

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25242069

研究課題名(和文) カイメン由来難培養性共生細菌に着目した新規物質探索研究

研究課題名(英文) Screening for Novel Natural Products from Symbiotic Bacteria of Marine Sponge, Halichondria Okadai

研究代表者

上村 大輔 (Daisuke, Uemura)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：00022731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：カイメンに共生する難培養性微生物を直接遺伝子資源として利用するメタゲノム法を発展させ、効率のよいスクリーニング法を開発し、新規化合物を単離することを目的とする。ライブラリーをBAC化、シャトルベクター化しメタゲノム法を改良した。SDS-PAGE解析を導入して新たな天然物の解析法を開発した。また、天然物を抗原とした免疫染色法とフローサイトメトリーを組み合わせた天然物の生物オリジン探索法を開発した。さらにSymbiodinolideの立体構造解析を進展させた。改良したメタゲノム法により新規化合物を単離構造決定すること、その生物オリジンを特定することで共生システムを解明することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We improved the metagenomic method by converting the library into BAC, shuttle vector. An analysis method of new natural products using SDS-PAGE analysis was constructed. In addition, we developed the origin search method for natural products combining immunostaining method using natural products as antigen and flow cytometry. We further advanced the structural analysis of Symbiodinolide. It is expected to elucidate the symbiotic system by determining the isolation structure of the novel compound by the improved metagenomic method and identifying the origin of these natural products.

研究分野：天然物化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物 クロイソカイメン 生物オリジン メタゲノム フローサイトメトリー SDS-PAGE 免疫染色
Symbiodinolide

1. 研究開始当初の背景

(1)海洋天然物化学の分野は近年非常に発展し、多くの天然物がカイメン類から単離・構造決定されてきた。例えばクロイソカイメン *Halichondria okadai* からは分子量 805 のオカダ酸などが単離されている。私達もクロイソカイメンよりハリコンドリノ B (分子量 1,110) の単離・構造決定に成功している (Uemura et al. Pure Appl. Chem. 1986, 58, 701)。近年ハリコンドリノ B をもとに新規抗がん剤ハラヴェンが開発され、既にアメリカ、日本等で上市され、カイメン由来天然物の医薬リードとしての価値が強く認識されている (Uemura et al. Pure Appl. Chem. 2012, 84, 1297)。

近年こうした天然物の幾つかは共生微生物が産生していることが報告されている (Piel et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004, 101, 16222)。しかし、こうした共生関係にある微生物がなぜこのような特異な構造と強烈な生理活性を有する天然物を産生するのかは依然不明であった。というのも環境中の細菌の大部分は難培養性であり、しかもカイメンの菌叢は多様でごく少数の天然物生産菌を単離・解析することは難しかったからである (Amman et al. Microbiol. Rev. 1995, 59, 143)。

このような難培養性細菌を解析する方法としてメタゲノミクス法が利用されている。メタゲノム法は単離・培養をせずに直接環境からゲノム DNA を抽出し、大腸菌などの宿主に導入してメタゲノムライブラリーとする方法である。メタゲノム法は遺伝子を網羅的に解析できるため未知遺伝子の探索に適した方法である。

(2)私達は基盤研究 (S) においてメタゲノム研究を始め、以下のような成果を挙げた。ゲノムの抽出方法を工夫することでクロイソカイメンより Fosmid をベクターとして 150,000 クローンのメタゲノムライブラリーの構築に成功している。これは初めてクロイソカイメンからメタゲノムライブラリーを構築した報告となる (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012, 76, 633)。また天然物化学的手法を用いて新規化合物 halichrome A (分子量 276) の単離に成功した。これはカイメン由来のメタゲノムライブラリーから初めて新規化合物の単離に成功した点で非常に重要な研究といえる (Chem. Lett. 2012, 41, 728)。このようにメタゲノム研究を大幅に前進させることができた。

一連の先行実験により、私達はメタゲノム法によるアプローチが有効なことを確認した。一方で、ポリケチド化合物などの高分子量の生理活性物質の生合成遺伝子は 30 ~ 90kb のクラスターを形成しており、これらの遺伝子群をクローニング可能な、Fosmid (最大 30kb) ベクターより高分子量のゲノム DNA ライブラリーを構築する必要性も確認した。

またクロイソカイメンのような極めて多様な菌相を持つサンプルを用いて効率的に天然物をスクリーニングするためには、メタゲノム法に新たなアプローチを導入する必要性も明らかとなった。

2. 研究の目的

前述の背景より、私達はクロイソカイメンに共生する難培養性微生物に注目し、これら共生微生物を単離・培養せず、直接遺伝子資源として利用するメタゲノム法をさらに発展させ、効率のよい難培養性の共生微生物の遺伝子ライブラリーを構築し、新規化合物のスクリーニングを行うことにした。具体的な目的としては、天然物を生産する微生物の持つ生合成遺伝子は一般的に巨大なクラスターを形成しており、それら生合成クラスターを効率的にスクリーニングできるライブラリーを構築する。またライブラリーを構成する宿主も大腸菌以外に拡大し、多様なライブラリーを構築する。スクリーニング方法に関しても、抗菌活性以外のアプローチを試みる。生理活性を指標とした探索以外にも、天然物そのものの物性に着目し、新しいスクリーニング法を開発する。また、クロイソカイメンは次世代シーケンサーによる解析の結果、多様な微生物を含んでいることが明らかとなっているが、天然物の真の生産者はその中のごく一部にしか過ぎない。この、極めてマイナーな微生物の遺伝子を効率的に利用する方法を開発する。

本研究のもうひとつの目的は、天然物を通して、その生産者である微生物と宿主であるクロイソカイメンの関係を明らかにし、共生システムを解明する事である。具体的には、クロイソカイメンから単離された天然物の生物オリジンを明らかとすることである。クロイソカイメンに共生する微生物が天然物を生産することでどのように宿主とのコミュニケーションをとっているのか知見を得ることが期待される。

3. 研究の方法

(1)メタゲノムライブラリーの改良

先ず、クロイソカイメンの共生微生物ライブラリーの改良を行った。前述のとおり、私達は既にクロイソカイメンから微生物画分を分離し、メタゲノムライブラリーを構築することに成功している。そこで本研究では、Fosmid より高分子量のゲノム DNA をクローニング可能な BAC をベクターとしたライブラリーを用いてライブラリー構築を行った。具体的には微生物画分をアガロースで固めた状態 (PLUG) で制限酵素処理をした。制限酵素処理をしたサンプルはパルスフィールド電気泳動を用いて 100kb 付近のゲノム DNA を抽出し、ライブラリー構築に供した。

次にライブラリーの宿主を拡大するためのシャトルベクター構築を行った。宿主としては、*Streptomyces lividans* を宿主とした。

具体的には大腸菌用の BAC プラスミドをベースとして、放線菌ファージ由来インテグラーゼ及びその認識配列、マーカーとして抗生物質耐性遺伝子、及びそれらの上流に放線菌で恒常的に発現するプロモーターを挿入し、シャトルベクターを構築した。スクリーニングは宿主が大腸菌の時は枯草菌および酵母を用い、放線菌を用いたときは酵母を用い、抗菌活性を指標にスクリーニングを行った。

また、次世代シーケンスの結果、クロイツカイメン中では、放線菌等の天然物生産能をもつ微生物種がマイナー種であることを確認した。これら難培養性の微生物を基にしたメタゲノムライブラリーから効率的に天然物のスクリーニングを行うためには、メタゲノムライブラリー作製の元となる微生物画分から単離・培養を経ずに放線菌を分離する必要があると私達は考えた。そこで放線菌を単離・培養せずに回収するため 16S rRNA を指標に FISH 法を用いて共生放線菌の選択的分離を行った。先ず放線菌に高度に保存されている 16S rRNA 配列を参考に蛍光タンパクを付加したオリゴ DNA プローブを合成した。*S. lividans* をコントロールとして、このプローブをハイブリダイズ可能な条件を検討した。次にフローサイトメトリーでの分離を進めた。クロイツカイメン破砕液を、コントロールを参考にした条件で染色しフローサイトメーターで分析を行った。

(2) パリトキシンの SDS-PAGE 解析

ライブラリーが生産する天然物を効率よくスクリーニングするために、私達は安価で迅速な天然物の検出システムの構築を計画した。具体的にはアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法を応用することで迅速に天然物のバンドを検出する。本研究では基礎的な知見を得るため、化学的手法で単離したパリトキシンをサンプルとして用いた。パリトキシンの抽出と分離は定法に基づいて行った。沖縄の石垣島の海岸から、イワスナギンチャク (*Palythoa tuberculosa*) を採集した。イワスナギンチャクを EtOH で抽出し、抽出物を濾過し、濃縮した。抽出液を逆相オープンカラムクロマトグラフィー (ODS シリカゲル, EtOH-H₂O) により分画した。次いで、逆相 HPLC (三菱化学, GEL CQP30; EtOH-H₂O) によりさらに単離し、精製されたパリトキシンを得た。

単離されたパリトキシンを蒸留水に溶解した。この試料に 2 X サンプル緩衝液 (Tris-HCl pH6.8 0.25M、グルコース 20%、SDS 8%、プロモフェノールブルー 0.02%) を添加した。試料を 95 °C で 5 分間加熱し、次いで氷中で 15 分間冷却した。今回 SDS-PAGE において、精製パリトキシンは非還元条件下 (-メルカプトエタノールなし) で分析した。精製されたパリトキシンを Tricine-SDS-PAGE ゲル上に流した。パリトキシンは T5 / C3 スタッキングゲル上で分離

し、T18 / C6 分離ゲルは 3 X ゲル緩衝液 (Tris-HCl pH8.45 3M) で分離した。分離ゲルに 4M 尿素を添加した。緩衝液はそれぞれ、陰極緩衝液 (Tris-HCl pH8.30 100mM、Tricine 100mM、SDS 0.1%、TEFCO、Japan) および陽極緩衝液 (Tris-HCl pH8.9 200mM) を用いた。低分子量タンパク質の分解能を高めるために、トリシンをグリシンに置き換えた。尿素はより低分子量のバンドを鮮明にし、小分子化合物の電気泳動移動度を減少させるために重要である。電気泳動条件は、最初に 50V に設定し、試料が完全に分離ゲルに達するまでこの電圧に維持した。プロモフェノールブルーがゲルの終わりに達するまで、次の電圧は 150V に設定した。標準的なプロトコールを用いてゲルを銀染色した。

(3) オカダ酸生物オリジンの探索

この膨大な種類の微生物群の中から天然物の真の生産者を見つけ出すことは、クロイツカイメンとそれら微生物との共生システムの解明につながるものと私達は期待している。オカダ酸に関しては渦鞭毛藻 *Prorocentrum lima* 等で生産が報告されている。しかしながら、クロイツカイメンにおけるオカダ酸の生物オリジンに関する報告は未だなされていない。その生合成経路に関しても依然不明な点が多く、クロイツカイメン内でのオカダ酸の働きを明らかにするためにも、オカダ酸の真の生産者を明らかにすることは学術上重要である。クロイツカイメンは神奈川県三浦半島で採取を行った。採取したクロイツカイメンはオートクレーブで滅菌した海水中で破砕し、石や貝類等はデカンテーションで除去した。先ず 4% パラホルムアルデヒド溶液でカイメン破砕液の固定を行った。各サンプルをパラホルムアルデヒド溶液で 1 時間処理した。その後リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄を行った。免疫染色は Vector Laboratories 社の VECTASTAIN ABC Kit 及び Vector Red を用いて、ABC 法で行った。一次抗体はモノクローナル抗オカダ酸抗体 (マウス) を購入し、100 倍以上希釈して用いた。染色後サンプルを顕微鏡で観察した。

次にセルソーターを用いたオカダ酸生物オリジンの単離を試みた。一次抗体は免疫染色で用いた抗オカダ酸抗体を用いた。二次抗体はそれぞれ異なる蛍光を示す Dylight488 と Dylight650 (フナコシ) を用いた。クロイツカイメン破砕液をパラホルムアルデヒドで固定し、洗浄後 PBS で希釈した一次抗体溶液で処理した。洗浄後 PBS に希釈した Dylight488 と Dylight650 で処理した後、PBS で洗浄した。洗浄後 PBS に再懸濁したサンプルをメンブレンフィルターでろ過した物を実験に供した。クロイツカイメンの破砕液には夾雑物が多く含まれるため、先ず標準物質として市販されている蛍光ビーズを用いて回収する微生物の大きさを決定し、極力夾雑

物を除去するようにゲーティングした。

(4) Symbiodinolide の立体構造決定

Symbiodinolide は渦鞭毛藻から単離したポリオール化合物である。本化合物はカルシウムイオンチャネル開口活性および COX-1 阻害活性を有していることが明らかとなっている。私達は基盤研究 S においてその立体構造の解析をスタートし、大きく研究を進展させることができた。そこで私達は基盤研究 A において引き続き本化合物の立体構造を解析し、その構造を完全に解明することを目指し、化学的なアプローチを行った。(岡山大学、門田功教授との共同研究)

4. 研究成果

(1) メタゲノムライブラリーの改良

私達は制限酵素処理した PLUG をパルスフィールド電気泳動にかけ 100-150kb 付近を切り出した後、向きを逆にして再度パルスフィールド電気泳動にかけることによって低分子量ゲノム DNA を極力除去し、高分子量のゲノム DNA を用いた BAC ライブラリーの構築に成功した。さらに RNase・DNase 阻害用バッファーにカイメンを漬け込むことで高分子量のゲノム DNA を回収することに成功した。

また、放線菌への組み込みを行うインテグラーゼとインテグラーゼの認識配列およびマーカーとして薬剤耐性遺伝子を放線菌用プロモーターと共に BAC ベクターに組み込み放線菌 大腸菌シャトルベクターを構築した。スクリーニングは酵母への抗菌活性を指標として進めたが、強い活性を示す株は得られなかった。原因としては、放線菌の形質転換効率が低いこと、クロイソカイメン共生菌の大部分がアルファプロテオバクテリアであることが考えられる。そこで以下のように計画を修正した。

放線菌への形質転換法を PEG 法からより効率の良い接合法を導入するため接合遺伝子保持株を導入した。さらに大腸菌内でメタゲノム DNA の分解を防ぐため、Dam, Dcm 遺伝子破壊株を購入した。現在ライブラリーを構築し、生理活性物質の探索を進めている。

またクロイソカイメン破碎液中から生理活性物質生産菌として期待される難培養性の放線菌を分離するため FISH 法とフローサイトメトリーを組み合わせることにした。FISH 法では、先ず *S. lividans* をコントロールとして条件検討を行った結果、ホルムアミドバッファーを用い、反応温度を 40 とすることで、放線菌の 16S rRNA を染色できることを蛍光顕微鏡で確認した。次に本条件でク

ロイソカイメン破碎液を染色し、フローサイトメトリーで解析した(図 1)。解析は非染色クロイソカイメン破碎液と比較しつつ行った。自家蛍光を示す範囲(R17)を極力排除し、回収範囲(R19)を決定してゲーティングした。結果、染色した破碎液において、放線菌と予想される蛍光を確認することができた。また、クロイソカイメン破碎液を 1000G、3000G、8000G と段階的に分画しそれぞれフローサイトメトリーで解析した結果、放線菌の反応は 1000G 画分に最も強く出た。これは通常の細菌と異なり、放線菌が糸状菌形態をとるためと考えられる。現在さらに詳細な解析を進めている。メタゲノムを作製する際、真核生物であるカイメン細胞の混入は極力避ける必要がある。フローサイトメトリーでの特定微生物の分離法を確立することはメタゲノムへカイメンのゲノム DNA の混入を防ぐという目的でも有効と考えられる。今後はフローサイトメトリーで回収したサンプルからのライブラリー構築を進める。

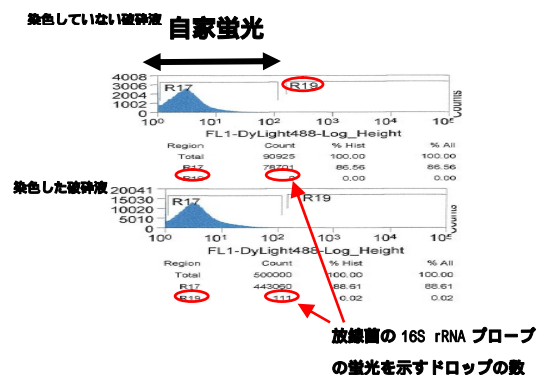


図 1 フローサイトメトリーによる放線菌の 16S rRNA を指標とした破碎液の解析

(2) パリトキシンの SDS-PAGE 解析

パリトキシンはポリオール化合物であり、ポリペプチドを含まない。したがって、SDS-PAGE 解析で一般的な CBB 染色はパリトキシンの染色には適切ではない。一方、パリトキシンには多くの水酸基が存在する。私達はその水酸基を標的として銀染色法を用いることでアクリルアミドゲル上のパリトキシンを検出することに成功した。今回銀染色法が利用可能であることを確認できたことで、CBB 染色と組み合わせることで、未知サンプルがペプチドを含むかどうかを確認することが可能となった。

銀染色によりバンドを確認できたため、次に私達はタンパク質マーカと比較して分子量から予測される位置にパリトキシンのバンドが存在するかどうかを確認した。結果、精製パリトキシンサンプルを用いたにもかかわらず、この Tricine-SDS-PAGE 分析では、アクリルアミドゲル上に分子量の異なる2つのバンドが検出された(図2)。

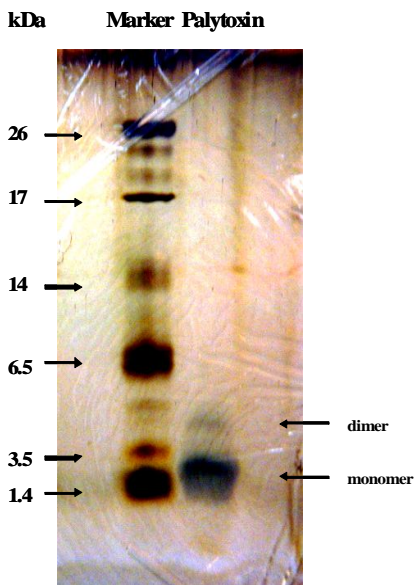


図2 パリトキシンの SDS-PAGE 解析

一方のバンドは3.5~6.5kDaの範囲にあり、他方のバンドは1.4~3.5kDaの範囲であった。私達は以前に、X線小角散乱(SAXS)によるパリトキシンの形状を調べたところ、パリトキシンが水溶液中に二量体を形成することが明らかにしている。したがって、本研究の結果はパリトキシンがその形態に従って2つの異なる分子量を示すことが現れた結果だと予測した:パリトキシン一量体は2680、パリトキシン二量体は5360である。実際に、低分子量側のバンドの分子量は、タンパク質マーカによって計算された近似曲線を使用して予想される一量体型のパリトキシンの分子量に非常に近い値を示した今後この仮説を明らかにするために、さらなる検討を進める。具体的にはパリトキシンをアセチル化する。アセチル化したパリトキシンは二量体を形成しないため、アセチルパリトキシンを SDS-PAGE 解析することで確認する。

この SDS-PAGE 法をさらに改良すれば、粗抽出物を分離することができ、化学分析と組み合わせることで、ライブラリー由来のサンプルをより容易に同定することができるかと私達は考えている。

(3)オカダ酸生物オリジンの探索

Vector-Red を用いた染色は染色部分が赤色を示すため可視光下肉眼で確認でき、さらにローダミン様の蛍光パターンを示すため、可視光及び蛍光での観察を行った。まず免疫染色をしていないクロイソカイメン破碎液と比較しながら可視光での観察を行った。結

果、1000G 画分を処理したサンプルにおいて、赤色に染色された10-20ミクロンの微生物を確認することができた。さらに本プレートを蛍光で観察した結果、赤色に染まった微生物がローダミン様の蛍光を示すのを観察することができた。本研究によって、染色を受けた微生物は極めて希少なしか存在せず、更なる解析を進めるためには効率的に微生物を回収する必要があることが明らかとなった。

セルソーターで回収したサンプルを蛍光顕微鏡で観察した。Dylight488の蛍光はFITCの、Dylight650はCy5のフィルターで観察した。観察の結果、Dylight488およびDylight650両方の蛍光を示す10-20ミクロンの微生物を確認することができた(図3)。ただ観察の結果、この微生物以外にも蛍光を示さない複数の微生物が確認されており、目的の微生物を単離できていなかった。これは検出時に同時通過するサンプルをアボートする条件を低く設定して回収を行ったことが原因と考えられる。

そこで現在セルソーターで回収したサンプルを試料として、マニピュレーターによるオカダ酸の生物オリジンの単離を進めている。単離後はゲノムを抽出し、生物種の特定、オカダ酸の生合成経路の解明を進めていく。また、本研究で得られた知見を元に、オカダ酸以外の天然物の生物オリジンの探索も進めていく。

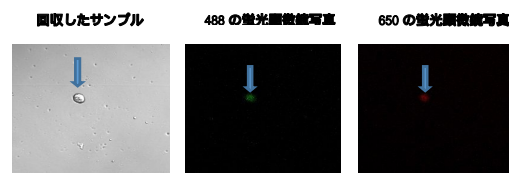


図3 蛍光顕微鏡による回収したサンプルの観察

(4) Symbiodinolide の立体構造決定

私達は培養した渦鞭毛藻から Symbiodinolide を単離し、その平面構造を既に決定している(図4)。そこで私達は本化合物の立体構造を完全に解明することを目指し、化学的なアプローチを行った。本研究は順調に進捗しており、絶対構造を含めて全構造が決定されつつある。具体的には C1'-C25'、C14-C24、C23-C34、および C33-C42 の各フラグメントに関して各種立体合成異性体を含めた合成を完了し、各々の絶対立体配置の決定および確認を行うことができた。そこで次に C1-C13 と C91-C99 の部位の立体構造を解析した。具体的には、合成品と分解生成物との NMR データの比較を行うことで、C1-C13 フラグメントの相対立体構造を決定した。またジアステレオマーを立体発散的に合成することで、C91-C99 部位の相対立体配置を決定することができた(図5)本化合物は64個の不斉中心を持つが、そのうち50個まで決定することができており、残り14個の不斉中心に関して研究を進めて

いく。

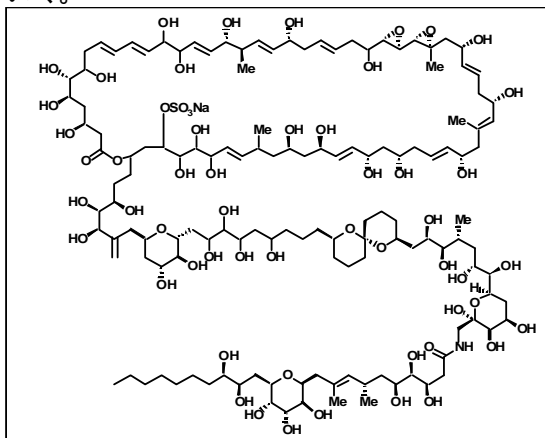
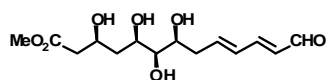


図4 Symbiodinolide の平面構造

a



b

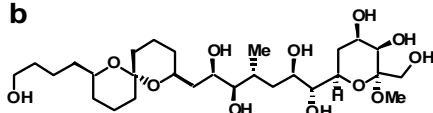


図5 (a) C1-C13 fragment, (b) C79-C104 fragment of Symbiodinolide

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計25件)

- (1) T. Abe, T. Naito, D. Uemura, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Analysis of Palytoxin, *Nat. Prod. Commun.*, 12, (2017) (in press) (査読有)
- (2) H. Takamura, D. Uemura et al., Stereodivergent Synthesis and Stereochemical Reassignment of the C79-C104 Fragment of Symbiodinolide, *Chem. A Europ. J.*, 22, 1984-1996 (2016) (査読有)
- (3) T. Inuzuka, D. Uemura et al., Haebaruol, a 9,11-Secosteroid Isolated from the Soft Coral *Clavularia* sp., *Chem. Lett.*, 45, 81-82 (2016) (査読有)
- (4) H. Takamura, D. Uemura et al., Stereoselective Synthesis of the Proposed C79-C104 Fragment of Symbiodinolide, *Chem. A Europ. J.*, 22, 1979-1983 (2016) (査読有)
- (5) H. Takamura, D. Uemura et al., Stereodivergent Synthesis and Relative Stereostructure of the C1-C13 Fragment of Symbiodinolide, *J. Org. Chem.*, 80, 3111-3123 (2015) (査読有)
- (6) T. Inuzuka, K. Yamada, D. Uemura, Amdigenols E and G, long carbon-chain polyol compounds, isolated from the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.,

Tetrahedron Lett., 55, 6319-6323 (2014) (査読有)

- (7) T. Inuzuka, D. Uemura, An inhibitor of the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells, yoshinone A, and its analogs, isolated from the marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp., *Tetrahedron Lett.*, 55, 6711-6714 (2014) (査読有)
- (8) H. Takamura, D. Uemura et al., Stereoselective synthesis of the C79-C97 fragment of symbiodinolide, *J. Org. Chem.*, 9, 1931-1935 (2013) (査読有)
- (9) H. Takamura, D. Uemura et al., Stereoselective synthesis of the C94-C104 fragment of symbiodinolide, *Tetrahedron Letters*, 53, 4317-4319 (2012) (査読有)

〔学会発表〕(計82件)

- (1) D. Uemura, "Chemical Biology Fantasia", International Symposium on Natural Products for the Future 2016 Tokushima (ISNPF2016), 2016年9月3日, 徳島
- (2) T. Abe, K. Miyamoto, Y. Sakakibara, T. Naito, D. Uemura, "Isolation of a pigment from a metagenomic library derived from the marine sponge *Halichondria okadai*", The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), 2015年12月15-20日, ホノルル (U.S.A.)

〔図書〕(計7件)

- (1) 上村大輔 et al., 基礎から学ぶケミカルバイオロジー(化学の要点シリーズ 18), 共立出版社, (2017)
- (2) 上村大輔編, 天然物の化学 - 魅力と展望 - (科学のとびら 60) (東京化学同人, (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計6件)

名称: 新規化合物
発明者: 上村大輔、川添嘉徳、小林里美、大村幸和、犬塚康俊
権利者: 神奈川大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-158365
出願年月日: 2015年8月10日
国内外の別: 国内
〔その他〕

<http://www.chem.kanagawa-u.ac.jp/~uemura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 大輔 (UEMURA DAISUKE)
神奈川大学・理学部・教授
研究者番号: 00022731