

令和元年5月24日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04685

研究課題名(和文)独自のノックダウンマウス作製法の応用と新たな実験系の提案

研究課題名(英文) The proposal of novel experimental system using original knockdown methods in mice

研究代表者

大塚 正人(OHTSUKA, Masato)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90372945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ターゲットトランスジェネシス法を利用した独自の遺伝子ノックダウン技術を主軸として、その実用性と汎用性の向上を目指した。具体的には、1) 組織特異的にmiRNA発現をオンオフにすることによるコンディショナル遺伝子発現リカバリー法の開発、2) 天然miRNAのコンディショナル発現マウスの作製と解析、3) 内在性遺伝子イントロンへのmiRNA挿入が、遺伝子治療に応用できるかの検討、を進めた。独自の系を用いて上述した研究に有用な全てのマウスリソースの開発に成功し、現在その解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は独自の遺伝子ノックダウン(機能の抑制)法、独自の遺伝子改変マウス作製法を応用した新たな実験系を提案するものであり、今回、その解析に有用なマウスモデルの開発に成功した。これにより、マウスの体内でより洗練された遺伝子発現のコントロールを行うことが可能となると期待される。それは、これまでに知られていなかった個体レベルでの遺伝子の機能を見出すことにも繋がるものであり、さらに最近話題となっているゲノム編集技術を応用し、将来的な新規遺伝子治療技術開発にも結びつくものと言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish novel strategies useful for in vivo analyses of gene function and for future gene therapies. We utilized original knockdown methods to create mouse models for 1) conditional gene recovery system, 2) conditional in vivo expression of endogenous miRNA, and 3) conditional gene knockdown by insertion of artificial miRNA into intronic region of an endogenous gene (for future gene therapy purpose). We successfully created all the mouse models required for these studies using i-PITT and Easi-CRISPR technologies. The detailed phenotypic analyses with these mice are currently in progress.

研究分野：マウス遺伝子工学

キーワード：ノックダウン miRNA 遺伝子治療 トランスジェニック マウスモデル

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

1. 研究開始当初の背景

遺伝子機能欠損(抑制)型モデルマウスは、遺伝子機能解析や疾患モデルとして有用なツールである。これらの多くは、ES細胞を介したノックアウト(KO)法により作製されてきた。しかし、KO法は手間がかかることもあり、2000年代には、より手軽な手法であるRNA干渉を利用したノックダウン法も注目されるようになった。ノックダウン法は、KO法とは異なり遺伝子発現量を0にすることは困難であるが、ES細胞を経ずに受精卵への核酸注入でもノックダウン個体が作製できること、ヘミ接合体で解析可能であること等から、労力、時間、コストの面で利点を有する簡便な解析法と言える。しかし、受精卵への顕微注入による従来のトランスジェニック(Tg)マウス作製法では、注入DNA(shRNAやmiRNA発現カセット)の挿入位置やコピー数を制御できないため、再現性良いノックダウン効率を示すマウス個体を得ることは困難であった。そのような中、我々は以下の2種類のノックダウンマウス作製法の開発に成功していた。

一つ目は、Cre-*loxP*部位特異的組換え系を介して特定のゲノム領域(*Rosa26*座位)に1コピーの目的遺伝子を挿入するPronuclear injection-based Targeted Transgenesis (PITT)法を用いた方法である(Ohtsukaら, *Nucleic Acids Res* 2010)。これにより、毒性を示さないレベルで最大限の発現量を示すmiRNA発現Tgマウスを再現性良く作製可能であることも示した(Miuraら, *PLoS ONE* 2015)。その後PITT法は改良され、improved PITT (*i*-PITT法)として効率化が図られた(Ohtsukaら, *BMC Genomics* 2015)。

二つ目は、CRISPR/Cas9ゲノム編集法を利用した手法である(Miuraら, *Sci Rep* 2015)。「内在性遺伝子のイントロン領域にmiRNAを挿入する」という新概念を提唱し、内在性遺伝子プロモーターでmiRNAを発現させる新規遺伝子ノックダウン法の開発に成功した。高効率なmiRNA挿入は、独自に開発した高効率ノックイン法(*Easi*-CRISPR法)を用いた。

2. 研究の目的

本研究では、ターゲットトランスジェネシス法を利用した独自の遺伝子ノックダウン技術を主軸として、その実用性と汎用性の向上を目指した。具体的には、1) 組織特異的にmiRNA発現をオン/オフにすることによるコンディショナル遺伝子発現リカバリー法の確立、2) 天然miRNAのコンディショナル発現マウスを作製し、単独のmiRNAが細胞運命決定を担いという仮説の検証に応用、3) 肝細胞ゲノムの内在性遺伝子イントロンへのmiRNA挿入が、遺伝子治療に応用できるかの検討、を進める。これらにより、独自のノックダウンシステムの生命現象の解析や治療への応用等への具体的な活用例を示すとともに、新たな実験系・モデル解析系を提案を目指す。具体的な目的を以下に示す。

1) **遺伝子発現リカバリー法の開発と免疫機能解析への応用**：特定の細胞でのCre発現後にmiRNAをオフにすることによる(目的遺伝子の発現を回復させる：コンディショナルリカバリー)システムを*i*-PITT法を用いて開発し、サイトカインのノックダウンに応用する。将来的に特定の表現型に重要なサイトカインの主要産生細胞の同定に利用する。

2) **天然miRNA発現マウス作製と機能解析**：血液系が分化する際に発現するmiRNAであるmiR195に注目し、これらのコンディショナル発現Tgマウスを*i*-PITT法で作製する。組織特異的Creマウスと交配することにより、これらのmiRNAが特定の細胞の運命決定に寄与することを明らかにする。また、これにより独自のノックダウン法が天然のmiRNAの過剰発現系にも有効活用できることを実証する。

3) **内在性遺伝子イントロンへのmiRNA挿入による遺伝子治療**：肝細胞ゲノム(内在性遺伝子イントロン)に標的遺伝子に対するmiRNA配列を挿入することで、成体肝での遺伝子ノックダウンの系を確立し、遺伝子治療への応用の可能性を検討する。インスリン抵抗性に関与する*Sepp1*と*Lect2*を標的遺伝子とし、本手法による耐糖能の回復を検証する。

3. 研究の方法

a) コンディショナルノックダウンマウス作製系の確立

遺伝子発現リカバリー法の開発および天然miRNA発現マウス作製には、コンディショナルにmiRNA発現を調節するシステムの確立を行う必要がある。*i*-PITT法を用いてコンディショナルに遺伝子発現を行うシステムはまだ開発していなかったため、本研究ではコンディショナル遺伝子発現を可能とするシステムとツールを開発し、それをmiRNA発現調節系に応用する。

b) 遺伝子発現リカバリー法の開発

IFN- 遺伝子に対するmiRNAを設計し、より強いノックダウン効果を示すmiRNAを選別後に、aで確立したコンディショナル発現系を利用して*IFN-* 遺伝子ノックダウンマウス作製を行う。マウス作製後にCre発現マウスと交配し、ノックダウンのリカバリーの検証を行う。

c) 天然miRNA発現マウス作製

aで確立したコンディショナル発現系を利用してmiR195コンディショナル発現マウスを作製する。作製された際には、Creマウスと交配して解析を進める。

d) 内在性遺伝子イントロンへのmiRNA挿入による組織特異的ノックダウン系の検証

*Sepp1*と*Lect2*を標的遺伝子としたmiRNAを設計し、より強いノックダウン効果を示すmiRNAを選別する。*Easi*-CRISPR法を用い、*Albumin1*遺伝子イントロンにこれらの遺伝子に対する人工miRNA配列を挿入する。肝臓でこれらの遺伝子がノックダウンされているか否かをqPCRで確認する。その後、作製したマウスを用い、インスリン抵抗性への影響を検討する。

e) ゲノム編集による遺伝子治療を目指した、*in vivo*ゲノム編集評価系マウス作製と検証

肝細胞ゲノムに*in vivo*でゲノム編集を行うための予備検討を行う。eGFP遺伝子破壊マウス(eGFP TgマウスのeGFP遺伝子領域に変異があるためeGFP蛍光を発しないもの)を確立し、本マウスへのCRISPR/Cas9関連試薬の導入実験を行い、蛍光を指標にゲノム編集効率が評価できるか否かの条件を検討する。

4. 研究成果

a) コンディショナルノックダウンマウス作製系の確立

我々はこれまでに、Cre-loxP系でコンディショナル遺伝子発現を行うfloxカセットを*Rosa26*座位に挿入可能な*i*-PITTシステムを開発してきたものの(Ohtsuka et al. BMC Genomics 2015)、実際にfloxカセットの挿入に応用した経験はなかった。そこで、PhiC31系とFLP-FRT系でのPITT法による遺伝子挿入系の確立を目指した。

PhiC31系単独の使用での挿入も可能であるがその効率は低いものであったため、FLP-FRT系との併用により挿入効率の改善を試みた。PhiC31oインテグラーゼmRNAの最適濃度を7.5ng/μlに固定し、混合するFLPo mRNAの最適濃度の検討を進めた。その結果、FLPo mRNAは8.4~16.9ng/μlの濃度で期待通りに動くこと、および、PhiC31系と併用することでPhiC31系単独で用いるよりも挿入効率が改善することを見出した。今後は、FLPo mRNAは11.3ng/μlで用いることに決定した。

また、コンディショナルな遺伝子発現を可能とするためのドナーベクターのデザインと構築を進めた。*i*-PITTシステム用のTOKMO-3マウスに使用するには、変異loxP配列、attB配列、変異FRT配列を有している必要がある。さらに、2つのloxPサイトの間にstopper配列(3x polyA)を設けて、loxP間の配列が削除された後に下流の目的遺伝子が発現する構造でなくてはならない。そのようなドナーベクターを人工合成遺伝子にて一部合成後、大腸菌でのクローニングを利用して、目的遺伝子をコンディショナルに発現させるためのベクターを作製した。

b) 遺伝子発現リカバリー法の開発

IFN- 遺伝子を標的遺伝子としたノックダウンを行うために、まずmiRNAを3種類設計した。miRNAオリゴを独自のmiRNAクローニングベクター(Miura et al, Anal Biochem 2011)に挿入し、また同時に、eGFP発現カセットの3'UTR領域にmiRNAの標的配列を挿入したeGFP-標的配列ベクターを構築した。293細胞にこれらを同時にトランスフェクションし、2日後にFACSにてeGFP発現強度を解析することで、最もノックダウン効果の高いmiRNA配列候補を選別した。

次に、選別されたmiRNA配列をコンディショナル発現Tgマウス用ベクターにクローニングし、*i*-PITT法にてTgマウス作製を進めた。具体的には、作製したベクター(pP207)を、以下c)で述べるコンディショナルmiR195発現Tgマウス用ベクター(pBIL)、PhiC31 mRNA、FLPo mRNAとともにTOKMO-3マウスから得た受精卵(計280個)に注入した。注入卵はKSOM培地中で1晩培養後、2細胞期胚に発生したもの(216個)について偽妊娠マウス卵管に移植した。仔が離乳した後に、耳片を採取してgenotypingを行った。

その結果、4個体において*IFN-* miRNAがmiR195を含むコンストラクトが挿入されており、その中で#696と#704の2個体が*IFN-* miRNAが挿入されていた。#696と#704ともにFLPoによる組換えが完全ではなく、ベクター配列が残存していることが分かった。

しかしながらこれらのファウンダーマウスから次世代が得られなかったため、再度Tgマウス作製を進めた。具体的には、作製したベクター(pP207)を、PhiC31 mRNA、FLPo mRNAとともにTOKMO-3マウスから得た受精卵(計201個)の前核と細胞質に注入した。1晩培養後、2細胞期胚に発生したもの(171個)について偽妊娠マウス卵管に移植した。妊娠個体が出産し35匹の仔が離乳した後に、耳片を採取してDNAを粗抽出しgenotypingを行った。その結果、5個体において*IFN-* miRNAを含むコンストラクトが挿入されていた。うち、#107と#121はFLPoによる組換えによって余分配列が除去されていたアリルをモザイクとして有するが、他(#120, #124と#130)は少なくとも3'側の余分配列は除去されておらず、ベクター配列が残っていた

ことが分かったため、FLPo mRNA の再注入によりこの余分配列の除去を進めた。その結果、余分配列の除去に成功した。今後、本マウスを用いて解析を進める予定である。

c) 天然 miRNA 発現マウス作製

まず、miR195 配列をコンディショナル発現 Tg マウス用ベクターに挿入した。得られたベクター (pBIL) を上記 b) で述べた手順で顕微注入した。既に 4 個体において *IFN-* miRNA が miR195 を含むコンストラクトが挿入されていることは記載したが、その中で #691、#704、#707 が miR195 発現カセットを有していた。#691 と #707 は miR195 発現カセットのみが挿入されていた。#691 は FLPo による組換えが完全ではなくベクター配列も残っていたが、#707 についてはベクター配列が残っているアリルと除去されているアリルの両方を含んでいた。#707 からは既に次世代に導入遺伝子が伝搬されたことを確認しているが、ベクター配列が残されたアリルを受け継いだ個体と除去されているアリルを受け継いだ個体の両方を得ることができた。ベクター配列が完全に除去された Tg マウス (BIL⁻ ex マウス) の系統化を行い、現在解析に使用している。

d) 内在性遺伝子イントロンへの miRNA 挿入による組織特異的ノックダウン系の検証

まず *Sepp1* と *Lect2* 遺伝子に対する miRNA を 3 種類設計し、その配列を独自の miRNA クローニングベクター (Miura et al, Anal Biochem 2011) に挿入した。また同時に、eGFP 発現カセットの 3' UTR 領域に miRNA の標的配列を挿入した eGFP-標的配列ベクターを構築した。これらのベクターを 293 細胞にトランスフェクションし、2 日後に FACS にて eGFP 発現強度を解析した。これにより、最もノックダウン効果の高い人工 miRNA 配列候補を選別した。

次に、これらの人工 miRNA 配列を肝臓特異的に発現させるために、*Albumin1* 遺伝子のイントロンに挿入することとした。第 7 イントロンに gRNA 標的配列を設計し、CRISPR による切断箇所の両側に 69 塩基と 73 塩基の相同領域を設けることとした。最もノックダウン効果の高いと期待される人工 miRNA 配列について、*ivTERT* 法で cDNA を合成した。

調製した ssDNA を、Cas9 タンパク質、crRNA/tracrRNA と混合し、C57BL/6J マウスから得た受精卵に顕微注入した。その結果、*Sepp1* と *Lect2* についてそれぞれ 2、26 個体の仔が得られ、離乳時に遺伝子タイピングを行ったところ、*Sepp1* と *Lect2* についてそれぞれ 1 個体、4 個体の目的の組換え体を得ることができた。次に、これらのマウスから次世代を取り、系統化してホモマウスを得ることができた。また、*Sepp1* と *Lect2* の遺伝子が期待通りに肝臓でノックダウンされているかに関して qPCR で確認することができた。今後はこれらのマウスについて、グルコース負荷時に耐糖能を有するか等の評価を行っていく予定である。

e) ゲノム編集による遺伝子治療を目指した、*in vivo* ゲノム編集評価系マウス作製と検証

ゲノム編集効率を *in vivo* で簡便に評価できるモデル系は国内外ともに未だ開発されていなかった。そこで本研究では、ゲノム編集効率を蛍光で容易に確認可能なモデルマウスの開発を目指した。既に eGFP Tg マウスの eGFP 遺伝子の一部を破壊した eGFP Tg マウスは作製済みであった。その中から、1 塩基を欠損した系統 (eGFP Tg #197) を系統化して維持した。

CRISPR/Cas9 系による遺伝子修復が上手く動くのかを確認する為、#197 から採取した受精卵に、CRISPR/Cas9 関連核酸 (Cas9 mRNA、新たに設計した sgRNA、eGFP 遺伝子修復用 1 本鎖 DNA) 溶液の顕微注入を行った。その結果、実際に緑蛍光を示す胚が確認でき、また、これらの胚から回収した DNA のシーケンス解析からは、実際に変異 eGFP 遺伝子が修復されていることが明らかとなった。これにより、これらの eGFP Tg マウス系統が期待通りに動くことを確認することができ、遺伝子治療法の評価系に使用できる可能性が示唆された。

また、卵管へ CRISPR/Cas9 関連溶液を導入することより、実際に体細胞で eGFP 遺伝子が修復されるのかについて eGFP 蛍光を指標に評価した。メスマウスの卵管上皮細胞を標的とした eGFP 遺伝子変異の修復を目指した実験を進めた。その結果、期待通りに卵管での蛍光が確認された。さらに、肝臓においても同様の結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 9 件)

(1) Sakurai T., Kamiyoshi A., Ohtsuka M., Gurumurthy CB., Sato M. and Shindo T. Isolation and Analysis of a Genome-Edited Single-Hepatocyte from a Cas9 Transgenic Mouse Line. *Methods Mol Biol.* 1874: 257-271 (2019)、査読有

(2) Nakamura S., Ishihara M., Watanabe S., Ando N., Ohtsuka M. and Sato M. Intravenous Delivery of piggyBac Transposons as a Useful Tool for Liver-Specific Gene-Switching. *Int J Mol Sci.* 19: E3452 (2018)、査読有

(3) Miura H.[†], Quadros RM.[†], Gurumurthy CB.* and Ohtsuka M.* *Easi*-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. Nat Protoc., 13: 195-215 (2018) [†]equal contribution, *correspondence、査読有

(4) Takizawa N.* , Okubo N.* , Kamo M. , Chosa N. , Mikami T. , Suzuki K. , Yokota S. , Ibi M. , Ohtsuka M. , Taira M. , Yaegashi T. , Ishisaki A. and Kyakumoto S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. Experimental Cell Research, 358: 411-420 (2017) *co-first authors、査読有

(5) Kotaki R, Koyama-Nasu R, Yamakawa N, Kotani A. miRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis. Int J Mol Sci. 11;18.(2017)、査読有

(6) Jacobi AM., Rettig GR., Turk R., Collingwood MA., Zeiner SA., Quadros RM., Harms DW., Bonthuis PJ., Gregg C., Ohtsuka M., Gurumurthy CB. and Behlke MA. Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. Methods. 121-122: 16-28 (2017)、査読有

(7) Quadros RM.[†], Miura H.[†], Harms DW., Akatsuka H., Sato T., Aida T., Redder R., Richardson GP., Inagaki Y., Sakai D., Buckley SM., Seshacharyulu P., Batra SK., Behlke MA., Zeiner SA., Jacobi AM., Izu Y., Thoreson WB., Urness LD., Mansour SL.* , Ohtsuka M.* and Gurumurthy CB.* *Easi*-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. Genome Biol. 18: 92 (2017) [†]equal contribution, *correspondence、査読有

(8) Ishida T, Suzuki S, Lai CY, Yamazaki S, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Pre-Transplantation Blockade of TNF- α -Mediated Oxygen Species Accumulation Protects Hematopoietic Stem Cells. Stem Cells. 35(4):989-1002. (2017)、査読有

(9) Schilit S.L.P.* , Ohtsuka M.* , Quadros R. and Gurumurthy C.B. Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (PITT). Curr. Protoc. Hum. Genet. 91: 15.10.1-15.10.28 (2016) *equal contribution、査読有

[学会発表](計 12件)

(1) 中村 伸吾、渡部 聡、石原 雅之、安藤 尚子、大塚 正人、佐藤 正宏 piggyBac系ベクターのハイドロダイナミクス遺伝子導入法はマウス肝臓での導入遺伝子の持続発現と肝細胞での gene switching を可能とする 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月

(2) 三浦 浩美、佐藤 正宏、水谷 晃子、大塚 正人 ゲノム編集効率評価系モデルマウスの開発と評価 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月

(3) H Miura, CB Gurumurthy, M Ohtsuka. Development of a reporter mouse model suitable for evaluation of *in vivo* genome editing efficiency. 2018 Cold Spring Harbor meeting: Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution, New York, USA

(4) 三浦 浩美、稲垣 豊、佐藤 正宏、大塚 正人 *In vivo*ゲノム編集効率評価系モデルマウスの開発 第40回日本分子生物学会年会 2017年12月

(5) 大塚 正人 新規遺伝子改変マウス作製方法：PITT, *Easi*-CRISPR, GONAD. 第3回川島カンファレンス 2017年11月

(6) Hiromi Miura, Yutaka Inagaki, Channabasavaiah B Gurumurthy, Masahiro Sato, Masato Ohtsuka Development of a mouse model suitable for *in vivo* genome editing efficiency studies 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017) Utah, USA, October 2017

(7) Rolan M Quadros, Hiromi Miura, Masato Ohtsuka, Donald W Harms, Channabasavaiah B Gurumurthy CRISPR solution for creating Cre-LoxP genetics resources. Genome Engineering: The CRISPR-Cas Revolution(CSHL Meetings & Courses Program)July, 2017、Cold Spring Harbor Laboratory

(8) 三浦 浩美、Gurumurthy Channabasavaiah、相田 知海、稲垣 豊、佐藤 正宏、佐藤 健人、大塚 正人 *Easi*-CRISPR：高効率なノックインマウス作製法 第39回日本分子生物学会年会 (BMB2016)、2016年11月

(9) Ohtsuka M. Generation of knockdown mice using PITT and *Easi*-CRISPR. MicroRNAs/Noncoding & Genome Engineering/Editing and Europe -2016, Cambridge, UK, November, 2016

(10) 三浦 浩美、Channabasavaiah Gurumurthy、稲垣 豊、大塚 正人 長い一本鎖DNAを用いたノックインマウス作製 平成28年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】」若手支援技術講習会、平成28年9月

(11) 大塚正人, 相田知海, 三浦浩美, Channabasavaiah Gurumurthy Easi-CRISPR: 長鎖一本鎖DNAを用いた高効率ノックイン法 日本ゲノム編集学会第1回大会、2016年9月

(12) 上滝隆太郎, 幸谷愛 miR-195 は転写因子 EBF1 の欠損による B 細胞分化能の欠失を補完できる 第8回日本 RNAi 研究会 2016/8~9

[図書](計 2件)

(1) 大塚正人、三浦浩美: PITT 法によるターゲットトランスジェニックマウス作製・動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法 技術情報協会 (2017)

(2) 上滝 隆太郎, 幸谷 愛: 単一 miRNA が TGF 経路を介して, B 細胞系列決定において転写因子欠損を補完する 臨床血液 58 巻 7 号 p. 792-797 (2017)

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: Dna editing using single-stranded dna

発明者: Channabasavaiah B. GURUMURTHY, Hiromi Miura, Masato Ohtsuka

権利者: Board Of Regents Of The University Of Nebraska, Tokai University

種類: 特許

番号: PCT/US2016/035660

出願年: 2016年

国内外の別: 国外

取得状況(計 0件)

[その他] ホームページ: <https://masato2.wixsite.com/ohtsuka-lab>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中村 伸吾

ローマ字氏名: NAKAMURA, Shingo

所属研究機関名: 防衛医科大学校

部局名: 防衛医学研究センター 医療工学研究部門

職名: 講師

研究者番号(8桁): 00505323

研究分担者氏名: 幸谷 愛

ローマ字氏名: KOTANI, Ai

所属研究機関名: 東海大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00517477

研究分担者氏名: 角田 茂

ローマ字氏名: KAKUTA, Shigeru

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 大学院農学生命科学研究科(農学部)

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 80345032

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 三浦 浩美

ローマ字氏名: MIURA, Hiromi