

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790937

研究課題名(和文)チロシン硫酸化に注目した糖尿病性合併症のバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Analysis of tyrosine sulfation as biomarkers for diabetic complication

研究代表者

三城 恵美(佐藤恵美)(Mishiro-Sato, Emi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00455544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のチロシン硫酸化は、生命の維持に必須の生体内反応であるが、その詳細はまだ明らかにされていない。本研究でははじめに、分解されやすいとされるチロシン硫酸化ペプチドを安定に解析する方法について検討し、これを確立した。次に、培養細胞から分泌タンパク質を回収し、この中からチロシン硫酸化タンパク質を網羅的に探索した。その結果、新規硫酸化タンパク質を複数発見した。さらに、臨床での扱いが簡便な尿中から硫酸化タンパク質を検出するに成功した。今後、本研究により同定したタンパク質チロシン硫酸化と疾患の関係を明らかにすることで、新たなバイオマーカーの開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although tyrosine sulfation is essential to life, its biological significance is not fully understood. In this study, I first developed the method to stably identify tyrosine sulfated peptides using LC-MS/MS system. Using this method, I analyzed the secreted proteins derived from cultured cells. Large-scale proteomic studies identified several novel proteins which are tyrosine sulfated. Finally, tyrosine sulfated proteins were successfully identified from urine samples. Urine samples have many advantages over traditional blood samples, in terms of easy collection and non-invasive sources. Although further studies are needed to assess the potential clinical importance of the sulfated proteins identified in this study, these findings would promote the detection of disease biomarkers.

研究分野：生化学

キーワード：チロシン硫酸化 硫酸化チロシン認識抗体 プロテオミクス解析 バイオマーカー 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、独立行政法人 国立国際医療研究センター 研究所 糖尿病研究センター 臓器障害研究部に所属し、糖尿病性合併症についてのバイオマーカー探索研究を担当していた。その中で、本研究者が以前から研究していたチロシン硫酸化という翻訳後修飾に着目してバイオマーカーを探索することにより、これまでに見つかっていないが機能的に有用であることが想定される新しいバイオマーカーを発見し、糖尿病合併症の早期診断や治療に役立てようとした。

日本の糖尿病患者は年々増加しているが、この病気の恐ろしさは、慢性的な経過で糖尿病性細小血管症による重篤な合併症（腎症は腎不全による人工透析、網膜症では失明、糖尿病性神経障害では糖尿病性壊疽による下肢切断）を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させることにある。糖尿病性細小血管症の一つである糖尿病性腎症のマーカーとしては、現在のところ、尿微量アルブミンがあるが、より早期に糖尿病性合併症の進行を診断できるバイオマーカーを探索し、早期に治療することができれば、腎不全への進行を食い止めることができると考えられる。

2. 研究の目的

糖尿病の合併症の中でも腎症は、微小炎症により引き起こされることが注目されている。本研究では、炎症性サイトカインや接着分子に発見されていて、接着や結合など機能に不可欠な修飾であることが報告されている、「チロシン硫酸化」という翻訳後修飾に着目してプロテオーム解析することにより、これまでに見つかっていないが機能的に有用であることが想定される新しいバイオマーカーを発見し、糖尿病合併症の早期診断や治療に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)尿中の硫酸化タンパク質の検出

健常者尿として自分の尿を用いる。尿中にもアルブミンと IgG が多く含まれるため、限外ろ過により脱塩・濃縮した尿タンパク質を Alb/IgG 除去カラムで処理する。

得られたタンパク質を自作の抗硫酸化チロシン認識抗体でウエスタンブロッティングにより検出した。

(2)硫酸化ペプチドの安定性の検討

チロシン硫酸化は高温酸性下で容易に加水分解されることが知られているが、実際にどれほど不安定であるかを明らかにするために、硫酸化ペプチドを TFA 存在下で 4-66 に置き、継時的な変化を質量分析装置 (nanoLC-QSTAR Elite) で測定することで調べた。また、アルカリ性の状態では、分解されにくいとされるため、同様に調べた。

また、質量分析装置で検出しにくいとされる硫酸化ペプチドを実際に検出するのに必要な量を検討した。

(3)硫酸基の低い pKa を利用して SCX カラムを用いた硫酸化ペプチドの濃縮法の開発

リン酸化タンパク質の網羅的解析に、プロテアーゼ消化後にリン酸化ペプチドを濃縮して、同定する方法が使われている。リン酸化ペプチドの濃縮法として、pH 2.7 にて SCX カラムを用いて分離し、低結合性の領域にリン酸化ペプチドが溶出される方法があるが、リン酸基より pKa の低い硫酸基では、さらに低い pH 条件下にすることで、硫酸基のみをチャージさせてリン酸基と硫酸基を分けて濃縮し、解析に用いることができると考えた。

(4) *in vitro* 硫酸化と検出法の開発

硫酸化候補タンパク質やペプチドが検出された場合に備えて、リコンビナントで発現し、精製した TPST と基質ペプチドを用いて *in vitro* で硫酸化し、検出できる方法を開発した。

(5)抗体カラムの作製

自作の硫酸化チロシン認識ファージ抗体を用いて、抗体カラムを作製することで、硫酸化タンパク質やペプチドを効率的に回収する。以前の予備実験では解離しやすく、ノンस्पーム多い His タグとニッケルカラムを使っていたため、今回は CNBr-Activated Sepharose を用いた。

(6)ウエスタンブロッティングの条件検討と細胞や分画法の選択

これまで市販されていなかった、Kehoe JW らの硫酸化チロシン認識ファージ抗体を購入し、自作の抗体と比較してウエスタンブロッティングの条件検討を行った。研究室で汎用の培養細胞を比較し、硫酸化タンパク質を多く含む細胞を選択し、分画法を検討した。

(7)二次元ウエスタンブロッティングと陽性スポットのタンパク質同定

C2C12 細胞の分泌タンパク質は、非常に多くの硫酸化タンパク質を含むことが分かったため、二次元電気泳動で分離し、市販の抗体でウエスタンブロッティングを行い、陽性スポットを検出した。1N HCl で 95 5min 加熱することで脱硫酸化させると、スポットが検出されなくなったため、チロシン硫酸化であると考えられる。陽性スポットをプロテアーゼで消化し、質量分析装置で測定した。同定タンパク質のうち、チロシン硫酸化部位予測サイト Sulfinator による硫酸化部位を有し、分泌・膜タンパク質と考えられる新規基質候補を選出した。

(8)チロシン硫酸化候補タンパク質の発現系構築

新規基質候補タンパク質について、チロシン硫酸化を確認するために、免疫沈降や検出に使えるように動物細胞で HSV タグ融合タンパク質の発現系を構築した。

(9)チロシン硫酸化候補タンパク質の硫酸化の確認

候補タンパク質の硫酸化の確認を、免疫沈降とウエスタンブロッティング、35S ラベルや PNGase F 処理によって行った。

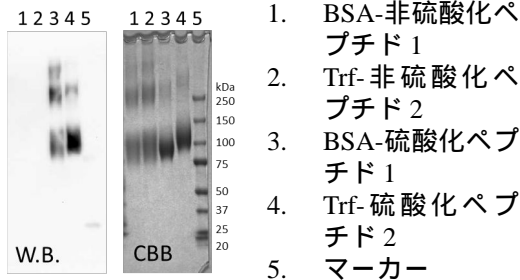
今後は、硫酸化部位を同定し、アラニンミュータントを作製してさらに確認を進める方針である。

4. 研究成果

(1)尿中の硫酸化タンパク質の検出

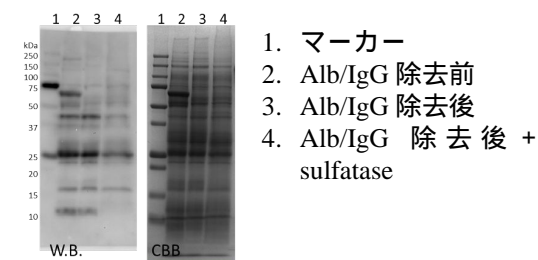
まず、自作の抗硫酸化チロシン認識抗体が、チロシン残基の硫酸基を認識するかを確認するためのウエスタンブロッティング(W.B.)を行った。硫酸化・非硫酸化ペプチドをコンジュゲートさせたタンパク質を検出したところ、硫酸化ペプチドにのみ反応した。硫酸化ペプチド 1: CASREEPEY[SO₃H]GEEIK、硫酸化ペプチド 2: CRGEEDDDY[SO₃H]LDLEK

図: 抗体の反応性の確認



次に、尿中の硫酸化タンパク質を検出した。Alb/IgG 除去カラムを用いることにより、アルブミンと IgG を効率的に除去することができた。脱硫酸化酵素である sulfatase で処理したところ、CBB では変化がないが、減少するバンドを検出したため、尿中に硫酸化タンパク質が存在することが分かった。ただし、陽性バンドの一部が CBB で濃いバンドと一致することから、ノンスペシフィックなものを検出してしまっている可能性も考えられた。

図: 尿中の硫酸化タンパク質の検出

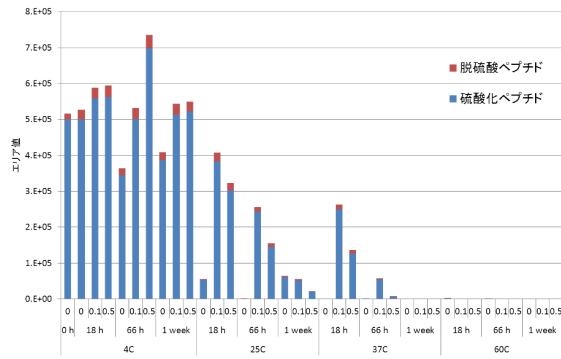


(2)硫酸化ペプチドの安定性の検討

硫酸化ペプチドに TFA (0%, 0.1%, 0.5%) を加え、通常の実験に使う温度を想定し、4、25、37、60 の温度下で保存した場合、硫酸化ペプチドがどの程度分解されるかを検討した。5 pmol 分のペプチドを nanoLC-QSTAR Elite にて 60 min のグラジエントで分離して測定した。定量は、硫酸化・非硫酸化ペプチドの m/z で Extracted-ion chromatogram (XIC)を描き、特定の retention time のエリア値を求めて使用した。また、今回は、他の酸化やアミド化などの修飾を受けたペプチドも多数検出されたが、定量には用いなかった。その結果、分解されやすいとされる硫酸化ペプチドは、通常の HPLC の条件

である 0.1%TFA 程度であれば、4 で保存しても安定であることが分かった。また、逆に 0%TFA の状態の方が、定量値が低くなってしまった。これは、チューブへの吸着など、別の要因によって引き起こされたものと考えられる。TFA 濃度が高いほど、温度が高いほど、硫酸化ペプチドが検出されなくなっているが、他の修飾のない脱硫酸化ペプチドの割合が増えている様子は見られなかった。これは、ほとんどのペプチドが他の酸化やアミド化などの修飾を受けたり、主鎖自体が分解されたりしていることを示している。

図: 硫酸化ペプチドの安定性の検討



チロシン硫酸化は酸性に弱い、アルカリ性に強い特徴があり、逆にチロシンリン酸化はアルカリ性に弱く酸性に強い特徴がある。そこで、アルカリ性への安定性を調べた。硫酸化ペプチドを 0.25 N と 3 N の NaOH、37、50 で処理し、上記と同様に測定した。その結果、確かに 3N で 50 という過酷な状況に 7.5 時間置いても、硫酸化チロシンがついたペプチドが検出され、安定であることが分かったが、今度は主鎖のペプチドが分解されて、短くなったものが検出された。リン酸化を区別するには、アルカリフォスファターゼで処理するのが適当と考えられ、リン酸化ペプチドを含むカゼインのトリプシン消化物に硫酸化ペプチドを加え、アルカリフォスファターゼ (CIAP) を処理して比較したところ、リン酸基のみを外すことができた。

質量分析装置にて硫酸化ペプチドの測定をする上で必要なペプチド量を検討した。用いたのは Bovine Fibrinogen -chain (Fib): QVGVEHHVEIEY[SO₃H]D (13 A.A.) と、Human Chromogranin-B (CGB): ASEEEPEY[SO₃H]GEEIK (13 A.A.) の硫酸体、非硫酸体、リン酸化体で、10 fmol から 10 pmol で測定し、解析ソフトである Protein Pilot で同定される量を検討した。その結果、どのペプチドも QSTAR の Analyst 上のクロマトグラムで 10 fmol から MS のピークを検出することはできたが、同定となると、非硫酸体は 10 fmol でも confidence 99 で十分に同定され、リン酸化体は、チロシン硫酸化と同じ分子量を示し、硫酸化の方が存在率が高く発生頻度が高いと計算される上、脱リン酸化もされないため、硫酸化修飾として confidence 99 で十分に同定されたが、硫酸化体は量を 10 pmol ま

で増やしても、confidence は 20 程度しか得られなかった。チロシン硫酸化部位は、もともと周りに酸性アミノ酸が多いことが知られているが、脱硫酸化の問題だけでなく、酸性アミノ酸も様々な修飾を受けてしまい、同定を困難にしていた。

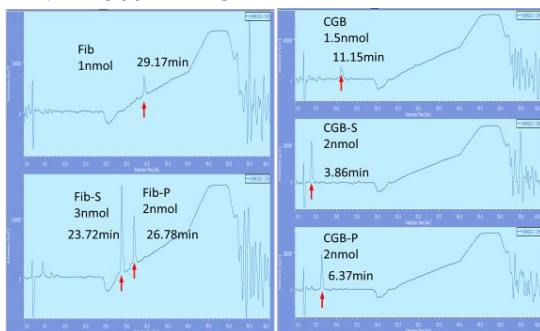
今回の検討により、硫酸化ペプチドやタンパク質のハンドリングとしては、通常のタンパク質を扱うような、冷やしておくなどの注意をしていけば、恐れることなく実験できることが分かった。リン酸化と硫酸化を区別するために、アルカリフォスファターゼ処理が適当であることが分かった。さらに、生体内に含まれるペプチドやタンパク質の硫酸体をリン酸化体と区別して質量分析装置で同定するのは、非常に困難であることが分かった。

(3) 硫酸基の低い pKa を利用して SCX カラムを用いた硫酸化ペプチドの濃縮法の開発

まず、pH 2.7 にて、リン酸化ペプチドを多く含むカゼインタンパク質のトリプシン消化物を SCX カラムで分離し、リン酸化ペプチドが前半に溶出されることを質量分析装置で確認した。次に、アミノ酸配列の異なるペプチド（前述の Fib、CGB）の、非修飾・硫酸化・リン酸化修飾のペプチドについて、buffer の pH を下げることで、ペプチドを分離できるポイントを探した。pH 1.0 まで下げて様々な buffer を作製し、図に示すように同一のペプチド配列で、硫酸化が前、リン酸化が後という retention time で分離することはできた。しかしながら、ペプチドのアミノ酸配列に依存して、retention time が変動してしまうことが明らかとなったため、網羅的な探索には不適當であることが分かった。これは、硫酸化チロシンの周りのアミノ酸の特徴として、酸性アミノ酸が多いことが原因で、そのため、プラスチャージの数の違うペプチドになってしまうことが原因と考えられた。

A: 50mM TFA, 20% CH₃CN (pH 1.4)

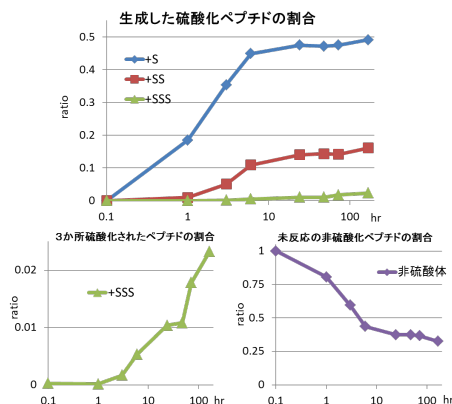
B: A + 500mM KCl



(4) *in vitro* 硫酸化と検出法の開発

これまでに行っていた *in vitro* 硫酸化反応は、³⁵S を用いた RI での検出で条件を確立していたが、RI は高感度であるが、硫酸供与体 (PAP³⁵S) は高価であるため、コールドの PAPS で硫酸化し、質量分析装置で検出する方法を開発した。コールドの PAPS は比較的安価であるため、反応系に十分量と考えられる量を加えた。基質は P-selectin glycoprotein

ligand-1 (PSGL-1) のチロシン硫酸化部位である GSATEY³⁵EYLDYDFLEFPGR³⁶L³⁷ERPHRD という配列のペプチドを用いた。酵素は大腸菌で発現・精製したヒト TPST-2 を用いた。反応液の組成は、50 mM MES-NaOH (pH 6.0), 50 mM KF, 25 mM MnCl₂, 1 mM PAPS, 5 μM PSGL-1 peptide, 0.2 μg hTPST-2, 10% Glycerol, 1 mg/ml BSA, 10 mM 2-mercaptoethanol で、50 μl で 30 分にて反応し、95 °C 3 min で反応終了後、C18 でペプチドを精製した。得られたペプチドを質量分析装置で測定し、前述と同様に、硫酸化・非硫酸化ペプチドの m/z で XIC を描き、特定の retention time のエリア値を求めた。検出されたペプチドの合計のエリア値のうち、それぞれの硫酸体がどの割合で精製されているかをグラフに示した。以前の RI の実験では、反応時間 30 min でプラトーに達していたが、今回の反応系では、図に示すように、非常に長時間にわたって反応が進んでいることが分かった。3 か所ある硫酸化されるチロシンは、1 か所の硫酸化では 6 時間程で 50% 弱のペプチドが硫酸化され、プラトーに達したが、3 か所とも硫酸化されるのは緩やかに反応が進み、1 週間経っても継続して増加していた。今回の質量分析装置を用いた検出法の確立により、ペプチドに何個の硫酸基が導入されたかを明らかにすることができるようになった。



(5) 抗体カラムの作製

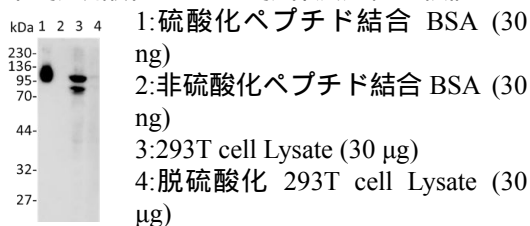
自作の硫酸化チロシン認識ファージ抗体を CNBr-Activated Sepharose に結合させて、抗体カラムを作製し、硫酸化・非硫酸化ペプチドを用いて結合を確認した。抗体カラムを作製することはできた。抗体とペプチドを室温で 2 時間反応させて結合させても、flow through 画分にほとんどのペプチドが出てきてしまった。ギ酸アモンの濃度を上げて塩濃度で溶出させると、硫酸化ペプチドのピークが検出されたため、わずかには結合していることが考えられるが、flow through が多すぎるので難しいという問題点が明らかとなった。

(6) ウエスタンブロッティングの条件検討と細胞や分画法の選択

これまで市販されていなかった、Kehoe JW ら (Mol Cell Proteomics, 2006 Dec;5(12): 2350-63) の硫酸化チロシン認識ファージ抗体を購入し、自作の抗体と比較してウエスタン

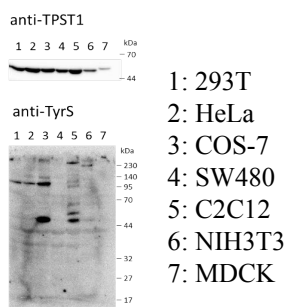
プロットングの条件検討を行った。自作の抗体では、Fab 部分と、Myc と His のタグがついているため、抗 Myc 抗体を二次抗体として使用した。前述のように、ポジコン・ネガコンとして、硫酸化・非硫酸化ペプチドをコンジュゲートさせたタンパク質は、問題なく検出できたが、細胞の Lysate を検出するとき、抗 Myc 抗体の nonspecific なバンドにより、硫酸化タンパク質の特異的な検出が難しくなってしまった。一方、市販されたファージ抗体は、mouse IgG の状態になっており、硫酸化・非硫酸化ペプチドを区別して検出することができる上、細胞の Lysate の酸加水分解 (1 M HCl, 95 °C, 5 min) による脱硫酸化サンプルを検出しても nonspecific なバンドが少なかったため、今後この抗体を使用することにした。

図：抗硫酸化チロシン抗体反応性の検証

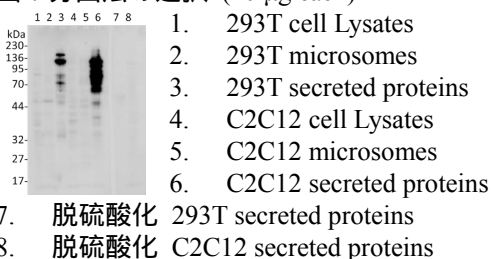


研究室で汎用の培養細胞を比較し、硫酸化タンパク質を多く含む細胞を選択することにした。同時にそれぞれの細胞の TPST1 の発現も検出した。図に示すように、TPST1 の発現はどの細胞もほぼ変わらないが、硫酸化タンパク質は、293T, HeLa, COS-7, C2C12 で多く見られた。293T, HeLa, COS-7 はパターンが良く似ていて、C2C12 は異なるパターンを示した。そのうち、293T, C2C12 を用いて、硫酸化タンパク質が多く存在するはずの膜タンパク質・分泌タンパク質を回収し、どの分画に硫酸化タンパク質が多いかを検討したところ、マウス筋芽細胞である、C2C12 細胞の分泌タンパク質に多くの硫酸化タンパク質が含まれていることが明らかとなった。

図：細胞の選択 (25 µg each)

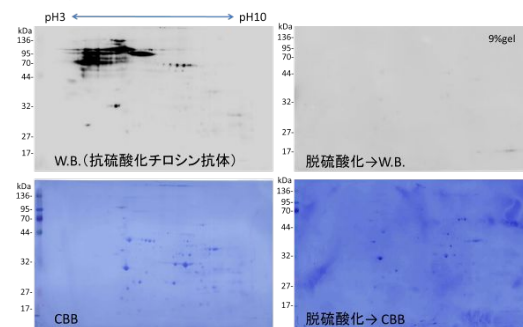


図：分画法の選択 (10 µg each)



(7) 二次元ウエスタンプロットングと陽性スポットのタンパク質同定

C2C12 細胞の分泌タンパク質は、非常に多くの硫酸化タンパク質を含むことが分かったため、二次元電気泳動で分離し、市販の抗体でウエスタンプロットングを行い、酸性高分子領域に多数の陽性スポットを検出した。CBB パターンとは異なるため、多量タンパク質を検出しているのではないことが分かる。1 N HCl で 95 °C 5 min 加熱することで脱硫酸化させると、スポットが検出されなくなったため、チロシン硫酸化であると考えられる。



54 個の陽性スポットをプロテアーゼで消化し、質量分析装置で測定した。Protein Pilot score > 4 にて、273 種類のタンパク質を同定し、既知の硫酸化タンパク質：6 種類 (Fibronectin, Nidogen-1, Collagen alpha-1(III) chain, Collagen alpha-1(V) chain, Collagen alpha-2(V) chain, Complement factor H) を含んでいた。さらに、チロシン硫酸化部位予測サイト Sulfinator による硫酸化部位を有し、分泌・膜タンパク質と考えられる新規硫酸化候補タンパク質を 15 種類選出した。

< 新規硫酸化候補タンパク質 >

1. Laminin subunit alpha-2
2. Laminin subunit beta-1
3. Laminin subunit gamma-1
4. Fibrillin-1
5. Tenascin
6. Complement C3
7. Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa
8. Neural cell adhesion molecule 1
9. Integrin alpha-V
10. Integrin beta-1
11. Endoplasmic reticulum chaperone
12. Cadherin-15
13. Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
14. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10
15. Follistatin-related protein 1

これらの中には、細胞外マトリクスや接着因子の他、主に小胞体に存在するとされるタンパク質も含まれた。

(8) チロシン硫酸化候補タンパク質の発現系構築

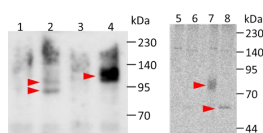
新規基質候補タンパク質について、チロシン硫酸化を確認するために、免疫沈降や検出に使えるように動物細胞で HSV タグ融合タ

ンパク質の発現系を構築した。膜タンパク質も含まれるが、硫酸化される部分は細胞外ドメインなので、transmembrane 領域を除いて分泌型にした。高分子量の場合は、特異的な抗体を購入し、免疫沈降で精製して用いた。

(9) チロシン硫酸化候補タンパク質の硫酸化の確認

候補タンパク質を動物細胞で発現させ、HSV タグで免疫沈降して硫酸化抗体で反応するか、酸加水分解で脱硫酸化されて反応しなくなるかを検討した。その結果、Endoplasmin と NCAM1 は硫酸化反応を検出することができた上、脱硫酸化により反応しなくなることを確認した。また、同様に細胞を ³⁵S ラベルして発現させ、免疫沈降タンパク質に放射活性があるかを検討した。糖鎖の硫酸化と区別するために、PNGase F を処理して糖鎖を切断した。ところ、FKBP10 が硫酸化されていることを確認した。今後も、さらなる検討は必要であるが、新規硫酸化タンパク質を見出すことができた。

図：硫酸化の確認



1. vector のみ
2. Endoplasmin
3. vector のみ
4. NCAM1
5. vector のみ
6. vector のみ+PNGase F
7. FKBP10
8. FKBP10+PNGase F

特に、Endoplasmin については、2 型糖尿病モデルマウスの神経疾患において、Endoplasmin が減少することで、小胞体ストレス応答を引き起こし、糖尿病の合併症の一つである神経障害を引き起こしているという報告がある (Sims-Robinson C ら、Diabetologia. 2012 Aug;55(8):2276-84.)。今回の研究では、Endoplasmin がチロシン硫酸化修飾によってその機能にどのような変化をもたらすかを調べるには至らなかったが、糖尿病性合併症に関連するタンパク質を見つけることができ、今後詳細に調べていきたい。

(10)まとめ

所属研究室の変更により、研究開始当初の目的であった、糖尿病性腎症のバイオマーカー探索として、糖尿病患者などの検体を使用した研究の報告はできなくなってしまったものの、現在所属している北里大学薬学部生化学教室にて、チロシン硫酸化研究について基礎的な予備実験から、本格的な新規基質の探索まで十分な研究を行うことができたため、新規硫酸化タンパク質を同定することができた。今後、タンパク質の機能と硫酸化の関係について、詳細に調べていく予定である。

本研究では、培養細胞培養液中から硫酸化タンパク質を多数同定し、尿中の硫酸化タンパク質の検出法を確立したことから、今後、糖尿病など様々な疾患において、チロシン硫酸化タンパク質がバイオマーカーとして利用できる場合に、簡便に測定できる方法を確立することができた。そして、チロシン硫酸化を研究することで、新しい機能性タンパク質を見出し、生命の維持や疾患の解明につながる研究をすることができた。

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 1 件)

Teramoto T, Fujikawa Y, Kawaguchi Y, Kurogi K, Soejima M, Adachi R, Nakanishi Y, Mishiro-Sato E, Liu MC, Sakakibara Y, Suiko M, Kimura M, Kakuta Y. Crystal structure of human tyrosylprotein sulfotransferase-2 reveals the mechanism of protein tyrosine sulfation reaction. *Nature Communications*, 査読有, 2013, Nature Publishing Group, 4:1572. doi: 10.1038/ncomms2593.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. ○三城(佐藤) 恵美、柴垣 芳夫、服部 成介 新規チロシン硫酸化タンパク質の探索 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

2. ○Emi Mishiro-Sato, Tomomi Kondo, Naoya Kenmochi, Tamayo Uechi, Katsuhisa Kurogi, Ming-Cheh Liu, Masahito Suiko, Yoichi Sakakibara Functional studies of post-translational modification by tyrosine sulfation: Knockdown analysis of three kinds of zebrafish tyrosylprotein sulfotransferases HUP0 12th Annual World Congress September 17, 2013, Pacifico Yokohama,

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/biochemistry/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三城 恵美 (MISHIRO-SATO, Emi)

北里大学・薬学部・生化学教室・嘱託助教
研究者番号：00455544

(2)研究分担者

なし