

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07823

研究課題名(和文) 紅茶テアフラビン類の選択的合成を目指した酵素資源の探索と高生産システムへの応用

研究課題名(英文) Screening of enzyme sources for efficient and specific synthesis of theaflavins, black tea polyphenols.

研究代表者

奈良井 朝子 (Narai-Kanayama, Asako)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：00339475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：紅茶の赤橙色色素であるテアフラビン類(TF)は、茶葉に豊富なカテキン類がポリフェノールオキシダーゼ(PPO)により酸化・縮合して生成するカテキン二量体である。TFには様々な生理活性が報告されているが、TF研究・応用に必要な精製された標品が少ない。そこで本研究では、PPOモデル酵素として頻用されるマッシュルーム由来のチロシナーゼを用い、TF合成反応機構を解析することでTF生成量・収率を増加させる反応条件を新規に見出した。

また、身近な植物素材にTF合成に適したPPO資源を求め、候補素材から粗酵素を抽出する方法の最適化を行った。さらに、これを効率的なTF生産技術へ応用するための条件を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では紅茶テアフラビン類(TF)の酵素的合成反応の速度論的解析から、TFが高収量で得られない反応機構を明らかにするとともに、基質と酵素の疎水性の指標である分配係数に基づいて新たに溶媒-緩衝液二相系という効率的なTF合成法を提案した。また、既往の研究を参考に、酵素を不活化させる副生成物の過酸化水素をカタラーゼ添加によって消去し、TF生成速度と収率を高めるといった画期的な反応条件も提案した。また、TF合成に有用な酵素資源を探索し、入手容易な素材と酵素抽出法を見出した。これらの成果は、紅茶の保健機能の研究・応用に必要なTFを安定して供給するシステムの構築に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Theaflavins (TF), characteristic red-orange pigments of black tea infusion, are dimers of selectively combined two catechins. TFs can be synthesized by the polyphenol oxidase (PPO)-catalyzed oxidation of catechins, however, the oxidative conditions cause their further polymerization. The shortage of the purified TF retards the progress of researches on various biological activities of TF and their pharmaceutical applications. Thus, in this study, we conducted the kinetic analyses of enzymatic synthesis of TF using mushroom tyrosinase, which has been often used as a typical model of PPO, to find the reaction conditions required for high-level production of TF. We for the first time indicated that the 1-octanol/buffer biphasic system and the exogenous addition of catalase into the reaction mixture increased TF2A and TF2B, respectively. We also found potential in crude extracts from some plant materials as useful catalysts for the efficient TF synthesis.

研究分野：食品科学

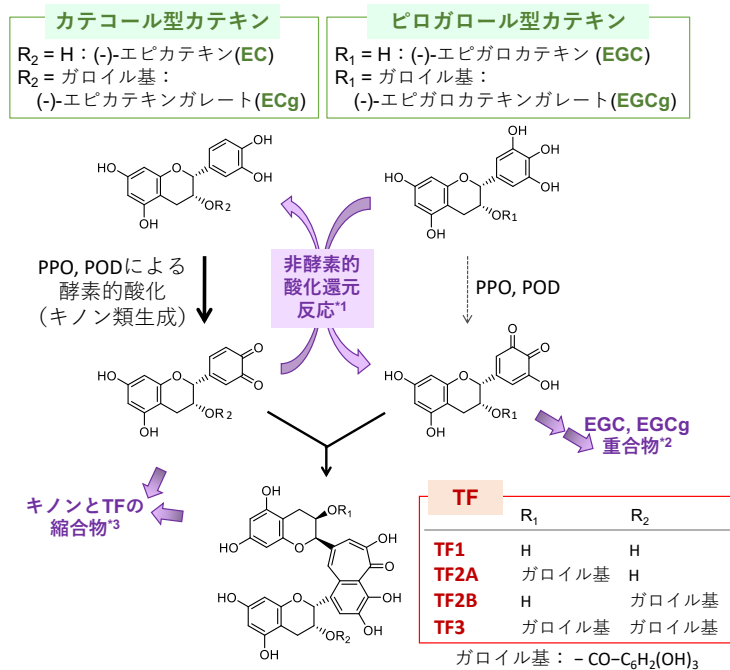
キーワード：テアフラビン 酵素的合成 紅茶 カテキン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 紅茶特有の赤橙色色素テアフラビン類は、紅茶ポリフェノールの代表的な成分である。主要なテアフラビン類として構造の異なる4種類が知られており(図1)、これらを区別しない場合はこれ以降TFと省略して記述する。TFは、紅茶の水色(すいしょく: 紅茶を淹れた時の抽出液の色)を良好にするだけでなく、近年、食後血糖値上昇抑制作用、コレステロール吸収抑制作用など様々な生理活性が報告され[1,2]、注目を集めている。

紅茶の製造工程における「発酵」では、茶葉中のカテキン類が茶葉由来のポリフェノールオキシダーゼ(polyphenoloxidase: PPO)によって酸化した後、カテコール型カテキン(エピカテキン: EC, エピカテキンガラート: ECg)とピロガロール型カテキン(エピガロカテキン: EGC, エピガロカテキンガラート: EGCg)の2分子が、選択的組み合わせにて縮合・脱炭酸を経るとTFが生成する(図1)[3,4]。しかし、生成したTFはさらに酸化・重合してテアルビジンと総称される構造不特定の化合物群へと変化する[3,4]。紅茶中のテアルビジン量が多いものの組成が複雑で、その精製と構造特定はほとんどできていない。また、テアルビジンの構造的特徴等はTFに類似すると考えられ、紅茶ポリフェノールの生理活性に関する研究は主にTFを用いて行われている。しかし、紅茶中のTFは微量で、抽出・精製した標品の入手が容易でなく、TFの生体内における吸収・代謝、生理活性の発現機構、構造活性相関などの検証は、緑茶カテキン類ほど進んでいない。そこで、TF特有の機能性を評価する研究では、高純度のTFを豊富に合成・供給できるシステムが必要とされている。



(2) TFの基本構成成分は化学的に不安定な構造をもつカテキン類であり、その重合過程を有機合成で模倣するのは極めて難しい。そこで、酵素の基質特異性・反応特異性を活かす方法が現実的である。しかし、効率的に高収量のTFを合成するためには、カテキン酸化物が重合してTFを生成する過程と、副産物等の共存成分がTFの収率・収量に及ぼす影響を詳細に解析することが必要である。

一方、PPOは、茶葉に限らず植物界に広く存在する酵素で、酵素の起源によって基質特異性、至適pHなどが異なる[5]。様々な植物の粗酵素とカテキン類を反応させてTF合成を試みた報告例はあるが[3]、原料を水でホモジナイズした試料を用い一律の反応温度・時間で生成物を分析しており、それぞれのPPOの酵素学的性質を考慮した反応条件ではなかった。また、PPO活性の高い植物原料には一般的に原料由来のポリフェノール量が多く、酵素抽出のホモジナイズ処理中に生じる酵素的褐変の影響が大きい(ポリフェノール酸化物を介した酵素の失活や副反応によるTF収量の低下)と予想されるが、未検討であった。そこで、酵素の抽出法ならびに反応条件を改良することで、TF合成に有用な酵素資源を探索する余地は十分に残っていると考えられた。

2. 研究の目的

(1) まず、PPOモデル酵素として研究に頻用されている市販酵素(マッシュルーム由来チロシナーゼ)を用いて、カテキン酸化からTF合成に至る反応を速度論的に解析することでTF合成効率の向上に必要な(または排除すべき)要素を明らかにする。

(2) 次に、TF合成に有用な植物酵素原料の探索をおこない、適切な酵素抽出条件も併せて検討する。得られた酵素試料の酵素学的性質を解析し、TFの効率的合成に向け、酵素反応の最適条件を検討する。また、一般的な紅茶では4種のTFのうちTF2B量が少ない傾向にある(原料茶葉中カテキン類の存在比を反映していると考えられる)[6,7]。しかし、互いに異性体であるTF2AとTF2Bにはそれぞれに特徴的な生理活性が報告されており[1,2]、構造活性相関に関する研究に対してこれらを豊富に合成・供給できるシステムが求められている。そこで、TF2Bを選択的に合成することに適したPPOを探索する。

図1 カテキン類からのTF生成機構

酸化型カテキン(キノン類)どうしのマイケル付加、酸化、脱炭酸を経てテアフラビンが生成する。TF合成のための選択的なカテキン類の組み合わせは次のとおりである。



紫色の矢印で示した反応(*1~3)はテアフラビンの収率低下の要因となる反応である。

3. 研究の方法

(1) TF 合成のため EC, EGC, ECg, EGCg から選択的に 2 種のカテキンを組み合わせた混合カテキン溶液 (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0) にマッシュルーム由来チロシナーゼを添加して室温で反応させ、経時的に反応停止した (25 mM クエン酸とエタノールの等量混合液による希釈)。これを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供し、反応液成分について分析し、TF の収率・収量を求めた。

TF 収量の増加につながる反応系として 1-オクタノール/緩衝液二相系を導入した時の効果を調べる実験では、カテキンを溶解した緩衝液の上に等量の 1-オクタノールを加え、チロシナーゼを添加後 15 min おきに攪拌と遠心分離によって反応系を二相分離し、上の 1-オクタノール相と下の緩衝液相からそれぞれ反応液を採取し、反応停止して反応液成分を HPLC で分析した。

(2) TF 合成に有用な植物酵素原料の探索には、入手容易な原料として市販の植物性食材のうち PPO による酵素的褐変が知られているもの (研究成果にて後述) を用いた。原料のホモジナイズ処理中に起こる褐変に由来する酵素へのダメージが懸念されたことから、金属キレート剤の EDTA と還元剤の 2-メルカプトエタノールを褐変防止剤 (inhibitor: I) として添加 (+I) または不添加 (-I) の 2 種類の抽出試料を調製した。50 mM クエン酸リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0 ($\pm I$) にて原料をホモジナイズ後、ガーゼ濾過と冷却遠心分離を経て得られた上清に等量の冷アセトンを静かに加えて混合し、 -20°C で静置後、冷却遠心分離をおこなった。その沈殿に対して冷却した 50%アセトンを加え、原料由来のポリフェノールおよび I を洗浄・除去し、風乾させた。このアセトン沈殿物を各原料の粗酵素とし、Bradford 法によるタンパク定量と TF 合成活性測定に供した。TF 合成活性は多検体を測定するために、緑茶葉の水溶性画分と所定の pH を調整する緩衝液を混合したものを基質溶液として粗酵素試料と反応させた。反応液が TF 由来の赤橙色に変化する様子を 520 nm の吸光度にて測定した。

TF 合成活性が認められた粗酵素試料については、生成した TF の種類を HPLC で分析した。さらに、選択的に 2 種混合したカテキン溶液との反応を解析し、TF の収率・収量を求めた。

4. 研究成果

(1) 各カテキンとの反応解析から速度定数 (K_M, k_{cat}) を求めたところ、チロシナーゼの基質に対する親和性の高さは $\text{ECg} > \text{EGCg} > \text{EC} > \text{EGC}$ で、触媒定数 (反応の速さ) は $\text{EC} \gg \text{EGC} > \text{ECg} > \text{EGCg}$ の順であった [8]。一方、選択的に 2 種のカテキンを組み合わせた混合溶液とチロシナーゼを反応させる TF 合成では、良好な基質であるはずの $\text{EC}(\text{g})$ は殆ど減少せず、 $\text{EGC}(\text{g})$ が反応開始とともに著しく減少した。このことから、図 1 の*1 に示した非酵素的なレドックス反応ならびに*2 のピロガロール型カテキンの自己重合が顕著に進行することが示唆された。また、反応液中の $\text{EGC}(\text{g})$ が枯渇すると $\text{EC}(\text{g})$ の減少が加速するとともに TF 量が減少に転じた (図 2A, TF1 合成の例)。このことから、図 1 の*3 に示したキノンと TF の反応が TF 収量低下に寄与することが明らかとなった。

$\text{EGC}(\text{g})$ は茶葉中に比較的豊富に存在するカテキンである。そこで、 $\text{EGC}(\text{g})$ の初濃度を高め、TF 合成反応を長く持続させると TF 収量が増加すると予想した。しかしながら、 $\text{EGC}(\text{g})$ の初濃度を $\text{EC}(\text{g})$ の 3 倍にしたところ、TF 生成速度は低下し (図 2B, TF1 合成の例)、基質消費量に対する TF 収率は、 $\text{EC}(\text{g})$ に対しては上昇したものの、 $\text{EGC}(\text{g})$ に対する TF の収率は低下した (表 1)。このことから、 $\text{EGC}(\text{g})$ 初濃度を高くすると、図 1 の*1 に示した非酵素的レドックス反応の速度が $\text{EGC}(\text{g})$ 濃度に比例して速くなり、 $\text{EC}(\text{g})$ キノンの供給が追いつかず、ピロガロール型カテキンの自己重合 (図 1 の*2) が促進されたことが示唆された。すなわち、酵素による $\text{EC}(\text{g})$ 酸化過程が TF 合成反応の律速になると考えられた。

次に、TF の収量低下に繋がる要因を反応系から排除あるいは隔離することを検討した。

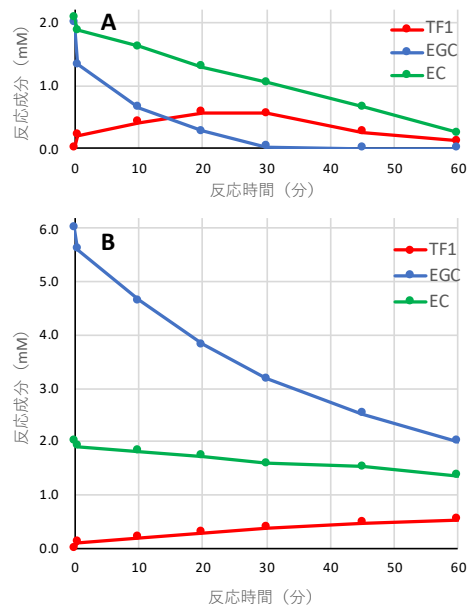


図2 チロシナーゼによるTF1合成反応

他3種のTFを合成する反応においても同様のパターンが見られた (データ省略)

表1 チロシナーゼによるTF合成反応の収量・収率に及ぼす基質濃度の影響

反応条件: 0.1 mg/mL チロシナーゼ, 50 mM NaP, pH 6.0, at 25°C (n=3, 平均±SD)				
TF	カテキン初濃度(mM)	最大収量を与えた時間(分)	消費EC(g)に対するTF収率(%)	消費EGC(g)に対するTF収率(%)
TF1	EC:EGC=2:2	20	75.3±4.7	34.5±3.5
TF2A	EC:EGCg=2:2	20	65.3±4.0	12.4±0.9
TF2B	ECg:EGC=2:2	20	48.9±3.4	19.2±1.2
TF3	ECg:EGCg=2:2	20	13.9±0.7	4.8±0.1
TF1	EC:EGC=2:6	60	91.9±9.7	12.1±2.0
TF2A	EC:EGCg=2:6	60	45.8±9.0	3.5±0.5
TF2B	ECg:EGC=2:6	60	51.3±5.4	6.7±0.5
TF3	ECg:EGCg=2:6	60	25.3±4.0	1.6±0.1

まず、カテキン類と TF それぞれの疎水性／親水性の指標となる 1-オクタノール／水分配係数 (log P) をもとに、EC+EGCg→TF2A の反応系においては、1-オクタノール／緩衝液の二相系を導入すると、TF 収量低下を引き起こす非酵素的反応 (図 1 の*2, 3) を抑制することが可能なのではないかとこの着想に至った。そこで、実際に反応を行ったところ、TF2A は 1-オクタノール相に蓄積し、収量は緩衝液単独系に比べて約 3 倍にまで増加させることができた。すなわち、酵素が活性を發揮しうる緩衝液相で EC が酵素的に酸化される→生成した EC キノンと同相に存在するわずかな EGCg を EGCg キノンに酸化し、自身は EC に還元されて再び酵素の基質になる→EGCg は 1-オクタノール相に分配され、緩衝液相での濃度を低く抑えられているため、EGCg の自己重合は抑えられ、EC、EGCg-両キノンどうしの縮合が効率的に起こり、TF2A の生成が進む→TF2A はその疎水性の高さから 1-オクタノール相に分配されるため、EC キノンの攻撃を受けずに 1-オクタノール相に蓄積する。ただし、酵素が溶媒変性を受けて反応途中に失活することから、酵素量および酵素の比活性が生成物の収率・収量を左右すると考えられた[9]。

一方で、カテキン類の酵素的または非酵素的な酸化によって過酸化酸素(H₂O₂)が生成するという報告と、H₂O₂ はチロシナーゼの不活化を招くことを示す報告が別々の研究グループから発表されていた[10,11]。我々は TF 合成反応系における H₂O₂ の蓄積とその濃度はチロシナーゼ活性を低下させるのに十分であることを確認した。チロシナーゼによる TF2B 合成 (ECg+EGC→TF2B) では H₂O₂ の生成量が著しく多かったことから、H₂O₂ 消去を目的にウシ肝臓由来カタラーゼを添加したところ、TF2B の生成速度が上昇し、最大収量も増加した。さらに、基質の初濃度比[ECg]/[EGC]を下げると、カタラーゼ共存下では対照反応に比べて TF2B の収量が 2~3 倍まで増加することを見出した[12]。

(2) 市販植物性食材のうち、PPO による酵素的褐変が起こることが知られるジャガイモ、サツマイモ、ナス、リンゴ、ナシ、ゴボウ、バナナ (バナナは皮、それ以外は可食部を使用) を±I の条件でホモジナイズ後、アセトン沈殿法にて粗酵素を得た。タンパク質回収量の多さとタンパク質あたりの TF 合成活性の高さを比較し、ジャガイモ±I、サツマイモ±I とゴボウ+I 試料が TF 合成用酵素として候補に挙げられた。しかし、アセトン沈殿物は多糖類も共沈した塊状かつ不均質で、調製した酵素試料の質的な差が大きかった。また、アセトン除去後に過度に乾燥すると溶解しづらくなるなど、酵素試料調製時の操作性に問題が起こりやすかった。そこで、アセトン沈殿法に代わり、ホモジナイズ後の上清に 65%飽和濃度の硫酸アンモニウムを加える塩析を行った。その結果、タンパク濃度が低い果実類に対してはタンパク質の凝集・沈殿が進まない場合があったが、ジャガイモ、サツマイモ、ゴボウは塩析したタンパク質の回収が容易で、さらに、タンパク回収量と TF 合成活性がアセトン沈殿に比べて増加した。

ジャガイモ±I 試料は、基質溶液との混合時に反応液が濁ったため、吸光度の変化量から求めた TF 合成活性と HPLC で測定した TF 量との間に相関性がなかった。HPLC 分析の結果からも高い TF 合成活性が認められたのはサツマイモ-I、ゴボウ+I 試料であった。

サツマイモ-I 試料の TF 合成に最適な pH を確認し、選択的に 2 種類のカテキンを組み合わせた混合溶液との反応で得られた TF 合成量は、TF1>TF2B>TF2A>>TF3 となった。精製カテキンではなく、茶葉中に豊富なカテキンをそのまま TF 合成反応に利用できるか検討するため、茶葉抽出液を市販のコウジカビ由来タンナーゼで処理し、カテキン類を脱ガロイル化した。こうして得られた EC、EGC に富んだ溶液にサツマイモ-I 試料を添加したが、想定したよりも TF1 の合成が進まなかった。そこで、茶抽出液に含まれるカテキン以外の特徴的な成分としてカフェイン、また、脱ガロイル過程で大量に生成する没食子酸の影響を調べるため、精製カテキンを用いた反応系にこれら 2 成分を単独で共存させたところ、濃度依存的にサツマイモ-I 試料による TF1 合成反応を阻害し、特に没食子酸でそれが顕著であった (図 3)。サツマイモ-I 試料を用いる TF 合成にむけては、茶葉抽出液からカフェインと没食子酸を除去することで、より簡便かつ効率的な TF 合成が可能になると考えられた。

一方、ゴボウ+I 試料の TF 合成に最適な pH も確認した。ひきつづき、TF 合成反応に対する特異性と最適反応条件を調べている。

今後は、本研究で見出した有用な酵素試料を樹脂に固定化することで安定性と反復利用性を付与し、これを TF 合成リアクターの構築に用いて研究・応用分野への安定な TF の供給を目指す。

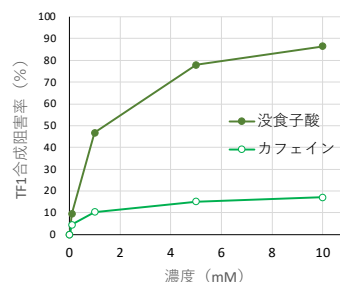


図3 サツマイモ粗酵素を用いたTF1合成反応に対する没食子酸、カフェインの阻害作用

<引用文献 (下線は本研究課題代表者) >

- [1] Matsui, T. et al., α -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. J. Agric. Food Chem. (2007) 55, 99-105.
- [2] Ikeda, I. et al., Black-tea polyphenols decrease micellar solubility of cholesterol in vitro and intestinal absorption of cholesterol in rats. J. Agric. Food Chem. (2010) 58, 8591-8595.
- [3] Tanaka, T. et al., Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates

and role of epicatechin quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J. Agric. Food Chem.* (2002) 50, 2142–2148.

[4] Tanaka, T. et al., Chemistry of secondary polyphenols produced during processing of tea and selected foods. *Int. J. Mol. Sci.* (2010) 11, 14-40.

[5] Yoruk, R. & Marshall M.R., Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.* (2003) 27, 361-422.

[6] Wright L.P. et al., Analysis of the theaflavin composition in black tea (*Camellia sinensis*) for predicting the quality of tea produced in Central and Southern Africa. *J. Sci. Food Agric.* (2002) 82, 517-525.

[7] 坂本彬ら, 12 種類の紅茶の化学成分. *日本食品科学工学会誌* (2012) 59, 326-330.

[8] Narai-Kanayama, A. et al., Specificity of tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavins. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (2016) 133, S452–S458.

[9] Narai-Kanayama, A. et al., Efficient synthesis of theaflavin-3-gallate by a tyrosinase-catalyzed reaction with (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin gallate in a 1-octanol/buffer biphasic system. *J. Agric. Food Chem.* (2018) 66, 13464–13472.

[10] García-Molina, F. et al., Mushroom tyrosinase: Catalase activity, inhibition, and suicide inactivation. *J. Agric. Food Chem.* (2005) 53, 3702–3709.

[11] Matsuura, K. et al., Structural specificity of electric potentials in coulometric-array analysis of catechins and theaflavins. *J. Clin. Biochem. Nutr.* (2014) 55, 103-109.

[12] Narai-Kanayama, A. et al., Elimination of hydrogen peroxide enhances tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavins. *Process Biochem.* (2019) 85, 19-28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Narai-Kanayama Asako, Uekusa Yoshinori, Kiuchi Fumiyuki, Nakayama Tsutomu	4. 巻 66
2. 論文標題 Efficient Synthesis of Theaflavin 3-Gallate by a Tyrosinase-Catalyzed Reaction with (?) - Epicatechin and (?) - Epigallocatechin Gallate in a 1-Octanol/Buffer Biphasic System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 13464 ~ 13472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b05971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asako Narai-Kanayama, Yuuka Uchida, Aya Kawashima, Tsutomu Nakayama	4. 巻 85
2. 論文標題 Elimination of hydrogen peroxide enhances tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Process Biochemistry	6. 最初と最後の頁 19 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.procbio.2019.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asako Narai-Kanayama, Kosuke Saruwatari, Natsumi Mori, Tsutomu Nakayama	4. 巻 82
2. 論文標題 Theaflavin-3-gallate specifically interacts with phosphatidylcholine, forming a precipitate resistant against the detergent action of bile salt.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 466 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1422967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣實 咲紀、智田 遼、松田 寛子、奈良井 朝子
2. 発表標題 サツマイモ由来粗酵素による効率的なテアフラビン合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣實 咲紀、松田 寛子、奈良井 朝子
2. 発表標題 サツマイモ塊根由来の粗酵素と緑茶浸出液を用いた効率的なテアフラビン合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈良井 朝子、内田 有香、川島 彩、中山 勉
2. 発表標題 チロシナーゼを用いたテアフラビン 3'-ガレート合成反応の収率向上
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈良井 朝子、増田 悠也、中山 勉
2. 発表標題 胆汁酸モデルミセルに含まれるホスファチジルコリンと茶ポリフェノールの相互作用
3. 学会等名 Food Congress 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奈良井 朝子、中山 勉
2. 発表標題 1-オクタノール/緩衝液二相系におけるチロシナーゼを用いたテアフラビン-3-ガレートの効率的合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	中山 勉 (Nakayama Tsutomu) (50150199)	東京農業大学・応用生物科学部・教授 (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------