慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ケミカルバイオロジーによる細胞内物流システムの理解と制御
Sub Title	Analysis of intracellular logistics by chemical biology
Author	清水, 史郎(Shimizu, Shiro) 近藤, 恭光(Kondo, Yasumitsu)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	計画班員および公募からのリクエストに応じ、化合物アレイと化合物溶液を使用して、興味深い化合物群の取得に成功した。さらに、世界初のPirin阻害剤であるTPhAを化合物アレイで同定し、そしてTPhAを使用することでPirinがメラノーマ細胞の遊走に重要であることを明らかにすることができた。
Notes	研究種目：新学術領域研究 研究期間：2008～2012 課題番号：20113008 研究分野：生物学 科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20113008seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年　３月３１日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：新学術領域研究
研究期間：2008～2012
課題番号：２０１１３００８
研究課題名（和文）　ケミカルバイオロジーによる細胞内物流システムの理解と制御

研究課題名（英文）　Analysis of intracellular logistics by chemical biology

研究代表者
清水　史郎（SIMIZU SIRO）
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：30312268

研究成果の概要（和文）：計画班員および公募班員からのリクエストに応じ、化合物アレイと化合物溶液を使用して、興味深い化合物群の取得に成功した。さらに、世界初の Pirin 阻害剤である TPh A を化合物アレイで同定し、そして TPh A を使用することで Pirin がメラノーマ細胞の遊走に重要であることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：According to the request from a plan group member and a general invitation group member, chemical array and compound solution were used and it succeeded in acquisition of the interesting compounds.
Furthermore, TPh A which is the first Pirin inhibitor was able to be identified by the chemical array, and it was able to be shown clearly by using TPh A that Pirin is important for migration of melanoma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	25,500,000	7,650,000	33,150,000
２００９年度	22,100,000	6,630,000	28,730,000
２０１０年度	21,700,000	6,510,000	28,210,000
２０１１年度	22,100,000	6,630,000	28,730,000
２０１２年度	21,700,000	6,510,000	28,210,000
総　計	113,100,000	33,930,000	147,030,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学
キーワード：ケミカルバイオロジー、化合物アレイ、細胞内ロジスティクス、がん細胞の浸潤・転移

１．研究開始当初の背景
化学の力で生物学を理解・制御することを志すケミカルバイオロジー研究は、その成果が創薬と直結しているために、基礎分野だけでなく、臨床的にも大変注目されている分野である。研究開始以前は Nature Chemical Biology 誌や ACS Chemical Biology 誌などが相次いで創刊され、世界中で最もホットな研究領域の一つであった。

多くの新規研究領域が早い年月で衰退していく中、ケミカルバイオロジー領域は発展の一途をたどり、研究開始当初は様々な生物学の分野で、ケミストリーと融合する研究が盛んであった。

２．研究の目的
本課題の目的はケミカルバイオロジーの

手法で細胞内ロジスティクスを理解・制御することである。本課題では、細胞内ロジスティクス制御分子（オートファジー関連タンパク質群、メラニン輸送関連分子群、細胞接着関連タンパク質群、細胞表面分子群、さらにがん転移関連タンパク質群など）に注目して、結合化合物の探索を主に化合物アレイを用いて行う。

一方で報告者はこれまでに、がん細胞の転移・浸潤機構の解析を行ってきており、これまで培ってきた情報を基に、転移関連タンパク質結合化合物の探索を目的に実験を行う。

いずれの目的も特異的な化合物（阻害剤）を取得し、それらを用いることで細胞内ロジスティクスの解明を図るところがユニークである。化合物によるタンパク質の制御は、遺伝子導入が困難な細胞であっても解析が容易であることから様々な応用が期待される。また、細胞内ロジスティクス制御タンパク質の多くは、その異常と疾病との関与が明らかになってきている。そこで、得られた化合物群を使用して、マウスなどの *in vivo* モデルにおいて薬剤効果を評価し、治療薬開発のための礎を築くことも本課題の目的とした。

３．研究の方法

(1) 化合物アレイおよび化合物溶液を用いた細胞内ロジスティクス制御分子の阻害剤探索

報告者は目的遺伝子と赤色蛍光タンパク質（DsRed）などの遺伝子を融合させて細胞内で発現させた細胞抽出物と、DsRed だけを発現させた細胞抽出物とを、それぞれ化合物アレイと処理し、画像解析することにより簡便に化合物とタンパク質との特異的な結合を解析することが出来る系の構築に成功している。この系を駆使し、本報告者に関係する多くのタンパク質だけでなく、同じ領域内の共同研究者からの依頼で細胞接着関連タンパク質群や細胞表面分子群の結合化合物の探索を行った。その結果、化合物アレイでヒットした化合物の中で、実際に細胞レベルで阻害活性を有する複数の候補化合物を得ることに成功した。

さらに、化合物溶液を配布し、表現型を指標としたスクリーニングにも活用した。

(2) ケミカルバイオロジー的手法によるがん細胞の転移・浸潤機構の解析

報告者はこれまでに、がん細胞の転移・浸潤に重要な様々なタンパク質に関して、阻害剤などを用いた実験から明らかにしてきた。転移に関与している転写因子に着目して、様々な転写因子およびそれに結合するタンパク質に対する結合化合物を探索して、がん細胞の転移・浸潤を制御することを目的とする。例えばメラノーマ細胞などの高転移性がん細胞に着目して、転移抑制剤の探索を行い、そのメカニズム解析を行った。

４．研究成果

(1)計画班員および公募班員との共同研究実績

報告者は、本領域内でケミカルバイオロジー研究の礎ともいえる化合物の提供を計画班員と公募班員に行ってきた。

実績数は下表の通りである。

化合物アレイ

依頼研究機関数:	合計12機関
依頼タンパク質数:	合計44種類（脂質等含む）
ヒット化合物数:	合計484化合物

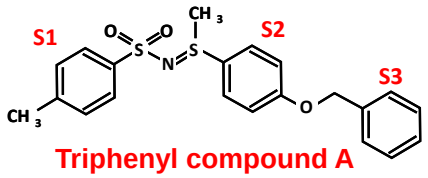
化合物溶液

依頼研究機関数:	合計 7機関
依頼アッセイ系数:	合計 7種類
配布化合物数:	合計2674化合物

全ての共同研究先からヒット化合物が出たわけではないが、細胞内ロジスティクスに関与する新しい作用を持ついくつかの化合物の取得に成功した。

(2) 世界初の Pirin 阻害剤 TPh A の発見

報告者の所属していた研究室で独自に開発した化合物アレイを用い、種々の新規阻害剤の取得に成功した。



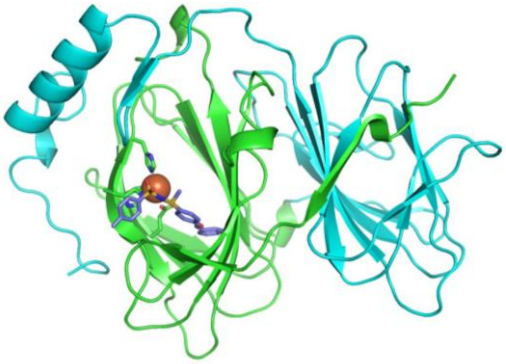
Triphenyl compound A (TPh A)

標的タンパク質として、「疾病関連タンパク質であること」「機能未知であること」「既存の阻害剤がないこと」を基準に選定した。

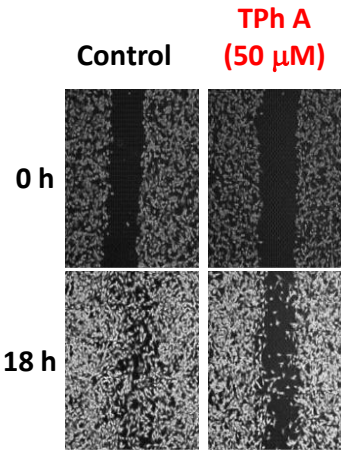
上記条件を満たす 100 遺伝子を超えるライブラリーを構築し、スクリーニングを行った。その結果、Pirin タンパク質と特異的に結合する化合物 TPh A を得た。ITC による測定の結果、Pirin と TPh A との親和性は Kd が 0.6 μM 程度であった。また、TPh A 固定化ビーズを作製して結合タンパク質を細胞抽出物から同定したところ、Pirin のみであったことから、TPh A の細胞内の標的も Pirin だけであることが示唆された。

一方で、より詳細な Pirin-TPh A 複合体の様子を解析するために共結晶像を得ることを試みて成功した。Pirin は鉄原子を 1 つ含むモノマーとして存在しているが、TPh A はその鉄原子付近にある疎水性領域に入り込むよ

うな形で、Pirin と相互作用していた。種々の TPh A 誘導体の解析から、他の誘導体が Pirin と相互作用できない理由も明らかになった。



他方、細胞内における Pirin の役割は依然として不明であった。様々な培養ヒト細胞における Pirin の発現量を確認したところ、白血病由来の細胞をはじめ、いくつかの細胞種で発現が確認できなかった。さらに、TPh A を細胞に処理しても細胞増殖抑制活性が見られなかったことから、Pirin が細胞増殖に必須でないことが示唆された。このことから、TPh A を使用して細胞の表現型に与える影響について検討を行った。



その結果、TPh A はメラノーマ細胞の増殖を抑制しない濃度で遊走だけを阻害した。また、詳細な阻害機構を解析した結果、TPh A 処理で、細胞内の Pirin と Bcl-3 の複合体が解離し、Slug の発現が抑制されたことで遊走が阻害されたことが分かった。

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 28 件）

1) Zimmermann, T.J., Burger, M., Tashiro, E., Kondoh, Y., Martinez, N.E., Gormer, K., Rosin-steiner, S., Shimizu, T. Ozaki, S., Mikoshiba, K., Watanabe, N., Hall, D., Vetter, I.R., Osada, H., Hedberg, C., & Waldmann, H.: Boronic acid inhibitors of acyl protein thioesterase 1 and 2. ChemBioChem,（査読有）14, 115-122 (2013)
doi: 10.1002/cbic.201200571

2) Kondoh, Y. & Osada, H.: High-throughput screening identifies small molecule inhibitors of molecular chaperones. Current Pharmaceutical Design,（査読有）19, 473-492 (2013)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920900

3) Ogasawara, A., Simizu, S., Ito, A., Kawai, T., Saisho, Y., Takei, I. & Umezawa, K.: Inhibition of NO-induced β-cell death by novel NF-κB inhibitor (-)-DHMEQ via activation of Nrf2-ARE pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications,（査読有）掲載決定
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.062

4) Arai, Y., Iinuma, H., Ikeda, Y., Igarashi, M., Hatano, M., Kinoshita, N., Ukaji, T., Simizu, S. & Umezawa, K.: Migracins A and B, new inhibitors of cancer cell migration, produced by *Streptomyces* sp. The Journal of Antibiotics,（査読有）掲載決定
doi: 10.1038/ja.2012.112

5) Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Umezawa, K. & Simizu, S.: Determination of cathepsin V activity and intracellular trafficking by N-glycosylation. FEBS Letters,（査読有）586, 3601-3607 (2012)
doi: 10.1016/j.febslet.2012.08.001

6) Niwa, Y., Matsui, C., Sukumwang, N., Iinuma, H., Ikeda, Y., Koyano, T., Kovitayakorn, T., Simizu, S. & Umezawa, K.: Inhibition of lysenin-induced hemolysis by all-*E*-lutein derived from the plant *Dalbergia latifolia*. Planta Medica,（査読有）78, 957-961 (2012)
doi: 10.1055/s-0031-1298538

7) Yasukagawa, T., Niwa, Y., Simizu, S. & Umezawa, K.: Suppression of cellular invasion by glybenclamide through inhibited secretion of platelet-derived growth factor in ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells. FEBS Letters,（査読有）586, 1504-1509 (2012)
doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.007

8) Noma, N., Simizu, S., Kambayashi, Y., Kabe, Y., Suematsu, M. & Umezawa, K. Involvement of NF-κB-mediated expression of galectin-3-binding protein in tumor necrosis factor-α-induced brest cancer cell adhesion. Oncology Reports,（査読有）27, 2080-2084 (2012)
doi: 10.3892/or.2012.1733

9) Khan, M. G. M., Simizu, S., Suzuki, T.,

Masuda, A., Muroi, M., Kawatani, M., Dohmae, N. & Osada, H. Protein disulfide isomerase-mediated disulfide bonds regulate the gelatinolytic activity and secretion of matrix metalloproteinase-9. Experimental Cell Research,（査読有）318, 904-914 (2012)
doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.021

10) Takeiri, M., Horie, K., Takahashi, D., Watanabe, M., Horie, R., Simizu, S. & Umezawa, K. Involvement of DNA binding domain in the cellular stability and importin affinity of NF-κB component RelB. Organic & Biomolecular Chemistry,（査読有）10, 3053-3059 (2012)
doi: 10.1039/c2ob07104e

11) Bürger, M., Zimmermann, T. J., Kondoh, Y., Stege, P., Watanabe, N., Osada, H., Waldmann, H. & Vetter, I. R. Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity despite close relationship to acyl protein thioesterases. Journal of Lipid Research,（査読有）53, 43-50 (2012)
doi: 10.1194/jlr.M019851

12) Sasazawa, Y., Kanagaki, S., Tashiro, E., Nogawa, T., Muroi, M., Kondoh, Y., Osada, H. & Imoto, M. Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. ACS Chemical Biology,（査読有）18, 892-900 (2012)
doi: 10.1021/cb200492h

13) Minagawa, S., Kondoh, Y., Sueoka, K., Osada, H. & Nakamoto, H. Cyclic lipopeptide antibiotics bind to the N-terminal domain of the prokaryotic Hsp90 to inhibit the chaperone activity. Biochemical Journal,（査読有）435, 237-246 (2011)
doi: 10.1042/BJ20100743

14) Hirai, G., Tsuchiya, A., Koyama, Y., Otani, Y., Oonuma, K., Dodo, K., Simizu, S., Osada, H. & Sodeoka, M. Development of a *vaccinia* H1-related (VHR) phosphatase inhibitor with a nonacidic phosphate-mimicking core structure. ChemMedChem,（査読有）6, 617-622 (2011)
doi: 10.1002/cmdc.201100107

15) Khan, M. G. M., Simizu, S., Lai, N. S., Kawatani, M., Shimizu, T. & Osada, H. Discovery of a small molecule PDI inhibitor that inhibits reduction of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. ACS Chemical Biology,（査読有） 6, 245-251 (2011)
doi: 10.1021/cb100387r

16) Hagiwara, K., Kondoh, Y., Ueda, A., Yamada, K., Goto, H., Watanabe, T., Nakata, T., Osada, H. & Aida, Y. Discovery of novel antiviral agents directed against the influenza A virus nucleoprotein using photo-cross-linked chemical arrays. Biochemical and Biophysical Research Communications,（査読有）394, 721-727 (2010)
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.058

17) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G., Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y. & Aida, Y. Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. Biochemical and Biophysical Research Communications,（査読有）403, 40-45 (2010)
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.107

18) Miyanishi, N., Suzuki, Y., Simizu, S., Kuwabara, Y., Banno, K. & Umezawa, K. Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion. Biochemical and Biophysical Research Communications,（査読有）403, 154-159 (2010)
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.007

19) Miyazaki, I., Simizu, S., Okumura, H., Takagi, S. & Osada, H. A small-molecule inhibitor shows that pirin regulates migration of melanoma cells. Nature Chemical Biology,（査読有）6, 667-673 (2010)
doi: 10.1038/nchembio.423

20) Kanoh, N., Takayama, H., Honda, K., Moriya, T., Teruya, T., Simizu, S., Osada, H. & Iwabuchi, Y. Cleavable linker for photo-cross-linked small-molecule affinity matrix. Bioconjugate Chemistry,（査読有）21, 182-186 (2010)
doi: 10.1021/bc900316q

21) Simizu, S., Teruya, T., Nogawa, T., Aono, H., Ueki, M., Uramoto, M., Kobayashi, Y. & Osada, H. Deamino-hydroxy-phoslactomycin B, a biosynthetic precursor of phoslactomycin, induces myeloid differentiation in HL-60 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications,（査読有）383, 406-410 (2009)
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.014

22) Miyazaki, I., Simizu, S., Ishida, K. & Osada, H. On-chip fragment-based approach for discovery of high-affinity bivalent inhibitors. ChemBioChem,（査読有）10, 838-843 (2009)
doi: 10.1002/cbic.200800704

23) Miyazaki, I., Okumura, H., Simizu, S., Takahashi, Y., Kanoh, N., Muraoka, Y., Nonomura, Y. & Osada, H. Structure-affinity relationship study of bleomycins and Sh*ble* protein by use of a chemical array. ChemBioChem,（査読有）10, 845-852 (2009)

doi: 10.1002/cbic.200800728

24) Takagi, S., Simizu, S. & Osada, H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. Cancer Research,（査読有）69, 1502-1508 (2009) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2635

25) Asami, Y., Mori, M., Koshino, H., Sekiyama, Y., Teruya, T., Simizu, S., Usui, T. & Osada, H. A cell-based screening to detect inhibitors of BRAF signaling pathway. Journal of Antibiotics,（査読有）62, 105-107 (2009) doi: 10.1038/ja.2008.17

26) Tamura, Y., Simizu, S., Muroi, M., Takagi, S., Kawatani, M., Watanabe, N. & Osada, H. Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-xL during pironetin-induced apoptosis. Oncogene,（査読有）28, 107-116 (2009) doi: 10.1038/onc.2008.368

27) Miyazaki, I., Simizu, S., Ichimiya, H., Kawatani, M. & Osada, H. Robust and systematic drug screening method using chemical arrays and the protein library: identification of novel inhibitors of carbonic anhydrase II. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,（査読有）72, 2739-2749 (2008) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838795

28) Lai, N. S., Simizu, S., Morisaki, D., Muroi, M. & Osada, H. Requirement of the conserved, hydrophobic C-terminus region for the activation of heparanase. Experimental Cell Research,（査読有）314, 2834-2845 (2008) doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.004

〔学会発表〕（計 80 件）

1) Ito Akihiro、他：「Spectomycin B1 suppresses Estrogen Receptor α-Dependent Breast Cancer Cell Growth by inhibiting a SUMO E2 Activity 」 2nd SNU-RIKEN Joint Symposium on Chemical Biology：2012 年 5 月 18 日： Naminara Hotel、大韓民国

2) Sakata Kotaro、他「Screening of Chemical Regulators for TGF-β Activation Reaction」 2nd SNU-RIKEN Joint Symposium on Chemical Biology：2012 年 5 月 18 日： Naminara Hotel、大韓民国

3) 坂田 幸大郎、他「血漿カリクレイン依存的 TGF-β 活性化反応阻害剤の探索」第 23 回日本レチノイド研究会：2012 年 10 月 19 日：米子コンベンションセンター、鳥取県

4) 山本 由佳、他「LAP 結合 TGF-β 活性化反応阻害物質の探索」：第 26 回肝類洞壁細胞研究会学術集会：2012 年 11 月 17 日： ANA クラウンプラザホテル宇部、山口県

5) 近藤 恭光、他「化合物アレイによるアミノ酸置換変異体特異的阻害剤の探索手法の開発」第 35 回日本分子生物学会年会：2012 年 12 月 14 日：福岡国際会議場他、福岡県

6) 須藤 龍彦、他「p38 のゲートキーパーの多様性を標的とした特異的阻害剤探索」第 35 回日本分子生物学会年会：2012 年 12 月 11 日：福岡国際会議場他、福岡県

7) 山本 由佳、他「LAP 結合 TGF-β 活性化反応阻害物質の探索」第 35 回日本分子生物学会年会：2012 年 12 月 13 日：福岡国際会議場他、福岡県

8) 三好 良幣、他「オートファジーを制御する低分子化合物の探索」第 35 回日本分子生物学会年会：2012 年 12 月 11 日：福岡国際会議場他、福岡県

9) 近藤 恭光、他「化合物アレイによるヘッジホッグ伝達経路の阻害剤の探索」日本農芸化学会 2013 年度大会：2013 年 3 月 26 日：東北大学川内北キャンパス、宮城県

10) 伊藤 卓也、他「植物ホルモン・アブシジン酸の新規アゴニスト・アンタゴニスト探索」日本農芸化学会 2013 年度大会：2013 年 3 月 25 日：東北大学川内北キャンパス、宮城県

11) 河村 達郎、他「がん細胞にアポトーシスを誘導するアセトアミド誘導体の活性評価と作用機序解析」日本農芸化学会 2013 年度大会：2013 年 3 月 26 日：東北大学川内北キャンパス、宮城県

12) 上杉 祥太、他「Pyrrocidine A によるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構」日本農芸化学会 2013 年度大会：2013 年 3 月 26 日：東北大学川内北キャンパス、宮城県

13) 野口 太朗、他「低分子マイクロアレイを用いた MDM2/MDMX-p53 阻害剤の探索法の開発」日本薬学会第 133 年会：2013 年 3 月 29 日：パシフィコ横浜、神奈川県

14) 村橋将崇、他「免疫抑制剤デオキシスパーガリンの標的分子の探索」日本ケミカルバイオロジー学会　第 7 回年会：2012 年 6 月 7 日：京都大学、京都府

15) 舟崎慎太郎、他「植物性アルカロイド conophylline による癌細胞薬剤耐性の軽減と標的タンパク質の結合解析」日本がん分子標的治療学会 第 16 回学術集会：2012 年 6 月 28 日：西日本総合展示場、福岡県

16) 丹羽祐貴、他「カテプシン L2 の機能に与える N-glycosylation の役割」第 21 回 日本がん転移学会学術集会・総会：2012 年 7 月 13 日：オリエンタルホテル広島、広島県

17) 清水史郎「がん分子標的研究の今昔」理研セミナー：2012 年 7 月 13 日：理化学研究所、埼玉県

18) Niwa, Y., et al.「N-glycosylation regulates cathepsin L2 functions 」 The 14th

International Biennial Congress of the Metastasis Research Society：2012 年 9 月 4 日：Brisbane Convention Centre & Exhibition Centre、オーストラリア

19) 後藤祐貴、他「Role of C-mannosylation on hyaluronidase1 functions」第 71 回 日本癌学会学術総会：2012 年 9 月 19 日：ロイトン札幌他、北海道

20) 伊藤あゆみ、他「Induction of RelB degradation and apoptosis in adult T-cell leukemia cells by DTCM-glutarimide」第 71 回 日本癌学会学術総会：2012 年 9 月 21 日：ロイトン札幌他、北海道

21) Goto, Y., et al.「Regulation of hyaluronidase1 enzymatic activity by C-mannosylation」EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics：2012 年 11 月 9 日：Convention Centre Dublin、アイルランド

22) Simizu, S., et al.「Hyaluronidase1 activity and secretion are regulated by C-mannosylation」9th AACR-JCA Joint Conference：2013 年 2 月 24 日：Hyatt Regency Maui、アメリカ

〔その他〕
ホームページ等

http://www.applc.keio.ac.jp/~simizu/

６．研究組織

(1) 研究代表者
清水　史郎（SIMIZU　SIRO）
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：30312268

(2) 研究分担者
近藤　恭光（KONDOH　YASUMITSU）
独立行政法人理化学研究所・専任研究員
研究者番号：80333342