

令和 元年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0278

研究課題名（和文）複合微生物系におけるプラスミドの「真の」宿主域の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）The actual host range of plasmids in microbial consortia(Fostering Joint International Research)

研究代表者

新谷 政己 (Shintani, Masaki)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：20572647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：プラスミドが宿主に与える生理的機能（薬剤耐性など）を指標とするのではなく、その接合伝達能自体を指標にしたプラスミドの収集を行った結果、既知・未知のものを含む自己伝達性プラスミドを多数取得した。よく知られたIncP-1群の他に、PromA群とよばれる、これまで見過ごされてきたグループのプラスミドを多数取得し、遺伝子の水平伝播における重要性を示した。また、得られたプラスミドについて、種々の条件における宿主域を比較したところ、酸素濃度の違いや、プラスミド自体の塩基組成の違いによって、その見かけの宿主域が変化することも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、自然界で遺伝子の水平伝播を実際に担っているプラスミドに関するこれまでの知見は、まだ不足していることを示している。こうしたプラスミドの探索を続けると共に、それらの宿主域を明らかにすることで、微生物の進化・適応機構を促すプラスミドの伝播経路の一端が明らかになると期待される。また、薬剤耐性遺伝子の伝播が各国で深刻な問題を引き起こしているが、本現象にもプラスミドの接合伝達機構が深く関与しており、本成果はこうした分野の研究者にも重要な知見を与える。

研究成果の概要（英文）：By exogenous plasmid capturing, many self-transmissible plasmids were obtained from microbial community in natural environments including IncP-1 and PromA group plasmids. Some of plasmids in PromA group showed differences in their GC contents around 10%. Although their gene sets were similar, their host range were different with each other. Conjugation assays under aerobic and anaerobic conditions showed that concentration of oxygens could change the kinds of transconjugants of IncP-1 plasmids.

研究分野：環境微生物学

キーワード：プラスミド 宿主 嫌気性細菌 複合微生物系 接合伝達

1. 研究開始当初の背景

プラスミドは、微生物の生存に必須な染色体とは物理的に別個に存在する DNA 分子である。プラスミドの多くは、接合伝達と呼ばれる機構によって、プラスミドをもつ細胞(供与菌)から、持たない細胞(受容菌)へと移動可能で、プラスミドを得た受容菌(接合完了体)は、プラスミドに由来する新たな形質を獲得する。プラスミドがどのような種類の細菌に接合伝達するかという宿主域の情報は、プラスミドの伝播を介した細菌の進化・適応機構を理解する上で重要である。従来、プラスミドの宿主域は供与菌と受容菌とを1種類ずつ培養・混合した接合実験によって決められてきた。しかし自然環境中の微生物の大半は未培養・難培養性であり、こうした複合微生物系に対するプラスミドの宿主域については情報が乏しい。また、こうしたプラスミドが実際に伝播していると考えられる土壌・堆肥・動物体内などの環境には、好気・嫌気的環境が併存する。研究代表者が、IncP-1, IncP-7, IncP-9群というプラスミドグループに属する接合伝達性のプラスミドについて、好気条件下で複合微生物系におけるプラスミドの宿主域を調べたところ、プラスミドの宿主域は、上述のような実験室内で行った接合実験の結果と異なり、既知の宿主域よりも広い可能性が高いこと、また嫌気性細菌もプラスミドを受け取る可能性を見出した(Shintani et al., 2014 Appl. Environ. Microbiol. 80:138-145)。また、塩基配列解読技術の革新的な進歩によって、好気性細菌のみならず、多くの嫌気性細菌にもプラスミドが存在することが判明した。以上のことから、プラスミドは、嫌気的環境下でも嫌気性細菌に対して接合伝達すると推定される。しかし、嫌気条件下の複合微生物系におけるプラスミドの宿主域についてはほぼ不明であった。さらに、嫌気環境を含む自然界では、どのプラスミドが実際に伝播しているのかという情報もほとんど無かった。

2. 研究の目的

研究代表者らの先行研究で、プラスミドを受け取った微生物(接合完了体)を細胞レベルで検出・分離・解析する手法によって、好気条件下では、接合完了体の種類の幅(宿主域)が従来知られているよりも広いこと、またプラスミドは嫌気的な環境でも伝播する可能性が示された。このような背景を受け、基課題の目的は、対象を微好気・嫌気的な環境に生息する様々な微生物集団(複合微生物系)に広げ、『複合微生物系におけるプラスミドの「真の」宿主域の解明』(若手研究(A), H27-29)とした。本研究課題では、好気・微好気条件下で伝達可能なプラスミドの探索・取得手法を確立するとともに、微生物細胞内のプラスミド DNA を、より高感度・高精度に検出・追跡する手法を導入し、プラスミドを介した複合微生物系内における微生物の進化・適応機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 好気・嫌気条件下で接合伝達可能なプラスミドの探索・取得方法の確立。

嫌気環境を含む自然界の様々な複合微生物系(土壌, 根圏, 下水の嫌気処理槽内の微生物群集, 牛糞堆肥)から新たな接合伝達性プラスミドの取得・探索を試みた。ここでは、プラスミドが宿主にもたらず、薬剤耐性などの生理的機能を指標とするのではなく、可動性プラスミドを、それ自体とともに接合伝達させる、自己接合伝達能のみを指標としてプラスミドの収集を行った。

(2) 改良 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) によるプラスミド DNA の検出手法の確立。

2種類の相補配列をもつ蛍光プローブを用いて、シグナルを増幅する改良 FISH を行い、細胞内のプラスミド分子の検出手法の確立を目指し、高コピーのプラスミドについて検出を試みた。

(3) 微好気・嫌気条件下における既存の接合伝達性プラスミドの宿主域の解明。

IncP-1・IncP-7群プラスミドを、嫌気的環境を含むモデル複合微生物系内の細菌に好気・嫌気条件の双方で接合伝達させ、フローサイトメリーとセルソーター (FACS) によって、接合完了体細胞を分取した。その後、得られた接合完了体の 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、プラスミドがモデル複合微生物系内のどのような細菌種に伝達可能かを決定した。

(4) 新たに見出した接合伝達性プラスミドの宿主域の解明。

(1) で取得した新たなプラスミドについて(3)と同様に複合微生物系における宿主域を決定した。

4. 研究成果

(1) 基課題と連携して、好気・嫌気条件下で接合伝達可能なプラスミドについて、プラスミドの接合伝達能のみを指標とした三親接合によるプラスミドキャプチャリング手法を確立した。その結果、静岡大学浜松キャンパス内の土壌, 上昇流嫌気性汚泥床(UASB)内でメタン発酵を担う微生物群集(グラニュール), 抗生物質を与えていない牛糞を含む堆肥, 浜松市の佐鳴湖およびその周辺の河川の底泥, の4種類の環境試料から抽出した微生物画分を分離源として、自己接合伝達性プラスミドをもつと推定される受容菌を500株以上得ることに成功した。これらのうち、現在までに14種類の全塩基配列を解読した(表1)。各プラスミドの複製開始を担うと推定されるタンパク質のアミノ酸配列を、既知の他のプラスミド由来の当該タンパク質のアミノ酸配列と比較して、系統樹を描いたところ、よく研究されている不和合性群 IncP-1 群プラスミドの他、比較的最近提唱された PromA 群に属する新たなプラスミド(図1), 不和合性群未知の新規性の高いプラスミドを得ることに成功した(Yanagiya et al., 2018)。

表1. 基課題と本課題で取得した完全長塩基配列を決定した自己接合伝達性プラスミド

不和合性群	名前	分離源	サイズ (bp)	GC 含量(%)
IncP-1	pSN1104-59	メタン発酵槽内の	50,476	65
	pSM0227-02	グラニール	47,983	62
	pSM0227-07		51,612	66
	pMH0621-02Tc	佐鳴湖底泥	64,795	63
IncP-9	pSN0726-36	土壌	76,174	59
PromA	pSN0517-01	メタン発酵槽内の	41,117	64
	pSN1104-11	グラニール	41,033	64
	pSN1104-34		41,117	64
	pSN0729-62	牛糞堆肥	38,644	54
	pSN0729-70		39,117	54
	pMH0613-68	佐鳴湖底泥	41831	61
	pMH0621-74		39,677	64
	不明	pSN1216-29	牛糞堆肥	35,552
	pMH0621-12	佐鳴湖底泥	37,561	61

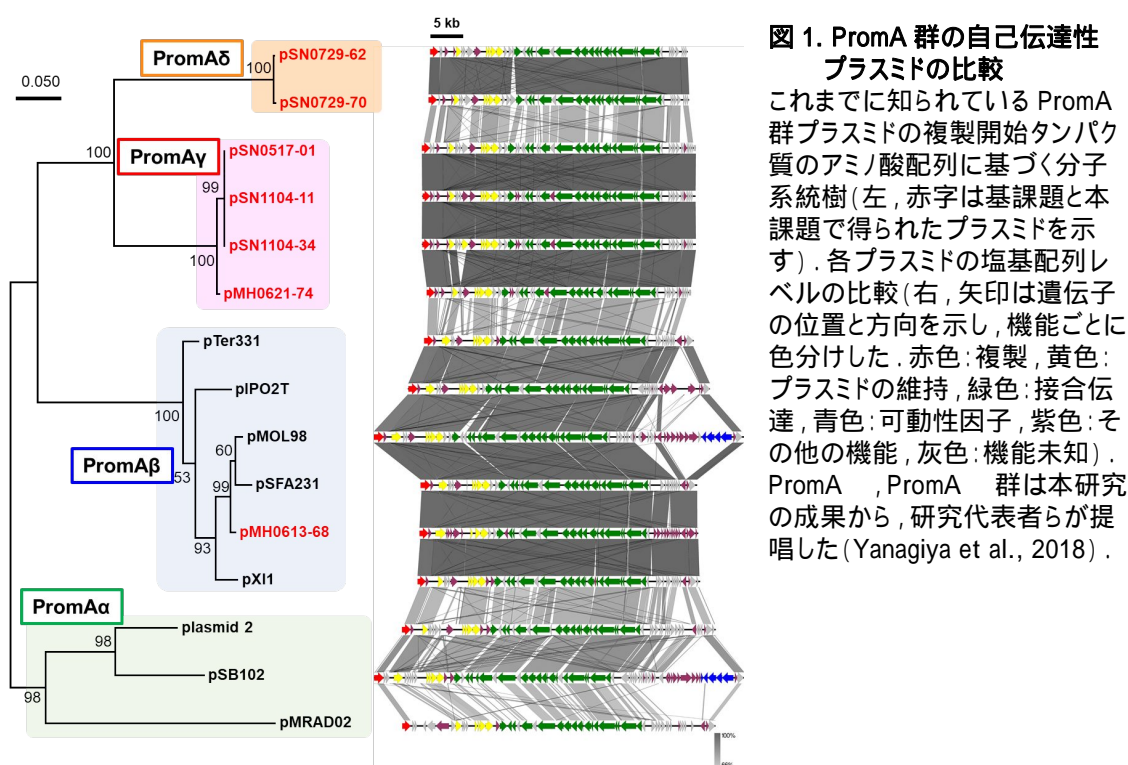


図1. PromA 群の自己伝達性プラスミドの比較

これまでに知られている PromA 群プラスミドの複製開始タンパク質のアミノ酸配列に基づく分子系統樹(左, 赤字は基課題と本課題で得られたプラスミドを示す). 各プラスミドの塩基配列レベルの比較(右, 矢印は遺伝子の位置と方向を示し, 機能ごとに色分けした. 赤色:複製, 黄色:プラスミドの維持, 緑色:接合伝達, 青色:可動性因子, 紫色:その他の機能, 灰色:機能未知). PromA, PromA 群は本研究の成果から, 研究代表者らが提唱した(Yanagiya et al., 2018).

(2)また本課題では, オーストリア・ウィーン大学の Michael Wagner 博士とともに, プラスミドを受け取った細胞を, より高感度・高精度に検出するために, 従来の fluorescence *in situ* hybridization(FISH)法の改良を試みた. バクテリアを対象とする通常の FISH は, 細胞内に高コピーに存在する rRNA をターゲットとするが, 本手法では低コピーのプラスミド DNA を対象とする. そのため, 複数のプローブを用いたり, プローブ結合後のシグナルを増幅したりする必要がある. そこで, hybridization chain reaction (HCR)-FISH 法(Yamaguchi et al., 2015, Environ. Microbiol. 17:2532-2541)を用いて, IncP-1 群に属するモデルプラスミド, pBP136 の, 複製や接合伝達に寄与する, プラスミドにユニークな遺伝子を, 高コピーの大腸菌用ベクターにクローニングし, 当該 DNA 領域を特異的に検出可能なプローブを構築・作製した. その後, プラスミドをもつ大腸菌に対して HCR-HISH を行い, プラスミドのインサートの有無によって, 細胞内のシグナルレベルが異なるかどうか検証した. ハイブリダイゼーション条件や洗浄条件等の条件検討の結果, (インサートのない)ベクターコントロールに比べ, 対象領域を含むプラスミドをもつ細胞から, 有意に高いシグナルが検出された(図2). 本手法を, 低コピーのプラスミドについて試みたところ, 残念ながらシグナルを得ることはできなかった(データは示さない). より強くシグナルを増幅する手法が必要と推察された.

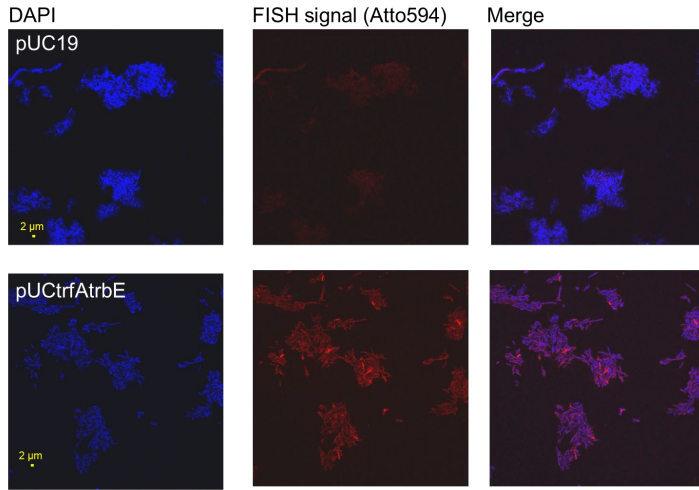


図2. HCR-FISH による高コピープラスミドの検出.
 pBP136 上の *trfA-trbE* 領域をクロニングした高コピープラスミド (pUC19) を、当該領域特異的に検出するプローブを用いて HCR-FISH を行った後、大腸菌の細胞を蛍光顕微鏡下で観察した結果. 青色は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色による細胞の検出. 赤色が特異的プローブ (Atto594 色素) で検出したシグナル. Merge は2つの画像を重ね合わせた写真. 紫色の細胞がプラスミドをもつ.

(3) GFP は嫌気条件下でもタンパク質として発現し、酸素は蛍光を示す発色団の最終段階にのみ必要なことを利用して、嫌気条件の接合実験の後に、短期間酸素に曝露することで、GFP の蛍光を検出することにした. 本手法を用いて、既知の IncP-1 群プラスミド pBP136::*gfp* と、IncP-7 群プラスミド pCAR1::*gfp* について、好気・嫌気条件で接合実験を行った. その結果、接合伝達頻度は、嫌気条件の方が低かったが、接合伝達自体には酸素が必須でないことが示された. また、供与菌と受容菌の組み合わせによって、頻度の低下度合いが異なった. 従って、好気・嫌気条件下では、プラスミドの見かけの宿主域が変化することが示唆されたため、IncP-1 群プラスミド、pBP136 を用いてこれを検証したところ、各条件で得られる接合完了体の種類が異なることが示された (表2).

表2. 好気・嫌気条件で得られた pBP136 の接合完了体の数と種類

接合条件	接合完了体数	属	綱	門	
好気条件	12	<i>Paracoccus</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	
	40	<i>Rhizobium</i>			
	8	<i>Achromobacter</i>			
	7	<i>Advenella</i>	<i>Betaproteobacteria</i>		
	12	<i>Caenimicrobium</i>			
	4	<i>Candidimonas</i>			
	1	<i>Eoetvoesia</i>			
	1	<i>Kerstesia</i>			
	3	<i>Pusillimonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>		
	1	<i>Buttiauxella</i>			
	20	<i>Escherichia</i>			
	2	<i>Klebsiella</i>			
	24	<i>Raoultella</i>			
	21	<i>Shigella</i>			
	87	<i>Pseudomonas</i>			
	2	<i>Aeromonas</i>	<i>Flavobacteria</i>		<i>Bacteroidetes</i>
	3	<i>Acinetobacter</i>			
	11	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Bacilli</i>		<i>Firmicutes</i>
	3	<i>Flavobacterium</i>			
1	<i>Bacillus</i>	好気条件			
14	<i>Buttiauxella</i>		<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	
1	<i>Cedecea</i>				
5	<i>Citrobacter</i>				
6	<i>Enterobacter</i>				
32	<i>Escherichia</i>				
16	<i>Klebsiella</i>				
1	<i>Lelliottia</i>				
7	<i>Raoultella</i>				
44	<i>Shigella</i>				
5	<i>Pseudomonas</i>				
3	<i>Aeromonas</i>				

(4) 上で得られた PromA 群プラスミドのうち、pSN1104-11 と pSN0729-62 は、異なるサブグループ、PromA₁、PromA₂ 群に属する (図1). これらのプラスミドの GC 含量は 10% も異なる (表1). プラスミドと宿主染色体の GC 含量の間には高い相関がある (Shintani & Suzuki, 2019) ことから、これら 2 種類のプラスミドの宿主域が異なるという仮説を立てた. 本仮説を検証するために、異なる受容菌を用いて接

合実験を行ったところ、接合伝達の成否が、プラスミドごとに異なった。そこで、先述した牛糞堆肥をモデル受容菌群として、それぞれのプラスミドをもつ供与菌と接合実験を行ったところ、得られた宿主の種類が異なった(データは示さない)。以上から、pSN1104-11とpSN0729-62は、同一の不和合性群に属するにもかかわらず、その宿主域が異なることが示唆された。現在、さらなる国際共同研究の一環として、米国アイダホ大学のEva Top博士らとIncP-1群プラスミドの異なるサブグループに属するプラスミドについても宿主域の比較を行っている。

(5)また本課題では、別の国際共同研究として、ドイツ、Julius Kühn InstituteのKornelia Smalla博士とともに、農薬散布を一切していないレタス、トマト、ジャガイモの根圏より、上述した三親接合によって、IncP-1群プラスミドを中心に収集して、その全塩基配列を解読した。これまでに得られたIncP-1群プラスミドの多くは、薬剤耐性遺伝子(群)や、物質代謝遺伝子(群)を有していたが、本研究で得られたプラスミドは、いずれもこうした遺伝子群を有していなかった。その代わりに、IS1071やごく祖先型のclass 1型のインテグロンが見いだされた。従って、自然界におけるIncP-1群プラスミドは、常に遺伝子群を運搬するプラスミドとして存在するのではなく、環境変化の必要に応じて遺伝子群を獲得し、運搬していることが示唆された。

以上から、プラスミドの宿主域は、酸素濃度の違いや、プラスミドの塩基組成によって変化することが示唆された。また、基課題と本課題で得られたプラスミドは、自然界における遺伝子の伝播を担う重要なプラスミドであることが示唆された。従って、本成果はプラスミドの宿主域を規定する因子を新たに明らかにするとともに、その伝播経路の一端についても明らかにしたと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)いずれも査読有,(*)は責任著者を示す。

- (1) Shintani M*, Ohkuma M, Kimbara K (2019) High-resolution comparison of bacterial conjugation frequencies, *Journal of Visualized Experiments*, e57812, doi: 10.3791/57812.
- (2) Yano H*, Shintani M, Tomita M, Suzuki H*, Oshima T (2019) Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 70-81, doi: 10.1016/j.csbj.2018.12.001.
- (3) Yanagiya K, Maejima Y, Nakata H, Tokuda M, Moriuchi R, Dohra H, Inoue K, Ohkuma M, Kimbara K, Shintani M* (2018) Novel self-transmissible and broad-host-range plasmids exogenously captured from anaerobic granules or cow manure, *Frontiers in Microbiology*, 9:2602, doi: 10.3389/fmicb.2018.02602.
- (4) Sakuda A, Suzuki-Minakuchi C, Matsui K, Takahashi Y, Okada K, Yamane H, Shintani M*, Nojiri H*. 2018. "Divalent cations increase the conjugation efficiency of the incompatibility P-7 group plasmid pCAR1 among different *Pseudomonas* hosts", *Microbiology*, 164(1):20-27, doi: 10.1099/mic.0.000583.
- (5) Nakazawa S, Haramiishi A, Fukuda K, Kanayama Y, Watanabe T, Yuki M, Ohkuma M, Takeda K, Kimbara K, Shintani M.* 2017. "Different transferability of incompatibility (Inc) P-7 plasmid pCAR1 and IncP-1 plasmid pBP136 in stirring liquid conditions", *PLoS One*, 12(10): e0186248, doi: 10.1371/journal.pone.0186248 and 10.1371/journal.pone.0191393.
- (6) Shintani M.* 2017. "The behavior of mobile genetic elements (MGEs) in different environments", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(5): 854-862, doi: 10.1080/09168451.2016.1270743.

[学会発表](計20件)

- (1) 徳田真穂, 柳谷洸輔, 井上謙吾, 雪真弘, 大熊盛也, 水口千穂, 野尻秀昭, 金原和秀, 新谷政己, 「新規プラスミドグループ PromA 群に属する GC 含量の異なるプラスミドの宿主域比較」, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年.
- (2) 越智健太郎, 柳谷洸輔, 徳田真穂, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較」, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年.
- (3) 早川雅也, 前島由明, 金原和秀, 新谷政己, 「環境試料からの新規自己伝達性プラスミドの取得と解析」, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年.
- (4) Shintani M, 「Behaviors of conjugative plasmids in various environments」, Introduction to Shizuoka University in Hue University (招待講演), 2018 年.
- (5) Shintani M, 「Behaviors of plasmids in microbial consortia under aerobic and anaerobic conditions」, Special Talk in Chulalongkorn University (招待講演), 2018 年.
- (6) 越智健太郎, 柳谷洸輔, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較」, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018 年.
- (7) Maejima Y, Nakata H, Moriuchi R, Dohra H, Inoue K, Kimbara K, Shintani M, 「Collecting and functional analysis of novel self-transmissible plasmid from environmental samples」, *Plasmid Biology* 2018, 2018 年.
- (8) Maejima Y, Yanagiya K, Nakata H, Moriuchi R, Dohra H, Inoue K, Kimbara K, Shintani M, 「PromA group plasmids isolated from environmental samples」, *Plasmid Biology* 2018, 2018 年.
- (9) Yanagiya K, Inoue K, Minakuchi C, Nojiri H, Ohkuma M, Kimbara K, Shintani M, 「Comparisons of

transferability and host range of conjugative plasmids under aerobic, microaerobic, and anaerobic conditions」, Plasmid Biology 2018, 2018 年.

(10) Shintani M, 「Behaviors of conjugative plasmids in different environmental conditions」, International Symposium for Microbial Ecology 17(招待講演), 2018 年.

(11) Shintani M, 「Behaviors of conjugative plasmids in different environmental conditions」, JKI mini-symposium “Networking and cooperation in microbial ecology” (招待講演), 2018 年.

(12) Sakuda A, Minakuchi C, Matsui K, Takahashi Y, Okada K, Yamane H, Shintani M, Nojiri H, 「Divalent cations increase the conjugation efficiency of the incompatibility P-7 group plasmid pCAR1 among different *Pseudomonas* hosts」, asm microbe 2018, 2018 年.

(13) 前島由明, 仲田裕貴, 森内良太, 道羅英夫, 井上謙吾, 金原和秀, 新谷政己, 「新規宿主・ベクター系の構築を目指した自己伝達性プラスミドの取得と機能解析」, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年.

(14) 柳谷洸輔, 越智健太郎, 仲田裕貴, 井上謙吾, 水口千穂, 野尻秀昭, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析」, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年.

(15) 越智健太郎, 柳谷洸輔, 井上謙吾, 水口千穂, 野尻秀昭, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析」, 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会, 2017 年.

(16) 柳谷洸輔, 井上謙吾, 野尻秀昭, 大熊盛也, 金原和秀, 新谷政己, 「微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析」, 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017 年.

(17) Shintani M, Nour EH, Elsayed T, Blau K, Bziuk N, Jechalke S, Sproer C, Bunk B, Overmann J, Smalla K, “Behaviors of plasmids in soil microcosms”, 6th International Symposium on Biosorption and Biodegradation/Bioremediation (招待講演), 2017 年.

(18) Shintani M. “Transferability of plasmids in various environmental conditions”, 奈良先端科学技術大学院大学セミナー(招待講演), 2017 年.

(19) レー・ティー・タントゥー, 片岡大亮, 道羅英夫, 金原和秀, 新谷政己, 「プラスミドを持つ宿主の fitness(適応度)を増加させる原因因子の同定」, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年.

(20) Shintani M, “Transferability of plasmids in various environmental conditions”, Thailand-Japan Collaboration Symposium on Environmental Microbiology and Applications(招待講演), 2017 年.

〔図書〕(計 2 件)

(1) Shintani M, Suzuki H (2019) (co-corresponding authors) Plasmids and their hosts, In "DNA Traffic in the Environment" (eds. Nishida H, and Oshima T) Springer, pp109-133.

(2) 新谷政己, 「第 8 章 非リンパ球・非モデル生物細胞への適用に関する Q&A, 『Q98 土壌細菌や昆虫体内の腸内細菌の解析とソーティングについて教えてください』, 実験医学別冊『ラボ必携 フローサイトメトリー Q&A 正しいデータを出すための 100 箇条』, 戸村道夫 / 編, 羊土社, 2017 年, pp. 298-300.

〔その他〕

ホームページ等

<https://kimbara-shintani.eng.shizuoka.ac.jp/>

<https://orcid.org/0000-0002-6505-9850>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名: マイケル ワグナー

ローマ字氏名: Michael Wagner

所属研究機関名: ウィーン大学

部局名: 微生物学部

職名: 教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名: コーネリア スマラ

ローマ字氏名: Kornelia Smalla

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。