様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　５月３１日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１９１７０

研究課題名（和文）超好熱性古細菌膜脂質を使った大腸菌の細胞膜エンジニアリング

研究課題名（英文）Cellular membrane engineering of Escherichia coli using membrane lipids from hyperthermophilic archaea

研究代表者
邊見　久（Hemmi, Hisashi）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：６０３０２１８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：超好熱性古細菌Aeropyrum pernixの持つ、炭化水素鎖の長いイソプレノイド膜脂質を大腸菌に大量生産させ、その膜の物性を変化させる「細胞膜エンジニアリング」技術の確立を目指して研究を進めた。同時期にA. pernixから新奇なイソプレノイド生合成前駆体供給経路である古細菌型メバロン酸経路を見出したため、イソプレノイドの微生物生産に対する同経路の導入の効果を検討した結果、準嫌気条件で宿主を培養した場合にイソプレノイド生産が向上することが示された。また、A. pernixと他生物の遺伝子を組み合わせて大腸菌に導入することで、より長い炭化水素鎖を持つ非天然型古細菌膜脂質の合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で取り扱った古細菌型メバロン酸経路は、既知のメバロン酸経路と比べ、エネルギー低消費型の代謝経路である。そのため、薬品や工業原料などの有用化合物を多く含むイソプレノイドの微生物生産に同経路を利用することで、宿主から生育に必要なエネルギーを大量に奪うことなく物質生産をさせることが可能になるかもしれない。また、本研究で合成に成功した非天然型古細菌膜脂質は、より厚く安定な細胞膜を構成することが予想される。したがって、大腸菌などの生体膜の性質を変化させて強い微生物を作る「細胞膜エンジニアリング」を今後確立する上で有用なツールとなりうる。

研究成果の概要（英文）：The research was aimed at the establishment of "cell membrane engineering" technology that might enable to change the properties of E. coli membrane by overproducing isoprenoid membrane lipid from a hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix, which has long hydrocarbon chains. At the same time, we discovered the archaeal mevalonate pathway, which was a novel pathway that supplies biosynthetic precursors for isoprenoid. Thus, we examined the effect of the introduction of the pathway on microbial production of isoprenoid and therefore proved the increase in isoprenoid production when the host was cultivated semi-anaerobically. In addition, we succeeded in synthesizing an unnatural archaeal membrane lipid that has a long hydrocarbon chain by introducing genes from A. pernix and other organisms in combination into E. coli.

研究分野：酵素化学

キーワード：古細菌　古細菌膜脂質　イソプレノイド　メバロン酸経路　細胞膜　細胞膜エンジニアリング

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

(1) 我々は以前より、真正細菌および真核生物の脂質とは大きく異なる構造的特徴を有する古細菌膜脂質（C20,C20-古細菌膜脂質）の生合成機構を解明し、それらを微量ながら大腸菌に生産させることに成功していた。さらに我々は、超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* より、より長い炭化水素鎖を有する C25,C25-古細菌膜脂質の生合成酵素の同定と、それらの酵素を用いた大腸菌における同脂質の生産にも成功し、これを研究開始直前に報告している。この超好熱性古細菌由来膜脂質は通常より厚い脂質二重膜を構成する。したがってその利用により、イオンや小分子に対する透過性が低い、「強い」生体膜が構築できるのではないかと期待された。

(2) 古細菌膜脂質は、カロテノイド色素などと同様に、イソプレノイドという巨大な化合物群に分類される。大腸菌などの微生物においてイソプレノイドを大量生産させる場合、しばしば用いられる手法は、真核生物由来のイソプレノイド前駆体供給経路である、メバロン酸経路の導入であった。この手法は、代謝工学によりイソプレノイドの微生物生産の増強を図る際のゴールデンスタンダードとして広く利用されている。我々は、以前より古細菌の多くが特異的に有する変形メバロン酸経路の解明を進めており、新たな酵素や経路を見出すとともに、そのイソプレノイド生産への応用の可能性を模索していた。

２．研究の目的

(1) 超好熱性古細菌膜脂質を大腸菌に大量生産させ、それにより大腸菌の生体膜の物性を変化させることを目的とした。超好熱性古細菌の細胞膜は温度変化に伴う透過性の変動がわずかであり、そのため高熱環境でもイオン濃度勾配を失わない。したがって、温度変化のみならず、塩や有機溶媒に対する耐性の向上した大腸菌細胞が構築できるのではないかと期待した。また、より強く膜の物性に影響するような構造を持った天然／非天然の膜脂質合成系を構築することも付加的な目的とした。

(2) 成熟型の古細菌膜脂質を生産するには、生合成中間体の炭化水素鎖に存在する複数の二重結合を還元する必要がある。これまでの我々の研究では、この還元反応を大腸菌細胞中で進めるには嫌気的な培養条件が必要なことが明らかにされている。しかし、イソプレノイド生合成は大量のエネルギーを要する過程であり、酸素が利用できない嫌気条件ではその効率が大幅に低下してしまう。古細菌膜脂質の大腸菌における大量生産を進めるためには、この矛盾した条件を両立させる必要があった。この課題を解決するために、古細菌由来の変形メバロン酸経路を利用できないか、その検討についても本研究の目的とした。

３．研究の方法

(1) 超好熱性古細菌 *A. pernix* 由来の C25,C25-古細菌膜脂質の大腸菌における生産システムをより高機能化するため、pET ベクターシステムを用いて発現プラスミドを再構築した。これを既存のメバロン酸経路発現プラスミドなどと共存させ、古細菌膜脂質の生産向上に及ぼす効果を検証した。また、*A. pernix* 由来の C25,C25-古細菌膜脂質生合成遺伝子を、真正細菌である *Bacillus subtilis* 由来の遺伝子と組み合わせて大腸菌に導入することにより、より長い炭化水素鎖を持つ古細菌膜脂質の合成を目指した。

(2) 我々が、後述するように超好熱性古細菌 *A. pernix* より新たに見出した、古細菌型メバロン酸経路の各遺伝子に対応するオルソログ遺伝子を、常温性メタン生成古細菌である *Methanosarcina mazei* より単離した。それらを大腸菌に導入し、イソプレノイド生産の向上に及ぼす効果を検証した。また、先に好熱好酸性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* より見出した変形メバロン酸経路についても、同様の手法により検証を進めた。これらの実験では、過去の同様の目的の研究においてイソプレノイド生産の一般的な指標とされている、カロテノイド色素の生産を指標に用いた。

４．研究成果

(1) 古細菌膜脂質の大量生産による大腸菌生体膜の物性改変

① pET ベクターシステムを用いた C25,C25-古細菌膜脂質の生合成酵素の発現系を構築することで、メバロン酸経路などによる前駆体供給量を反映して膜脂質が大量生産できるようになった。これを後述する変形メバロン酸経路や、メチルエリスリトールリン酸経路などと組み合わせて大腸菌に導入することで、古細菌膜脂質を大腸菌の全脂質量の数%まで向上させることに成功している。現在、生体膜の物性に関する検証を進めている。

② 真正細菌 *B. subtilis* は古細菌膜脂質の生合成中間体に類似した構造の化合物であるプレニル

グリセロールリン酸を合成する酵素PcrBを有している。同酵素と、古細菌由来のC30プレニル二リン酸合成酵素、および *A. pernix* 由来のC25,C25-古細菌膜脂質生合成酵素の遺伝子を大腸菌に導入することにより、非天然型膜脂質であるC30,C25-古細菌膜脂質を生産させることに成功した（図１）。この膜脂質は、一般的なC20,C20-古細菌膜脂質と比較して、単純計算で4割近くも厚い疎水部を持つ脂質二重膜を構成すると考えられ、大腸菌の生体膜に与える影響はC25,C25-古細菌膜脂質と比較しても大きく、細胞膜エンジニアリングの有力なツールとなると期待される。同非天然型膜脂質の大腸菌における大量生産の影響についても検証を進めている。

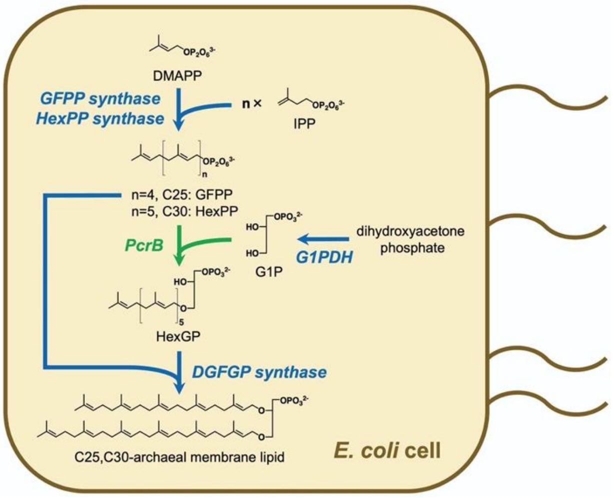

図１　大腸菌におけるC30,C25-古細菌膜脂質の生産

(2) 古細菌型メバロン酸経路のイソプレノイド生産への応用

① 我々は、比較ゲノム解析の結果をもとに、超好熱性古細菌 *A. pernix* より新奇な変形メバロン酸経路を見出し、これを古細菌型メバロン酸経路と命名した（図２）。同経路は既知のメバロン酸経路がATP依存性脱炭酸酵素により触媒しているのと同等の反応を、アコニターゼに類似した脱水酵素と、プレニル化フラビン依存性脱炭酸酵素の組み合わせにより、ATP非依存的に触媒している。これにより、古細菌型メバロン酸経路は、通常のメバロン酸経路と比べてATP消費量が２／３と少ない。この性質は、上述した成熟型古細菌膜脂質の大腸菌における生産に適していることが予想されたが、それだけではなく、一般的に宿主の生育に必要なATPを大量に奪うことになる、イソプレノイドの微生物生産を改良する上で有用だと期待された。最大の天然化合物群であるイソプレノイドには、薬剤や工業原料などの有用物質が多く含まれている。これまでに真核生物型メバロン酸経路を利用して行われていたそのような有用物質の生産を、古細菌型経路の利用によって高効率化できる可能性がある。

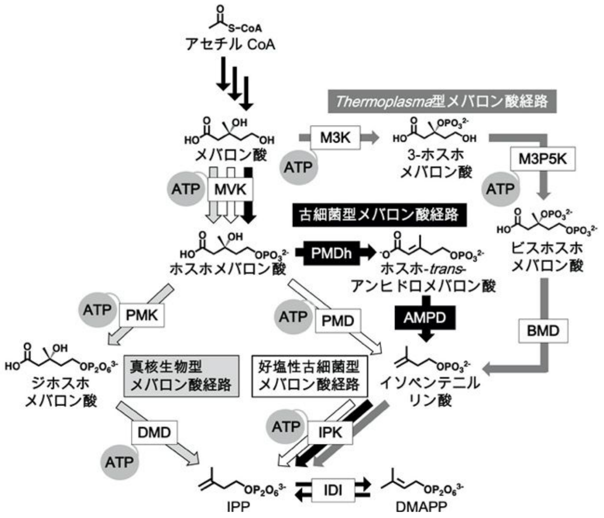

図２　各種メバロン酸経路

そこで、イソプレノイド生産の指標として広く用いられている、赤色カロテノイド色素、リコペンを指標として、古細菌型メバロン酸経路の導入が大腸菌におけるイソプレノイド生産に与える影響を評価した。ただし、超好熱性古細菌である *A. pernix* 由来の酵素が常温菌である大腸菌において十分に機能しないことを想定し、常温性メタン生成古細菌である *M. mazei* より、古細菌型メバロン酸経路の推定遺伝子を単離し、それらを大腸菌に導入した。その結果、好気培養条件ではリコペン生産の向上は確認できなかったが、準嫌気的に大腸菌を培養した場合にのみ、リコペン生産が向上することが明らかとなった。さらに、古細菌型メバロン酸経路の大腸菌における機能は、メチルエリスリトールリン酸経路阻害剤の存在下で、大腸菌の純嫌気条件での生育を相補することによっても確認された。これらの結果は、ATP生産が低下する生育条件において、古細菌型メバロン酸経路が大腸菌内在性のメチルエリスリトールリン酸経路と比べて有利であることを意味しており、先に述べた成熟型古細菌膜脂質の生産においても有効に機能する可能性が高いことを示唆するものであった。

② 同様に、我々が先に *T. acidophilum* より見出していた *Thermoplasma* 型メバロン酸経路（図２）を応用し、大腸菌におけるイソプレノイド生産の向上を図った。指標としてリコペンを用い、真核生物型メバロン酸経路との比較を行った。しかしながら、*Thermoplasma* 型経路の遺伝子の導入ではリコペンの生産量はわずかしか増加しなかった。そこで同経路の酵素であるメバロン酸3-キナーゼの機能を部位特異的変異導入により5-ホスホメバロン酸3-キナーゼへと改変し、他生物由来の酵素と組み合わせて、非天然型の変形メバロン酸経路を構築した。その結果、同経路は真核生物型メバロン酸経路と同程度のリコペン生産増強能力を示した。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計7件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

1．著者名 Yoshida Ryo、Yoshimura Tohru、Hemmi Hisashi	4．巻 86
2．論文標題 Reconstruction of the "archaeal" mevalonate pathway from the methanogenic archaeon Methanosarcina mazei in Escherichia coli cells	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Applied Environmental Microbiology	6．最初と最後の頁 e02889-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02889-19	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 Emi Koh-ichi、Sompiyachoke Kitty、Okada Miyako、Hemmi Hisashi	4．巻 520
2．論文標題 A heteromeric cis-prenyltransferase is responsible for the biosynthesis of glycosyl carrier lipids in Methanosarcina mazei	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6．最初と最後の頁 291～296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.09.143	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 Motoyama Kento、Sobue Fumiaki、Kawaide Hiroshi、Yoshimura Tohru、Hemmi Hisashi	4．巻 未定
2．論文標題 Conversion of mevalonate 3-kinase into 5-phosphomevalonate 3-kinase by single amino acid mutations	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6．最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00256-19	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 Hayakawa Hajime、Motoyama Kento、Sobue Fumiaki、Ito Tomokazu、Kawaide Hiroshi、Yoshimura Tohru、Hemmi Hisashi	4．巻 115
2．論文標題 Modified mevalonate pathway of the archaeon Aeropyrum pernix proceeds via trans-anhydromevalonate 5-phosphate	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6．最初と最後の頁 10034～10039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1809154115	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 Yoshida Ryo、Hemmi Hisashi	４．巻 5
２．論文標題 Construction of an artificial biosynthetic pathway for hyperextended archaeal membrane lipids in the bacterium Escherichia coli	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Synthetic Biology	６．最初と最後の頁 ysaa018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/synbio/ysaa018	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 Okada Miyako、Unno Hideaki、Emi Koh-Ichi、Matsumoto Mayuko、Hemmi Hisashi	４．巻 296
２．論文標題 A versatile cis-prenyltransferase from Methanosarcina mazei catalyzes both C- and O-prenylations	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 100679～100679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100679	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 邊見 久	４．巻 93
２．論文標題 古細菌型メバロン酸経路の発見	５．発行年 2021年
３．雑誌名 生化学	６．最初と最後の頁 221-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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29件（うち招待講演　7件／うち国際学会　5件）

１．発表者名 松嶋夏海、吉村　徹、邊見　久
２．発表標題 古細菌型メバロン酸経路に関与するプレニル化FMN依存性脱炭酸酵素の研究
３．学会等名 日本ビタミン学会第７１回大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 邊見　久
２．発表標題 古細菌に存在する変形メバロン酸経路～その多様性と進化～
３．学会等名 名古屋大学－岐阜大学 微生物系研究室交流会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 松嶋夏海、品田哲郎、吉村　徹、邊見　久
２．発表標題 古細菌型メバロン酸経路に関与するプレニル化FMN依存性脱炭酸酵素の研究
３．学会等名 酵素補酵素研究会2019
４．発表年 2019年

１．発表者名 邊見　久
２．発表標題 超好熱アーキアに見出した「第４の」メバロン酸経路
３．学会等名 シンポジウム「好熱菌研究最前線」in微生物ウィーク2019（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Ryo Yoshida, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi
２．発表標題 Recounstruction of the archaeal mevalonate pathway from the mesophilic methanogenic archaeon Methanosarcina mazei in Escherichia coli cells
３．学会等名 TERPNET 2019　14th International Meeting on the Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids（国際学会）
４．発表年 2019年

1．発表者名
Hisashi Hemmi, Hajime Hayakawa, Kento Motoyama, Fumiaki Sobue, Tomokazu Ito, Hiroshi Kawaide, and Tohru Yoshimura

2．発表標題
Discovery of a “fourth” mevalonate pathway from the hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix

3．学会等名
Thermophiles 2019　15th International Congress on Thermophiles（招待講演）（国際学会）

4．発表年
2019年

1．発表者名
Kitty Sompiyachoke, Koh-ichi Emi, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi

2．発表標題
A heteromeric cis-prenyltransferase from the thermophilic archaeon Archaeoglobus fulgidus: purification and biochemical characterization

3．学会等名
第９２回日本生化学会大会

4．発表年
2019年

1．発表者名
吉田　稜、吉村　徹、邊見　久

2．発表標題
非天然型C25,C30-アーキア膜脂質の生合成経路の構築

3．学会等名
第９２回日本生化学会大会

4．発表年
2019年

1．発表者名
米山　睦、吉村　徹、邊見　久

2．発表標題
超好熱性アーキアAeropyrum pernix由来ホスホメバロン酸デヒドラターゼの解析

3．学会等名
第２９回イソプレノイド研究会例会

4．発表年
2019年

１．発表者名
邊見　久、松嶋夏海、品田哲郎、吉村　徹

２．発表標題
超好熱性アーキアAeropyrum pernix由来ホスホ-trans-アンヒドロメバロン酸デカルボキシラーゼの特性評価

３．学会等名
第２０回極限環境生物学会年会

４．発表年
2019年

１．発表者名
邊見　久

２．発表標題
「緩い」基質認識が可能にするプレニル基転移反応のリデザイン

３．学会等名
生合成リデザイン第7回公開シンポジウム（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
米山　睦、齋藤甲斐、保野陽子、品田哲郎、吉村　徹、邊見　久

２．発表標題
アーキア型メバロン酸経路におけるホスホメバロン酸デヒドラターゼの特性評価

３．学会等名
2020年度日本農芸化学会大会

４．発表年
2020年

１．発表者名
Riko Kuriki, Ryo Yoshida, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi

２．発表標題
Does the archaeal mevalonate pathway exist in an unculturable bacterium, Candidatus Promineofilum breve?

３．学会等名
2020年度日本農芸化学会大会

４．発表年
2020年

１．発表者名
邊見　久

２．発表標題
RIトレーサー実験による古細菌メバロン酸経路の解明

３．学会等名
第４２回国立大学ラジオアイソトープ総合センター長会議（招待講演）

４．発表年
2018年

１．発表者名
吉田 稜，吉村 徹，邊見 久

２．発表標題
C25アーキア膜脂質生合成経路の解明と大腸菌における合成

３．学会等名
日本Archaea研究会第31回講演会

４．発表年
2018年

１．発表者名
青木　瑞希、吉村　徹、邊見　久

２．発表標題
Picrophilus torridus由来 3,5-ビスホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの結晶構造に基づく機能解析

３．学会等名
第２８回イソプレノイド研究会例会

４．発表年
2018年

１．発表者名
吉田 稜，吉村 徹，邊見 久

２．発表標題
C25アーキア膜脂質生合成経路の解明と大腸菌における合成

３．学会等名
2018年度酵素補酵素研究会

４．発表年
2018年

１．発表者名
Kento Motoyama, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi

２．発表標題
Modification of the substrate specificity of mevalonate 3-kinase from a thermoacidophilic archaeon Thermoplasma acidophilum

３．学会等名
Extremophiles 2018: 12th International Congress of Extremophiles（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Hisashi Hemmi, Hajime Hayakawa, Kento Motoyama, Fumiaki Sobue, Tomokazu Ito, Hiroshi Kawaide, and Tohru Yoshimura

２．発表標題
A novel modified mevalonate pathway identified from a hyperthemophilic archaeon Aeropyrum pernix

３．学会等名
Extremophiles 2018: 12th International Congress of Extremophiles（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
岡田美弥子、江見　晃一、海野　英昭、吉村　徹、邊見　久

２．発表標題
幅広い基質特異性を有するcis-プレニルトランスフェラーゼの構造機能研究

３．学会等名
第９１回日本生化学会大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
邊見　久、早川　祝、本山　賢人、祖父江史明、川出　洋、吉村　徹

２．発表標題
超好熱性アーキアから見出された新奇な変形メバロン酸経路

３．学会等名
第９１回日本生化学会大会

４．発表年
2018年

１．発表者名 Hisashi Hemmi
２．発表標題 Creation of mevalonate decarboxylase for the production of a second-generation biofuel, isoprenol
３．学会等名 ノボザイムズジャパンバイオテクノロジーフォーラム2018（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 吉田　稜、吉村　徹、邊見　久
２．発表標題 アーキアに広く保存される「省エネ型」新奇メバロン酸経路を用いた大腸菌でのリコペン生産強化
３．学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 邊見　久
２．発表標題 古細菌型メバロン酸経路の発見
３．学会等名 2019年度日本農芸化学会大会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Ryo Yoshida, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi
２．発表標題 Enhancement of lycopene production in E. coli by introducing the “energy saving” mevalonate pathway conserved in archaea
３．学会等名 2019 SAKURA-Bio Meeting（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 邊見 久、Riko Kuriki、吉田 稜
２．発表標題 未培養真正細菌に存在する古細菌型メバロン酸経路
３．学会等名 第30回イソプレノイド研究会例会
４．発表年 2020年

１．発表者名 米山 睦、三野 広幸、保野 陽子、品田 哲郎、吉村 徹、邊見 久
２．発表標題 超好熱性アーキア由来ホスホメバロン酸デヒドラターゼの活性中心に存在する鉄硫黄クラスターの解析
３．学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
４．発表年 2021年

１．発表者名 松嶋 夏海、栗木 莉子、保野 陽子、品田 哲郎、吉村 徹、邊見 久
２．発表標題 アーキア型メバロン酸経路の鍵酵素ホスホ-trans-アンヒドロメバロン酸デカルボキシラーゼの酵素学的研究
３．学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
４．発表年 2021年

１．発表者名 石橋 裕美、松嶋 夏海、吉村 徹、邊見 久
２．発表標題 Methanosarcina mazei 由来プレニル二リン酸特異的 Nudix hydrolase の機能解明
３．学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
1.新規メバロン酸経路を有する非古細菌生物	邊見　久、早川祝、本山賢人、祖父江史明、吉田　稜	名古屋大学
産業財産権の種類、番号	出願年	国内・外国の別
特許、2018-155000	2018年	国内

〔取得〕　計0件

〔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