

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32651

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0429

研究課題名（和文）アミロイド性バイオフィルムのマトリクス形成制御

研究課題名（英文）Regulation of amyloidogenic biofilm-matrix formation

研究代表者

杉本 真也（SUGIMOTO, SHINYA）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60464393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間：0.1ヶ月

研究成果の概要（和文）：Curliの主要構成成分CsgAを分解するペリプラズム局在プロテアーゼとしてPrcを同定し、その作用機序の一端を明らかにした。また、ペリプラズムにCsgAが過剰に蓄積することを回避するために、CsgAの発現を転写レベルで低下させるネガティブフィードバック機構と細胞外小胞を介してCsgAを細胞外に排出する機構が存在することを明らかにした。さらに、細胞質においてCurliの産生を調節するDnaKシャペロンの補助因子であるJドメインタンパク質の機能的ヒエラルキーという新しい概念を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上の微生物の大部分は固体表面に付着し、自身が産生するマトリクス（多糖・核酸・タンパク質・アミロイド線維など）に覆われながら“バイオフィルム”と呼ばれる集合体を形成して生息している。バイオフィルムが生体内や体内留置型医療デバイスの表面に作られると、バイオフィルム中の菌は抗菌薬や宿主免疫に抵抗性を示すため、難治性感染症の原因になる。本研究で得られた成果は、このようなバイオフィルムに関連した感染症の治療法・予防法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Enteric bacteria synthesize extracellular functional amyloids, curli, during biofilm formation and host colonization. Although aggregation of the major curli subunit, CsgA, is prevented by cytoplasmic and periplasmic molecular chaperones, its degradation in cells remains unclear. Here, using genomically engineered *E. coli* and multicopy-suppressor screening, we discovered that serine proteases Prc is involved in degradation of CsgA in the periplasm. Expression of the *csg* operon is down-regulated at the transcription level under the situations where CsgA aggregates could accumulate in the periplasm. In addition, production of extracellular membrane vesicles was stimulated under the similar situations. Furthermore, we proposed functional hierarchy of J-domain proteins that work with molecular chaperone DnaK in regulation of curli biosynthesis.

研究分野：応用微生物学

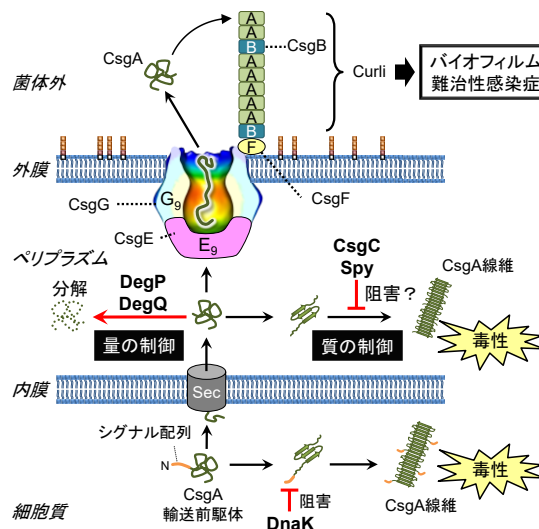
キーワード：バイオフィルム マトリクス 細胞外アミロイド Curli 大腸菌 プロテアーゼ 分子シャペロン ペリプラズム

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

地球上の微生物の大部分は固体表面に付着し、自身が産生するマトリクス（多糖・核酸・タンパク質など）に覆われながら“バイオフィーム”と呼ばれる集合体を形成して生息しているらしい。バイオフィームが生体内や体内留置型医療デバイスの表面に作られると、バイオフィーム中の菌は抗菌薬や宿主免疫に抵抗性を示すため、難治性感染症の原因になる。このようなバイオフィーム関連感染症に対処するためには、バイオフィームの形成メカニズムに基づいた阻害薬開発の戦略が必要である。

Curliは大腸菌などの腸内細菌科細菌によって菌体外に産生されるアミロイド線維である。Curliはこれらの細菌の重要なバイオフィームマトリクス成分であり、尿路感染症や人工デバイス関連感染症と深く関わっている (Olsén *et al. Nature* 1989)。Curliは主要成分 CsgA と補助成分 CsgB が菌の表面でアミロイド線維を形成することで作られる (図)。これらのタンパク質は翻訳後、Sec 膜透過装置を通して細胞質からペリプラズム（大腸菌を含むグラム陰性菌の内膜と外膜の間の領域）へ輸送される。その後、外膜に局在する CsgG のチャネルを通して菌体外へと分泌される。



研究代表者らはこれまでに、細胞質に局在する分子シャペロン DnaK が Curli の形成に必須であることを見出した (Arita-Morioka *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* 2015)。その後の詳細な解析により、DnaK が CsgA のシグナル配列（細胞外に輸送されるための目印）を認識して結合することで、細胞質で CsgA が凝集するのを防ぎ、結果として細胞外へ正しく輸送されることを明らかにした (Sugimoto *et al. Commun. Biol.* 2018)。しかし、内膜と外膜に挟まれたペリプラズムにおける CsgA の質と量を制御する分子機構は良く分かっていなかった。海外の研究グループは、ペリプラズムに局在する分子シャペロン CsgC および Spy が、*in vitro* において CsgA のアミロイド線維形成を抑制することを報告している (Evans *et al. Mol. Cell* 2015)。一方、研究代表者はペリプラズム局在プロテアーゼ DegP および DegQ が CsgA の分解を担う可能性を発見した (Sugimoto *et al. in preparation*)。これらの結果より、ペリプラズムでは分子シャペロン CsgC および Spy が CsgA の質を制御し、プロテアーゼ DegP および DegQ が CsgA の量を調節すると予想されるが、これらの分子シャペロンやプロテアーゼが直接的に CsgA に作用するのかや、分子シャペロンとプロテアーゼの協調性については不明であった。

以上の事より、研究代表者はタンパク質の品質管理の観点から、アミロイド性バイオフィームマトリクスの形成制御機構を解き明かす本研究課題を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子シャペロンおよびプロテアーゼの機能解析を主軸として、Curli を構成するタンパク質の大腸菌細胞内における品質管理機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光標識大腸菌の分子シャペロン・プロテアーゼ遺伝子欠損株の作製と機能解析

sfGFP 融合 CsgA (CsgA-sfGFP) および mCherry 融合 CsgB (CsgB-mCherry) を染色体から発現する大腸菌 (BA-FP 株と略す) を親株として、各種分子シャペロンおよびプロテアーゼ遺伝子欠損株を作製した。その後、作製した株を Curli を産生する条件で培養し、タンパク質の発現量や分解パターンをウェスタンブロッティングで解析した。

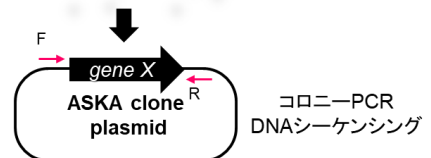
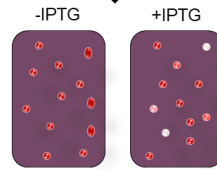
## (2) CsgA の分解を担う第三のプロテアーゼの探索

遺伝子欠損株の解析から、CsgA-sfGFP の約半数は DegP と DegQ によって分解されるが、残り半数は別のプロテアーゼによって分解されることを示唆する結果を得ている。そこで、次のような方法で CsgA の分解を担う第三のプロテアーゼの特定を試みた(図)。まず、大腸菌全 ORF 発現プラスミドライブラリーである ASKA クローンライブラリーを用いて大腸菌 BW25113  $\Delta degP \Delta degQ$  株を形質転換した。その後、得られた形質転換体をコンゴレードを含む寒天培地上で培養し、Curli を産生しないコロニー(白またはピンク色を呈する)を取得した。次に、これらのコロニーに含まれるプラスミド中の遺伝子をコロニーPCR および DNA シーケンス解析で同定した。

ASKAクローンライブラリー (Cm<sup>R</sup>, P<sub>lac</sub>)  
ペリプラズム局在プロテアーゼ遺伝子

↓  
プラスミドプール  
↓  
エレクトロポレーション  
E. coli BW25113  $\Delta degP \Delta degQ$

↓  
塗布  
CR-YECSA plate  
(30  $\mu$ g/ml Cm  $\pm$  IPTG)  
↓  
培養 (3 days, 25°C)



## (3) ペリプラズムプロテアーゼの生化学的機能解析

DegP、DegQ、および第三の CsgA 分解プロテアーゼを大腸菌で大量発現し、精製した。同様に、CsgA と CsgA-sfGFP を精製した。その後、精製したプロテアーゼが CsgA および CsgA-sfGFP を分解するかを *in vitro* で解析した。また、これらのプロテアーゼ遺伝子欠損株における CsgA のタンパク質量をウェスタンブロッティングで評価した。

## (4) ペリプラズムへの CsgA の蓄積に対する大腸菌の応答の解析

大腸菌野生株および種々の遺伝子欠損株における *csgA* mRNA および *csgD* mRNA の量をリアルタイム PCR で測定した。また、これらの株における細胞外小胞の産生を透過型電子顕微鏡 (TEM) や超解像顕微鏡で観察した。

## (5) 細胞質で機能する Jドメインタンパク質の機能解析

これまでに申請者らは、細胞質に局在する分子シャペロン DnaK が Curli の形成に必須であることを見出ししていたが (Arita-Morioka *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; Sugimoto *et al. Commun. Biol.* 2018)、DnaK と協調的に機能する 3 つの Jドメインタンパク質 (DnaJ、CbpA、および DjIA) の重要性は不明であった。そこで、これらの単独または多重遺伝子欠損株を作製し、上記のコンゴレード呈色試験やウェスタンブロッティングで Curli の産生を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) Prc は CsgA を直接分解する

マルチコピーサプレッサースクリーニングの結果、Prc が CsgA の分解に関わる第三のペリプラズム局在プロテアーゼであることを見出した。BA-FP 株における *prc* の単独欠損の効果は *degP degQ* の二重欠損の効果よりも小さかったため、少なくとも CsgA-sfGFP の分解では DegP と DegQ が主に機能すると考えられる。一方、野生株において *prc* を欠損すると凝集体を形成していない CsgA モノマーが検出され、*degP degQ* の二重欠損では野生株と同様にアミロイド線維を形成した CsgA のみが検出された。このことから、ペリプラズムにおける CsgA の分解は主に Prc が担っていると考えられる。

次に、精製した Prc と CsgA を試験管内で混合し、CsgA の分解を経時的に調べたところ、Prc が CsgA を直接的に分解することがわかった。一方、活性中心に変異を導入した Prc<sup>S452A</sup> では CsgA の分解は見られなかった。また、質量分析を用いて分解された断片を詳しく調べた結果、Prc は従来から知られている Tail-specific プロテアーゼのように CsgA の C 末端を分解するのではなく、分子内部の複数の部位を分解することが示唆された。

興味深いことに、Prc はヒトのアルツハイマー病に関わるアミロイド  $\beta$  ペプチド (A $\beta$ <sub>42</sub>) を直接的に分解することがわかった。Prc と相同性を示すヒトのタンパク質を探索したところ、ヒトのアミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質に結合するタンパク質 A と低いながら相同性を示すことを見出した。ヒトのタンパク質 A のリコンビナントを大腸菌で発現・精製し、プロテアーゼ活性を調べたところ、明確なプロテアーゼ活性は認められなかった。一方、ヒトのタンパク質 A は A $\beta$ <sub>42</sub> のアミロイド線維形成を抑制するという新しい機能を見出した。

### (2) DegP および DegQ はアダプタータンパク質 YjfN 依存的に CsgA を分解する

DegP および DegQ は CsgA の C 末端に sfGFP を融合した CsgA-sfGFP を分解したが、native な CsgA は分解しなかった。そこで、DegP および DegQ と協調的に機能するアダプタータンパク質として報告されていた CpxP および YjfN の効果を調べた。その結果、DegP および DegQ は YjfN 依存的に CsgA を分解することがわかった。

### (3) ペリプラズム局在プロテアーゼとペリプラズム局在分子シャペロンは協調的に機能する

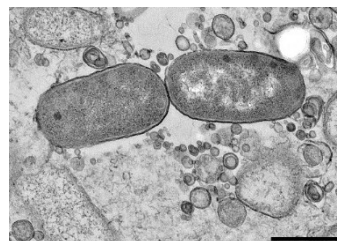
BA-FP 株からペリプラズム局在プロテアーゼ (DegP、DegQ) とペリプラズム局在分子シャペロン (CsgC、Spy) をコードする遺伝子を欠損させ、ウェスタンブロッティングで CsgA-sfGFP の発現量と分解パターンを調べた。その結果、BA-FP  $\Delta degP \Delta degQ$  と BA-FP  $\Delta spy \Delta csgC \Delta degP \Delta degQ$  で CsgA-sfGFP の発現量と分解パターンに違いは見られなかった。そこで、Filter-Trap アッセイで CsgA-sfGFP 凝集体の蓄積を比較した。その結果、BA-FP  $\Delta spy \Delta csgC \Delta degP \Delta degQ$  では BA-FP  $\Delta spy \Delta csgC$  や BA-FP  $\Delta degP \Delta degQ$  よりも CsgA-sfGFP 凝集体の量が増加していた。以上の結果より、ペリプラズム局在プロテアーゼとペリプラズム局在分子シャペロンは協調的に機能して、ペリプラズムへの CsgA-sfGFP 凝集体の蓄積を抑制することがわかった。

#### (4) ペリプラズムに CsgA が蓄積すると Curli 関連遺伝子の発現は転写レベルで低下する

CsgA の分解に関わるペリプラズム局在プロテアーゼ (DegP、DegQ、Prc) の遺伝子を欠損すると、細胞内外の CsgA の量が増加すると予想されたが、ウェスタンブロッティングの結果、むしろ CsgA の量は減少することがわかった。そこで、リアルタイム PCR で *csgA* mRNA および *csgD* mRNA の量を測定したところ、これらの mRNA はペリプラズムに局在する 3 つのプロテアーゼ (DegP、DegQ、Prc) の遺伝子を欠損させた場合や外膜に局在する輸送タンパク質 CsgG の遺伝子を同時に欠損した場合に減少することがわかった。つまり、ペリプラズムに CsgA が過剰に蓄積することを回避するために、Curli 関連遺伝子の発現を転写レベルで低下させるネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

#### (5) ペリプラズムに CsgA が蓄積すると細胞外小胞の産生が亢進する

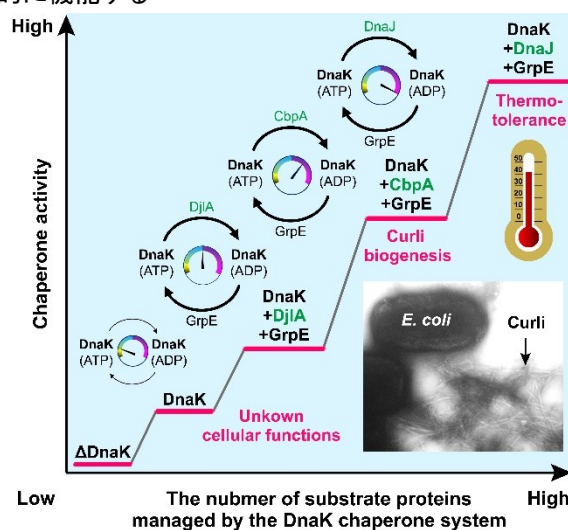
ペリプラズムに CsgA 凝集体が蓄積した場合、細胞外小胞の産生が促進することを見出した。細胞外小胞を精製し、その内部に含まれる CsgA がアミロイド線維を形成しているのか、それとも不定形な凝集体を形成しているのかを超薄切片・透過型電子顕微鏡法で検証した。その結果、明確な線維構造は確認されず、CsgA は不定形な凝集体として細胞外小胞に内包されていることが示唆された。



#### (6) DnaJ と CbpA は Curli の産生において相補的に機能する

作製した遺伝子欠損株を用いて Curli の産生を調べたところ、*dnaJ* と *cbpA* を同時に欠損させた株 ( $\Delta cbpA \Delta dnaJ$ ) と 3 つの J ドメインタンパク質 (JDP) を欠損した株 ( $\Delta cbpA \Delta dnaJ \Delta djIA$ ) で Curli の産生がなくなり、他の単独遺伝子欠損株や多重遺伝子欠損株では Curli の産生が認められた。一方、熱ストレス (43°C) 条件下では、 $\Delta dnaJ$  の生育が著しく低下し、 $\Delta cbpA$  や  $\Delta djIA$  は野生株と同様に生育した。また、 $\Delta cbpA \Delta dnaJ$  と  $\Delta cbpA \Delta dnaJ \Delta djIA$  は  $\Delta dnaJ$  よりも 43°C での生育が悪かった。なお、30°C では全ての遺伝子欠損株は野生株と同様に生育した。

これらのことから、DnaK と協調的に機能する JDP のうち唯一 DnaJ が熱ストレス条件下での生育に必須であるが、細胞外アミロイド線維である Curli の産生には DnaJ と CbpA が相補的に機能することを明らかにした。以上の結果を踏まえ、JDP の機能的ヒエラルキーという概念を提唱した (Sugimoto *et al. J. Mol. Biol.* 2021)。



以上の得られた研究成果について、1 報の原著論文として発表し (Sugimoto *et al. J. Mol. Biol.* 2021)、現在 1 報の論文投稿準備中である。また、国際学会 (Keystone Symposium、EMBO Workshop) および国内学会 (日本細菌学会、日本分子生物学会、日本バイオフィルム学会、21 世紀大腸菌研究会、日本生体防御学会、日本感染症学会、日本化学療法学会など) で発表した。海外共同研究者とは継続して国際共同研究を展開しており、さらなる研究展開と研究交流を実施する。また、分厚いバイオフィルム中のアミロイド性バイオフィルムマトリクスを観察する新規な透明化イメージング法を開発するなど (Sugimoto *et al. Commun. Biol.* 2023)、当初は予想していなかった成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Sugimoto Shinya, Kinjo Yuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Instantaneous Clearing of Biofilm (iCBiofilm): an optical approach to revisit bacterial and fungal biofilm imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-022-04396-4	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 Sugimoto S, Yamanaka K, Niwa T, Terasawa Y, Kinjo Y, Mizunoe Y, Ogura T.	4. 巻 433
2. 論文標題 Hierarchical Model for the Role of J-Domain Proteins in Distinct Cellular Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 166750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2020.166750.	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 杉本 真也	4. 巻 98
2. 論文標題 バイオフィルムの形成メカニズムと制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 6300-6304
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15件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉本 真也, 丹羽 達也, 奈良 萌子, 大瀧 琴音, 山中 邦俊, 金城 雄樹
2. 発表標題 J-domain proteinの機能的ヒエラルキーを規定する分子基盤の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大瀧 琴音, 奈良 萌子, 杉本 真也, 金城 雄樹
2. 発表標題 細胞外アミロイド線維Curliの産生におけるDnaK/Hsp70シャペロンのヌクレオチド交換因子GrpEの必須性の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈良 萌子, 大瀧 琴音, 杉本 真也, 金城 雄樹
2. 発表標題 大腸菌の細胞外アミロイド線維Curliの産生において分子シャペロンDnaKのヌクレオチド交換因子GrpEは必須なのか？
3. 学会等名 第36回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大瀧 琴音, 奈良 萌子, 杉本 真也, 金城 雄樹
2. 発表標題 DnaKシャペロンのヌクレオチド交換因子GrpEは細胞外アミロイド線維の産生に必須ではない
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本 真也, 丹羽 達也, 奈良 萌子, 大瀧 琴音, 山中 邦俊, 金城 雄樹
2. 発表標題 JDPの機能的ヒエラルキーを規定する分子機構の解明
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinya Sugimoto, Yoshimitsu Mizunoe, Yuki Kinjo
2. 発表標題 Maintenance of proteostasis in the periplasm by exclusion of amyloid aggregates via membrane vesicles.
3. 学会等名 EMBO Workshop on Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺澤 友梨香、杉本 真也、山中 邦俊、金城 雄樹
2. 発表標題 大腸菌のペリプラズムにおける菌体外アミロイド形成タンパク質の分解機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本 真也、金城 雄樹
2. 発表標題 バイオフィルム感染症の制圧に向けた基礎研究と応用展開
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第67回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本 真也、金城 雄樹
2. 発表標題 細胞外小胞を介した大腸菌の生体防御機構
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本 真也、山中 邦俊、丹羽 達也、寺澤 友梨香、水之江 義充、小椋 光、金城 雄樹
2. 発表標題 大腸菌のバイオフィルム形成と高温適応におけるJDPの機能的ヒエラルキー
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 休眠と覚醒を繰り返す菌の温床“バイオフィルム”～その形成メカニズムと制御～
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本真也、山中邦俊、小椋光、金城雄樹
2. 発表標題 ペリプラズム局在プロテアーゼによる細菌のアミロイド線維形成の制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本 真也、山中 邦俊、小椋 光、金城 雄樹
2. 発表標題 菌体外アミロイド線維Curliのペリプラズムにおける品質管理機構の解明
3. 学会等名 第15回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Shinya Sugimoto, Kunitoshi Yamanaka, Teru Ogura, Yuki Kinjo
2. 発表標題 The DnaK/Hsp70 system modulates the activity of AAA+ protease ClpXP
3. 学会等名 Keystone Symposium. AAA+ Proteins: From Atomic Structures to Organisms (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 細胞外小胞を介したプロテオスタシスの制御
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 バイオフィルムの透明化試薬、及び、その透明化試薬を使用するバイオフィルムの観察方法	発明者 杉本 真也、金城 雄樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/7149	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 バイオフィルムの透明化試薬	発明者 杉本真也、金城雄樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-043605	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>東京慈恵会医科大学細菌学講座  <a href="http://square.umin.ac.jp/saikin/">http://square.umin.ac.jp/saikin/</a></p> <p>細菌学講座 東京慈恵会医科大学 基礎・臨床講座  <a href="http://www.jikei.ac.jp/academic/course/11_saikin.html">http://www.jikei.ac.jp/academic/course/11_saikin.html</a></p> <p>バイオフィルム研究センター 東京慈恵会医科大学 基礎・臨床講座  <a href="http://www.jikei.ac.jp/academic/course/77_biofilm.html">http://www.jikei.ac.jp/academic/course/77_biofilm.html</a></p>
--

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ギーゴ ジョンマルク  (Ghigo Jean-Marc)	パスツール研究所・Department of Microbiology・Professor	2020年度と2021年度にパスツール研究所に滞在して研究を行う予定であったが、COVID-19パンデミックのため渡航を中止した。メール等で適宜連絡を取り合うことで共同研究を推進することができた。

	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
その他の研究協力者	ベロイン クリストフ  (Beloin Christophe)	パスツール研究所・Department of Microbiology・Group Leader	
その他の研究協力者	吉井 悠  (Yutaka Yoshii)	パスツール研究所・Department of Microbiology・ポスドク	

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			
フランス	パスツール研究所			