

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03101

研究課題名(和文) 抗菌タンパク質・ペプチドを用いた家畜感染症の新規防除戦略の開発を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Development of a new strategy aiming for the prevention of animal infections using antimicrobial proteins and peptides

研究代表者

米山 裕 (Yoneyama, Hiroshi)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10220774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：畜産領域で経済的損失の甚大なウシ乳房炎の予防・治療戦略の構築は喫緊の課題である。本研究では乳房炎の主要起因菌である黄色ブドウ球菌に対する新規防除戦略の構築を目指し、新規ミサイル療法のツールとして本菌に特異性をもつドデカペプチドを同定した。また、本菌に特異的抗菌活性をもつ抗菌タンパク質Lysostaphinに注目し、この組換え型遺伝子を導入したイネ形質転換体の作出に成功した。そして、イネカルス破碎試料においてタンパク質レベルでの発現を検証し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性をもつことを明らかにした。さらに、ウシのケモカインCCL28のC末側領域51アミノ酸残基の大腸菌を宿主とする発現系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畜産生産現場で多量に使用されている抗生物質は、病原細菌に対する選択圧として作用するため、薬剤耐性菌の出現リスクが高まることから公衆衛生上の問題となっている。本研究課題において、主要なウシ乳房炎起因菌である黄色ブドウ球菌に対する新規防除戦略の構築を目指し、新たなミサイル療法開発のツール探索と、植物および微生物を宿主とする安価な抗菌タンパク質の生産システム構築に向けた基盤研究を行った。本課題で得られた成果は、抗生物質に頼らない家畜生産システムの構築、さらに、現在公衆衛生上の大きな問題となっている薬剤耐性菌問題に対処するための一助となる基礎データを提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus is the most important etiologic agent of bovine mastitis. To develop a novel strategy to control mastitis, we focused on an antimicrobial protein, lysostaphin, and a bovine chemokine, CCL28, and constructed their expression systems in *Oryza sativa* and *Escherichia coli*, respectively. Consequently, we obtained the following results: 1) a callus of the recombinant rice possessing the recombinant lysostaphin gene appeared to express lysostaphin as assessed by the western blot analysis, 2) its cell-extracted fraction showed an antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* 209P, 3) an expression plasmid of the C-terminal region of CCL28 (51 amino acid residues) was successfully constructed, and 4) the recombinant CCL28 C-terminal protein was obtained in a soluble form. In addition, we employed the phage display technology to screen hepta- and dodeca-peptides that have an ability to bind selectively to *S. aureus* strains isolated from cows afflicted with mastitis.

研究分野：動物微生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌 乳房炎 抗菌タンパク質 抗生物質 薬剤耐性 ファージディスプレイ法 CCL28 lysostaphin

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) 今日の畜産が抱える薬剤耐性菌出現との関連における諸課題

ペニシリンが世に出て間もない1946年以降、家畜生産現場において低濃度の抗生物質を添加した飼料を家畜へ給餌することにより成長が促進されることが偶然発見され(J. Biol. Chem. 165: 437-441, 1946)、抗生物質の飼料添加は近代の集約的家畜生産システムの発展を支える重要な技術となっている。この抗菌性飼料添加物(抗生物質)は、安全な食品の安定供給のために欠かすことのできない重要な資材であり、現在、家畜生産のために使用される抗生物質の量は人の医療用としての用途よりも多く、全世界では生産量の50%以上の抗生物質が家畜生産に使用されている(N. Engl. J. Med. 369: 2474-2476, 2013)。しかし、抗生物質は細菌に対し選択圧として作用するため、飼料に添加した抗生物質により選択される薬剤耐性菌が、人の健康に悪影響を及ぼすことが懸念されている。実際、家畜生産現場で出現したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が一般市民に感染する事例が報告され(Appl Environ Microbiol, 80: 7275-82, 2014)(図1)、市中での薬剤耐性菌を原因とする感染症の脅威となることから、家畜生産に使用する抗生物質を削減する社会的圧力が高まっている。



(2) ウシ乳房炎に対するワクチン療法の限界と新規アプローチの必要性

ウシ乳房炎起因菌の中でも特に問題となる *S. aureus* は、抗生物質投与によって一旦治癒しても再発を繰り返し根治することが困難であるため、本疾患に対する新規防除戦略の構築は喫緊の課題である。ウシ乳房炎に対する防除法として期待されるアプローチの一つは *S. aureus* に対するワクチン療法であり、現在、世界では2つの製品(LysiginとStartvac)が主に使用されている。しかし、これらのワクチンは再現性に乏しくその評価は定まっていないことに加え、乳房炎の症状を緩和することはできるものの新規の乳房炎感染を抑えることはできず、より有効なワクチンの開発が求められている。細菌学・感染症学の観点からは *S. aureus* は細胞外病原細菌であり細胞内寄生細菌ではない。従って、細胞外病原細菌である *S. aureus* をワクチンで防除する戦略は理に叶っている。しかし、本菌が乳腺組織に持続感染すること、抗菌薬で治療しても再発を繰り返すことなどから、*S. aureus* が乳腺組織細胞内あるいは食細胞内に侵入後生存し続けることが疑われてきた。最近、*S. aureus* が細胞内寄生細菌としての生存戦略をもつことが実験的に証明され(Nature 527: 323-328, 2015)、本菌による乳房炎を防除するためにはワクチン療法に加え、*S. aureus* をより積極的に狙い撃ちするアプローチが必要かつ有効であることが示唆された。

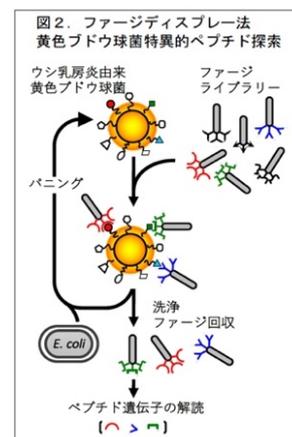
2. 研究の目的

前述したように、家畜生産現場で頻発するウシ乳房炎による経済的損失は甚大であり、畜産業の健全かつ持続的発展のためには、本疾患に対する新規防除法の開発が必要である。家畜の細菌感染症に対する処方として抗生物質が投与されているが、現在の集約的家畜生産システムは、治療以外にも飼料に添加する多量の抗生物質に依存しており、それが選択圧として働き出現する薬剤耐性菌が公衆衛生上大きな問題となっている。このような背景から、家畜生産現場で使用する抗生物質の減量化は社会的に強く求められており、畜産業の健全かつ持続的発展のために解決しなければならない喫緊の課題である。そこで本研究では、主要な乳房炎起因菌である *S. aureus* に対する新規防除法戦略の構築を目指し、次の2つの研究課題に取り組む。(1) 抗生物質に代わるミサイル療法開発の基盤となる *S. aureus* 特異的ペプチドのファージディスプレイ法による探索。(2) 畜産現場での感染症対策は安価な資材が求められることから、本菌に対する特異的抗菌活性をもつ抗菌タンパク質リゾスタフィンと、B細胞に対する遊走活性をもつウシの抗菌性ケモカインCCL28の微生物および植物を宿主とした生産法の確立。

3. 研究の方法

(1) ファージディスプレイ法によるウシ乳房炎由来 *S. aureus* 特異的ペプチドの探索

M13 ファージのコートタンパク質 pIII のN末端にランダムな7アミノ酸あるいは12アミノ酸残基を付加したファージライブラリー(New England Biolabs社)を用い、ウシ乳房炎由来の *S. aureus* 株を標的としたバイオパニング操作を行い本菌に結合能のあるファージの選抜を行った(図2)。なお、バイオパニング操作を行う際、洗



浄回数、結合時間等の条件を複数設定してスクリーニングを行った。候補ペプチドの配列は、取得した pIII 遺伝子の塩基配列を解析して決定した。

(2) 7 アミノ酸残基からなる候補ヘプタペプチドとクロラムフェニコールとの共役化合物の合成と抗菌活性評価

S. aureus SA5 に対するファージディスプレイ法で選抜したヘプタペプチド (LILRKRT) とクロラムフェニコール (CP) が連結した複合化合物 (CP-Peptide) の合成は Chen *et al.* の方法 (Mol. Pharmaceut. 15: 2505–2516, 2015) に従って合成した。生成した CP-Peptide の検証は NMR 解析および MS 分析 (結果の図 5 参照) にて行った。指標菌 *S. aureus* SA5 に対する CP-Peptide の抗菌活性は、96-well プレートを用いたマイクロ希釈表を用いて評価した。なお、コントロールとしてフリーのヘプタペプチドおよびクロラムフェニコールに対する抗菌活性を評価した。

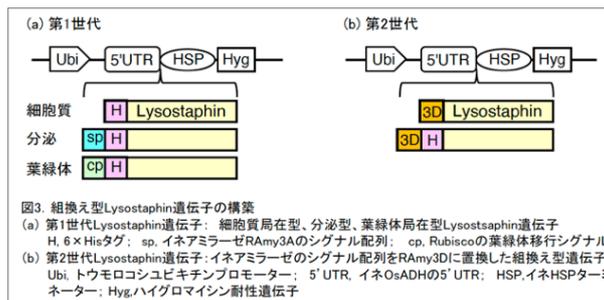
(3) ランダムな 12 アミノ酸ペプチドからなるファージライブラリーから候補ドデカペプチドの探索と標的 *S. aureus* への結合能評価

前項目で選抜した候補ヘプタペプチドの標的である *S. aureus* SA5 に対する結合能を後述するプラークアッセイ法で評価したが、選択的結合能は期待したほど高くはないことが明らかとなった。そこで、12 アミノ酸残基からなるランダムペプチドライブラリーを用いてバイオパニング操作をする際、標的との結合/洗浄操作を行った後大腸菌宿主に感染させ増幅する前に、再度標的との結合操作を加えた改良バイオパニング法を用いて *S. aureus* SA5, SA31, SA21 に対する選択性の高いファージの選抜を行った。得られた候補ドデカペプチドの標的細胞への結合能は以下に示すプラークアッセイ法で評価した。まず候補ドデカペプチドを発現するファージと標的である *S. aureus* を混合し、未結合ファージを洗浄除去した後、結合したファージを低 pH バッファーで回収した。この回収液を即座に中和後、ファージの力価測定を行なった。コントロールとして未使用のランダムファージライブラリーを用い、ファージの吸着特異性は以下の式により算出した。

$$\text{特異性} = (\text{選抜後のファージプラーク数}) / (\text{コントロールファージのプラーク数})$$

(4) 組換え型 Lysostaphin 遺伝子の構築とイネ形質転換体の作出と発現解析、および活性評価

Lysostaphin の成熟領域の N 末端に、ヒスチジンタグ (細胞質局在型)、イネアミラーゼのシグナル配列 RAm3A+ヒスチジンタグ (分泌型)、Rubisco 小サブユニットの葉緑体移行シグナル (葉緑体局在型) を付加した組換え型遺伝子をユビキチンプロモーター下に連結した発現プラスミド (第 1 世代) (図 3a) を構築し、アグロバクテリウム法で各遺伝子をイネ (日本晴) に形質転換して再分化個体を得た。次に、イネアミラーゼの別のシグナル配列 RAm3D を、Lysostaphin 成熟領域の N 末端に直接付加した組換え型遺伝子と、その間にヒスチジンタグを挿入した発現プラスミド (第 2 世代) (図 3b) を構築し同様にイネの再分化個体を得た。RNA レベルでの Lysostaphin の発現は RT-PCR 法、タンパク質レベルでの発現は抗ヒスチジンタグ抗体または抗 Lysostaphin 抗体を用いたウェスタンブロット解析にて評価した。*S. aureus* 209P に対する抗菌活性はバイオアッセイ法にて評価した。

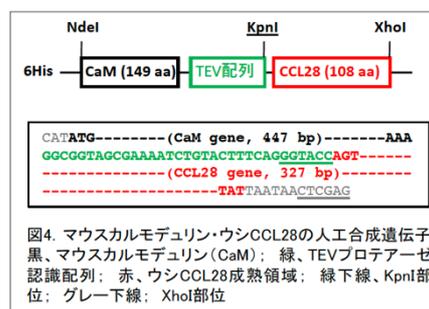


(5) Lysostaphin の分解に関与するプロテアーゼの探索と同定

イネ (日本晴) のカルスを植え継ぎ 12 日後の培養液と市販 Lysostaphin (終濃度 100 μg/ml) を混合し経時的にサンプルを回収し、SDS-PAGE にて解析した。次に、イネカルスで発現することが報告されているプロテアーゼ遺伝子 7 個のうち、N 末端にシグナル配列を有する 2 つの遺伝子 (OsSP, OsSUB31) を選抜し、その大腸菌を宿主とする GST タグ組換え体の発現系を構築した。これらの組換え型プロテアーゼを発現させアフィニティー精製した試料を用いて市販の Lysostaphin 分解活性を評価した。

(6) ウシ CCL28 全長および C-末端領域 (51 アミノ酸残基) の大腸菌を宿主とした高発現系の構築

マウスのカルモデュリン (CaM) とウシ CCL28 の成熟領域の遺伝子の間にリンカーとして TEV プロテアーゼの認識配列を挿入した人工合成遺伝子を実験的に合成した (ユーロフィン) (図 4)。この人工合成遺伝子から組換え型 CCL28 を含む *NdeI/XhoI* 断片を分離し pET15b と連結 (pET15b-CaM-CCL28) した後、*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換して *E. coli* 高発現系を構築した。次に、CCL28 の C 末側領域 51 アミノ酸残基の発現ベクターを構築するために、取得したプラスミドを鋳型として Fwd プライマー (5'-



CATAACCATGTCATCAAACAGTGGATGAAACAG-3') と Rev プライマー (5'-GATGACATGGTTATGGGTACCCTGAAAGTA-3') を用いたインバース PCR 反応を行い C 末端 51 アミノ酸残基の発現ベクター (pET15b-CaM-CCL28C-terminal) を取得した。得られた組換え型遺伝子は塩基配列を解析することによって設計通りの遺伝子であることを検証した。

(7) ウシ CCL28 C-末端領域 (51 アミノ酸残基) の精製と抗菌活性の評価

前項目で取得した形質転換体 (*E. coli* BL21 (DE3)/pET15b-CaM-CCL28C-terminal) を対数期まで 37°C にて培養し、IPTG (終濃度 0.2 mM) を添加し 4 時間発現誘導を行った。回収した菌体懸濁液を超音波破碎 (15-sec ON/45-sec OFF、氷冷条件) にかき、その上清を Ni-NTA レジン (和光純薬) を用いてアフィニティー精製を行い、300 mM イミダゾールで溶出した。試料中のイミダゾールを透析で除去し、TEV プロテアーゼで切断処理を行った後、逆相カラム Presep-C18 (ODS) (和光純薬) を用いて溶出画分を得た。この TEV 切断処理後の C 末端領域の抗菌活性を *S. aureus* 209P を指標菌としたペニシリンカップ法 (試料 200 μ l 添加) で評価した。

4. 研究成果

(1) ウシ乳房炎由来 *S. aureus* SA5 株に対する特異的ヘプタペプチドの探索

ランダムな 7 アミノ酸残基からなるファージライブラリーを用い *S. aureus* SA5 に対するスクリーニングを行い取得した 33 個のファージの pIII 遺伝子をシーケンス解析した結果、13 種類の異なるペプチド配列が認められ、その中で最も出現回数 (8 回) の多かったヘプタペプチド (LILRKRT, Pep7-5A と命名) を選抜した。次いで、この Pep7-5A とクロラムフェニコールとの複合化合物を合成し (図 5)、*S. aureus* SA5 株に対する抗菌活性を評価した結果、複合体はフリーのクロラムフェニコールよりも *S. aureus* SA5 の生育抑制効果は低いものの (培養液の透明度が低い)、フリーのヘプタペプチドに比べ明らかに *S. aureus* SA5 の生育抑制が認められた (図 6)。このことから、選抜したヘプタペプチドの複合化合物の抗菌活性の増強は認められなかったが、結合によるクロラムフェニコールの抗菌活性に及ぼす立体障害の影響はそれほど大きくないと考えられた。

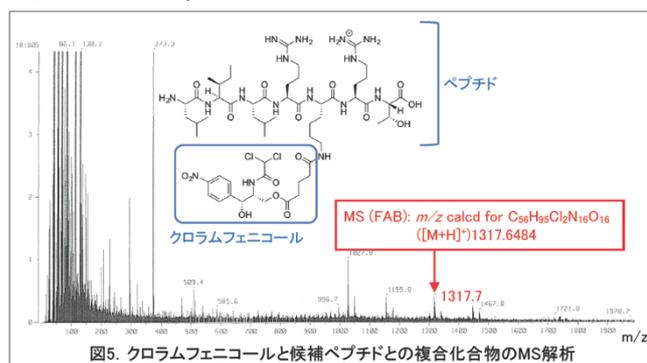


図6. 複合化合物の *S. aureus* SA5 株に対する抗菌活性評価
上段、フリーのクロラムフェニコール
中段、ペプチド・クロラムフェニコール複合化合物
下段、フリーのヘプタペプチド
赤矢印、フリーのペプチドに比べ培地が透明であり生育抑制効果が認められる。

(2) 改良バイオパニング法によるウシ乳房炎由来 *S. aureus* に対する特異的ドデカペプチドの同定

改良バイオパニング法を用いて乳房炎由来 *S. aureus* に対する特異性をもつドデカペプチドのスクリーニングを行った結果、SA31 と SA21 を標的とした実験で 1 つの候補ペプチド、SA5 を標的とした実験で 3 種類の候補ペプチドを選抜することができた (表 1)。次いで、これらの候補ペプチドをもつファージクローンの各種被検菌に対する特定の結合能をブランクアッセイで評価した結果、前述したヘプタペプチドとは異なり、それぞれ標的への特異性を有することが明らかとなった (表 2)。

標的	ペプチド名	配列
<i>S. aureus</i> SA21, SA31	Pep12-31-21A	APGYSSASHRTA
	Pep12-5A	GYTSTSIFVPLH
<i>S. aureus</i> SA5	Pep12-5B	GYTSKSGYDYDT
	Pep12-5C	YNYTSSSLNPIR

候補ドデカペプチド	被検菌		
	SA31	SA21	SA5
Pep12-31-21A	7.6×10^2	1.9×10^4	1
Pep12-5A	3.1	9.2	3.6×10^4
Pep12-5B	0.36	0.83	1.5×10^4
Pep12-5C	0.11	0.83	1.9×10^4

* 特異性は選抜前のファージライブラリーのブランク数を 1 としたときの値

(3) 組換え型 Lysostaphin 遺伝子の構築とイネ形質転換体の作出と発現解析、および活性評価

イネアミラーゼのシグナル配列 RAmy3A を用いた組換え型 Lysostaphin 遺伝子をイネに形質転換した結果、3 つの異なる局在型 (細胞質、細胞外分泌、葉緑体) の遺伝子をもつ再分化個体がそれぞれ 1 個 (細胞質)、11 個 (細胞外分泌)、17 個 (葉緑体) 得られた。これらの発現解析を

行った結果、葉緑体局在型でのみ Lysostaphin の mRNA 発現が認められたが (図 7)、タンパク質レベルでの発現は認められなかった。

次いで、イネアミラーゼのシグナル配列 RAmY3D を用いて組換え型 Lysostaphin 遺伝子を構築しイネに形質転換した結果、ヒスチジンタグをもたない発現プラスミドを導入したとき 4 系統の形質転換体を得ることに成功した。取得した 4 系統 (a, b, c, d) の形質転換体から作製したカルス細胞破碎液中の Lysostaphin の発現をウェスタンブロット解析した結果、Lysostaphin に相当する位置にクローン a, b, c で強いシグナルが、クローン d で弱いシグナルが認められた (図 8a)。これら 4 つのクローンのカルス破碎試料の抗菌活性をバイオアッセイ法で調べた結果、明らかな指標菌 (*S. aureus* 209P) の生育阻止ゾーンが認められた (図 8b)。

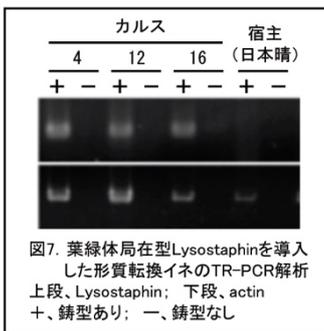


図7. 葉緑体局在型Lysostaphinを導入した形質転換イネのTR-PCR解析
上段、Lysostaphin; 下段、actin
+、鑄型あり; -、鑄型なし

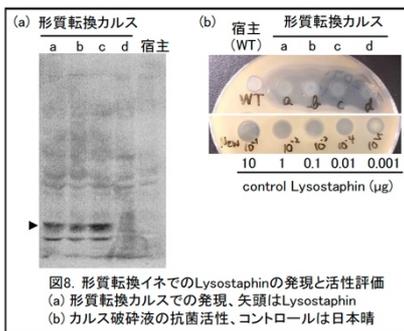


図8. 形質転換イネでのLysostaphinの発現と活性評価
(a) 形質転換カルスでの発現、矢頭はLysostaphin
(b) カルス破碎液の抗菌活性、コントロールは日本晴

(4) リゾスタフィンの分解に関与するプロテアーゼの関与の検証とその同定

分泌型 Lysostaphin は細胞破碎液からは検出されたが、培養上清からは検出されなかった。その原因として培養上清に分泌されるイネのプロテアーゼによる分解が考えられる。そこで、イネ (日本晴) のカルス植え継ぎ 12 日後の培養液を市販 Lysostaphin と反応させ SDS-PAGE にて解析した結果、反応時間に応じて Lysostaphin の分解が認められた (図 9)。そこで、プロテアーゼを同定するために、これまで報告されている 7 種のイネカルスで発現するプロテアーゼ遺伝子のうちシグナル配列をもつ 2 つの遺伝子 (OsSP, OsSUB31) を選び、それらの大腸菌を宿主とする GST タグを融合した組換えタンパク質の高発現系を構築した。次いで、誘導発現した組換え型プロテアーゼをアフィニティー精製した後、Lysostaphin と反応させたところ OsSUB31 による分解は見られなかったが、OsSP が Lysostaphin を分解することが明らかとなった (図 10)。

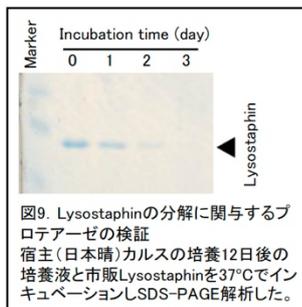


図9. Lysostaphinの分解に関与するプロテアーゼの検証
宿主(日本晴)カルスの培養12日後の培養液と市販Lysostaphinを37°CでインキュベーションしSDS-PAGE解析した。

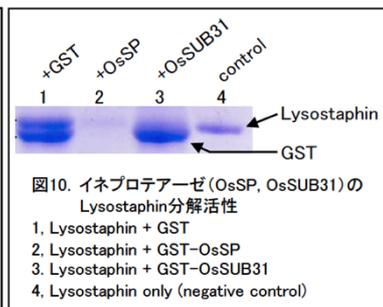


図10. イネプロテアーゼ (OsSP, OsSUB31) の Lysostaphin分解活性
1. Lysostaphin + GST
2. Lysostaphin + GST-OsSP
3. Lysostaphin + GST-OsSUB31
4. Lysostaphin only (negative control)

(5) ウシ CCL28 の大腸菌を宿主とした高発現系の構築

畜産生産現場で感染症対策として使用する資材は安価であることが重要な要件である。そこで、B 細胞遊走活性を合わせもつウシケモカイン CCL28 全領域 (108 アミノ酸残基) の大腸菌を宿主とした高発現系を構築したが、この組換え型 CCL28 は宿主細胞内でインクルージョンボディを形成し不溶化することが分かった (data not shown)。そこで、CCL28 の抗菌活性を担うことが推定される C 末端側 51 アミノ酸残基の高発現系を構築した。この発現プラスミドを導入した形質転換体を IPTG で誘導発現したところ、C 末端側断片は可溶化状態で発現しアフィニティー精製することができた (図 11a)。この精製試料のリンカーに存在する TEV プロテアーゼ認識配列を TEV 切断後 (図 11b)、逆相カラムクロマトグラフィー精製をして溶出した画分の抗菌活性を評価した結果、画分 #2 と #3 において弱いながらも明らかな抗菌活性が認められた (図 12)。なお、この溶出画分の SDS-PAGE 解析を行ったが、CCL28 の C 末端領域に相当するバンドを観察することができなかったことから (data not shown)、溶出画分に存在する少量の C 末端領域が抗菌活性を示したものと考えられる。

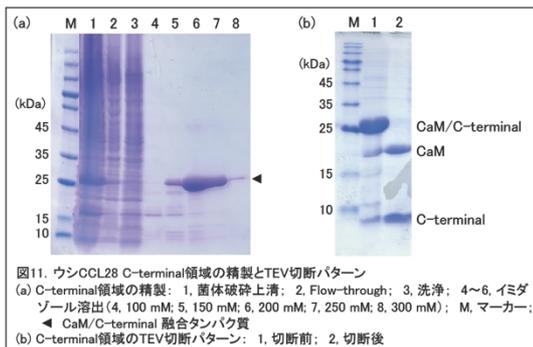


図11. ウシCCL28 C-terminal領域の精製とTEV切断パターン
(a) C-terminal領域の精製: 1. 菌体破碎上清; 2. Flow-through; 3. 洗浄; 4~6. イミダゾール溶出 (4, 100 mM; 5, 150 mM; 6, 200 mM; 7, 250 mM; 8, 300 mM); M, マーカー;
◀ CaM/C-terminal 融合タンパク質
(b) C-terminal領域のTEV切断パターン: 1. 切断前; 2. 切断後

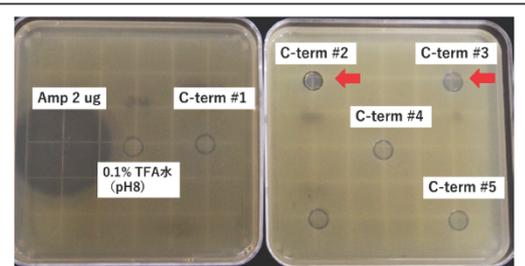


図12. TEVプロテアーゼ処理後溶出サンプル#1~#5の抗菌活性
矢印で示した溶出サンプル#2と#3で明らかな*S. aureus* 209Pに対する生育抑制効果が認められる。陽性コントロール、アンピシリン (2 µg); 陰性コントロール、0.1% TFA (pH 8)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryota Miyazawa 1, †, So Shimoda, Keiichi Matsuda, Ryuta Tobe, Tasuke Ando and Hiroshi Yoneyama	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of Staphylococcus aureus Isolates from Bovine Mastitis and Bulk Tank Milk: First Isolation of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10112117	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口純平、宮澤亮太、松田敬一、米山 裕、安藤太助
2. 発表標題 牛乳房炎由来黄色ブドウ球菌分離株の特性解析
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山由理、下田蒼、田中浩貴、安藤太助、米山裕
2. 発表標題 ウシ乳房炎の新規防除戦略構築に向けた微生物学的基盤研究
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮澤亮太、那須野俊、松田敬一、安藤太助、米山 裕
2. 発表標題 宮城県内の酪農場における乳房炎罹患牛から分離された黄色ブドウ球菌の分子疫学調査
3. 学会等名 第6回乳房炎サマーキャンプ（MSC）横須賀
4. 発表年 2019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
研究分担者	野地 智法 (Nochi Tomonori) (10708001)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	伊藤 幸博 (Ito Yukihiro) (70280576)	東北大学・農学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	榎本 賢 (Enomoto Masaru) (90546342)	東北大学・農学研究科・准教授 (11301)	

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
---------	---------