

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03037

研究課題名(和文)汎用性および実用性を高める新たな樹木ゲノム編集技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of new genome editing technology with higher versatility and practicality in trees.

研究代表者

西口 満 (Nishiguchi, Mitsuru)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：80353796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポプラ以外の広葉樹としてユーカリ(*Eucalyptus camaldulensis*)のゲノム編集技術を開発するため、CRISPR/Cas9法を用いてユーカリのフィトエン不飽和化酵素遺伝子をゲノム編集した。遺伝子組換え樹木であるゲノム編集スギを非遺伝子組換え化するため、ゲノム編集スギと非遺伝子組換えスギを交配して得られた子世代(F1)の遺伝子を調べ、外来遺伝子を持たないF1を得た。F1同士を交配して、孫世代(F2)の種子を得た。スギの複数の遺伝子を同時にゲノム編集するため、必要なベクターを作製し、スギに導入した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のゲノム編集技術において、初めてCRISPR/Cas9の使用が報告された2013年から約10年を経過した。この間、作物を含む草本植物ではゲノム編集可能な植物種が大幅に増え、基礎研究以外にも耐病性をはじめとする環境ストレス耐性の向上、あるいは機能性成分の増加など応用的な研究開発にゲノム編集技術が利用されてきた。一方、樹木のゲノム編集技術については、ポプラ類を除けば研究例は未だ少ない。本研究で得られた知見は、実用樹木であるユーカリやスギのゲノム編集技術をさらに改良し、有効的に活用していくために役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop genome editing technology in broad-leaved trees other than *Populus* species, *Eucalyptus camaldulensis* phytoene desaturase genes were mutated using the CRISPR/Cas9 system. To remove exogenous genes from the genome-edited sugi trees made with the CRISPR/Cas9 system, they were crossed with non-transgenic trees. F1 hybrid trees were obtained, some of which did not have the exogenous genes such as the kanamycin-resistant gene. The F1 trees were crossed each other and then the F2 seeds were generated. To modify two loci in the sugi genome simultaneously, we made the required CRISPR/Cas9 vectors and introduced them into sugi cells.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：CRISPR/Cas9 *Cryptomeria japonica* *Eucalyptus camaldulensis* ゲノム編集技術 スギ 非遺伝子組換え 木本植物 ユーカリ

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

ゲノム編集技術は、生物の遺伝子を切断して、遺伝子を改変する新しい技術である。これまでの放射線や薬品による方法と違い、狙った遺伝子だけを改変できることから有用性は非上に高く、遺伝子機能の解明、遺伝病の治療、品種改良などへの応用が進められている。

樹木では、オレンジのゲノム編集が2014年に最初に報告された。その後、ポプラや果樹(リンゴ、ブドウ、コーヒーなど)のゲノム編集が国内外で進められ、我々もポプラ(*Populus nigra*)やスギ(*Cryptomeria japonica*)のゲノム編集技術を開発している。しかし、他の有用樹種のゲノム編集例はほとんどなく、実験技術的な問題や遺伝子情報の不足があると考えられる。

また、多くの植物では、ゲノム編集のために遺伝子組換え実験をとまなう。このように作られたゲノム編集植物は遺伝子組換え生物に該当し、日本国内ではカルタヘナ法など関連法令によって栽培や使用が規制されている。加えて、遺伝子組換え植物が社会的に受け入れられにくいという問題もあり、遺伝子組換え生物に該当しないゲノム編集樹木が望ましい。

ゲノム編集の効率や自由度を向上させる方法として、CRISPR/Cas9法を利用したマルチプレックスゲノム編集技術で複数の性質(遺伝子)を同時に改変することができる。作物やポプラでは報告があるが、他の樹種ではまだマルチプレックスゲノム編集技術の報告はない。

これらの背景により、樹木のゲノム編集技術を利用していくために現在重要と考えられる課題は次の3点であり、各課題の解決が必要である。

もっと色々な樹種でゲノム編集技術が使えないだろうか？

遺伝子組換え生物に該当しないゲノム編集樹木を作るにどうすればよいか？

複数の遺伝子を変えるマルチプレックスゲノム編集技術は他の樹種にも応用できるか？

2. 研究の目的

本研究では、汎用性や実用性を高める新たな樹木のゲノム編集技術を確立することを研究目的にし、そのために以下の3つの研究目標を設定した。

ポプラ以外の広葉樹へゲノム編集技術を拡大するためのユーカリのゲノム編集技術の開発
遺伝子組換えゲノム編集樹木(スギ)から非組換え型ゲノム編集樹木へ交配による転換技術の開発

樹木(スギ)の複数の性質(遺伝子)を同時に変えるためのマルチプレックスゲノム編集技術の開発

3. 研究の方法

(1)植物材料

ユーカリ(*Eucalyptus camaldulensis*)はオーストラリア連邦科学産業研究機構(CSIRO)より購入した種を滅菌・発芽させて使用した(田原・松永 2022)。スギの不定胚形成細胞(ST4-11-51)は、多賀4号(茨城県)を母樹とする自然交配の未熟種子から誘導された。

遺伝子組換えユーカリおよび遺伝子組換えスギの培養条件は、明期16時間、暗期8時間、25とした。鉢上げした遺伝子組換えスギは、外気温に追従する自然光型閉鎖温室又は特定網室で栽培した。スギの交配時には、花粉が飛散しないようセロファン袋で雄花や雌花を袋掛けした。

(2)DNA解析

ユーカリおよびスギのゲノムDNAはDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN社)を用いて抽出した。PCR法には、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase(New England Biolabs社)又はKAPA3G Plant PCR Kit(Kapa Biosystems社)を使用した。DNA塩基配列の解読はApplied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いた。DNA情報の解析には、GENETYX Ver.16ソフトウェア(日本サーバ社)を使用した。

(3)ベクターの構築

ユーカリのゲノム編集には、pZK_gYSA_FFcas9ベクターを用いた(Mikami et al 2015)。スギのゲノム編集にはpBFG1ベクターを用いた(Nishiguchi et al 2023)。標的配列のDNAを合成し、pUC19_AtU6 oligoベクターに挿入した。pUC19_AtU6 oligoベクターから、AtU6プロモーターおよびsgRNA領域を切り出し、pZK_gYSA_FFcas9ベクター又はpBFG1ベクターに挿入してベクターを作製した。

(4)形質転換

遺伝子組換えユーカリの作製にはアグロバクテリウム法を用いた(田原・松永 2022)。CRISPR/Cas9ベクターを持つ*Agrobacterium tumefaciens* EHA105株をユーカリ芽生えの胚軸に感染させた。胚軸を選抜培養し遺伝子組換えユーカリを作製した。遺伝子組換えスギの作製にもアグロバクテリウム法を用いた(Nishiguchi et al 2023)。ベクターを持つ*A. tumefaciens* GV3101株をスギの不定胚形成細胞に感染させ、形質転換細胞を選抜・培養し、遺伝子組換えスギを作出した。

4. 研究成果

(1) ユーカリのゲノム編集技術

ユーカリのゲノム編集技術を開発するため、CRISPR/Cas9法を用いてユーカリ (*E. camaldulensis*) のフィトエン不飽和化酵素遺伝子 (*PDS3*) のゲノム編集を行った。*PDS3* 遺伝子に変異が生じて機能喪失すると、カロテノイドが合成されず、光障害により葉緑体が破壊されてユーカリが白化する (アルビノ) と予想された。

PDS3 遺伝子の第1エキソンと第2エキソンを同時にゲノム編集するCRISPR/Cas9ベクター、又は第3エキソンをゲノム編集するベクターを構築し、遺伝子組換えユーカリを作製した。前者のベクター由来の遺伝子組換えユーカリでは白化個体が得られなかったが、第3エキソンを標的とした遺伝子組換えユーカリでは、その一部が白化した2個体が得られた (図1)。

白化したユーカリの白葉と緑葉からDNAを抽出し、*PDS3* 遺伝子内の標的領域近傍のDNA配列を調べた (図2)。ゲノム編集ユーカリ No3 の白葉では、1 bp の欠失と1 bp の挿入が検出されたが、同時に変異の無い野生型のDNAも検出され、ゲノム編集された細胞とゲノム編集されていない細胞から構成されたキメラ葉であることが分かった。緑葉では変異は検出されず、野生型のDNAのみが検出された。一方、ゲノム編集ユーカリ No4 の白葉では、No3 とは異なる17 bp の欠失と1 bp の挿入が検出された。さらに、変異の無い野生型のDNAも検出され、No4 の白葉もキメラ葉であった。また、No4 の緑葉はNo3 の緑葉と異なり、野生型DNA以外に様々な変異が検出され、緑葉でもキメラになっている場合があることが明らかになった。

本研究では、CRISPR/Cas9法を用いてユーカリがゲノム編集できることを証明できた。しかし、植物体の白化をゲノム編集の目安としたが、得られた白化個体は少なかった。また、白化したゲノム編集ユーカリは変異した *PDS3* 遺伝子と元の野生型 *PDS3* 遺伝子を持つキメラ個体であり、変異 *PDS3* 遺伝子のみを持つゲノム編集ユーカリは得られなかった。この理由として、*PDS3* 遺伝子が完全に壊されたヌル (null) 変異体はカロテノイドを全く生産できないため、ユーカリでは致死性となり、ゲノム編集個体が得られにくくなる可能性が考えられた。

PDS3 以外の遺伝子でもユーカリのゲノム編集が可能かどうかを確認するため、葉緑素合成に関わるマグネシウムキラーゼ遺伝子のゲノム編集を行った。マグネシウムキラーゼは3種類のサブユニット (I、D、H) から構成される。ユーカリの I サブユニットの遺伝子 *CHL1* の標的配列を持つCRISPR/Cas9ベクターを構築し、遺伝子組換えユーカリを作製したところ、一部が白化した個体が得られた。今後、*CHL1* 遺伝子の変異解析を行う予定である。



図1 ゲノム編集ユーカリ系統 No3 の個体。矢印の部分が遺伝子変異により白化している。

系統・サンプル	DNA配列	変異	Read数
野生型ユーカリ・緑葉	TCAACA GCAAAGTACTT AGCGGAT GC TGGTCACCA	-	×16
ゲノム編集ユーカリ No3・白葉	TCAACA GCAAAGTACTT AGCGGAT GC TGGTCACCA	-	×4
	TCAACA GCAAAGTACTT AGCGG- TGCT TGGTCACCA	-1 bp Del	×3
	TCAACA GCAAAGTACTT AGCGG A T GC TGGTCACCA	+1 bp Ins	×8
ゲノム編集ユーカリ No3・緑葉	TCAACA GCAAAGTACTT AGCGGAT GC TGGTCACCA	-	×8
ゲノム編集ユーカリ No4・白葉	TCAACAGCAAAGTACTT AGCC GAT GC TGGTCACCA	-	×2
	TCAACAGCAAAGT----- CA CCA	-17 bp Del	×4
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCGG AT GC TGGTCACCA	-	×3
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCGG AT GC TGGTCACCA	+1 bp Ins	×4
ゲノム編集ユーカリ No3・緑葉	TCAACAGCAAAGTACTT AGCC GAT GC TGGTCACCA	-	×3
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCCG AT GC TGGTCACCA	+1 bp Ins	×2
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCCG - TGCT TGGTCACCA	-1 bp Del	×1
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCC --- TGCT TGGTCACCA	-2 bp Del	×2
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCC -----	-49 bp Del	×1
	----- GAAAGG		
	TCAACAGCAAAGTACTT----- GCT TGGTCACCA	-7 bp Del	×1
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCGG AT GC TGGTCACCA	-	×1
	TCAACAGCAAAGTACTT AGCGG AT GC TGGTCACCA	+1 bp Ins	×3

図2 ゲノム編集ユーカリの *PDS3* 遺伝子に見られた変異
標的配列は赤字、PAM配列は青字、欠失した塩基は-、挿入された塩基は小文字、対立遺伝子の SNP (G 又は C) は下線で示されている。

(2) 遺伝子組換えゲノム編集スギから非組換えゲノム編集スギへの転換技術

本研究では CRISPR/Cas9 法により *ACOS5* 遺伝子をゲノム編集した遺伝子組換えスギ (Nishiguchi et al 2023) を非組換え化することにした。ゲノム編集スギは、アグロバクテリウムを介した遺伝子組換え技術により作られているため、CRISPR/Cas9 遺伝子やカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) などの外来遺伝子を含んでいる。交配により外来遺伝子を除く方法を図3に示す。使用するゲノム編集スギは無花粉であるが、本研究が始まる前年の2019年の春に、ゲノム編集スギの雌花に、スギ品種であるクモトオシ又は信夫の花粉を交配し、秋に子である種子 (F1) を得ていた。

2020年に子F1種子の発芽実験を行った。当初、シャーレ中の寒天又は水で濡らした紙、あるいは育苗ポットの培養土に播種していたが、カビの発生が著しく、得られる芽生えが少なかった。種子の殺菌法や発芽させるための基材を検討し、種子を0.05% Tween 20 (6時間)、水道水 (24、24、18時間で水を交換)、1/500 ベンレート (6時間) に順番に浸漬した後、鹿沼土に播種することで芽生えが多く得られるようになった。

育成した子F1スギからDNAを抽出し、PCR法を用いてカナマイシン耐性耐性遺伝子 (*NPTII*) の存否を調べた。80個体のうち25個体では*NPTII*が検出されず、非組換えスギになっている可能性が示された (図4)。

非組換えスギと推定された子F1スギを育成し、2021年の7月末に着花誘導のためジベレリン (GA3) を散布した。しかし、スギのサイズが小さかった (10cm以下) ためか、雄花および雌花が少なく、2022年の春にF1スギ同士の交配はできなかった。

子F1の育成を続け、2022年の7月末に再びジベレリンを散布したところ、2023年の春に雄花と雌花が着花し、F1スギ同士を交配することができた。2023年の秋には、少ないながら孫F2の種子が得られた。今後、F2を発芽・育成し、外来遺伝子の有無やゲノム編集された*ACOS5* 遺伝子の解析を行う予定である。

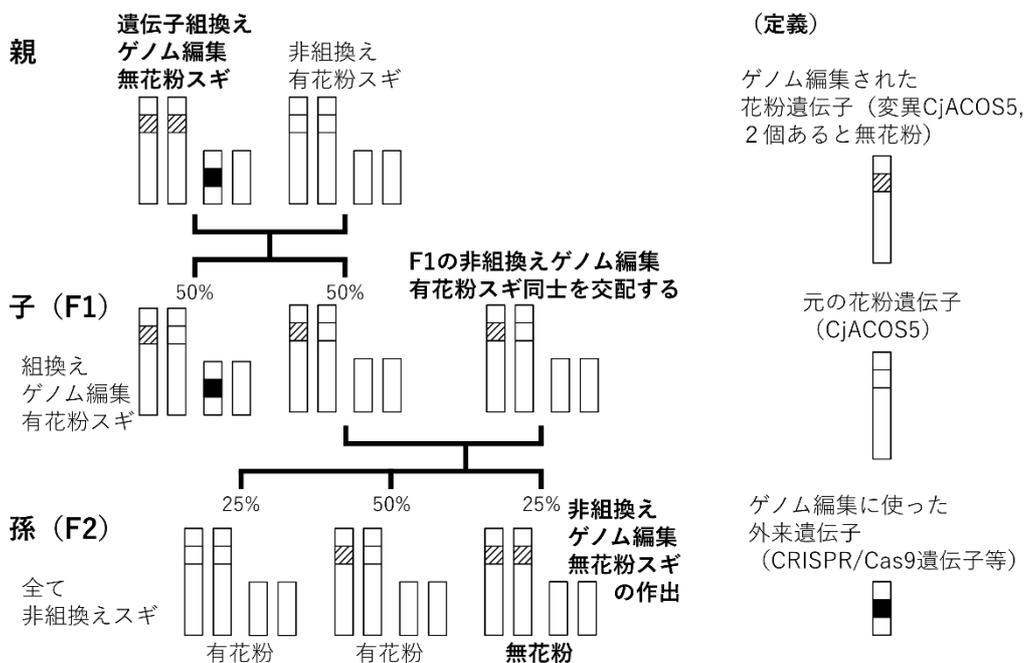


図3 遺伝子組換えゲノム編集スギから非組換えゲノム編集スギへの転換方法

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

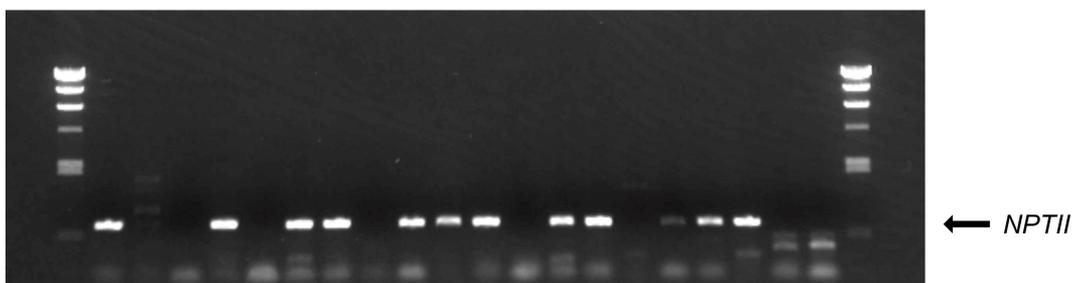


図4 ゲノム編集スギの子F1の遺伝子解析
PCR実験結果の一部を示す。赤番号の個体では*NPTII* 遺伝子が検出されない。

(3) スギのマルチプレックスゲノム編集技術

スギの複数の遺伝子を同時にゲノム編集するマルチプレックスゲノム編集技術を開発するため、2種類の標的配列を含むガイド RNA (sgRNA) を発現する CRISPR/Cas9 ベクターを作製し、利用する (図5)。

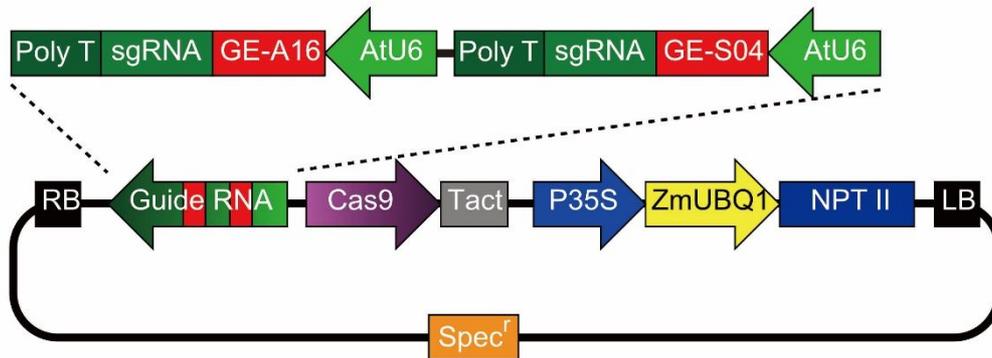


図5 スギ用マルチプレックスゲノム編集ベクターの模式図

予備的な実験として、スギの *MS1* 遺伝子 (雄性不稔遺伝子の一つ) 内の2つの領域を標的配列としたゲノム編集実験を行った。*MS1* 遺伝子中の GE-A16 領域と GE-S04 領域の標的配列を持つ CRISPR/Cas9 ベクターを作製し、スギの細胞を形質転換した。形質転換細胞から抽出したゲノム DNA の標的配列近傍を PCR で増幅し、クローニングして塩基配列を解読した。その結果、GE-A16 領域と GE-S04 領域に変異が生じていたが、両領域に同時に変異が入ったクローンは検出されなかった (図6)。その理由は不明である。一方、GE-A16 領域から GE-S04 領域にわたり長い欠失があるクローンは複数存在した。これは、GE-A16 領域と GE-S04 領域で DNA 切断が同時に起こった結果、はさまれた DNA とその周辺が欠失してしまったためと考えられた。従って、複数の標的配列を持つ CRISPR/Cas9 ベクターを使うことで、スギでも複数の DNA 部位を切断しゲノム編集することができると考えられた。

	GE-A16 領域	GE-S04 領域
	98 123	215 263
MS1_WT	ACCCATCGTGAGCCTCTCACCATGC	GCTTGTGCGAGCTCGTCTCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175001	ACCCATCGTGAGCCTCTCACCATGC	GCTTG-GGG-----CCAGGACTATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175002	ACCCATCGTG-----	-----TCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175004	ACCCATCGTG-----	-----TCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175005	ACCCATC-TGAGCCTCTCACCATGC	GCTTGTGCGAGCTCGTCTCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175006	ACCCATCGTG-----	-----TCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175007	ACCCATCG-GAGCCTCTCACCATGC	GCTTGTGCGAGCTCGTCTCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175008	ACCCATC-TGAGCCTCTCACCATGC	GCTTGTGCGAGCTCGTCTCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175801	ACCCATCGTGAGCCTCTCACCATGC	-----CACTCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175802	ACCCAT-----	-----TAA
MS1_GE175804	ACCCATCGTGAGCCTCTCACCATGC	GCTTGT-----CCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA
MS1_GE175805	ACCCAT-----	-----TAA
MS1_GE175808	ACCCATCGTGAGCCTCTCACCATGC	GCTTGTGCGAGCTCGTCTCCAGGACGATTTTCTGGGCTTCCCATTA

図6 2種類の標的配列を利用したゲノム編集による *MS1* 遺伝子の変異
標的配列は赤字、PAM 配列は青字、欠失した塩基は - で示されている。

次に、2種類のフラボタンパク質、F1vA と F1vB の遺伝子を同時にゲノム編集したスギを作成することにした。F1vA と F1vB はヘテロ複合体を形成し、光呼吸において酸素を水に還元する機能を持つと考えられている。興味深いことに、F1vA 遺伝子と F1vB 遺伝子は、緑藻類、コケ類、裸子植物に見られるが、被子植物のゲノム中には相同遺伝子が見つからない。スギゲノムには F1vA 遺伝子と F1vB 遺伝子の存在が推定され、それらは異なる染色体上に位置し、アミノ酸レベルでの相同性は低い (約 38%) と推定された。スギの F1vA と F1vB の機能を解明するため、両遺伝子を単独に又は同時に破壊する CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、スギ細胞に導入した。現在、遺伝子組換えスギの作出を行っており、今後、F1vA および F1vB の変異の有無、ならびに表現型の解析を行う予定である。

<引用文献>

田原恒、松永悦子、ユーカリの組織培養および形質転換、ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門、2022、287-296、国際文献社

Mikami et al., Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice., *Plant Molecular Biology*, 88: 561-572, 2015

Nishiguchi et al., CRISPR/Cas9-mediated disruption of *CjACOS5* confers no-pollen formation on sugi trees (*Cryptomeria japonica* D. Don)., *Scientific Reports*, 13: 11779, 2023

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 Mitsuru Nishiguchi, Norihiro Futamura, Masaki Endo, Masafumi Mikami, Seiichi Toki, Shin-Ichiro Katahata, Yasunori Ohmiya, Ken-ichi Konagaya, Yoshihiko Nanasato, Toru Taniguchi, Tsuyoshi Emilio Maruyama	4. 巻 13
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated disruption of CjACOS5 confers no-pollen formation on sugi trees (Cryptomeria japonica D. Don)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-38339-8	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西口満、丸山E.毅、宮澤真一、藤野健、笠原雅弘、重信秀治、山口勝司、上野真義
2. 発表標題 ゲノム編集によるスギ雄性不稔遺伝子MS1の機能証明
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西口満、丸山E.毅、宮澤真一、藤野健、笠原雅弘、重信秀治、山口勝司、上野真義
2. 発表標題 雄性不稔遺伝子MS1を変異させたゲノム編集スギの性質
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西口満、田原恒、遠藤真咲
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるユーカリのゲノム編集技術の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西口満、田原恒、遠藤真咲
2. 発表標題 ユーカリのフィトエン不飽和化酵素遺伝子のゲノム編集
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西口満、宮澤真一
2. 発表標題 花成抑制遺伝子のゲノム編集がポプラの花成と生理的特性に与える影響
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西口満、宮澤真一
2. 発表標題 ポプラの花成抑制遺伝子をゲノム編集した影響
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 西口満	4. 発行年 2022年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 408
3. 書名 ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで (担当章 ポプラの形質転換およびゲノム編集)	

1. 著者名 西口満（監修：山本卓）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 240
3. 書名 最新のゲノム編集技術と用途展開（第17章 樹木のゲノム編集技術とスギの無花粉化）	

〔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	宮澤 真一 (Miyazawa Shin-Ichi) (10578438)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	上野 真義 (Ueno Saneyoshi) (40414479)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	遠藤 真咲 (Endo Masaki) (40546371)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	田原 恒 (Tahara Ko) (70445740)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	

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