

平成21年 5月 26日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380108
 研究課題名（和文） 自然クローン・倍数体を遺伝資源とした魚類育種技術の開発に関する研究
 研究課題名（英文） Studies on breeding technology using natural clonal and polyploid fish as genetic resources
 研究代表者
 荒井 克俊（ARAI KATSUTOSHI）
 北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
 研究者番号：00137902

研究成果の概要：ドジョウは両性生殖で繁殖するのが普通であるが、通常の減数分裂によらず非還元二倍体の卵を産み、かつ、これらの卵が雌性発生により父親の遺伝的関与なく発生するクローン系統、および偶然の精子核取り込みにより生じる自然三倍体系統が野生集団に見られる。本研究は、このような特殊な生殖の機構と起源を明らかにするとともに、このような変異体を遺伝資源（育種素材）として、交雑・染色体操作と組み合わせることにより育種技術開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：クローン 倍数体 雌性発生 雄性発生 性転換 減数分裂 単為発生 非還元配偶子

1. 研究開始当初の背景

魚類の一部に見られる、非還元（減数分裂によらない）配偶子（2n卵・精子）を産生する自然クローン二倍体、三倍体、倍数体モザイク等は多様なゲノムの変異を生み出す貴重な「遺伝資源」である。農作物ではこのような遺伝資源を素材として育種を進めてきた。魚介類では、1980年代より人為的な染色体操作が開発・利用されてきたが、多くの場合、不妊三倍体、全雌集団などの生殖統御の範疇にとどまり、育種利用に至っていない。これは、より有用な人為クローン系統や四倍体の作出に不可欠な第一卵割阻止が困難なこと

による。今後、簡単、確実に染色体操作品種を樹立するには、自然の遺伝資源を活用する育種技術が必要である。ゲノムの時代を迎え、遺伝地図作成のためのリソースファミリー樹立にクローン系統は有用であり、四倍体の産む2n卵や精子を用いた不妊三倍体の効率的生産(4n x 2n)はトランスジェニック魚の生物学的封じ込めや生殖系列キメラ作成時の不妊のホストとしても注目される。この点からも、新規の育種技術開発につながる、自然クローン・倍数体の2n配偶子形成などの特殊な生殖機構や起源の解明は興味深い。

2. 研究の目的

ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* などの一部の魚類に見られる非還元配偶子形成や雌性発生などの特殊な生殖を、減数分裂や受精に関するミュータント (変異体) と捉え、それらの出現機構と起源を解明するとともに、遺伝資源 (育種素材) として利用して、従来の染色体操作法では作出が著しく困難であった体細胞クローン、同質四倍体、複二倍体品種等を育種することを試みる。また、特殊な生殖の起源として予想される交雑を実施し、再現可能か否かを検討する。

3. 研究の方法

北海道網走管内大空町野生集団から選抜、増殖、飼育した、非還元 2n 卵を産む二倍体のクローンドジョウ雌、ならびに岩見沢市北村、亀田郡七飯町等より得た両性生殖ドジョウ雌雄を材料とした。また、クローンの起源ならびに類縁関係解析のためには国内外 54 地点より集めた 833 個体のドジョウ標本を用いた。

人為排卵には hCG 注射を用い、人工授精は常法によった。雌性発生の誘起には、UV 照射キンギョ精子を用いた。第二極体放出阻止による染色体倍加には、受精直後の高温処理を用いた。雌から雄への人為性転換は、雄性ホルモン (17 α -メチルテストステロン) の経口投与により行った。

倍数性は、フローサイトメトリーによる DNA 量測定により行った。クローン、三倍体の遺伝的解析には、マイクロサテライト DNA マーカーを用いた。遺伝的クローン性の解析には RAPD-PCR 法も併用した。体細胞および生殖細胞 (精母細胞、卵母細胞卵核細胞) について、空気乾燥法により染色体標本を作成した。精巢の組織学的観察には、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色により顕微鏡標本を作成した。精巢については、抗ウナギ精原細胞抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

雌性発生と非還元配偶子形成に関する分子機構解明のためには、それぞれから mRNA を得て、調製した cDNA を用いて発現量の差を調査した。候補となる産物については、常法により塩基配列を決定し相同性検索とリアルタイム PCR による発現量解析を行った。

サケ類については、北大七飯淡水実験所に飼育中の、各種の間で人為交雑を行い、その子孫を飼育するとともに、染色体観察と生殖腺観察を行った。このほか、ドジョウに近縁のカラドジョウ *M. mizolepis*、キンギョ *Carassius auratus*、自然倍数体のフナ *Carassius auratus langsdorfii* を材料とした交雑、染色体操作実験を行った。

4. 研究成果

(1) 非還元配偶子を遺伝資源としたクローン等作出の育種実証試験

クローン二倍体系統の維持: 自然クローン雌の産む 2n 非還元卵を紫外線照射キンギョ精子で受精することにより、確実に自然の雌性発生を誘起しクローン二倍体子孫を作出し、系統保存を行った。また、二倍体-三倍体モザイクおよび性転換クローン雄はクローン 2n 精子を産生することから、これらの精子凍結の技術開発を行うとともに、雄性発生による 2n 凍結精子からのクローン個体再生のために、ドジョウ卵子の遺伝的不活性化のための紫外線処理条件を詳細に検討して、雌性発生誘起の技術を開発した。

性転換クローン二倍体雄: ドジョウ自然クローン系統の産む非還元 2n 卵に、紫外線照射キンギョ精子を受精し、二倍体クローン子孫を作出し、これらに対して、孵化後 1 か月令から、約 30 日間 0.5ppm の 17 α -メチルテストステロンを経口投与することにより、100% に近い高率で雌から雄への性転換を誘起した。誘起したクローン雄を成熟させ、それらの精子について、フローサイトメトリーにより、DNA 量を測定したところ、すべて二倍性であった。これら 2n 精子による受精からは、三倍体子孫が生じることを確認した。マイクロサテライト DNA 分析の結果、三倍体子孫はクローン二倍体由来の二つのアレルを必ずもつことから、クローン雄の産生する 2n 精子は遺伝的に同一のクローン精子であることが確認できた。

四倍体クローン: クローン系統について雌雄親魚が得られたことから、四倍体クローン雌雄間の交配、あるいは、クローン雌の自然雌性発生開始直後での高温処理による第二極体放出阻止により、クローン四倍体を作出した。マイクロサテライト DNA 分析により、これらは同一の遺伝子型をもつが、フローサイトメトリーの結果、自然二倍体クローンの倍のゲノム量を持っていることが判明した。これらを成熟させ、配偶子を得て、特性を調査したところ、四倍体クローン雌は減数分裂により 2n 卵を産生し、これらの 2n 卵は遺伝的に同一のクローンであった。また、これら 2n 卵は自然雌性発生を起す能力を維持していた。四倍体クローン雄は遺伝的に同一の 2n 精子を産生した。

クローン由来三倍体とその雑種発生: クローンの産む 2n 配偶子と遺伝的に異なる A および B クレド (後述) のドジョウの半数性配偶子を受精することにより、クローン二倍体由来のゲノムを 2 セット、両性生殖二倍体由来のゲノムを 1 セット持つ三倍体を作成した。これらの三倍体を成熟させたところ、これらは 1n 卵を産した。そこで、それら 1n 卵を正常な両性生殖二倍体より得た 1n 精子と

受精し二倍体子孫を作成し、マイクロサテライトDNAマーカーの分離を解析した。その結果、三倍体を作る時に用いたドジョウのクレードにより、伝達されるアレルが異なった。この現象は、クローンがAおよびBクレードからの2nゲノム(AB)を持つと考え、三倍体(AABあるいはABB)では、相同性の高い染色体間(たとえばA-A)で対合が起こり、異質な染色体(たとえばB)が排除されると考えると、よく説明ができる。したがって、「減数分裂型雑種発生 meiotic hybridogenesis」により三倍体が半数性配偶子を作ることが明らかになった。

その他：クローン由来の二倍体-三倍体モザイク雌について、どのような卵を形成するか調査したところ、1n卵、クローン2n卵、非還元3n卵を同時に形成することが分かった。2n卵はクローン由来生殖細胞に、1n卵と3n卵は三倍体生殖細胞に由来すると推察された。通常ドジョウの1n卵を起源不明の自然四倍体の2n精子で受精後、第二極体放出阻止により新四倍体neo-4nドジョウ系統を作成した。

(2) 特殊な生殖の分子細胞機構

非還元卵形成機構：クローン雌の卵母細胞卵核胞における二価染色体数が、両性生殖二倍体の倍の50であったこと、卵核胞崩壊後第一極体を放出し、その後、第二減数分裂中期で排卵されることから、減数分裂前核内分裂(premitotic endomitosis)の機構により、全染色体が倍加し、これら姉妹染色体があたかも相同染色体のように複製・対合して、擬似的な減数分裂を行うことにより、二倍体のクローンが非還元の2n卵を産むことが明らかになった。

非還元精子形成機構：性転換クローン雄の精巣を材料とした。染色体観察を行ったところ、体細胞分裂像に、ドジョウは2n=50であるにも関わらず、2n分裂像のほか、4n(染色体数100)が多く見られた。減数分裂像をみると、25の二価染色体ではなく、50の二価染色体を示す像が多く見られた。したがって、2n精子も卵形成の場合と同様に、減数分裂前の核内分裂により形成されることが明らかになった。次に、このような現象が何時起きているかを明らかにするため、精巣を組織学的・免疫組織化学的に観察し、A型精原細胞を除くほとんどの時期で核サイズの増大(染色体倍加)が生じていることが分かった。初期精原細胞に特異的な抗体を用いて、フローサイトメトリーを行ったところ、これらの細胞でDNA量の倍加が起きていることが確認できた。従って、A型精原細胞において、核内分裂により、染色体倍加による四倍体精原細胞が生じ、このことが2n精子を作る機構であることが判明した。

雌性発生機構：1n正常精子で受精後、細胞学的組織学的に受精卵を追跡したところ、侵入した精子は多く凝縮したままで雄性前核を形成しないことが自然雌性発生の機構であることが判明した。偶然、1n精子が卵割前に前核化した場合は三倍体に、卵割後の割球で前核化した場合は、二倍体-三倍体モザイクとなることが推定できた。

分子機構：クローンと正常な二倍体の間で、A型精原細胞について発現量に差のある遺伝子群を差別化したcDNAライブラリーを作製し、差のあった77遺伝子の部分配列を明らかにした。卵についても、同様のアプローチにより発現差のあった37遺伝子の部分配列を明らかにした。

(3) 特殊な生殖様式の再現実験

遺伝地図：特殊な生殖様式の検討ならびにその起源の解析には、対象とするドジョウのゲノム構造の理解が必要なことから、マイクロサテライトDNAマーカーを開発し、約160マーカーによる27連鎖群からなる遺伝地図を構築した。また、人為雌性発生二倍体を用いたhalf-tetrad分析から、各連鎖群の動原体の位置も推定した。

集団解析：ドジョウの集団構造を明らかにするため、54集団についてミトコンドリアDNA調節領域のRFLPあるいは塩基配列解析をおこなった。その結果、日本のドジョウは種レベルに相当する分化を示す、二つのクレードAとBに分けられ、北海道北部ならびに石川県にのみ産するクローンは、北海道北部の両性生殖のドジョウとともに前者に包含された。

Bはさらに、B1とB2のサブクレードに分けられ、後者は関東・東海・甲信越に日本列島を分断する形で分布した。これ以外の各地にはB1のドジョウが生息した。現在進行中の中国ドジョウの検討(未発表データ)からは、B2サブクレードは、日本の国内市場に見られる自然四倍体を含み中国の中央部に由来する可能性が示唆されている。すなわち、ドジョウの集団構造は複雑であり、異なる集団間の交雑がクローン等形成に関与する可能性が示唆された。

種間交雑実験：ドジョウと近縁なカラドジョウの人為交雑と染色体操作により作出した雑種二倍体雄は減数分裂により1n精子を、雑種三倍体雄は雑種発生の様式により1n精子を形成する場合が見られた。さらに、自然四倍体フナ雄の2n精子と正常キンギョ1n卵との受精に由来する三倍体雄は1.5n精子を産生した。従って、これらの種間雑種では、非還元配偶子形成や雌性発生を再現できなかった。

サケ科においては、生鮮あるいは凍結保存精子を用いて、10の組み合わせで人為交雑を

行い、生じる胚について細胞遺伝学的な分析を行った。作出したサクラマス *Oncorhynchus masou* × カワマス *Salvelinus fontinalis* 雑種雄について生殖特性を調査したところ、ごく少数の雄において、非還元精子形成の可能性が示唆された。雑種雌も含め、これらの交雑種を現在も継続して飼育中である。

集団間交雑：ミトコンドリアDNA調節領域の解析から遺伝的に大きく異なることが明らかになったクレードAの北海道女満別町（現：大空町）とクレードB1の岩見沢市北村のドジョウの間で集団間交雑を行った。交雑F1雌を成熟期まで飼育して、調べたところ、非還元2n卵のみを産む個体と多数の1n卵と少数の2n卵を同時に産む個体が見られた。従って、集団間の交雑により非還元卵形成を誘導できた。しかし、これらの非還元2n卵は精子を取り込み三倍体へと発生し、自然の雌性発生は生じなかった。雑種雄の精液には半数性、二倍性、四倍性の細胞が認められたが、接水後、活発な運動を示す精子あるいは精子様細胞は著しく少なかった。しかし、人工授精により、ごく僅かの二倍体および三倍体個体が出現し、DNAマーカーの解析の結果、少量の1nおよび2n精子形成が起きていることが判明した。以上のことから、遺伝的に異なるゲノムを有する集団（あるいは種）間の交雑により、特殊な生殖を再現する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計14件）

- ① 荒井克俊：ドジョウの倍数性とクローン、それらの特殊な生殖様式。動物遺伝育種37(1)：印刷中（2009）査読有
- ② Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K: A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. *Animal Reproduction Science*, in press (2009) 査読有 DOI 10.1016/j.anireprosci.2009.02.021
- ③ Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Saito T, Kobayashi T, Yamaha E, Arai K: Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. *Biology of Reproduction*, 80 : 973-979 (2009) 査読有 DOI 10.1095/biolreprod.108.075150

- ④ Arias-Rodriguez L, Morishima K, Arai K: Inter-populational difference in microsatellite-centromere map distances in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol Res*, 56:126-132 (2009) 査読有 DOI 10.1007/s10228-008-0077-7
- ⑤ Arias-Rodriguez L, Yasui GS, Arai K: Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus* loach. *Genetica*, 136:49-56 (2009), 査読有 DOI 10.1007/s10709-008-9299x
- ⑥ Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K: Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. *CryoLetters* 29(5), 383-390 (2008) 査読有
- ⑦ Fujimoto T, Yasui GS, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K: Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female and *M. mizolepis* male. *J Appl Ichthyol* 24, 430-437 (2008) 査読有 DOI 10.1111/j.1439-0426.2008.01131.x
- ⑧ Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Arias-Rodriguez L, Yamaha E, Arai K: Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: a review. *J Appl Ichthyol* 24, 410-414 (2008) 査読有 DOI 10.1111/j.1439-0426.2008.01129.x
- ⑨ Morishima K, Yoshikawa H, Arai K: Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity*, 100, 581-586 (2008) 査読有 DOI 10.1038/hdy.2008.17
- ⑩ 李雅娟, 印傑, 王嘉博, 袁旭, 魏傑, 孫効文, 荒井克俊: 中国におけるドジョウ倍数体の分布に関する研究. *日本水産学会誌*, 74(2), 177-182 (2008) 査読有
- ⑪ Morishima K, Nakayama I, Arai K: Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica* 132, 227-241 (2008) 査読有 DOI 10.1007/s10709-007-9165-2

⑫Morishima K, Nakamura-Shiokawa Y, Bando E, Li YJ, Boron A, Khan MMR, Arai K: Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Genetica* 132, 159-171 (2008) 査読有 DOI 10.1007/s10709-007-9158-1

⑬Fujimoto T, Sakao S, Yamaha E, Arai K: Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. *J Exp Zool*, 307A, 449-462 (2007) 査読有 DOI 10.1002/jez.398

⑭Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Yamaha E, Arai K: Simultaneous formation of haploid, diploid and triploid eggs in diploid-triploid mosaic loaches. *J Fish Biology*, 71(Supplement B), 250-263 (2007) 査読有 DOI 10.1111/j.1095-8649.2009.01608.x

[学会発表] (計 20 件)

① 李雅娟, 荒井克俊: 外来倍数体ドジョウの起源. 平成 21 (2009) 年度日本水産学会春季大会, 2009 年 3 月 28 日, 東京海洋大学品川キャンパス, 東京都.

② Li YJ, Sun XW, Yuan X, Li Y, Arai K: Genetic differentiation inferred from sequences of mitochondrial DNA control region of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. 5th World Fisheries Congress, Oct 21-22, 2008, Pacifico Yokohama, Yokohama.

③ Abe S, Fujiwara A, Ito D, Sato K, Yamaguchi M, Zheng L, Kimura S, Yamaha E: Molecular cytogenetics of viable and inviable salmonid hybrids. 5th World Fisheries Congress, Oct 22, 2008, Pacifico Yokohama, Yokohama.

④ Arai K, Morishima K, Yoshikawa H, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Yamaha E: Genetic markers, mapping and manipulation for analyses of mechanisms of atypical reproduction in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. 5th World Fisheries Congress, Oct 22, 2008, Pacifico Yokohama, Yokohama.

⑤ 荒井克俊, 森島輝, 吉川廣幸、李雅娟:

クローンドジョウの起源. 日本動物学会北海道支部第 5 4 回大会, 2008 年 8 月 9 日, 北海道大学学術交流会館, 札幌

⑥ Arai K: Genetic marker, map and manipulation in aquatic species. *World Aquaculture* 2008, May 23, 2008, Busan, Korea.

⑦ 藤本貴史, Yasui GS, 吉川廣幸, 山羽悦郎, 荒井克俊: 雑種と異質三倍体は借り腹生産の不妊化宿主として有効か? 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 2008 年 3 月 30 日, 東海大学海洋学部, 静岡市

⑧ アリアスーロドリゲス レニン, 森島輝, 荒井克俊: ドジョウ集団間におけるマーカー動原体間地図距離の相違. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 2008 年 3 月 28 日, 東海大学海洋学部, 静岡市

⑨ 藤本貴史・Yasui GS, 吉川廣幸, 山羽悦郎, 荒井克俊: ドジョウ雌とカラドジョウ雄間の雑種・異質三倍体は不妊か? 平成 19 年度日本水産学会秋季大会, 2007 年 9 月 27 日, 北海道大学水産学部, 函館市

⑩ 吉川廣幸, 森島輝, 藤本貴史, 荒井克俊: クローン四倍体ドジョウは減数分裂により二倍体精子をつくる. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会, 2007 年 9 月 27 日, 北海道大学水産学部, 函館市

⑪ Yasui GS, 藤本貴史, 荒井克俊: ストローとドライアイスを用いた冷却速度制御による精子凍結保存の新方法. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会, 2007 年 9 月 27 日, 北海道大学水産学部, 函館市

⑫Fujimoto T, Yasui GS, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K: Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female and *M. mizolepis* male. The 1st International Workshop on the Biology of Fish Sperm, August 29, 2007, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, University of South Bohemia, Vodnany, Czech.

⑬ Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, Arias-Rodriguez L, Yamaha E, Arai K: Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: a review. The 1st

International Workshop on the Biology of Fish Sperm, August 29, 2007, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, University of South Bohemia, Vodnany, Czech.

- ⑭ 森島輝, 荒井克俊: 自然クローンドジョウの非還元卵形成とゲノムセット構成の関係. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 2007 年 3 月 28 日, 東京海洋大学、東京
- ⑮ アリアスーロドリゲス レニン, 荒井克俊: ドジョウの地域集団間雑種第一代に見られた非還元 2n 卵形成. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 2007 年 3 月 28 日, 東京海洋大学、東京
- ⑯ アリアスーロドリゲス レニン, 楠田聡, 荒井克俊: ドジョウの地域集団間雑種はごく少量の 1n および 2n 精子をつくる. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 2007 年 3 月 28 日, 東京海洋大学、東京
- ⑰ 藤本貴史, 吉川廣幸, 森島輝, 山羽悦郎, 荒井克俊: 借り腹生産における三倍体の不妊宿主としての有効性. 平成 19 年度日本水産学会春季大会, 2007 年 3 月 28 日, 東京海洋大学、東京
- ⑱ Morishima K, Fujimoto T, Yoshikawa H, Arai K: Recent progress in reproductive biology and genetics of *Misgurnus loaches*. 3rd International Conference, Loaches of the Genus *Cobitis* and Related Genera. Sept 25, 2006, Sibenik, Croatia.
- ⑲ Morishima K, Arias-Rodriguez L, Nakayama I, Arai K: A genetic map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei:Cobitidae). 9th International Symposium Genetics in Aquaculture, June 26-30, 2006, Montpellier, France.
- ⑳ Morishima K, Oshima K, Arai K: Hybridogenesis-like oogenesis in triploid females derived from the clone lineage of *Misgurnus loach*. 9th International Symposium Genetics in Aquaculture, June 28, Montpellier, France.

[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]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 克俊 (ARAI KATSUTOSHI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 00137902

(2) 研究分担者

阿部 周一 (ABE SHUICHI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 80125278

山羽 悦郎 (YAMAHA ETSURO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授
研究者番号: 60191376

村上 賢 (MURAKAMI MASARU)

麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号: 80271360

(3) 連携研究者

なし