

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：17208004

研究課題名（和文） 植物ウイルスにおける分子擬態の解明とそれを利用したポティウイルスベクター群の開発

研究課題名（英文） Molecular mimicry by plant viruses and the development of potyvirus-vectors to express foreign genes

研究代表者

夏秋 知英 (NATSUAKI TOMOHIDE)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10134264

研究成果の概要：植物ウイルスのポティウイルスを用い、「どのように宿主細胞を欺いて優先的にウイルスの遺伝情報を翻訳し、抵抗性(ジーンサイレンシング)を回避するのか」という基本的命題について、VPg タンパク質が「分子擬態」で植物細胞を騙す分子機構を解明した。また、HC-Pro タンパク質が病原性、特に弱毒性に関与していることを証明した。さらに、ポティウイルスのベクター化に用いて成功し、ポティウイルス以外でも感染性クローンの構築に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2006年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：植物病理学・植物ウイルス学

科研費の分科・細目：6004

キーワード：ポティウイルス、分子擬態、カブモザイクウイルス、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス、VPg、eIF(iso)4E、ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

擬態とは、魚や昆虫などで他のものに似せる(模倣する)ことで何らかの利益を得る生命現象である。そこから派生した「分子擬態(molecular mimicry)」という概念は以前から存在し、特に免疫学の世界では宿主がもつ分子レベルの防御機構を欺いて侵入しようとする病原体が、宿主分子と区別のつかない擬態タンパク質を用いることで、非自己として認識されることから逃れる場合に用いられてきた。

これまでにウイルスタンパク質が細胞内で宿主タンパク質とどのように相互作用し

ているかという研究報告は、世界中に多数ある。一方、研究代表者らはここ数年、数種ポティウイルスの強毒株と弱毒株、あるいは宿主範囲の異なる分離株の比較を通してウイルスタンパク質の機能解析を進めていた過程で、ウイルスタンパク質が分子擬態により巧妙に宿主細胞を欺いている現象が多いことに気がついた。たとえば、ポティウイルスRNAの5'末端にはVPgというタンパク質が結合している。VPgは細胞のmRNAの5'末端のキャップ(Cap)と競合して翻訳開始因子と結合できるため、翻訳開始因子-VPg-ウイルスRNAという複合体がさらにリボソームに

結合してタンパク質合成(翻訳)を開始し、マクロチューブルに結合して細胞内を移動する、などを行う。もちろん Cap は塩基で VPg はタンパク質であり、まさに分子擬態である。同様の分子擬態が他のウイルスタンパク質でも起きていると容易に想像できるので、本研究では、ポティウイルスの各種タンパク質の機能を分子擬態という視点で解析しようとした。すなわちウイルスは宿主細胞に侵入すると、脱外被タンパク質→感染初期タンパク質の生産→ウイルス RNA の大量複製→ウイルスタンパク質の大量生産、という段階を経て増殖し、さらには隣接細胞や全身に移行する。いずれの段階でも、ウイルスタンパク質は分子擬態により宿主細胞を欺いてその機能を利用する。逆に分子擬態が働かない植物は宿主となれない。植物ウイルスタンパク質を分子擬態という視点から解析した報告は世界的にもまだなく、本研究の独創的な点であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、植物ウイルスのうち (+)ssRNA をゲノムとするポティウイルスを主に研究対象として取り上げ、ウイルスの根本的な性状である「どのように宿主細胞を欺いて優先的にウイルスの遺伝情報を翻訳し、ウイルス核酸を増殖させ、抵抗性(ジーンサイレンシング)を回避し、全身感染するのか」という点について、ウイルスタンパク質を分子擬態という視点から捉え直してその機能を解明することをまず第一の目的とした。

(2) 次に、ウイルスタンパク質の分子擬態を人為的に制御して、より有効なウイルスベクターの開発へと結びつけることを第二の目的とした。すなわち理想的なウイルスベクターは宿主範囲が狭く、宿主に病徴を引き起こさず、媒介昆虫で媒介されず、複数の外来遺伝子が挿入可能、というような性状を持つべきと考えられる。第一の研究目的で得られる各種擬態タンパク質の機能と構造の解析結果を利用し、ウイルス擬態タンパク質を自由に改変して理想の植物ウイルスベクターの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) これまでに申請者らが得た宿主範囲や病徴、増殖性などの病原性が異なる各種ポティウイルス分離株の塩基配列を多数比較し、ウイルスの性状に影響するアミノ酸や塩基の変異を推定する。その後、その塩基配列をもとに感染性全長 cDNA クローンを構築し、さらに点突然変異を導入したりキメラウイルスを作製し、アミノ酸や塩基の変異と機能の変化の相互関係を解明する。

(2)ウイルスタンパク質を大腸菌で組換え

タンパク質として発現し、抗血清の作製などに用いる。なお、アミノ酸変異の影響が判明したウイルスタンパク質から順次行う。

(3) ポティウイルスタンパク質およびそれに直接的あるいは間接的に反応する植物タンパク質との相互作用を解析する。すなわち、上記の(1)で解明された変異を含むウイルスタンパク質が分子擬態を示して相互作用する植物タンパク質、および本来その植物タンパク質と結合するはずの物質の3種を用いて、分子擬態の分子機構を解明する。すなわち、ウイルスの擬態タンパク質は他の物質を追い出しても自らが必要とする植物タンパク質と結合していると考えられる。このため、ウイルス擬態タンパク質と植物タンパク質間の分子間相互作用をプルダウンアッセイ、表面プラズモン共鳴センサー(BIAcore)などによって測定し、その結合の強さ、結合部位のアミノ酸配列の立体構造、などを解明する。特にアミノ酸配列を変異させて、結合の状態がどのように変化するかを測定し、ウイルス擬態分子のどのアミノ酸を操作すると理想の性質をウイルスタンパク質に付与できるかを検討する。

(4) ポティウイルスベクター群を開発する。上記(1)や(3)の結果を受け、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)、インゲンマメ黄斑モザイクウイルス(BYMV)、カブモザイクウイルス(TuMV)の感染性クローンから外来遺伝子発現や内在遺伝子抑制のためのポティウイルスベクター群を作製する。特に HC-Pro を操作してサプレッサー機能を変化させたり、VPg を変化させて宿主範囲を限定したベクターを検討する。最終的には、「分子擬態」の機能を応用して、1) 各種農作物に感染できる複数のウイルスベクターを含み、2) 複数の遺伝子の挿入・発現が可能で、3) 強毒型と弱毒型を自由に制御でき、4) アラビドプシスで有効利用できるベクターも含む、ポティウイルスベクター群の構築とその有効利用法の確立を目指す。特に HC-Pro タンパク質はジーンサイレンシングサプレッサーであるため、さまざまな増殖能力を持つベクターの構築、すなわち外来遺伝子を大量発現できる強毒型(サイレンシング抑制タイプ)と、ウイルス誘導性ジーンサイレンシング(VIGS)により遺伝子の発現が抑制される弱毒型(サイレンシング感受性タイプ)のベクターの構築が可能と考えられる。

4. 研究成果

(1) ポティウイルスの塩基配列の解析

① 全塩基配列の決定：ポティウイルスの宿主範囲や増殖性の決定に関与する VPg、あるいは後述する病原性に関与する HC-Pro など

のウイルス遺伝子を解析するためには、まず全塩基配列の決定と感染性全長 cDNA 解析が必須の前提条件である。そこで本研究では、カボチャモザイクウイルス(WMV)の全塩基配列を決定して報告した。この報告はわが国では初である。また ZYMV に関しては強毒株と弱毒株の全塩基配列を決定した(Wang *et al.*, 2006)。今後は WMV だけでなく、わが国で未構築の感染性クローンを各種ポティウイルスで構築していく。

② ZYMV 分離株の識別の重要性：ZYMV の防除には弱毒株(ワクチン株)の利用が有効である。すでに開発された弱毒株 ZYMV-2002 は京都府内では高い実用性を示したが、沖縄株には干渉効果がないことが知られている。このため、ZYMV-2002 の普及には他の地域で発生している ZYMV に対する干渉効果を検証する必要がある。そこでまず、各地から ZYMV を収集して合計 28 分離株の HC-Pro 遺伝子領域の塩基配列を決定したところ、分子系統樹において明確な地域性をもつグループに分けられた。次にできるだけ迅速に干渉効果を評価するために、まずカボチャの子葉に 2002-YFP を一次接種し、その 6 日後に子葉の一方にのみチャレンジ接種し、更にその 10 日後に病徴と蛍光を観察する手順を考案した。その結果、2002-YFP の干渉効果は、京都市株(KYO)には高かった。一方、宮城県東松島市(MU05-10)と愛媛県宇和島市株(EM17)には、打破されたものの病徴発現が遅延した。これらのことから、ZYMV の地域性が干渉効果の有効性に影響すると考えられた。以上のように、本法でも ZYMV-2002 の干渉効果を迅速に検定できることが判明し、その導入適地の判別に利用できる可能性が示された。

(2) VPg の分子擬態と翻訳開始因子との関連性

① VPg・翻訳開始因子の結合の解析：ポティウイルスのゲノム結合蛋白質(VPg)が翻訳開始因子と結合することがこれまでに推定され、その相互作用は宿主植物のウイルス感受性やウイルスの増殖に関係しているとの報告があるが、その分子機構については詳細には明らかになっていない。そこで本研究では、カボチャモザイクウイルス(TuMV)とモデル植物のシロイヌナズナの翻訳開始因子 eIF4E や eIF(iso)4E との相互作用を詳細に解析した。まず、TuMV の感染性 cDNA クローンより、大腸菌による VPg 発現系を構築した。同様にシロイヌナズナの EST クローンから eIF(iso)4E の発現系も構築した。また、VPg と eIF(iso)4E について、それぞれ変異体の調製も行った。調製した種々の蛋白質を用いたプルダウンアッセイによって、VPg と eIF(iso)4E の相互作用について検討した。プルダウンアッセイの結果、VPg と eIF(iso)4E との結合が

eIF(iso)4E の mRNA のキャップ構造との結合部位と重複しており、VPg が eIF(iso)4E に結合したキャップ構造を排除できることを確認した。さらに、この結合に関与している VPg のアミノ酸領域がこれまでの報告とは異なっていることを見出した。続いて、TuMV の VPg がシロイヌナズナの eIF(iso)4E と結合し、その結合を介してさらに eIF(iso)4F との三者複合体を形成することを明らかとし、VPg のウイルスゲノム RNA の翻訳開始への直接的な関与の可能性を指摘した(Miyoshi *et al.*, Biochimie 2006)。次に、VPg と eIF(iso)4E との結合が、宿主植物の翻訳開始因子複合体とウイルスゲノム RNA 上の IRES との結合の安定化に寄与している翻訳開始モデルを提案した(Khan *et al.*, J. Biol. Chem. 2006)。
② VPg による翻訳阻害：さらに、VPg による宿主植物細胞の翻訳阻害の可能性を小麦胚芽無細胞翻訳系を用いて検討し、VPg の添加が翻訳効率を低下させることを見出した。一方、海外のグループは VPg の RNase 活性を報告したが、今回の実験では RNase 活性は追認できず、翻訳阻害は VPg の RNase 活性によるものではないと考えられた。以上から、VPg による宿主細胞 mRNA の翻訳阻害は、VPg が「分子擬態」によって翻訳開始因子と mRNA のキャップ構造よりも強く結合できる能力を介し、リボソームなど翻訳因子の略奪によるものと考えられた(Miyoshi *et al.*, Biochimie 2008)。

以上の翻訳開始因子との結合や翻訳開始阻害に関する研究成果は、下野新聞で平成 20 年 7 月 16 日に報道された。今後は、この結合領域の解析を基にして、宿主植物のウイルスに対する感受性やウイルスの増殖との関係を調査していく予定である。

(3) HC-Pro 抗血清の作成と解析

ポティウイルス属ウイルスはプロテアーゼ、病原性、アブラムシ伝搬性、ジーンサイレンシングサプレッサーなどの機能を持つ HC-Pro を有する。この多機能な HC-Pro は ZYMV などでは弱毒性を決定しているが、そのメカニズムは不明である。そこで、ZYMV 弱毒株の HC-Pro の機能を解析するために、まず強毒株 Z5-1 とその弱毒株 ZYMV-2002 の HC-Pro 領域を pQE30 ベクターに組み込み、得られた形質転換体から His タグ融合 HC-Pro を精製し、ウサギに免疫した。作製した抗血清は ZYMV 感染葉から HC-Pro を特異的に検出できた。次に Z5-1、ZYMV-2002、沖縄県分離株 4S およびその弱毒株 4SCV のカボチャ感染葉からそれぞれの CP が等しい濃度になるように調整して検定したところ、4SCV では感染葉中の HC-Pro が 4S と比べて明らかに減少していることが判明した。このような現象は Z5-1 と ZYMV-2002 の間では認められないこと

から、弱毒化の機構は2種弱毒株間で異なることが示唆された。

(4) HC-Pro と病原性・干渉効果の関連

ZYMV の防除に有効な弱毒株 ZYMV-2002 の干渉効果は、沖縄県の ZYMV 分離株 4S には容易に打破される。そこで 4S から弱毒株 4SCV を選抜したところ、4S に対する高い干渉効果を確認した。そこで、多機能タンパクである HC-Pro 遺伝子領域に着目し、4S と 4SCV の HC-Pro の塩基配列を決定して比較した。その結果、両株間において塩基配列に3箇所、アミノ酸配列に2箇所の変異が確認され、アミノ酸変異は2箇所ともメチオニンがイソロイシンに変異していた。次に、4S の感染性クローンの HC-Pro を 4SCV の HC-Pro と入れ換えたキメラウイルスを作製し、キュウリとカボチャに接種したところ、ごく軽い病徴から無病徴という 4SCV と同程度の弱毒化が認められた。これにより、HC-Pro は 4S においても病原性に関与していることが確認された。一方カボチャにおいて、このキメラウイルスは 4S に対して 4SCV と同等の干渉効果を示した。弱毒株 ZYMV-2002 で HC-Pro が弱毒性を決定しているが干渉効果は決定していないことを合わせて考慮すると、一般的に HC-Pro は弱毒性を決定しているが干渉効果には直接関与していないと考えられた。さらに、4S 株の HC-Pro においてメチオニンがイソロイシンへの変異を導入した点変異体をそれぞれ作製し、キュウリとカボチャに接種した結果、160 番目のアミノ酸が弱毒性を決定していた。次に 160 番目のアミノ酸をバリンに置換すると弱毒性を呈したが、ロイシンに置換した場合は強毒性のままであった。さらに京都分離株 Z5-1 でも 160 番目をメチオニンからイソロイシンに置換したところ、明らかに弱毒化した。よって、ZYMV において HC-Pro の 160 のアミノ酸は病原性に関与していることが判明した。

一方、ZYMV の優良弱毒株 ZYMV-2002 は、元株の強毒株 Z5-1 に強い干渉効果を示し、また圃場レベルでも実用的な干渉効果を発揮する。しかし沖縄株 (4S) は ZYMV-2002 の干渉効果を容易に打破する。そこで、干渉効果の打破に関わるウイルス遺伝子を解明するために、感染性全長 cDNA クローンをを用い Z5-1 と 4S 株の間で様々なキメラウイルスを作製した。これらのキメラウイルスに対する ZYMV-2002 の干渉効果の試験では、Z5-1 の 5' -UTR と P1 を含む領域を 4S 株に置き換えたキメラウイルスは ZYMV-2002 の干渉効果を打破した。一方、4S 株の 3' 末端側約 2000 塩基を Z5-1 と置換したキメラ、逆に Z5-1 の 3' 末端側を 4S 株に置換したキメラはともに打破しなかった。また、ZYMV ゲノムの中央で CI や NIa をコードする領域を置換しても、同

様に打破できなかった。さらに、他のキメラウイルスのチャレンジ接種結果から、4S 株による ZYMV-2002 の干渉効果打破には複数の遺伝子が関与していることが示唆された。以上のような弱毒ウイルスを中心とした解析の成果は、日経新聞で平成 20 年 12 月 25 日に報道された。今後とも、実用面と基礎的側面の双方を持つような研究を推進したい。

(5) オオムギ縮萎縮ウイルス (BaYMV) の分子解析

BaYMV は VPg を有してポティウイルス科の属するが、ポティウイルス属とはゲノム RNA 数や媒介生物などの性状が異なる。日本で発生する BaYMV はビール大麦の品種に対する感染性の違いから、これまで I~IV 型系統に大きく分類されていた。本研究ではまず、それらの全塩基配列を決定した。これまでの系統判別法は、圃場における判別品種の反応に基づいて行われているが、BaYMV の病原性には VPg が関与している可能性がある。そこで、この領域の変異を詳細に解析し、各系統の VPg 領域を RT-PCR-RFLP による遺伝子診断でより正確な系統判別が可能であることを示した。さらに、本手法は混合感染の検出も可能であることが示唆された。また、TuMV と同様に BaYMV の 5' 末端に結合している VPg と宿主植物の翻訳開始因子 (eIF4E または eIF(iso)4E) との相互作用がウイルス感染に関与していると考えられる。日本で発生する BaYMV の系統の違いは VPg の変異による可能性が考えられる。そこでこれらの系統の VPg 領域の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列の比較解析を行った。その結果、VPg の立体構造に変化を与えると考えられるアミノ酸の置換や、ウイルス抵抗性遺伝子 (*rymd*) による抵抗性を打破したヨーロッパ系統におけるアミノ酸変異部位においても変異が認められた。VPg 内の 1 アミノ酸置換によりウイルス抵抗性を打破する新たなウイルスが出現する可能性が高いことから、今後も両タンパク質の相互作用のメカニズムの解析を進め、ウイルス抵抗性品種の育成に繋げたい。

(6) 新しいウイルスベクターの構築の試み

① 2 種外来遺伝子同時発現ベクターの構築：弱毒株 ZYMV-2002 の感染性全長 cDNA クローンをベースにして、ゲノムの CP と NIb との間に NIa cleavage site と外来遺伝子導入部位のセットを 2 組挿入し、2 種外来遺伝子同時発現ベクター pZY2002dvec を構築した。pZY2002dvec にある 2 箇所の外来遺伝子導入部位のひとつに GFP 遺伝子、もう一箇所には強毒 CMV-Pepo2b 遺伝子あるいは弱毒変異導入 CMV-Pepo2bR46C 遺伝子、TBSV-P19 遺伝子などを挿入したクローンをカボチャに接種したところ、接種したすべての植物から GFP

由来の蛍光が観察され、全身感染が認められた。また、pZY2002-GFP-Pepo2b と pZY2002-GFP-Pepo2bR46C が感染した植物では病徴に差異が見られ、pZY2002-GFP-Pepo2bR46C は軽微な病徴しか引き起こさなかったのに対し、pZY2002-GFP-Pepo2b 感染植物は明らかな病徴を呈した。また TBSV-P19 遺伝子を挿入した pZY2002-GFP-TBSV-P19 も病徴を引起した。以上の結果からことから、CMV-2b と TBSV-p19 は ZYMV の病徴発現に関与できることが示された 2 種外来遺伝子同時発現ベクターの構築が可能であり、発現遺伝子が機能することが判明した。

②ポテ以外のウイルスのベクター構築：ポテウイルス属とは異なり、*Carlavirus* 属は分子生物学的解析が遅れている。そこで、そのメンバーであるキク B ウイルス (CVB) の全塩基配列を世界で最初に決定したところ、その全長は 8990nt で、CP のアミノ酸配列はドイツ株と 91.8%、インド株と 90.2% の同一性を示した。ORF4 のアミノ酸配列の同一性が最も低く、この領域は非常に変異に富むことが判明した。次にポテウイルスで用いた方法を適用して CVB の感染性全長 cDNA クローンを作製し、そのクローンをパーティクルガンで接種したところ、野生株と同様にキクとシュンギクに無病徴で感染した (Ohkawa et al., 2008)。CVB の感染性クローンの構築も世界初である。このようにポテウイルスの分子解析に用いた方法が他のひも状ウイルスに適用できることが判明し、今後の展開が大いに期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

① Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K. and Natsuaki, T. (2008). Turnip mosaic virus VPg interacts with Arabidopsis thaliana eIF(iso)4E and inhibits in vitro translation. *Biochimie* 90:1427-1434. 査読有

② Ohkawa, A., Ishikawa-Suehiro, N., Okuda, S. and Natsuaki, T. (2008). Construction of an infectious full-length cDNA clone of *Chrysanthemum virus B*. *Journal of General Plant Pathology* 74(6):434-437. 査読有

③ Wang, W-Q., Natsuaki, T., Kosaka, Y. and Okuda, S. (2006). Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of parental and attenuated isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Journal of*

General Plant Pathology 72(1): 52-56. 査読有

④ Khan M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N. and Goss, D. J. (2006). Interaction of genome-linked protein (VPg) of *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *Journal of Biological Chemistry* 281:28002-28010. 査読有

⑤ Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T. and Natsuaki, T. (2006). Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* 88: 329-340. 査読有

[学会発表] (計 35 件)

① 西川尚志・萩原智美・湯本真理・五月女敏範・加藤常夫・夏秋知英 (2008) オオムギ縮萎縮ウイルスの系統と VPg の変異. 日本植物病理学会大会 平成 20 年 4 月 26 日～28 日 松江市

② 夏秋知英・馬場一樹・久野修司・三好洋・王蔚芹・小堀崇・西川尚志・奥田誠一・小坂能尚 (2008) ズッキーニ黄斑モザイクウイルス弱毒株の HC-Pro の機能解析. 日本植物病理学会大会 平成 20 年 4 月 26 日～28 日 松江市

③ 久野修司・王蔚芹・辻井みや子・小堀崇・西川尚志・奥田誠一・小坂能尚・夏秋知英 (2008) ズッキーニ黄斑モザイクウイルス沖縄株およびその弱毒株の HC-Pro 領域の遺伝子解析と干渉効果の評価. 日本植物病理学会大会 平成 20 年 4 月 26 日～28 日 松江市

④ 三好洋・石川(末廣)典子・岡出隼人・中島秀喜・友尾幸司・夏秋知英 (2007) カブモザイクウイルスゲノム結合蛋白質 (VPg) による宿主翻訳開始阻害. 日本植物病理学会大会 平成 19 年 3 月 28 日～30 日 宇都宮市

⑤ 久野修司・王蔚芹・西川尚志・奥田誠一・小坂能尚・夏秋知英 (2007) ズッキーニ黄斑モザイクウイルスの地域性と干渉効果の迅速評価. 日本植物病理学会大会 平成 19 年 3 月 28 日～30 日 宇都宮市

[図書] (計 1 件)

① 夏秋知英. 弱毒ウイルスの防除機構 (「微生物と植物の相互作用—病害と生物防除—」百町・対馬編、pp404、ソフトサイエンス社) p134-141, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕(計 2件)

- ① 下野新聞 平成 20 年 7 月 16 日掲載「翻訳乗っ取りを解明」
- ② 日経新聞 平成 20 年 12 月 25 日掲載「植物ウイルス感染予防」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏秋 知英 (NATSUAKI TOMOHIDE)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10134264

(2) 研究分担者

三好 洋 (MIYOSHI HIROSHI)

聖マリアンナ医科大・医学部・講師

研究者番号：80322519

西川 尚志 (NISHIGAWA HISASHI)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・助教

研究者番号：60361614

塚本 利朗 (TSUKAMOTO TOSHIROU)

宇都宮大学・遺伝子実験施設・助教授

研究者番号：30236864

(3) 連携研究者

なし