

令和元年6月20日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08005

研究課題名(和文) 高圧下および高圧処理後の筋肉内デコリン分子構造変化の解析

研究課題名(英文) Changes in the molecular structure of intramuscular decorin under and after high hydrostatic pressure

研究代表者

西海 理之(NISHIUMI, Tadayuki)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60228153

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)： 以前の研究により、高圧処理による筋肉内結合組織の脆弱化にはデコリンの分解もしくはコラーゲン繊維からの解離が関与することが予想され、ウシ骨格筋から実際に単離・精製したデコリン分子の高圧下ならびに高圧処理後の立体構造を解析し、高圧処理に伴う筋肉内結合組織の脆弱化との関連性を検討した。得られた結果の要旨は以下の通りである。

(1)高圧処理は、デコリンコアタンパク質の分解、GAG鎖の分解および解離を引き起こさなかった。(2)高圧下、蛍光スペクトルおよび表面疎水性測定により、高圧処理に伴ってデコリン分子の立体構造の一部が不可逆的に変化した。(3)デコリン分子内のSS結合は高圧処理によって不変だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規な非加熱の食品加工技術の1つである高圧食品加工技術の開発を目指し、食肉の軟化技術としての高圧処理の効果とその軟化メカニズムの解明を行なっている。これまでの一連の研究により、従来硬くて噛み切れないような硬い肉でも高圧処理によって適度に軟化し、その時非常に硬い部分である「スジ」(専門的には結合組織という)も軟化することを見出した。結合組織はコラーゲン繊維の塊で、コラーゲン繊維同士をデコリンと呼ばれるプロテオグリカンが接着・補強していることが知られているが、本研究により、高圧処理に伴ってデコリンの分子構造が変化し、コラーゲン繊維から離れることで結合組織が脆弱化・軟化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： High hydrostatic pressure induces a structural weakening of intramuscular connective tissue. Decorin, one of a small proteoglycans, binds to and stabilizes of collagen fibrils. It has been suggested that the weakening of intramuscular connective tissue may result from alteration of decorin-collagen interaction due to the structural changes in decorin molecule. In the present study, decorin was isolated and purified from bovine skeletal muscle, and then the molecular structure of the isolated decoin under and after high pressure was investigated. The results were following: (1) Degradation of core protein and GAG chain of the isolated decorin was not revealed by high pressure. (2) Fluorescence spectra and surface hydrophobicity of the isolated decorin indicated that the tertiary structure of the decorin molecule was altered partially under high pressure up to 400 MPa. (3) High pressure did not affect the intramolecular disulfide bonds of the isolated decorin.

研究分野：農学(畜産物利用学、食品科学)

キーワード：高圧処理 デコリン 筋肉内結合組織 プロテオグリカン 立体構造 食肉科学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高圧処理は、新たな非熱的食品加工技術として、近年、世界中で最も注目されている技術である。高圧処理は、別名、高静水圧処理ともいい、水などの液体を介して1,000気圧(100 MPa)以上の圧力を生物材料(食品を含む)にかける技術で、日本において提唱された新技術である。高圧処理には、以下のような特徴があるため、生物科学分野のみならず、食品加工分野や医療分野での利用が検討されている。(a)省エネ：圧力保持にはエネルギーを必要とせず、加熱処理の約1/16のエネルギーしかからない。(b)均一性：材料の中心にまで瞬時に均一に圧力が伝播するため、均質処理ができる。食品においては、調理むらがおこらない。(c)微生物制御：微生物の生育抑制および殺菌が可能。微生物の種類による圧力耐性の違いを利用し、発酵などを制御できる可能性がある。(d)化学変化を伴わない：加熱に伴う化学反応生成物による変色・異臭・異常物質の生成がない。ビタミンなどの栄養素が破壊されない。(e)物理反応である：細胞膜や細胞壁などの構造物に対する物理的破壊を引き起こす。このことによって、物性の変化や膜破壊で流出した酵素による反応促進が誘発される。(f)タンパク質や炭水化物などの生体高分子の立体構造変化を引き起こす：高圧処理は、生体成分に水分子を物理的に押し込む処理であるので、それに伴い、物質の水和・相互作用・高次構造などの変化を引き起こす。その結果、物性の変化、食品の加工特性の変化、アレルギーの低減、消化性の改善などが誘発される可能性がある。

一方、食肉科学分野において、高圧処理は食肉の熟成軟化を速めることが知られている。またその軟化促進は、筋原線維タンパク質の変化に伴う軟化効果であり、もう一つの硬さの決定因子である結合組織は高圧処理でも変化しないとされてきた。しかしながら、我々は、高圧処理で筋肉内結合組織は脆弱化・軟化するはずだという認識のもとに研究を始め、平成21~23年度科学研究助成事業の補助を受けてその軟化メカニズム解明の研究に着手し、筋肉内コラーゲンの分解などは起こらないが、筋肉内コラーゲン線維同士の密着性が脆弱化してコラーゲン線維の束がほぐれ、その結果、コラーゲン線維ネットワークから構成される筋肉内結合組織構造が脆弱化することで食肉の軟化に繋がることを提起した。

2. 研究の目的

プロテオグリカン的一种であるデコリンはコラーゲン分子と結合し、コラーゲン線維形成の制御やコラーゲン線維の物性に影響を及ぼすことが、腱や皮膚組織で報告されている。高圧処理による筋肉内コラーゲン線維ならびに結合組織の脆弱化には、コラーゲン線維同士を接着しているデコリン分子の分解もしくはデコリン分子のコラーゲンからの解離が関与することを予想し、本研究では、まず筋肉内デコリン分子の構造に及ぼす高圧処理の影響を明らかにすることを目的とした。具体的には、ウシ骨格筋から筋肉内結合組織を単離し、単離した筋肉内結合組織から実際にデコリンを単離・精製したのち、ウシ骨格筋デコリンの分子構造のどのレベル、どの領域がどのように高圧処理によって変化するのか、また、高圧処理に伴うデコリン分子構造変化は可逆的か？不可逆的か？などについて検討した。

3. 研究の方法

- (1)ウシ骨格筋デコリンの単離・精製と特徴付け：筋肉内結合組織の脆弱化に関係すると予想されるデコリンを単離・精製するため、Fujii と Murota (1982)の方法を用い、まずウシ骨格筋から筋肉内結合組織を単離した。得られた筋肉内結合組織から塩酸グアニジンでプロテオグリカンを抽出した後、塩化セシウム (CsCl)密度勾配遠心分離法を用いてプロテオグリカンを単離、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーおよび Sepharose CL-6B ゲルろ過クロマトグラフィーを用い、筋肉内結合組織と相互作用していると考えられるデコリンを単離・精製した。また、デコリンの特徴付けは SDS-PAGE (銀染色およびアルシアンブルー染色)、セルロースアセテート膜電気泳動などで行った。また、Yamagata ら(1968)の方法を一部改良して単離・精製したウシ骨格筋デコリンを Chondroitinase ABC にてその GAG 鎖を分解除去し、デコリンコアタンパク質を調製した。デコリンコアタンパク質の確認は、SDS-PAGE (銀染色)にて行った。
- (2)高圧処理によるウシ骨格筋デコリンの分解の評価：単離したウシ骨格筋デコリンならびにデコリンコアタンパク質に 0.1~700 MPa の高圧処理を施し、SDS-PAGE にてデコリンコアタンパク質の分解、GAG 鎖の分解および解離を評価した。
- (3) 高圧処理によるウシ骨格筋デコリンコアタンパク質の立体構造の解析：0.1~400 MPa までの昇圧および降圧下での、ならびに 0.1~700 MPa の高圧処理後のウシ骨格筋デコリンコアタンパク質の起波長 295 nm および 280 nm における蛍光スペクトル測定、8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS)を用いた表面疎水性測定、および高圧処理後のウシ骨格筋デコリンの表面 SH 基量を測定し、高圧処理に伴うウシ骨格筋デコリン分子の立体構造の変化を検討した。

4. 研究成果

- (1)ウシ骨格筋デコリンの単離・精製と特徴付け

ウシ骨格筋から筋肉内結合組織を単離し、塩酸グアニジンでプロテオグリカン抽出後、CsCl密度勾配遠心分離した。遠心チューブの底部(高密度)から上部(低密度)にかけて4つに分画したD1~D4(D1を底部とする)画分をSDS-PAGEにより分析した結果、D2画分の100 kDa付近にデコリンのバンドを確認し、D2画分を次の精製ステップに供した。

DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーに供した後、ピーク付近の画分15~43をSDS-PAGEで分析した結果、画分36~41(塩濃度0.29~0.35 M)において100 kDa付近にデコリンのバンドを確認することができた。さらにデコリンの精製度を高めるため、デコリンが含まれると考えられる画分を限外濾過膜により濃縮し、次の精製ステップに供した。

Sephacrose CL-6B ゲルろ過クロマトグラフィーに供した後、ピーク付近の画分13~32をSDS-PAGEで分析した結果、画分18~26にかけて100 kDa付近にデコリンと思われるバンドを確認することができ、デコリン以外の共雑タンパク質の混入も認められなかった。以上の結果から、デコリンが含まれていると推定される画分を混合、透析した後、凍結乾燥し、精製したデコリンをさらに特徴付けるためにセルロースアセテート膜電気泳動を用いてGAG鎖の同定を行った。

1 M 酢酸-ピリジン緩衝液(pH 3.5)もしくは0.3 M 酢酸カルシウム溶液を用いてセルロースアセテート膜電気泳動を行った結果、単離・精製したプロテオグリカンのGAG鎖はデルマタン硫酸鎖であることが示された。また、Chondroitinase ABCによりGAG鎖を分解した後にSDS-PAGEで分析したところ、100 kDa付近にブロード状バンドを示したデコリン分子は50 kDa付近のシャープなバンドとして移動し、デコリンコアタンパク質を得ることができた。デコリンコアタンパク質の立体構造変化の解析にあたっては共存するChondroitinase ABCを除去する必要があるため、Kakizakiら(2014)の方法に従ってDEAE-Sephacelイオン交換クロマトグラフィーに供し、純粋なデコリンコアタンパク質を得た。

(2) 高圧処理によるウシ骨格筋デコリンの分解

高圧処理後のウシ骨格筋デコリンをSDS-PAGEに供した結果、高圧処理はデコリンコアタンパク質の分解、GAG鎖の解離およびGAG鎖自身の分解を引き起こさないことが示された(図1)。

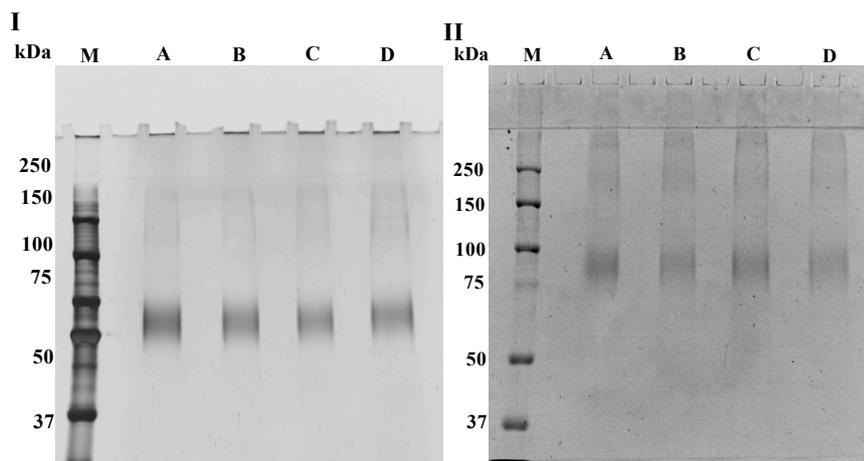


図1 高圧処理後のウシ骨格筋デコリンのSDS-PAGE像 (I: 銀染色, II: AB染色)
M: 分子量マーカー, A: 0.1 MPa, B: 100 MPa, C: 400 MPa, D: 500 MPa

(3) 高圧処理によるウシ骨格筋デコリン分子の立体構造の変化

高圧下において励起波長295 nmならびに280 nmにおける蛍光スペクトルを測定した(図2)。0.1~400 MPaまでの圧力の上昇に伴って高圧下での蛍光強度は低下し、特に特に0.1~200 MPa間でのスペクトルの変化が顕著であった(図2左)ため、デコリンコアタンパク質の立体構造は200 MPa以下の比較的低い圧力で大きな影響を受けることが示唆された。減圧下では(図2右)、圧力の低下と共に蛍光強度は上昇し、加圧前のスペクトルに近づいた。しかしながら、除圧後の蛍光強度は加圧前の傾向強度より低かった。また、蛍光強度が最も高い時の波長(最大波長)は、昇圧と共に長波長側へシフト(レッドシフト)したが、減圧に伴って短波長側にシフトし、除圧後は加圧前と同じ波長に戻った。以上の結果は、400 MPaまでの高圧処理により、デコリンコアタンパク質両末端に存在するトリプトファン残基が分子の外側に露出するような構造変化が起きていること、また、高圧処理がデコリンコアタンパク質の不可逆的な構造変化を導くことを示唆する。

ANSを用いた表面疎水性測定の結果、圧力の増加に伴って表面疎水性は徐々に低下していき、0.1 MPa時の値と比較すると400 MPaではその値が半分近くも減少した。また、圧力を解放していくと表面疎水性が徐々に上昇し、0.1 MPaでは高圧処理前とほぼ同じ値まで戻った。この結果から、デコリンの表面疎水性も400 MPaまでの高圧処理に伴うトリプトファン残基の挙動と同様に変化することが示された。

高圧処理したウシ骨格筋デコリンの表面SH基量を測定した結果、0.1、100、400、700 MPaの各処理圧力においてその値はほとんど変化しないことが示された。このことからデコリンコ

アタンパク質内のジスルフィド結合は高圧処理によってほぼ影響を受けないことが示唆された。

以上の結果より、高圧処理は、筋肉内デコリン分子の分解を引き起こさない一方で、デコリン分子の立体構造を変化させる作用があることが示唆された。高圧処理は、デコリン分子内部の疎水性アミノ酸残基を分子表面側に露出させるような立体構造変化を引き起こし、この高圧下で変化したデコリン分子構造がコラーゲン分子との相互作用に変化をもたらし、コラーゲン線維からのデコリン分子の遊離が誘導される可能性が推測される。したがって、今後は、高圧下におけるデコリン-コラーゲン相互作用の変化を調査することで、高圧処理に伴う筋肉内コラーゲン線維ネットワーク構造の脆弱化メカニズムが解明できると考えられる。

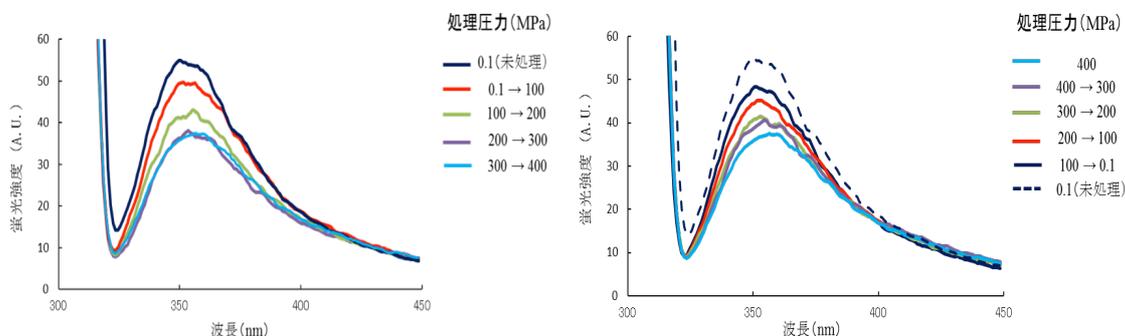


図2 高圧下でのウシ骨格筋デコリンコアタンパク質の蛍光スペクトル（励起波長 295 nm）
（左：昇圧時，右：降圧時）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 10 件）

- ① Maksimenko, A., Kikuchi, R., Tsutsuura, S. and Nishiumi, T., Effect of high hydrostatic pressure and reducing sodium chloride and phosphate on physicochemical properties of beef gels. *High Pressure Res.*, 査読有、39, 2019, 13 pages. (Published online: 04 March 2019: DOI: 10.1080/08957959.2019.1586895)
- ② Nakane, M., Fuchu, H., Nakaura, Y., Nishiumi, T. and Yamamoto, K., Effect of plating and incubation conditions on the detection of lactic acid bacteria after high hydrostatic pressure treatment. *High Pressure Res.*, 査読有、39, 2019, 10 pages. (Published online: 07 Feb. 2019: DOI: 10.1080/08957959.2019.1574347)
- ③ Ogino, M. and Nishiumi, T., Control of the generation time of microorganisms by long-term application of hydrostatic pressure of 50 MPa or less. *Food Sci. Technol. Res.*, 査読有、24, 2018, 289-298.
- ④ Saito, M., Nishida, M., Eitsuka, T., Kim, Y.-J., Nishiumi, T., Konishi, T., Urakami, H., and Nishida, H., Pork loin treated with high hydrostatic pressure as a food processing technology: Subacute toxicity of the freeze-dried powder and cytotoxicity of the methanol extracts. *Food Safety*, 査読有、5, 2017, 98-109.
- ⑤ 西海理之, 高圧処理によるタンパク質の改質と食品の物性改善. *応用糖質科学*, 査読有、7, 2017, 197-203.
- ⑥ Siqin, Q., Nishiumi, T., Yamada, T., Wang, S., Liu, W., Wu, R. and Borjigin G., Relationships among muscle fiber type composition, fiber diameter and *MRF* gene expression in different skeletal muscles of naturally grazing Wuzhumuqin sheep during postnatal development. *Anim Sci. J.*, 査読有、88, 2017, 2033-2043.
- ⑦ Chen, X., Tume, R.K., Xiong, Y., Xu, X., Zhou, G., Chen, C. and Nishiumi, T., Structural modification of myofibrillar proteins by high-pressure processing for functionally improved, value-added, and healthy muscle gelled foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 査読有、2017, 1-23. (Published online: 05 Sep., 2017: DOI: 10.1080/10408398.2017.1347557)
- ⑧ Zhang, W., Naveena, B.M., Jo, C., Sakata, R., Zhou, G., Banerjee, R. and Nishiumi, T., Technological demands of meat processing –An Asian perspective. *Meat Sci.*, 査読有、132, 2017, 35-44.
- ⑨ 西海理之, 圧力で肉が軟化?—食肉の高圧物性変換技術の開発—. *高圧力の科学と技術*, 査読有、27, 2017, 49-59.
- ⑩ 西海理之, 重曹・高圧併用処理を用いた食肉加工品の物性変換技術の開発. *食品と容器*, 査読有、57, 2016, 340-347.

〔学会発表〕（計 27 件）

- ① 阿部菜月, 西海理之, 桜井敏行, 杜仲葉添加飼料給餌が豚肉の物性および筋肉内コラーゲン特性に及ぼす影響. 北信越畜産学会新潟県分会研究発表会, 2019.3.18, 新潟大学 (新潟県)

- 新潟市).
- ② 小林駿斗, 西海理之, 高田良三, 平野勇作, 藤村忍, リジン調節飼料給与が豚の肉質に及ぼす影響. 北信越畜産学会新潟県分会研究発表会, 2019.3.18, 新潟大学 (新潟県新潟市).
 - ③ 江口柗平, 藤村忍, 高田良三, 平野勇作, 西海理之, 枝肉重量が豚の肉質に及ぼす影響. 北信越畜産学会新潟県分会研究発表会, 2019.3.18, 新潟大学 (新潟県新潟市).
 - ④ Ando, M., Sato, T., Tsutsuura, S., Nakai, H. and Nishiumi, T., Elucidation of physical properties of the exopolysaccharide of low molecular weight produced by lactic acid bacteria. Joint Symposium of the 8th International Agriculture Congress 2018 and 6th International Symposium for Food & Agriculture 2018, 2018.11.14, University Putra Malaysia (Malaysia).
 - ⑤ Minezaki, S., Tsutsuura, S., Murata, M. and Nishiumi, T., Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing. Joint Symposium of the 8th International Agriculture Congress 2018 and 6th International Symposium for Food & Agriculture 2018, 2018.11.14, University Putra Malaysia (Malaysia). [Best Poster Award 2nd]
 - ⑥ Yamazaki, K., Kakiuchi, T., Tsutsuura, S. and Nishiumi, T., Effect of high pressure on the physical and sensory properties of Kanikama. Joint Symposium of the 8th International Agriculture Congress 2018 and 6th International Symposium for Food & Agriculture 2018, 2018.11.14, University Putra Malaysia (Malaysia). [Best Poster Award 1st]
 - ⑦ Tsutsuura, S., Nishiumi, T. and Murata, M., Effect of various factors such as pH, inoculum size, and storage temperature on enterotoxin A (SEA) production of *Staphylococcus aureus* in cooked rice. Joint Symposium of the 8th International Agriculture Congress 2018 and 6th International Symposium for Food & Agriculture 2018, 2018.11.14, University Putra Malaysia (Malaysia).
 - ⑧ Abe, N., Tsutsuura, S. and Nishiumi, T., Effect of Tochu leaf powder on intramuscular collagen and meat texture in pork. Joint Symposium of the 8th International Agriculture Congress 2018 and 6th International Symposium for Food & Agriculture 2018, 2018.11.14, University Putra Malaysia (Malaysia).
 - ⑨ Ando, M., Iwase, C. and Nishiumi, T., Effect of high pressure treatment on structural properties of egg white ovalbumin at acidic pH. 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2018.9.20, Numazu (Japan).
 - ⑩ Yamazaki, K., Kakiuchi, T. and Nishiumi, T., Effect of high pressure on the physical and sensory properties of Kanikama. 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2018.9.20, Numazu (Japan).
 - ⑪ Maksimenko, A., Kikuchi, R., Tsutsuura, S. and Nishiumi, T., Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical properties of low-salt beef gels. 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2018.9.20, Numazu (Japan).
 - ⑫ Nakane, M., Fuchu, H., Nakaura, Y., Nishiumi, T. and Yamamoto, K., Differential plate count methods for evaluating injured populations of lactic acid bacteria after high hydrostatic pressure treatment. 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2018.9.20, Numazu (Japan).
 - ⑬ Maksimenko, A., Kikuchi, R., Tsutsuura, S. and Nishiumi, T., Effect of high hydrostatic pressure on reducing of sodium chloride and sodium phosphate of beef gels. 64th International Congress of Meat Science and Technology, 2018.8.14, Melbourne (Australia).
 - ⑭ 小林祥子, 西海理之, 尹赫一, 坂田亮一, ソーセージ用豚腸ケーシングの品質向上におけるリン酸塩の効果. 第107回日本養豚学会大会, 2017.10.26, 酪農学園大学(北海道江別市).
 - ⑮ 藤崎貴大, 大竹祐希, 細野匠, 西海理之, ウシ筋肉内結合組織からのデコリンの単離精製. 北信越畜産学会第66回大会, 2017.9.8, 信州大学(長野県南箕輪村).
 - ⑯ 阿部菜月, 西海理之, 桜井敏行, 豚肉の物性に及ぼす杜仲葉添加飼料給餌の影響. 日本畜産学会第123回大会, 2017.9.6, 信州大学(長野県南箕輪村).
 - ⑰ 岡本慎太郎, 西海理之, 菊地凌, 高圧処理した低塩牛肉パティの加熱ゲル化の動的粘弾性挙動. 日本畜産学会第123回大会, 2017.9.6, 信州大学(長野県南箕輪村).
 - ⑱ 劉文君, 西海理之, 天然ケーシングの硬さに及ぼす要因の検討. 日本畜産学会第123回大会, 2017.9.6, 信州大学(長野県南箕輪村).
 - ⑲ 岩瀬千里, 蛭田あゆみ, 太刀川泰生, 西海理之, 酸性条件下高圧処理が鶏卵白オボアルブミンの立体構造に及ぼす影響. 日本畜産学会第123回大会, 2017.9.6, 信州大学(長野県南箕輪村).
 - ⑳ Ogino, M., Kazama, Y., Yamazaki, A. and Nishiumi, T., Microbial-control technology using hydrostatic pressure less than 50 MPa. 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP2017), 2017.8.23, Kyoto (Japan).
 - ㉑ 菊地凌, 西海理之, 低塩牛肉ゲルの理化学特性および官能特性に及ぼす高圧処理の影響. 第57回高圧討論会, 2016.10.28, 筑波大学(茨城県つくば市).
 - ㉒ 岩瀬千里, 蛭田あゆみ, 太刀川泰生, 西海理之, 酸性条件下での鶏卵白オボアルブミン立体構造に及ぼす高圧処理の影響. 第57回高圧討論会, 2016.10.28, 筑波大学(茨城県つくば市).
 - ㉓ 小野真理恵, 西海理之, 高圧処理が鶏卵白オボムコイドの *in vitro* 消化性と抗原性に及ぼす

影響. 第 57 回高圧討論会, 2016.10.28, 筑波大学大学(茨城県つくば市).

- ②4 西海理之, 鈴木敦士, 高圧食肉加工と高圧食肉科学 ～特に食肉の物性について. 第 57 回高圧討論会, 2016.10.27, 筑波大学大学(茨城県つくば市). [招待講演]
- ②5 垣内崇宏, 山崎航, 中野晃, 佐藤有希, 西海理之, カニ風味蒲鉾のテクスチャーならびに保存性に及ぼす高圧力の影響. 第 57 回高圧討論会, 2016.10.26, 筑波大学大学(茨城県つくば市). [ポスター賞受賞]
- ②6 大竹祐希, 藤崎貴大, 細野匠, 西海理之, ウシ骨格筋デコリンコアタンパク質の高圧力構造解析. 第 57 回高圧討論会, 2016.10.26, 筑波大学大学(茨城県つくば市).
- ②7 Ogino, M. and Nishiumi, T., Sterilization of *Bacillus cereus* spores by a combination of high-pressure treatment and subsequent heat treatment. 62nd International Congress of Meat Science and Technology, 2016.8.16, 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

http://researchers.adm.niigata-u.ac.jp/html/612_ja.html?k=西海

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 :

ローマ字氏名 :

※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。