

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26520303

研究課題名(和文) 根圏微生物の宿主との共生制御剤の創製とその利用による無機元素循環の効率化

研究課題名(英文) Development of chemical regulators for the symbiosis between rhizosphere microorganisms and host plants for the efficient circulation of mineral nutrients

研究代表者

中村 英光 (Nakamura, Hidemitsu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：40724191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物と共生し栄養吸収効率を高めるアーバスキュラー菌根菌(AM菌)は、植物ホルモンであるストリゴラクトン(SL)により菌糸分岐さらには宿主植物との共生が促進される。本研究は我々がこれまでに合成してきた種々のSL類似体でありデブラン化合物をこのAM菌による共生促進に利用することを目的としている。しかしこれらのデブラン化合物はいずれも弱い菌糸分岐誘導能しか示さなかった。そこで我々は、新たに多様な構造を持つSL類似体を合成し、それらの植物ホルモン活性、寄生植物の種子発芽誘導活性を評価し分類した。さらにSL受容体阻害剤も創製し、AM菌のSL受容機構解明のツールを整えた。

研究成果の概要(英文)：Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi form a symbiotic association with several plant species and increase the absorption of mineral nutrients of host plants. Strigolactones induce extensive hyphal branching of AM fungi. Debranones are phenoxyfuranone compounds, which mimic strigolactone (SL) activity. 4BD is a functionally selective debranone that reduces shoot branching of rice, but does not induce seed germination of the root-parasitic plant. We had prepared several analogues of 4BD in which the various functional groups were added on the phenyl ring. Although we evaluated the biological activities of them with AM fungi, no debranones induced hyphal branching of AM fungi as well as natural strigolactones. Therefore we have made more SL mimics with various chemical backbones and evaluated their biological activity. In addition we have developed some strigolactone receptor inhibitors. We expect that these tools are useful for unraveling of the SL-perception mechanism in AM fungi.

研究分野：農芸化学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 ストリゴラクトン 植物・微生物間相互作用 無機栄養

1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトンは、植物の枝分かれや根の発達を制御することが比較的最近明らかになった植物ホルモンであるが、アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) の分岐誘導作用を持つことが以前より知られていた (引用文献)。またストリゴラクトンはエンドウマメの根における根粒形成を促進することも知られている。一方、ストリゴラクトンは、地中海沿岸地域やアフリカ大陸などで甚大な被害を及ぼしているストライガなどの根寄生植物の発芽誘導物質であることも知られていた。

このようにストリゴラクトンは多様なシステムにおいて多様な機能を持つ。申請者らは、それぞれに選択的な生理活性をもつストリゴラクトンミミック、あるいは選択的な受容体阻害剤を創製することで、枝分かれ制御、共生菌の共生促進、あるいは根寄生植物からの防除を副作用なしに行うことができるようになるのではないかと考えていた。

そのためにはそれぞれのシステムにおけるストリゴラクトンの受容とシグナル伝達メカニズムを解明することが必須であるが、その受容機構やシグナル伝達機構に関しては不明な点が多かった。植物によるストリゴラクトンの受容には / 加水分解酵素である D14 タンパク質が重要であることが近年解明されつつあったが、代表者らはタンパク質結晶構造解析を用いて、加水分解活性およびその産物と D14 の結合が、D14 とその標的タンパク質の相互作用に重要であるという新たな分子メカニズムのモデルを提唱した (引用文献)。また代表者らのグループでは、合成簡便なストリゴラクトンミミックを多く合成し、ベンゼン環上に多様性を持たせることで枝分かれ抑制活性およびストライガ種子発芽誘導活性を選択的にもつストリゴラクトンミミックを創製することに成功していた (引用文献)。

2. 研究の目的

農業において、作物の栄養吸収能を上昇させ、低濃度の肥料でも生産性を向上させることは、農業の効率化のみならず、環境負荷の低減という観点でも非常に重要な課題である。さらに窒素・リン・カリウムの三大栄養素のうち、リンに関しては、地球規模でその資源の枯渇が心配されている。低濃度施肥における生産性の向上は残り少ない資源の有効利用という観点でも喫緊の課題である。

本研究は、この課題を乗り越えるための基盤研究と応用を目指し、根圏において作物のリン酸吸収・窒素固定を補助する根圏の共生菌系に着目し、共生を促進することが知られているストリゴラクトンの作用機構を解明すること、共生菌の生育および共生を促進するような制御剤を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) AM 菌培養系の確立とそれを用いたデブラノン類の評価

当初はニンジン毛状根培養組織を入手し、そこに AM 菌 (*Glomus irregularis* DAOM197198) の胞子を加え、CO₂ インキュベーター中で培養し、菌糸を形成させ、その菌糸を用いてデブラノン類の評価を行う予定であったが、より胞子が大きく扱いやすい AM 菌である *Megarospora margarita* を含む土壌を入手できたため、この胞子を用いて菌糸分岐誘導活性の評価を行った。

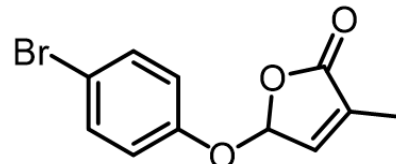
2) イネと AM 菌の共生系とその可視化

小八重らは SCAMP と呼ばれる AM 菌感染時に発現量が上昇するイネのタンパク質に GFP を融合した SCAMP-GFP 融合遺伝子を用いて、AM 菌の感染を可視化できることを報告している (引用文献)。代表者らはこのイネを入手して、ストリゴラクトンが AM 菌感染を促進する現象を評価できるかどうかを検討した。

3) 新たなストリゴラクトンミミックの作製と評価

AM 菌の菌糸分岐誘導評価系で供試したストリゴラクトンミミックの活性が全て弱かったため、新たなストリゴラクトンミミックを合成することにした。手法としては大きく分けて以下の 2 つの方法で行った。

新規のデブラノン類の設計



(図 1) 4-Bromo-debranone; 4-BD の構造

4-Bromo-debranone (4-BD; 図 1) は強いイネ分げつ抑制活性を示すが、ストライガの種子発芽誘導活性は低い。4-BD のベンゼン環の置換基を様々に変化させ、それぞれの置換基が活性にどのような影響を与えるかを調べた。ストリゴラクトン活性は D14-D53 相互作用を検出する酵母ツーハイブリッド系、ストライガ KAI2d-MAX2 相互作用検出酵母ツーハイブリッド系、イネの分げつ伸長評価系やストライガ種子発芽誘導系を用いて評価した。

D 環をもとにした設計

D 環と様々なカルボン酸誘導体をエステル結合させたエステル型化合物、および D 環とフタルイミドの窒素原子を結合させたフタル酸型化合物、さらに生合成中間体であるカラクトンの構造をもとにした化合物を新規に合成し、これらの化合物の SL 活性を評価した。また、植物における生理活性はイネの分げつ伸長抑制活性によって検討した。さらに、根寄生植物ストライガの種子発芽を誘導する活性についても調べた。さらに、D14 およびストライガのストリゴラクトン受容体

ShKAI2による被分解活性についてもLC-MSや蛍光SLプローブであるYoshimulactone Gを用いて評価した。

4) ストリゴラクトン受容体阻害剤の創製 ランダムスクリーニング

D14の結晶構造解析情報を利用してファーマコフォアモデルを構築し*in silico*スクリーニングを行い、約470万の化合物ライブラリーの中から受容体に結合することが予測された候補化合物を選抜し、酵母ツーハイブリッド系やイネへのストリゴラクトン作用の解析系を用いて阻害活性を評価した。

また、ストリゴラクトン依存的にD14-D53相互作用を検出する酵母ツーハイブリッド系を用いて、MayBridge社の化合物ライブラリー中の約1万の化合物から、GR24のD14-D53相互作用誘導能を阻害する化合物をスクリーニングし、さらにストライガKAI2d-MAX2相互作用検出酵母ツーハイブリッド系でも評価した。また、*in vivo*の系として、イネの分げつ伸長評価系やストライガ種子発芽誘導系も用いて、それぞれの化合物のイネ・ストライガにおけるストリゴラクトン阻害効果を評価した。

共有結合型阻害剤

ストリゴラクトン受容体D14ならびにKAI2dは加水分解酵素ファミリーに属する加水分解酵素であり、D14/KAI2dによるストリゴラクトンの加水分解がストリゴラクトン受容・シグナル伝達に必須であることがわかっている。加水分解酵素ファミリーは広く生物界に存在する非常に大きな酵素ファミリーであり、それぞれの酵素は多種多様な機能を有する。ほ乳類も数多くの加水分解酵素を有し、しばしば創薬のターゲットとなっている。加水分解酵素は多数知られているが、その中でもトリアゾールウレア構造を持つ化合物が加水分解酵素の活性中心に共有結合し、不可逆的に活性を阻害することが報告されている(引用文献)。そこで、本研究では、トリアゾールウレア構造を有する約100種の化合物を合成し、本研究で他に合成したストリゴラクトンミミックや阻害剤の評価系を同様に用いて阻害活性を評価した。

4. 研究成果

1) AM菌培養系の確立とそれを用いたデブラノン類の評価

AM菌培養系を用いてこれまでに作成したデブラノン類のAM菌菌糸分岐誘導活性を調べたが、供試したデブラノン類はいずれも天然型のストリゴラクトンと類似した構造を持つ合成ストリゴラクトンGR24と比較してAM菌菌糸分岐誘導活性が低かった。この結果は植物とAM菌とでは異なるストリゴラクトン受容機構を持つことを示唆している。

2) イネとAM菌の共生系とその可視化

SCAMP-GFP融合遺伝子導入イネを用いて、AM

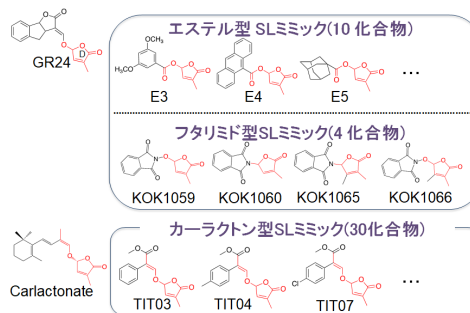
菌が感染した根の細胞を可視化することには成功したが、期間内にGR24やデブラノン類などのストリゴラクトンによる感染促進効果を可視化するには至らなかった。これに関しては、今後も引き続き検討していく。

3) 新たなストリゴラクトンミミックの作製と評価

新規のデブラノン類の設計

新たなデブラノン類のイネ枝分かれ抑制、及びストライガ種子発芽誘導活性を調べたところ、イネに特異的に働くもの、ストライガ種子発芽誘導に特異的に働くもの、両方に働くものを得ることができた。また、酵母ツーハイブリッド系やLC-MSを用いた酵素反応系の結果から、こうした特異性、汎用性が受容体のリガンドになりやすさと一致していることが明らかとなった。今後は、結晶構造解析などを通して受容体に認識されるために必要な構造をより精密に明らかにしていく。

D環をもとにした設計



(図2) 設計した種々のストリゴラクトンミミック

D環と様々なカルボン酸誘導体をエステル結合させたエステル型化合物、およびD環とフタルイミドの窒素原子を結合させたフタル酸型化合物、さらに生合成中間体であるカラクトンの構造をもとにした化合物を新規に合成し、これらの化合物のSL活性を評価した結果、多様な作用スペクトラムを有する化合物を得ることができた。これらの*in vivo*での活性は酵母ツーハイブリッド系や、精製受容体を用いた*in vitro*での受容体リガンドになりやすいかどうかの試験の結果と一致していた。

ストリゴラクトンミミックは多数報告されているが、実際に農業上応用していくためにはより多様な構造骨格を持った化合物のバリエーションを用意することは重要なことである。今後はこうした化合物がAM菌などの根圏微生物にどのように作用するかを解明していく。

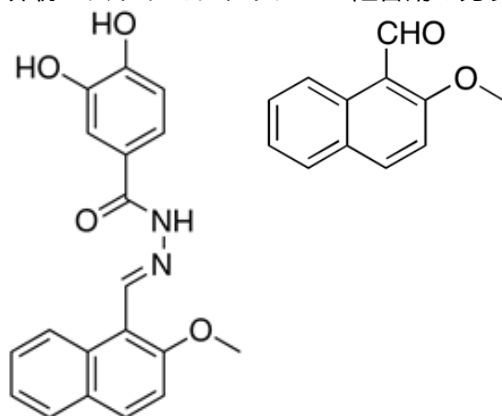
4) 受容体阻害剤の創製

本研究では、当初の計画にはなかったストリゴラクトン受容体阻害剤の開発も行った。その第一の目的は、植物ホルモン受容体D14やKAI2dのリガンド受容機構の解明と、その農業上の応用であるが、AM菌の受容機構の解明にも寄与することが期待されたため、本研

究課題の中に新たに加え、以下の方法で開発を進めた。

ランダムスクリーニング

構築したファーマコフォアモデルを用いた *in silico* スクリーニングの結果、約 470 万の化合物ライブラリーの中から受容体に結合することが予測された候補化合物 XM-47 を得た(図 3)。XM-47 は Methoxy-1-naphthaldehyde (2-MN) へと加水分解することが予測されたが(図 3)、酵母ツーハイブリッド系やイネへのストリゴラクトン作用の解析系を用いた実験の結果、2-MN がストリゴラクトン情報伝達阻害剤として機能することが示された。この成果は論文として報告したが(発表論文・雑誌論文)、本研究成果が世界初のストリゴラクトン D14 阻害剤の発表と



なった。

(図 2) XM-47 (左) と 2-MN (右) の構造

酵母ツーハイブリッド系を用いた約 1 万の化合物ライブラリーからのスクリーニングでは、十数個の候補化合物を得た。それらの殆どは、イネの D14 のみに作用し、ストライガの受容体への作用は弱かったが、一つだけ、イネの D14 への作用は弱いがストライガの受容体 KAI2d へは強い阻害作用を有するものが存在した。現在、植物体への作用を検討中である。

共有結合型阻害剤

阻害剤のスクリーニング：酵母ツーハイブリッド法 (Y2H) を用いた D14 と下流タンパク質 SLR1/D53 の相互作用の阻害を指標とした 1 次スクリーニングにより候補化合物を選抜した。次に、選抜された KOK 化合物の中から SL 生合成変異体 d17 イネの多分げつ形質の SL 外部投与による抑制実験により候補化合物の 2 次スクリーニングを行った結果、いくつかの化合物は GR24 による分げつの抑制を回復する活性を示した。その中で、KOK1094 という化合物は最も強い回復活性を示したため、本研究では KOK1094 を D14 阻害剤候補化合物として選抜した。

KOK1094 の作用解析：植物内生 SL 受容シグナルに対する抑制効果を調べるため、野生型イネに KOK1094 を投与した結果、SL 欠損変異体の形質と同様に第一、第二分げつ伸長の促進を示し、KOK1094 はイネ内生 SL 活性を強く阻

害することが示唆された。続いて HPLC-MS を用い、D14 酵素活性に対する KOK1094 の阻害効果を *in vitro* で解析した。その結果、KOK1094 は GR24 の加水分解を阻害し、KOK1094 自身も D14 により分解されることがわかった。この結果から KOK1094 は D14 に分解された後、D14 に共有結合し酵素活性を抑制するという阻害メカニズムを推測した。KOK1094 の阻害効果を評価するため、Yoshimulactone Green (YLG) という SL 受容体に作用する蛍光アンタゴニストを用い、D14 による YLG 分解の阻害効果を反応速度論的に解析したところ、その阻害効果は不可逆的阻害であることが示され、上の仮説が支持された。さらに、D14 と KOK1094 とを反応させた後、トリプシン処理し、本研究により発見された SL 受容体を標的とした新規阻害剤は、基礎研究にも SL 機能制御剤としての応用にも有用であることが期待される。

<引用文献>

- Akiyama et al., 2005, *Nature* 435: 824-827.
Nakamura et al., 2013, *Nat Commun.* 4:2613.
Fukui et al., 2013, *Mol Plant* 6: 88-99.
Kobae and Fujiwara, 2014, *Plant Cell Physiol.* 55: 1497-1510.
Adibekian et al., 2011, *Nat Chem Biol.* 7: 469-478.

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 8 件)

- Thussagunpanit, J., Nagai, Y., Nagae, M., Mashiguchi, K., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Nakano, T., Nakamura, H. and Asami, T. "Involvement of STH7 in light-regulated development in *Arabidopsis thaliana* promoted by both strigolactone and karrikin." *Biosci. Biotech. Biochem.* 81: 292-301 (2017). (査読有)
doi: 10.1080/09168451.2016.1254536
Jiang, K., Otani, M., Shimotakahara, H., Yoon, J.M., Park, S.H., Miyaji, T., Nakano, T., Nakamura, H., Nakajima, M. and Asami, T. "Substituted phthalimide AC94377 is a selective agonist of the gibberellin receptor GID1." *Plant Physiol.* 173: 825-835. (2017) (査読有)
doi: 10.1104/pp.16.00937
中村英光, 浅見忠男. "ストリゴラクトンの受容とシグナル伝達" *植物の生長調節*, 51: 103-110. (2016) (査読無)
Xu, Y.Q., Miyakawa, T., Nakamura, H., Nakamura, A., Imamura, Y., Asami, T.,

Tanokura, M. "Structure basis of unique ligand specificity of KAI2-like protein from parasitic weed *Striga hermonthica*." *Sci. Rep.* 6: 31386 (2016) doi: 10.1038/srep31386. (査読有)

Li G.D., Pan, L.N., Jiang, K., Takahashi, I., Nakamura, H., Xu, Y.W., Asami, T. and Shen, R.F. "Strigolactones are involved in sugar signaling to modulate early seedling development in *Arabidopsis*." *Plant Biotech.* 33: 87-97. (2016) (査読有) doi: 10.5511/plantbiotechnology.16.0326a

Mashita, O., Koishihara, H., Fukui, K., Nakamura, H. and Asami, T. "Discovery and identification of 2-methoxy-1-naphthaldehyde as a novel strigolactone-signaling inhibitor." *J. Pestic. Sci.* 71-18. (2016) (査読有) doi: 10.1584/jpestics.D16-028

Jiang, K., Kurimoto, T., Seo, E.K., Miyazaki, S., Nakajima, M., Nakamura, H. and Asami, T. "Development of Inhibitors of Salicylic Acid Signaling." *J. Agric. Food. Chem.* 63: 7124-7133 (2015). (査読有) doi: 10.1021/acs.jafc.5b01521.

Nakamura, H. and Asami, T. "Target sites for chemical regulation of strigolactone signaling." *Front Plant Sci.* 5:623. (2014) (査読有) doi: 10.3389/fpls.2014.00623.

〔学会発表〕(計 18件)

Tadao Asami, Hidemitsu Nakamura, "Chemical regulation of strigolactone functions" 第2回ストリゴラクトン国際会議、平成29年3月29日、トリノ大学(イタリア・トリノ市)

Guo Dong Li, Li Na Pan, Kai Jiang, Ikuo Takahashi, Hidemitsu Nakamura, Ying Wu Xu, Tadao Asami, Ren Fang Shen, "Crosstalk between Strigolactone and sugar in regulating early seedling development in *Arabidopsis*" 第2回ストリゴラクトン国際会議、平成29年3月29日、トリノ大学(イタリア・トリノ市)

中村英光, 浅見忠男, "ストリゴラクトンジベレリン間クロストークとその応用" 日本農芸化学会2017年度大会、平成29年3月17日、ウェスティン都ホテル京都(京都府京都市)

今村優作, 高橋郁夫, 呂瑩, 胡文倩, 福井康祐, 徐玉群, 宮川拓也, 中村英光, 田之倉優, 浅見忠男, "根寄生雑草被害の低減を目指したShKAI2sの機能解析" 日本農芸化学会2017年度大会、

平成29年3月17日 - 3月20日、京都女子大学(京都府京都市)

中村英光, 呂瑩, 山野博之, 喜久里貢, 姜凱, 徐玉群, 宮川拓也, 田之倉優, 浅見忠男, "新規ストリゴラクトンミミックの生理活性の評価と生化学的解析" 日本農芸化学会2017年度大会、平成29年3月17日 - 3月20日、京都女子大学(京都府京都市)

久保田真康, 間下大樹志, 中村英光, 浅見忠男, "ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索" 日本農芸化学会2017年度大会、平成29年3月17日 - 3月20日、京都女子大学(京都府京都市)

胡文倩, 喜久里貢, 中村英光, 姜凱, 徐玉群, 平林圭, 宮川拓也, 田之倉優, 浅見忠男, "ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索研究" 日本農薬学会第42回大会、平成29年3月6日 - 3月8日、愛媛大学(愛媛県松山市)

今村優作, 高橋郁夫, 呂瑩, 胡文倩, 太田鋼, 喜久里貢, 福井康祐, 中村英光, 浅見忠男, "ストライガHTL/KAI2の機能制御剤の探索" 植物化学調節学会第51回大会、平成28年10月28日 - 10月30日、高知大学(高知県南国市)

呂瑩, 喜久里貢, 竹内純, 山野博之, 中村英光, 浅見忠男, "新規ストリゴラクトン類縁体の合成と構造活性相関への探索及びD14による分解活性の評価" 植物化学調節学会第51回大会、平成28年10月28日 - 10月30日、高知大学(高知県南国市)

呂瑩, 戸塚直哉, 竹内純, 山野博之, 福井康祐, 中村英光, 浅見忠男, "ストリゴラクトン類縁体の合成と構造活性相関: D14による非加水分解性と生理活性" 日本農芸化学会2016年度大会、平成28年3月27日 - 3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Wenquian Hu, Yusaku Imamura, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami, "Karrikins response in parasitic plants" 日本農芸化学会2016年度大会、平成28年3月27日 - 3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

間下大樹志, 小石原暉, 中村英光, 浅見忠男, "ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索と機能解析"、日本農薬学会第41回大会、平成28年3月17日 - 3月19日、島根大学(島根県松江市)

竹内純, 中村英光, 浅見忠男, "加水分解耐性型ストリゴラクトン受容体阻害剤の創出"、日本農薬学会第41回大会、平成28年3月17日 - 3月19日、島根大学(島根県松江市)

呂瑩, 戸塚直哉, 竹内純, 山野博之, 福井康祐, 中村英光, 浅見忠男, "ストリゴラクトン類縁体の合成と構造活性相関: D14による非加水分解性と生理

活性”植物化学調節学会第50回大会、平成27年10月23日-10月25日、東京大学(東京都文京区)

- ②7 間下大樹志, 小石原暉, 中村英光, 浅見忠男, “ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索”、植物化学調節学会第50回大会、平成27年10月23日-10月25日、東京大学(東京都文京区)

福井康祐, 間下大樹志, 中村英光, 浅見忠男, “機能選択的ストリゴラクトンミミック『デブラノン』の選択性に関する詳察”日本農芸化学会2015年度大会、平成27年3月25日-3月29日、岡山大学(岡山県岡山市)

徐玉群, 宮川拓也, 中村英光, 中村顕, 大塚淳, 浅見忠男, 田之倉優, “寄生植物 *Striga hermonthica* 由来 D14L タンパク質の構造機能解析”日本農芸化学会2015年度大会、平成27年3月25日-3月29日、岡山大学(岡山県岡山市)

- ③2 間下大樹志, 中村英光, 浅見忠男, “ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索”日本農薬学会第40回大会、平成27年3月18日、玉川大学(東京都町田市)

- ③3 中村英光, 薛友林, 宮川拓也, 侯峰, 秦慧民, 福井康祐, 石玄, 伊藤瑛海, 伊藤晋作, Seung-Hyun Park, 宮内裕美子, 浅野敦子, 戸塚直哉, 上田貴志, 田之倉優, 浅見忠男, “ストリゴラクトン受容・シグナル伝達における D14 の機能とその分子メカニズムの解析”、日本植物生理学会、富山市、平成27年3月18日、富山大学(富山県富山市)

福井康祐, 山上大智, 間下大樹志, 中村英光, 秋山康紀, 浅見忠男, “ストリゴラクトンミミック『デブラノン』の機能選択性に関する詳察”、植物化学調節学会第49回大会、平成26年10月18日-10月19日、京都大学(京都府京都市)

高橋郁夫, 福井康祐, 中村英光, 浅見忠男, “ストリゴラクトンがハツカダイコン肥大根の成長に及ぼす影響”、植物化学調節学会第49回大会、平成26年10月18日-10月19日、京都大学(京都府京都市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ストリゴラクトン受容体阻害剤、農業用組成物及びそれらの使用、並びにトリアゾールウレア化合物

発明者: 浅見忠男、中村英光、喜久里貢、フォーウェンチェン

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-040881

出願年月日: 2017年3月3日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 英光 (NAKAMURA Hidemitsu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 40724191

(2) 連携研究者

大友 量 (Otomo Ryo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター生産環境研究領域・主任研究員

研究者番号: 80355081