

令和元年6月5日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02378

研究課題名(和文)細胞のエネルギーフリー長期常温乾燥保存(細胞の乾物屋)を目指した基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of a methodology for the energy-free long-term preservation of biological materials

研究代表者

櫻井 実 (Sakurai, Minoru)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授

研究者番号：50162342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：ネムリユスリカ等の耐乾燥生物が発現する天然の乾燥保護物質であるLEAタンパク質やトレハロースの機能発現メカニズムをin vitroの実験と計算機シミュレーションにより調べた。その結果、これらの保護剤は、分子シールドメカニズムによりタンパク質や細胞膜の乾燥破壊を未然に防ぐとともに、一度破壊された構造の修復を助ける分子シャペロンとしても働くことが判明した。

ネムリユスリカの乾燥耐性メカニズムを解明するため、gain-of-function実験系の構築と loss-of-function 実験系の構築(CRISPR/Cas9システムの構築)に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞、タンパク質、遺伝子などの生物資源は、通常、低温あるいは凍結条件下で保存されている。これには莫大なエネルギーコスト、停電リスクが伴う。近年、特に3.11震災以来、これらの生物資源を扱う研究者や医療・医薬関係者は、この非常事態への対策に迫られている。本研究の成果によれば、LEAペプチドやトレハロースを用いることにより、タンパク質(タンパク質製剤含む)やリボソームを利用したドラッグデリバリーシステムの常温乾燥保存が可能となると期待される。

ネムリユスリカ細胞のゲノム編集が可能になったことにより、乾燥耐性メカニズムの基礎研究が今後より発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the functional mechanisms of LEA (late embryogenesis abundant) proteins/peptides and trehalose as desiccation protectants using in vitro physicochemical experiments and molecular simulations. It was revealed that these protectants work through the so-called molecular shielding mechanism and also play a role of molecular chaperon.

For an in-depth understanding of the desiccation tolerance mechanism of *P. vanderplanki*, we successfully developed a method of CRIPPR/CAS9 mediated gene editing for its Pv11 cell.

研究分野：生物物理学

キーワード：乾燥休眠 トレハロース LEAタンパク質 水 分子シミュレーション ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞、タンパク質、遺伝子などの生物資源は、通常、低温あるいは凍結条件下で保存されている。これには莫大なエネルギーコスト、停電リスクが伴う。近年、特に3.11震災以来、これらの生物資源を扱う研究者や医療・医薬関係者は、この非常事態への対策に迫られている。

アフリカの半乾燥地帯に生息するネムリユスリカは、乾期になると脱水状態で代謝活動を停止し乾燥休眠状態に至るが、雨期には水を吸収して蘇生する。この生物は乾燥状態で17年間もの長きにわたって生き延びたという報告もある。研究代表者は、ネムリユスリカの乾燥状態を物理化学的手法で測定・分析し、乾燥休眠のメカニズムを明らかにしてきた。その結果、ネムリユスリカは乾燥すると水の代替物質として二糖トレハロースを体内隅々まで大量に蓄積し、これがガラス化することにより細胞膜やタンパク質を“堅いカプセル”に閉じ込め安定化させる、ことを見出した。さらに乾燥時に多量に産生されるLEA (late embryogenesis abundant) タンパク質も乾燥保護に寄与していると考え、その機能解明のため、LEA タンパク質特有の11残基の繰返し配列 (AKDGTKEKAGE) から成るペプチドを化学合成し、その立体構造と機能を調べてきた。その結果、このペプチド (以下 LEA ペプチド) 水溶液中ではランダムであるが、乾燥するとヘリカル-コイルドコイル構造をとることを見出した。すなわち、機能を発現すべき状況ではじめて構造化するタンパク質、intrinsically disordered protein の一つであること明らかにした。LEA ペプチドはトレハロースと混ぜるとトレハロースのつくる堅いガラスをさらに強化する役割をすることがわかった。さらに、LEA ペプチドはイオンスキャベンジャーとして働き、細胞の脱水過程で生じる浸透圧ストレスを抑制する機能があることが判明した。また、LEA ペプチドは不安定なタンパク質やリボソームの凝集・融合を抑制し、単独でも乾燥保護機能をもつことが判明した。

以上の背景の下、耐乾燥生物が産生する天然の乾燥保護剤であるトレハロースや LEA タンパク質 (あるいはそのモデルである LEA ペプチド) を利用すれば、iPS 細胞を含む貴重な生物資源のエネルギーフリー長期常温乾燥保存が可能ではないかと期待した。

2. 研究の目的

LEA ペプチドやトレハロースの更なる機能解析に加え、将来的な細胞の常温乾燥保存の実用化 (言わば細胞の乾物屋) に向けて、必要な基盤技術を確認するための基礎研究を行う。具体的には以下の通りである。

- 1) in vivo 及び in silico 系での LEA ペプチドの機能評価
- 2) in vivo 及び in silico 系でのトレハロースの機能評価
- 3) 細胞を用いた LEA ペプチドの機能評価
- 4) ネムリユスリカ乾燥耐性メカニズム解明へ向けてのゲノム編集

3. 研究の方法

- 1) LEA ペプチドによるタンパク質/酵素あるいはリボソームの乾燥ストレス保護・熱ストレス保護を in vitro 試験で調べ、そのメカニズムを FTIR, CD スペクトルおよび DSC 測定などの物理化学実験とスーパーコンピュータを用いた分子動力学 (MD) シミュレーションにより解析した。
- 2) トレハロースおよびその誘導体によるリボソームの乾燥ストレス保護を in vitro 試験で調べ、そのメカニズムを FTIR, CD スペクトルおよび AFM 測定などの物理化学実験と MD シミュレーションにより解析した。
- 3) ネムリユスリカ由来の細胞 Pv11 内に LEA ペプチドを導入した場合、あるいは外側の培養液中にペプチドを添加した場合について、乾燥耐性試験を行った。
- 4) ネムリユスリカ細胞株である Pv11 細胞における乾燥耐性メカニズムを解明するため、以下のステップで研究を行った。

Pv11 細胞における gain-of-function 実験系の構築

loss-of-function 実験系の構築を目指した、CRISPR/Cas9 システムの構築

内因性遺伝子のノックアウト技術の確立と、ノックアウト細胞の選別

4. 研究成果

- 1) LEA ペプチドは、細胞サイズ (直径 6-9 μm) の巨大ベシクルの乾燥誘導融合・凝集を抑制することを示した。MD シミュレーションによると、ペプチドの Lys 残基の側鎖がアンカーのようにリン脂質二重膜表面に突っ込み、リン酸基の極性ヘッドグループと水素結合を形成していることが判明した。アンブレラサンプリング MD シミュレーションによるとペプチド - 膜表面の結合自由エネルギーは $\sim 15 \text{ kcal/mol}$ にも及び、両者は非常に強い結合をしていた。通常は乾燥によって二重膜の脂肪鎖層の秩序性は低下するが、LEA ペプチドがこのように強固に結合していると秩序性が保持され、再水和後に二重膜が再生することが明らかとなった。

LEA ペプチドは、乾燥状態においてリゾチームや乳酸脱水素酵素 (LDH) などの酵素活性を保持する役割をするが、そのメカニズムを解明するためリゾチーム - LEA ペプチド混

合系に対し MD シミュレーションを行った。その結果、主としてペプチドの酸性残基がタンパク質表面に存在する Arg 残基の側鎖に水素結合（あるいは salt-bridge）していることが判明した。また、このようにして LEA ペプチドが結合水に置き換わってターゲットタンパク質表面に結合することにより、乾燥状態においてもターゲットの立体構造が保持されることが、蛍光タンパク質を用いた実験（乾燥 再水和過程での蛍光強度の保持）から明らかとなった。

以上の結果は、LEA ペプチドがリボソームやタンパク質表面をシールドし、乾燥ストレスに対する構造破壊を未然に防ぐというメカニズム、いわゆる“分子シールド仮説”を実証したものである。それでは一度変性してしまったターゲットに対しては効果がないのであろうか。このことを検証するため、LEA ペプチドとリゾチームの混合系に熱ストレスをかける実験を行った。その結果、確かにリゾチームは変性温度 T_m で変性するが致命的な凝集には至らず、室温に戻すとリフォールディングすることが判明した。すなわち、LEA ペプチドは“分子シャペロン”の機能をもつのである。このメカニズムを調べるため、粗視化 MD シミュレーションを実行したところ、変性リゾチーム分子の周囲にペプチドが結合し、凝集を抑制していることが明らかとなった。

- 2) トレハロースも上の LEA ペプチドと同様に、ターゲットの表面に結合水の代わりに結合したり（水置換仮説） ガラス化することにより（ガラス化仮説） 乾燥保護機能を果たすと考えられているが、一度崩壊してしまったターゲットを回復させる機能（シャペロン機能）があるかどうかは不明であった。そこで、リン脂質二重膜を乾燥破壊した後、トレハロースを添加・再水和することにより二重膜が再生されるかどうかを高速 AFM 測定で調べた。その結果、再生することが判明し、他の二糖（マルトースやスクロース）では見られないトレハロース特有の機能であることが示された。

トレハロース脂質（トレハロースに脂肪鎖が結合した分子）とリン脂質を様々な割合で含むリボソームの性質を AFM 測定と全原子および粗視化 MD シミュレーションにより調べた。その結果、トレハロース脂質の割合が増加するにつれて、弾性率の上昇、水和数の増加、側方拡散の減少および脂肪鎖の秩序性の低下することが判明した。また、トレハロース脂質を 70% 含む膜では、がん細胞モデル膜との間に融合の前段階と思われる構造変化（膜の湾曲）が起こることが判明した。これはトレハロース脂質の抗がん作用に関する先行研究を支持する結果であった。

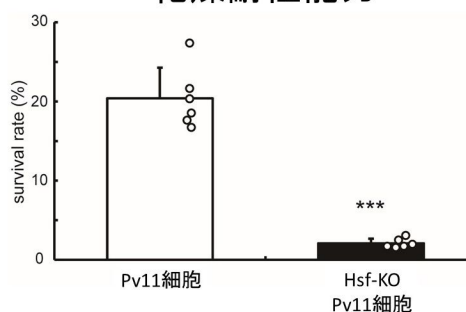
- 3) LEA ペプチドを細胞内に一過発現させた系および外部添加した場合のいずれにおいても、乾燥 再水和後の蘇生率はほぼゼロに等しかった（細胞は全て死に至る結果となった）。しかしながら、外部添加の系では、細胞形は乾燥前と同じ紡錘型のまま保持されていた。したがって、乾燥に伴う細胞膜の凝集融合を防いで細胞外形を保持することと、細胞を生き残った状態のまま保つことは同義ではないことが明らかになった。
- 4) ネムリユスリカ細胞のゲノム編集

まず、過剰発現系の構築を目指した。Pv11 細胞では、市販の恒常活性プロモーターは機能しなかったため、プロモーターを構築する必要があった。そこで、ネムリユスリカで常に高発現している遺伝子 Pv.00443 に着目した。この遺伝子上流領域には、恒常活性プロモーターが存在すると考え、約 1.8kb のゲノム領域を抽出した。この配列の 3' 側に AcGFP1 遺伝子を配置したプラスミドを構築し、Pv11 細胞に遺伝子導入したところ、強い蛍光が得られた。次に、1.8kb の配列と同等の転写活性を維持する、最短領域の同定を目的として、デリベーションアッセイを行った。その結果、1333bp の配列が決定された。この領域は、ネムリユスリカゲノムの 121 番目の scaffold に存在していたため、121 プロモーターと名付けた。

以上のように、Pv11 細胞における gain-of-function 実験系は構築できたが、Pv11 細胞の乾燥耐性メカニズムを解明するためには、loss-of-function 実験系の方が望ましい。そこで、CRISPR/Cas9 システムの構築を目指した。まず、121 プロモーターを用いることで、Cas9 タンパク質を高発現させることに成功した。さらに、GFP 安定発現 Pv11 細胞において、GFP に対する gRNA と同時に発現させることで、GFP 遺伝子のノックアウトに成功した。従って、Pv11 細胞において CRISPR/Cas9 システムの構築に成功した。

次に、内因性の遺伝子をノックアウトし、かつノックアウト細胞のみを選別する実験系を構築するため、CRIS-PITCH 法の適用を検討した。ネムリユスリカにおいては Hsf が乾燥耐性メカニズムに寄与することが知られていたため、Hsf 遺伝子上に 121 プロモーターを用いた GFP 発現ユニットを逆向きに挿入することで、ノックアウトを行った。その結果、GFP 陽性細胞のみを分取することで、Hsf ノックア

図 1 Hsf-KO細胞における乾燥耐性能力



ウト細胞を樹立でき、遺伝子の破壊、Hsf タンパク質の完全消失も確認できた。さらに、乾燥耐性能力の著しい減弱も確認できた(図1)。

以上より、CRIS-PITCh 法は Pv11 細胞に適応可能で、この方法を用いることで、内因性遺伝子のノックアウト細胞を樹立できることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. 阪野美紗, 渡邊宙志, 古田忠臣, 櫻井実, G3LEA ペプチドの生体膜への結合過程における自由エネルギー及び構造変化の解析, 低温生物工学会誌, **61**, 105-109 (2015). 査読有
2. 山口鉄郎, 畑中理恵, 黄川田隆洋, 櫻井実, 細胞内タンパク質凝集アッセイ系を用いた G3LEA ペプチドのタンパク質凝集抑制機能に関する研究, 低温生物工学会誌, **61**, 111-115 (2015). 査読有
3. T. Furuki, T. Watanabe, T. Furuta, K. Takano, R. Shirakashi, and M. Sakurai, The Dry Preservation of Giant Vesicles Using a Group 3 LEA Protein Model Peptide and Its Molecular Mechanism, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **89**, 1493-1499 (2016). Doi: 10.1246/bcsj.20140136 査読有
4. T. Furuki, and M. Sakurai, Protective Effect of Group3 LEA Model Peptides on Enzymes during Desiccation, 低温生物工学会誌, **62**, 47-51 (2016). 査読有
5. 臼井慎, 古田忠臣, 櫻井実, Group3LEA ペプチドのもつタンパク質乾燥保護機能の分子メカニズムに関する計算化学的研究, 低温生物工学会誌, **62**, 2, 127-131 (2016). 査読有
6. 山口凌平, 古木隆生, 古田忠臣, 櫻井実, ネムリユスリカ由来グループ 3LEA タンパク質 PvLEA4 の非繰返し配列部位の物理化学的性質, 低温生物工学会誌, **62**, 2, 133-137 (2016). 査読有
7. 加藤早紀, 櫻井実, 森俊明, 欠陥を有する固定化脂質二重膜へのトレハロース添加に伴う修復効果, 低温生物工学会誌, **63**, 1, 57-60 (2017). 査読有
8. 西本達志, 古田忠臣, 櫻井実, レプリカ交換分子動力学を用いた LEA ペプチドの乾燥誘導構造変化, 低温生物工学会誌, **63**, 2, 119-123 (2017). 査読有
9. 古木隆生, 櫻井実, グループ 3LEA タンパク質を模倣した機能ペプチドによるタンパク質の熱変性抑制, 低温生物工学会誌, **63**, 2, 139-142 (2017). 査読有
10. 古木隆生, 櫻井実, ネムリユスリカ幼虫の乾燥耐性機構と乾燥保護物質 -トレハロースと LEA タンパク質の役割-, 冷凍 8月号, 10-15, (2017). 査読無
11. 古木隆生, 櫻井実, 乾燥ストレス応答 LEA タンパク質を模倣した合成ペプチドの分子科学的特徴と機能, 極限環境生物学会誌, **16**, 46-53 (2017). 査読有
12. S. Tokumoto, M. Banno, Y. Miyata, M. Sakurai, and T. Kikawada, The Physiological Functions of a Model Peptide of G3LEA in Living Cells., *Cryobiol. Cryotech.*, **64**, 2, 67-73 (2018). 査読有
13. T. Furuki, T. Niwa, H. Taguchi, R. Hatanaka, T. Kikawada, and M. Sakurai, A LEA model peptide protects the function of a red fluorescent protein in the dry state, *Biochem. Biophys. Reports*, **17**, 27-31 (2019). Doi: 10.1016/j.bbrep.2018.11.006 査読有
14. Y. Miyata, S. Tokumoto, Y. Sogame, R. Deviatiiarov, J. Okada, R. Cornette, O. Gusev, E. Shagimardanova, M. Sakurai, and T. Kikawada, Identification of a Novel Strong Promoter from the Anhydrobiotic Midge, *Polypedilum vanderplanki*, with Conserved Function in Various Insect Cell Lines, *Scie. Rep.*, in press (2019). 査読有
15. T. Nishimoto, Y. Takahashi, S. Miyama, T. Furuta, and M. Sakurai, Replica exchange molecular dynamics simulation study on the mechanism of desiccation-induced structuralization of an intrinsically disordered peptide as a model of LEA proteins, *Biophys. Physicobiol.*, in press (2019). 査読有

[学会発表](計 30 件)

1. T. Furuki, T. Shimizu, K. Yamakawa, R. Hatanaka, T. Takahashi, T. Kikawada, T. Okuda, H. Mihara, and M. Sakurai, Anti-aggregation effects on proteins during desiccation by model peptides of group-3 LEA proteins, *Pacificchem 2015*, December 15-20, Honolulu, 2015.
2. T. Furuki, and M. Sakurai, Antifusion effects on liposomes during desiccation by model peptides of group-3 LEA proteins, *Pacificchem 2015*, December 15-20, Honolulu, 2015.
3. T. Furuki, and M. Sakurai, Protective effects on enzymes during desiccation by model peptides of group-3 LEA proteins, *Pacificchem 2015*, December 15-20, Honolulu, 2015.
4. 阪野美紗, 渡邊宙士, 古田忠臣, 櫻井実, G3LEA ペプチドの生体膜への結合過程における自由エネルギー及び構造変化の解析, 第 60 回低温生物工学会年会, 八王子, 5/30-31, 2015.
5. 古木隆生, 櫻井実, グループ 3LEA タンパク質のモデルペプチドによる酵素の乾燥保護効果, 第 60 回低温生物工学会年会, 八王子, 5/30-31, 2015.

6. 山口鉄郎, 畑中理恵, 黄川田隆洋, 櫻井実, 細胞内アミロイド凝集アッセイ系を用いた G3LEA ペプチドのタンパク質凝集抑制機能に関する研究, 第 60 回低温生物工学会年会, 八王子, 5/30-31, 2015.
7. 阪野美紗, 渡邊宙志, 古田忠臣, 櫻井実, G3LEA モデルペプチドの生体膜結合自由エネルギー及び構造変化解析, 第 15 回日本蛋白質科学学会年会, 徳島, 6/24-26, 2015.
8. 古木隆生, 櫻井実, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, 9/13-15, 2015.
9. 臼井慎, 古木隆生, 古田忠臣, 櫻井実, MD シミュレーションを用いた G3LEA モデルペプチドとタンパク質の相互作用の解析, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, 9/13-15, 2015.
10. 山口凌平, 古木隆生, 古田忠臣, 櫻井実, ネムリユスリカ由来グループ 3LEA タンパク質 PvLEA4 の非繰返し配列部位の物理化学的性質, 第 16 回日本蛋白質科学学会年会, 福岡, 6/7-9, 2016.
11. 山口凌平, 古木隆生, 古 忠臣, 櫻井実, ネムリユスリカ由来グループ 3LEA タンパク質 PvLEA4 の非繰返し配列部位の物理化学的性質, 第 61 回低温生物工学会年会, 埼玉, 6/25-26, 2016.
12. 加藤早紀, 櫻井実, 森俊明, 欠陥を有する固定化脂質二分子膜へのトレハロース添加に伴う修復効果, 第 61 回低温生物工学会年会, 埼玉, 6/25-26, 2016.
13. 臼井慎, 古田忠臣, 櫻井実, Group3LEA ペプチドのもつタンパク質乾燥保護機能の分子メカニズムに関する計算化学的研究, 第 61 回低温生物工学会年会, 埼玉, 6/25-26, 2016.
14. 櫻井実, トレハロースや LEA タンパク質により誘導される生体の乾燥耐性メカニズムに関する実験的・理論的研究, 第 61 回低温生物工学会年会, 埼玉, 6/25-26, 2016.
15. 櫻井実, トレハロースや LEA タンパク質により誘導されるアンヒドロピオシス状態の物理化学, Cryopreservation Conference 2016, 岡崎, 11/10-11, 2016.
16. 宮田佑吾, 十亀陽一郎, 徳本翔子, 櫻井実, 黄川田隆洋, CRISPR/Cas9 システムを用いたネムリユスリカ培養細胞のゲノム編集, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 11/30-12/2, 2016.
17. 西本達志, 古田忠臣, 櫻井実, レプリカ交換分子動力学法を用いた LEA ペプチドの乾燥誘導構造変化の解析, 第 62 回低温生物工学会年会, 札幌, 5/21-22, 2017.
18. 古木隆生, 櫻井実, グループ 3 LEA タンパク質を模倣した機能ペプチドによるタンパクの変性抑制, 第 62 回低温生物工学会年会, 札幌, 5/21-22, 2017.
19. 阪野美紗, 櫻井実, 黄川田隆洋, LEA ペプチドのネムリユスリカ培養細胞 Pv11 に対する生理学的機能, 第 62 回低温生物工学会年会, 札幌, 5/21-22, 2017.
20. 櫻井実, 生体材料の乾燥保護剤として利用可能な LEA ペプチドの構造と機能, 第 17 回日本蛋白質科学学会年会, 仙台, 6/20-22, 2017.
21. 高橋佑太, 古田忠臣, 櫻井実, 乾燥過程における G3LEA モデルペプチドの生体膜保護に関する計算化学的研究, 第 17 回日本蛋白質科学学会年会, 仙台, 6/20-22, 2017.
22. 宮田佑吾, 徳本翔子, 櫻井実, 黄川田隆洋, CRISPR/Cas9 システムを用いたネムリユスリカ培養細胞のゲノム編集, 日本ゲノム編集学会 第 2 回大会, 豊中, 6/28-30, 2017.
23. 古木隆生, 櫻井実, LEA モデルペプチド及びトレハロースによるリゾチームの熱変性防止, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本, 9/19-21, 2017.
24. 高橋佑太, 古田忠臣, 櫻井実, 乾燥過程における G3LEA モデルペプチドの生体膜保護に関する計算化学的研究, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本, 9/19-21, 2017.
25. 加々宮崇, 古田忠臣, 櫻井実, 選択的抗がん作用をもつトレハロース脂質含有リポソームの物性の計算化学的解析, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本, 9/19-21, 2017.
26. 宮田佑吾, 徳本翔子, 櫻井実, 黄川田隆洋, CRISPR/Cas9 システムを用いたネムリユスリカ培養細胞のゲノム編集とその応用, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 12/6-9, 2017.
27. 山口凌平, 古木隆生, 櫻井実, ネムリユスリカ由来 Group 3 LEA タンパク質の非繰返し配列モデルペプチドの物理化学的性質, 第 63 回低温生物工学会年会, 埼玉, 6/9-10, 2018.
28. 宮田佑吾, 徳本翔子, 櫻井実, 黄川田隆洋, CRISPR/Cas9 システムを用いたネムリユスリカ培養細胞のゲノム編集とその応用, 第 63 回低温生物工学会年会, 埼玉, 6/9-10, 2018.
29. 林俊洋, 古田忠臣, 櫻井実, QM/MM metadynamics シミュレーションによる trehalose-6-phosphate phosphatase の触媒機構に関する研究, 第 56 回日本生物物理学会年会, 岡山, 9/15-17, 2018.
30. 宮田佑吾, 徳本翔子, 櫻井実, 黄川田隆洋, ネムリユスリカにおける新規プロモーターの同定とその応用, 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 11/28-30, 2018.

[図書](計 2件)

1. 古木隆生, 櫻井実, タンパク質, リポソームの乾燥保存に利用可能な新規ペプチドとその作用機構, 「ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術」, 第 5 章, 第 5 節, 技術情報協会, (2017) 557.
2. T. Furuki, and M. Sakurai, Physicochemical Aspects of the Biological Functions of Trehalose and Group 3 LEA Proteins as Desiccation Protectants in “Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation” ed. by M. Iwaya-Inoue, M. Sakurai, and M. Uemura,

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：黄川田 隆洋

ローマ字氏名：Takahiro Kikawada

研究協力者氏名：白樫 了

ローマ字氏名：Ryo Shirakashi

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、研究者個人に帰属されます。