SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

微生物により生成される新規蓄放電物質の生成機構の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 静岡大学 公開日: 2018-11-26 キーワード (Ja): 微生物, ミネラル, 細胞外電子伝達, 微生物燃料電池, 蓄電部材 キーワード (En): 作成者: 二又, 裕之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00026020

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月 ２１ 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６２８１０３８

研究課題名（和文）微生物により生成される新規蓄放電物質の生成機構の解明

研究課題名（英文）Producing mechanism of novel rechargeable materials produced by microorganisms

研究代表者
二又　裕之（Futamata, Hiroyuki）

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：５０３３５１０５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　12,400,000円

研究成果の概要（和文）：新規蓄放電物質生成微生物を取得する為、嫌気的に微生物を分離した結果、本物質を生成する単一微生物の分離に成功した。本物質の充電容量は約80 μAh mg-1であった。XRDおよびEDX解析から本物質は鉄と硫黄で構成されたMackinawiteであることが判明した。本物質を添加した負極を装着した微生物燃料電池（MFC）と本細菌を接種したところ、微生物からの電子移動と蓄電が確認された。ゲノム解析の結果、細胞外電子伝達に関わるOmcBESTZやMtrABC-OmcA遺伝子は見出せなかったため、別の細胞外電子伝達機構が推定された。今後、本菌株の変異株を嫌気的に作成する方法を確立し生成機構の解明を進める。

研究成果の概要（英文）：We tried to isolate microorganisms anaerobically to obtain novel rechargeable material-producing microorganisms. We obtained a single microorganism enable to produce the material. Rechargeable capacitance was approximately 80 μAh mg-1. XRD and EDX analyses revealed that this material consisted of iron and sulfur, which is known as mackinawite. Microbial fuel cell equipped with anode including the material was run. It was confirmed that electron transfer from cells to electrode and rechargeable were observed. Genome analysis revealed that genes closely related to omcBESTZ and MtrABC-OmcA genes were not found, indicating that this strain has another extracellular electron transfer mechanisms. In future plan, we establish the method for making mutant under anaerobic conditions and re-challenge to unveil the rechargeable material-producing mechanism of this strain.

研究分野：微生物電気化学

キーワード：微生物　ミネラル　細胞外電子伝達　微生物燃料電池　蓄電部材

１．研究開始当初の背景

(1)　微生物燃料電池は「微生物による有機物の生物化学的変換によって生じるプロトンと電子を用いて直接電気エネルギーを生産する」装置であり、次世代型エネルギー生産技術の一つとして期待されている。しかし、電気生産密度が極めて低く、実用化には飛躍的な効率化が必要とされている。ところが近年、技術的改良や電気生産微生物に関する研究が進み、発電効率と出力の飛躍的な伸びから、実用化の可能性に光明が射しつつある状況となっている。

　しかし、実用化に向けた課題は、まだまだ多いのが実状である。例えば、最も一般的なプロトン交換膜 Nafion117 の性能を凌駕する膜の開発や、複雑微生物系において高電気生産微生物群（例えば *Geobacter* 属細菌）を適切に制御する方法の確立など、未だ道半ばである。現在、電極やプロトン交換膜などの「材料の研究」、電気生産に関わる微生物やそれらの生態系を対象とした「微生物の研究」が進展しているものの、国内外を問わず、新しいブレークスルーが望まれている。

(2)　そのような状況の中、我々は、高電気生産微生物の選択的集積化を図る研究を進める中で、極めて興味深い成果を得た。即ち、微生物燃料電池を長期間運転した際、一時的ではあるが極めて高密度の電流が生産（最大値 3.9 A m^{-2}）された。この要因を探るため、微生物燃料電池から微生物群を取得し培養したところ、黒色の沈殿物質が生成した。

　そのため、「微生物と鉄酸化物の導電性複合体」が形成されたのではないかと想定し、黒色沈殿物質の成分分析を EDX（Energy Dispersive X-ray）により実施した。その結果、酸素、チタン、リン等が検出され、これまでの報告例とは異なる複数の元素で構成された物質であることが示された。なお、この物質の詳細な特性については解明されていない。

　電気化学的解析を実施した結果、本物質に導電性が確認されたため、微生物燃料電池に添加したところ、運転初期において、無添加系と比較し約 300 倍もの高い電流密度の達成に成功した。更に、大変興味深い事に、本物質は、微生物が有機物を嫌気的に分解する際の電子受容体となり蓄電すること、また放電も可能であることが明らかとなった。即ち、微生物に親和性を示す新規の蓄放電物質であり、この性能を向上できればエネルギー分野における革新的ブレークスルーを引き起こすことができるのではないか、と考えられた。

２．研究の目的

(1)　循環型低炭素化社会の構築は、極めて挑戦的でありかつ希求の課題である。この課題を達成するためには、２つの大きな問題を解決する必要がある。即ち、我々の生活基盤を支える諸産業から排出される廃棄物の効果的な処理と化石燃料エネルギーの低減である。

(2)　本研究では、廃棄物の中でも大きな割合を占める有機性廃棄物の処理とクリーンエネルギーである電気の生産を同時に行える微生物燃料電池の実用化を図ることを究極の目標とする。既に我々は、微生物に親和性を示し蓄放電能力を備えた新規機能性材料が、微生物によって生成される事を見出した。そこで本研究では、本物質の蓄放電能力向上を図るため、微生物による新規の蓄放電物質の生成機構と特性の解明を目的とする。

３．研究の方法

　本研究では、微生物学および物質科学の異なる２つの面から解析を実施する。その骨子は以下の通りである。(i) 蓄放電物質生成に関わる微生物群集の構造と機能解析を実施した。特に、新規蓄放電物質生成に関わる複数の微生物を特定・分離し、複数の微生物が関わる生成機構について種間水素伝達系を切り口として解明を試みた。(ii) 分離菌株を用いた蓄放電物質生成に関する分子基盤の解析を行った。分離菌株を用いて、微生物が溶解無機物質をどのように認識し、どのような機構で固形の蓄放電物質を生成するのか、関連する遺伝子および代謝機構を解明を図った。(iii) 蓄放電物質の特性を物質科学的に解析し、二次電池用電極の作成と評価を実施した。

　蓄放電物質を生成する培養は、乳酸を電子供与体、3 価の鉄を電子受容体とした嫌気的条件下で実施した。予察実験の結果、蓄放電物質形成には大きく分けて２つのステップから成ることが推察された。１）まず、培養液中の硫酸イオン濃度が減少し、２）次いで培養液中の鉄イオンが減少し、並行して蓄放電物質が生成する。培養液中の鉄は 3 価であったのに対して、蓄放電物質中の鉄のほとんどは 2 価の鉄へと還元される。これらの変化に付随して、培養液中の硫化水素濃度の増加も確認されている。

　以上の予察実験結果から、乳酸を電子供与体とし、複数の微生物群による電子の授受（種間水素伝達系）の過程で蓄放電物質が生成されていると推察した。そこで、以下の手法を用いて、微生物生態学的および分子生物学的に蓄放電物質の生成機構を解明を目指した。

(1)　蓄放電物質生成に関わる微生物群集の構造と機能解析

　これまでの培養条件と同様に、乳酸を電子供与体、3 価の鉄を最終電子受容体とした培養系を用いて、蓄放電物質を生成させた。上述した様に、培養液中の硫酸イオンと鉄の挙動を追跡した。同時に培養液と蓄放電物質それぞれから DNA を抽出し、PCR によって 16S

rRNA 遺伝子を増幅後、DGGE 解析およびクローンライブラリー解析を実施した。これらの解析から優占微生物および準優占微生物の集団を捉えることができ、real-time PCR による動態解析を図った。また、本蓄放電物質生成には初発反応として硫酸還元が必須であることから、硫酸還元酵素の発現の有無や他の発現している機能について SDS-PAGE による解析を試みた。これら一連の解析結果を統合することで、蓄放電物質生成における微生物生態系のダイナミックな動態と機能について理解を目指した。

(2)　分離菌株を用いた蓄放電物質生成に関する分子基盤解析

一方で、蓄放電物質の生成に、優占および準優占微生物が具体的にどのように関与しているのかは不明のままであった。また、蓄放電物質生成に深く関与している微生物は少数派の微生物集団の可能性もあった。そこで、これらの問題を解決するため、まず、上述した（１）で明らかとなった 16S rRNA 遺伝子情報と硫酸イオンあるいは鉄の還元能とが合致した微生物の取得を実施した。そのため、遺伝子情報から推定される微生物の培養条件を基に、分離に適した培地組成（主として炭素源および電子供与体と受容体の組み合せ）を考案し、煩雑な嫌気微生物の分離を簡便効率化した 6 well plate 法を用いて分離株を取得した。単一微生物のみで培養し、蓄放電物質生成の有無、16S rRNA 遺伝子解析、硫酸イオンあるいは鉄の還元能を調べ、目的の微生物（乳酸、硫酸、鉄、その他有機酸などを還元する微生物）を取得した。次に、ゲノム解析を行い、電子伝達系（呼吸鎖）を中心とした代謝マップ図の作成に着手した。ここで得られた代謝反応情報を遺伝情報に還元し、分離菌株を標的としたトランスクリプトーム解析を実施する。ここでは分離菌株を用いた解析のため、どのような物質に対してどの微生物のどのような機能が発揮されるのか、を詳細に理解することが可能となる。即ち、微生物間電子伝達系を軸とした、蓄放電物質形成に関わる機能や無機物質に対する微生物の応答を理解することができる。本解析で得られた情報を基に、大元の複合微生物系における蓄放電物質生成過程を解析し、同様の反応によって生じているのかどうかを検証する。この解析を通して、蓄放電物質に関わる具体的な微生物とその機能を分子基盤レベルで理解する。分離菌株のゲノム解析を実施する。

(3)　物質の特性解析と応用

本物質の分子が、どのように配列し、どのような構造をとっているのかに関しては、全く分かっていないのが現状である。そこで、原子の電子状態や隣接原子の位置などの情報を得るため、透過型電子顕微鏡観察、回折パターンのシミュレーション、電子後方散乱回折などを活用した解析を実施した。本解析は、バイオミネラリゼーションによって生じた物質の解析を進めてある小暮博士（東京大学、研究分担者）のご協力のもと、当研究室の学生も参画して解析を実施した。

さらに、微生物燃料二次電池の実用化に向けた基礎知見の集積を目指すため、本物質を負極に添加した電極を微生物燃料電池に装着し、微生物から本物質に蓄電することが可能かどうかを電気化学的に解析した。

４．研究成果

本研究では、廃棄物の中でも大きな割合を占める有機性廃棄物の処理とクリーンエネルギーである電気の生産を同時に行える微生物燃料電池の実用化を図ることを究極の目標とする。既に我々は、微生物に親和性を示し蓄放電能力を備えた新規機能性材料が、微生物によって生成される事を見出した。そこで本研究では、本物質の蓄放電能力向上を図るため、微生物による新規の蓄放電物質の生成機構と特性の解明を目的とした。

(1)　本物質生成培養物から、蓄電物質を生成する微生物を２株分離した。１株（HB-II 株）は Mackinawite に特有のヒラヒラとした構造を形成し、片方の株（HB-IV 株）はヒラヒラとした構造に加え粒子状物質も形成していた。16S rRNA 遺伝子解析から、当初の予想とは異なり、本物質は硫酸還元細菌分離株によって生成される事が示された。株によって生成物の形態が異なる理由は未解明である。硫酸還元細菌は多様な微生物群で構成されている為、複数の基準菌株を購入し、同様の物質を生成するかどうかを調べたところ、系統学的に生成するグループとそうでないグループに分かれた。その原因は不明である。生成機構としては、硫酸還元に伴う硫化水素の生成と溶液中の鉄イオンが反応して生成されると推定されている。しかし、同じ硫酸還元細菌であっても生成物質の形状が異なる事から微生物の関与が考えられた。HB-II 株のゲノム解析を実施し、細胞外電子伝達に関わるタンパク質をコードしている遺伝子について解析した。その結果、*Geobacter* 属細菌や *Shewanella* 属細菌で報告例のある OmcBEST, OmcZ あるいは MtrABC-OmcA（引用文献①～⑦）は見出せておらず、新規の細胞外電子伝達機構を有する可能性がある。

(2)　物質科学的解析の結果、微生物由来の蓄電物質は Mackinawite であることが反映した。化学的合成 Mackinawite（引用文献⑧）はナノサイズ粒子状であり充電容量も HK-II 株の約３倍を示した。しかし、MFC に添加した結果、培養２ヶ月付近から pH が減少し MFC の活性が減少した。そのため、実用化の為には、生成反応速度を適性に調整する重要性が示唆された。充放電に際して、mackinawite が可逆的に変化している事が示された。充放電メカニズムは、微生物由来と化学合成由来にお

いて同様の傾向を示すものと、そうでない物質とに分かれた。そのため、物質科学的および電気化学的により深く解析を進める必要が有る。本物質への電子授受を微生物が行えるかどうかを調べる為、分離微生物と本物質を微生物燃料電池に封入し、開回路および閉回路時における電子供与体の減少、発電量等を測定した。その結果、開回路時に微生物から本物質へ電子が渡され充電されていることが示された。

以上の結果から、１）硫酸還元に伴う化学反応として本物質が生成されている事、２）充放電機構の一端を解明できた、３）硫酸還元細菌にとってこのような物質を細胞外に生産する事は生存戦略の一つ、ということが示唆された。

＜引用文献＞

① Canstein, H., J. Ogawa, S. Shimizu, and J.R. Lloyd. 2008. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. Appl. Environ. Microbiol. 74:615-623.

② Coursolle, D., D.B. Baron, D.R. Bond, and J.A. Gralnick, 2010. The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewnalla oneidensis*. J. Bacteriol. 192:467-474.

③ Inoue, K., C. Leang, A.E. Franks, T. L. Woodard, K.P. Nevin, and D.R. Lovley. 2011. Specific localization of the c-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. Envrion. Microbiol. Reports 3:211-217.

④ Leang, C., X. Qian, T. Mester, and D.R. Lovley. 2010. Alignment of the *c*-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. Appl. Environ. Microbiol. 76:4080-4084.

⑤ Marsili, E., D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick, and D.R. Bond. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105:3968-3973.

⑥ Okamoto, A., K. Hashimoto, K.H. Nealson, and R. Nakamura. 2013. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:7856-7861.

⑦ Voordeckers, J.W., B.-C. Kim, M. Izallalen, and D.R. Lovley. 2010. Role of *Geobacter sulfurreducens* outer surface c-type cytochromes in reduction of soil humic acid and anthraquinone-2,6-disulfonate. Appl. Environ. Microbiol. 76:2371-2375.

⑧ Liu, J., Valsaraj, K.T., Devai, I., DeLaune, R.D. 2008. Immobilization of aqueous Hg(II) by mackinawite (FeS). *J. Hazard, Mater*. 157 (2-3), 432-440

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

Kei Suzuki, Rubaba Owen, Joann Mork, Hiroki Mochihara, Takuya Hosokawa, Hiroko Kubota, Hisatosihi Sakamoto, Atsunori Matsuda, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata Comparison of electrochemical and microbiological characterization of microbial fuel cells equipped with SPEEK and Nafion membrane electrode assemblies. J. Bioscience Bioeng.査読有、
122、2016 322-328.
doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.02.005

〔学会発表〕（計 22 件）

① 由井嵐士、鈴木渓、安藤翔太、田代陽介、小暮敏博、二又裕之、蓄電性 Mackinawite の充放電前後における結晶構造解析、日本生物工学会　2016 年 9 月 28 日～30 日、富山大学（富山県富山市）

② 由井嵐士、鈴木渓、安藤翔太、田代陽介、二又裕之、Mackinawite と Lepidocrocite における可逆物質変化、日本鉱物学会、2016 年 9 月 23 日～25 日、金沢大学（石川県金沢市）

③ 鈴木渓, 久保田博子, 由井嵐士, 小暮敏博, 田代陽介, 二又裕之　微生物燃料電池の細胞外電子伝達を強化する新規化合物の特性解析、日本農芸化学会中部支部第 177 回例会、2016 年 9 月 24 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

④ Hiroko Kubota, Kei Suzuki, Arashi Yui, Syota Ando, Yosuke Tashiro, Hiroyuki Futamata、“Novel rechargeable material produced by biomineralization” Asia-Pacific Conference of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (AP-ISMET2016)、 2016/Sep./1st BEXCO Exhibition Center (Busan, South Korea)

⑤ 鈴木渓、由井嵐士、久保田博子、安藤翔太、田代陽介、二又裕之、微生物燃料電池の可能性　～微生物が創る未知の物質～、日本生物工学会中部支部例会、2016 年 8 月 5 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

⑥ Arashi Yui, Hiroko Kubota, Hiroki Mochihara, Kei Suzuki, Akihisa Ochi, Toshihiro Kogure, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata、Characterization of Rechargeable Minerals Produced by Microorganism、Inter-Academia Asia 2015、2015 年 12 月 1 日グランシップ（静岡県静岡市）

⑦ 由井嵐士、久保田博子、餅原弘樹、鈴木渓、越智章富、田代陽介、小暮敏博、二又裕之、微生物により生成される新規蓄電物質の物質科学的特質と蓄電性能の関係、日本生物工学会、2015 年 10 月 25 日城山ホテル（鹿児島県鹿児島市）

⑧ 由井嵐士、久保田博子、餅原弘樹、鈴木渓、越智章富、小暮敏博、田代陽介、二又裕之、硫酸還元細菌が生成に関わるバイオミネ

ラルの特性解析、日本微生物生態学会、2015 年 10 月 20 日土浦亀城プラザ（茨城県土浦市）

⑨ 細川拓也、鈴木渓、餅原弘樹、久保田博子、由井嵐士、田代陽介、二又裕之、電子フロー制御に基づく新規低環境負荷型嫌気性排水処理プロセスの構築、環境バイオテクノロジー学会、2015 年 6 月 29 日-30 日東京大学（東京都文京区）

⑩ 由井嵐士、久保田博子、鈴木渓、餅原弘樹、細川拓也、田代陽介、小暮敏博、二又裕之、微生物により生成されるミネラルの物質特性解析、日本土壌微生物学会、2015 年 5 月 22 日つくば国際会議場（茨城県つくば市）

⑪ 久保田博子、鈴木渓、餅原弘樹、細川拓也、千葉悠介、由井嵐士、田代陽介、二又裕之、蓄電性ナノ物質を生成する嫌気性複合微生物系の解析、日本農芸化学会、2015 年 3 月 29 日岡山大学（岡山県岡山市）

⑫ 由井嵐士、久保田博子、餅原弘樹、鈴木渓、細川拓也、田代陽介、小暮敏博、二又裕之、微生物により生成される蓄電性ナノ物質の物質科学的解析、日本農芸化学会、2015 年 3 月 29 日岡山大学（岡山県岡山市）

⑬ 細川拓也、鈴木渓、餅原弘樹、久保田博子、由井嵐士、田代陽介、二又裕之、電子フロー制御による低環境負荷型嫌気性排水処理システムの構築、日本水環境学会、2015 年 3 月 16 日金沢大学（石川県金沢市）

⑭ 由井 嵐士、久保田博子、鈴木渓、餅原弘樹、細川拓也、田代陽介、二又裕之、微生物由来新規バイオマテリアルの物質科学的特性解析、静岡ライフサイエンスシンポジウム、2015 年 3 月 7 日静岡大学（静岡県静岡市）

⑮ 餅原弘樹、鈴木渓、細川拓也、久保田博子、由井嵐士、田代陽介、二又裕之、蓄電性バイオナノマテリアル生成因子の微生物生態学的解析、環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 22 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

⑯ 久保田博子、鈴木渓、千葉悠介、餅原弘樹、細川拓也、由井嵐士、田代陽介、二又裕之、蓄電性バイオナノマテリアル生成複合微生物系の解析、環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 22 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

⑰ 細川拓也、鈴木渓、餅原弘樹、久保田博子、田代陽介、二又裕之、微生物燃料電池による低環境負荷嫌気性排水処理システムの検討　環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 22 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

⑱ 由井嵐士、久保田博子、餅原弘樹、鈴木渓、細川拓也、田代陽介、小暮敏博、二又裕之、微生物により生成されるミネラル様物質の同定、環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 22 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

⑲ 久保田博子、鈴木渓、加藤豊、田代陽介、二又裕之、異なる外部抵抗条件下における微生物燃料電池の電気生産特性、第 66 回日本生物工学会、2014 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

⑳ Kei Suzuki, Hiroki Mochihara, Hiroko Kubota, Yusuke Chiba, Takuya Hosokawa, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata、Rechargeable biomineral produced by enrichment cultures derived from microbial fuel cell ISME-15 2014 24th Aug. to 29th Aug. Coex Convention Center (Soul) Soul Korea

21 Hiroko Kubota, Kei Suzuki, Yuki Mochihara, Yusuke Chiba, Takuya Hosokawa, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata Characterization of novel rechargeable material produced by biomineralization in pure culture ISME-15、2014 24th Aug. to 29th Aug. Coex Convention Center (Soul) Soul Korea

22 Hiroki Mochihara, Kei Suzuki, Nozomi Yoshida, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata Sulfate-reducing bacteria contribute to produce novel bio-nanomaterial in a microbial complex system、ISME-15、 2014 24th Aug. to 29th Aug. Coex Convention Center (Soul) Soul Korea

23

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/futamatalab/

報道等

① NHK 静岡放送局 2016 年 5 月 31 日、佐鳴湖の菌類が蓄電物質を生成
② 中日新聞 2016 年 6 月 1 日、微生物燃料電池発電力 100 倍に
③ 毎日新聞 2016 年 6 月 4 日、微生物発電、100 倍超に　効率化物質を発見
④ 静岡新聞 2016 年 6 月 7 日、微生物の発電効率化
⑤ 日刊工業 2016 年 6 月 15 日、微生物燃料電池効率 100 倍

６．研究組織

(1)研究代表者

二又　裕之（FUTAMATA, Hiroyuki）
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：５０３３５０１５

(2)研究分担者

小暮　敏博（KOGURE, Toshihiro）
東京大学・理学（系）研究科（研究院）・教授
研究者番号：５０２８２７２８

孔　昌一（KOU, Syoichi）
静岡大学・工学部・准教授
研究者番号：６０３３４６３７

(3)連携研究者

(　　)

研究者番号：

(4)研究協力者

(　　)