

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05291

研究課題名(和文) プラズモン共鳴による光濃縮効果を用いた膜タンパクの結晶化

研究課題名(英文) Crystallization of membrane proteins using photoconcentration effect by plasmon resonance

研究代表者

奥津 哲夫 (Tetsuo, Okutsu)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：20261860

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)：バクテリオロドプシンの結晶化を、金ナノ構造上で光誘起結晶化により行った。金ナノ構造はギャップモードのプラズモン共鳴が起こるようにした。結晶が出現しなかった試料に光を当てると結晶が出現した。光を当てると結晶のサイズが大きくなった。この理由を考察した。膜タンパク質は金ナノ粒子の表面に吸着する。ギャップモードのプラズモン共鳴が生じたとき、ナノ粒子の間に増強電場が発生し、光ピンセット効果が生じ、表面拡散したタンパク質分子がギャップにトラップされ濃縮される。結晶のサイズが大きくなったのは、結晶化する場所が限定され、大きくなったと考えられる。この結果から、膜タンパク質の光誘起結晶化が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は水に溶けず結晶化がきわめて難しい。今まで界面活性剤を用いて水に可溶化し塩析して結晶化する方法が提案されていたが、界面活性剤でタンパク質が変性するという問題があった。これを解決するため脂質中で結晶化する方法が提案された。本研究は脂質中での結晶化を、金のナノ構造上で膜タンパク質を吸着させプラズモン共鳴によりギャップに濃縮し結晶化させるものである。膜タンパク質の結晶化が容易になれば、構造生物学の研究が容易に進むようになり、タンパク質の機能解明と、創薬の進歩が促進される。

研究成果の概要(英文)：Crystallization of bacteriorhodopsin was performed by light-induced crystallization on gold nanostructures. The gold nanostructure was formed by gold sputtering on a glass substrate to allow gap-mode plasmon resonance to occur. In the experiment, crystals appeared when light was applied to a sample that had no crystals. The size of the crystals increased in the sample exposed to light. We considered the reason for this. Membrane proteins are adsorbed to the surface of the gold nanoparticles and diffuse over the surface. When gap-mode plasmon resonance occurs, an enhanced electric field is generated between the nanoparticles, an optical tweezers effect occurs, and surface-diffused protein molecules are trapped and concentrated in the gap. The reason why the size of the crystals increased is considered to be that the crystallized places were restricted and the crystals became larger. The results indicated light-induced crystallization of membrane proteins.

研究分野：物理化学 結晶工学

キーワード：膜タンパク質 結晶成長 バクテリオロドプシン 表面プラズモン共鳴

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶化は、構造生物学および創薬に重要である。タンパク質の機能を理解するためには、その構造を理解することが必要である。また、タンパク質の構造を基にした薬剤の開発(Structure-Based Drug Design)が行われている。実際に、ノイラミニダーゼ阻害による抗インフルエンザ薬であるタミフルやリレンザは、ノイラミニダーゼの X 線結晶構造解析結果から設計された[1]。

タンパク質構造の有力な解析法のひとつに X 線結晶構造解析がある。しかし、多くのタンパク質は結晶化が困難であり、研究のボトルネックとなっている。タンパク質分子は、単純な無機塩類と比較して分子に異方性があり分子の配向も結晶化する際に重要である。このためタンパク質は非常に限定された溶解度条件でのみ結晶化する。タンパク質の溶解度は、溶液の温度や緩衝液の種類や pH, 結晶化剤の種類などによって変化することから結晶化が困難である。

タンパク質が結晶化しにくい問題を解決するため、光を用いた結晶化方法が研究されている。我々は光化学反応によるタンパク質の結晶化を研究してきた。奥津らは lysozyme の過飽和溶液に弱い紫外光を照射すると光化学反応により結晶化が誘起することを発見した[2]。

我々は光を用いて結晶化させる方法に表面プラズモン共鳴を用いて行うことを検討した。表面プラズモン共鳴とは、光の波長に比べて十分に小さい金や銀などの金属ナノ粒子に光を照射すると光の電場によって金属ナノ粒子表面に存在する自由電子が集団振動し、電気的な分極が起こる現象である。この結果、大きな光電場増強を生み出し、金ナノ粒子単体で入射光に対して 21 倍の増強電場が発生する。さらに、2 つ以上の金属ナノ粒子が数ナノメートルに近接した場合、金属ナノ粒子に局在するプラズモン励起により形成した双極子と隣接した金属ナノ粒子の双極子が相互作用し、ナノ粒子間において静電的な相互作用が誘起される。この時ナノ粒子間における光電場強度は最大で入射光電場強度の 10^5 倍増強されることが理論的に予想されている[3]。

タンパク質の結晶化プレートに、表面プラズモン共鳴の仕組みを構築し結晶化に成功した[4,5]。これを用いて結晶化を行い、可視光によるタンパク質の結晶化に成功した。この光を用いた結晶化方法は特許を取得し、実用化されている。

この方法を水溶性タンパク質でなく、膜タンパク質の結晶化に応用する研究を進めた。

2. 研究の目的

膜タンパク質の結晶化

金の表面プラズモン共鳴と直線偏光を用いて分子を整列する機構であれば膜タンパク質の結晶化を誘起できるのではないかと考えた。本研究では脂質立方相を用いた結晶化法に金のプラズモン共鳴の仕組みを組み合わせ膜タンパク質の結晶化を誘起した。

具体的には以下のことを行った。

- (1) 本研究では脂質を用いた膜タンパク質の結晶化実験に金の表面プラズモン共鳴の仕組みを導入した実験方法を構築した。
- (2) 金のプラズモン共鳴を用いて結晶化の誘起を試みた。

3. 研究の方法

bR の発現と精製

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* を培養し、その細胞膜に存在する bR を得た[6]。

2-12. 脂質立方相の調製

脂質として MO を用いて立方相を形成した。立方相を形成するため 20℃ 水の含有率 40%w/w で相を形成した。脂質立方相を用いた結晶化方法で bR の結晶化を行った。MO と可溶性 bR 溶液を混合し立方相を形成した。塩溶液として pH 5.5, 3 M Na/K Pi 緩衝液を用いた。金ナノ粒子を加えた実験では粒径 40 nm の金コロイド溶液をタンパク質溶液に対して 10%v/v 加えた。照射には 300 W キセノンランプ (USIO UXL-300SX) の光を用いた。照射

光は水セルを通し、赤外光を除いて用いた。照射時間は 1 時間とした。これらの操作は bR の光変性を防ぐため赤色蛍光灯下で行った。結晶化が光により誘起したことをどのように判断するかを説明する。Fig. 1(a) に溶解度と結晶化の関係を表すダイアグラムを示す。

結晶が出現するには溶媒中のタンパク質濃度が過飽和でなければならない。タンパク質濃

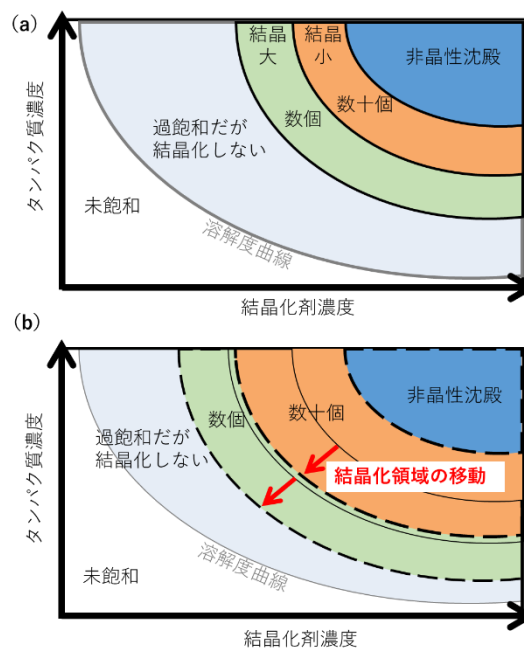


Fig. 1 光誘起結晶化の概念図。
(a) 過飽和度と結晶化の関係を表す溶解度ダイアグラム。
(b) 光誘起結晶化した際の溶解度ダイアグラムの変化。

度を高くすれば過飽和度は高くなる。中性塩などの結晶化剤を添加した場合も、タンパク質の溶解度が低下し過飽和度は高くなる。したがって溶解度ダイアグラムの右上ほど過飽和度は高くなる。タンパク質の結晶は過飽和度の違いによって結晶の数や大きさが変化する。過飽和度が高いほど結晶数は多く、小さな結晶となる。過飽和度が低くなるにしたがって結晶数は少なくなり、大きな結晶となる。更に過飽和度が下がると、過飽和だが自発的には結晶化の起こらない準安定な領域が存在する。

4. 研究成果

膜タンパク質の光誘起結晶化

bR の濃度を 19 mg mL^{-1} に固定し、立方相に加える塩濃度を 3.0, 2.7, 2.4, 2.0 M とした。600 回混合した脂質立方相を金蒸着プレートと金のない結晶化プレートに分注し、金ありの条件に光照射をした。1 条件につき 4 ウェルの同時実験を行った。Fig. 2 に各条件 4 ウェルの 7 日後の観察結果を示す。金なし/光なし、金あり/光ありの実験共に一般的な結晶化の傾向に従い、過飽和度の高い塩濃度 3.0 M 条件では結晶化が起りやすく多くの細かい結晶が出現した。塩濃度が 2.7, 2.4 M と低くなるにつれて結晶数が減少し大きな結晶となった。さらに塩濃度 2.0 M の条件では結晶化せず準安定な領域にあると考えられる。結晶の出現した過飽和度条件では 4 ウェルの同時実験全てで結晶が出現し結晶化確率は 100%であった。過飽和度に従った結晶化結果が得られ、実験が安定していることが確かめられた。

実験の安定性を確かめた上で金の表面プラズモン共鳴の効果を確認した。金あり/光ありでは、金なし/光なしに比べて結晶が大きくなっているように見えた。そこで塩濃度 2.7 M と 2.4 M の条件について、得られた 6 角形の結晶の頂点から対角の頂点までの長さを測定し、金なし/光なしの場合と金あり/光ありの場合で結晶の大きさを比

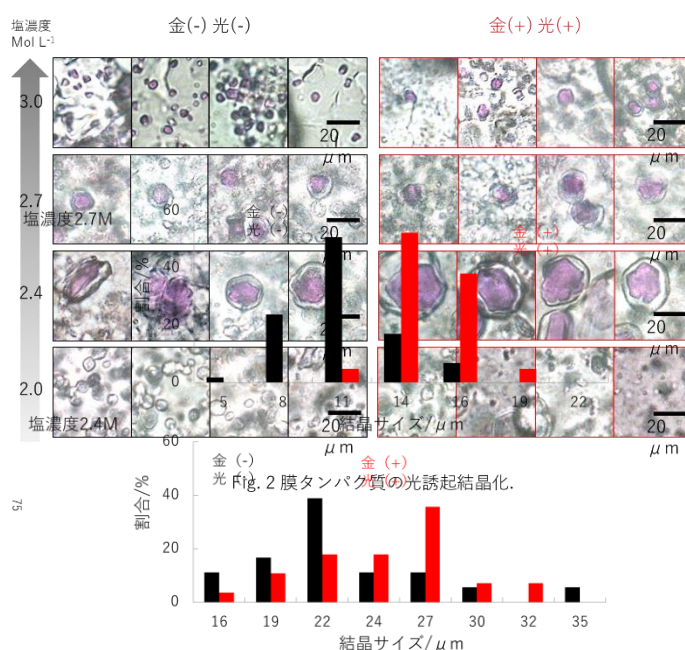


Fig. 3 結晶サイズの分布.

較した. Fig. 3 に結晶のサイズの分布を示す. 金なし/光なしの場合の結晶のサイズの分布を黒色, 金あり/光ありの場合赤色の棒グラフで示した. 塩濃度 2.7 M と 2.4 M 共に金なし/光なしに比べて金あり/光ありでは結晶の分布が大きなサイズの方にシフトする結果が得られた. この結果から金の表面プラズモン共鳴を用いると結晶のサイズが大きくなる傾向があることが判明した.

次に金の表面プラズモン共鳴によって結晶化する過飽和領域が拡大することを確かめるため, 自発的に結晶化しない過飽和度条件からの光誘起結晶化を試みた. Fig. 4

(b) に経過日数に対して 1 条件 4 ウェルの同時実験の内結晶化した割合をグラフとして示す. 実験開始から 7 日経過しても結晶

の出現しない塩濃度 2.0 M の条件に光照射を行った. 14 日後に観察すると金あり/光なし, 金なし/光なしの場合は結晶が出現しなかったが, 金あり光ありの場合では 4 ウェル中 2 ウェルで結晶が出現した. 28 日後に観察を行うと金あり/光ありでは 4 ウェル中 3 ウェルに結晶が出現し, 金あり/光なしでも 1 ウェルで結晶が出現した. 一方で金なし/光なしでは 28 日経過しても結晶は出現しなかった.

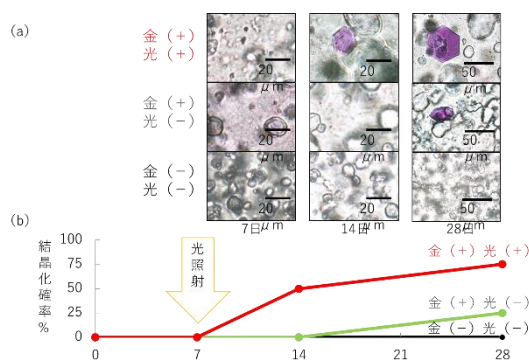


Fig. 4 結晶が出ない条件からの光誘起結晶化.
(a) 結晶の写真. (b) 経過時間と結晶化確率のグラフ.

参考文献

- [1] 佐藤健太郎: 創薬化学入門, オーム社 (2011).
- [2] T. Okutsu, K. Furuta, M. Terao, H. Hiratsuka, A. Yamano, N. Ferté, S. Veessler, *Cryst. Growth Des.*, **5**, 1393 (2005).
- [3] 吉田隆: プラズモニクス-光・電子デバイス開発最前線, エヌ・ティー・エス出版 (2011).
- [4] S. Haruta, H. Misawa, K. Ueno, Y. Yokota, H. Uehara, H. Hiratsuka, H. Horiuchi, T. Okutsu, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **221**, 268 (2011).
- [5] K. Tawa, S. Haruta, T. Okutsu, J. Nishi, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **51**, 06FK09 (2012).
- [6] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667-678 (1974).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tetsuo Okutsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Crystal nucleation of proteins induced by surface plasmon resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Organic Crystal Chemistry Comprehensive Reviews	6. 最初と最後の頁 71 - 79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-5085-0	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 H. Horiuchi, M. Isogai, K. Hirakawa, T. Okutsu	4. 巻 3
2. 論文標題 Improvement of the ON/OFF Switching Performance of a pH-Activatable Porphyrin Derivative by the Introduction of Phosphorus(V)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 138-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cptc.201800248	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 奥津哲夫	4. 巻 83
2. 論文標題 表面プラズモン共鳴により誘起されるタンパク質の結晶核形成	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学工学誌	6. 最初と最後の頁 691-694
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 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 Tetsuo Okutsu	4. 巻 2020
2. 論文標題 Crystal nucleation of proteins induced by surface plasmon resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Organic Crystal Chemistry Comprehensive Reviews 2020	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-5085-0	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34件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 T. Okutsu, A. Ito, T. Sato, H. Horiuchi
2. 発表標題 Protein crystallization induced by surface plasmon resonance of gold nano particles
3. 学会等名 22nd American Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ACCGE-22) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島優樹・堀内宏明・田島和哉・奥津哲夫
2. 発表標題 近赤外光線力学療法・診断を指向したトリプルpH応答性光増感剤の活性化メカニズム
3. 学会等名 2021年光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蟹和勇人・堀内宏明・田島和哉・奥津哲夫
2. 発表標題 光線力学療法への応用を目指したトリプルpH応答性光増感剤におけるアミノインドール置換数の及ぼす影響
3. 学会等名 2021年光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島優樹・堀内宏明・田島和哉・奥津哲夫
2. 発表標題 近赤外光線力学療法・診断を指向したトリプルpH応答性光増感剤の活性化メカニズム
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蟹和勇人・堀内宏明・田島和哉・奥津哲夫
2. 発表標題 近赤外光線力学療法への応用を目指したトリプルpH応答性光増感剤におけるアミノインドール置換数の及ぼす影響
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐生みか・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 混合溶液から空間分離して結晶が析出する現象の発見
3. 学会等名 第50回結晶成長国内会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤文恵・佐藤友彦・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 タンパク質の光誘起結晶化における熱の効果
3. 学会等名 第50回結晶成長国内会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高須賀友香・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 タンパク質の金ナノ粒子への吸着および結晶化における電荷の影響
3. 学会等名 第50回結晶成長国内会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 椋弥・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 ギャップ構造をもつ金コロイドフィルムの表面プラズモン共鳴を利用したタンパク質の結晶化
3. 学会等名 第50回結晶成長国内会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Horiuchi, K. Tajima, T. Okutsu
2. 発表標題 Triple pH-activatable photosensitizer for near-infrared photodynamic theranostics
3. 学会等名 PacifiChem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 椋弥・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 ギャップ構造をもつ金コロイドフィルムの表面プラズモン共鳴を利用したタンパク質の結晶化
3. 学会等名 2021年 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 腰越依紗那・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 タンパク質の結晶核形成のその場観察
3. 学会等名 2021年 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高須賀友香・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 タンパク質の金ナノ粒子への吸着および結晶化における電荷の影響
3. 学会等名 2021年 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤文恵・佐藤友彦・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 タンパク質の光誘起結晶化における熱の効果
3. 学会等名 2021年 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内宏明・田島和哉・奥津哲夫
2. 発表標題 近赤外光線力学療法・光線力学診断への応用を指向したトリプルpH応答性光増感剤
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住谷有沙・堀内宏明・武藤慎吾・奥津哲夫
2. 発表標題 腫瘍特異的な光増感を目指したGSH活性化可能なシリルポルフィリンダイマーの研究
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川昂汰・堀内宏明・大重真彦・松尾一郎・菅原二三男・坂口謙吾・桂進司・吉原利忠・飛田成史・奥津哲夫
2. 発表標題 光線力学療法への応用を目指したシリルポルフィリン-含硫糖複合体の開発
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住谷有沙・堀内宏明・武藤慎吾・奥津哲夫
2. 発表標題 腫瘍特異的な光増感を目指したGSHにより活性化可能なシリルポルフィリンダイマーの研究
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蟹和勇人・堀内宏明・田島和哉・奥津哲夫
2. 発表標題 ポルフィリンのトリプルpH応答性におけるアミノインドール置換数の及ぼす影響
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山諒・伊藤明日香・田倉章浩・天日勝也・粕谷豊・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 金コア/パラジウムシェルナノ粒子による表面プラズモン共鳴を用いたタンパク質結晶化
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤友彦・堀内宏明・奥津哲夫・田倉章浩・天日勝也・粕谷豊
2. 発表標題 "表面プラズモン共鳴を利用したタンパク質光誘起結晶化に求められる光の性質 "
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山諒・伊藤明日香・田倉章浩・天日勝也・粕谷豊・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 金コア/パラジウムシェルナノ粒子による表面プラズモン共鳴を用いたタンパク質結晶化
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥津哲夫, 笠原脩平, 堀内宏明, 伊藤正浩, 山中茂樹, 粕谷豊
2. 発表標題 膜タンパク質の合理的な結晶化
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合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤明日香・伊藤正浩・山中茂樹・粕谷豊・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 金ナノコロイドシートを用いたタンパク質結晶化誘起の効果
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合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤明日香・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 金コロイドフィルムの表面プラズモン共鳴を用いたタンパク質の結晶化の実用化検討
3. 学会等名 2019光化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥津哲夫・甲高多模子・伊藤明日香・佐藤友彦・堀内宏明
2. 発表標題 金ナノ構造のギャップでプラズモン共鳴により濃縮され誘起されるタンパク質の結晶化
3. 学会等名 2019光化学討論
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥津哲夫
2. 発表標題 プラズモン共鳴により誘起されるタンパク質の結晶化
3. 学会等名 第28回有機結晶シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤明日香・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 金コロイドフィルムの表面プラズモン共鳴を用いたタンパク質の新規結晶化法
3. 学会等名 第48回結晶成長国内会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤友彦・堀内宏明・奥津哲夫
2. 発表標題 タンパク質光誘起結晶化のための光源の検討
3. 学会等名 第48回結晶成長国内会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuo Okutsu
2. 発表標題 Protein crystallization induced by surface plasmon resonance of gold nano particles
3. 学会等名 2019 GLOBAL RESEARCH EFFORTS ON ENERGY AND NANOMATERIALS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuo Okutsu
2. 発表標題 Photochemically-induced crystallization of protein
3. 学会等名 The 3rd joint symposium on chemistry between Xiamen University and GunmaUniversity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Sato, Hiroaki Horiuchi, Tetsuo Okutsu
2. 発表標題 "Properties of irradiation source that induces protein crystallization by surface plasmon resonance "
3. 学会等名 2019 GLOBAL RESEARCH EFFORTS ON ENERGY AND NANOMATERIALS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Ito, Hiroaki Horiuchi, Tetsuo Okutsu
2. 発表標題 "Properties of irradiation source that induces protein crystallization by surface plasmon resonance "
3. 学会等名 2019 GLOBAL RESEARCH EFFORTS ON ENERGY AND NANOMATERIALS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥津哲夫 他
2. 発表標題 金コロイドフィルムの表面プラズモン共鳴を用いたタンパク質の新規結晶化
3. 学会等名 第67回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tetsuo Okutsu	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 537
3. 書名 Advances in Organic Crystal Chemistry Comprehensive Reviews 2020	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体高分子の濃縮化方法、結晶化方法およびナノ構造基盤	発明者 奥津哲夫、伊東正 浩、田倉章皓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT020116	出願年 2019年	国内・外国の別 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
研究 分 担 者	堀内 宏明 (Horiuchi Hiroaki) (00334136)	群馬大学・大学院理工学府・准教授 (12301)	

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