

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08443

研究課題名(和文) A群連鎖球菌spy1588遺伝子の酸感受性機構と病原性発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the acid-sensitive mechanism and pathogenesis of the Group A Streptococcus spy1588 gene

研究代表者

井坂 雅徳 (Isaka, Masanori)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：40336673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、劇症型を発症するA群連鎖球菌の二成分制御因子SPY1588の酸感受性とその機能と病原性発症機構の解析を実施した。その結果SPY1588は、1)酸性環境下でバイオフィーム産生に関与、2)酸環境下でSPY1588組換えタンパク質が自己リン酸化、3)組換えタンパク質のアミノ酸置換で酸感受性部位とキナーゼドメインが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A群連鎖球菌spy1588遺伝子並びにそのタンパク質SPY1588の酸感受性機構が明らかになると、この感染症の治療の主体である抗生物質投与から、体内の酸性代謝物の改善により、劇症型発症が抑えられることが期待される。現在でもこの感染症による劇症型発症が増加しているため、この結果を治療に反映したい。

研究成果の概要(英文)：Group A Streptococcus produces biofilms in acidic environments. Biofilm is one of the virulence factors. The mechanism of this biofilm production has not yet been elucidated. The mechanism of pathogenesis of the fulminant form of this bacterium has also not yet been elucidated. The two-component regulatory system is a mechanism that sensitizes to external stimuli. We investigated the acid-sensing mechanism of SPY1588, which is involved in biofilm production in acidic environments, and the expression of virulence factors to investigate its relevance to the mechanism of the fulminant form. In this study, SPY1588 was involved in biofilm production under acidic conditions, SPY1588 recombinant protein autophosphorylated under acid conditions, and amino acid substitutions in the recombinant protein revealed the acid-sensitive site and kinase domain.

研究分野：細菌学

キーワード：A群連鎖球菌 二成分制御因子 ヒスチジンキナーゼ バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

A 群連鎖球菌 *Streptococcus pyogenes* の感染は重篤な劇症型を発症し、徐々にその発症者数が増加しているにも関わらず、劇症型の発症機構が解明されていない。また、この劇症型を発症する株に感染している健康人も存在したことから、劇症型株に感染することが発症に必須ではないことも知られている。

そこで、劇症型が発症するには A 群連鎖球菌がヒトへ感染後、劇症型へ変化するための何らかの情報を受け取らなければならないと考えた。ここで外界情報を受け取る二成分制御因子の研究が進んでいる、*Streptococcus mutans* に着目した。A 群連鎖球菌と同属のこの細菌は、乳酸、酪酸を産生し、歯にバイオフィルムを形成して虫歯を増悪させる。この細菌の二成分制御因子は酸感受とバイオフィルム形成に関与する。同様の仕組みが A 群連鎖球菌に存在するかを調べると、A 群連鎖球菌の二成分制御因子の一つである *spy1588* 遺伝子欠損株は、バイオフィルム産生低下、酸抵抗性の低下を示した。

この現象をきっかけに、劇症型発症株では酸を感受する二成分制御因子と、それに関連する遺伝子群に変異が生じていると考え、SPY1588 の病原性発症との関連性を解析した。

### 2. 研究の目的

細菌の二成分制御因子の研究では、よくレギュレータータンパク質欠損株を用いて進められている。この方法では、どのようなリガンドが影響して目的のセンサータンパク質に結合して作用しているか解らない。今回の研究はセンサータンパク質の SPY1588 とその遺伝子である *spy1588* をターゲットとして絞り、A 群連鎖球菌の劇症化との関連性と、酸感受性機構を解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子欠損株の作製

A 群連鎖球菌はゲノム株 SF370 株、劇症型発症株(1529, MDYK)を使用した。これらの二成分制御因子センサータンパク質遺伝子欠損株は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を相同組換え法で作製した。

#### (2) SPY1588 組換えタンパク質の作製

SF370 株及び 1529 株由来ゲノムはリゾチーム、界面活性剤処理により抽出、エタノール沈殿法により得た。PCR により *spy1588* を増幅し、pET22b pET32a ベクターヘライゼーション、*E. coli* DH5a へ導入した。その後 *E. coli* BL21(DE3)pLysS ヘプラスミドを再導入した。IPTG で誘導後の大腸菌は超音波処理した。pET22b は膜タンパク質として発現させ、超遠心法と TALON アフィニティーカラムで精製した。

アミノ酸置換を実施した SPY1588 は、pET22b ベクターに導入した *spy1588* に PCR 法で遺伝子置換を実施したのち、上記同様の方法でタンパク質を精製した。

結晶解析用のタンパク質は部分的なドメインでタンパク質発現を実施した。使用したベクターは pET32a で、このベクターに SPY1588 の細菌内ドメインと細菌外ドメインに相当する遺伝子を導入した。ベクターを導入した大腸菌 *E. coli* BL21(DE3)pLysS は、IPTG 誘導、超音波破碎を実施後、TALON アフィニティー、陰イオン交換アフィニティークロマトグラフィー、S protein agarose でタンパク質の精製を実施した。

#### (3) タンパク質の立体構造の予測

組換えタンパク質の立体構造を予測し、酸感受性部位の特定やヒスチジンキナーゼドメインを予測するためにウェブサイト I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) を使用した。予測された立体構造を元に酸感受性部位を CuMo12 により表面静電ポテンシャルを計算し、酸感受性部位を求めた。

#### (4) タンパク質二次構造の解析

精製した SPY1588 は、抽出精製段階で変性してしまう可能性が高い。そこで精製タンパク質の二次構造が保持を、円二色性分散計 (CD スペクトル) により解析した。精製 SPY1588 は、CD スペクトル測定装置で波長 (198nm - 250nm) を測定した。

#### (5) 自己リン酸化活性

精製 SPY1588 は、人工脂質によりリポソームに取り込んだ。中性付近から酸性付近までの pH 環境下にリポソームを浮遊させ、ガンマ 32P-ATP と共に自己リン酸化を実施した。自己リン酸化

後 SDS-PAGE で分離し、BAS-1800 で測定した。

同様に、上記リポソームを中性付近から酸性付近までの pH 環境下に浮遊させ、ADP-Glo Kinase Assay Kit により、キナーゼ活性で消費した ATP 代謝物の ADP を測定し、間接的に SPY1588 の自己リン酸化を測定した。

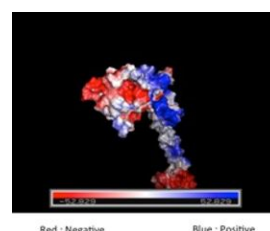
#### (6) プロモーター活性

A 群連鎖球菌の毒素産生は Mga (*mga* 遺伝子) により調節されている。酸性環境下のバイオフィーム産生は、この仕組みを利用していると報告されている。そこで SPY1588 と Mga がバイオフィーム産生に關与するかを検討するために、*mga* プロモーター活性を測定した。*spy1588* 遺伝子欠損株と野生株 (1529) へ *mga* 遺伝子のプロモーター部位とルシフェラーゼ遺伝子を結合したプラスミドを導入した。酸性環境下でルシフェラーゼ活性を発光プレートリーダーで測定した。

## 4. 研究成果

(1) ウェブサイト I-Tasser による SPY1588 の立体構造予測と、CuMol2 による静電ポテンシャルの計算結果を示した。このグラフの赤の部分は、酸性状況下の時に SPY1588 が正電荷を帯びる領域と予測された (図 1)。

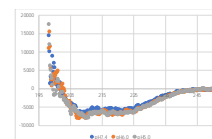
図 1



精製 SPY1588 の立体構造が保持されているかを CD スペクトルで検討した。変性してしまうとスペクトルが観察されないが、精製 SPY1588 ではスペクトルが観察された。pH を変化させたが、その変化による差は見られなかった (図 2)。

(2) 上記の正電荷を示したアミノ酸位置を求めた後、pET22b ベクタ

図 2



導入した *spy1588* 遺伝子にアミノ酸置換を導入し、それらの組換えタンパク質をリポソーム化後、ガンマ 3 2 P-ATP で自己リン酸化を実施した。アミノ酸置換を実施していない SPY1588 は pH6.0 付近で自己リン酸化が強く現れた (図 3)。また、アミノ酸置換を導入した SPY1588 では D111N, E143Q で自己リン酸化が阻害された (図 3)。そして、キナーゼのリン酸化の本体と考えられるヒスチジン残基を H393Q に

置換すると、自己リン酸化は阻害された (図 3)。また、間接的な自己リン酸化活性を ADP-Glo Kinase Assay Kit で測定した結果、pH6.0 付近でキナーゼ活性が有意に上昇した (図 4)。

図 3

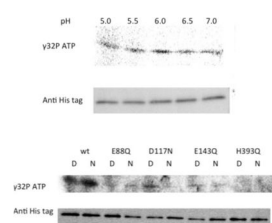
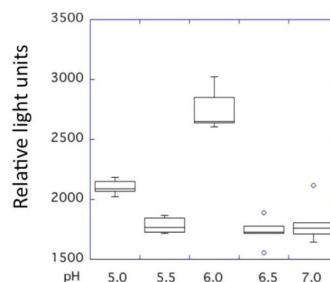


図 4



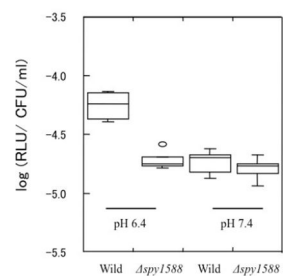
(3) A 群連鎖球菌の産生する毒素は Mga によって調節されている。SPY1588 が酸を感受後にバイオフィームを産生する時に、Mga を経由していることが考えられる。そこで Mga のプロモーター活性を酸環境下で測定した。*spy1588* 欠損株では野生株に比してプロモーター活性が低下した。この現象は中性環境下では見られなかった (図 5)。

SPY1588 が酸環境下で産生するバイオフィームを LC-MS で解析し、Emm (*emm* 遺伝子) と同定できた。Emm は上記 Mga によって発現制御されている。さらにリアルタイム PCR で確認すると、酸性環境下の *emm* は中性付近の環境下に比べて遺伝子発現が増加していることが明らかとなった。さらに SPY1588 のアミノ酸番号 D111N 及び E143Q のアミノ酸置換を導入した A 群連鎖球菌のバイオフィーム産生を観察した。

その結果、酸性状況下でバイオフィーム産生は低下した。これらの結果から、A 群連鎖球菌の二成分制御因子のセンサータンパク質 SPY1588 は酸環境下で、アミノ酸番号 D111 及び E143 でプロトンを認識し、バイオフィーム産生を活性化することが明らかとなった。

以上の結果を総合すると、A群連鎖球菌は酸性環境下で SPY1588 センサータンパク質で反応し、Mga を経由して Emm によるバイオフィルムを産生することが明らかとなった。

図 5



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tatsuno Ichiro, Isaka Masanori, Hasegawa Tadao	4. 巻 -
2. 論文標題 A greater effect on clarithromycin resistance of mef associated msr than mef associated msr in Streptococcus pyogenes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12974	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 Isaka Masanori, Okamoto Akira, Miura Yutaka, Tatsuno Ichiro, Maeyama Jun-ichi, Hasegawa Tadao	4. 巻 89
2. 論文標題 Streptococcus pyogenes TrxSR Two-Component System Regulates Biofilm Production in Acidic Environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00360-21	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 Tatsuno Ichiro, Niimi Yuna, Tomita Makoto, Terashima Hiroshi, Hasegawa Tadao, Matsumoto Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of transient photothermal inactivation of bacteria using a wavelength-tunable nanosecond pulsed laser	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01543-5	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 Maeyama Jun-ichi, Iho Sumiko, Suzuki Fumiko, Hayashi Daisuke, Yamamoto Toshiko, Yamazaki Toshio, Goto Yoshitaka, Ozeki Yuriko, Matsumoto Sohkiichi, Yamamoto Saburo	4. 巻 128
2. 論文標題 Evaluation of a booster tuberculosis vaccine containing mycobacterial DNA-binding protein 1 and CpG oligodeoxynucleotide G9.1 using a Guinea pig model that elicits immunity to Bacillus Calmette Guerin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tuberculosis	6. 最初と最後の頁 102067 ~ 102067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tube.2021.102067	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 Yanaka Saeko, Nishiguchi Shigetaka, Yogo Rina, Watanabe Hiroki, Shen Jiana, Yagi Hirokazu, Uchihashi Takayuki, Kato Koichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Quantitative Visualization of the Interaction between Complement Component C1 and Immunoglobulin G: The Effect of CH1 Domain Deletion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2090 ~ 2090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042090	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 Kohmura Y, Igami N, Tatsuno I, Hasegawa T, Matsumoto T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Transient photothermal inactivation of Escherichia coli stained with visible dyes by using a nanosecond pulsed laser	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74714-5.	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 Tatsuki Soyama 1, Akira Sakuragi 1, Daisuke Oishi 1, Yuka Kimura 1, Hiromasa Aoki 1, Akihiro Nomoto 2, Shigenobu Yano 3, Hirota Nishie 4, Hiromi Kataoka 4, Mineyoshi Aoyama 5	4. 巻 14
2. 論文標題 Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 101005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.101005	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 Himari Ogino,1 Tsuzumi Nakajima,1 Yuki Hirota,2 Kohki Toriuchi,3 Mineyoshi Aoyama,3 Kazunori Nakajima,2 and Mitsuharu HattoriCorresponding author1	4. 巻 40
2. 論文標題 The Secreted Glycoprotein Reelin Suppresses the Proliferation and Regulates the Distribution of Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Embryonic Neocortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 7625-7636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0125-20.2020	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 Kohki Toriuchi,1 Hiroki Kakita,1,2 Tetsuya Tamura,3 Satoru Takeshita,1,2 Yasumasa Yamada,2 and Mineyoshi Aoyamacorresponding author1	4. 巻 17
2. 論文標題 Prolonged astrocyte-derived erythropoietin expression attenuates neuronal damage under hypothermic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation.	6. 最初と最後の頁 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-020-01831-3	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 Jun-Ichi Furukawa 1, Hisatoshi Hanamatsu 2, Takashi Nishikaze 3, Hiroshi Many 4, Nobuaki Miura 5, Hirokazu Yagi 6, Ikuko Yokota 1, Keiko Akasaka-Many 4, Tamao Endo 4, Motoi Kanagawa 7 8, Norimasa Iwasaki 1, Koichi Tanaka 3	4. 巻 3
2. 論文標題 Lactone-Driven Ester-to-Amide Derivatization for Sialic Acid Linkage-Specific Alkylamidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anal Chem .	6. 最初と最後の頁 14383-14392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02209.	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 Hirokazu Yagi, Maho Yagi-Utsumi, Rena Honda, Yusaku Ohta, Taiki Saito, Miho Nishio, Satoshi Ninagawa, Kousuke Suzuki, Takahiro Anzai, Yukiko Kamiya, Kazuhiro Aoki, Mahito Nakanishi, Tadashi Satoh & Koichi Kato	4. 巻 11
2. 論文標題 Improved secretion of glycoproteins using an N-glycan-restricted passport sequence tag recognized by cargo receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15192-1	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 Tatsuno I, Isaka M, Matsumoto M, Hasegawa T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Prevalence of emm1 Streptococcus pyogenes having a novel type of genomic composition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 413-426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12739.	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 Tatsuno I, Isaka M, Matsumoto M, Nishio N, Matsui H, Hasegawa T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of emm1 Streptococcus pyogenes 10-85, a Strain Isolated from a Patient with Streptococcal Toxic Shock Syndrome in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc	6. 最初と最後の頁 e00453-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00453-19.	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 Hasegawa T, Matsumoto M, Hata N, Yano H, Isaka M, Tatsuno I.	4. 巻 127
2. 論文標題 Homologous role of CovRS two-component regulatory system in NAD(+) -glycohydrolase activity in Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis as in Streptococcus pyogenes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 APMIS	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apm.12914.	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 Hasegawa T, Matsumoto M, Hata N, Yano H, Isaka M, Tatsuno I.	4. 巻 127
2. 論文標題 Homologous role of CovRS two-component regulatory system in NAD+ -glycohydrolase activity in Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis as in Streptococcus pyogenes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 APMIS	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apm.12914.	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 Tatsuno I, Isaka M, Masuno K, Hata N, Matsumoto M, Hasegawa T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Functional Predominance of msr(D), Which Is More Effective as mef(A)-Associated Than mef(E)-Associated, Over mef(A)/mef(E) in Macrolide Resistance in Streptococcus pyogenes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microb Drug Resist.	6. 最初と最後の頁 1089-1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2017.0277.	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立野 一郎, 井坂 雅徳, 松本 昌門, 長谷川 忠男
2. 発表標題 Prevalence of emm1 Streptococcus pyogenes having a novel type of genomic composition
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前山 順一, 林 大介, 山本 十糸子, 大石 紳二, 山崎 利雄, 尾関 百合子, 鈴木史子, 伊保澄子, 松本壮吉, 山本三郎
2. 発表標題 新規結核菌抗原と DNA アジュバントからなる成人肺結核に対する プースターワクチンの開発
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井坂 雅徳, 立野 一郎, 前山 順一, 長谷川 忠男
2. 発表標題 A 群連鎖球菌二成分制御因子 SPY1588 の酸感受性と自己リン酸化について
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前山 順一, 伊保 澄子, 山本 三郎
2. 発表標題 新規 A 型 CpG-DNA G9.1 のアジュバント作用におけるインターフェロンアルファの関与
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立野一郎, 井坂雅徳, 松本昌門, 長谷川忠男
2. 発表標題 Prevalence of emm1 Streptococcus pyogenes having a novel type of genomic composition
3. 学会等名 第56回 日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井坂雅徳, 立野一郎, 前山順一, 長谷川忠男
2. 発表標題 A群連鎖球菌二成分制御因子SPY1588の酸感受性と自己リン酸化
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 リン・マクタガート, 島津 公美	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ダイヤモンド社	5. 総ページ数 384
3. 書名 パワー・オブ・エイト	

〔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	長谷川 忠男  (Hasegawa Tadao)  (10314014)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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	前山 順一  (Maeyama Jun-ichi)  (40199641)	国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官    (82603)	
研究分担者	立野 一郎  (Tatsuno Ichiro)  (50311642)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師    (23903)	
研究分担者	青山 峰芳  (Aoyama Mineyoshi)  (70363918)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授    (23903)	
研究分担者	矢木 宏和  (Yagi Hirokazu)  (70565423)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・准教授    (23903)	

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