

令和元年6月3日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05237

研究課題名(和文) ヒメミカヅキモの生殖様式進化の解明に向けたフィールド調査と実験的検証

研究課題名(英文) Field survey and experimental verification to understand the evolution of mode of sexual reproduction in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex

研究代表者

関本 弘之 (SEKIMOTO, HIROYUKI)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：20281652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメミカヅキモは、遺伝的に決定された性をもつ複数のヘテロタリック株交配群と、それらとごく近縁で自殖による接合をおこなうホモタリック株を含む一形態種で、さらに有性生殖過程を分子生物学的に解析する基盤が整備されているが、現存株のほとんどは継代培養の間に接合能が低下しており、研究に使用できなかった。本研究では、海外数カ所の拠点を調査し、2種の交配群の獲得に成功した。さらに生殖様式と系統関係を調べつつ、生殖様式の切換にCpMinus1遺伝子が関与することを逆遺伝学的手法により示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究対象であるヒメミカヅキモは、陸上植物の姉妹群であるホシミドロ目に属する単細胞藻類である。これまでに解析に利用できる系統株が非常に限定されていたが、本研究の結果、解析可能な系統株の確立、系統関係の整理がなされ、さらに生殖様式の切換に関わる候補遺伝子の同定がなされた。自殖(ホモ)、他殖(ヘテロ)の進化は、陸上植物でも頻繁に見られており、特に陸上植物の進化を考える上で非常に有益な情報となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (C. p-s-l. complex) is a unicellular alga, and is composed of several reproductively isolated mating groups of heterothallic strains and closely related homothallic strains. We carried out field studies in foreign countries and in Japan, to isolate reproductively isolated C. p-s-l. complex. Finally, we established several clonal cultures of new sexually isolated mating groups and the closely related homothallic strains from these fields. We found a gene for mating-type determination in the heterothallic strains and named CpMinus1. In addition, the function of the orthologous gene in the homothallic strain was demonstrated by reverse genetic techniques. We suggest that the CpMinus1 could be a molecular switch between heterothallism and homothallism.

研究分野：藻類生殖生理学

キーワード：ミカヅキモ 海外調査 生殖様式

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究で着目したミカツキモ属は、100種類を超える形態学的種から構成され、さらにある種のミカツキモでは、雌雄にあたる2つの性(+型、-型)を持つヘテロタリックなもの(他家交配に相当、以下、ヘテロ株)同一クローン内で接合子を生じるホモタリックなもの(自家交配に相当、以下、ホモ株)接合はせずに単為胞子を形成するものなど多様な生殖様式を示すもので構成される。さらにヘテロ株は複数の交配群からなり、交配群を超えた接合反応が全く起こらない完全に生殖隔離した交配群や、低い頻度で接合子を形成できる不完全に生殖隔離した交配群など、多様な生物学的種を含む。ヒメミカツキモ(*C. psl. complex*)は、このような複合的な交配群を包含する一形態種であり、これまで我々は、ヘテロ株の1交配群(IE)に絞り、その有性生殖機構を、生理学、生化学、分子生物学的手法により多面的に解析してきた。これまでに、接合成立に不可欠な二種の性フェロモン(PR-IP, PR-IP Inducer)を単離し、それらをコードする遺伝子の配列を明らかにした(Sekimoto 2000)。また、cDNA マイクロアレイ解析により、有性生殖過程で機能する88種の遺伝子群の単離・解析などを進め(Sekimoto et al. 2006)、さらに、遺伝子導入系を確立して、遺伝子発現の影響を直接モニター可能とした(Abe et al. 2011)。また、ゲノム解読およびRNAseq解析を開始していた。

これらの先行研究を通して、ヒメミカツキモは、分子レベルで配偶子間の相互情報交換を解析し、生物学的種への分化機構を検討できる、唯一の単細胞生物と位置づけられるようになった。しかしながら、現在系統保存されている株の多くは、40-50年前に単離されたものであり、継代培養の間に交配能が低下したものが非常に多く(凍結保存法が確立されていない)以後の解析には使用できない状況にあった。そこで、この数年間かけて、国内外でヒメミカツキモの分布調査、単離を進め、安定した系統株確立を進めてきた。接合試験による交配群確定、性フェロモン活性の差異などを解析し、さらに分子系統解析による相互の関係性の検証も進めてきた結果、確立された3種の交配群(IIA, IIB, IE)では、生殖隔離度と性フェロモンの活性、遺伝子変異度に有意な相関が見出され、性フェロモン遺伝子の変異が交配能力の第一義的な決め手であることが強く示唆された(Tsuchikane et al. 2008)。

さらに、フィールド調査を進める過程で、いくつかのホモ株を得ていたが(Tsuchikane et al. 2010)、その中にはヘテロ株交配群IIA/IIB、またはIICのいずれかと高い近縁性を示すものが含まれ、近縁な関係にあるヘテロ株とホモ株の間では、部分的な生殖反応を示す場合も見られたことから(Tsuchikane et al. 2012)ヘテロ、ホモといった生殖様式の進化は、比較的短期間に、極少数の遺伝子変異の影響で、複数回独立に起こったことが示唆された。

最近になり、ヘテロ株の-型細胞ゲノムのみ存在する転写因子遺伝子 *CpMinus1* の発見に成功した。ヘテロ株+型細胞で、この遺伝子を強制発現した場合、形質転換株が-型細胞の特徴を示すようになり、さらに一部の株はホモ株のように自家接合能力をも示すようになったことから、性決定のみならず生殖様式決定にも関わることが示唆された。さらに、1系統のホモ株を用いた予備的なRNA-seq解析により、*CpMinus1* を含む生殖関連遺伝子群の存在とそれらの有性生殖時特異的な発現も示されていた。

今後、さらに生殖様式の進化の実態を正確に把握するためには、安定して接合反応を示す交配群を新たに出来るだけ多く確立しつつ、さらにそれぞれの交配群と近縁なホモ株を確実に確保することが求められる。しかし、これまでの調査の結果、日本国内は、海外に比べて湿地が減少し、里山環境に生息する藻類相が急速に失われつつあり、さらには農薬使用により水田中の藻類多様性も明らかに激減していることが明白となった。予備的な調査で赴いたネパールなどと比べると、その差は顕著である。しかしその一方で、現在、世界各国で系統保存されている安定した株の数は、あまりにも少ないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、1)過去にヒメミカツキモの存在報告があるものの系統株確立に至っておらず、さらに地理的に遺伝子交流が制限される海外数カ所の拠点において、ヒメミカツキモの分布調査と採集を進め、2)地域を構成する集団の生殖様式を調べつつ、3)進化に中立な塩基配列情報を用いて株間の系統関係を把握して、多様なヘテロ株交配群および近縁なホモ株をセットとして系統保存株として確立する。4)各株のRNA-seq情報、概要ゲノム情報を取得し、生殖関連遺伝子を選出し、各株の遺伝学的基盤を明確にする。各クレードを構成するヘテロ株、ホモ株の関係から、ホモ化、またはヘテロ化に共通するパターンを探ることを試みる。

5)正の選択圧を受けている生殖関連遺伝子が見いだされた場合、ヘテロ型、またはホモ型の原因遺伝子を、他方に形質転換して強制発現させた組換え型ヒメミカツキモの作出を行い、生殖様式への影響を検証する。6)特定の候補が得られない場合、タンパク質の構造では無く、その発現制御に違いがあると考えられる。有力候補である *CpMinus1* 遺伝子を中心に、各株において有性生殖時にどのような発現制御を受けるのかを明らかにする。最終的には、7)ヘテロ株のホモ株化、またはホモ株のヘテロ株化を実験室内で再現することで、生殖様式進化の実態解明を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

本研究では、過去にヒメミカツキモの存在報告があるものの系統株確立に至っていない海外数カ所の拠点において、ヒメミカツキモの分布調査と採集を進めた。海外調査にあたり、生物

多様性条約(CBD)に留意し、しかるべき許可を取得した後、現地カウンターパートと共に調査に臨んだ。サンプルは、フィールドでは主にポータブル顕微鏡を用いて観察し、可能であれば、海外共同研究者の研究施設にて、予備的な同定と単藻分離を行うこととした。加えて、接合子を得るための土壌サンプル採集も行った。得られたクローン株からゲノム DNA を抽出し、進化に中立な塩基配列情報を用いた詳細な系統解析を行うとともに、ヘテロタリック株については、生殖隔離状況を検証した。さらに、ヘテロ、ホモからなる複数のクレードからそれぞれ株を選択し、各株の RNA-seq 解析をもとに生殖関連遺伝子情報を取得した。特に生殖様式進化に関わると思われる *CpMinus1* オルソログ遺伝子に注目し、ホモ株において発現を変動させた形質転換体を作成し、ホモ株のヘテロ株化を実験室内で再現することで、生殖様式進化の実態解明を目指した。

#### 4. 研究成果

##### (1) フィールド調査全般

まず、以前の調査でヒメミカツキモの存在が確認されていたニュージーランド北島での調査を実施した。ミカツキモ集団の存在は数カ所で確認され、一番の目的となるヒメミカツキモについても、非常に限定的な数ながら取得に成功した。確立された系統株は、いずれもヘテロタリック株と考えられ、クローン内での接合子形成は起こさなかった。しかし、系統株間で掛け合わせを試みても、接合子形成を示さなかった。

さらに、ネパールおよびタイに出向き、サンプリング調査を行った。その結果、ヒメミカツキモと思われるいくつかの株の取得に成功したものの、18S rDNA の group I intron 領域を用いた系統解析の結果では、既存のヒメミカツキモ交配群の外側にクレードを形成するものが多く、形態観察と必ずしも一致しないという結果を得た。研究期間内に、再度のネパール調査を行い、ヒメミカツキモと思われるいくつかの株の取得に最終的に成功し、18 S DNA の group I intron 領域を用いた系統解析、および既存の交配群との接合試験を進めた結果、新規交配群 H を構成するヘテロタリック株として確立することに成功した。

さらに、国内フィールドから、これまで系統株が失われていた交配群 IIC の単離に成功した。交配群 IIC については、近縁なホモタリック株がすでに単離されており、生殖様式進化を解析する上で、非常に有益なセットとなった。

これらの調査を通して、少なくとも3つの交配群 ( IIA, IIB, IIC ) について、接合能を持つ系統株が揃い、それらと近縁なホモタリック株も揃うこととなった。それらに加えて、生殖能力を持つ3つの交配群 ( IE, G, H ) が揃い、生殖様式進化と種分化を考えるための材料を揃えることに成功したと言える。

##### (2) ヘテロタリック株における生殖隔離の生理学的解析

生殖隔離関係にある交配群 IE と G の生理学的解析を進めたところ、IE の PR-IP Inducer が G に全く作用しないことが、生殖隔離の主な原因であることが明らかになった。また、各交配群どうして接合誘起した場合と、両交配群の + 型と - 型の 4 者を同所で混合した場合を比較したところ、4 者混合では、G の接合子形成が、IE の存在により一方的に影響を受けるといふ、生殖干渉と思われる現象が見出された。その機構として、IE からの PR-IP が G 自身による PR-IP の作用に加えて過剰に作用したことがその原因であると考察された (Tsuchikane et al. 2018)。

生殖隔離関係にある交配群 IIA と IIB の生理学的解析も進めた。交配群 IIA の + 型細胞と交配群 IIB の - 型細胞はハイブリッドな接合子を形成するが、IIA の - 型細胞 と IIB の + 型細胞は接合反応を示さないという、不完全かつ非対称な生殖隔離が見られる。各交配群どうして接合誘起した場合と、両交配群の + 型と - 型の 4 者を同所で混合した場合を比較したところ、IIA + 型細胞 と IIB - 型細胞のみの混合に比べ、4 者混合ではハイブリッド接合子が減少し、交配群 IIA と IIB が混在する場合でも、同じ交配群と選択的に接合する生殖隔離機構の存在が示唆された。この機構の詳細を解析するため、タイムラプス撮影を行い、接合過程を連続観察した。4 者混合でハイブリッド接合子形成が低下する理由として、交配群 IIA と IIB の間で接合子形成のタイミングが異なっており、IIA の接合反応があらかた終了した後に、IIB の接合子が形成されるために、IIA とのハイブリッド接合がほとんど行われなことが考えられた。一方で、両者間での生殖干渉は観察されなかった。

##### (3) ゲノム解読

ヘテロタリック株の染色体における性染色体様領域を絞り込み、近縁なホモタリック株の染色体領域と比較するために、既存ヘテロタリック株 14 系統、ホモタリック株 7 系統について、Illumina による予備的なゲノム解読を進めた。K-mer 頻度解析を進めたところ、系統株間でのゲノムサイズが 0.35~1.2 Gbp と大きく異なっていることが明らかとなった。また、頻度のピークが 2 つ以上存在する、もしくはあきらかに肩があるものが多く、これらでは染色体レベルでの重複が起こっていることが示唆された。これらの結果から、ヒメミカツキモという種は、すでに染色体レベルで大きなちがいを示す多様な集団となっていることが明らかになった。その中で、ゲノムサイズが比較的小さく、重複のカーブがほとんど見られない、交配群 IIB に近縁なホモタリック株 (yama58 株) については、PacBio シークエンサーでの解析データを取得した。並行して進めてきたヘテロタリック株 (交配群 IE) のゲノムアセンブリは、なかなか満足のい

くつながりを示さず、*CpMinus1*を含む contig も 140 kb 程度と非常に短い。また、想定されるプラス型特異的な性染色体様領域は、未だに特定できておらず、ホモタリック株のゲノムと比較することは行うことが出来なかった。

#### (4) ヘテロタリック株における性決定遺伝子 *CpMinus1* を中心とした生殖様式進化の解析

交配群 IE に属するヘテロタリック株からマイナス型ゲノム特異的な遺伝子として *CpMinus1* が発見され、異所的にプラス型細胞で発現させる形質転換体の解析から、性決定遺伝子として機能することが示唆されていた。また、遺伝子の発現レベルによっては、ホモタリズムのような表現型を示すことから、生殖様式の切換に関わる可能性も示唆されていた。ホモタリック株 (naga37s-1) から得られたこの遺伝子に相同な *CpMinus1N* 遺伝子を、naga37s-1 株に対して、アンチセンス方向に発現させる形質転換体を作成したところ、ホモタリズムによる接合が抑制され、近縁なヘテロタリック株のプラス型細胞との接合が促進されるという表現型が見られたことから、*CpMinus1N* が交配様式に関わることを示された。しかし、*CpMinus1N* 遺伝子の発現抑制によって、細胞がマイナス化するという結果は、ヘテロタリック株での遺伝子機能とは反対のものであった。一方で、形質転換体の中にはホモタリズムによる接合を保ったままの株があったことから、遺伝子抑制株における発現抑制は不完全である可能性が示唆された。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いてホモタリック株の *CpMinus1N* 遺伝子の破壊が試みられたが、ターゲット部位を複数箇所試してみても変異の入った株は作出できなかった。

さらに、恒常的な発現が期待される *Elongation factor 3 (EF-3)* をコードする遺伝子のプロモーター領域を用いて、*CpMinus1N* 遺伝子の過剰発現株の作出が試みられた。得られた遺伝子導入株は、姉妹接合子形成が顕著に低下し、*CpMinus1* 遺伝子をもつ近縁なヘテロタリック株の-型との混合でより有性生殖反応が上昇したことから、*CpMinus1N* 遺伝子の発現により、naga37s-1 株は、ヘテロタリック株の+型に近い性表現を示すようになったと考察された。

以上の結果より、*CpMinus1* 遺伝子はヘテロタリック株の性表現を決定するのみならず、ヘテロタリズム、ホモタリズムの生殖様式の切換に関与することが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 11 件)

Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. (2019) The genus *Closterium*, a new model organism to study sexual reproduction in streptophytes, *New Phytol.* 221(1): 99-104, doi: 10.1111/nph.15334.

Higo, A., Kawashima, T., Borg, M., Zhao, M., López-Vidriero, I., Sakayama, H., Montgomery, S. A., Sekimoto, H., Hackenberg, D., Shimamura, M., Nishiyama, T., Sakakibara, K., Tomita, Y., Togawa, T., Kunimoto, K., Osakabe, A., Suzuki, Y., Yamato, K. T., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., Franco-Zorrilla, J. M., Twell, D., Berger, F., Araki, T. (2018) Transcription factor DUO1 generated by neo-functionalization is associated with evolution of sperm differentiation in plants. *Nat. Commun.* 9(1) 5283. DOI: 10.1038/s41467-018-07728-3.

Tsuchikane, Y., Kobayashi, H., Kato, M., Watanabe, J., Wu, J.-T., Sekimoto, H. (2018) Identification of a new mating group and reproductive isolation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex., *J. Plant Res.* 131(5): 735-746, doi: 10.1007/s10265-018-1043-8.

Sekimoto, H. (2017) Sexual reproduction and sex determination in green algae, *Journal of Plant Research* 130: 423-431. doi: 10.1007/s10265-017-0908-6.

Kanda, N., Ichikawa, M., Ono, A., Toyoda, A., Fujiyama, A., Abe, J., Tsuchikane, Y., Nishiyama, T., Sekimoto, H. (2017) CRISPR/Cas9-based knockouts reveal that CpRLP1 is a negative regulator of the sex pheromone PR-IP in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Sci. Rep.* 7: 17873. 10.1038/s41598-017-18251-8.

Abe, J., Hori, S., Sato, M., Sekimoto, H. (2016) Concanavalin A disrupts the release of fibrous material necessary for zygote formation of a unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Frontiers in Plant Science* 7:1040. 10.3389/fpls.2016.01040.

Hirano, N., Marukawa, Y., Abe, J., Hashiba, S., Ichikawa, M., Tanabe, Y., Ito, M., Nishii, I., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. (2015) A receptor-like kinase, related with cell wall sensor of higher plants, is required for sexual reproduction in the unicellular charophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* 56: 1456-1462. 10.1093/pcp/pcv065.

DeLaux, P.-M., Radhakrishnan, G.V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J.D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C.J., Sederoff, H.W., Stevenson, D.W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M.R., Dunand, C., Morris, R.J., Roux, C., Wong, G.K.-S., Oldroyd, G.E.D., Ané, J.-M. (2015) Algal ancestor

of land plants was pre-adapted for symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112: 13390-13395. 10.1073/pnas.1515426112.

〔学会発表〕(計 44 件)

小林弘佳、川口也和子、Mangal Man Shakya、土松隆志、関本弘之、土金勇樹「ネパール産ミカヅキモ属の多様性と新規交配群 H の発見」日本植物分類学会 18 回大会 2019 年 3 月 7 日

土金勇樹、小林弘佳、吉田睦未、関本弘之「ヒメミカヅキモの性フェロモン PR-IP Inducer による生殖隔離障壁」日本植物学会第 82 回大会 2018 年 9 月 14 日

Sekimoto, H. “CRISPR/Cas9-based knockouts reveal the action mechanism of the sex pheromone PR-IP in unicellular zygnematophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” EMBO Workshop -New shores in land plant evolution, Lisbon, Portugal, June 21, 2018.

小林弘佳・関本弘之・土金勇樹「ヒメミカヅキモの 失われた交配群とその再発見」日本植物分類学会第 17 回大会 2018 年 3 月 9 日

Sekimoto, H. “New insights into the sexual reproduction in unicellular zygnematophycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” The 65<sup>th</sup> NIBB Conference Marchantia Workshop 2017 “Renaissance of *Marchantia polymorpha* - the genome and beyond”, Okazaki, Aichi, December 17, 2017.

土金 勇樹、土松 隆志、Shakya Mangal Man、関本 弘之「性特異的遺伝子から明らかにするミカヅキモの進化」日本植物学会第 81 回大会 2017 年 9 月 10 日

Kobayashi, H., Kato, M., Sekimoto, H., Tsuchikane, Y. “Reproductive isolation and reproductive interference by sex pheromones in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 11th International Phycological Congress, Szczecin, Poland, August 15, 2017.

Sekimoto, H., Kanda, N., Kon, S., Nishiyama, T., Tsuchikane, Y. “Functional analyses of sex specific receptor-like proteins in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex, using CRISPR/CAS9 system” 11th International Phycological Congress, Szczecin, Poland, August 14, 2017.

Tsuyuki, N., Komiya, A., Kanda, N., Tsuchikane, Y., Nishiyama, T., Sekimoto, H. “*CpMinus1*, mt<sup>-</sup> genome specific gene of heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex, is involved in the sex determination” 11th International Phycological Congress, Szczecin, Poland, August 14, 2017.

小林弘佳、加藤万智、関本弘之、土金勇樹「接合藻ヒメミカヅキモの性フェロモンによる生殖隔離と生殖干渉」日本植物分類学会第 16 回大会 2017 年 3/9-3/12

関本弘之「シャジクモ藻類ヒメミカヅキモの性決定機構の解析」第 80 回日本植物学会シンポジウム「ゲノム解析から見えてきた性の多様性と共通性」2016 年 9 月 16 日

Sekimoto, H., Komiya, A., Nishiyama, T. “The *CpMinus1* gene, specifically localized on the mating-type minus genome, is responsible for the sex determination of heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” EMBO Workshop -New model systems for early land plant evolution, Vienna, Austria, June 24, 2016.

小宮 あゆみ、阿部 淳、川井 絢子、鈴木 穰、豊田 敦、藤山 秋佐夫、大槻 涼、土金 勇樹、西山 智明、関本 弘之「*CpMinus1* 遺伝子はヒメミカヅキモの性を決定する」日本植物学会第 79 回大会（新潟・朱鷺メッセ）2015 年 9 月 8 日

土金 勇樹、渡邊 樹梨、加藤 万智、鈴木 穰、西山 智明、関本 弘之「接合藻ヒメミカヅキモにおける新規交配群 G の発見とトランスクリプトーム解析」日本植物学会第 79 回大会 2015 年 9 月 8 日

Hiroyuki Sekimoto「Sexual reproduction and sex determination of green algae」第 79 回日本植物学会シンポジウム “Fusion” in Fertilization: Interdisciplinary Collaboration among Plant and Animal Scientists, 2015 年 9 月 7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~sekimoto/Site/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野崎 久義

ローマ字氏名：(NOZAKI, Hisayoshi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院理学系研究科

職名：准教授

研究者番号：40250104

研究分担者氏名：土金 勇樹

ローマ字氏名：(TSUCHIKANE, Yuki)

所属研究機関名：日本女子大学

部局名：理学部

職名：助教

研究者番号：20434152

(2)連携研究者

連携研究者氏名：西山 智明

ローマ字氏名：(NISHIYAMA, Tomoaki)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：学際科学実験センター

職名：助教

研究者番号：50390688

(3)研究協力者

研究協力者氏名：川井 絢子

ローマ字氏名：(KAWAI, Junko)

研究協力者氏名：大槻 涼

ローマ字氏名：(OOTSUKI, Ryo)

研究協力者氏名：小宮 あゆみ

ローマ字氏名：(KOMIYA, Ayumi)

研究協力者氏名：神田 奈保

ローマ字氏名：(KANDA, Naho)

研究協力者氏名：土松 隆志

ローマ字氏名：(TSUCHIMATSU, Takashi)

研究協力者氏名：柴田 あいか

ローマ字氏名：(SHIBATA, Aika)

研究協力者氏名：小林 弘佳

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Hiroka)

研究協力者氏名：露木 奈津美

ローマ字氏名：(TSUYUKI, Natsumi)

研究協力者氏名：平田 優香

ローマ字氏名：(HIRATA, Yuuka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。