

〔研究ノート〕

ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞膜への トラフィッキングの観察

須賀比奈子・フレデリック J. エラート・グレゴリー W. ソーヤー

The Export Trafficking of the Muscarinic Acetylcholine Receptors Induced by an Antagonist

Hinako SUGA, Frederick J. EHLERT and Gregory W. SAWYER

G protein-coupled receptors are cell-surface receptors, many of which have conserved motif F(x)₆LL in their C-terminal intracellular region. The motif is known to function when the G protein-coupled receptors are exported from the endoplasmic reticulum to the cell surface. We reported previously that the amino acid mutations of the conserved leucines of M1 muscarinic acetylcholine receptor caused significant decrease in the cell-surface expression and significant increase in the endoplasmic reticulum expression of the mutant receptor, and that in the presence of antagonist atropine, the mutant receptor showed cell-surface expression, similar to the expression of the wild-type receptor. In this study, we investigated the export trafficking of the mutant receptor by the measurements of membrane-impermeable antagonist [³H]N-methylscopolamine binding to the cell surface, and indicated that the cell-surface expression of the mutant receptor in the presence of atropine decreased to 20% by the depletion of atropine for 3 days, and recovered to the same amount as before by the second addition of atropine. We also investigated the export trafficking of the mutant receptor using the total internal reflection fluorescence microscope, and indicated that the mutant receptor expressed time-dependently to the cell surface by the second addition of atropine.

Key words: G protein-coupled receptor (Gタンパク質共役受容体 (GPCR)), muscarinic receptor (ムスカリン受容体), antagonist (アンタゴニスト), ligand binding (リガンド結合), total internal reflection fluorescence microscope (全反射照明蛍光顕微鏡), trafficking (トラフィッキング), pharmacological chaperone (薬理的シャペロン), folding (フォールディング)

【背景・目的】

神経伝達物質やホルモン等をリガンドとする G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、ヒトゲノムに約 450 種存在している (Suga & Haga, 2007)。これらの多くは病因と関係しており、現在使われている治療薬のおよそ半数は GPCR に作用するものである。GPCR は 7 回膜貫通型受容体とも呼ばれている。N 末端は細胞外にあり、 α ヘリックス構造をとるヘリックス 1 からヘリックス 7 が、ヘリックス間のループを挟んで細胞膜を 7 回横切り、C 末端は細胞内に

ある (Figure 1)。多くの GPCR には、C 末端細胞内領域にヘリックス 8 と呼ばれる両親媒性 α ヘリックスが存在し、疎水性アミノ酸残基で細胞膜と相互作用している。ヘリックス 8 を含む C 末端細胞内領域は、G タンパク質や、G タンパク質共役受容体キナーゼ、アレスチンなどと結合することにより、シグナル伝達や、GPCR の細胞内移行、脱感受性に関与している。また、GPCR のフォールディングや、小胞体から細胞膜への輸送にも関与していることが報告されている (Nakamura et al., 2010)。ヘリックス 8 には、高く保存されたアミノ酸配列 F(x)₆LL

```

-----I-----
1  MNTSAPPAVS PNITVLAPGK GPWQVAFIGI TTGLLSLATV TGNLLVLISF KVNTEKTVN

-----II-----
61 NYFLLSLACA DLIIGTFSMN LYTTYLLMGH WALGTLACDL WLALDYVASN ASVMNLLIS

-----III-----

-----IV-----
121 FDRYFSVTRP LSYRAKRTPR RAALMIGLAW LVSFVLWAPA ILFWQYLVGE RTVLAGQCYI

-----V-----
181 QFLSQPIITF GTAMAAFYLP VTVMCTLYWR IYRETENRAR ELAALQGSET PGKGGGSSSS

241 SERSQPGAEG SPETPPGRCC RCCRAPRLQ AYSWKEEEEE DEGSMSLTS SEGEEPGSEV

301 VIKMPMVDPE AQAPTKQPPR SSPNTVKRPT KKGRDRAGKG QKPRGKEQLA KRKTFSLVKE

-----VI-----
361 KKAARTLSAI LLAFILWTP YNIMVLVSTF CKDCVPETLW ELGYWLCYVN STINPMCIAL

-----VII-----

-- -----VIII-----
421 CNKAFRDTFR LLLCRWDKR RWRKIPKRP SVHRTPSRQC

```

Figure 1 野生型ヒト M1 受容体のアミノ酸配列

野生型ヒト M1 受容体 (GenBank Accession: NM_000738) の保存されたアミノ酸配列 F(x)₆LL を長方形で囲んだ。その中の変異を導入した L432 と L433 を、太字にした。ヘリックス 1~8 の位置を I~VIII で示した。

が存在する。この配列は、GPCR の小胞体から細胞膜への輸送に関与していると報告されており、フォールディングにも関与していると推測されている (Duvernay et al., 2004, 2009)。

GPCR の遺伝子変異は各種の疾患と関係している。その原因の多くとして、変異 GPCR は翻訳され、小胞体に移行するが、アミノ酸残基の変異によりフォールディングに異常を来し、細胞膜に輸送されないため、小胞体に蓄積してしまうことが考えられている。薬理的シャペロンとは、フォールディングが異常なタンパク質に結合し、フォールディングを改善させる分子である。GPCR のリガンドは、薬理的シャペロンとして機能することが報告されており、遺伝子変異による疾患の新しい治療法として期待されている (Tao & Conn, 2014)。

ムスカリン性アセチルコリン受容体は GPCR の一種であり、精神神経疾患や癌等多くの病因と関係している (Haga, 2013)。ムスカリン受容体には 5 つ

のサブタイプ (M1-M5) が存在し、各々異なる病因と関係している。Sawyer らは以前、ヒトムスカリン受容体 M1 サブタイプの ⁴²⁵F(x)₆LL⁴³³ 中の L432/L433 (Ballesteros-Weinstein numbering scheme では L7.67/L7.68; Ballesteros & Weinstein, 1995) を L432A/L433A に変異させた M1 L432A/L433A 受容体を培養細胞に一過性に発現させ、細胞内での局在を調べた (Sawyer et al., 2010)。その結果、M1 L432A/L433A 受容体を一過性に発現させた細胞では、野生型 M1 受容体を一過性に発現させた細胞と比べて、受容体の小胞体での局在が著しく増加し、細胞膜での局在が著しく減少していることが明らかとなった。また、膜透過型アンタゴニスト atropine 添加により、小胞体での局在が減少し、細胞膜での局在が増加することが明らかとなった。M1 受容体 ⁴²⁵F(x)₆LL⁴³³ 中の L432/L433 は、M1 受容体の結晶構造 (PDB ID: 5CXV; Thal et al., 2016) から、ヘリックス 8 の細胞膜と相互作用しているアミノ酸残基と考えられる。

このことから、L432/L433 を L432A/L433A に変異させた M1 受容体は、ヘリックス 8 の細胞膜との相互作用に変化が生じ、フォールディングおよび構造が変化したことにより、小胞体から細胞膜への輸送が阻害されたと推測した。

GPCR の細胞膜での発現量を知ることは、GPCR の細胞膜への輸送だけでなく、細胞のリガンド感受性などを知るために必要である。Sawyer らは、M1 L432A/L433A 受容体の細胞膜での発現量をリガンド結合で測定しているが、atropine 添加後は 7 時間のみで結合が直線に上昇中であり、除去後は 8 時間のみで結合が約 63% までしか減少していない (Sawyer et al., 2010)。ここでは野生型との比較も行われていない。著者らは、M1 L432A/L433A 受容体を一過性に発現させた細胞を用いて研究を行うことを試みたが、transfection の効率が低く、結果を得ることが難しかった。そこで、本研究では、M1 L432A/L433A 受容体を恒常的に発現させた細胞を用いて、M1 L432A/L433A 受容体の小胞体から細胞膜への輸送について解析することを目的とした。受容体の細胞表面への輸送は、リガンド結合実験および全反射照明蛍光顕微鏡で観察した。本研究は、GPCR リガンドの薬理的シャペロンとしての機能解明、さらに、GPCR の遺伝子変異による疾患の治療法開発に役立つと思われる。

【実験材料・方法】

1. 実験材料

1-1. 試薬

Ham's F-12 Nutrient Mixture, trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。Fetal calf serum は、HyClone Laboratories Inc. (South Logan, UT, USA) から購入した。G418 は、InvivoGen (San Diego, CA, USA) から購入した。Atropine は、Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer の調製に使用する試薬、HCl, NaOH は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。 $[^3\text{H}]$ *N*-methylscopolamine (NMS) は、PerkinElmer

Life and Analytical Sciences (Waltham, MA, USA) から購入した。

1-2. 培養細胞株

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に、野生型ヒト M1 受容体 cDNA, または、変異型ヒト M1 L432A/L433A 受容体 cDNA を挿入した発現ベクター pEGFP-C2 (Sawyer et al., 2010) をトランスフェクションし、Green fluorescent protein (GFP) を N 末端に融合した受容体を恒常的に発現させた CHO 細胞 (クローン) を作製した。

1-3. 蛍光顕微鏡

モノクロ顕微鏡カメラ Axiocam を搭載した蛍光顕微鏡 Axiovert 200M (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), および、カリフォルニア大学アーバイン校蛍光動態研究所の全反射照明蛍光顕微鏡 IX81 (Olympus, Tokyo) を使用した。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

GFP を融合した野生型ヒト M1 受容体を恒常的に発現させた CHO 細胞, および, GFP を融合した M1 L432A/L433A 受容体を恒常的に発現させた CHO 細胞は, Ham's F-12 Nutrient Mixture に 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418, および, 0.10 μM atropine を添加した培地を用いて, 5% $\text{CO}_2/95\%$ air 中で, 37°C で培養を行った。

2-2. 生細胞を用いた $[^3\text{H}]$ NMS 結合アッセイ

細胞を, 24 穴の培養プレート (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) に 1 穴あたり 0.60 ml の培地を用いて播種し, 【結果】に記載する様々な条件で培養を行った。Atropine を含まない培地に交換する時は, atropine を含まない培地で 37°C, 10 分間の洗浄を 2 回行った後, 新しい atropine を含まない培地に交換した。 $[^3\text{H}]$ NMS 結合アッセイを行う時は, KRB buffer (26 mM NaHCO_3 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 124 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.3 mM MgCl_2 , and 10 mM glucose, pH 7.4) で 37°C, 15 分間の洗浄を 3 回行った後, 氷冷した 0.50 ml の 1.0 nM $[^3\text{H}]$ NMS (specific activity, 82 Ci/mmol) を

含む KRB buffer に交換した。細胞を $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 存在下で 4°C で 24 時間インキュベートした後、氷冷した KRB buffer で素早く 2 回洗浄し、KRB buffer を吸引により除去した。細胞に 0.20 ml の 1.0 M NaOH を添加し、室温で 20 分間溶解した後、0.30 ml の 1.0 M HCl を添加した。細胞溶解液中の放射活性は、以前報告したとおりに測定した (Suga et al., 2008)。非特異的な $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合は、 $10\ \mu\text{M}$ atropine 存在下での $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合とした。全ての測定は、トリプレットで行った。

2-3. 全反射照明蛍光顕微鏡を用いた観察

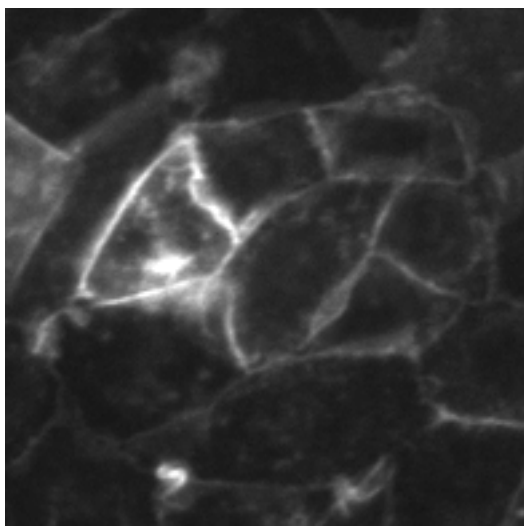
細胞を、直径 35 mm のガラスボトムディッシュ (MatTek, Ashland, MA, USA) に 2.0 ml の $1.0\ \mu\text{M}$ atropine を含む培地、または、含まない培地を用いて播種した。培養を 3 日間行った後、atropine を含まない培地の細胞に $1.0\ \mu\text{M}$ atropine を添加し、一定時間後に全反射照明蛍光顕微鏡を用いて 37°C で観察を行った。

【結 果】

1. M1 L432A/L433A 受容体の $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合アッセイを用いた細胞膜での発現解析

これまでの著者らの研究により、M1 L432A/L433A 受容体を一過性に発現させた細胞では、野生型 M1 受容体を一過性に発現させた細胞と比べて、受容体の小胞体での局在が著しく増加し、細胞膜での局在が著しく減少していること、および、膜透過型アンタゴニスト atropine を添加すると、小胞体での局在が減少し、細胞膜での局在が増加することが明らかとなっている。一過性発現より発現効率を上げるため、また、長期間観察を行うため、本研究では、M1 L432A/L433A 受容体を恒常的に発現させた CHO 細胞を用いることにした。この細胞を atropine 存在下で培養し、M1 L432A/L433A 受容体が細胞膜に局在するかどうか調べるため、M1 L432A/L433A 受容体に融合させた GFP を蛍光顕微鏡で観察した (Figure 2)。M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞では、GFP 蛍光は細胞膜および細胞質全体に一様に存在していた。このことは、M1 L432A/L433A 受容体は細胞膜に局在するが、

A



B

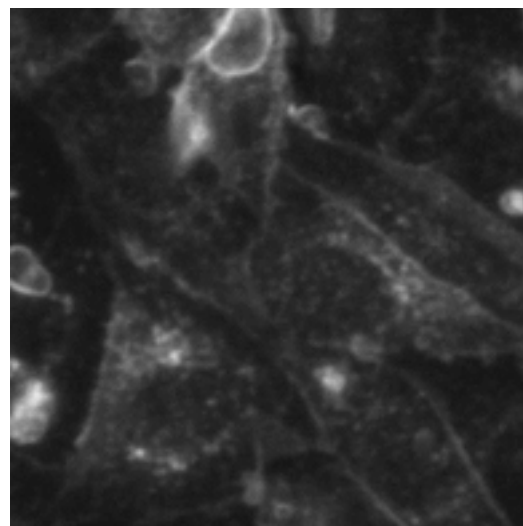


Figure 2 Atropine 存在下での M1 L432A/L433A 受容体の局在

野生型 M1 受容体恒常発現細胞および M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞を、atropine 存在下で培養し、蛍光顕微鏡を用いて、40 倍の倍率で観察した。(A) は野生型 M1 受容体に融合させた GFP の蛍光像、(B) は M1 L432A/L433A 受容体に融合させた GFP の蛍光像である。同様の実験を 2 回行い、同様の結果を得た。

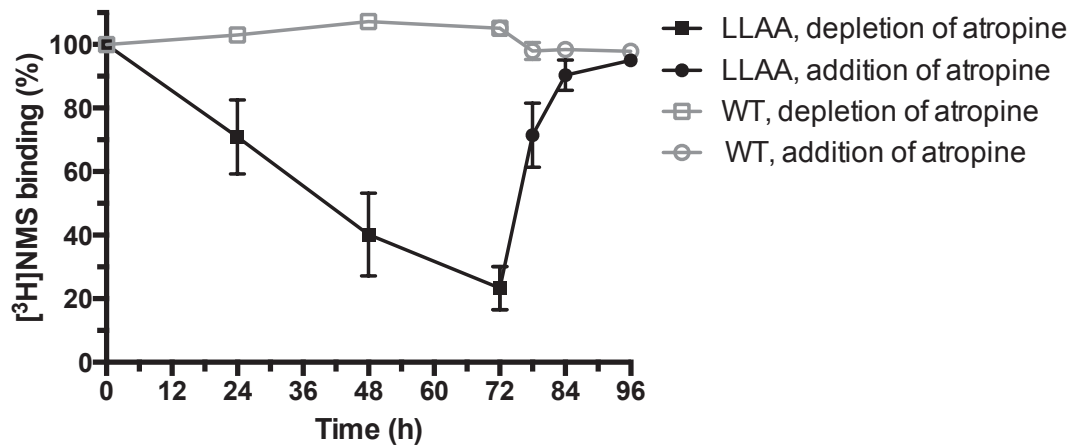


Figure 3 M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞への $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合に対する Atropine の効果
 Atropine 存在下で培養していた野生型 M1 受容体恒常発現細胞 (オープン・スクエア) および M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞 (クローズド・スクエア) から, atropine を除去し, これらの細胞への $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合を 24 時間ごとに測定した。また, atropine を除去した 72 時間後に atropine を添加し, atropine を添加した 6, 12, 24 時間後に, 野生型 M1 受容体恒常発現細胞 (オープン・サークル) および M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞 (クローズド・サークル) への $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合を測定した。グラフの縦軸は $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合 (%) であり, atropine 除去後 0 時間で (直ちに) 測定した $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合を 100% とした。野生型 M1 受容体恒常発現細胞の実験は 2 回, M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞の実験は 4 回, それぞれトリプレットで行った。シンボルは平均値, エラーバーは標準誤差である。

細胞内にも多く局在していることを示している。それに比べて, 野生型 M1 受容体恒常発現細胞では, 細胞膜に強い GFP 蛍光を示す細胞の割合が高かった。このことは, 野生型 M1 受容体が, M1 L432A/L433A 受容体より, 細胞膜に多く局在していることを示している。

これらの細胞の培地を atropine を含まない培地に交換し, 細胞膜に局在している M1 受容体の発現量を, 膜不透過型アンタゴニスト $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合アッセイにより 24 時間ごとに測定した (Figure 3)。M1 L432A/L433A 受容体を恒常的に発現させた CHO 細胞の場合, $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合は, 時間依存的に減少し, 72 時間後には, atropine 除去後 0 時間の約 20% になった。72 時間後に 1.0 μM atropine を含む培地に交換したところ, その 6 時間後に $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合は約 70% まで回復し, atropine を含む培地に交換した 24 時間後には 95% まで回復した。一方, 野生型 M1 受容体を恒常的に発現させた CHO 細胞の場合, atropine を含まない培地に交換しても, $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合の減少は見られず, 72 時間後に 1.0 μM atropine を含む培地に交換しても, $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合の上昇は見られなかった。逆に,

atropine を含む培地に交換後, $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合が 5 % 程度減少しているが, $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 結合測定前に行う atropine の洗浄が不十分だったため, 受容体に結合した atropine が残っていた可能性があると思われる。以上のことから, C 末端細胞内領域 F(x)₆LL 中の L432/L433 は, M1 受容体の細胞膜への局在に必要であること, L432A/L433A の変異により M1 受容体は細胞膜へ輸送されず, 細胞内に局在するが, アンタゴニスト atropine と結合すると細胞膜へ輸送されることが考えられた。

2. M1 L432A/L433A 受容体の全反射照明蛍光顕微鏡を用いた細胞膜での発現解析

全反射照明蛍光顕微鏡は, エバネッセント顕微鏡とも呼ばれ, ガラスボトムディッシュに付着した細胞のガラス面から 100 nm 程度が観察可能であり, 細胞膜近辺のみの観察に適している。本研究では, 全反射照明蛍光顕微鏡を用いて, GFP を融合した M1 L432A/L433A 受容体の細胞膜近辺での発現を観察した。Atropine 存在下で培養した M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞では, 細胞膜近辺 (特に輪郭) に強い GFP 蛍光を示す細胞の割合が高か

った (Figure 4A)。このことは、M1 L432A/L433A 受容体は細胞膜近辺に局在していることを示している。Atropine 非存在下で3日間培養したM1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞では、強い GFP 蛍光を示す細胞は少なく、細胞の輪郭より内側に弱い GFP 蛍光を示す細胞が見られた (Figure 4B)。このことは、M1 L432A/L433A 受容体は、atropine の除去により、細胞膜近辺への局在が著

しく低下したことを示している。この細胞に 1.0 μ M atropine を添加したところ、その4時間後には、細胞の輪郭より内側に加えて、細胞の輪郭に弱い GFP 蛍光を示す細胞が一部見られるようになった (Figure 4C)。Atropine を添加した7時間後には、細胞の輪郭に強い GFP 蛍光を示す細胞が多く見られるようになったが (Figure 4D)、Figure 4A と比べて、蛍光強度が低く、細胞の輪郭より内側に

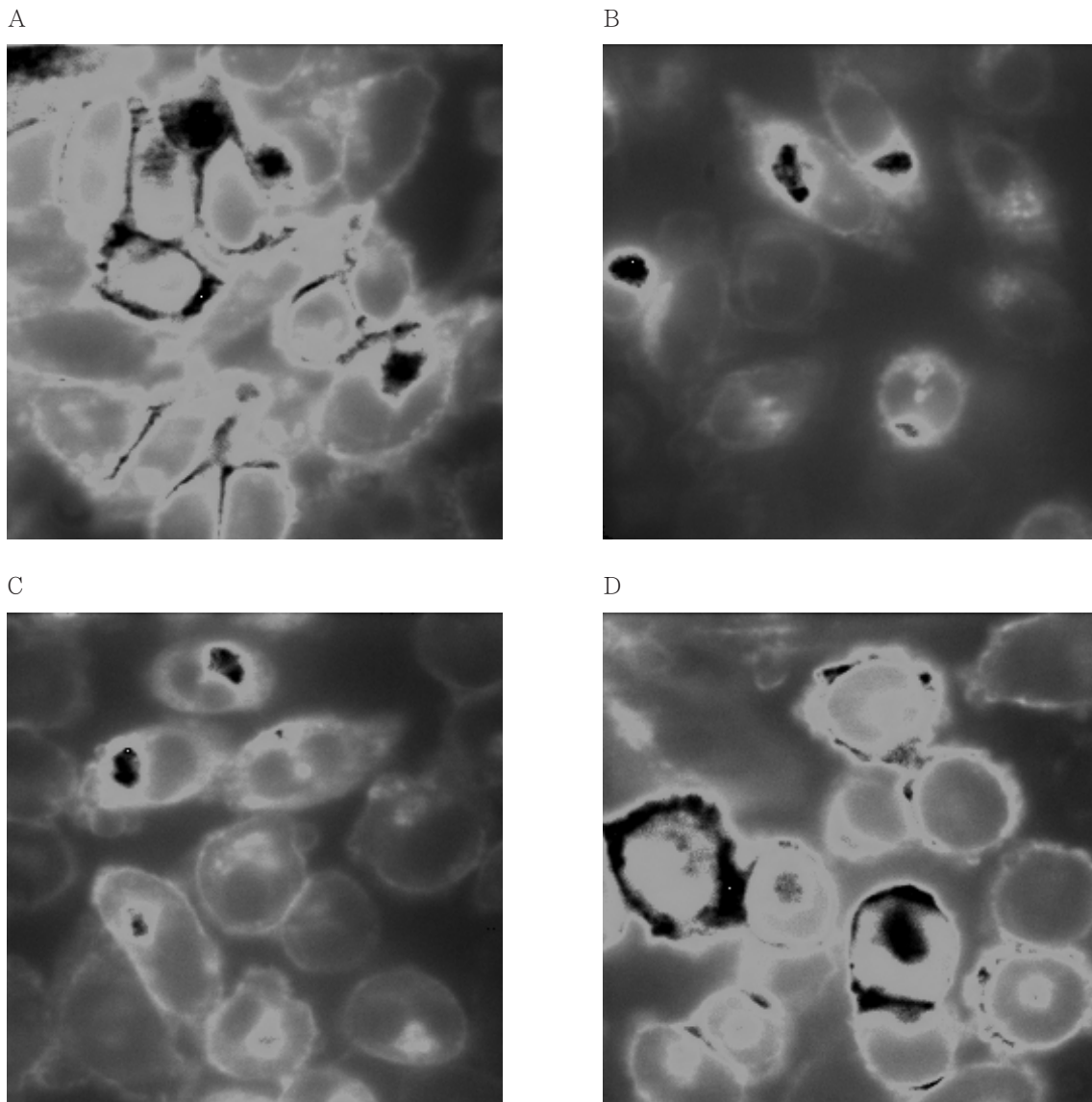


Figure 4 M1 L432A/L433A 受容体の局在に対する Atropine の効果の全反射照明蛍光顕微鏡による観察

M1 L432A/L433A 受容体恒常発現細胞を、atropine 存在下 (A) および非存在下 (B) で3日間培養後、atropine 非存在下で培養した細胞に、atropine を添加し、さらに4時間 (C) および7時間 (D) 培養を行った。全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、これらの細胞を60倍の倍率で観察した。GFP の蛍光強度を濃青色 (弱) から赤色 (強) のグラデーションで示している。同様の実験を2回行い、同様の結果を得た。

GFP 蛍光を示す細胞が多く見られた。これらの結果から、M1 L432A/L433A 受容体は、atropine と結合することにより、細胞内から細胞膜に移行し、細胞膜に局在することが示唆された。

【考 察】

本研究では、GPCR の C 末端細胞内領域に存在するヘリックス 8 中の高く保存されたアミノ酸配列 F(x)₆LL の、小胞体から細胞膜への輸送との関連について、M1 受容体を用いて、解析を行った。受容体の細胞表面への輸送を膜不透過型アンタゴニスト [³H]NMS 結合実験で観察した結果、膜透過型アンタゴニスト atropine 存在下で細胞表面に発現していた M1 L432A/L433A 受容体は、atropine 除去により時間依存的に減少し、72 時間後に atropine 除去直後の約 20% まで減少することが明らかとなった。また、72 時間後に atropine を添加すると、細胞表面への M1 L432A/L433A 受容体の発現は急速に上昇し、6 時間後に約 70%、24 時間後に 95% まで回復することが明らかとなった。次に、受容体の細胞表面への輸送を全反射照明蛍光顕微鏡で観察した結果、atropine 存在下で細胞表面に発現していた M1 L432A/L433A 受容体が、3 日間の atropine 除去により著しく減少すること、そこに atropine を添加すると、細胞表面への M1 L432A/L433A 受容体の発現が急速に上昇し、7 時間後には atropine 存在下より少し低い近似した顕微鏡像が得られるまで回復することが明らかとなった。本研究の結果と以前の結果 (Sawyer et al., 2010) から、M1 L432A/L433A 受容体は、atropine と結合することにより、小胞体から細胞膜に輸送され、細胞膜に発現することが強く示唆された。即ち、F(x)₆LL 中の LL は、M1 受容体のフォールディングおよび細胞膜への輸送に関与していること、F(x)₆LL 中の LL の変異により、M1 L432A/L433A 受容体はフォールディングが異常になるため、細胞膜に輸送されず、小胞体に蓄積すること、さらに、膜透過型アンタゴニスト atropine が、M1 L432A/L433A 受容体に結合して、薬理的シャペロンとして機能し、フォールディングを改善させ、小胞体

から細胞膜への輸送を促進すること、が示唆された。

今後は、M1 受容体の L432A/L433A 変異によるフォールディングおよび構造変化について解析したい。さらに、小胞体から細胞膜への輸送機構において、どのようなメカニズムで輸送されるかどうかの選別が行われるのかについて解析したい。これらの研究は、薬理的シャペロンとして有用な、新規リガンドの探索や開発、および、GPCR の遺伝子変異による疾患の薬理的シャペロンを用いた治療法開発に役立つと思われる。

【謝 辞】

蛍光顕微鏡を使わせていただいた Rainer K Reinscheid 博士 (カリフォルニア大学アーバイン校) に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- Ballesteros JA, Weinstein H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neuroscience* 25, 366-428.
- Duvernay MT, Dong C, Zhang X, Zhou F, Nichols CD, Wu G. (2009) Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)₆LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* 75(4), 751-761.
- Duvernay MT, Zhou F, Wu G. (2004) A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem.* 279(29), 30741-30750.
- Haga T. (2013) Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci.* 89(6), 226-256.
- Nakamura M, Yasuda D, Hirota N, Shimizu T. (2010) Specific ligands as pharmacological chaperones: The transport of misfolded G-protein coupled receptors to the cell surface. *IUBMB Life* 62(6), 453-459.
- Sawyer GW, Ehlert FJ, Shults CA. (2010) A conserved motif in the membrane proximal C-terminal tail of human muscarinic M₁ acetylcholine receptors affects plasma membrane expression. *J Pharmacol*

Exp Ther. 332(1), 76-86.

Suga H, Figueroa KW, Ehlert FJ. (2008) Use of acetylcholine mustard to study allosteric interactions at the M₂ muscarinic receptor. J Pharmacol Exp Ther. 327, 518-528.

Suga H, Haga T. (2007) Ligand screening system using fusion proteins of G protein-coupled receptors with G protein α subunits. Neurochem Int. 51, 140-164.

Thal DM, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder CC, Bures MG, Evans DA, Weis WI, Bachhawat P, Kobilka TS, Sexton PM, Kobilka BK, Christopoulos A. (2016) Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. Nature 531, 335-340.

Tao YX, Conn PM. (2014) Chaperoning G protein-coupled receptors: from cell biology to therapeutics. Endocr Rev. 35, 602-647.

(すが ひなこ 食安全マネジメント学科)

(フレデリック J. エラート カリフォルニア大学アーバイン校
医学部薬理学科)

(グレゴリー W. ソーヤー シェナンドー大学薬学部)