

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		KITA KIYOSHI					
①研究代表者氏名		北 潔		②所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院医学系研究科・教授	
③研究課題名	和文	低酸素適応における寄生虫ミトコンドリア特異的呼吸酵素群の生理機能					
	英文	Physiological function of respiratory enzymes specific for parasite mitochondria in the adaptation to low oxygen tension					
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計	
	37,600	19,000	9,500	9,500		75,600	
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成17年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
北 潔	東京大学・大学院医学系研究科・教授	分子寄生虫学	研究全般の実施と総括				
原田 繁春	京都工芸繊維大学・繊維学部・教授	構造生物学	複合体 II の結晶解析				
三芳 秀人	京都大学・大学院農学研究科・助教授	生物有機化学	ユビキノ結合部位の解析				
渡邊 洋一	東京大学・大学院医学系研究科・講師	分子生物学	複合体 I および II の分子構築の解析				
網野 比佐子	東京大学・大学院医学系研究科・助手	分子寄生虫学	ロドキノン生合成の解析				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>生物は他の生物と深い関わりを保ちつつ生存している。寄生現象もこの様な関係のひとつと考えられ、自由生活型の祖先から出発し、寄生生活に移行してからの進化の過程において宿主内の環境に適応し、宿主特異性や臓器特異性をそなえた種々の寄生虫が成立したと考えられる。この点から寄生虫は真核生物における適応現象の研究を進めるうえで極めて良い研究対象であり、特にエネルギー転換系の様な全生物に共通の代謝系の適応や進化、また基本的な反応機構を理解するうえで最適な系のひとつと考えられる。申請者はこの様な観点から、回虫などの寄生虫と宿主であるヒトのミトコンドリアを用いて酸素適応機構の解明を目的として研究を進めている。その結果、寄生虫ミトコンドリアにおいて多様な嫌氣的呼吸鎖が機能している事が判って来たが、中でも回虫で見出した NADH-フマル酸還元系は多くの寄生虫に存在し、宿主体内の環境で中心的な役割を果たしている事が明らかになった。この系は複合体 I (NADH-ユビキノ還元酵素)、ロドキノンおよび複合体 II (ロドキノール-フマル酸還元酵素：RQFR) の3成分から構成され、NADH から最終電子受容体であるフマル酸への電子伝達を触媒している。その生理的意義は嫌氣的グルコース分解系の最終ステップとして、無酸素下でも複合体 I の共役部位を駆動する事により ATP を合成できる点にある。そこで本研究では NADH-フマル酸還元系の分子構築とその生理機能の特徴を明らかにする目的で、回虫成虫ミトコンドリアを用い、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 複合体 I (NADH-ユビキノ還元酵素) および複合体 II (RQFR) の分子構築と電子伝達機能 2) ロドキノンおよびユビキノンの生合成機構と生理的役割 3) 生活環における呼吸酵素群の発現制御機構 <p>の3点に焦点を絞り研究を行う。</p>							

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

回虫受精卵、第3期幼虫(L3)そして成虫を用いた研究から、酸素適応機構における回虫ミトコンドリアの役割とその特徴について、以下の点を明らかにする事ができた。

【1】複合体I (NADH-ユビキノン還元酵素) について

電子受容体として低電位のロドキノンをを用いている回虫成虫ミトコンドリア複合体Iの特徴を明らかにする目的で、詳細な酵素学的解析を行ない、キノン類や阻害剤に対する相互作用が宿主哺乳類と大きく異なる点を明らかにした。特に NADH-フマル酸還元系阻害剤のマススクリーニングから見出した線虫複合体Iの特異的阻害剤ナフレジンは、極めて低濃度で線虫複合体Iを阻害し、ロドキノンの結合部位を競合阻害する事が明らかになった (J. Antibiot. 2005)。また、新たに合成したキナゾリン系の阻害剤に対する挙動は哺乳類の酵素と大きく異なっており、線虫複合体Iの基質結合部位の構造の特異性が明らかになった (Biochim. Biophys. Acta, 2004)。

さらに最近、成虫筋肉のミトコンドリアから活性を保持した複合体Iの可溶化・精製を開始し、SDS電気泳動上で哺乳類の複合体Iと各サブユニットを比較可能な純度の標品を得る事ができた。

【2】複合体II (ロドキノール-フマル酸還元酵素; RQFR) について

成虫ミトコンドリアの複合体IIが哺乳類酵素の持つコハク酸-ユビキノン還元酵素と逆反応のフマル酸還元を触媒する機構を明らかにし、さらに特異的な阻害剤の分子設計を目的として結晶化を試みた。種々の条件を検討した結果、回虫筋肉1kgから約1gの高純度のミトコンドリアを調製する方法を見出した。RQFRを界面活性剤を用いて可溶化し、イオン交換クロマトグラフィーで大量に精製する方法を確立し、結晶化条件の検討を行なった。その結果、C12E8とドデシルマルトシドなどの界面活性剤の混合比を調節する事によって再現性良く結晶を得る事ができるようになった。これはキノール-フマル酸還元酵素活性を持つミトコンドリア複合体IIのはじめての結晶であり、3Åを切る解像度での解析が可能となった。その結果、非ヘム鉄やFADなどの補欠分子属が電子供与体であるロドキノールからフマル酸までの複合体内での電子伝達が可能な位置関係を持って配置している事が明らかになった (投稿準備中)。

また本酵素の阻害剤として見出したアトペニンはいまだにない強力な複合体IIの阻害剤であり、複合体IIの反応機構の解析に大いに貢献すると考えられ、実際にヒトや*C. elegans*の複合体IIとその変異酵素の解析にも利用されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003)。

また生活環において成虫とは異なり、酸素を用いて好氣的なエネルギー代謝を行なっている第3期幼虫の複合体IIについては、微量な試料しか得られず研究が遅れていたが、虫卵の培養法を検討した結果、再現性よく解析に十分なミトコンドリアを得られる系を確立する事ができた。この系を用いて得た幼虫複合体IIの各サブユニットのLC-MS/MS解析から4つのサブユニットのうち、フラボプロテインサブユニット(Fp)とシトクロム*b*小サブユニット(CybS)が成虫酵素と異なっていることを見出した (Mol. Biochem. Parasitol, 2003)。ところが、つい最近、受精卵のミトコンドリアにはさらに両者のキメラ型酵素が存在する事が判った。すなわち、Fpは幼虫型でCybSが成虫型の酵素であり、受精卵の発生に従ってCybSのみが成虫型から幼虫型に変化して行く。この様に、回虫複合体IIがその生活環においてダイナミックな変換を通して、環境の変化に適応していることが明らかになった。

【3】ロドキノンおよびユビキノン生合成機構と生理的役割

低分子電子伝達体であるユビキノンおよび回虫をはじめとする線虫の嫌氣的呼吸鎖の必須成分である低電位のロドキノンの生合成経路を明らかにする目的で研究を進めている。キノン合成経路に欠損があると予想された自由生活性線虫*Caenorhabditis elegans*の長寿命変異株*clk-1*のキノン組成を分析した結果、*clk-1*ではユビキノンが全く合成されておらず、代わりに合成中間体であるデメトキシユビキノンが蓄積している事が明らかになった (J. Biol. Chem. 2001)。しかし、ロドキノンの合成量に変化はないので、ユビキノンとロドキノンの合成経路の分岐はデメトキシユビキノンの上流である事が判明した。この結果をふまえて、*clk-1*の遺伝子産物がデメトキシユビキノンを水酸化するヒドロキシラーゼと考え、酵素活性測定系の確立をin vivoおよびin vitroで試みた。その結果、線虫*clk-1*が大腸菌の本酵素の変異株の増殖を回復させた点はCLK-1がヒドロキシラーゼである事を示している (FEBS Lett. 2003)。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

寄生虫の代名詞となっている回虫は蠕虫のなかでも線虫類に属するが、特にブタ回虫は虫体のサイズが大きく、また研究材料としての入手が比較的容易なことから低酸素適応のモデルに最適な系として研究を進めてきた。糞便とともに外界に排出された受精卵の発生には温度、湿度に加え酸素の供給が必須で、受精卵を通気培養して得た幼虫からミトコンドリアを分離し生化学的に調べてみると呼吸鎖電子伝達系の構成は哺乳類と同一である。一方、成虫が生息する小腸は pO_2 が 2.5-5% と外界に比べ低酸素分圧の環境になっており、成虫のエネルギー代謝は幼虫や宿主と大きく異なっている。すなわち成虫においては酸素を利用しない独特な糖分解経路である PEPCK (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ)-コハク酸経路が働いており、低酸素条件下でも ATP を合成できる。この経路の最終ステップであるコハク酸の生成には回虫成虫ミトコンドリアに特有な嫌氣的電子伝達系である NADH-フマル酸還元系が関与している。また脂溶性の低分子電子伝達体であるキノン類も大きく変化する。好氣的代謝を行っている幼虫では哺乳類同様にユビキノンが働いているが、成虫ではユビキノンの側鎖の置換によって酸化還元電位が低くなったロドキノンが主成分となり、NADH からフマル酸へ電子を伝達する NADH-フマル酸還元系の重要な構成成分となっている。この様に回虫はその生活環において呼吸鎖を大きく変動させてエネルギー供給を一定に保ち、環境の酸素分圧の変化に対応している。

本研究開始時点でわれわれは複合体 II が幼虫では哺乳類同様にコハク酸-ユビキノン還元酵素 (succinate-ubiquinone reductase SQR, コハク酸脱水素酵素複合体とも呼ばれる) として機能しているが、一方成虫ではフマル酸をコハク酸へ還元するフマル酸還元酵素 (quinol-fumarate reductase QFR) として逆反応を触媒していることを示し、両者が二つの独立した酵素であることを明らかにしていた。これはミトコンドリアの複合体 II が 2 種類存在するはじめての例として国際的にも注目されていた。しかし本研究においてつい最近、第 3 の複合体 II が存在することが明らかになった。すなわち、幼虫型のフラボプロテインサブユニット (Fp) と成虫型のシトクロム *b* 小サブユニット (CybS) を持つキメラ型酵素が受精卵から発生初期にかけて発現していることが判明した。現在、酵素学的な解析が進行中であるが、キメラ型が最も好氣的性質を持ち、幼虫型は嫌氣的な成虫に近い性質も合わせ持っていることが明らかになりつつある。このことは宿主による経口摂取時に遭遇する大気中から腸内への急激な酸素分圧の変化に対応するための前適応と考えられる。このようなサブユニットのダイナミックな変換を介しての酸素適応の例はこれまで報告がなく、その発現制御機構も含め極めて興味深い現象である。第 3 期幼虫は感染後の体内移行を経て最終的に小腸で成虫となるが、この間に複合体 II は幼虫型から成虫型に変換するはずであり、その時期、また宿主体内の位置についても幼虫の周囲の環境との関係からの解析が必要と考えられる。

本研究がきっかけとなり、われわれは複数の複合体 II を持つ例の探索を開始したところ、自由生活性線虫である *C. elegans* では発現時期の異なる 2 種の複合体 II の存在が確認された。また、われわれが全てのサブユニットの cDNA クローニングを行ったヒト複合体 II において 2 種の Fp サブユニットが見い出され、このうち 1 種はイントロンを持たない遺伝子にコードされていた。両者は全ての臓器で発現しているが、その転写産物量は異なっている。この事実は複合体 II 欠損のミトコンドリア異常症患者における臓器特異性を説明できる可能性があり、現在解析を進めている。このように、これまで 1 種と考えられてきたミトコンドリアの複合体 II が、回虫ばかりでなくヒトを含む多くの生物で多様性を示すことが明らかになりつつあり、この新しい知見に基づき、その生理的役割についてもさらに解析が必要と考えられる。この点で本研究で見出した複合体 II の特異的阻害剤アトペニンは nM オーダーの IC_{50} を示し、複合体 II の機能解析に大いに期待される。

以上述べてきたように、本研究の遂行により回虫成虫の嫌氣的代謝に中心的な役割を果たす成虫 NADH-フマル酸還元系について、その全体像を分子レベルで捉え、さらに生理的意義を明確にする基盤を確立しつつある。本研究によって寄生虫におけるエネルギー代謝の多様性の意義が明らかになり、線虫を含む蠕虫類における代謝の基本原則を理解する事が可能となるが、その情報は原虫、ひいては寄生虫全体、さらにわれわれ哺乳類のエネルギー代謝における低酸素適応機構の理解に大きく貢献すると考えられる。特に申請者らが平行して進めている虚血時の低酸素環境下におけるヒトミトコンドリア機能の臓器特異性について明らかにする事ができると考えられ、臨床面も含め他分野への波及効果が大きい期待できる。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付し付してください。)

学術誌

1. Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans* Miyadera, H., Amino, H., Hiraishi, A., Taka, H., Murayama, M., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Ishii, N., Hekimi, S., Kita, K. (2001) **J. Biol. Chem.**, 276, 7713-7716
2. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum* Kita, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H., and Takeo, S. (2002) **Biochim. Biophys. Acta**, 1553, 123-139
3. Quinones in long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans* Miyadera, H., Kano, K., Miyoshi, H., Ishii, N., Hekimi, S. and Kita, K. (2002) **FEBS Lett.** 512, 33-37
4. Electron transfer complexes in *Ascaris* mitochondria Kita, K., and Takamiya, S. (2002) **Advance in Parasitology**. 51, 95-131
5. Complex II inactivation is lethal in the nematode *Caenorhabditis elegans* Ichimiya, H., Huet, R. G., Hartman, P., Amino, H., Kita, K. and Ishii, N. (2002) **Mitochondrion**, 2, 191-198
- ⑥ Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Miyoshi, H., Osanai, A., Kita, K. and Omura, S. (2003) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100, 473-477
7. Purification of active recombinant Trypanosome Alternative Oxidase. Nihei, C., Fukai, Y., Kawai, K., Osanai, A., Yabu, Y., Suzuki, T., Ohta, N., Minagawa, N., Nagai, K., and Kita, K. (2003) **FEBS Lett.** 538, 35-40
8. Complex II from Phototrophic Purple Bacterium *Rhodospirillum rubrum* displays rhodoquinol-fumarate reductase activity. Miyadera, H., Hiraishi, A., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Mineki, R., Murayama, K., Nagashima, V. P., Matsuura, K., Kojima, S., and Kita, K. (2003) **Eur. J. Biochem.** 270, 1863-1874
9. Complementation of *Escherichia coli ubiF* mutation by *Caenorhabditis elegans* CLK-1, a product of longevity gene of the nematode worm. Adachi, A., Shinjyo, N., Fujita, D., Miyoshi, H., Amino, H. Watanabe, Y. and Kita, K. (2003) **FEBS Lett.** 543, 175-179
- ⑩ Isolation and characterization of the stage-specific cytochrome *b* small subunit (CybS) of *Ascaris suum* complex II from the aerobic respiratory chain of larval mitochondria. Amino, H., Osanai, A., Miyadera, H., Shinjyo, N., Tomitsuka, T., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., Takamiya, S., Aoki, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Kojima, S., and Kita, K. (2003) **Mol. Biochem. Parasitol.** 128, 175-186
11. Parasite mitochondria as a drug target: diversity and dynamic changes during the life cycle. Kita, K., Nihei, C., and Tomitsuka, E. (2003) **Curr. Med. Chem.** 10, 1241-1253

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

12. Direct evidence for two distinct forms of the flavoprotein subunit of human mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase). Tomitsuka, E., Hirawake, H., Goto, Y., Taniwaki, M., Harada, S., and Kita, K. (2003) **J. Biochem.** 134, 191-195
13. Direct evidence for expression of Type II flavoprotein subunit in human complex II (succinate-ubiquinone reductase). Tomitsuka, E., Goto, Y., Taniwaki, M., and Kita, K. (2003) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 311, 774-779
- ⑭ Rhodoquinone reaction site of mitochondrial complex I, in parasitic helminth, *Ascaris suum*. Yamashita, T., Ino, T., Miyoshi, H., Sakamoto K., Osanai, A., Nakamaru-Ogiso, E., and Kita, K. (2004) **Biochim Biophys. Acta** (Bioenergetics), 1608, 97-103
15. A γ -Lactone Form Nafuredin, Nafuredin- γ also Inhibits Helminth Complex I Shiomi, K., Ui, H., Suzuki, H., Hatano, H., Nagamitsu, T., Takano, D., Miyadera, H., Yamashita, T., Kita, K., Miyoshi, H., Harder, A., Tomoda, H. and Omura, S. (2005) **J. Antibiot.** 58, 50-55
16. Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation. Shinjyo, N. and Kita, K. (2006) **J. Biochem.** in press
17. Recent advances in research for parasite control in Japan Arizono, N., Shiomi, K., Kita, K., Nakanishi, K. and Omura, S. (2006) **Trend. Parasitol.** in press

国際会議発表

1. Kita, K. "Unique properties of respiratory chain in *Plasmodium falciparum* mitochondria", International Eijkman Symposium, Sept. 2-6, 2001, Bogor, Indonesia
2. Kita, K. "Parasite respiratory chain in the mitochondria as a target for chemotherapy" 8th International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, Sept. 5-9, 2001, Gdansk, Poland
3. Kita, K. "*Plasmodium* mitochondria: Post genome research", Joint Meeting of Tropical Medicine and Malaria, Nov. 20-22, 2002, Bangkok, Thailand
4. Kita, K. "Parasite Mitochondria as a Target of Chemotherapy", International Symposium of "Asian unique strategy against Asian parasitic diseases for Asian people by Asian parasitologists, Nov. 12-14, Chiba, Japan
5. Kita, K. "Diversity of parasite mitochondria", International Eijkman Symposium, Oct. 1-3, 2004, Jogjakarta, Indonesia
6. Ohara, S., Amino, H., Jiang, M. and Kita, K. "Comparative study of hypoxia responding genes between *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*", IX European Muticolloquim of Parasitology, July 18-23, 2004, Valencia, Spain
7. Kita, K. "*Plasmodium* mitochondria as a target of chemotherapy", Joint Meeting of Tropical Medicine and Malaria, Nov. 29-Dec. 1, 2004, Bangkok, Thailand

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

8. Kita, K. "Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: The inhibitory effect of licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain", International Conference on Natural Products & Molecular Therapy, Jan. 12-15, 2005, Cape Town, South Africa

国内学会発表

1. 北 潔 「寄生適応におけるミトコンドリアの多様性の意義」第74回日本生化学会大会（2001）10月
2. 宮寺浩子他「*Caenorhabditis elegans* 長寿変異株におけるユビキノン生合成系の変動」第24回日本分子生物学会年会（2001）12月
3. 長内理大他「カイチュウ成虫ミトコンドリア複合体 II の生化学的解析と結晶化」第71回日本寄生虫学会大会（2002）3月
4. 大原聡他「*Caenorhabditis elegans* を用いた回虫 stage-specific 複合体 II isoform 発現系の構築」第71回日本寄生虫学会大会（2002）3月
5. 新庄記子他「回虫ミトコンドリア幼虫型複合体 II による感染時低酸素条件への前適応」第75回日本生化学会大会（2002）10月
6. 山下哲生他「ブタ回虫 *Ascaris suum* の成虫型 HADH-キノ還元酵素（複合体 I）の阻害剤を用いたキノ還元部位の解析」第75回日本生化学会大会（2002）10月
7. 大原聡他「*Caenorhabditis elegans* を用いた組換えタンパク質発現系の構築」第75回日本生化学会大会（2002）10月
8. 長内理大他「薬剤開発を目的としたカイチュウ成虫ミトコンドリア複合体 II の生化学的解析」第72回日本寄生虫学会大会（2003）3月
9. 山下哲生他「ブタ回虫 *Ascaris suum* の成虫型ミトコンドリア複合体 I のロドキノ還元部位の解析」第72回日本寄生虫学会大会（2003）3月
10. 新庄記子他「回虫卵発生過程における複合体 II のサブユニット構成変化と嫌氣的呼吸鎖の成立」第72回日本寄生虫学会大会（2003）3月
11. Kita, K. 「Diversity of Parasite Mitochondria」第76回日本生化学会大会（2003）10月
12. Shinjyo, N. et al 「Purification of chimera-type complex II from *Ascaris suum* egg mitochondria」第76回日本生化学会大会（2003）10月
13. Adachi, A. et al 「Complementation of *Escherichia coli ubiF* mutation by *Caenorhabditis elegans* CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm」第76回日本生化学会大会（2003）10月
14. 富塚江利子他「ヒト複合体 II（コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素）フラボプロテインサブユニット（Fp）アイソフォームの解析」第26回日本分子生物学会年会（2003）12月
15. 新庄記子他「神経細胞分化過程におけるヘム生合成系の活性化」第27回日本分子生物学会年会（2004）12月
16. 富塚江利子他「ヒト複合体 II（コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素）フラボプロテインサブユニット（Fp）変異を用いたアイソフォームの解析」第27回日本分子生物学会年会（2004）12月
17. 後藤美穂他「回虫 *hif-1* (Hypoxia-inducible factor-1) ホモログのクローニング」第28回日本分子生物学会年会（2005）12月
18. 網野比佐子他「線虫 *Caenorhabditis elegans* ミトコンドリア電子伝達系複合体 II におけるフラビントタンパク質アイソフォームの機能解析」第28回日本分子生物学会年会（2005）12月
19. 清水洋成他「回虫 *Ascaris suum* 成虫ミトコンドリア複合体 II の結晶構造解析」日本結晶学会 2005年度会（2005）12月
20. 北 潔「化学療法の標的としての寄生虫ミトコンドリア」日本薬学会第125年会（2005）12月

研究成果による工業所有権の出願・取得状況 なし