

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03219

研究課題名（和文）細胞膜張力と膜タンパク質機能の関連解明に向けた基盤実験技術の創成と応用

研究課題名（英文）Development and Application of Fundamental Experimental Techniques for Elucidating the Relationship between Cell Membrane Tension and Membrane Protein Function

研究代表者

岩本 真幸（Iwamoto, Masayuki）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40452122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞膜の張力が膜タンパク質の機能に与える影響を解明するために、独自の脂質2重膜実験法（CBB法）を改良して、膜張力実験の基盤システムを構築した。このシステムを使って、代表的な膜タンパク質であるKcsAカリウムイオンチャンネルの膜張力依存性を1分子レベルで詳しく調べた。その結果、張力によってKcsAチャンネルが開く際の構造変化や、KcsA分子内の張力を感知する部位についての新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は細胞の物質輸送や情報伝達の中心的な役割を果たす重要な分子である。従来、膜タンパク質の機能を制御する因子として、膜電位や化学修飾、信号分子の結合などが一般的に考えられてきた。私たちの研究により、代表的な膜タンパク質において、これまで明らかにならなかった張力依存性とその仕組みが解明されたことで、膜張力という新たな制御因子が加わった。また、膜張力を考慮に入れて医薬品の膜タンパク質に対する作用機序を再評価することで、より精度の高い医薬品設計が可能になる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the effect of membrane tension on membrane protein function, we established a basic system for membrane tension experiments based on our original lipid bilayer experimental method (CBB method). Using this system, we investigated the membrane tension dependence of the representative membrane protein, the potassium ion channel KcsA, at the single-molecule level. We were able to gain new insights into the structural changes that occur when the KcsA channel opens in response to tension and to identify the tension-sensing sites within the KcsA molecule.

研究分野：脂質2重膜を使ったチャンネルタンパク質の機能解析

キーワード：生体膜 チャンネル 張力 電気生理 蛍光

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

細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質は、脂質 2 重層に生じる張力（膜張力）を受けつつ機能している。膜張力は、細胞の状態や周囲環境の変化などによって大きく変動する。例えば、周囲が低浸透圧環境になると細胞が膨張し、細胞膜が伸びて張力が大幅に増大する。また、細胞周期や遊走によっても細胞膜局所の張力が増大することが明らかになっている (Helvert et al. Nat. Cell. Biol. 2018)。

こうした膜張力の変化を活性制御に利用する膜タンパク質が存在する。その代表的なものが機械受容チャネルであり、膜張力の増大によって開口する大腸菌の MscL や MscS チャネル、哺乳類に存在する Piezo チャネルなどが含まれる。よって、脂質 2 重層からの物理的作用“Force-from-lipid”をタンパク質活性制御に利用する仕組みは、バクテリアから高等生物に至るまで生物界では広く利用されている (Teng et al. Pflugers Arch. 2015)。

一方、膜張力が増大するような事象が起きていない細胞膜においても、微弱な内因性張力が常に存在する。この内因性張力、すなわち“小さな Force-from-lipid”は膜タンパク質の機能にどのような影響を及ぼしているのだろうか？この問題について、現在に至るまで明確な答えが得られていない。細胞膜を貫通する膜タンパク質は、膜に組み込まれた時点で区別なく内因性張力に曝される。よって内因性張力の影響を切り分けて機能解析を行うことは極めて困難で、その問題は事実上看過されてきたと言える。高分解能の膜タンパク質構造情報が得られるようになり、高精度な機能解析と組み合わせることではじめて分子レベルでの作動機序解明を実現できる。“小さな Force-from-lipid”の制御およびその影響の評価が可能となれば、膜タンパク質の機能解析精度が飛躍的に向上すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の究極的な目標は、内因性張力のような微弱な張力が膜タンパク質機能に及ぼす影響について分子レベルで実態を解明し、その仕組みを理解することである。これまで内因性張力に関する研究が進展していないのは、その影響を評価するための実験自体が極めて困難なためであった。細胞膜、あるいは従来の人工脂質 2 重膜において、膜張力を厳密に制御して実験を行うことは現実的には困難である。また、機械受容チャネル研究の常套手段とされるパッチクランプ法では、細胞膜をピペットで吸引することによって大きな膜張力を発生させることはできるが、内因性張力程度の小さい張力を制御することは、原理的に不可能である。本研究ではこうした困難な課題に対し、再構成実験、研究対象の単純化、により、極めて本質的な要素だけに絞った研究戦略でアプローチを試みる。これにより、内因性張力の作用を膜タンパク質の制御因子として初めて議論の俎上に載せ、関連する研究手法・分野の開拓を目指す。膜タンパク質は創薬のターゲットとしても重要であり、膜タンパク質の働きを制御する因子に張力が加わることとなれば、その性質を応用した創薬研究への展開も期待できる。

3. 研究の方法

本研究目的を実現するために、再構成実験では、申請者が近年開発した人工膜実験技術、接触液胞 2 重膜法 (Contact Bubble Bilayer, CBB 法、Iwamoto et al. Sci. Rep. 2015) を最大限活用した (図 1)。CBB 法では、パッチクランプ法のような大きな膜張力の制御だけではなく、原理的に、小さな膜張力範囲での制御も可能である。この点において、CBB 法が内因性張力の効果を実験的に検討できる現在唯一の手法である。再構成実験系の特徴として、溶液や脂質 2 重膜の組成を完全に制御できるので、膜タンパク質機能の摂動要因を極力排した環境で実験を行うことができる。また、研究対象の単純化にあたっては、機能解析データから分子機序の解釈が容易に行えるよう、構造が比較的単純な膜タンパク質・KcsA カリウムイオンチャネル (以下、KcsA チャネル) を研究対象として用いた。KcsA チャネルは、イオン透過路 (ポア) とイオン選択性フィルター、開閉制御ゲートというイオンチャネルの本質的構造と小さな細胞質ドメインから構成され、タンパク質型イオンチャネルの典型モデルとみなされており、分子機序解明に必須の高解像度構造情報も豊富に蓄積している。また、シングルチャネル

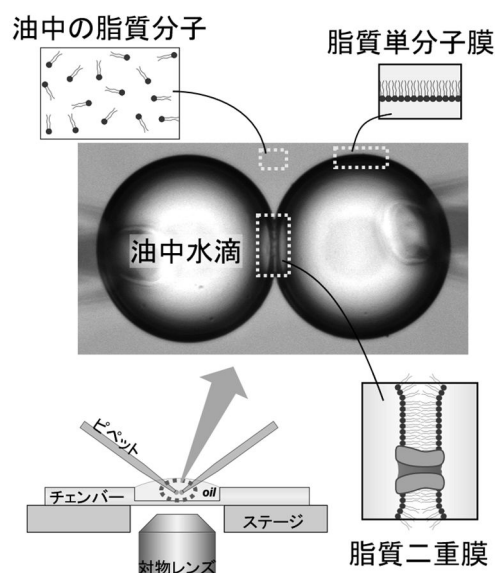


図 1. CBB 法の概要

倒立顕微鏡のステージ上で実験を行う。両ピペット内に電極を挿入することで、膜に組み込まれたイオンチャネル電流測定に対応する。

電流としてチャンネルの開閉挙動を 1 分子レベルで精度良く捉えることができる利点がある。以下は具体的な研究方法である。

(1) CBB 法を応用した膜張力制御実験法の確立

CBB 法では、脂質単分子膜を纏った 2 つの油中水滴同士を接触させることで、その接触面に脂質 2 重膜(接触膜)を作成する。油中水滴は、ガラスピペット先端からピペット内圧操作によって中のリン脂質懸濁液(リポソーム溶液)を膨らませて作成し、そのままピペット先端に維持したものである。接触膜の張力は、油中水滴の半径、油中水滴同士の接触角、そしてピペット内圧から、Young-Laplace 式と Young 式により決定できる(図 2)。本研究では、油中水滴の顕微鏡映像をモニターし、ピペット内圧を計測・制御することで、膜張力の解析と操作を可能にすることを旨とした。従来の CBB 法では、接触角の膜電位依存的变化と、別に解析した膜容量から膜張力を計算していた。しかしこの手順では、その都度膜電位パルスを加える必要がある上に解析に時間を要し、シングルチャンネル電流測定中にリアルタイムで膜張力を知り得ることはなかった。本研究手法では連続的な膜張力のモニターおよび操作が可能となるため、膜張力研究への応用の可能性が大幅に広がることが期待できる。

(2) KcsA チャンネル開閉挙動に対する膜張力の影響の解明

申請者はこれまで、本来機械受容チャンネルには分類されない KcsA チャンネル開閉挙動の膜張力依存性の一端を報告している(Iwamoto et al. PNAS 2018)。本研究では確立した張力操作実験法を適用し、KcsA チャンネル張力応答性のより詳細な解明を旨とした。具体的には、シングルチャンネル電流から開確率と開状態寿命を解析し、これらパラメータの純粋な膜張力依存特性を明らかにすることで、膜張力が開閉構造変化のどの過程に効いているのか検討を行う。

(3) 膜張力依存性の分子機序解明

チャンネル分子構造の観点から、開閉挙動の膜張力依存性に関する因子の特定を試みる。CBB 法では 2 つの油中水滴の圧力をそれぞれ独立して操作できるので、脂質 2 重膜の半層(リーフレット)ごとに異なった張力を発生させることができる。この非対称張力操作により、KcsA チャンネルに対して細胞内・外どちら側のリーフレット張力が影響するのか、特定を試みる。さらに、脂質 2 重膜とチャンネル分子との接点と推定されるドメイン、アミノ酸側鎖について、欠損体や変異体の機能解析を行い、膜張力感知に関与する部位の特定を試みる。

一方、膜張力がチャンネル構造に与える影響について、開閉制御ゲート近傍へ蛍光標識を導入し、膜張力下での蛍光強度変化から解析を試みる。

4 . 研究成果

(1) 膜張力実験法の確立

油中水滴内圧は 100 Pa 程度であり、この圧力を正確に測定できる微小圧力計を CBB 法実験システムに組み込み、油・水圧、毛細管現象を補正したバブル内圧を推定し、Young-Laplace の原理を使って膜張力を解析した。その結果、従来の解析法と同一の張力値が得られることを確認できた。さらに、圧力値の測定と同期してバブル径およびバブル間接触角を顕微鏡画像から連続的に取得し、リアルタイムで膜張力を解析するプログラムを作成した。これにより、圧力操作による膜張力変化をその場で確認し、狙った膜張力値のもとでシングルチャンネル電流解析を行えるようになった。

(2) 膜張力に対する開閉挙動の応答

開発した膜張力実験システムを使い、膜張力を連続的に変化させた際の KcsA チャンネル開閉挙動をシングルチャンネル電流から解析した。驚くべきことに、膜張力の増大期と減少期で、KcsA は張力に対して異なる特性を示すこと(履歴現象)が明らかになった。この結果は、チャンネルが過去の膜張力を分子内で"記憶"していることを示唆している。この現象はタンパク質構造変化と関連付けて解釈することができ、チャンネルの構造-機能連関の解明にとって重要な情報を得ることができた。現時点では、この性質の生物学的な意義は不明確であるが、膜タンパク質が力学環

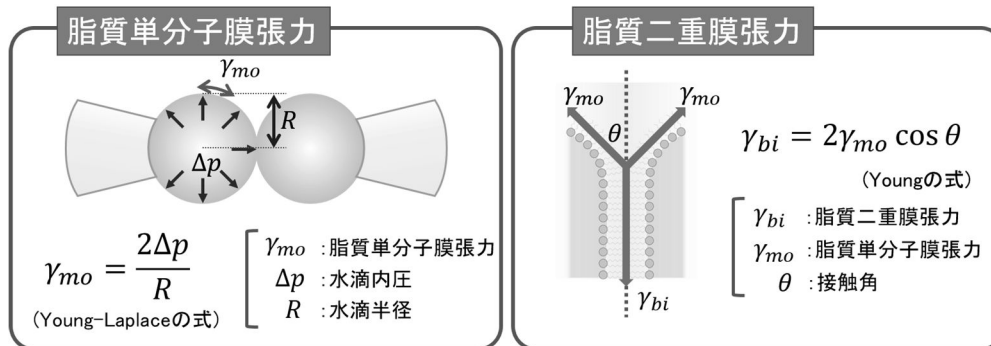


図 2 . CBB 法での膜張力解析・操作の概要

油中水滴半径と内圧から脂質単分子膜張力を計算し、その値と接触角から脂質二重膜張力を計算する。内圧はピペットに接続した圧力計で測定し、半径と接触角はモニター画像から解析する。内圧はピペットを介して自在に操作でき、このことで膜張力操作が可能となる。

境を短期的に記憶できることは、メカノトランスダクション(細胞が力を感じて情報を伝達するプロセス)の制御や感度調節に関連する可能性があり、今後の研究の展望として注目に値する(JACS Au 2021)。

(3) 膜張力依存性の分子機序

KcsA チャンネル開閉の張力依存性に関し、脂質 2 重層の単層(リーフレット)ごとに張力を操作する実験を行った。興味深いことに、KcsA チャンネルの開閉は細胞外側リーフレットの張力には影響されず、細胞質側リーフレットの張力のみ依存していることが明らかになった。より詳細な張力感知の分子機序を明らかにするため、変異体を用いて張力感知部位の検討を行った。変異導入部位として、膜貫通ヘリックスに存在するトリプトファンやチロシンに着目し、これらをアスパラギンまたはロイシンに置換した変異体 KcsA を作製した。また、細胞質側リーフレット表面に配置すると考えられているアミノ末端の両親媒性ヘリックス(M0)の関与を検討するため、M0 削除体も実験に用いた。張力制御下でのシングルチャンネル電流の開確率を解析したところ、すべての変異体の開確率は、野生型と同様に、細胞外側リーフレットの張力操作には影響されなかった。また、細胞質側リーフレットの張力操作に対する開確率の応答は、細胞質側に位置するトリプトファン変異体と M0 ヘリックス削除体では減弱し、高い開確率となるにはより大きな張力を負荷する必要があることが分かり、現在より詳細な解析を継続している。

一方、KcsA の構造に与える非対称張力の影響を検証するために、テトラメチルローダミン(TMR)標識による蛍光測定実験を行った。この実験は、KcsA の特定部位に標識した TMR の蛍光強度が KcsA のゲート開閉に伴う構造変化によって変化することを利用したものである。TMR 標識 KcsA をリポソームに再構成し、直径の小さいリポソームを調製することで膜に非対称張力を発生させた。KcsA はリポソーム膜に細胞質側を外側に向けて組み込まれていることを確認しており、上記リポソームでは KcsA の細胞質側リーフレットの張力が大きくなる。蛍光測定の結果、小径(約 30 nm)のリポソーム膜内では TMR 標識 KcsA の蛍光強度が有意に変化しており、ゲート構造に対する細胞質側張力の影響を確認できた(FEBS Lett. 2021)。また、同様な蛍光測定実験を上記変異体について行ったところ、膜貫通ヘリックスの細胞質寄りに位置するトリプトファンの変異体と M0 削除体において、張力感知への関与をうかがわせる実験結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計24件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hayakawa Eri Saki H., Ueki Misuzu, Alhatmi Elmukhtar, Oiki Shigetoshi, Tokumasu Fuyuki, Mitchell Drake C., Iwamoto Masayuki	4. 巻 1866
2. 論文標題 Different lateral packing stress in acyl chains alters KcsA orientation and structure in lipid membranes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184338 ~ 184338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2024.184338	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 Iwamoto Masayuki, Morito Masayuki, Oiki Shigetoshi, Nishitani Yudai, Yamamoto Daisuke, Matsumori Nobuaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Cardiolipin binding enhances KcsA channel gating via both its specific and dianion-monoanion interchangeable sites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108471 ~ 108471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108471	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 岩本真幸	4. 巻 6
2. 論文標題 膜タンパク質機能における細胞膜の役割を人工膜実験で解明する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 445-449
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 無
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 Ueki Misuzu, Iwamoto Masayuki	4. 巻 595
2. 論文標題 Fluorescent labeling in size controlled liposomes reveals membrane curvature induced structural changes in the KcsA potassium channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1914 ~ 1919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14141	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 Keita, Iwamoto Masayuki, Koshiji Takaaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Geometrical and electrophysiological data of the moving membrane method for the osmotic water permeability of a lipid bilayer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 107309 ~ 107309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2021.107309	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 Iwamoto Masayuki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Hysteresis of a Tension-Sensitive K ⁺ Channel Revealed by Time-Lapse Tension Measurements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 467 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.0c00098	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 Mita Kenichiro, Sumikama Takashi, Iwamoto Masayuki, Matsuki Yuka, Shigemi Kenji, Oiki Shigetoshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Conductance selectivity of Na ⁺ across the K ⁺ channel via Na ⁺ trapped in a tortuous trajectory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2017168118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2017168118	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 Keita, Iwamoto Masayuki, Koshiji Takaaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 627
2. 論文標題 Visualizing the osmotic water permeability of a lipid bilayer under measured bilayer tension using a moving membrane method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Membrane Science	6. 最初と最後の頁 119231 ~ 119231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.memsci.2021.119231	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 Iwamoto Masayuki、Oiki Shigetoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Physical and Chemical Interplay Between the Membrane and a Prototypical Potassium Channel Reconstituted on a Lipid Bilayer Platform	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 Article 634121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.634121	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30件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松木悠佳、高島政子、岩本真幸、吉田俊之、老木成稔
2. 発表標題 接触バブル二重膜法を用いた膜張力クランプ法の開発
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 真木孝尚、松木悠佳、吉田俊之、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 TRAAKチャネルの特徴的なフリッカーゲーティングは内葉張力によって制御されている
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayuki Iwamoto
2. 発表標題 Reconstituted lipid bilayers to elucidate physicochemical interactions between ion channels and membranes
3. 学会等名 Ion Channel Modulation Symposium (ICMS) 2023 Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩本真幸
2. 発表標題 カリウムイオンチャンネルにおけるtrans-leaflet情報伝達
3. 学会等名 生理研研究会「構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木悠佳、岩本真幸、高島政子、老木成稔
2. 発表標題 Concurrent effect of the membrane thickness and tension on the gating of the KcsA potassium channel
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木美鈴、宮腰雅美、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 Exploring the membrane tension sensing sites in the KcsA potassium channel
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真木孝尚、植木美鈴、宮腰雅美、松木悠佳、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 脂質二重膜張力の非対称制御によるカリウムチャンネル開閉機構の探究
3. 学会等名 生理研研究会「細胞の局所コミュニティ研究会」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真木孝尚、松木悠佳、吉田俊之、老木成稔、岩本真幸
2. 発表標題 Asymmetric manipulation of the lipid bilayer tension revealed an inner leaflet tension dependence in the single TRAAK channel gating
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松木悠佳、岩本真幸、高島政子、老木成稔
2. 発表標題 The interplay between the membrane thickness and tension on the gating of the KcsA potassium channel
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植木美鈴、岩本真幸
2. 発表標題 Fluorescence detection of membrane curvature-induced structural changes in the KcsA potassium channel
3. 学会等名 日本生物物理学会第59回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植木美鈴、岩本真幸
2. 発表標題 蛍光標識による KcsAカリウムイオンチャネルの膜曲率依存的な構造変化の評価
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木悠佳、岩本真幸、高島政子、老木成稔
2. 発表標題 KcsAカリウムチャネルのチャネル活性と脂質2重膜の膜厚の関係
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 Hysteretic behavior of the tension-dependent gating of the KcsA potassium channel revealed by the dynamic manipulation of membrane tension
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 動的膜張力操作によるKcsAチャネルゲート開閉特性の研究
3. 学会等名 生理研研究会「イオンチャネルと生体膜のダイナミクス：構造生物学の先にあるもの」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三田建一郎、炭竈享司、岩本真幸、老木成稔
2. 発表標題 カリウムチャネル選択性フィルタ内のイオン選択的ダイナミクス
3. 学会等名 生理研研究会「イオンチャネルと生体膜のダイナミクス：構造生物学の先にあるもの」
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsuki Y, Iwamoto M, Oiki S	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Humana New York, NY	5. 総ページ数 292
3. 書名 Potassium Channels : Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Simone Furini Ed.	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂質二重膜の制御装置、制御プログラム、制御方法、制御システム及び薬剤のスクリーニング方法	発明者 吉田俊之、老木成稔、岩本真幸	権利者 福井大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-014217	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

福井大学医学部分子神経科学HP https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/molecular-neuroscience/
--

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	真木 孝尚 (Maki Takahisa)		
研究協力者	植木 美鈴 (Ueki Misuzu)		

6. 研究組織（つづき）

	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	松木 悠佳 (Matsuki Yuka)		
研究協力者	吉田 俊之 (Yoshida Toshiyuki)		
研究協力者	老木 成稔 (Oiki Shigetoshi)		

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