

令和 5 年 4 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05697

研究課題名(和文) 制御分子を触媒とするマルチターンオーバー型真核系人工リボスイッチの開発

研究課題名(英文) Development of eukaryotic riboswitches that use their ligands catalytically

研究代表者

小川 敦司 (Ogawa, Atsushi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：30442940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モデル制御分子(テオフィリン)およびそのアプタマーを用いて、当該分子を触媒とするターンオーバー型アプタザイムを創製した。また、短鎖核酸やペプチドに応答する真核系リボスイッチを構築するとともに、前者に関して制御分子種を合理的に拡大する方法を確立した。一方で、発現促進時におけるリボスイッチの発現効率を高めるために、mRNAの非翻訳配列の最適化に加えて、高い真核発現効率を実現可能な転写-翻訳共役系を開発した。さらに、リボスイッチ機能を*in vitro*で調査するための超巨大人工細胞の創製にも成功した。これらの技術を組み合わせることで、異なる3種のターンオーバー型真核系リボスイッチのプロトタイプを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボスイッチは、mRNAの非翻訳領域に存在し、特定の分子に応答して遺伝子発現を制御するRNA素子である。これまで天然において数種類のリボスイッチが同定されてきたが、mRNAを上手く改変することで、人工的にも構築可能である。しかし、特に真核発現系で機能する人工リボスイッチの制御効率は悪く、その改善が望まれていた。本研究では、制御分子を触媒的に再利用することで効率の良い発現制御を可能とする『ターンオーバー型真核系人工リボスイッチ』の開発を試みて、そのプロトタイプを作成した。今後改良の余地はあるが、高効率な遺伝子発現制御を可能とし得る本技術は、生物学・医学を含む幅広い学問領域での利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We used theophylline and its aptamer as a model pair to create aptazymes that use the molecule (theophylline) catalytically. We also constructed eukaryotic riboswitches that respond to short nucleic acids or peptides, and established a method to rationally expand the variety of regulatory molecules for the former. On the other hand, to increase the expression efficiency of these riboswitches in the ON state, we developed an efficient transcription-translation coupled system for eukaryotic expression, in addition to optimizing untranslated regions of mRNA. Furthermore, we successfully created supergiant artificial cells to investigate riboswitch functions *in vitro*. By combining these technologies, we finally constructed prototypes of three different eukaryotic riboswitches that use their ligand molecules catalytically.

研究分野：生体関連化学

キーワード：リボスイッチ 発現制御 アプタマー リボザイム アプタザイム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「外部環境(分子・光・pH など)にตอบสนองして遺伝子発現をスイッチングするシステム」は、合成生物学、代謝工学、システム生物学、生物分析学、医学など多方面に応用できる。特に、「分子」には有機化学的手法によって光応答性(ケージド基やアゾベンゼンリンカーなどの利用)や pH 応答性(酸性基や塩基性基の利用)を導入できるため、『分子応答性遺伝子発現制御システム』の汎用性は極めて高いと考えられる。

この種のシステムを任意分子に対して人工的に構築する場合、生物が有するシステムを参考にすることが望ましく、cis 作用型の分子応答性遺伝子発現制御システム『リボスイッチ』が第一候補として挙げられる。リボスイッチは、主に原核生物 mRNA の非翻訳領域(UTR)上に存在するノンコーディング RNA であり、制御分子に結合する「アプタマー部位」及び遺伝子発現を司る「発現制御部位」で構成されている。制御分子がアプタマー部位に結合すると、発現制御部位の構造変化が起こり、下流(or 上流)の遺伝子発現(転写 or 翻訳)が制御(天然では主に「抑制(OFF)」)される仕組みである。

天然のリボスイッチは生物の内在性分子にตอบสนองするものに限られるが、任意分子に結合する人工アプタマーは *in vitro* selection 法によって獲得できるので、その人工アプタマーを使って、人工のリボスイッチを構築する試みが、近年盛んに行われている。とりわけ、“転写制御”より単純な“翻訳制御”、且つ“OFF スイッチ”より有用な“ON スイッチ”の人工リボスイッチが多く、例えば原核系では、mRNA の 5'-UTR に人工アプタマーとランダムな塩基配列を挿入した後、スクリーニングを行うことによって、幾つかの翻訳制御型人工 ON リボスイッチが得られている。一方、真核系の通常翻訳機構では、リボソームが mRNA の 5'末端から進入してくるため(5'-UTR 上の制御分子/アプタマー複合体がリボソームの進行を阻害するため)、真核系で機能する人工 ON リボスイッチを構築するのは困難であった。しかし、本研究代表者らは、IRES 依存翻訳などの非典型翻訳機構を利用したり、分子応答性の自己切断型リボザイム(アプタザイム)を mRNA に導入したりすることで、上記問題を解消した真核系人工 ON リボスイッチの開発を重ねてきた。

このように、原核系/真核系や ON 型/OFF 型を問わず、研究者が選択した制御分子に結合・ตอบสนองする人工リボスイッチを構築できるようになったものの、『スイッチング効率』の点においては課題が残されており、一般的に人工リボスイッチ(特に真核系)の ON/OFF 誘導比は天然のものとは比べて低くなってしまいう問題があった。

2. 研究の目的

上記問題を克服するために本研究代表者が着目したのが、「制御分子のターンオーバー数」である。既存のリボスイッチにおいては、天然/人工や原核系/真核系に関わらず、一度結合した制御分子は離れない(or 離れるとスイッチが切り替わる)。つまり、制御分子は、単なる配位子(リガンド)として働いているだけで、ターンオーバーしない。しかし、もし、ターンオーバーさせることができれば、スイッチング効率を改善できるはずである。そこで本研究では、制御分子が触媒として働く『ターンオーバー型リボスイッチ』の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ターンオーバー型 ON アプタザイムの構築

モデル制御分子およびそのアプタマーを用いて、当該分子を触媒として機能する「ターンオーバー型 ON アプタザイム」の構築を試みた。具体的には、低マグネシウム濃度でも高い自己切断活性を示すハンマーヘッドリボザイムやツイスターリボザイムを基盤として、アプタマーの導入位置や周辺の塩基配列などを最適化した。なお、切断反応後に制御分子が解離するように、アプタマーをスプリット化して用いた。また、最適化アプタザイムを真核 mRNA に直接導入することで、真核系人工 ON リボスイッチの構築を目指した。

(2) 短鎖核酸応答性・真核系人工 ON リボスイッチの構築

上記アプタザイムを trans 制御に応用するために、短鎖核酸断片にตอบสนองする真核系人工 ON リボスイッチを開発することにした。具体的には、特定の 6 ヌクレオチド配列から成る DNA (nDNA) に特異結合する RNA アプタマーを改良版 *in vitro* selection 法により獲得した後、当研究室で確立した合理設計法に基づいて当該アプタマーを真核 mRNA に導入し、最適化した。

(3) 短鎖核酸応答性・真核系人工 ON リボスイッチにおける制御分子種の拡大・制御効率改善

上記で獲得した nDNA 結合アプタマーは、標的の nDNA と相補的な配列を 2 つ含んでいた。そこで、当該配列を別の nDNA と相補的にすることによって、様々な nDNA/アプタマー対を合理的に創出し、短鎖核酸応答性・真核系人工 ON リボスイッチの制御分子種の拡大および制御効率の改善を試みた。

(4) 短鎖ペプチド応答性・真核系人工 ON リボスイッチの構築

ON リボスイッチの制御によって発現するペプチドあるいはタンパク質を、制御分子として疑似触媒的に利用できれば、ターンオーバー型リボスイッチに匹敵する効果が期待できる。そこで、短鎖ペプチドおよびそのアプタマーを用いて、当研究室で確立した合理設計法に基づき、当該ペプチドに応答する真核系人工 ON リボスイッチの構築を試みた。

(5) 超巨大人工細胞の創製

人工リボスイッチ機能を *in vitro* で調査するための反応場としての利用を指向して、真核無細胞発現系（小麦胚芽抽出液：WGE）を封入した超巨大人工細胞（リボソーム）の創製にも挑んだ。具体的には、WGE を効率的に封入し、かつ内部における発現が阻害されないようにするために、超巨大リボソーム調製法（water-in-oil エマルジョン界面通過法）の条件検討を行った。

(6) 高い真核発現効率を發揮する非翻訳領域の探索・最適化

ON 状態におけるリボスイッチの発現効率を高めるために、3'末端からの mRNA 分解を防ぐ保護配列を *in vitro* selection によって獲得するとともに、クリケット麻痺ウイルス（CrPV）が有する内部リボソーム進入部位（IRES）の配列を合理的に改変することで、WGE における IRES 媒介翻訳効率の向上を目指した。

(7) 真核発現系を基盤とした転写-翻訳共役系の開発

上述した非翻訳領域の最適化に加えて、さらに WGE の発現効率を高めるために、高効率な転写-翻訳共役系の開発にも取り組んだ。具体的には、「T7 RNA ポリメラーゼによる転写」と「上記で改変した CrPV IRES 媒介の翻訳」を組み合わせ、反応条件を最適化した。

4. 研究成果

(1) ターンオーバー型 ON アプタザイムの構築

モデルとしてテオフィリン結合アプタマーを用いて、ハンマーヘッドリボザイム基盤 ON アプタザイムを構築・最適化した。最適化アプタザイムは、テオフィリン濃度依存的に自己切断率が上昇し、1 mM テオフィリン（および 2.7 mM Mg²⁺）存在下において、高い切断 ON/OFF 比（約 15）を示した。また、当該アプタザイムを真核 mRNA の 5'末端に導入して真核系人工 ON リボスイッチを構築したところ、1 mM テオフィリン存在下の発現 ON/OFF 比は、WGE において約 4~7 であった。本リボスイッチはプロトタイプであるため、今後の改良によって、スイッチング効率の改善が望まれる。

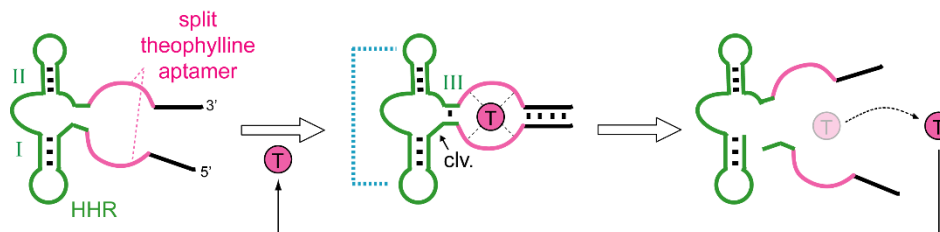


図 1. テオフィリン応答性のターンオーバー型 ON アプタザイム

(2) 短鎖核酸応答性・真核系人工 ON リボスイッチの構築

リボスイッチ構築用のアプタマーを獲得するために考案した「改良版 *in vitro* selection 法」によって、短鎖核酸（nDNA, 5'GGTTGC 3'）に高特異性・高親和性で結合する RNA アプタマーを数種類獲得した。そのうちの 1 つ（nDNA-547）を用いて、チャパネアオカメムシ腸管ウイルス（PSIV）の IRES を基盤とした真核系人工 ON リボスイッチを構築したところ、300 μM nDNA 存在下の WGE において、約 21 の発現 ON/OFF 比を示した。本リボスイッチは、5'末端に r[GGUUGC] という配列を有する RNA に対しても高い応答性を示すため、上記アプタザイムの切断断片配列を上手く調節することによって、trans 制御カスケードの構築も可能である。

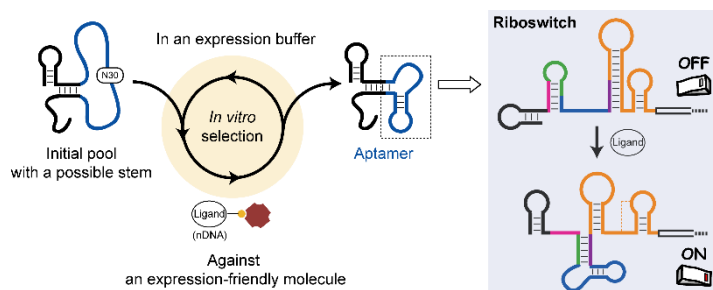


図 2. 改良版 selection 法（左）と nDNA 応答性の真核系人工 ON リボスイッチ（右）

(3) 短鎖核酸応答性・真核系人工 ON リボスイッチにおける制御分子種の拡大・制御効率改善
 nDNA-547 が有する nDNA の相補配列部分を別の nDNA (5' XXTTGC 3' or 5' GGXXGC 3') と相補的になるように変更して、計 30 種 (オリジナルを除く) の真核系人工 ON リボスイッチを構築した。その結果、例外はあったものの、半数以上のリボスイッチは、対応する nDNA に高い応答性を示した。また、幾つかのリボスイッチは、オリジナルのスイッチング効率を超える ON/OFF 比を示した。さらに、高応答性を示すリボスイッチの中から高い直交性を示すグループを抽出することも可能で、実際に、異なる 3 種のリボスイッチによる同時制御を実現した。

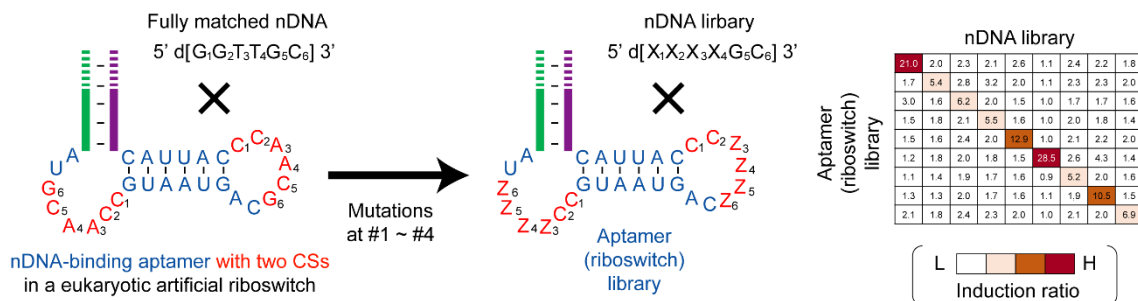


図 3 . nDNA/アプタマー (nDNA/リボスイッチ) 対の合理的創出

(4) 短鎖ペプチド応答性・真核系人工 ON リボスイッチの構築

モデルとして「Arg リッチなペプチド (Rev or Tat) に結合する RNA アプタマー」を用いて構築した真核系人工 ON リボスイッチは、低濃度のペプチド (10 μM) を含有する WGE において、最大 11 の発現 ON/OFF 比を示した。また、最適化した Rev 応答性リボスイッチと Tat 応答性リボスイッチは互いに直交しているため、疑似ターンオーバー型リボスイッチの他、人工の遺伝子回路構築への応用展開が期待できる。

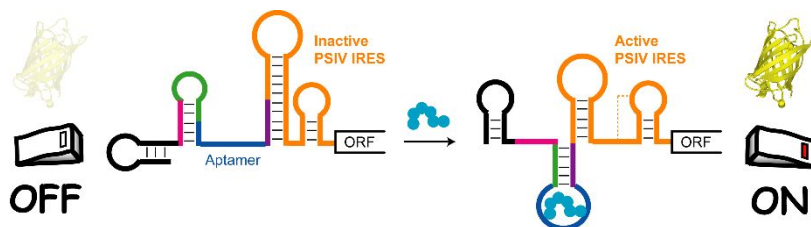


図 4 . ペプチドに応答して蛍光タンパク質を発現する真核系人工 ON リボスイッチ

(5) 超巨大人工細胞の創製

WGE とともに封入する高密度溶質 (スクロース) の濃度、油相および水相の組成、調製温度を最適化することで、WGE 封入超巨大人工細胞 (直径 1.6~4.4 μm) を効率的に調製する方法を確立した。また、最適条件下で調製した人工細胞内部での発現効率は、外部における発現効率と同等であった。今後、人工リボスイッチの機能のみならず、様々な生命システムを *in vitro* で調査するための反応場としての利用が期待される。

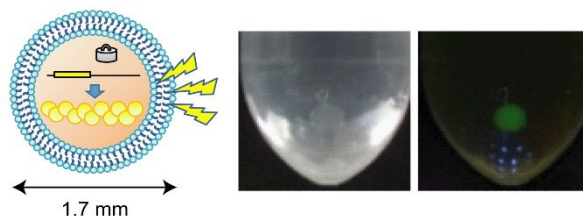


図 5 . WGE 封入超巨大人工細胞内における蛍光タンパク質の発現

(6) 高い真核発現効率を發揮する非翻訳領域の探索・最適化

In vitro selection で獲得した 3' 末端保護配列を mRNA に付加したところ、安定性の向上効果によって、WGE における翻訳効率が約 5 倍程度上昇した。また、CrPV の IRES を改変した結果、野生型より 3~4 倍高い翻訳効率を示すものを発見した。両配列は同時使用が可能であり、ON 状態におけるリボスイッチの発現効率向上の他、真核発現系におけるタンパク質大量合成のために利用可能である。

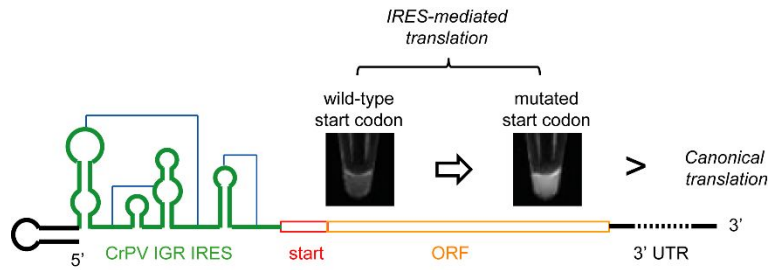


図 6 . CrPV IRES の開始コドン改変による翻訳効率の改善

(7) 真核発現系を基盤とした転写-翻訳共役系の開発

最適化した転写-翻訳共役系の発現効率は、mRNA を鋳型とした従来のバッチ法に比して、約 9 倍上昇し、一部の原核無細胞系にも匹敵した。また、上記超巨大人工細胞内部でも発現効率を損なうことなく機能することを確認した。今後、当該共役系を利用することで、高効率な原核系人工 ON リボスイッチのように、速度論的機構で機能する真核系人工 ON リボスイッチの構築も可能になるかもしれない。

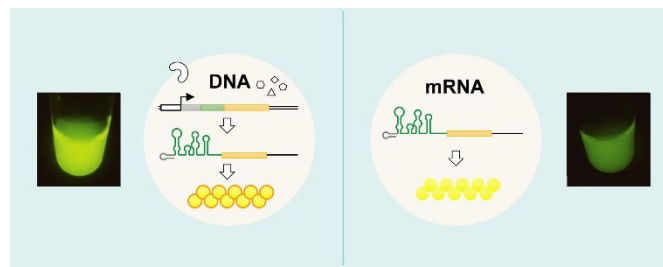


図 7 . WGE を基盤とした転写-翻訳共役系 (左) と従来バッチ法 (右) による発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa Atsushi, Inoue Honami, Itoh Yu, Takahashi Hajime	4. 巻 12
2. 論文標題 Facile Expansion of the Variety of Orthogonal Ligand/Aptamer Pairs for Artificial Riboswitches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.2c00475	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 Takahashi Hajime, Okubo Ryo, Ogawa Atsushi	4. 巻 71
2. 論文標題 Eukaryotic artificial ON-riboswitches that respond efficiently to mid-sized short peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128839 ~ 128839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128839	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 Takahashi Hajime, Ogawa Atsushi	4. 巻 52
2. 論文標題 Coupled in vitro transcription/translation based on wheat germ extract for efficient expression from PCR-generated templates in short-time batch reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128412 ~ 128412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128412	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 Takahashi Hajime, Ogawa Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 A Detailed Protocol for Preparing Millimeter-sized Supergiant Liposomes that Permit Efficient Eukaryotic Cell-free Translation in the Interior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	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) 10.21769/BioProtoc.4054	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 Yano-Ozawa Yuki, Lobsiger Nadine, Muto Yu, Mori Takahiro, Yoshimura Ken, Yano Yuki, Stark Wendelin Jan, Maeda Mizuo, Asahi Tsuyoshi, Ogawa Atsushi, Zako Tamotsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular detection using aptamer-modified gold nanoparticles with an immobilized DNA brush for the prevention of non-specific aggregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 11984 ~ 11991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0RA05149G	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 該当する

1. 著者名 Ogawa Atsushi, Itoh Yu	4. 巻 9
2. 論文標題 In Vitro Selection of RNA Aptamers Binding to Nanosized DNA for Constructing Artificial Riboswitches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2648 ~ 2655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00384	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 Takahashi Hajime, Ogawa Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Preparation of a Millimeter-Sized Supergiant Liposome That Allows for Efficient, Eukaryotic Cell-Free Translation in the Interior by Spontaneous Emulsion Transfer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1608 ~ 1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00173	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 Atsushi Ogawa, Akane Kutsuna, Masashi Takamatsu, Tatsuya Okuzono	4. 巻 29
2. 論文標題 In vitro selection of a 3' terminal short protector that stabilizes transcripts to improve the translation efficiency in a wheat germ extract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2141 ~ 2144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.06.058	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 Atsushi Ogawa and Masashi Takamatsu	4. 巻 29
2. 論文標題 Mutation of the start codon to enhance Cripavirus internal ribosome entry site-mediated translation in a wheat germ extract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126729 ~ 126729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126729	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16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 小川敦司
2. 発表標題 機能性核酸および無細胞系を利用した真核遺伝子発現制御システムの合理設計
3. 学会等名 第37回中国四国地区高分子若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋萌, 小川敦司
2. 発表標題 小麦無細胞基盤・超巨大人工細胞における遺伝子発現能の向上を指向した転写-翻訳共役系の開発
3. 学会等名 第17回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hajime Takahashi, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Coupled in vitro transcription/translation system based on a wheat germ extract for highly efficient gene expression in supergiant artificial cells
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Ohtsuka, Masashi Maekawa, Shigeki Higashiyama, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 In vitro selection of DNA aptamers against KCTD10, a substrate receptor of cullin-3 ubiquitin ligases
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋萌, 小川敦司
2. 発表標題 超巨大人工細胞における高効率な真核系遺伝子発現を指向した転写-翻訳共役系の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hajime Takahashi, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Coupled in vitro transcription/translation based on wheat germ extract for efficient expression in batch reactions
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋萌, 小川敦司
2. 発表標題 効率的な遺伝子発現能を有する超巨大人工細胞の構築を目的とした超巨大リボソーム調製法の改良
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋萌、小川敦司
2. 発表標題 内部での効率的な遺伝子発現を指向した小麦無細胞系基盤・超巨大人工細胞の構築
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋萌、小川敦司
2. 発表標題 小麦無細胞基盤パッチ法における高効率遺伝子発現を指向した転写-翻訳共役系の開発
3. 学会等名 第16回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤優、小川敦司
2. 発表標題 人工リボスイッチ構築用RNAアプタマーのin vitro selection
3. 学会等名 2020年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋萌、小川敦司
2. 発表標題 小麦無細胞系を封入した超巨大リボソーム (SGUV) における遺伝子発現
3. 学会等名 2020年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋萌、小川敦司
2. 発表標題 コムギ無細胞系基盤の高発現活性を有する超巨大人工細胞の創製
3. 学会等名 第15回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 敦司
2. 発表標題 マルチターンオーバー型真核系リボスイッチの開発
3. 学会等名 新世代の生物有機化学研究会2019 (第14回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hajime Takahashi, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Gene expression in a super-giant liposome encapsulating a wheat germ extract
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 優, 小川 敦司
2. 発表標題 ナノDNA応答性真核系人工リボスイッチの構築
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 リボスイッチ媒介化学コミュニケーション型の真核系超巨大人工細胞
2. 発表標題 高橋 萌, 小川 敦司
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 小川研究室 https://www.pros.ehime-u.ac.jp/ogawa/

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