

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19412

研究課題名(和文)非膜オルガネラによる代謝連続反応の制御とその応用

研究課題名(英文)Membrane-less organelles and control of metabolic pathways

研究代表者

荒川 博文(Arakawa, Hirofumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：70313088

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):膜のないオルガネラとしての液滴は、液-液相分離によって誘導される。この新しい細胞内生命原理は、これまでの膜のあるオルガネラを中心とした学問では説明が難しかった現象を説明しうる新しい生物学として発展しようとしている。我々が長年研究を続けてきたp53誘導性タンパク質Mieapはミトコンドリアに液滴の形成を誘導することが明らかとなった。このMieap液滴は非膜オルガネラとしてミトコンドリアに特異的な脂質であるカルジオリピンの代謝反応を制御することで、ミトコンドリアの健全性維持に重要な役割を果たす。それによって、がん・認知症・老化などの病態から我々の健康を守ってくれている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古典的概念ではこれまで説明が難しかった代謝連続反応のメカニズムを液滴による代謝制御という全く新しい概念で説明することが可能になると期待される。細胞内の様々な生物活性の反応様式が、単なる教科書の図ではなく、リアリティーのある生物活性として説明可能になると期待される。Mieap液滴を応用することで、カルジオリピン代謝制御を介した全く新しいミトコンドリア健全性維持の手段を提供し、がん・認知症・老化などの予防や治療が可能になると期待され、広く人類の健康福祉に大きく貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文):Biomolecular condensates (BCs) are formed by proteins with intrinsically disordered regions (IDRs) via liquid-liquid phase separation. Here, we report that Mieap is an IDR-containing protein that drives formation of BCs involved in cardiolipin metabolism. Mieap BCs specifically phase separate the mitochondrial phospholipid, cardiolipin. Mieap directly binds to cardiolipin in vitro. Lipidomic analysis of cardiolipin suggests that Mieap promotes enzymatic reactions in cardiolipin biosynthesis and remodeling. Accordingly, four cardiolipin biosynthetic enzymes, TAMM41, PGS1, PTPMT1, and CRLS1, and two remodeling enzymes, PLA2G6 and TAZ, are phase-separated by Mieap BCs. Mieap-deficient cells exhibit altered crista structure, leading to decreased respiration activity and ATP production in mitochondria. These results suggest that Mieap may form membrane-less organelles to compartmentalize and facilitate cardiolipin metabolism, thus potentially contributing to mitochondrial quality control.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：相分離 液滴 非膜オルガネラ ミトコンドリア カルジオリピン 酵素反応 代謝連続反応 p53

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mieap は p53 誘導性タンパク質として同定され、ミトコンドリア品質管理を介したがん抑制機能を有することが分かっていた。研究の過程で、Mieap が誘導する構造物は、ミトコンドリアを分解する液胞様構造物ではなく、タンパク質の濃縮体としての液滴であることが明らかになった。さらにこの Mieap 液滴は、カルジオリピンの代謝反応を促進する働きがあることが分かり、カルジオリピン代謝反応を区画化・促進する非膜オルガネラの可能性が高まった。

2. 研究の目的

細胞内の代謝連続反応がどのように制御されているかについては未だ不明である。本研究は、非膜オルガネラである Mieap 液滴によるカルジオリピン代謝連続反応の制御機構について、我々が世界で初めて構築したモデルの検証を行い、さらにそれを応用することで人為的代謝制御法の開発に繋げることを目的に行われた。

3. 研究の方法

(1) 生細胞イメージング

各種酵素と Mieap 液滴の関係は生細胞イメージングでのみ解析可能である。EGFP 融合カルジオリピン代謝酵素と RPF 融合 Mieap の領域欠失変異体発現ベクターを用いて Mieap 液滴内への各種カルジオリピン代謝酵素の取り込みの有無を調べ、Mieap と各種カルジオリピン代謝酵素の多価結合に重要な機能ドメインを決定し、我々の仮説を検証する。

(2) 結合蛋白質の同定

抗 Mieap 抗体免疫沈降法による Mieap 液滴構成分子の網羅的解析を行う。カルジオリピン代謝制御の非膜オルガネラとしての Mieap 液滴の形成を Mieap タンパク質はドライバーとして駆動することが出来る。この形成に関わる共役分子や液滴の構成分子の同定のために細胞内で誘導した Mieap 液滴に対して免疫沈降と網羅的プロテオミクス解析を行う。

(3) バイオインフォマティクス

Mieap 及びカルジオリピン代謝酵素、代謝関連タンパク質、Mieap 結合タンパク質のアミノ酸配列を、最新のプログラムを用いて、液滴形成におけるドライバータンパク質、クライアントタンパク質としての可能性を探る。

(4) 生理的 Mieap 液滴の可視化

蛍光タンパク質 mNeonGreen の cDNA をマウスゲノム Mieap 遺伝子座にノックイン (KI) し mNeonGreen-Mieap KI マウスを作成し、個体及び細胞株における生理的 Mieap 液滴を可視化する。

4. 研究成果

(1) 本研究課題の成果

Mieap タンパク質は中央から N 末端側が親水性、C 末端側が疎水性の両親媒性タンパク質であり生体内ではバイオサーファクタンズとして働いている。

N 末端領域には 3 カ所の天然変性領域と 2 カ所の coiled-coil 領域を認め、7 つの CL 代謝酵素との緩い結合に重要である。

C 末端疎水領域で CL 及び CL 関連脂質と強固に結合する。

Mieap 液滴は Mieap 及び CL 関連脂質を含有する基質相と CL 代謝関連酵素を含有する酵素相の 2 種類の相から構成される多層構造を呈する。

CL 代謝連続反応は基質相と酵素相の界面で起こっている。

Mieap タンパク質は両親媒性タンパク質として、界面において CL 代謝酵素と CL 関連脂質を近接させる役割を果たしている。

Mieap タンパク質は天然変性タンパク質であり、Mieap 液滴を単独で誘導できる足場タンパク質として機能する。

Mieap 結合タンパク質として TRIOBP と 14-3-3 を同定した。いずれも Mieap 液滴の構成分子であることを確認した。

TRIOBP は単独で液滴を形成しうることを確認した。

14-3-3 は、Mieap の N 末端領域と CL 代謝酵素の結合を媒介することを確認した。

バイオインフォマティクス解析により Mieap は液滴のドライバータンパク質であり、PRELI, PGS1, CRLS1, PLA2G6, TAZ はクライアントタンパク質であることを見出した。

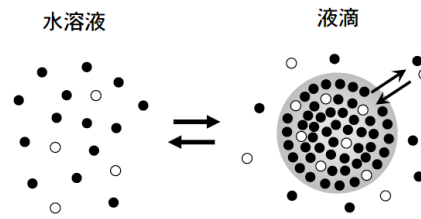
Mieap タンパク質の N 末及び C 末に mNeonGreen を融合させた mNeonGreen-Mieap KI マウスの樹立に成功した。

(2) 本研究課題成果の意義

非膜オルガネラとしての液滴の役割

タンパク質が細胞内の局所で高濃度となり、凝集せずにコロイド状の液化した球形領域を作る。このコロイド状球形のタンパク質の濃縮体 (condensates) を液滴と呼ぶ。重要なことは、この液滴は単なるある単一タンパク質の濃縮状態ではなく、「数十から数百種類のタンパク質や核酸などの分子を含有した状態」になっており、内部にはある特定の反応に関与する複数の基質と酵素及び反応中間体が濃縮して、その一連の反応系を促進させる膜のないオルガネラ (非膜オルガネラ: membraneless organelles, MLOs) として機能することである。古典的な膜オルガネラと異なり、非膜オルガネラの重要な特徴は、膜がないために周囲との物質交換が自由に行われ、形成と消失が時空間ダイナミックに行われることである。これまでに代謝やシグナル伝達、転写などの「反応の区画化」や「反応の調節機能」として働いていることが明らかになっている(文献 1-5)。このような膜のないオルガネラが細胞内の核や細胞質に数多く存在していると予測されている。

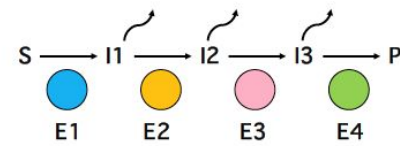
膜のないオルガネラとしての液滴の役割



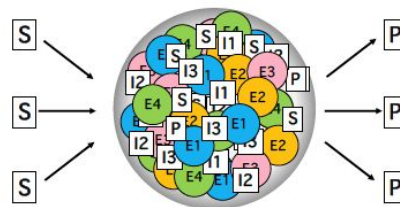
・膜がないため周囲との物質交換が自由に行われる。
 ・誘導と消失も時空間ダイナミックに変化できる。

液滴による代謝連続反応の制御

生体内での連続的な酵素反応は、基質 S に対して酵素 E1 が触媒し中間産物 I1 が産生され、さらに I1 が酵素 E2 の基質として受け取られ触媒され中間産物 I2 が産生される。産生された中間産物 I2 は次の酵素 E3 の基質として受け取られ触媒され中間産物 I3 が産生される、といった連続反応で進み、最終産物 P が産生されると示されている。図でこの連続反応を描くことは容易だが、実際の細胞内でこの連続反応がどのようなメカニズムで進んでいるかは未だ不明である。右図(上)のモデルでは、「連続反応の途中で産生される中間産物の拡散はどのように防止されているのか? 前の反応で産生された中間産物は、次の酵素の基質として、どのようなメカニズムで正確に受け渡されるのか? このような反応がどのように連続的に効率よく進んでいくのか?」などの疑問は説明できない。



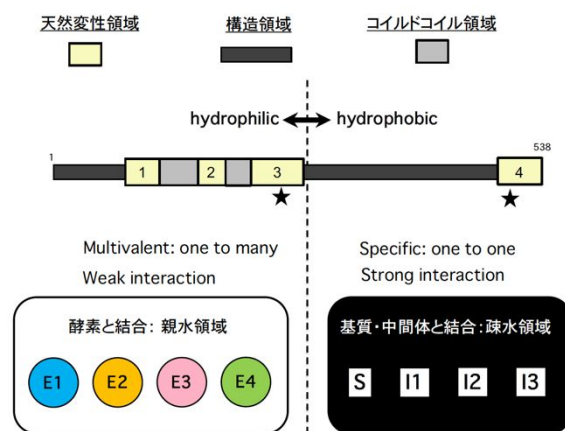
Mieap液滴



しかし、液滴内にこれら酵素と基質が区画化・濃縮された場合、次のような仮説によって反応が効率よく進む可能性が出てくる(文献 6)。第一に、反応の過程で生じる中間産物は、液滴による区画化で拡散が防止される。第二に、酵素と基質は液滴内で濃縮されることで、自由空間に比べ、対応する酵素と基質・中間産物のペアは、出会う確率が格段に上昇する。区画化と濃縮という点だけでも、液滴はこれまで説明が難しかった細胞内の代謝連続反応のメカニズムをうまく説明できる可能性がある。

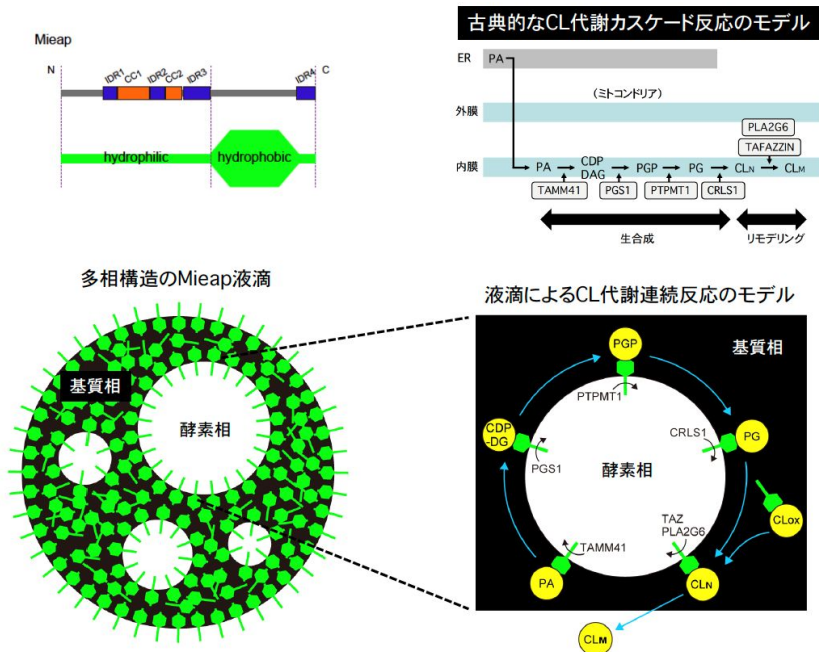
Mieap 液滴による代謝連続反応の制御

我々は非膜オルガネラとしての Mieap 液滴が細胞内でカルジオリピン酵素反応を区画化し、酵素や基質を局所へ濃縮することで、効率的な代謝連続反応が進むという可能性を見出した(文献 1)。Mieap タンパク質は、親水性の N 末領域に 3 つの天然変性領域 (IDR) が、疎水性の C 末領域に構造領域が存在することでバイオサーファクタントの特徴を有する。また 2 カ所に陽性荷電クラスターが存在している。これにより、Mieap は陰性荷電の CL 及び CL 合成関連脂質 (基質・中間産物) と静電作用と疎水結合で直接結合し、バイオサーファクタントとして機能する。Mieap 液滴の CL 代謝制御は局所への酵素・基質・中間産物の区画化・濃縮に加え、Mieap が C 末で基質 S と強く結合し、一方 N 末で酵素 E とゆるく結合し、E1 から E4 の各酵素との結合を常時変化させることで代謝連続反応が可能になると予想している。いったん結合した S は、その後の E1 から E4 までの酵素との緩い会合で触媒されていくことが CL 代謝連続反応の実態ではないかと予想している。



Mieap 液滴によるカルジオリピン代謝反応の制御

これまでに液滴による酵素反応の促進作用や多相構造を形成するメカニズムについて以下の重要な報告がなされている。(1) RNA プロセッシング顆粒における液滴は多相構造を形成するが、基質である RNA と酵素である CNOT7 は、一つの相に濃縮されるより、二つの異なる相へ別々に分離される方が、より迅速で効率の良い酵素反応が可能になる(文献 7)。(2)人工的に設計された足場タンパク質で形成された液滴内に、SUMO 化酵素とその基質が濃縮され、さらに足場タンパク質によって物理的に近接化することで、バルクに比べ SUMO 化反応が 36 倍上昇した(文献 8)。単なる酵素と基質の濃縮だけでは、substrate inhibition(基質阻害)が生じ、逆に反応の効率が低下することを報告しており、液滴内への基質と酵素の濃縮だけではなく、加えて足場タンパク質の特異的



な結合による、酵素と基質の適切な距離への近接化で K_M 値を低下させることが重要である事を報告している。(3)液滴内の多相構造形成のメカニズムは、水相の中で二つの液滴の水に対する表面張力によって決定される。より親水性の表面に wetting する液滴(ぬれ性が高い)の中に、wetting しない液滴(ぬれ性が低い)が取り込まれる(文献 9)。ただし 2 つの相の界面にサーファクタントが存在する場合には、この関係が逆転する。

Mieap 液滴は多相構造を形成する。Mieap が存在する相(Mieap 相:基質相)には Mieap と CL 代謝の基質や代謝産物が存在し、液滴内部に形成される Mieap が存在しない相(非 Mieap 相:酵素相)には主に CL 代謝酵素が存在している。

基質と酵素が別々の相に分離されることが、代謝反応の効率を上げることは(1)の報告に一致している。これは高濃度の基質による反応の阻害が生じる substrate inhibition を防止することに貢献する。さらに反応の場が 2 つの相の界面であることを示唆している。

Mieap はバイオサーファクタントとしての性質を有し、基質相と酵素相の界面に存在している。親水領域の N 末で酵素と、疎水領域の C 末で基質と特異的に結合することで、基質と酵素を物理的に近接させ、酵素反応を効率的に進める。これは(2)の報告に一致している。

水相の中で基質相は基質としての脂質を多量に含むため、親水性の表面に対しては wetting せず、逆に酵素相は wetting しやすいと考えられる。(3)の報告に従えば、酵素相の中に基質相は存在するはずである。しかし論文でも述べられているように、2 つの相の界面にサーファクタントが存在すれば、この原理は逆転しうる。

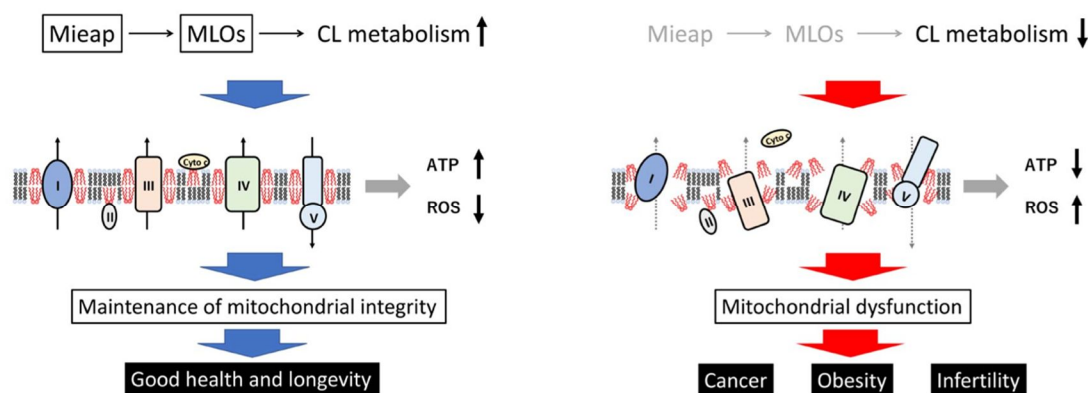
Mieap はバイオサーファクタントとしての性質を有し 2 つの相の界面に存在しているため、基質相と酵素相は逆転しうる。これも(3)の報告に矛盾しない。酵素相が基質相の中に入ることによって、多数の酵素相が発生し、基質相との反応の界面の面積を格段に増加させることができる。

まとめると、Mieap 液滴は、CL 代謝の酵素と基質を液滴内に濃縮し、さらに酵素と基質を 2 つの相に別々に分離し、2 つの相の界面にサーファクタントとして存在し、2 つの相の界面で基質と酵素を物理的に近接させ酵素反応を可能にし、基質との強い結合と、酵素との緩い結合で、CL 代謝の連続反応を効率良く進めている。これが我々の提唱するモデルである。

カルジオリピン代謝制御によるミトコンドリアの健全性維持

CL は脂質の中でもただ一つミトコンドリア固有のリン脂質であり、ミトコンドリアの内膜に存在する。CL は 1 分子に 4 本足の脂肪酸側鎖を有しているため極めてユニークな cone-shaped と呼ばれる、円錐形の形態をとる(文献 10)。この性質はミトコンドリア内膜クリステの屈曲した構造の構築に重要である。また強く負に荷電した極性頭部と足側の 4 つの脂肪酸鎖の疎水性結合により、数多くのミトコンドリア膜タンパク質と結合し、それらタンパク質の足場となって安定化し、その機能発現に重要である(文献 10)。特に呼吸鎖においては複合体 I、II、III、IV、V のそれぞれに対して 2 分子から 4 分子の CL が結合し、呼吸鎖タンパク質の足場となり安定化させ、さらに、各複合体を互いに近接させ、超複合体を形成することで、電子伝達系の効率が高まり、酸化リン酸化、酸素消費、ATP 合成が上昇する(文献 11)。このため CL に異常が生じると電子伝達系の効率が下がり、ミトコンドリアからの ATP 合成が低下し、活性酸素種(ROS)発

生が増加する。これまでに、オートファジーやプロテオスタシスなどのミトコンドリアの健全性維持に関するメカニズムが知られていた。Mieap 液滴による CL 代謝制御はこれらに続く第 3 のミトコンドリア品質管理メカニズムと言える。



(3) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

液-液相分離によって形成される液滴は、様々な細胞内生物活性の制御に重要な働きをしていることが明らかになって来ている。世界的にもこの新しい概念に多くの研究者が取り組み始めており、続々と新しい知見が報告されている状況である。その中でも、酵素反応や代謝反応における役割は、極めて重要であると予測されているが未だ実例の報告はない。我々の研究は、この様な状況の中、世界に先駆けて、代謝連続反応を制御する液滴として Mieap 液滴を見出し、そのモデルの提唱に成功した。また Mieap 液滴は CL 代謝の制御機構であるため、本機能はミトコンドリア異常を背景としたがん、神経変性疾患、老化など多くの病態の原因となっている可能性があり、本機能の人為的制御法の開発は、これまでに存在しなかった全く新しい疾患治療法や予防法の創出が期待される。従って、本研究課題の成果は、研究領域へのパラダイムシフトを引き起こすだけでなく、人類の健康福祉にも大きく貢献しうることが予測される。また小児領域の難治疾患である Barth 症候群の患者に対する治療の可能性を開くと期待される。

(4) 今後の展望

液滴は少数の足場タンパク質によってその形成が駆動できる。Mieap 液滴は、Mieap タンパク質単独で形成が駆動できるため、今後は Mieap タンパク質の mRNA レベルあるいはタンパク質レベルでの発現活性化が可能になれば、人為的 CL 代謝促進法の開発が可能になると期待される。Mieap 液滴を応用した CL 代謝制御法は、がん・神経変性疾患・老化などに対するミトコンドリア健全性の維持・回復による新しい予防・治療の手段を提供できると考えている。

引用文献

1. Ikari N, Arakawa H, et al. Mieap forms membrane-less organelles involved in cardiolipin metabolism. **iScience**. 27, 108916 (2024).
2. Arakawa H. MLOs and control of metabolic pathways. In Uversky V. **Droplets of life**. Chapter 14 (Elsevier), p431-446 (2023).
3. 荒川博文. がんの細胞死回避戦略としてのワールブルグ効果とカルジオリピン代謝を制御する Mieap 液滴について. **医学のあゆみ** (vol.283 No.5) 2022 年増刊号「細胞死のすべて」p469-479.
4. 荒川博文. Mieap が誘導する液滴とミトコンドリア制御. **実験医学** (vol.37 No.12) 2019 年増刊号「ミトコンドリアと疾患・老化」p105-113 (p1977-1986).
5. 碓直樹, 荒川博文. Mieap 液滴が制御するカルジオリピン代謝連続反応のメカニズム. **細胞** (vol. 54 No. 8) 2022 年 7 月号「Architectural RNA と液-液相分離」p39-43 (p461-465).
6. Castellana, M. et al. Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling. **Nat. Biotechnol.** 32, 1011-1018 (2014).
7. Kim, T.H. et al. Phospho-dependent phase separation of FMRP and CAPRIN1 recapitulates regulation of translation and deadenylation. **Science**. 365, 825-829 (2019).
8. Peebles, W. and Rosen, M.K. Mechanistic dissection of increased enzymatic rate in a phase-separated compartment. **Nat. Chem. Biol.** 17, 693-702 (2021).
9. Feric, M. et al. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. **Cell**. 165, 1686-1697 (2016).
10. Ikon, N., and Ryan, R.O. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes**. 1859, 1156-1163 (2017).
11. Paradies, G. et al. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics**. 1837, 408-417 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Ikari Naoki, Honjo Katsuko, Sagami Yoko, Nakamura Yasuyuki, Arakawa Hirofumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Mieap forms membrane-less organelles involved in cardiolipin metabolism	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2024.108916	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 Giulivi Cecilia, Zhang Kezhong, Arakawa Hirofumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent advances and new perspectives in mitochondrial dysfunction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-34624-8	査読の有無 無
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 Ikari Naoki, Arakawa Hirofumi	4. 巻 655
2. 論文標題 Identification of a mitochondrial targeting sequence in cathepsin D and its localization in mitochondria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 25 ~ 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.03.016	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 Hamada Koichiro, Kurashige Tomomi, Shimamura Mika, Arakawa Hirofumi, Nakamura Yasuyuki, Nagayama Yuji	4. 巻 13
2. 論文標題 MIEAP and ATG5 are tumor suppressors in a mouse model of BRAFV600E-positive thyroid cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 932754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.932754	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8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hirofumi Arakawa
2. 発表標題 Warburg effect as an anti-apoptotic strategy for cancer cells and membrane-less organelles involved in cardiolipin metabolism
3. 学会等名 KSMRM (Korean Society for Mitochondrial Research and Medicine) 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒川 博文
2. 発表標題 がんの細胞死回避戦略としてのワールブルグ効果とカルジオリピン代謝を制御するMieap液滴のがん抑制作用について
3. 学会等名 第31回日本Cell Death学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 康之、荒川 博文
2. 発表標題 Mieap液滴の生体内可視化：液滴はどのように腫瘍を抑制するか？
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒川 博文
2. 発表標題 がんとミトコンドリア
3. 学会等名 第7回ミトコンドリア病研究公開フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒川 博文
2. 発表標題 Mieapが誘導する液滴とミトコンドリア制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 碓 直樹、中村 康之、荒川 博文
2. 発表標題 Mieapは液滴を形成しカルジオリピン代謝を促進する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 碓 直樹、中村 康之、荒川 博文
2. 発表標題 p53-Mieap経路のがん抑制におけるカルジオリピン代謝の役割について
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Ikari, Yasuyuki Nakamura, Hirofumi Arakawa
2. 発表標題 Mieap forms membraneless organelles to compartmentalize and facilitate cardiolipin metabolism
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Hirofumi Arakawa	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 16
3. 書名 Droplets of life, Chapter14	

1. 著者名 荒川 博文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 11
3. 書名 医学のあゆみ Vol.283 No.5	

1. 著者名 碓 直樹、 荒川 博文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス	5. 総ページ数 5
3. 書名 細胞 Vol.54 No.8	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Dr. HIROFUMI ARAKAWA'S LABORATORY https://hirofumi-arakawa-labo.jp/index.html
--

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