

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05338

研究課題名（和文）Serial transfer法による常温性藍藻の長期高温適応進化実験

研究課題名（英文）Experimental adaptive evolution assay of a cyanobacterium to high temperature using serial transfer method.

研究代表者

兼崎 友（Kanesaki, Yu）

静岡大学・静岡共同利用機器センター・特任助教

研究者番号：70380293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞を亜致死高温条件に曝しながら継代するSerial transfer培養法により高温適応進化株のラインを確立した。定期的にシーケンス解析することで変異した遺伝子座を同定し、変異数の増加を観測した。累積した突然変異がゲノム上の特定領域に集中するかどうかを解析したが、現時点ではホットスポットは見られていない。一方、電顕解析による高温下での細胞形態の比較の結果からは親株と高温適応進化株の違いは明瞭であった。また新たに取得した高温適応株のラインはこれまでの株とは異なる遺伝子座への変異を持っていたことから、高温耐性や高温適応に関わる突然変異には多様性があることが見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子組換え技術を用いずに通常の生育限界温度を大幅に上回る高温適応株を作出できたことは、シアノバクテリアを用いたバイオマス物質生産系の開発における可能性とリスクの双方の理解に役立つ結果であった。また本研究により、亜致死条件での超長期間培養という過去に報告例のない条件に曝すことで新規の高温誘導性遺伝子の探索が進むことが明らかになった。これらの結果は他の藻類や光合成微生物での研究においても新たな研究の方向性や発展性を示すものである。また将来的な地球温暖化により、現存する微生物の表現型がどのように変化していくかを予想する上でも重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：We performed a long-term laboratory evolutionary experiment to test the hypothesis that moderate cyanobacteria can adapt to high temperatures beyond their growth limit by accumulation of mutations. The high temperature-adapted strain had a number of new mutations during a long-term cultivation at high temperature. Structural changes in the cells were also confirmed by electron microscopic analysis. Transcript profiles under normal conditions were also different. We also confirmed trade-offs in the temperature range of growth between the adapted strain with the parental strain.

研究分野：微生物学

キーワード：シアノバクテリア ゲノム解析 適応進化 高温ストレス 突然変異

## 1. 研究開始当初の背景

個々の生物種は長い進化と生存競争の過程で、ゲノムレベルで現在棲息する生育環境へ最適化してきたはずであるが、そこから生育限界条件を超えた別の環境へと適応するのに、どれほどの時間を要するのか、どれほどゲノムへの変異蓄積を要するのか、どれほどの生理学的変化が必要なのか、という疑問は根源的な問いであり基礎科学から応用科学にまで通じるテーマである。比較ゲノム解析や広く保存された house-keeping 遺伝子の配列を用いた分子系統解析から、種の多様性が生じるために要した時間を推測することは可能であるが、一般的な自然突然変異の発生頻度や不作為性から考えて、研究者が観測可能な時間の範囲内で、突然変異の連続的な蓄積による適応進化の過程を観測できる実験系が構築可能なのは、増殖速度の早い微生物に限られる(Barrick et al. 2013)。

光合成微生物における適応進化実験は、クロレラやクリプトコディニウムなどで有用物質生産能を指標に開始され始めたが最長事例でも 2 年以内であり、超長期間の挑戦で生育限界条件を大きく超えた事例は未だ無い。シアノバクテリアでは、常温性の種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 において mutagen を用いた高温耐性変異株の大規模な解析事例があるが、生育上限温度は 45 °C の壁を超えることには成功していない。申請者らは過去に常温性シアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC 6803) において多数の熱ショック応答性遺伝子の発現を抑制する因子 (Hik34) を発見し、同遺伝子の破壊により 48 時間までの高温処理に耐えられる株を作製したが(Suzuki et al., 2005)、その株を用いても長期の高温連続培養は不可能であった。これまでの多くの高温ストレス耐性機構の研究では、比較的短時間のストレス応答に着目して耐性機能に関わる遺伝子の探索が為されてきたが、逆に超長期間の環境ストレス処理により引き起こされる突然変異の蓄積や遺伝子発現変動はそもそも観測例が乏しいため、これまでに報告例の無い遺伝子の関与が見つかる可能性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究代表者は、増殖速度の早い微生物を生育限界条件付近に曝して長期継代培養をおこなう、生存に不利な突然変異が生じた細胞はすぐに淘汰されるという選択圧をかけ続けることで、特定の方向性を持った突然変異の蓄積を観測することが可能であろうと考えた。生育限界条件での順化を繰り返しながら長期継代培養することで生育限界条件を越える突然変異株を単離できれば、微生物進化における環境適応の分子機構だけでなく、人為的な遺伝子組換えに依らない育種技術の開発などにも役立つと考えられる。特に温度についての知見は、地球温暖化などの環境変動が与える生態系への影響を見積もる上でも重要である。そこで本研究計画においては、全ゲノム情報が既知であり、かつ常温性のシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を材料に、高温適応につながる自然突然変異の蓄積の観測と、これまでに報告例のない高温耐性を獲得した株の選抜、及びその分子機構の解明を目的として研究を実施した。

これまでの研究により、寒天培地を用いて生育上限温度付近での長期培養を継続した結果、意外にも培養開始より 2 ヶ月の段階でこれまでに難しかった「45 °C の壁 (Bergey, 1919)」を超える突然変異株を得ることが出来たが、このような株の出現に再現性があるかどうかや、さらなる高温での連続培養が可能かどうか、またこの突然変異株がどのような性質を持ち、どのような高温耐性機構を獲得したのかは未だ不明であったため、本研究では詳細な解析やさらなる連続培養を試みた。

## 3. 研究の方法

本研究では常温性のシアノバクテリア *S. elongatus* PCC 7942 を材料に、亜致死温度に曝しながら寒天培地上で継代培養をおこなう serial transfer 法を用いて突然変異の蓄積により生育限界を超えた高温環境への適応が進むかどうかを検証した。適応進化株を取得する際には、親株となる細胞の全ゲノムリシーケンス解析が必須となるが、本研究においてはこれまでの研究により全ゲノム情報を再解析した、*S. elongatus* PCC 7942 TUA 株を基準に実験を実施した。

ゲノム上の新規変異部位の同定は、次世代シーケンス技術を用いたリシーケンス解析の手法によりおこなった。多くのシアノバクテリアのゲノムはマルチコピーであるため、リシーケンス解析における変異部位の探索ソフトウェアのパラメーター設定などには注意が必要であるが、研究代表者は複数の検出ソフトウェアを併用することで、高い精度での変異同定を実現している(Kanesaki et al., 2012)。長期高温培養中に生育限界温度が上昇する度に、全ゲノムリシーケンス解析と冷凍保存株の作製をセットで実施する。ゲノム上の変異の規則性や構造変異の特徴を、他の好熱性シアノバクテリアの遺伝子型やタンパク質フォールディングと比較して、同様の変異型に転換したかを検証する。また RNA-seq 解析によりどのような遺伝子発現変動が生じたかを検証する。

## 4. 研究成果

寒天培地は BG-11 培地を用いた。生育上限温度に設定した恒温インキュベーター内に複数の

温度計を設置し、細胞状態や色を確認しながら 2-3 日おきに新しい培地に継代した。生育上限温度での生育が安定し、培地の全面にコロニーが確認できる状態になったらインキュベーターの温度を上げて次の条件に移行し、定期的な凍結サンプルの保存とリシーケンス解析を実施した。この操作により、高温適応した *S. elongatus* PCC 7942 のゲノム DNA はフェノール法により抽出し精製した。1 年に 1 回程度の頻度で全ゲノムリシーケンス解析を実施し、新規の突然変異の蓄積を確認した。長期間の適応進化実験により累積した突然変異がゲノム上の特定領域に集中するかどうかを検証したが、現時点ではそのようなホットスポットは見られていない。一方、高温下での細胞形態の面では親株と高温適応株の違いは明瞭で、親株がフィラメント状になるような温度でも高温適応株は通常の細胞形態を保つことが明らかになった。また新たに取得した高温適応株のラインでは、これまでの株ラインで高温耐性への寄与が示唆された 2 遺伝子座への変異は見られなかったことから、高温耐性や高温適応に関わる突然変異には多様性があることが見えてきた。

これまでは液体培地での生育試験では、寒天培地での試験よりも 2 程度低い温度までしか生育は確認できず、またこの結果は再現的であったが、継続的な高温適応培養を続けた結果、寒天培地での生育上限温度の向上とともに液体培地での生育上限温度も上昇していることが確認できた。このことは培養系における細胞のフィットネスがさらに向上したことを示す。一方で、プレート上では細胞外多糖による保護やマット化することによる遮光効果などの影響については、いくつか試験をおこなったものの現時点では解明に至っていない。

転写産物レベルでの遺伝子発現変動を調べるため、親株(TUA 株)と高温適応株を 37 で培養した後、43 にシフトしてトランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、TUA 株と HT50 株では遺伝子発現パターンが大きく異なっていることが明らかとなった。特徴的な結果として、熱ショックタンパク質の遺伝子などの変動は顕著ではなく、機能未同定遺伝子が多く発現変動していた。発現変動の大きな遺伝子群について、遺伝子破壊用のコンストラクト作成のためのプライマーセットを設計した。予算の関係で、高温域でのトランスクリプトーム解析のデータは見送ったが、取得に向けた準備を進めている。トランスクリプトーム解析の結果から、突然変異により細胞内の遺伝子発現パターンが変動したことが細胞の高温耐性の向上につながったことが示唆された。当初は、ゲノム全体の構造や GC 含量などに変化が生じるレベルの大規模な数の変異が蓄積しないと高温耐性の獲得には至らない可能性もあると予想していたが、実際には非常に少数の突然変異でも既知の生育上限温度を超えることが可能であることが明らかになった。

#### < 引用文献 >

1. Barrick JE, Lenski RE. Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet.* 2013, 14: 827-839.
2. Suzuki I, Kanesaki Y, Hayashi H, Hall JJ, Simon WJ, Slabas AR, Murata N. The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* 2005, 138: 1409-1421.
3. Bergey DH. *Thermophilic Bacteria.* *J Bacteriol.* 1919, 4: 301-306.
4. Kanesaki Y, Shiwa Y, Tajima N, Suzuki M, Watanabe S, Sato N, Ikeuchi M, Yoshikawa H. Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 2012, 19: 67-79.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hasegawa H, Kanesaki Y, Watanabe S, Tanaka K.	4. 巻 69
2. 論文標題 A high-temperature sensitivity of <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 due to a tRNA-Leu mutation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 167-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2023.02.001	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 Soma A, Kubota A, Tomoe D, Ikeuchi Y, Kawamura F, Arimoto H, Shiwa Y, Kanesaki Y, Nanamiya H, Yoshikawa H, Suzuki T, and Sekine Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 yaaJ, the tRNA-Specific Adenosine Deaminase, Is Dispensable in <i>Bacillus subtilis</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14081515.	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 Matsumoto N, Matsutani M, Tanimoto Y, Nakanishi R, Tanaka S, Kanesaki Y, Theeragool G, Kataoka N, Yakushi T, and Matsushita K.	4. 巻 205
2. 論文標題 Evolutionary Adaptation by Repetitive Long-Term Cultivation with Gradual Increase in Temperature for Acquiring Multi-Stress Tolerance and High Ethanol Productivity in <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e0010123.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jb.00101-23.	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 該当する
1. 著者名 Effendi D.B., Sakamoto T., Ohtani S., Awai K., and Kanesaki Y.	4. 巻 135
2. 論文標題 Possible involvement of extracellular polymeric substrates of Antarctic cyanobacterium <i>Nostoc</i> sp. strain S0-36 in adaptation to harsh environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 771-784.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01411-x	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 Maruyama T., Sumi S., Kobayashi M., Ebuchi T., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Ueda K., and Takano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Class II LitR serves as an effector of "short" LOV-type blue-light photoreceptor in <i>Pseudomonas mendocina</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26254-3	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 Pattanakittivorakul S., Tsuzuno T., Kosaka T., Murata M., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Limtong S., and Yamada M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Evolutionary Adaptation by Repetitive Long-Term Cultivation with Gradual Increase in Temperature for Acquiring Multi-Stress Tolerance and High Ethanol Productivity in <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU 3-1042	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10040798	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 Kataoka N., Matsutani M., Matsumoto N., Oda M., Mizumachi Y., Ito K., Tanaka S., and Kanesaki Y., Yakushi T., and Matsushita K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Mutations in <i>degP</i> and <i>spoT</i> Genes Mediate Response to Fermentation Stress in Thermally Adapted Strains of Acetic Acid Bacterium <i>Komagataeibacter medellinensis</i> NBRC 3288	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 802010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.802010	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 Takahashi S., Okubo R., Kanesaki Y., Zhou B., Takaya K., Watanabe S., Tanaka K., and Imamura S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of Transcription Factors and the Regulatory Genes Involved in Triacylglycerol Accumulation in the Unicellular Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10050971	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 Yoshikawa S., Kanesaki Y., Uemura A., Yamada K., Okajima M., Kaneko T., and Ohki K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Physiological and genomic analysis of newly-isolated polysaccharide synthesizing cyanobacterium <i>Chroococcus</i> sp. FPU101 and chemical analysis of the exopolysaccharide.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2021.02.002	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 Hirose Y., Ohtsubo Y., Misawa N., Yonekawa C., Nagao N., Shimura Y., Fujisawa T., Kanesaki Y., Katoh H., Katayama M., Yamaguchi H., Yoshikawa H., Ikeuchi M., Eki T., Nakamura Y., and Kawachi M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocyst-forming clade.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsab024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsab024	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 Kanesaki Y. and Ogura M.	4. 巻 14
2. 論文標題 RNA-seq analysis identified glucose-responsive genes and Yqf0 as a global regulator in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-021-05869-1	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17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yu Kanesaki
2. 発表標題 Strain heterogeneity and adaptive laboratory evolution of a cyanobacterium <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.
3. 学会等名 BioAnveshana-2024. International conference on Frontiers in Basic Biology, Biotechnology and Bioinformatics. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三宅敬太, 櫻本友則, 松本直大, 迫凌輔, 佐藤繭子, 豊岡公德, 兼崎友, 岩崎渉, 成川礼
2. 発表標題 Acaryochloris marina MBIC 11017 におけるプラスミドシャッフリングを介した光環境適応機構
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 駒形 遥、坂巻 裕、内田 小百合、浦井 誠、兼崎 友、朝井 計、渡辺 智
2. 発表標題 スピルリナ強光培養後に観察されるアルカリバチルスの出現メカニズム解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兼崎 友
2. 発表標題 静岡共同利用機器センターゲノム機能解析部の紹介
3. 学会等名 静岡大学研究設備統括本部シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 駒形 遥、坂巻 裕、内田 小百合、浦井 誠、兼崎 友、朝井計、渡辺 智
2. 発表標題 スピルリナ強光培養後に観察されるアルカリバチルスの出現メカニズム解析
3. 学会等名 第21回 微生物研究会「微生物の進化、その産業応用」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅 敬太, 櫻本 友則, 迫 凌輔, 松本 直大, 佐藤 繭子, 豊岡 公德, 兼崎 友, 岩崎 渉, 成川 礼
2. 発表標題 プラスミドを介したシアノバクテリア <i>Acaryochloris marina</i> MBIC 11017の橙色光環境への適応
3. 学会等名 日本植物学会 第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Devi B. Effendi, Toshio Sakamoto, Shuji Ohtani, Koichiro Awai, Yu Kanesaki
2. 発表標題 Genome analysis of the Antarctic cyanobacterium <i>Nostoc</i> sp. strain S0-36 which shows EPS production and a psychrotolerant phenotype.
3. 学会等名 The 9th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山内 あずさ, 川島 玉稀, 兼崎 友, 渡辺 智
2. 発表標題 極限環境藻類ガルデリアのpHストレスに関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 駒形 遥, 坂巻 裕, 内田 小百合, 浦井 誠, 兼崎 友, 渡辺 智
2. 発表標題 スピルリナ培養時に確認されたアルカリバチルス の出現メカニズム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山内 あずさ、川島 玉稀、兼崎 友、渡辺 智
2. 発表標題 極限環境藻類Cyanidium sp.のpHストレス応答に関する研究
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会 第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅 敬太、櫻本 友則、迫 凌輔、佐藤 繭子、豊岡 公德、兼崎 友、岩崎 渉、成川 礼
2. 発表標題 プラスミドを介したAcaryochloris marina MBIC 11017 の橙色光環境への適応
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会 第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兼崎 友
2. 発表標題 単細胞紅藻ガルデリア、光合成をやめるとか、やめないとか
3. 学会等名 第23回 静岡ライフサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Effendi Devi B., 坂本 敏夫、大谷 修司、粟井 光一郎、兼崎 友
2. 発表標題 南極から単離されたシアノバクテリアNostoc sp. S0-36の低温耐性と細胞外多糖の関連性
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 駒形 遥、内田小百合、坂巻 裕、浦井 誠、兼崎 友、渡辺 智
2. 発表標題 スピルリナ凝集体形成時に確認されたアルカリパチルス出現メカニズムの解析
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 広瀬侑、大坪嘉行、三澤直美、米川千夏、長尾信義、志村遥平、藤澤貴智、兼崎友、加藤浩、片山光徳、山口晴代、吉川博文、池内昌彦、浴俊彦、中村保一、河地正伸
2. 発表標題 NIESコレクションのシアノバクテリアのゲノム解析の取り組み
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ritsuho Yamakawa, Hikaru Sano, Yusuke Sugimoto, Yu Kanesaki, Kan Tanaka, Akiko Soma
2. 発表標題 Characterization of tRNA repertoires for the CGN codon family in Cyanidiophyceae organelles
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 広瀬 侑、大坪 嘉行、三澤 直美、米川 千夏、長尾 信義、志村 遥平、藤澤 貴智、兼崎 友、加藤 浩、片山 光徳、山口 晴代、吉川 博文、池内 昌彦、浴 俊彦、中村 保一、河地 正伸
2. 発表標題 NIES コレクションのシアノバクテリアのゲノム解析
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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