

令和元年6月14日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07183

研究課題名(和文) 無酸素環境で炭化水素分解を担うコア生物群の獲得と多様性解析

研究課題名(英文) Elucidation and diversity analysis of core microbiome involving in hydrocarbon degradation in anoxic environments

研究代表者

中村 浩平 (NAKAMURA, KOHEI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40456538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：地下に残存する原油の回収や原油等で汚染された環境の修復には、嫌気性炭化水素分解原核生物群に関する知見は不可欠である。本研究は、新規のメタン生成を伴う脂肪族炭化水素(アルカン)分解細菌の取得と無酸素環境下における炭化水素分解原核生物群の多様性の解明を目的とし、軽油を基質とするメタン発酵培養系を構築し、その構成成分となる微生物群を明らかとした。更に、複数の脂肪族炭化水素分解メタン発酵培養系のメタゲノム解析から、脂肪族炭化水素分解メタン発酵に関わるコア生物群の特定を試みた。更に、石油系芳香族炭化水素であるトルエンを分解する新規異化的硫酸塩還元細菌を分離し、そのゲノム配列を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタン発酵を伴う炭化水素分解反応を担う微生物群の多様性を明らかにした。既報と同様の嫌気的アルカン分解菌群に加え、その分解菌が持つアルカン分解酵素の多様性も明らかにした。今回明らかとなった嫌気的アルカン分解菌およびその分解酵素の遺伝子を知ることにより、土壌・地下水などの原油汚染や原油増進回収の際に、現地での嫌気的アルカン分解菌(その分解酵素)の存在を解析することが可能になり、汚染浄化施工や増進回収導入の事前診断につながる。また、新規に分離したトルエン分解硫酸塩還元細菌の嫌気的トルエン分解酵素遺伝子も、石油系芳香族炭化水素汚染土壌などのバイオレメディエーションに利用可能である。

研究成果の概要(英文)：Knowledge on anaerobic microbial communities degrading hydrocarbon is of great importance to recover crude oil remaining in oil fields and remediate crude oil contaminated subsurface environments. The purposes of this study were to identify and obtain aliphatic hydrocarbon degrading anaerobes under methanogenic condition and to understand microbial diversity in anaerobic hydrocarbon degrading microbial communities. Metagenomic analysis using enrichment cultures amended with diesel oil or n-alkane mixture indicated the presence of core microbiome involved in the n-alkane degradation under methanogenic condition. In addition, toluene-degrading dissimilatory sulfate reducing bacteria was isolated and its genome was sequenced.

研究分野：微生物生態学

キーワード：石油増進回収 炭化水素分解 メタン発酵 メタゲノム

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

1. 研究開始当初の背景

原油は主に油田地下の油層圧力により自噴させて回収するが、様々な既存技術を用いても原油の半分以上が油層に残り残される。原油資源には限りがあるうえ、新たな油田開発にも様々な問題がある。2010年のメキシコ湾沖で起きた原油流出事故は、新たな油田が沖合、海底に残されている現状を反映し、開発に伴うリスクの大きさを示している。そのため、油田埋蔵原油の新たな回収技術の開発が必要とされており、『メタン発酵による原油分解 原油の粘度低下 & 産生メタンで油層圧力上昇 埋蔵原油と天然ガス(メタン)の回収』が可能となる。

メタン発酵による原油回収技術のカギは脂肪族炭化水素(アルカン)を分解する発酵菌とメタン菌 原油主成分である脂肪族炭化水素(アルカン)のメタン発酵の報告以降(Zengler et al, Nature, 1999), メタン発酵による原油(とメタン)回収技術の可能性が議論されてきた。原油のメタン発酵は、原油を分解して水素と酢酸を生成する発酵菌群と、それらを利用してメタン生成するメタン菌によって起こると考えられている(Gray et al, Adv Appl Microbiol, 2010)。しかし、油田で起きる原油メタン発酵は非常に遅く(Jones et al, Nature, 2008), それは分解で生じる発酵産物が、極めて低濃度で原油分解を阻害するためである(Dolfing et al, ISME J, 2008)。よって、原油メタン発酵の成否は、原油主成分のアルカンを分解する発酵菌(アルカン分解菌)や発酵産物(水素や酢酸)を速やかに利用(除去)できるメタン菌のようなコア生物にあると考えられるが、申請者が知る限り、メタン発酵を伴うアルカン分解菌は原油貯留層(またはその関連施設や環境)から分離されていない。

我々は、これまでに天然ガス田や油田などの地下圏メタン発酵環境の微生物生態学的研究を行ってきた(Mochimaru, Nakamura et al, Extremophile, 2007)。その中で天然ガス田から特異なメタン菌 RMAS 株を分離し、*Methanothermobacter tenebrarum* RMAS 株として提唱した(Nakamura et al, Int J Syst Evol Microbiol, 2013)。RMAS 株は世界各地の油田などから検出され、申請者の先行研究から原油メタン発酵の鍵となる低濃度水素利用メタン菌である可能性が示されている。一方でメタン発酵を伴うアルカン分解菌の取得を目的として探索を行い、新潟県内油田跡試料からアルカン分解メタン発酵系の構築に成功し、このメタン発酵系には極めて新規性の高いアルカン分解菌が Bacteria の優占種として存在することを明らかにした。

無酸素環境でアルカンを分解する分離株には、硝酸塩を使う *Aromatoleum* 属 HxN1 株と、硫酸塩を使う *Desulfatibacillum* 属 AK-01 株等が知られている。いくつかの嫌気性アルカン分解菌が分離されているが、AK-01 株のみがメタン菌との共存下でメタン発酵を伴ってアルカンを分解する唯一の分離株である(Callaghan et al, Environ Microbiol, 2012)。原油生産関連環境やそこから構築されたアルカン分解メタン発酵系からは *Smithella* 属細菌、*Peptococcaceae* 科細菌が頻りに検出されるが、いずれも未分離である(Gieg et al, Curr Opin Biotechnol, 2014)。申請者のアルカン分解メタン発酵系にはこの両者が存在するが、*Peptococcaceae* 科細菌の存在が特異である。その特異性とは、この *Peptococcaceae* 科細菌において 系統分類学的に極めて新規性が高い、Bacteria の 50%以上を占める優占種であった、メタゲノム解析からアルカン分解菌である可能性が示唆(HxN1 株や AK-01 株が有する嫌気アルカン分解の鍵酵素 alkylsuccinate synthase (ASS) 様遺伝子を有した)された、ことである。この *Peptococcaceae* 科細菌や *Smithella* 属細菌を分離すれば、世界で 2 株目のメタン発酵を伴うアルカン分解菌(原油生産関連環境からは世界初)となる。

2. 研究の目的

原油のメタン発酵による増進回収の成否は、メタン発酵を伴うアルカン分解菌の存在が鍵である。しかしながら、メタン菌共存下でメタン発酵を伴うアルカン分解菌は 1 株のみであり、その微生物学(生態学, 生化学, ゲノム学)は未解明である。また、無酸素環境におけるアルカンを含めた炭化水素分解菌の多様性に関する研究は十分ではない。そこで本研究では、
(1) アルカン分解メタン発酵系からアルカン分解菌を分離しその微生物学を解明する
(2) 無酸素環境下における炭化水素分解菌群の多様性を解析しコア生物を特定する
を目的とした。

3. 研究の方法

(1) アルカン分解メタン発酵系の構築

先行研究にて、日本各地から油田跡地などの土壌や生産水試料を、アルカン混合物(オクタン, ドデカン, ヘキサデカン, ヘプタメチルノナン(HMN)を等モル含む)や軽油(に HMN を混合)を唯一のエネルギー、炭素源とする嫌気無機塩培地に植菌した。ガラスバイアル瓶に入った培地をテフロンコートされたプチルゴム栓とアルミキャップで密栓した。植菌後、バイアル瓶の口を下向きにした水封状態にて、30℃で静置培養した。アルカン混合物または軽油を添加しない培養系(非添加コントロール)を更に準備し、すべての培養系を 3 連で実験した。

メタン量の測定には GC-TCD を用いた。定期的にバイアル内の気相をサンプリングして、GC-TCD に供した。アルカン量の測定は GC-MS を用いた。経時的に油層を採取し、ヘキサンで適当に希釈し、GC-MS に供しアルカン量の定量を行った。アルカン混合物や軽油に添加した HMN を内部標準物質(微生物によって分解されないため)として用いた。

(2) 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析には 16S rRNA 遺伝子を標的とした Miseq によるアンブリコン解析を用い

た。Miseq から得られた結果は、Mothur (Schloss et al, 2009) によって配列の整理 (キメラ配列の除去など) や系統分類等を行い、R の Vegan Package などを用いて多様性解析を行った。

(3) メタゲノム解析・ゲノム解析

先行研究(若手B平成25~26年度)で得られた *Peptococcaceae* 科細菌のメタゲノム情報を利用し、KEGG KOALA でアノテーションされた情報を基に、*Peptococcaceae* 科細菌の代謝経路を推定した。新たに構築した軽油分解メタン発酵系 DNA から NEXTERA XT (illumina) を用いて DNA ライブラリーを調製し、Miseq (illumina) で解析した。得られた配列を各種プログラムで DNA の質管理とアッセンブル等を行い、アッセンブルされた scaffold を Prokka (Torsten Seemann, 2014) で解析した。トルエン分解異化的硫酸塩還元細菌のコロニーからゲノム DNA を分離し、ゲノム DNA 配列を取得した。ゲノム DNA 配列の解析にはメタゲノム解析とほぼ同様の方法で行った。

(4) 分離培養実験

(3)の解析で得られた推定代謝経路に基づいて、*Peptococcaceae* 科細菌の分離培養を試みた。

(5) alkylsuccinate synthase のクローニング

軽油分解メタン発酵系から得られたメタゲノム情報から、嫌氣的アルカン分解の鍵酵素 alkylsuccinate synthase alpha subunit (AssA) の近縁遺伝子らを含むコンティグが得られた。このコンティグ中の Ass 遺伝子群の cloning と大腸菌での Ass の発現を試みた。

4. 研究成果

(1) アルカン分解メタン発酵系の構築

新潟県の新津川から得た土壌試料から、軽油を分解するメタン発酵系の構築に成功した(図1, 図2)。

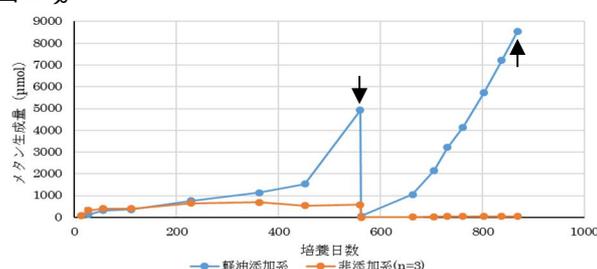


図1 .軽油分解メタン発酵系のメタン生成量変化. 矢印(560日, 868日)で培養液からDNAを抽出した

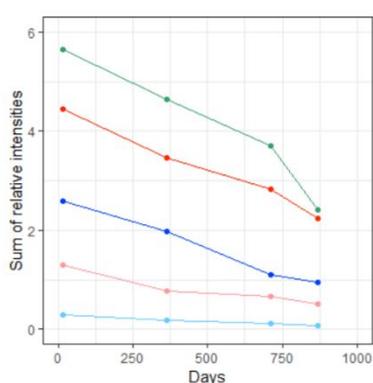


図2 .軽油分解メタン発酵系の経時的アルカン濃度変化. HMNのピーク強度を1とした時の各n-アルカンの相対強度. C8.C11, 軽油中のn-オクタン, n-ノナン, n-デカン, n-ウンタデカンの合計; C12.C15, 軽油中のn-ドデカン, n-トリデカン, n-テトラデカン, n-ペンタデカンの合計; C16.C19, n-ヘキサデカン, n-ヘプタデカン, n-オクタデカン, n-ノナデカンの合計; C20.C23, n-エイコサン, n-ヘンイコサン, n-ドコサン, n-トリコサンの合計; C24.C26, n-テトライコサン, n-ペンタイコサン, n-ヘキサイコサンの合計

図1, 図2は3連の軽油添加系の一つのメタン生成量やアルカン濃度の経時変化で、残りの二つも同様な変化パターンを示した。図1の非添加系と比較し、軽油添加系では明らかなメタン生成量の増加が見られ、更にアルカン濃度の経時的な減少が確認できた。最初のDNA抽出を行った560日目と比べて868日目では、メタンの生成量が約1.8倍となり、C16.C19 (n-ヘキサデカンからn-ノナデカン)のアルカンの減少が顕著だった。これは、培養560日目から868日目にかけて、C16.C19を分解するアルカン分解菌が増加した可能性を示唆した。そこで新津川土壌試料から得られた軽油分解メタン発酵系の微生物群集構造解析を行った。

(2) 微生物群集構造解析

16S rRNA 遺伝子を標的とした Miseq によるアンプリコン解析の結果を図3, 図4に示した。図3.1と図3.2は培養560日目と868日目の培養系の微生物群集構造をそれぞれ示した。アーキアでは、酢酸資化性メタン生成アーキアである *Metanosaeta* 属が両培養日数とともに優占していた。560日目では酢酸資化性メタン生成アーキアである *Metanosaeta* 属がアーキアの67%, 水素資化性メタン生成アーキアである *Methanoregula* 属, *Methanoculleus* 属, *Methanocella* 属がそれぞれ同13%, 7%, 6%であった。868日目では、アーキアのうち、*Metanosaeta* 属が同89%, *Methanoregula* 属, *Methanoculleus* 属, *Methanocella* 属がそれぞれ同5%, 5%, 0.3%であった。このことから、継代後では酢酸資化によるメタン生成がメインとなったことが示唆された。バクテリアでは、嫌氣的アルカン分解に関わるとされる *Smithella* 属細菌が両培養日数ともに優占した。*Smithella* 属細菌は、560日目ではバクテリアの24%を、868日目では同36%を占め、培養日数の経過とともに *Smithella* 属細菌の集積が示唆された。また、メタン生成条件下で n-ヘキ

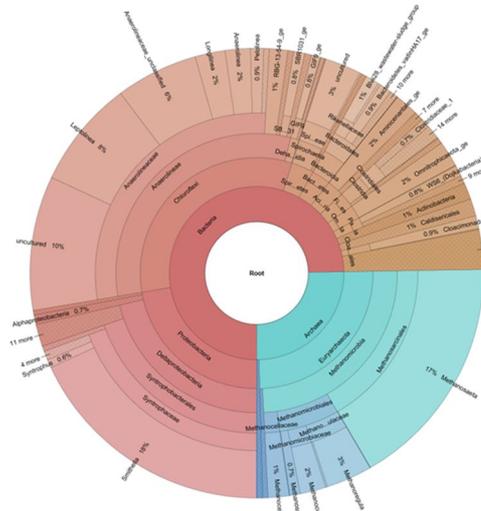


図3. 1. 新津川由来軽油分解メタン発酵系 560日目の微生物群集構造

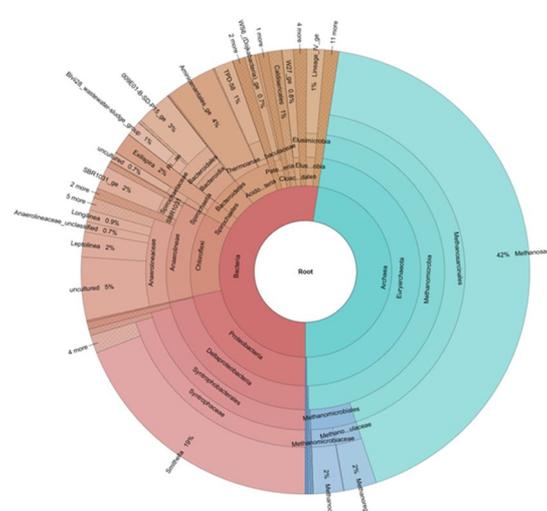


図3. 2. 新津川由来軽油分解メタン発酵系 868日目の微生物群集構造

サンやn-オクタンといった短鎖アルカン分解を行う Firmicutes 門の *Peptococcaceae* 科細菌は、両培養日数でいずれも 1%未満であった。したがって、本培養系での軽油分解は *Smithella* 属細菌の関与が強く示唆された。

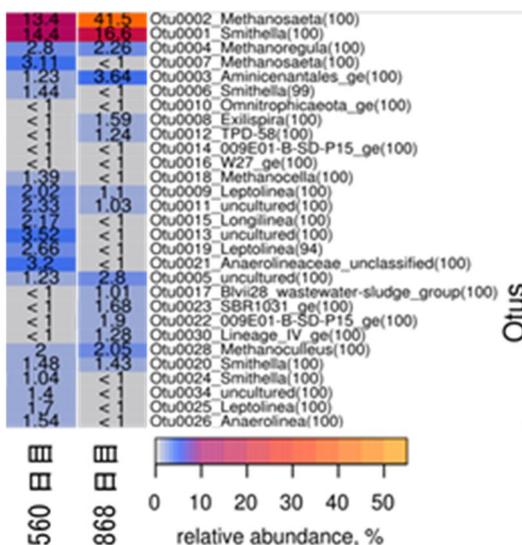


図4. 新津川由来軽油分解メタン発酵系の微生物群集構造 (ヒートマップ)

図4は97%の塩基配列同一性で形成した OTU を基づいてヒートマップを示した。本培養系で軽油分解に関与すると考えられる *Smithella* 属細菌は4つの OTU (Otu0001, Otu0006, Otu0020, Otu0024) が存在した。560日目, 868日目ともに Otu0001 の *Smithella* 属細菌が優占しており, それぞれ全体の 14.4, 16.6%の相対存在率であった。他3つの OTU は560日目ではすべて相対存在率 1%以上であったが, 868日目では Otu0006, Otu0024 の *Smithella* 属細菌が相対存在率 1%未満であった。このことから, 培養日数経過に伴い特定の *Smithella* 属細菌への変遷が示唆された。軽油中のアルカン種の分解パターンが560日目から868日目で変化していることから, Otu0001 や Otu0024 のような *Smithella* 属細菌が C16.C19 のようなアルカンの分解に関与した可能性も示唆された。

この *Smithella* 属細菌とメタン生成アーキア以外で、両培養日数を通して存在する細菌 OTU が存在した (Otu0003, Otu0005, Otu0009, Otu0011)。Otu0009 の *Leptolinea* 属細菌は嫌気環境でその存在が多く報告されており、単糖類などを発酵すると考えられた (Yamada et al. 2006)。一方、Otu0003, tu0005, tu0011 に関連付けられた細菌は全て未培養細菌であり、その機能については全く不明である。特に Otu0003 は他のアルカン分解メタン発酵系からも検出されており、その機能について引き続き解析が必要である。

(3) メタゲノム解析・ゲノム解析

未培養 *Peptococcaceae* 科細菌が優占するアルカン分解メタン発酵系のメタゲノム解析の結果、未培養 *Peptococcaceae* 科細菌には嫌氣的アルカン分解に関わる遺伝子に加え、酪酸やプロピオン酸の酸化能、および異化的フマル酸塩還元能を有する可能性が示唆された。これらの基質を用いた培養実験を行った (後述)。

Smithella 属細菌が優占する軽油分解メタン発酵系のメタゲノム解析を行った。アッセンブルされた scaffold の中からアルキルスクシネート合成酵素 (Ass) 遺伝子群が複数見つかった。Ass の サブユニット (AssA) は嫌氣的アルカン分解細菌の鍵酵素の指標として広く用いられており、その系統関係を明らかにするために、AssA アミノ酸配列に基づく分子系統樹を推定した (図5)。図5にあるように軽油分解メタン発酵系から取得された AssA ホモログは、緑色と紫色のブランチに色づけた2つのクラスターに分離した。565日目 () の方が多くの AssA ホモログが検出され、868日目 () では緑色ブランチのクラスターのみだった。また、紫色ブランチのクラスターには、アルカン分解に関与する嫌気性細菌分離株 (strain AK-01) やメタゲノム情報から得られた AssA ホモログ (*Peptococcaceae* bacterium SCADC1 2 3, *Smithella* sp. SCADC, *Smithella* sp. D17) が存在し、560日目の培養系内ではこれらに近縁な AssA ホモログがアルカン分解に関与した可能性が考えられた。一方、緑色ブランチのクラスターには既報に近縁の配列は存在しなかったことから、新規の AssA である可能性が考えられた。また、560日目と868日

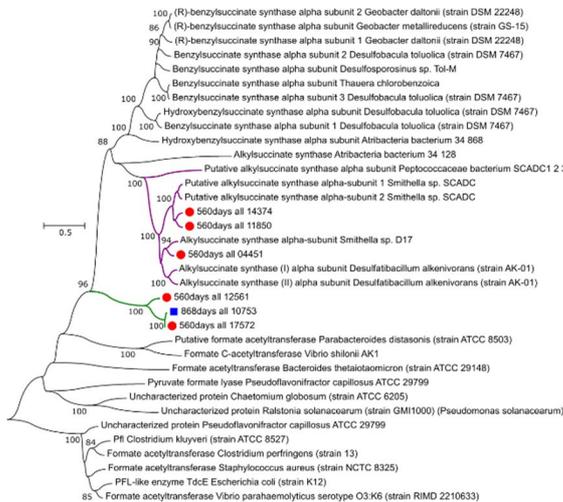


図5. 軽油分解メタン発酵系 AssA ホモログと近縁タンパク質アミノ酸配列に基づく分子系統樹. 近隣結合法で計算, ノード付近の数値は Bootstrap 値 (80%以上のみ表示).

する遺伝子群も同定された。更に酢酸代謝経路が存在したことから, 集積培養系から硫酸塩と酢酸塩による分離培養を試みたところ, 硫酸塩還元トルエン分解細菌の分離に成功した。TSK 株の系統分類学的解析から, 本株は *Syntrophobacteraceae* 科の新種細菌である可能性が示唆された。引き続き, TSK 株のゲノム・系統分類学的解析を行う必要がある。

(4) 分離培養実験

未培養 *Peptococcaceae* 科細菌には嫌氣的アルカン分解に関わる遺伝子に加え, 酪酸やプロピオン酸の酸化能, および異化的フマル酸塩還元能を有する可能性が示唆されたため, アルカンに加え, 酪酸とプロピオン酸, 更にフマル酸塩を添加した。その結果, フマル酸塩のコハク酸塩への還元と, アルカン(n-オクタン)の分解が GC-MS 解析によって確認された。集積培養菌体の Miseq によるアンプリコン解析を行った結果, 未培養 *Peptococcaceae* 科細菌は殆ど存在せず, 好気性の *Acinetobacter* 属細菌が存在した。*Acinetobacter* 属細菌は好氣的アルカン分解菌であり, 培養系内に酸素の混入ないし, *Acinetobacter* 属細菌による未知の嫌氣的アルカン分解の可能性も示唆された。本分離培養実験にて, 目的としない *Acinetobacter* 属細菌が集積されたが, これまでに油田環境から嫌氣的原油分解微生物群集から同じく好気性の *Marinobacter* 属細菌が検出されていることもあり (Gray et al., 2011), *Acinetobacter* 属が嫌氣的にアルカン分解に関与する可能性も考えられた。

(5) alkylsuccinate synthase のクローニング

alkylsuccinate synthase (Ass)の活性サブユニットである AssA は, 嫌氣的アルカン分解の鍵酵素であり, その遺伝子 *assA* はマーカー遺伝子として, 種々のメタン生成アルカン分解培養系で発現が確認されている。しかし, Ass の生化学的性質は未解明であり, Ass タンパク質の精製が課題である。そこで, 軽油分解メタン発酵系 560 日目のメタゲノム解析で *assA* を含む *ass* オペロン様構造を有する contig (NODE882, 図6)の遺伝子情報をもとに, Ass の サブユニットをコードする *assC* を大腸菌にクローニングし, AssC の発現を試みた。

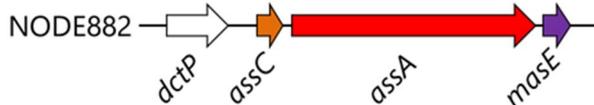


図6. 軽油分解メタン発酵系 560 日目のメタゲノム解析で得られた *ass* operon 様構造を含む contig. *assA* は図5中 560days all 11850 であった。

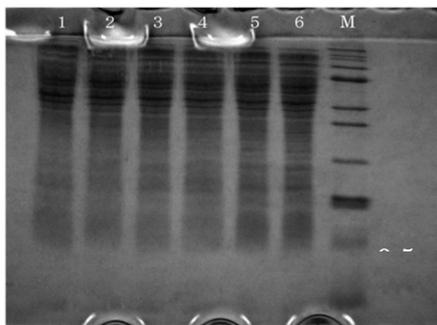


図7. SDS-PAGE 像. レーン番号(IPTG 濃度, mM); 1 (0), 2 (0.1), 3 (0.25), 4 (0.5), 5 (0.75), 6 (1.0); M, マーカー

AssC を含む領域をカバーし, プラスミド (pColdII ベクター) にライゲーションするようにプライマーを設計し, PCR で AssC 遺伝子断片を取得した。AssC 増副産物を Golden Gate Assembly キットで pColdII に挿入後, 発現用大腸菌 (Rosetta 2 (DE3) Plys S) に形質転換した。形質転換体を低温下, IPTG 濃度を変化させて発現を試みた。Cell-free 粗抽出液を SDS-PAGE に供した (図7)。

AssC の分子量は約 6.6 k であるが, いずれの IPTG 濃度でも発現は確認されなかった。また, 同様に菌体を直接 SDS-PAGE に供した際に, Inclusion body の生成は確認されなかった。Ass と同じく Glycyl Radical Enzyme の 1 つである Benzylsuccinate synthase では, pET ベクターを用いた大腸菌での発現が確認されている。今後は発

現ベクターの検討を含め、発現条件の検討が必要である。

(6) 総括

アルカン分解メタン発酵系からアルカン分解菌を分離しその微生物学を解明する

アルカン分解メタン発酵系からのアルカン分解菌の分離には至らなかった。特に未培養 *Peptococcaceae* 科細菌が優占する培養系においては、継代培養による集積を継続しているが、2回の継代(元の培養系から4%になった段階)でアルカン分解メタン発酵反応が停止した。継代培養により、アルカン分解メタン発酵反応に必要な栄養源の不足や細菌の希釈が考えられた。前者については、試料源の産生水を無菌化して添加したが、その効果はなかった。後者については不明な点が多いが、未培養 *Peptococcaceae* 科細菌優占アルカン分解メタン発酵系と軽油分解メタン発酵系に、メタン生成アーキア以外で共通して存在する細菌があったことから、これらの細菌が継代により失われた可能性が考えられた。一方で、*Smithella* 属細菌が優占化する軽油分解メタン発酵系では、これまでに3回の継代培養(元の培養系から1%になった段階)を経ているが、順調に軽油分解メタン発酵反応が起こっている。今後はこの培養系から、アルカン分解菌の分離を試みる。

無酸素環境下における炭化水素分解菌群の多様性を解析しコア生物を特定する

メタン発酵を伴う脂肪族炭化水素(アルカン)分解培養系から、未培養 *Peptococcaceae* 科と *Smithella* 属細菌がアルカン分解菌として、*Methanosaeta* 属、*Methanoregula* 属、*Methanoculleus* 属、及び *Methanocella* 属アーキアがメタン生成アーキアとして特定された。さらに、これらアルカン分解とメタン生成アーキア以外に、異なる分離源であっても、また培養日数(継代回数)を経て共通する細菌群の存在が明らかになった。この共通細菌群の機能は不明であるが、アルカン分解メタン発酵反応に関わるコア生物群である可能性も考えられるため、その機能解析を継続する。*Smithella* 属細菌がアルカン分解菌として特定された軽油分解メタン発酵系では、種レベルで異なる *Smithella* 属細菌が存在し、それぞれが異なる炭素鎖長のアルカンを分解する可能性が示唆された。また、嫌氣的アルカン分解のマーカークロニカル遺伝子 *assA* も複数検出され、*Smithella* 属内においても多様なアルカン分解反応が存在する可能性が示された。芳香族炭化水素であるトルエンを分解する硫酸塩還元細菌の分離培養に成功した。本菌は *Syntrophobacteraceae* 科の新種である可能性が示唆され、ゲノム・微生物学的解析を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

原田 智菜, 佃 玲奈, 稲葉 桂子, 野村 泉, 上原 葵, 鈴木 徹, 中村 浩平. 軽油分解メタン発酵微生物群集の群集構造解析. 日本農芸化学会. 2018年3月17日. 名古屋

佃 玲奈, 牧 大智, 高見澤 一裕, 中村 浩平. 硫酸塩・Fe(III)還元を伴う嫌氣的トルエン分解微生物群集の構造解析. 日本微生物生態学会. 2016年10月23日. 横須賀

山田 大之, 藤岡 大地, 新里 尚也, 齋藤 星耕, 青山 洋昭, 高見澤 一裕, 中村 浩平. n-アルカン分解メタン生成培養系の群集構造解析. 日本微生物生態学会. 2015年10月19日. 土浦
Kohei Nakamura, Masayuki Yamada, Daichi Fujioka, Kazuhiro Takatnizawa, Naoya Shinzato, Seikoh Saitoh, Hiroaki Aoyama. Prokaryotic Diversity in Alkane-oxidizing Methanogenic Community From Production Water of Oil and Gas Seep. The International Kasetsart University Science and Technology Annual Research Symposium 2015 (国際学会). 2015年5月28日. Bangkok (Thailand)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし