

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03935

研究課題名（和文）化学アプローチによる膜蛋白質の動的解析

研究課題名（英文）Analysis of membrane protein dynamics with chemical approaches

研究代表者

菊地 和也（Kikuchi, Kazuya）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：70292951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では独自に開発した化学的な蛋白質修飾法により、膜蛋白質の局在メカニズムを解析できる技術の開発に取り組んだ。成果の第一として、「PYPタグラベル化法」を応用し、Ⅱ型糖尿病に關与する膜蛋白質、グルコース輸送体GLUT4が糖鎖修飾により細胞膜に引き留める機構を調べた。第二として、「BLタグシステム」を用い、膜蛋白質を蛍光プローブで染め分け、蛋白質のリガンド刺激に対する動態解析に取り組んだ。加えて、BLタグシステムを改良し、新たなリガンド構造を用いたプローブを開発した。これらの化学プローブを用い、膜蛋白質の動態や蛋白質間相互作用の解析手法を供出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によって、膜蛋白質が生きた細胞内でどのように振る舞うのかを調べるための道具を提供することが可能となった。例えば、膜蛋白質であるGLUT4の細胞膜に維持される機構はⅡ型糖尿病の発症に關与しており、相互作用に關わる蛋白質を検出する化学プローブはこの機構解明に大きく貢献できることが期待できる。また、がんや免疫応答に關与する受容体を蛍光ラベル化し、イメージングによって解析することで、これらの動態を生きた状態で可視化追跡することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed chemical protein labeling probes and applied them for analyzing the dynamics of membrane proteins in living cells. First, we applied a PYP tag labeling method to investigate why glucose transporter GLUT4 is retained in the plasma membrane by glycosylation. Second, we developed near-infrared and red fluorescent probes based on BL-tag system for imaging membrane proteins and analyzing the dynamics in response to ligand stimulation. In addition, we developed an improved labeling system using new ligand structures and beta-lactamase. Using these chemical probes, we provided a method for analyzing membrane protein dynamics and protein-protein interactions.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：化学プローブ 膜蛋白質 PYPタグ BLタグ

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質は、細胞膜やオルガネラ膜などへ動的に移動することで、生体機能の維持に必須の役割を果たしており、膜蛋白質の動態解明とその解析技術の開発の重要性は益々増している。特に、膜蛋白質の生きた細胞・個体における動態を、その場で解明することが挙げられるようになった。この目的達成には新規の生細胞可視化プローブを化学原理に基づいてデザイン・合成することが非常に有効である。申請者は“生きた状態における生体分子の空間的な局在性とその時間的な変化、量的・質的な変化を解析する手法”を創り出し、直接細胞に応用することに成功してきた。具体的には、見たい蛋白質にタグとなる短い配列を遺伝子工学によって融合して発現させ、タグに特異的に共有結合を形成するプローブによって標識するものである。これまでに申請者らはバクテリア由来の蛋白質 PYP (Photoactive yellow protein) を用いた「PYP タグラベル化法」や β ラクターマーゼの変異体を用いた「BL タグシステム」を用いて蛋白質を特異的にラベルする手法を開発してきた (Figure 1)。

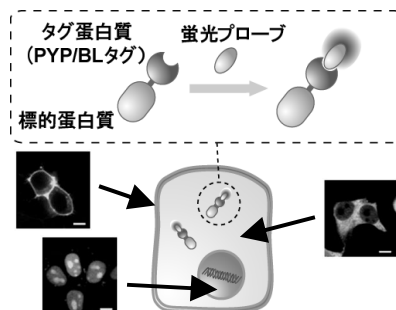


Figure 1. PYP タグラベル化法と BL タグシステムを用いた蛋白質のラベル化

一例として、PYP タグラベル化法を用いたグルコース輸送体 GLUT4 の動態解析について記す。GLUT4 は、血中グルコースを細胞内に取り込むことで血糖値を下げる重要な役割を担っている。GLUT4 は、通常は細胞内小胞に存在し、インスリン刺激時に細胞膜移行しグルコースを取り込む。一方、インスリン抵抗性 2 型糖尿病では、GLUT4 の膜移行が障害されグルコースを効率的に細胞内に取り込むことができない。このため、GLUT4 の動態制御機構を明らかにすることは、糖尿病の発症機構解明や治療にとって極めて重要である。われわれは、発蛍光プローブ (ラベル化時に蛍光が上昇する) プローブを用いることで、迅速に GLUT4 をラベル化することに成功し、GLUT4 の糖鎖修飾が細胞膜への保持に重要な役割を持っていることを初めて明らかにした (*Nat. Chem. Biol.* 2016)。しかしながら、GLUT4 の糖鎖修飾が細胞膜保持に寄与している機構に関しては未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、上記の「PYP タグラベル化法」と「BL タグシステム」の 2 つの蛋白質ラベル化法を用い、膜蛋白質の細胞内ダイナミクスを解析し、イメージングを行うことで初めて明らかに出来る生命現象解明を行う。前者のラベル化法においては、GLUT4 の動態制御機構を明らかにする化学ツールとして、マルチカラー発蛍光プローブ、及び蛋白質間相互作用を光で繋ぐ分子プローブの開発を目的とした。後者のラベル化法においては、自然免疫応答に関与する膜蛋白質である TLR4 の 1 分子イメージング解析を目指し、実験系の構築、及び細胞内外の蛋白質を長時間イメージング可能な新たなラベル化システムの開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) PYP タグラベル化法を用いたマルチカラー発蛍光プローブの開発

PYP タグラベル化法を用いた GLUT4 の機能解析として、細胞膜上に移行した GLUT4 を選択的に迅速、高コントラストに可視化するために、膜非透過性の発蛍光プローブの開発を行った。特にマウスを用いた実験への応用を目指し、近赤外蛍光を示す蛍光色素として、650~700 nm に蛍光発光波長を有する Si ローダミン類の色素を選択した。これらの色素に PYP タグリガンド、消光基であるジニトロベンゼンを導入し、発蛍光プローブを合成した。

PYP タグを組み換え蛋白質として調製し、ラベル化を SDS-PAGE により確認した。また、合成したプローブの発蛍光特性は、蛍光スペクトル測定により調べた。また、培養細胞において GLUT4 をラベルするため、GLUT4 の細胞外ループ部分に PYP タグを融合させたコンストラクトを作製し、この遺伝子を細胞に導入し、プローブによるラベル化を行い蛍光顕微鏡を用いてイメージングを行った。

(2) GLUT4 の糖鎖部分と相互作用する蛋白質を光で繋ぐ分子プローブの開発

GLUT4 の膜局在維持には、GLUT4 の糖鎖と結合する蛋白質分子が関与していると考えられる。そこで、糖鎖結合蛋白質の同定のために、PYP タグラベル化法を用いて GLUT4 の糖鎖近傍部位をラベル化し、GLUT4 と糖鎖結合蛋白質を光架橋するプローブ“光で繋ぐ分子”を設計した。このプローブは蛍光性クマリンを PYP タグリガンドとして、リンカーを介して光架橋分子が連結されている。また、光架橋以外の捕捉方法として、GLUT4 に PYP タグを介してビオチンをラベル化するプローブの開発も行った。PYP タグリガンドにビオチンを連結させたプローブを設計・合成した。相互作用する蛋白質の捕捉、回収は以下の手順で行った。細胞に発現させた PYP-GLUT4 を細胞膜上に移行させて光架橋、もしくはビオチン化プローブでラベル化し、架橋反応を行い、相互作用蛋白質と GLUT4 を結合させた。その後、細胞溶解液からラベル化された PYP-

GLUT4 をストレプトアビジンビーズで捕捉し、PYP-GLUT4 と相互作用する蛋白質を検出した。

(3) BL タグシステムを用いた 1 分子イメージング系の構築

Toll 様受容体 (TLR) は、様々な異物を特異的に感知する受容体ファミリーであり、その一種である TLR4 は LPS を認識するセンサーとして免疫応答に機能する。TLR4 は TIR ドメインを介して TIRAP をはじめとした複数のアダプター蛋白質と相互作用することが知られている。以前に我々のグループではマルチカラー 1 分子イメージングによって TLR4 とそのアダプター蛋白質の相互作用に伴うダイナミクスの変化を 1 分子イメージングによって明らかとしている (*J. Am. Chem. Soc.* 2017)。TLR4 が細胞膜上で脂質ラフトと呼ばれるドメインに非応答、応答時に局在するかどうかは未だ議論されていた。そこで、ラフト局在する蛋白質ドメインを BL タグによってラベル化可能な、ラフト画分可視化プローブの開発を行った。ラフト局在する蛋白質ドメインとして、GPI アンカーや LCK の膜結合ドメインを BL タグに融合したコンストラクトを作製し、生細胞イメージングを行った。

(4) 野生型 β ラクターマーゼを用いた新たなラベル化システムの開発

BL タグシステムでは β ラクターマーゼの変異体と β ラクタム基質のペアを用いているが、リガンドとして用いる β ラクタム基質が化学的に不安定であり、合成過程で酸やアルカリを使えない、長期保存に不向き、ラベル化後の蛋白質複合体からの解離といった課題があった。これらの課題を解決すべく、高いラベル化効率とラベル化保持能を確保するために β ラクターマーゼ阻害剤を用いた新たなラベル化システムを考案した。 β ラクターマーゼ阻害剤は野生型の β ラクターマーゼに対して共有結合を形成することが知られている。特に、近年開発が進んでいるジアザビシクロオクタン (DBO) 構造を有する阻害剤は、高い阻害効率を有することが知られている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012)。そこで、DBO 構造を導入した種々のラベル化プローブを設計・合成した。組み換え蛋白質として調製した野生型および変異型 β ラクターマーゼを用い、蛋白質ラベル化プローブのラベル化能は SDS-PAGE により評価した。また、 β ラクターマーゼを培養細胞において発現させ、これらのプローブにより標識し蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) PYP タグラベル化法を用いたマルチカラー発蛍光プローブの開発

Si ローダミン類の色素を PYP タグリガンドに連結したプローブを合成し、蛋白質ラベル化を確認したところ、PYP タグに相当する分子量の位置に蛍光バンドが観察され、PYP タグをラベル化できることが示された。また、蛍光スペクトルの測定により、ラベル化により色素の蛍光波長に相当する 650~700 nm の波長領域で 30 倍程度の蛍光上昇が観察された。生細胞イメージングにおいても細胞膜、および核に発現させた PYP タグをラベル化し、イメージングできることが示された。

(2) GLUT4 の糖鎖部分と相互作用する蛋白質を光で繋ぐ分子プローブの開発

プローブは、蛍光性 PYP タグリガンドであるヒドロキシクマリン誘導体に水溶性リンカーを介して光架橋剤を導入することで設計した。光架橋剤として、ジアジリン (DA)、トリフルオロメチルフェニルジアジリン (TPD) およびベンゾフェノン (BP) を、ペンタエチレングリコールを介してリガンドにそれぞれ組み込んだ化合物を合成した。これらのプローブは PYP タグを融合した蛋白質を蛍光ラベル化し、照射により DA および TPD はカルベンを、BP はラジカルを生成して近傍の生体分子と共有結合を形成すると考えられる。各プローブと PYP タグを反応させ、SDS-PAGE により解析したところ、ラベル化反応が起こっていることが確認された。これらのプローブは光架橋反応を示したが、GLUT4 に相互作用する蛋白質の検出には反応効率が十分でないという課題があった。

そこで、PYP タグリガンドに水溶性リンカーを介してビオチンを連結させたプローブを合成した。このとき、細胞膜に移行した GLUT4 を選択的にビオチン化できるように、リンカーの間にはスルホ基を導入し、プローブが細胞膜非透過性となるようにした。PYP-GLUT4 を発現している細胞に対してこのプローブを用いて生細胞イメージングを行った。インスリンで PYP-GLUT4 を細胞膜上に移行させ、プローブ及びストレプトアビジンと蛍光色素の複合体を添加した結果、発現している細胞から蛍光が観察された。これにより、このプローブは生細胞中の PYP-GLUT4 をビオチン化できることが分かった。続いて、架橋剤を加えて GLUT4 相互作用蛋白質を捕捉し、ストレプトアビジンビーズにより回収し、ウエスタンブロッティングにより検出を試みた (Figure 2)。その結果、細胞内の GLUT4 貯蔵小胞中に存在している蛋白質が検出された。この他にも GLUT4 と相互作用する蛋白質候補を検出しており、さらなる詳細な解析によって GLUT4 の膜動態における機構を明らかにできるものと考えられる。

(3) BL タグシステムを用いた 1 分子イメージング系の構築

BL タグにラベル化できる β ラクタム基質を有する近赤外蛍光プローブを合成した。また、脂質

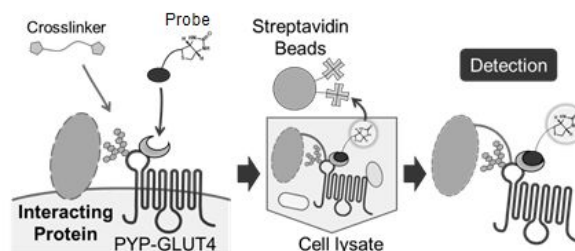


Figure 2. PYP タグを用いた GLUT4 相互作用蛋白質の捕捉と検出

ラフトに局在すると考えられる GPI アンカーや LCK の膜結合ドメインを BL タグに融合したコンストラクトを作製した。合成したプローブを用い、細胞にこれらのコンストラクトを発現させた細胞をラベル化しイメージングを行ったところ、目的とする細胞膜上、および細胞膜内葉から蛍光シグナルが観察された。

(4) 野生型 β ラクタマーゼを用いた新たなラベル化システムの開発

DBO 構造を有する β ラクタマーゼ阻害剤、Relebactam と蛍光色素であるテトラメチルローダミンを縮合させたプローブ RD を合成した (Figure 3)。このプローブは SDS-PAGE 解析結果から、野生型、変異体に関わらず β ラクタマーゼと安定な複合体を形成し、高いラベル化能を有していることが確認された。また、膜蛋白質である上皮成長因子受容体 (EGFR) をラベル化し、長時間イメージングによってその一部が内在化していることも観察できた (Figure 3)。

RD は優れたラベル化能を有している一方、阻害剤由来の負に帯電したスルホン酸を有しているため、細胞膜を透過することができず細胞内の蛋白質のラベル化には利用できない。そのため細胞内蛋白質

をラベル化するにはスルホン酸部分の改変が必要になる。そこでカルボン酸エステルを有するプロドラッグに着目し、新たなプローブ RD2 を設計、合成およびその評価を行った。カルボン酸エステルを有する RD2 は、中性の緩衝液中でエステルの加水分解が徐々に進行していくことが HPLC により確認された。この性質を利用することで、最初はエステル構造のプローブが細胞膜を透過し、細胞内で加水分解が起こり、ラベル化が起こることが期待された。そこで、RD2 を用いて細胞内 (核や細胞膜内葉に局在する) 蛋白質のラベル化を行ったところ、 β ラクタマーゼを発現している細胞から特異的に蛍光シグナルが見られ、高いコントラストでイメージングすることができた。

本研究では、膜蛋白質の動態を調べるため、蛋白質ラベル化能を有する化学プローブを開発し、イメージングや生化学的手法によりその動態を解析できることを示した。今後、これらの化学プローブをさらに深化し、応用研究を進めることで、さまざまな膜蛋白質の動態や蛋白質間相互作用を明らかにできることが期待できる。

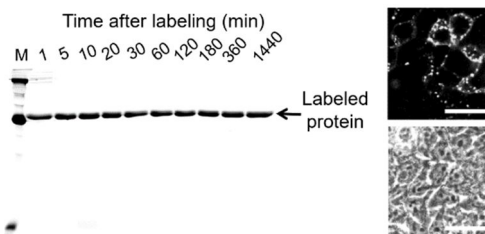


Figure 3. β ラクタマーゼラベル化プローブ (RD) によりラベル化された蛋白質の SDS-PAGE による蛍光検出、 β ラクタマーゼタグを用いた EGFR の生細胞イメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minoshima Masafumi, Kikuta Junichi, Omori Yuta, Seno Shigeto, Suehara Riko, Maeda Hiroki, Matsuda Hideo, Ishii Masaru, Kikuchi Kazuya	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.9b00220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Shimomura Takashi, Bordy Mathieu, Hasserodt Jens, Kikuchi Kazuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Development of Fluorogenic Probes for Rapid High Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 656 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900568	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 該当する
1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Takeuchi Osamu, Kikuchi Kazuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 577 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00696	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 Imoto Takuma, Kawase Akihiro, Minoshima Masafumi, Yokoyama Tatsushi, Bito Haruhiko, Kikuchi Kazuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Photolytic Release of a Caged Inhibitor of an Endogenous Transcription Factor Enables Optochemical Control of CREB-Mediated Gene Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 22 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b03568	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 Benson Sam, Fernandez Antonio, Barth Nicole D., de Moliner Fabio, Horrocks Mathew H., Herrington C. Simon, Abad Jose Luis, Delgado Antonio, Kelly Lisa, Chang Ziyuan, Feng Yi, Nishiura Miyako, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya, Vendrell Marc	4. 巻 58
2. 論文標題 SCOTfluors: Small, Conjugatable, Orthogonal, and Tunable Fluorophores for In Vivo Imaging of Cell Metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6911 ~ 6915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900465	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 該当する

1. 著者名 Akazawa Kazuki, Sugihara Fuminori, Nakamura Tatsuya, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Highly Sensitive Detection of Caspase-3/7 Activity in Living Mice Using Enzyme-Responsive 19F MRI Nanoprobes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1720 ~ 1728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00167	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 Akazawa Kazuki, Sugihara Fuminori, Minoshima Masafumi, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya	4. 巻 54
2. 論文標題 Sensing caspase-1 activity using activatable 19F MRI nanoprobes with improved turn-on kinetics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11785 ~ 11788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc05381b	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 Akazawa Kazuki, Sugihara Fuminori, Nakamura Tatsuya, Matsushita Hisashi, Mukai Hiroaki, Akimoto Rena, Minoshima Masafumi, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya	4. 巻 57
2. 論文標題 Perfluorocarbon Based 19F MRI Nanoprobes for In Vivo Multicolor Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 16742 ~ 16747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201810363	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 Hori Yuichiro, Otomura Norimichi, Nishida Ayuko, Nishiura Miyako, Umeno Maho, Suetake Isao, Kikuchi Kazuya	4. 巻 140
2. 論文標題 Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1686 ~ 1690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b09713	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9件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 New Biological Findings which were Revealed by Designed Fluorescent Probes
3. 学会等名 Chemical Biology & Physiology Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 In vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps
3. 学会等名 16th International, Methods & Applications of Fluorescence (Roger Y Tsien Memorial Symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 In vivo Chemical Probes for MRI and Fluorescence Imaging
3. 学会等名 ICBIC-19, International Conference on Biological Inorganic Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 Development of Multifunctional 19F MRI Contrast Agents Based on Fluorine-encapsulated Silica Nanoparticle
3. 学会等名 The Future of Molecular MR: A Cellular and Molecular Imaging Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地 和也
2. 発表標題 イメージングプローブのデザイン・合成によるケミカルバイオロジー研究
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 New Biological Findings Which Were Revealed by Designed Chemical Probes
3. 学会等名 A3 Meeting for Chemical Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 In Vivo Chemical Probes for MRI and Fluorescence Imaging
3. 学会等名 The 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC IX) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 Development of Multifunctional 19F MRI Contrast Agents Based on Fluorine-encapsulated Silica Nanoparticle
3. 学会等名 Imaging in 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikuchi Kazuya
2. 発表標題 New Biological Findings Which Were Clarified by Designed Chemical Probes
3. 学会等名 MSMLG 2018, 6th International Conference on Molecular Sensors and Molecular Logic Gates (招待講演) (国際学会)
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

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