件致死に限られていた。大腸菌は *iscSUA-hscBA-fdx-iscX* と *sufABCDSE* というふたつの生合成系オペロンを有しているが、片方の変異では表現型が不明瞭、二重変異は合成致死となるため、詳細な解析には適していなかった。

2. 研究の目的

近年、研究代表者 (高橋) は大腸菌のイソプレノイド生合成経路を代謝改変することによって、クラスター生合成マシナリーの必要性を回避し、関連する遺伝子群を自在に操作できる実験系を開発した。本研究では、この *in vivo* 実験系を駆使してマシナリー成分の特性を明らかにし、また、機能残基や機能領域などを洗い出すことを計画した。これら *in vivo* 解析から得られた知見に基づいて、*in vitro* の機能解析・構造解析を展開することにより、Fe-S クラスターの生合成メカニズムを理解することを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

大腸菌のイソプレノイド生合成経路は非メバロン酸 (MEP) 経路で、これには 2 種類の Fe-S 酵素が関与している。一方、イソプレノイド生合成の別経路 (メバロン酸経路) には Fe-S 酵素が関与していない。そこで、放線菌のメバロン酸経路の遺伝子群を大腸菌に導入してみると、 Δisc と Δsuf の二重変異株がメバロン酸を含む培地でのみ生育できることを見出した。本研究ではこの実験系を利用して、*suf* オペロンの欠失バックグラウンドで *isc* オペロンの 7 種類の遺伝子を個別に破壊し、各変異株の表現型や Fe-S クラスター形成能を詳細に比較検討した。また、ISC マシナリー

の中心成分である IscU に対して系統的な部位特異変異を導入して機能残基や機能領域を洗い出し、さらに、機能不全となったものからはサプレッサー変異を同定した。これら *in vivo* の知見に基づいて、野生型と変異型タンパク質の生化学的性質を *in vitro* で詳細に比較した。SufBCD 複合体の構造解析には X 線結晶解析法を用いた。

4. 研究成果

(1) イソプレノイド生合成経路を代謝改変した大腸菌を用いて、*suf* オペロンを欠失したバックグラウンドで *isc* オペロンを破壊した二重変異株、すなわち“Fe-S クラスターがなくても生きられる大腸菌変異株”をはじめ構築した。この変異株はメバロン酸の存在下でのみ極めてゆっくりと (3 時間程度の倍化時間で) 生育し、アコニターゼやコハク酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸合成酵素といった Fe-S タンパク質の活性は全く検出されなかった。また、[4Fe-4S] FdxN や [2Fe-2S] Fdx も検出限界以下だった。大腸菌には 130 種類を超える Fe-S タンパク質が存在しており、電子伝達系や TCA サイクル、DNA の修復、RNA 修飾、イソプレノイドの生合成、チアミンやリポ酸などコファクターの生合成、イソロイシン、バリン、ロイシンなどアミノ酸の生合成などに関与しているが、これらのうちで生育に必須なのはイソプレノイドの生合成に関与する IspG と IspH のみであり、それ以外の全てが機能しなくても富栄養培地であれば生育できることが明らかになった (図 1)。

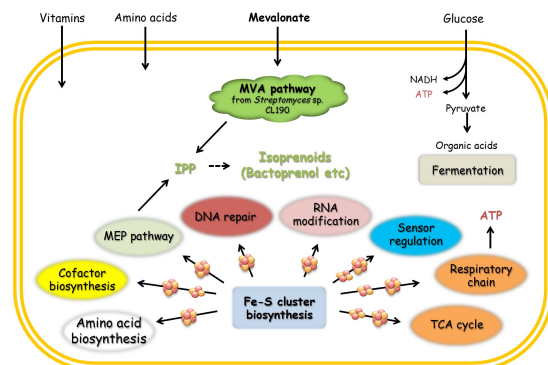


図 1 大腸菌の Fe-S タンパク質群

(2) *suf* オペロンを欠失したバックグラウンドで *isc* オペロンの 7 種類の遺伝子を個別に破壊した変異株を構築してそれらの性質を比較解析したところ、IscA と Fdx の 2 成分は嫌気条件では必ずしも必須でないことを見出した。また、IscA は [4Fe-4S] クラスターの生合成には必須だが、[2Fe-2S] クラスターの生合成には関与しないことが明らかになった。IscS、IscU、ならびに HscA と HscB (協調して IscU に結合する Hsp70 シャペロンとコシャペロン) は、嫌気・好気の両条件で [4Fe-4S] と [2Fe-2S] のクラスターの生合成に共に必要であった。さらに興味深いことに、サプレッサー変異の解析から HscA・HscB の必須機

能は IscU 内のアミノ酸置換によってバイパスされることを見出した。これらの知見は、マシナリー成分の役割を理解する上で重要な基盤となる(図2)。

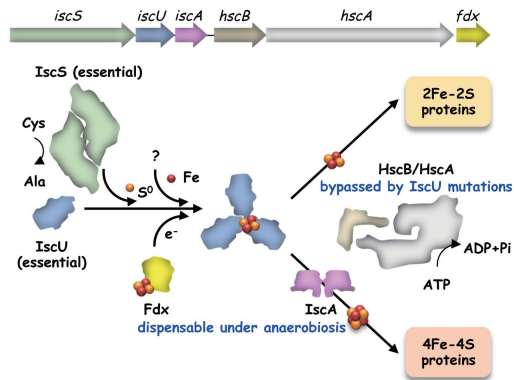


図2 新たに判明したISCマシナリーの特性

(3) IscU は、ISC マシナリーにおいて Fe-S クラスターの新規形成を担う中心成分である。IscU において Fe-S クラスターを結合すると考えられる 3 残基の Cys と 1 残基の His、ならびにその周辺の残基に系統的に部位特異的変異を導入して、変異型タンパク質の機能性を大腸菌変異株の相補試験を用いて検討したところ、Fe-S クラスターを配位する 4 残基に加えて、Tyr3、Asp39、Lys103 が in vivo 機能に必須であることが判明した。また、IscU の Tyr3 変異をサプレスする二次的な変異 (A349V) を IscS 内に見出した。野生型と変異型の IscU と IscS を精製し、これらを組み合わせて in vitro で相互作用を解析したところ、IscU の Tyr3 は IscS からの硫黄転移反応において、IscS のコンフォメーション変化に関与する可能性が明らかになった(図3)。

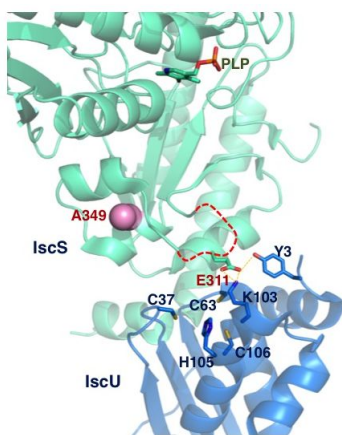


図3 IscS-IscU の機能的な相互作用

(4) SufBCD 複合体は、SUF マシナリーにおいて Fe-S クラスターの新規形成を担うと考えられている。本研究では、この複合体の結晶構造を初めて決定した。SufB と SufD の立体構造は相同で、どちらも N 末端ヘリカルドメインと C 末端ヘリカルドメインの間に、20

本のストランドが扁平ならせん状に巻き付いたユニークな β -ヘリカルコアドメインを持つことが明らかになった。SufB と SufD ではこのドメインどうしが会合しており、それぞれの C 末端ヘリカルドメインには SufC が 1 分子ずつ結合していた(図4)。SufC は ABC トランスポーターのヌクレオチド結合サブユニットに相同であるため、ATP 存在下では 2 分子の SufC が会合し、これによって SufB と SufD の β -ヘリカルコアドメインに大きな構造変化が生じるといった可能性が浮かび上がってきた。

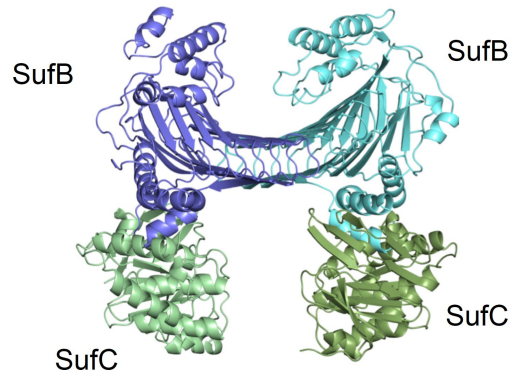


図4 SufBCD 複合体の結晶構造

(5) 大腸菌は機械的なストレス下で、アコニターゼやコハク酸デヒドロゲナーゼといった Fe-S タンパク質の活性が低下し、それを回復させるかのように Fe-S クラスターの生合成系、特に ISC マシナリーの HscA の発現が増加することを見出した。また、実際に HscA の発現を人為的に増加させると、ストレス下での Fe-S タンパク質の活性低下を防ぐ効果が認められた。

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 4 件)

1. Naoyuki Tanaka, Miaki Kanazawa, Keitaro Tonosaki, Nao Yokoyama, Tomohisa Kuzuyama and Yasuhiro Takahashi (2016) "Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron-sulfur clusters" Mol. Microbiol. 99(50): 835-848 doi: 10.1111/mmi.13271. 査読あり

2. Kei Hirabayashi, Eiki Yuda, Naoyuki Tanaka, Sumie Katayama, Kenji Iwasaki, Takashi Matsumoto, Genji Kurisu, F. Wayne Outten, Keiichi Fukuyama, Yasuhiro Takahashi, and Kei Wada (2015) "Functional Dynamics Revealed by the Structure of the SufBCD Complex, a Novel ATP-binding Cassette (ABC) Protein That Serves as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis" J. Biol. Chem. 290(50): 29717- 29731. doi:

10.1074/jbc.M115.680934. 査読あり

3. Tadashi Nakai, Hiroto Ito, Kazuo Kobayashi, Yasuhiro Takahashi, Hiroshi Hori, Motonari Tsubaki, Katsuyuki Tanizawa, and Toshihide Okajima (2015) "The Radical S-Adenosyl-L-methionine Enzyme QhpD Catalyzes Sequential Formation of Intra-protein Sulfur-to- Methylene Carbon Thioether Bonds" J. Biol. Chem. 290(17): 11144-11166. doi: 10.1074/jbc.M115.638320. 査読あり

4. Satoshi Okutani, Takayoshi Iwai, Shintaro Iwatani, Kiyoshi Matsuno, Yasuhiro Takahashi, and Toshiharu Hase (2015) "Response of Fe-S cluster assembly machinery of *Escherichia coli* to mechanical stress in a model of amino-acid crystal fermentation" J. Biosci. Bioeng., 120(3): 287-293. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.011. 査読あり

[学会発表](計40件うち招待講演3件)

1. 金澤美秋、田中尚志、松嶋夢叶、高橋康弘、「鉄硫黄クラスターの生合成に特化した Hsp70 型分子シャペロンシステムの遺伝学的解析」、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016年3月4~5日、東京工業大学(東京都)

2. 外崎敬太郎、田中尚志、金澤美秋、高橋康弘、「鉄硫黄クラスター生合成系に関する大腸菌フェレドキシン(Fdx)の機能残基および機能領域の解析」BMB2015(第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会)、2015年12月1~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

3. 田中尚志、金澤美秋、外崎敬太郎、葛山智久、高橋康弘、「鉄硫黄クラスター生合成系の完全欠損変異株を用いたISCマシナリーの再検討」、BMB2015(第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会)、2015年12月1~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

4. 高橋康弘、「広がりゆく鉄硫黄タンパク質の世界」、BMB2015(第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会)、2015年12月1~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)招待講演

5. 金澤美秋、田中尚志、高橋康弘、「大腸菌の鉄硫黄クラスター生合成欠損株の比較解析から判明した新たな特性」、第14回微生物研究会、2015年10月31日、明治大学 生田キャンパス(神奈川県川崎市)

6. 外崎敬太郎、田中尚志、高橋康弘、「大腸菌鉄硫黄クラスター生合成におけるフェレドキシン(Fdx)の機能残基および機能領域

の解析」、第14回微生物研究会、2015年10月31日、明治大学 生田キャンパス(神奈川県川崎市)

7. 金澤美秋、田中尚志、高橋康弘、葛山智久、「大腸菌の鉄硫黄クラスター生合成欠損株の解析から新たに判明したISCマシナリーの特性」、日本遺伝学会第87回大会、2015年9月24~26日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

8. Naoyuki Tanaka, Miaki Kanazawa, Tomohisa Kuzuyama, and Yasuhiro Takahashi, 「Genetic and Biochemical Analysis of IscU, a Central Component of Fe-S Cluster Biosynthesis Machinery」、RIKEN Symposium, "Metals in Biology" in Wako, 2015年6月16~17日、理化学研究所(埼玉県和光市)

9. 金澤美秋、田中尚志、高橋康弘、「鉄硫黄クラスター生合成系の新たな遺伝学的解析」、第12回21世紀大腸菌研究会、2015年6月4~5日、琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県大津市)

10. 田中尚志、金澤美秋、葛山智久、朝井計、高橋康弘、「イソプレノイド合成経路を代謝改変した大腸菌変異株における鉄硫黄クラスター生合成系の機能解析」、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月26-29日、岡山大学(岡山県岡山市)

11. 高橋康弘、「鉄硫黄クラスターの生合成を担うISCマシナリーの構造と遺伝学的解析」、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2015年3月5日、大阪大学蛋白質研究所(大阪府吹田市)招待講演

12. 外崎敬太郎、田中尚志、高橋康弘、「大腸菌鉄硫黄クラスター生合成系におけるフェレドキシン(Fdx)の機能領域の解析」、日本農芸化学会関東支部2014年度支部大会、2014年10月18日、埼玉大学、(埼玉県さいたま市)

13. 田中尚志、松嶋夢叶、北村整一、和田啓、福山恵一、高橋康弘、「鉄硫黄クラスター生合成系(ISCマシナリー)におけるIscUの構造変換の意義」、第87回日本生化学会大会、2014年10月15~18日、(京都国際会館(京都府京都市))

14. 山川誠、岩永朋子、平林佳、和田啓、福山恵一、高橋康弘、「超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* の鉄硫黄クラスター生合成系：新規なIscS-IscU-[2Fe-2S]複合体の形成」、第87回日本生化学会大会、2014年10月15~18日、(京都国際会館(京都府京都市))

15. 田中尚志、葛山智久、高橋康弘、「鉄硫黄

クラスターの生合成を担うISCマシンリーの機能解析」、平成26年度日本生化学会関東支部例会、2014年6月14日、茨城大学(茨城県水戸市)

16. 外崎敬太郎、田中尚志、高橋康弘、「鉄硫黄クラスターの生合成におけるフェレドキシン(Fdx)の機能領域の解析」、平成26年度日本生化学会関東支部例会、2014年6月14日、茨城大学(茨城県水戸市)

17. 山川誠、岩永朋子、平林佳、和田啓、高橋康弘、「超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の鉄硫黄クラスター生合成系ISC様マシンリーの解析」、平成26年度日本生化学会関東支部例会、2014年6月14日、茨城大学(茨城県水戸市)

18. 田中尚志、葛山智久、高橋康弘、「Fe-Sクラスターを持たなくても生存可能な大腸菌変異株を用いたFe-Sクラスター生合成系の解析」、第11回21世紀大腸菌研究会、2014年6月5~6日、ホテル大観(岩手県盛岡市)

19. 横山奈央、野中ちひろ、田中尚志、葛山智久、朝井計、高橋康弘、「枯草菌の鉄硫黄クラスター生合成系：合成生物学的アプローチによる必須オペロンの破壊と置換」、第8回日本ゲノム微生物学会年会、2014年3月7~9日、東京農業大学(東京都)

20. 湯田瑛樹、佐藤喬之、田中尚志、葛山智久、高橋康弘、「大腸菌の鉄硫黄クラスター生合成系(SUFマシンリー)におけるSufBの機能解析」、第8回日本ゲノム微生物学会年会、2014年3月7~9日、東京農業大学(東京都)

21. 田中尚志、葛山智久、高橋康弘、「イソプレノイド生合成系を改変した大腸菌における鉄硫黄クラスター生合成系の解析」、第8回日本ゲノム微生物学会年会、2014年3月7~9日、東京農業大学(東京都)

22. 田中尚志、横山奈央、野中ちひろ、坂本琴望、朝井計、葛山智久、高橋康弘、「鉄硫黄クラスターの生合成系を完全に欠失したバクテリア変異株の構築」、「細胞を創る」研究会6.0、2013年11月14~15日、慶應義塾大学鶴岡(山形県鶴岡市)

23. Yasuhiro Takahashi, "Structural and in vivo Functional Studies of IscU, a Central Component of the Iron-Sulfur Cluster (ISC) Biosynthesis Machinery", International Symposium "Biochemistry and Bioinorganic Chemistry of the Nitrogenase Active Sites, 2013年10月11日~12日、名古屋大学、招待講演

24. 横山奈央、野中ちひろ、田中尚志、葛山

智久、朝井計、高橋康弘、「鉄硫黄クラスターをつくれない枯草菌：必須オペロンの破壊と変異株の性質」、第12回微生物研究会、2013年10月5日、東京電機大学(東京都)

25. 山川誠、岩永朋子、平林佳、和田啓、高橋康弘、「超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の鉄硫黄クラスター生合成系、ISC様マシンリーの解析」、第12回微生物研究会、2013年10月5日、東京電機大学(東京都)

26. 葛西隆之、田中尚志、高橋康弘、「鉄硫黄クラスター生合成系NIFマシンリーの機能解析」、第12回微生物研究会、2013年10月5日、東京電機大学(東京都)

27. 田中尚志、和田啓、福山恵二、葛山智久、高橋康弘、「鉄硫黄クラスター生合成系の中心成分IscUへの変異導入とin vivo機能解析」、第86回日本生化学会大会、2013年9月11~13日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

28. 平林佳、長坂雄太、佐藤喬之、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵二、高橋康弘、和田啓、「鉄硫黄クラスター合成装置のダイナミックな構造変化」、第86回日本生化学会大会、2013年9月11~13日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

29. 野中ちひろ・横山奈央・田中尚志・葛山智久・朝井計・高橋康弘、「枯草菌の鉄硫黄クラスター生合成オペロン破壊株の構築」、2013年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2013年9月7~8日、筑波山江戸屋(茨城県つくば市)

30. 坂本琴望・大橋由香里・塩田正晴・田中尚志・朝井計・高橋康弘、「枯草菌鉄硫黄クラスター生合成系におけるSufUの機能解析」、2013年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2013年9月7~8日、筑波山江戸屋(茨城県つくば市)

31. 田中尚志、葛山智久、高橋康弘、「イソプレノイド生合成系を改変した大腸菌変異株における、鉄硫黄クラスター生合成系の機能解析」、第10回21世紀大腸菌研究会、2013年6月20~21日、ラフォーレ修善寺(静岡県伊豆市)

32. 平林佳、長坂雄太、佐藤喬之、片山寿美枝、岩崎憲治、福山恵二、高橋康弘、和田啓、「蛋白質複合体間の会合状態変換が生み出す鉄硫黄クラスターの合成基盤」、第14回日本蛋白質科学会年会、2013年6月25~27日、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

33. N. Tanaka¹, T. Masako, K. Wada, K. Fukuyama, T. Kuzuyama, and Y. Takahashi, "Mutational analysis of IscU revealed novel

functional residues” 7th International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation, 2013年5月20～24日、Columbia, (USA)

34. Kei Hirabayashi, Tomoko Iwanaga, Makoto Yamakawa, Naoyuki Tanaka, Keiichi Fukuyama, Yasuhiro Takahashi, and Kei Wada, “X-ray crystallographic analysis of a noncanonical cysteine desulfurase from the hyperthermophile, *Aquifex aeolicus*” 7th International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation, 2013年5月20～24日、Columbia, (USA)

35. 田中尚志、和田啓、福山恵一、葛山智久、高橋康弘、「イソプレノイド合成系を改変した大腸菌変異株における鉄硫黄クラスター生合成系 ISC マシナリーの機能解析」、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（福岡県福岡市）

36. 大橋由香里、塩田正晴、田中尚志、坂本琴望、野中ちひろ、朝井計、高橋康弘、「枯草菌鉄硫黄クラスター生合成系の遺伝学的解析」、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（福岡県福岡市）

37. 平林佳、高橋康弘、福山恵一、和田啓、「鉄硫黄クラスター合成系 ISC マシナリーを支えるタンパク質間相互作用の構造生物学的研究」、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（福岡県福岡市）

38. 中井忠志、伊藤寛人、岡島俊英、小林一雄、高橋康弘、堀洋、鏝木基成、谷澤克行、「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」、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（福岡県福岡市）

39. 田中尚志、馬迫卓也、和田啓、福山恵一、葛山智久、高橋康弘、「鉄硫黄クラスターの新規形成を担う IscU タンパク質の in vivo 機能解析：クラスター近傍の必須残基の役割」、第 12 回蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 20～22 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市

40. 平林佳、岩永朋子、高橋康弘、福山恵一、和田啓、「鉄硫黄クラスターの de novo 合成を支える、脱硫黄酵素 IscS を中心とした ISC 蛋白質群の相互作用」、第 12 回蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 20～22 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市

〔図書〕(計 0 件)

〔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.molbiol.saitama-u.ac.jp/tougyo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 康弘 (TAKAHASHI, Yasuhiro)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：10154874

(2)研究分担者

福山 恵一 (FUKUYAMA, Keiichi)
大阪大学・工学(系)研究科・招聘研究員
研究者番号：80032283

(3)連携研究者

なし