

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02998

研究課題名(和文)「オルガネラ様防衛共生体」の基盤解析から応用展開へ

研究課題名(英文) From the fundamental analysis to the application development of "organelle-like defensive symbionts"

研究代表者

中鉢 淳 (NAKABACHI, Atsushi)

豊橋技術科学大学・先端農業・バイオリサーチセンター・准教授

研究者番号：40332267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミカンキジラミ共生細菌の産生する化合物「ディアフォリン」が、1)大腸菌の増殖・物質生産を促進する一方、枯草菌の増殖・細胞分裂を抑制すること、2)低濃度で細菌由来無細胞タンパク質合成系の活性を促進する一方、高濃度で阻害すること、3)大腸菌・枯草菌に対して異なる遺伝子発現変動を惹起すること、などを解明した。また、ミカンキジラミの共生器官/共生細菌の超微細構造を解明するとともに、複数キジラミ系統の共生細菌のゲノム構造や一次共生細菌の極端な高倍数性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌に対するディアフォリンの特異的な活性は、特定系統の増殖を促進しながら他の系統を排除するなど、柑橘病原体を含むキジラミ細菌叢に大きな影響を与える可能性があり、植物保護の観点から注目される。また、大腸菌は多様な有用物質の工業生産に頻用されるため、上記活性はこれらの生産効率向上への貢献が期待される。また、共生器官・共生細菌の微細構造、ゲノム構造などの解明は、真核生物-細菌間の相互作用の理解を進めるとともに、高選択性害虫防除法開発の基盤データを提供する。

研究成果の概要(英文)：The present research project revealed that diaphorin, a compound produced by a symbiotic bacterium of the Asian citrus psyllid, 1) promotes the growth and substance production of *Escherichia coli* while inhibiting the growth and cell division in *Bacillus subtilis*, 2) promotes the activity of a bacterial cell-free protein synthesis system at low concentrations while inhibiting it at high concentrations, and 3) induces different gene expression changes in *E. coli* and *B. subtilis*. In addition, the ultrastructure of the Asian citrus psyllid symbiotic organ and symbiotic bacteria therein was elucidated, as well as the genome structure of symbiotic bacteria of multiple psyllid lineages and the extremely high ploidy of the primary symbiont.

研究分野：共生生物学、昆虫学、微生物学

キーワード：ミカンキジラミ 二次代謝 大腸菌 枯草菌 物質生産 無細胞タンパク質合成 電子顕微鏡 ゲノム

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミカンキジラミ *Diaphorina citri* (半翅目:キジラミ科)は、カンキツグリーニング病の病原体“*Candidatus Liberibacter spp.*”(Alphaproteobacteria)を媒介する、世界的に重要な農業害虫である。*D. citri*は、共生器官「バクテリオーム」に“*Ca. Carsonella ruddii*”(Gammaproteobacteria: Oceanospirillales)と“*Ca. Proffttella armatura*”(Gammaproteobacteria: Burkholderiales)の2種類の共生細菌を保有し、経卵感染により世代を超えて受け継いでいる。*Carsonella*は、キジラミの餌である植物師管液に不足する必須アミノ酸を合成して宿主に提供する栄養共生体で、各種キジラミ類に普遍的に存在する。これに対し、*D. citri*のみで見られる *Proffttella*は、他に類例のない「オルガネラ様防衛共生体」と推察され、各種真核生物に対して阻害的な活性を示す新規化合物「ディアフォリン」を大量に産生し、その虫体内濃度は2-20 mMに及ぶ。ただし、*Liberibacter*の媒介等、*D. citri*の細菌叢に影響を与え得る、原核生物に対するディアフォリンの活性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題は、原核生物に対するディアフォリンの生物活性の解明を主目的とし、その作用機序・分子機構の基盤情報収集を目指した。また、きわめてユニークな「オルガネラ様防衛共生体」としての *Proffttella*の進化動態や、ミカンキジラミ・バクテリオーム共生系の維持機構の解明を志向した。

3. 研究の方法

様々な濃度のディアフォリンを液体培地に添加して原核生物を培養し、その影響を、培養液の濁度測定、微分干渉像の画像解析に基づく細胞の濃度・形態・サイズの定量、透過型電子顕微鏡解析、ガラクトシダーゼアッセイなどにより追跡した。さらに、再構成型無細胞タンパク質合成系を用いて GFP 遺伝子を発現させることで、原核生物の遺伝子発現に対するディアフォリンの影響を調べるとともに、培養細菌の RNA-seq によりディアフォリン処理後の遺伝子発現パターンの変化を追跡した。また、アンプリコン解析により、多様なキジラミ系統の細菌叢を解析して *Proffttella* 姉妹系統を探索し、得られた共生細菌の比較ゲノム解析を行った。加えて、透過型電子顕微鏡により *D. citri* バクテリオームの超微細構造を解析するとともに、定量 PCR 法により、*Carsonella* のゲノム倍数性を解析した。

4. 研究成果

(1)ディアフォリンが大腸菌の増殖・物質生産を促進することを解明

モデルグラム陰性細菌である大腸菌 *Escherichia coli* (Gammaproteobacteria: Enterobacteriales)を、様々な濃度のディアフォリンを含む培地中で培養したところ、5 mM ディアフォリンにより大腸菌の増殖や物質生産が促進されることが明らかとなった。本活性は、大腸菌による有用物質の工業生産効率改善への貢献が期待される。

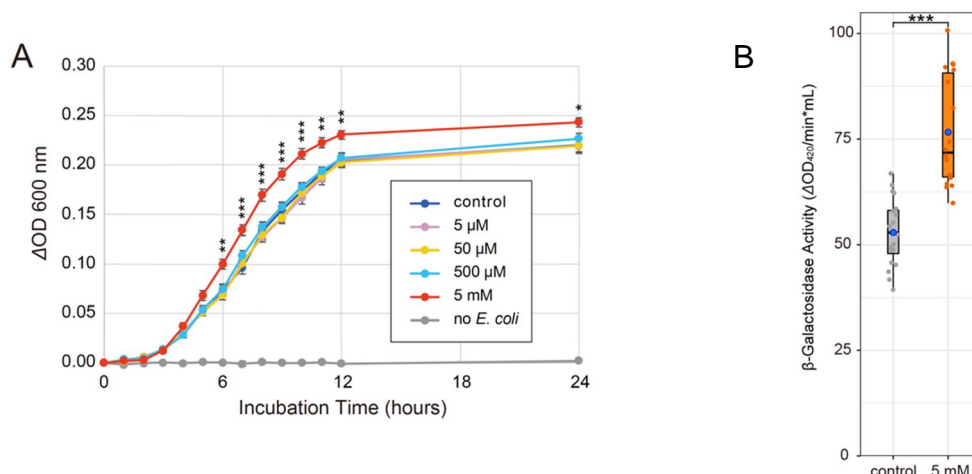


図1.ディアフォリンは大腸菌の増殖・物質生産を促進する。(A) 0-5 mMのディアフォリンを含む培地中で培養した大腸菌の増殖曲線($n = 12$).横軸は培養時間,縦軸は培養液の濁度を示し,5 mMディアフォリン添加による増殖促進が示唆された.その他,微分干渉像の画像解析に基づく単位培地体積あたり細胞数,細胞形態と細胞サイズの追跡により,ディアフォリンが大腸菌細胞の数とサイズの両者を増大させることを明らかにした.(B) ガラクトシダーゼ活性の定量に基づく大腸菌の物質生産能評価($n = 20$).5 mMディアフォリン添加により,培養液の単位体積あたり物質生産能が約50%向上することが明らかとなった.

(2)ディアフォリンが枯草菌の増殖・細胞分裂を抑制することを解明

モデルグラム陽性細菌である枯草菌 *Bacillus subtilis* (Bacilli: Bacillales) を用いて上記と同様の解析を行ったところ,大腸菌とは反対に,その増殖や細胞分裂がディアフォリン濃度依存的に抑制されることが明らかとなった.

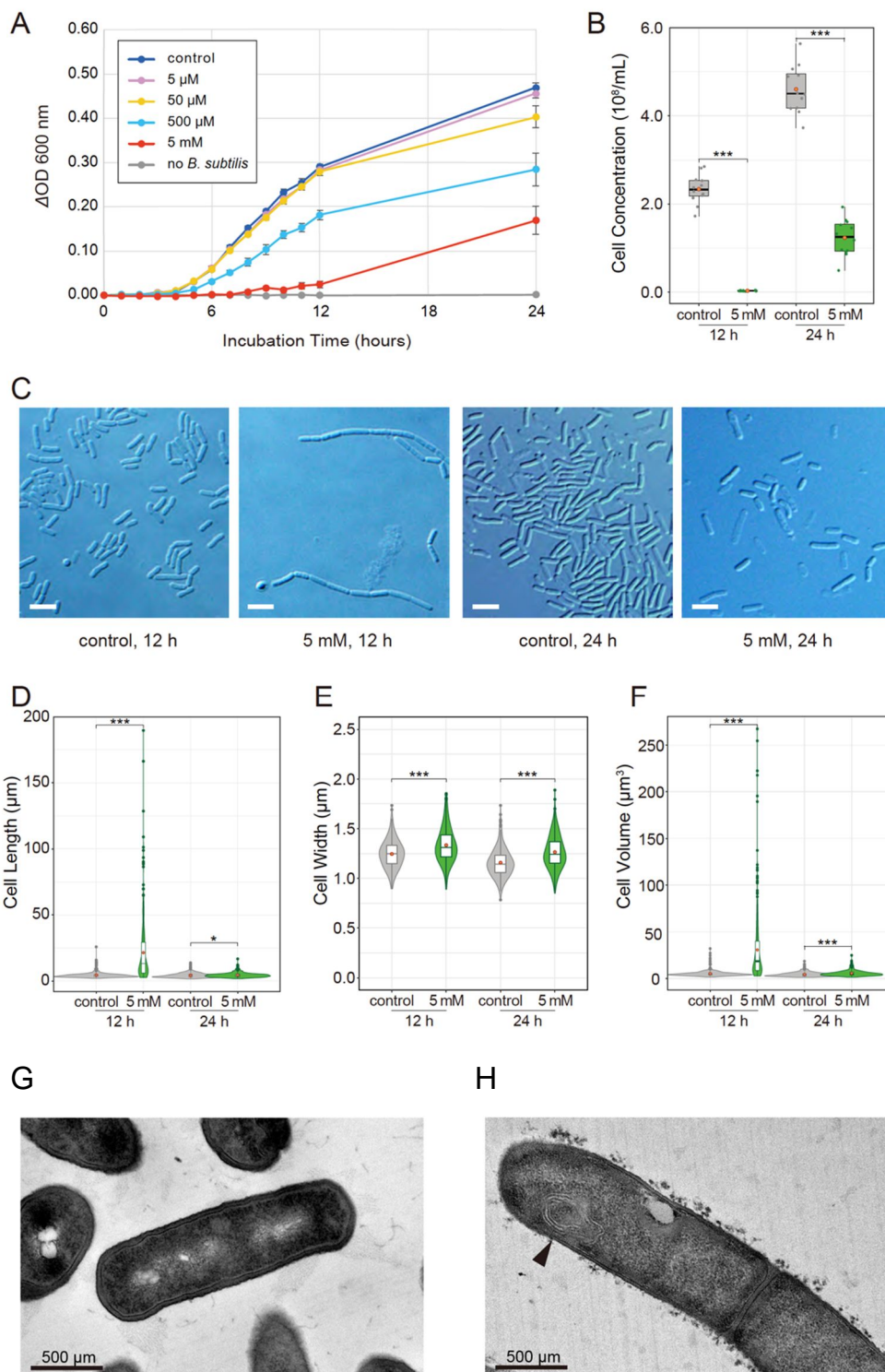


図 2. ディアフォリンは枯草菌の増殖・細胞分裂を抑制する。(A)0-5 mM のディアフォリンを含む培地中で培養した枯草菌の増殖曲線 ($n = 12$). ディアフォリン濃度依存的な増殖抑制が示唆される。(B)培養 12 時間後(左)と 24 時間後(右)の枯草菌の単位培地体積あたり細胞数 ($n = 12$). (C)枯草菌の微分干涉像. スケールバー, 5 μm . (D-F) 枯草菌細胞の長径, 短径, 体積 ($n = 1,200$). (G)12 時間培養後の対照群(ディアフォリン処理なし)の枯草菌の透過型電子顕微鏡像. (H)5 mM ディアフォリン含有培地で 12 時間培養後の枯草菌の透過型電子顕微鏡像. エンベロープに明らかな異常が見られるとともに, 細胞内にも「メソソーム」様構造が生じており, 膜構造に対するディアフォリンの影響が示唆される.

(3)ディアフォリンが低濃度で試験管内タンパク質合成を促進し、高濃度で阻害することを解明
大腸菌や枯草菌のリボソームを含む再構成型無細胞タンパク質合成系を利用してディアフォリンによる影響を検証したところ、ディアフォリンは 5 mM の高濃度ではいずれの系に対しても阻害的に働くのに対し、50-500 μM の濃度範囲では、これらの系のタンパク質合成を促進することを明らかにした。これは、ディアフォリンによる細菌の増殖・代謝制御活性の標的の少なくとも一部が、遺伝子発現系である可能性を示唆する。

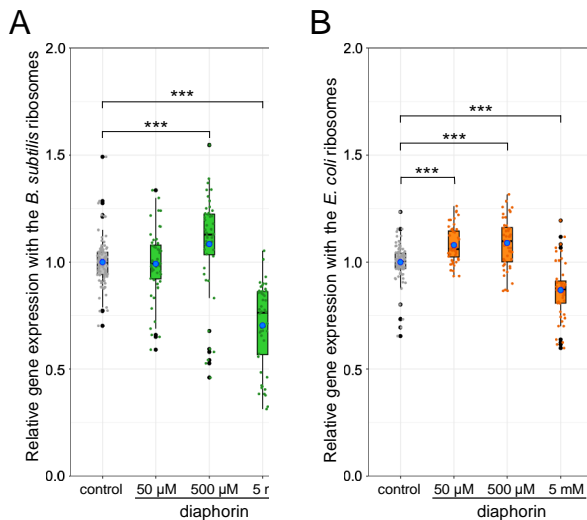


図 3. ディアフォリンは低濃度で試験管内タンパク質合成を促進し、高濃度で阻害する。(A)大腸菌リボソームを用いた際の GFP 遺伝子発現の相対値.(対照群 $n = 96$;ディアフォリン処理群 $n = 48$). (B)枯草菌リボソームを用いた際の GFP 遺伝子発現の相対値.(対照群 $n = 96$;ディアフォリン処理群 $n = 48$).いずれのリボソームを用いた場合も 50-500 μM のディアフォリン添加により相対発現量が 10%程度増加するのに対し、5 mM のディアフォリン添加により発現が低下することが分かる。

(4)RNA-seq により大腸菌と枯草菌の対ディアフォリン挙動の相違についての示唆を獲得
ディアフォリン処理時の大腸菌・枯草菌の RNA-seq 解析に着手し、両細菌間でディアフォリンに対する挙動が大きく異なる原因について、重要な示唆を得た。

(5)各種原核生物に対するディアフォリンの生物活性を解明

4 系統のグラム陰性細菌 *Arsenophonus nasoniae*, *Photobacterium luminescens* (ともに Gammaproteobacteria: Enterobacterales: Morganellaceae), *Serratia entomophila* および *Serratia symbiotica* (ともに Gammaproteobacteria: Enterobacterales: Yersiniaceae)、また 2 系統のグラム陽性細菌 *Micrococcus luteus*, *Kocuria rhizophila* (いずれも Actinobacteria: Micrococcales) を用いて 1, 2 と同様の解析を行なった。その結果、増殖の促進/抑制されるグループに明確に区分されるものの、グラム陽性・陰性の類別とは異なり、ディアフォリンの複雑な活性スペクトルが明らかとなった。

(6) キジラミ二次共生細菌の進化動態の一端を解明

宿主と一体化しながら防衛機能を担うきわめてユニークな二次共生体である *Proffttella* の進化動態について理解を進めるべく、多様なキジラミ系統を用いて、16S rRNA 遺伝子の可変領域 V3-V4 を標的としたアンプリコン解析を行い、それぞれのキジラミ種における共生細菌叢を解明した。その結果、*Diaphorina* 属の複数種より *Proffttella* の姉妹系統と目される細菌を検出した。これは、*Proffttella* が *Diaphorina* 属で広く保存されている可能性を示唆するものである。この知見に基づき、*Diaphorina* spp. に由来する共生細菌の比較ゲノム解析を行い、500 kb 弱の *Proffttella* 極小ゲノムにディアフォリン合成遺伝子クラスターが保存されていること、ただし一部遺伝子について、モジュールユニット数が大きく異なることなどを解明した。また、キジラミ細菌叢解析より、これまでアブラムシ(半翅目:腹吻亜目)の二次共生体としてのみ認識され

ていた “*Candidatus Fukatsuia symbiotica*” や *Serratia symbiotica* (ともに Gammaproteobacteria: Enterobacterales) 節足動物の生殖攪乱因子として知られる *Wolbachia* (Alphaproteobacteria) のうち supergroup 0 に属する系統、植物病原体である *Pectobacterium* に近縁ながら病原性を示さず、近年多様な無脊椎動物から共生細菌として検出されている *Symbiopectobacterium* などを世界で初めてキジラミ類から検出するなど、多様な共生細菌叢を明らかにした。また、この解析で得られた複数の共生細菌のゲノム解析を行い、*Carsonella* と同様の極小ゲノムを持つ二次共生細菌を見出した。

(7) *D. citri* のバクテリオームと共生細菌の超微細構造を解明

これまでのオミクス解析により、極小ゲノムを持ち、遺伝子レパートリーの乏しい共生細菌二種 (*Carsonella*, *Profftella*) と宿主 *D. citri* の間の相互依存的な代謝系が示唆されており、三者間での様々な生体物質の授受が想定される。こうした生物間相互作用の理解には、共生細菌やその宿主との界面であるバクテリオームの存在様態についての情報が不可欠だが、こうした知見は乏しい。そこでこれらの超微細構造を調べるべく、透過型電子顕微鏡観察を行なった。その結果、*Profftella* 細胞内に直径約 300 nm の特異なチューブ状構造が多数存在すること、そのチューブ状構造は 5-6 本の繊維が絡み合って構成されているらしいこと、*Carsonella* ではエンベロープ直下に繊維束が存在し、ネット状の構造を形成すること、*Carsonella* は多くのリボソームを持ち、その一部は顕著な凝集体を形成すること、宿主のミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ体などのオルガネラがこれら共生細菌と密に接触すること、こうしたオルガネラは *Profftella* を収納する多核領域と比較して *Carsonella* を収納する単核菌細胞でより高密度に分布し、ミトコンドリアのクリステも後者でより発達すること、*Wolbachia* は、*Carsonella* を収納する単核菌細胞のみで見出されること、などを明らかにした。このチューブ構造については、状況証拠からウイルスなどの寄生体ではないと考えられる。細菌は一般にオルガネラを持たないため、こうした細胞内構造が見つかることはきわめて珍しく、現在その実態解明を進めている。

(8) *Carsonella* ゲノムの極端な高倍数性を解明

ミトコンドリアや色素体は、原始単細胞真核生物が取込んだ細菌を起源とするオルガネラ(細胞内小器官)であり、極小ゲノムを多コピー持つことが知られている。これに対し、真核生物が多細胞化した後に取込まれたオルガネラ様共生体である昆虫の菌細胞内共生細菌について、ゲノム配列データは急速に蓄積されつつあるが、その倍数性についてはほとんど知られていない。そこで今回、定量 PCR 法で *Carsonella* の倍数性を評価したところ、ひとつの菌細胞内の *Carsonella* は平均 6×10^4 コピーのゲノムを持ち、*Carsonella* 一細胞は数千~数万コピーに及ぶゲノムを保有し得ることが明らかとなった。このきわめて高い倍数性は、相同組換えによる DNA 損傷の修復に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kyosuke Nishino, Hiromitsu Inoue, Yuu Hirose, and Atsushi Nakabachi	4. 巻 TBA
2. 論文標題 Microbiome of psyllids of the family Aphalaridae, including <i>Aphalara itadori</i> , a biocontrol agent against <i>Reynoutria</i> spp.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Entomologia Experimentalis et Applicata	6. 最初と最後の頁 TBA
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 Yuka Yasuda, Hiromitsu Inoue, Yuu Hirose, Atsushi Nakabachi	4. 巻 TBA
2. 論文標題 Highly reduced complementary genomes of dual bacterial symbionts in the mulberry psyllid <i>Anomoneura mori</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 TBA
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takasu Rena, Izu Takashi, Nakabachi Atsushi	4. 巻 TBA
2. 論文標題 A limited concentration range of diaphorin, a polyketide produced by a bacterial symbiont of the Asian citrus psyllid, promotes the <i>in vitro</i> gene expression with bacterial ribosomes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0017024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00170-24	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 Nakabachi Atsushi, Suzuki Toshinobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Ultrastructure of the bacteriome and bacterial symbionts in the Asian citrus psyllid, <i>Diaphorina citri</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0224923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02249-23	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 Takasu Rena, Yasuda Yuka, Izu Takashi, Nakabachi Atsushi	4. 巻 18
2. 論文標題 Diaphorin, a polyketide produced by a bacterial endosymbiont of the Asian citrus psyllid, adversely affects the in vitro gene expression with ribosomes from Escherichia coli and Bacillus subtilis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0294360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0294360	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 Maruyama Junnosuke, Inoue Hiromitsu, Hirose Yuu, Nakabachi Atsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 16S rRNA Gene Sequencing of Six Psyllid Species of the Family Carsidaridae Identified Various Bacteria Including Symbiopectobacterium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME23045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME23045	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 Nakabachi Atsushi, Inoue Hiromitsu, Hirose Yuu	4. 巻 37
2. 論文標題 High-resolution Microbiome Analyses of Nine Psyllid Species of the Family Triozidae Identified Previously Unrecognized but Major Bacterial Populations, including Liberibacter and Wolbachia of Supergroup O	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME22078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME22078	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 Tanabe Nozomu, Takasu Rena, Hirose Yuu, Kamei Yasuhiro, Kondo Maki, Nakabachi Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Diaphorin, a Polyketide Produced by a Bacterial Symbiont of the Asian Citrus Psyllid, Inhibits the Growth and Cell Division of Bacillus subtilis but Promotes the Growth and Metabolic Activity of Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0175722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.01757-22	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 Nakabachi Atsushi, Moran Nancy A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Extreme Polyploidy of Carsonella, an Organelle-Like Bacterium with a Drastically Reduced Genome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0035022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00350-22	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 該当する

1. 著者名 Nakabachi Atsushi, Inoue Hiromitsu, Hirose Yuu	4. 巻 22
2. 論文標題 Microbiome analyses of 12 psyllid species of the family Psyllidae identified various bacteria including Fukatsuaia and Serratia symbiotica, known as secondary symbionts of aphids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-021-02429-2	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 Nakabachi Atsushi, Malenovsky Igor, Gjonov Ilia, Hirose Yuu	4. 巻 80
2. 論文標題 16S rRNA Sequencing Detected Profftella, Liberibacter, Wolbachia, and Diplorickettsia from Relatives of the Asian Citrus Psyllid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 410 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00248-020-01491-z	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 Nakabachi Atsushi, Piel Joern, Malenovsky Igor, Hirose Yuu	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative Genomics Underlines Multiple Roles of Profftella, an Obligate Symbiont of Psyllids: Providing Toxins, Vitamins, and Carotenoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1975 ~ 1987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gbe/evaa175	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高須麗奈, 田邊望夢, 安田侑加, 伊豆尚, 亀井 保博, 近藤 真紀, 中鉢淳
2. 発表標題 新規二次代謝物のユニークな細菌制御活性とその作用機構の探究
3. 学会等名 令和5年度 次世代半導体・センサ科学研究所シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高須 麗奈, 田邊 望夢, 安田 侑加, 伊豆 尚, 亀井 保博, 近藤 真紀, 広瀬 侑, 中鉢 淳
2. 発表標題 昆虫共生細菌由来の二次代謝物によるユニークな細菌制御活性の発見とその作用機序の探究
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊豆 尚, 高須 麗奈, 中鉢 淳
2. 発表標題 多様な細菌種に対するディアフォリンの生物活性評価
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西野 京助, 井上 広光, 広瀬 侑, 中鉢 淳
2. 発表標題 イタドリマダラキジラミとその同科種の共生細菌叢解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山淳之介, 井上 広光, 広瀬 侑, 中鉢 淳
2. 発表標題 ネッタイキジラミ科キジラミ6種の共生細菌叢解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田 侑加, 井上 広光, 広瀬 侑, 中鉢 淳
2. 発表標題 クワキジラミ共生細菌 2 種のゲノム解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中鉢淳, 井上広光, 広瀬侑
2. 発表標題 吸汁性昆虫キジラミ-細菌間の多様な複合共生系
3. 学会等名 令和3年度エレクトロニクス先端融合研究所シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中鉢淳, Joern Piel, Igor Malenovsky, Ilia Gjonov, 広瀬侑
2. 発表標題 昆虫共生細菌Profftella_Dcoの特異なポリケチド合成系
3. 学会等名 令和2年度エレクトロニクス先端融合研究所シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中鉢淳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 12
3. 書名 環境・生命科学 6章「生命工学」	

〔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
研究協力者	井上 広光 (INOUE Hiromitsu)		
研究協力者	広瀬 侑 (HIROSE Yuu)		

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			
米国	テキサス大学			
チェコ	マサリク大学			
ブルガリア	ソフィア大学			
スイス	チューリッヒ工科大学			