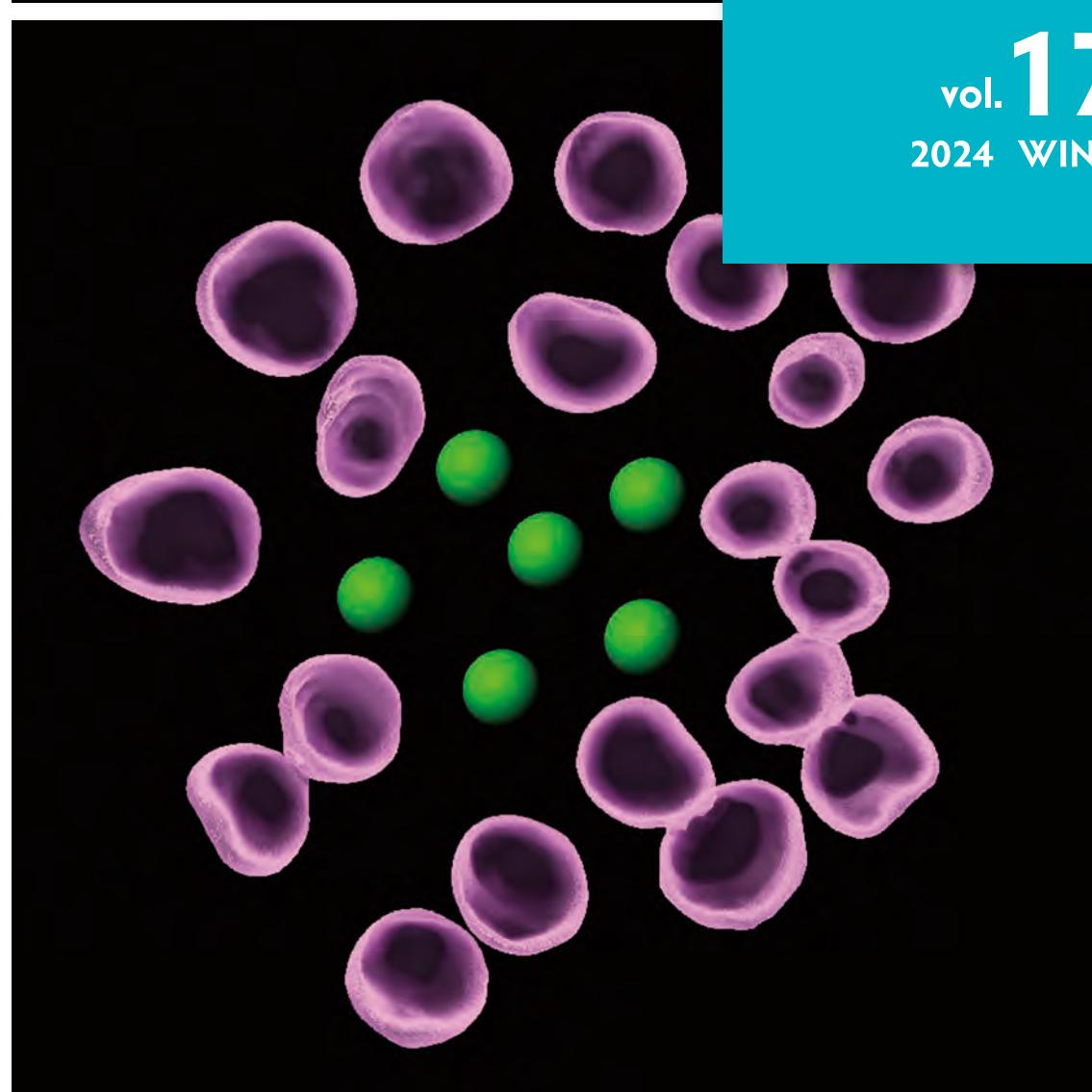


理化学研究所
生命機能科学研究センター



「生きている」仕組みをひも解く。

いきもん

IKIMON
TIME\$

vol. 17

2024 WINTER

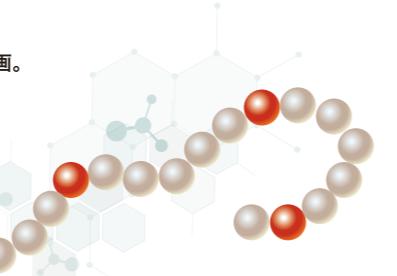
いきもんタイムズを
webで読む▶





ヤクシジが、毎回研究者にネホリハホリ聞いて回る連載企画。

いろいろ計れる 質量分析計



ハエで栄養について研究している小坂元さんからご紹介いただいたのは、質量分析のスペシャリストの益田さんです。遺伝子とか細胞とかはこのシリーズでよく出ていますが、質量分析は初めてです。さてどんな研究でしょうか?

タンパク質研究のはじめの一歩

薬師寺(薬) ▶ タンパク質の研究との出会いはいつ頃ですか?

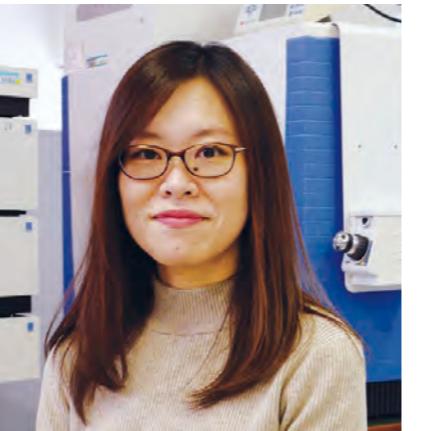
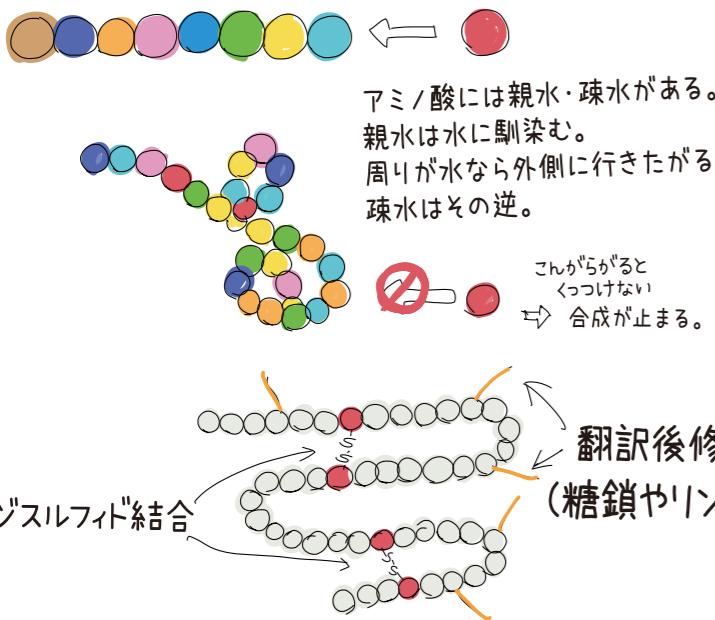
益田(益) ▶ 出身学部が広島大学の総合科学部というちょっとめずらしいところなんです。理系・文系の科目を半分ずつ履修できるという感じで、当時の学部長が「何かに特化した専門家を育てていくことはもちろん大事だけど、いろいろな専門家の橋渡しになるような人間も必要だ。」「いろいろな知識合いがいて、いろいろな方面にアンテナが張れるような、そういう人材を育成するのが大事だ。」というお話をされていた記憶があります。

薬 ▶ いわゆる「学際」みたいなことをする学部なんですね。

益 ▶ 生物系にはともと興味があって大学受験のタイミングでは薬学部に憧れがあったんですけど、広島大学を調べているうちにその総合科学部というシステムがちょっとおもしろいなと思ったんです。ギュッと何かに決めずに、ちょっと広げた状態で前に進みたいなって。

薬 ▶ 学部長先生の狙い通りじゃないですか。

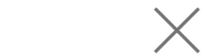
ペプチドの化学合成 =1コずつつなげて長くする



益田 恵子 さん

(まだ・けいこ) 理化学研究所 生命機能科学研究センター 無細胞タンパク質合成研究チーム 研究員

広島大学大学院総合科学研究院にて博士号(学術)を取得。その後理研に入所し、一細胞質量分析の技術開発に携わる。自称飽きっぽい性格だけれど研究職だけは飽きないらしい。瘾しげは美味しいごはんとお酒、あとチンチラ(ねずみの方、見る専)。元保護わんこと同居中。



薬師寺 秀樹

(やくしじ・ひでき) 理研OBで、現在は神戸を中心に活動する事業開拓人。分析化学、光学、バイオテクノロジー、ITなど幅広いバックグラウンドを持つ。理研をはじめとするアカデミアの技術・アイデアを事業にするため、アイデアを共有する場の開催から、資金調達、事業戦略立案など、さまざまな活動を行っている。

が回収できないと、実験が始まらない……

益 ▶ そうなんです。大腸菌に発現させても収量が少なく、通常の化学合成では全長を合成することが難しくて、受託合成会社に依頼を出そうとしてみたりもしました。

薬 ▶ 結構な長さと量ですから、それなりのお値段になりますね。

益 ▶ 見積もりは数百万円だったみたいです。でも一回りではなく継続的に合成する必要があったので外注は諦めて、代わりにマイクロウェーブを使ったタンパク質合成機が導入されました。合成中に凝集しちゃうものをマイクロウェーブを当てて伸ばしながら合成を進めて、なんとか必要な量を得ました。

薬 ▶ 最終的に目的の表現型は確認できたんですか?

益 ▶ はい。過剰に投与すると脂肪が蓄積しやすくなるということが確認されました。

薬 ▶ それはイヤなやつですね……。

質量分析の手法開発

薬 ▶ 質量分析に出会ったのはその頃ですか?

益 ▶ そうですね。ただ、当時は自分でやったわけではなくて、大学にあった共通機器室の質量分析計で技官さんにお願いしました。

本格的に質量分析に向き合い始めたのは理研に移ってきてからで、私を質量分析の道に引き入れてくれたのは升島努先生(故人)です。その縁もあって、今は質量分析と無細胞タンパク質合成をやっています。

薬 ▶ 質量分析は物質の同定に使われることが多いイメージなんですが、一方で定量にも使われますよね。

益 ▶ 私たちは、MS-QBiCという技術を持っていて、そのアップグレードを進めています。質量分析計で計測する前に、同じ配列のペプチドに安定同位体で標識した内部標準を使う方法です。たとえばN(窒素)の質量は普通は14ですが、15の同位体を使うと、質量が1ずれます。これを既知の量入れておくと、測定対象のペプチドの量がわかるんです。

薬 ▶ 要はモノサシを混ぜ込んでおくイメージですね。でも安定同位体使うと高そうですね。

益 ▶ その問題を解決しているのが、MS-QBiCです。ベースになっているのは、PURE systemという無細胞タンパク質合成系です。これだと非常に少ない量のタンパク質を合成することができます。モノサシのコストは安定同位体が占めるので、量が少ないとコストが下がるということです。

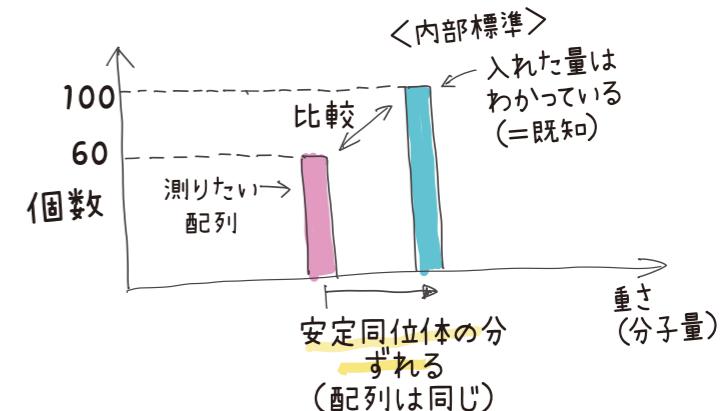
薬 ▶ 質量分析は一度にたくさんのペプチドを計れるから、モノサシもたくさんいるんじゃないですか?

益 ▶ そこも解決しています。MS-QBiCにはタグ配列というのがついているのですが、このタグ配列にバリエーションを持たせると、いろいろ混ぜて計測しても識別可能になります。スループットを上げることができます。やったので、今はその先をやっています。次の目標は、タンパク質の活性制御に重要なリン酸化などの翻訳後修飾を定量できるようにすることです。まだ開発途中なのですが、PURE systemに使われている酵素や遺伝暗号を改変することで翻訳後修飾入りのペプチドも合成できるようにしたいんです。

質量分析での定量の仕組み

例) グリシン = $C_2H_5NO_2$ → 分子量 75

通常は 14 → これを 15 の 安定同位体に置き換える
⇒ 分子量 76



薬 ▶ それで、今やっているのは質量分析と無細胞タンパク質合成、ってことになるわけですね。

いろいろなテーマに 関わることが楽しい

薬 ▶ 共同研究でタンパク質の同定や定量をすることも多いですか?

益 ▶ そうですね。いろんなテーマの研究に関われるのが楽しいですね。質量分析じゃないと取れないデータというのもたくさんあるので、今回、紹介してもらった小坂元さんも共同研究相手です。

薬 ▶ あ、そうなんですね。

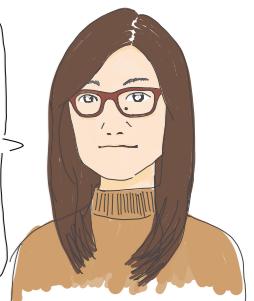
益 ▶ 私は質量分析を取り扱えますけど、結局は何が測りたいのか、というのが一番重要です。私一人では何も生まれないので、いろんな研究者と話して、「それだったら質量分析が役立つか」ということで測定する。結果が出たらもちろんハッピーですし、期待通りでなくともそれはそれで新しい発見がありました。何かテーマを絞つて掘り下げるという感じではないかもしれません、多種多様な研究のお手伝いができることが嬉しいし楽しいです。周りにはいろんな興味を持った研究者がたくさんいるので、そういう人たちと議論して、データを取って、結果に対する感想などのフィードバックをもらって……ってやってると毎回毎回が新鮮で勉強になります。

薬 ▶ 研究者にもいろんなタイプがいてもいいですよね。

益 ▶ 質量分析って感度もいいし、見られる情報がすごく多いです。ボタンを押せば結果が出てくるんでしょう? というふうに思われるのもあたりするんですけど、研究目的に合ったデータがとれるようになるまでの最適化の作業が、知識と経験が必要な仕事だと思います。サンプルによって意外と前処理方法や測定条件の検討が複雑だったり、得られたデータをどのように解析するかが重要だったり、奥が深いんですよ。そういうところが、やりがいでもあっておもしろいですね。

薬 ▶ 質量分析計は真空系なので、メンテナンスも大変ですね。

質量分析では色々なものが測れるのがすごいところ。案外、前処理やメンテナンスが大変なんですね。



編集後記

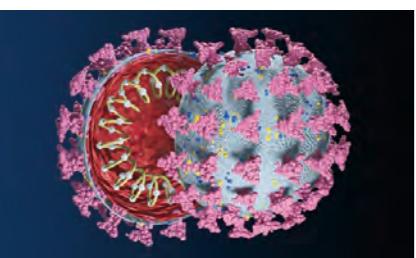
「質量分析が大好きだー」という感じが全開だったので、そうお伝えしたところ、そんなつもりはないそうです。質量分析計は英語ではMass Spectrometerというので、業界では「マス」と呼ばれることが多いです。実際のインタビューでも、益田さんは「マス」と表現していますが、わかりにくいので、あえて質量分析計と表記しました。真空系のターボポンプとか壊れると悲しい気持ちになるのを思い出した……。

01

SARS-CoV-2の転写開始の鍵となるRNA構造を同定

SARS-CoV-2やMERSを含むベータコロナウイルスのRNAゲノムの3'非翻訳領域は2つの異なる立体構造(ステムループ構造とシードノット構造)を形成し、構造が切り替わることで転写(RNAゲノムの複製)が始まるとする仮説が提唱されています。今回、大山貴子 研究員と石井佳音チーフリーダー(先端NMR開発・応用研究チーム)らは、これまで実験的に確認されていなかったシードノット構造が形成可能であることを示し、高磁場核磁気共鳴を用いてその構造を原子レベルで解析しました。ベータコロナウイルスに共通するシードノット構造は、「汎コロナウイルス薬剤」の開発につながる新たな創薬ターゲットとして期待できます。

Ohyama T, Osawa T, Sekine S, Ishii Y. *JACS Au* 4, 1323-1333 (2024)



02

抗てんかん薬が効く仕組みを解明

てんかんは人口の約1%が発症する神経疾患で、抗てんかん薬により発作を抑えることで日常生活が可能となっています。山形敦史 上級研究員と白水美香子チーフリーダー(タンパク質機能・構造研究チーム)らは、抗てんかん薬レバチラセタムとその標的であるシナプス小胞糖タンパク質2Aの複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡を用いて解析し、抗てんかん薬の作用機序を解明しました。この成果は、新たな抗てんかん薬の開発や、脳内シナプス密度を可視化するPETプローブの設計に大きく貢献すると期待されます。

Yamagata A, Ito K, Suzuki T, et al. *Nat Commun* 15, 3027 (2024)

03

アロステリック調節薬が構造平衡を変えて効く仕組み

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞外のシグナルを細胞内に伝達する重要な膜タンパク質で、新薬開発の主要な標的の分子となっています。近年、注目されているのが、GPCRの基質結合部位とは異なる部位に結合してその活性を増強する「アロステリック調節薬」です。嶋田一夫チーフリーダー、今井駿輔 上級研究員(生体分子動的構造研究チーム)、白水美香子チーフリーダー(タンパク質機能・構造研究チーム)らは、GPCRの一種であるμオピオイド受容体が、アロステリック調節薬により活性化されるメカニズムを、超高磁場核磁気共鳴(NMR)装置を用いた溶液NMR法とクライオ電子顕微鏡法を使って解明しました。今後、GPCRを標的とした、既存薬より高い薬効を有する医薬品の開発に貢献する期待できます。

Kaneko S, Imai S, Uchikubo-Kamo T, et al. *Nat Commun* 15, 3544 (2024)

04

RNAの高次構造をほどく分子機構

RNAが折り畳まれて作られる高次構造は、翻訳速度やRNA結合タンパク質との相互作用、RNAの細胞内局在などを制御しています。この高次構造の形成と解消を担うRNAヘリカーゼの一種DDX3Xがうまく機能しないと、がんの一種である髄芽腫などの疾患につながることが知られています。嶋田一夫チーフリーダーと外山侑樹 研究員(生体分子動的構造研究チーム)らは、溶液核磁気共鳴光法を用いた実験で、DDX3Xが特に1本鎖RNAに優先的に結合して安定化し、この結合を通じて複雑なRNAの高次構造をほどくメカニズムを明らかにしました。この発見は、髄芽腫などの疾患メカニズムの理解や新しい治療法の開発に貢献すると期待されています。

Toyama Y, Shimada I. *Nat Commun* 15, 3303 (2024)

05

手足の再生能力を取り戻す発生再起動制御因子を見つける

カエルは、幼生期には四肢(手や足)を再生できる高い再生能力を持つ一方、成体になるとその能力が低下します。この再生能力の経時的な変化の仕組みは、これまで解明されていませんでした。森下喜弘チーフリーダー、川住愛子 学振特別研究員RPD、李尚尚 技師(発生幾何研究チーム)らは、比較トランスクリプトーム解析によって四肢の正常発生には関与しない *hoxc12* および *hoxc13* 遺伝子が四肢再生時に特異的に発現することを発見しました。さらに、これらの遺伝子の発現を抑制すると四肢の再生が阻害され、過剰発現させると成体の四肢再生能力も部分的に回復できることを示しました。この成果は、ヒトを含む哺乳類の再生能力を向上させる手法の探索につながると期待できます。

Kawasumi-Kita A, Lee SW, Ohtsuka D, et al. *Nat Commun* 15, 3340 (2024)

06

タンパク質凝集のコード解読

生物の細胞内には、さまざまなタンパク質でできた小さな構造(細胞小器官)が存在します。中には、ミトコンドリアのように膜で囲まれたものだけでなく、膜を持たないタンパク質凝集体も多く見られます。これらがどのように形成されているのかよく分かっていませんでした。佐久間知佐子 上級研究員(栄養応答研究チーム)らは、哺乳類の血液が凝固する際に產生されるフィブリノペプチドAが、吸血と共にネッタシマカの体内で蓄積し、吸血を停止させるシグナルとして働くことを発見しました。この成果は、蚊の吸血行動の仕組みの理解を深め、感染症対策法の開発に役立つと期待されます。

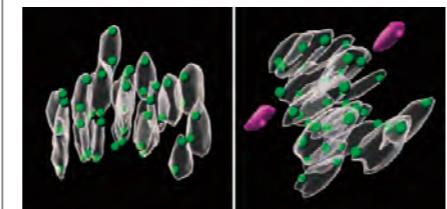
Sakuma C, Iwamoto T, Masuda K, et al. *Cell Rep* 43, 114354 (2024)

07

卵子の老化で小さな染色体が正しく分配されない原因

卵子が正常に機能するためには、減数分裂という過程で染色体が正しく分配されることが重要です。しかし、特に小さな染色体は分配に異常が起こりやすく、これが流产やダウン症などの先天性疾患の原因になることがあります。竹之内修 基礎科学特別研究員、岸原陽悟 基礎科学特別研究員、北島智也チーフリーダー(染色体分配研究チーム)らは、生きた細胞内で個々の染色体を見分ける技術を開発し、その動態を追跡することに成功しました。マウス卵母細胞の染色体の動きを解析した結果、老化した卵母細胞では小さな染色体が紡錘体の内側に配置されるため、分配異常を起こしやすいことを発見しました。

Takenouchi O, Sakakibara Y, Kitajima TS. *Science* 385, eadn5529 (2024)



08

マーカー遺伝子を用いた細菌叢解析法のおよそ50年の歴史を俯瞰

～新しい計測技術による変革期の到来～複雑な生態系を理解するためには、そこに存在する生物種やその量を正確に把握することが重要ですが、細菌のように微小な生物の場合は「DNAを数える」手法が有効です。城口克之チーフリーダー(細胞システム動態予測研究チーム)らは、細菌が構成する生態系「細菌叢」をDNAで解析するための技術開発の歴史を俯瞰し、研究チームが2022年に開発した「BarBIQ法」などの新しい計測技術による精密な細菌叢解析が、今後の生命科学研究に与えるインパクトを論じています。

Jin J, Liu X, and Shiroguchi, K. *iMetaOmics* e9 (2024)

09

蚊は腹八分目を知る

蚊は宿主の血液中のシグナルを受け取ることで吸血を継続し、通常、満腹になる前に適当なタイミングで吸血を止めますが、その停止のメカニズムはよく分かっていませんでした。佐久間知佐子 上級研究員(栄養応答研究チーム)らは、哺乳類の血液が凝固する際に产生されるフィブリノペプチドAが、吸血と共にネッタシマカの体内で蓄積し、吸血を停止させるシグナルとして働くことを発見しました。この成果は、蚊の吸血行動の仕組みの理解を深め、感染症対策法の開発に役立つと期待されます。

Sakuma C, Iwamoto T, Masuda K, et al. *Cell Rep* 43, 114354 (2024)



Peek-a-LABoo

2023年4月にBDRに合流した構成的細胞生物学研究チームのチームリーダー、宮崎牧人 博士にご自身の研究やチームについて聞きました。

構成的細胞生物学研究チーム



Q 理研でチームを持つ前は、どこでどのような研究をしていましたか?

A 修士課程までは分子モーター1分子の動きを、当時最先端の光学顕微鏡を駆使して見る・操作する研究をしていました。分子モーターの動作原理を理解するにはもっと物理を勉強しなきゃと思い、博士課程では非平衡統計力学に関連した理論的研究で学位を取得しました。この頃進路に悩んでいて、昆虫少年だった頃の初心に立ち返って、もう少し生き物っぽいものを研究したいと思い、ポストドクから今の研究につながる再構成実験を始めました。

Q 理研ではどのような研究を目指していますか?

A 生物は分子から個体に至るまで複雑な階層構造をっていますが、その中でも物質と生命の境界である分子と細胞の階層をつなぐ研究を目指しています。レゴブロックや自動車、折り紙、洋服など、自分の手で壊して組み立て直すことで、仕組みが手に取るようにわかった経験をお持ちの方は多いのではないでしょうか?同じことを細胞でもやってやろうという挑戦です。無謀なことに思えますが、分子から生命が成り立つ仕組みに迫ると信じています。

Q チームのスゴイところを教えて下さい。

A 精製したタンパク質を混ぜ合わせて細胞サイズのリポソームに封入する技術、特にアクチン細胞骨格を再構成する技術が一番の強みだと思います。アフリカツメガエルの卵から細胞質を取り出す技術もチームの強みです。最近では光遺伝学の技術を再構成系で使えるようにしました。あとは装置とかソフトウェアとか、自作できるものは、なるべく自作しようと心掛けました。時間はかかりますが自作した方が理解が深まるし、辛いところに手が届くカスタマイズ仕様になるので、オーナーの実験技術が生まれると信じています。

Q 趣味を教えて下さい。

A いろいろありますが、研究と関連しそうなことをいくつか。料理は食べるのもつくるのも好きです。最初に指導を受けた先生から「料理が上手な人は実験も上手い」とそそのかされ(?)、それ以来、余裕があればキッチンに立つようになっています。それからプラタモリ的な街歩き。注意を向けなければ見過ごしてしまう日常からおもしろそうなことを掘り出し、ふとしたきっかけでそれらが一気に繋がり、街の成り立ちが見えてくるのは快感です。特に期待通りの結果が出ず研究が停滞しているときに大切な姿勢、役立つスキルだと思います。あとは絵を描くこと。旅先にスケッチブックと鉛筆、水彩絵の具を持って行って風景画を描くのが好きです。複雑な建築や草木などからエッセンスを抽出してシンプルな線や色に落とし込む作業、これも研究に通ずるところがあると思います。

Q 今後どんな方にチームに加わって欲しいですか?

A 一言で言うならば、研究を楽しめる人。日々の研究活動を楽しめないと、今日も上手くいかなかった、ダメだ、、、となってしまいがちです。そうではなく、没データの中からおもしろなことを拾い上げ、既成概念にとらわれない仮説を考え、まさにプラタモリ的な推理を楽しめれば、思い通りの結果が出てなくても日々の研究は楽しくなります。

高校生のわたしたちが
取材しました。



Vol.17

研究者に ズームイン Q.



老化分子生物学研究チーム
上級研究員
宇野 雅晴

(うの・まさはる) 兵庫県姫路市出身。京都大学院から理研に来て、ずっと線虫を使った老化の研究に没頭。趣味は読書。師匠の博識に負けじと読み始め、最近は、小説、哲学書、科学書など分野の異なる書籍を同時に5冊程度読む。

私たちは探究活動や自分の進路選択に向けて、自分の興味関心を深める活動を行っています。忙しい高校生活を送るなかで「いつまでも若くいたい」「年をとりたくない」と感じ、「生物の老化や若返り、寿命について聞きたい!」と思いました。そこで「老化」の研究をしている宇野さんに、スキンケアやアンチエイジングといったどこかで耳にしたことに関する素朴な疑問から高校生へのメッセージまで、いろいろ聞きました。

老化の本質に迫る ヒトは若返ることができるのか?

Q 「若返る」と「寿命が延びる」は同じですか?

A そもそも「若返る」ってどういうことだと思いますか?多くの人が「若返る」って簡単に言うんですけど、それがどういうことなのかを考えると結構ぼんやりしているんか?臓器の機能が落ちたのを元に戻せたら元気な期間が延びるという意味で考えると、若返ることで寿命が延びると思います。でも脳の機能が衰え、人の名前を忘れがちになった人が、若返ってすぐに思い出せるようになったとしても、それはおそらく寿命にそこまで関係ないですね。だから「何を」若返らせたいかによってその質問の答えは変わるんじゃないかなと思います。

Q アンチエイジングのスキンケアは根本的に肌が若返るのですか?

A 僕の奥さんもスキンケアにとても気を遣っているんですけど、アンチエイジングのクリームを塗ったときに、どこまで細胞に取り込まれていると思いますか?皮ふは他の部位に比べて、一番いろいろなものに接しているところなので、とてもバリアが強そうに思えませんか?しかも皮ふの表層の細胞はほとんど死んでいるんです。だからしっかりと奥の方に入っていかない限り本当の意味で「若返ってほしい細胞」ってなくて、そこまで入ってるかどうかは、研究者としては少し疑問です。

Q 老化の一番の原因は何ですか?

A 世間の人たちが言う「老化」は、時間が経つと老いていくということだと思います。でも、筋肉は年をとってもいいということを一番言いたいですね。教科書はもちらん知識の塊ですが、もしかすると正しくないこともあるかもしれません。一方、目はなんとなく年をとることが悪くなることの原因であるように感じます。そう考えると「老化の一番の原因」というとなかなか

(インタビューを終えて)

「老化」に関して、私たちはこれまで本当にぼんやりとか分かっていなかったのだと改めて実感することができました。寿命を延ばすことや不老不死のお話、今の私たちへのアドバイスも聞くことができ、寿命の必要性や今後の取り組み方を考えるきっかけになりました。これからは多くのことに疑問を持ち、いろんなことに挑戦していくと思います。

取材・執筆 熊見明大、菅原賢人、田畠七海、井上正裕、緒方歩夢、小西穂乃香、中村大雅、越水駿人、小松原楓華、永田怜華、山田真仁一、渡邊大翔

* 脚書はインタビュー当時



兵庫県立
神戸甲北高等学校
49回生
のみなさん

もっと知って!

BDR

セミナーやシンポジウム、イベントなどのアウトリーチ活動を通じて、研究内容やその成果を伝えています。

活動報告 2024年7月～2024年11月



2024年度の一般公開が行われました

神戸キャンパスでは11月2日(土)に、横浜キャンパスでは11月16日(土)に、それぞれ一般公開を開催しました。神戸キャンパスには2591人、横浜キャンパスには2344人の来場がありました。研究室を公開して顕微鏡で細胞を観察したり、研究で大活躍する生き物や大型機械について解説を聞いたり、研究者と来場者がたくさんコミュニケーションしていました。



夏休みに、大学生や高校生向けのイベントを開催しました

理研BDRは、生命科学研究を志す次世代の育成のために、大学生向けのインターンシップと、高校生向けの1日講座を毎年開催しています。今年は7月の末から8月にかけて高校生のための生命科学体験講座を、また8月19日から5日間大学生のためのBDRサマースクールを開催しました。



第6回中高生のためのオンライン特別授業を開催しました

11月2日に第6回中高生のためのオンライン特別授業「今、神戸でアツい科学」を開催しました。今回は理化学研究所一般公開in神戸の会場内に授業を聞ける教室を設置。神戸キャンパスで研究している4名の研究者がお話をしました。現地会場では終了後に参加者との懇談もありました。

今後の予定

RIKEN BDR
Symposium 2025
"Towards Redesigning
Lifecycles"

2025年3月3日(月)～5日(水)
理研BDR神戸キャンパス
ライフサイクルの再構築を目標とし、その基盤となる技術やアイデアを有する第一線の研究者が分野を超えて神戸に集結します。国内外からの参加者による分野を超えた議論・交流が行われます。



2025 RIKEN BDR-CuSTOM Joint
Organoid Symposium "Integrated
organoid science: Stem cells,
engineering, Medicine"

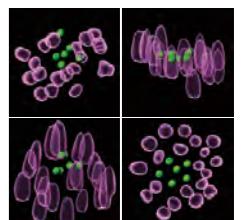
2025年3月5日(水)～7日(金)
理研BDR神戸キャンパス
6度目となるオルガノイドと幹細胞の研究にフォーカスを当てた合同国際シンポジウム。世界中から気鋭のオルガノイド研究者と若手研究者が一同に会し、議論します。



BDRについて、もっと詳しい情報は



表紙はこれ!



謎のストーンサークル?
実は…

これは、細胞内の染色体(紫)と「人工動原体ビーズ(緑)」の振る舞いを捉えた再構築画像。分裂中期に、同じ平面上に整列しています。

画像提供: 染色体分配研究チーム

いきもんタイムズ vol.17
2024 WINTER

発行日/2024年12月1日
発行者/理化学研究所
生命機能科学研究センター(RIKEN BDR)
神戸市中央区港島南町2-2-3
E-mail: bdr-riken@m1.riken.jp
<https://www.bdr.riken.jp/>

記事中の表記は原則発表当時のものです



このニュースレターについての簡単なアンケートにご協力ください。

ご協力いただいた方の中から毎月抽選で3名にオリジナルグッズをお送りします。

