

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02210

研究課題名(和文) 合成分子と蛋白質を駆使した膜蛋白質の動態解明技術の開発

研究課題名(英文) Development of Fluorescence Imaging Technique for Elucidation of Membrane Protein Dynamics Using Synthetic Molecule and Protein

研究代表者

堀 雄一郎 (Hori, Yuichiro)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00444563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質は、細胞内でダイナミックに局在変化することで、生理機能を発揮している。本研究では、内在性膜タンパク質の動態を可視化するために、独自のタンパク質ラベル化技術により、ナノボディと膜染色色素を複合させたハイブリッドプローブを開発した。このプローブは、内在性膜タンパク質を特異的に認識し蛍光強度を上昇させることができるため、生細胞で内在性膜タンパク質を高いコントラストで検出する有用な技術である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日、最も用いられているイメージング技術は、免疫染色と蛍光タンパク質を用いた方法の二つといえる。前者は細胞固定を伴うため生細胞の状態での解析ができず、後者は目的タンパク質との融合タンパク質として発現させるため、内在性のタンパク質を検出することができない。このため、本研究で開発した技術は、これまでに得ることのできなかった内在性タンパク質の動態情報を与える革新的なものとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins exert their physiological functions by dynamically changing their localization in living cells. In this study, to visualize the dynamics of endogenous membrane proteins, we developed a hybrid probe consisting of a nanobody complexed with a membrane staining dye using our protein labeling technology. This probe can specifically recognize endogenous membrane proteins and increase their fluorescence intensity, which is a useful technique to detect endogenous membrane proteins with high fluorescence contrast in living cells.

研究分野：蛍光イメージング、ケミカルバイオロジー

キーワード：ハイブリッドプローブ PYPタグ ナノボディ 合成蛍光色素 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、細胞膜やオルガネラ膜などへ動的に移動することで、生体機能の維持に必須の役割を果たしており、膜タンパク質の動態解明とその解析技術の開発の重要性は益々増している。なかでも、蛍光イメージング法は、細胞における膜タンパク質の局在と機能を明らかにする極めて有用な技術である。今日、最も用いられているイメージング技術は、免疫染色と蛍光タンパク質を用いた方法の二つといえる。前者は、内在性のタンパク質をイメージングできることが利点であるが、細胞固定を伴うため生細胞の状態での解析ができない。一方、蛍光タンパク質による方法では、生細胞のタンパク質をイメージングできるが、目的タンパク質との融合タンパク質として発現させるため、内在性のタンパク質を検出することができない。このため、内在性のタンパク質を生細胞でイメージングする手法は、これまでに得ることのできなかつたタンパク質情報を与える革新的技術となる可能性を秘めている。

我々のグループでは、PYP タグと合成蛍光プローブを用いたタンパク質標識技術を開発してきた^{1,7}。PYP は、紅色硫黄細菌由来の小タンパク質 (125 アミノ酸) であり、リガンドとして桂皮酸やクマリンの誘導体と共有結合することが知られている。これまでに、PYP タグを標識することで蛍光性となる発蛍光プローブを開発し、PYP タグを融合したタンパク質を洗浄操作無しで迅速に生細胞イメージングすることに成功している。しかしながら、本技術も蛍光タンパク質と同様に、標的タンパク質の強制発現を伴うため、原理的に内在性タンパク質のイメージングを行うことができなかった。

近年、タンパク質を生細胞イメージングする技術として、ナノボディを用いた方法が提案されている。ナノボディは、ラクダ科動物の抗体であり、抗原結合部分 (VHH) は 130 アミノ酸程度の小タンパク質である。以前の研究において、膜タンパク質を標的とするナノボディと蛍光タンパク質の融合タンパク質を蛍光プローブとして用いる方法が報告されている。一方、標的タンパク質に結合していない融合タンパク質からも蛍光が観測されるため、シグナルバックグラウンド比が低く、この問題を解決することが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、内在性膜タンパク質に結合すると蛍光強度が増大する発蛍光プローブを開発する。この目的を達成するために、膜に結合し蛍光性となる合成膜染色色素と標的膜タンパク質に特異的に結合するナノボディを組み合わせた合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブを構築する。このハイブリッドプローブにより、内在性膜タンパク質をイメージングする技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) ハイブリッドプローブの設計原理

標的とする膜タンパク質に特異的に結合するナノボディと PYP タグの融合タンパク質 Nb-PYP をハイブリッドプローブのタンパク質部位とする。合成蛍光色素としては、環境応答性蛍光色素の一つである Nile red を選択する。この色素は、水のような溶媒の極性が高い環境下では、ねじれ型分子内電荷移動を引き起こし蛍光が抑制されるが、脂質膜のような極性の低い環境下では、平面型分子内電荷移動が起こり、蛍光強度が増大する。この結果、水中において遊離状態であるときは蛍光強度が低く、細胞膜に結合すると蛍光性となる。Nile red に PYP タグリガンドを連結し、Nb-PYP をラベル化することで、Nile red と Nb-PYP からなるハイブリッドプローブを構築する。このハイブリッドプローブは、ナノボディ部位が標的膜タンパク質に結合した時、細胞膜に Nile red 部位が近接する。その近接効果により Nile red が細胞膜脂質に結合する。その結果、Nile red の蛍光強度が上昇し、結果として、ハイブリッドプローブにより細胞膜タンパク質を検出することが可能となる。本研究では、標的タンパク質を EGFR とし、EGFR に結合するナノボディを Nb7D12⁸ もしくは NbEgA1⁸ とする。

(2) ラベル化分子の合成とハイブリッドプローブの構築

PYP リガンドを 4-ヒドロキシ桂皮酸チオエステル誘導体として、その 2 位から PEG リンカーを伸ばし、Nile red と連結する。Nile red は極めて脂溶性が高いため、水溶性を向上させるために、リンカー中にスルホン酸を有するシステイン酸を導入する。PYP タグは、リガンドとチオエステル交換反応により結合するが、結合時にリガンドからチオフェノール誘導体が脱離する。その脱離基には、ジニトロベンゼンを組み込んでおくことで、ラベル化速度を向上させる。このようにして設計したラベル化分子を NRDNB と名付け合成した。この NRDNB により、Nb-PYP をラベル化し、ハイブリッドプローブを構築した。

(3) ハイブリッドプローブの評価

各種分光法を用いて、NRDNB の分光学的性質及びラベル化反応を評価した。また、ハイブリッドプローブを用いたイメージング実験では、HEK293T 細胞及び A431 細胞を用い、共焦点蛍

顕微鏡により EGFR を可視化した。更に、内在性 EGFR のイメージングを評価するために、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。

4. 研究成果

(1) NRDNB の分光学的性質とラベル化反応

NRDNB が溶媒の極性に応答して蛍光強度が変化するかを検討するために、極性の異なる各種溶媒 (20 mM HEPES buffer, MeOH, BuOH, Octanol) に溶解し、蛍光スペクトルを測定した。その結果、HEPES buffer 中では非蛍光性で、MeOH、BuOH、Octanol の順に蛍光強度が増大することが分かった (図 1)。次に、liposome (LUV) を DOPC:Cholesterol=2:1 の割合で Lipofast を用いて、作成した。この liposome を NRDNB と混合すると、NRDNB の蛍光強度が増大することから、脂質成分に結合すると蛍光強度が増大することが示された。更に、NRDNB が細胞膜の構成成分を持つ小胞膜と結合したときの蛍光特性を観測するため、Giant plasma membrane vesicle (GPMV)⁹ を HeLa 細胞から作成した。NRDNB と GPMV をインキュベートし、共焦点顕微鏡で観測するとその膜上から蛍光が観測された。以上の結果から、NRDNB は、生細胞においても細胞膜に結合すると蛍光強度を増強させることが示唆された。

次に、NRDNB がナノボディと PYP タグの融合タンパク質に結合するかを検証した。NRDNB の PYP タグリガンド部位である 4-ヒドロキシ桂皮酸は、PYP タグに結合すると 446 nm 付近の吸光度を上昇させることが分かっている。そこで、NRDNB と Nb7D12-PYP 及び NbEgA1-PYP を反応させたところ、該当する波長の吸光度が上昇したことから、NRDNB とそれぞれの融合タンパク質は結合していることが分かった (図 2)。また、これらのラベル化反応後、SDS-PAGE で解析すると、該当する融合タンパク質のバンド部位が蛍光を発することからも、NRDNB は共有結合で PYP と結合していることが確認された。

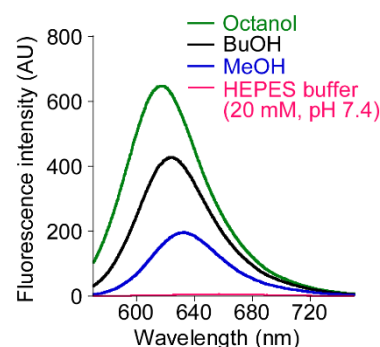


図 1. NRDNB の環境応答性。

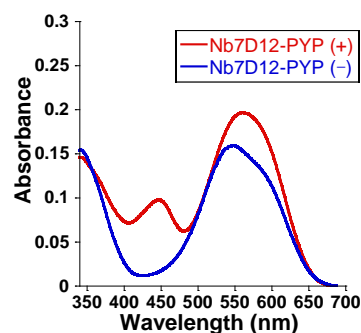


図 2. NRDNB によるラベル化。

(2) ハイブリッドプローブによる過剰発現 EGFR の生細胞イメージング

HEK293T 細胞は、内在性 EGFR を発現しないため、EGFR 遺伝子を一過性に過剰発現させてハイブリッドプローブによりその EGFR を検出できるかを検討した。まず、Nb7D12-PYP 及び NbEgA1-PYP を NRDNB でラベル化し、ハイブリッドプローブを構築し、EGFR 遺伝子を導入した HEK293T 細胞と非導入細胞に添加し、顕微鏡で観察した。その結果、Nb7D12-PYP のハイブリッドプローブを添加した場合、導入細胞と非導入細胞で明確に違いのある蛍光像は得られなかった。一方、NbEgA1-PYP 由来のハイブリッドプローブでは、EGFR 発現細胞の細胞膜から蛍光が観測されたのに対し、非発現細胞からは蛍光が観測されなかった。更に、蛍光が観測された細胞に NRDNB をラベル化していない過剰量の NbEgA1-PYP を添加したところ、その蛍光が消失した。以上の実験から、NbEgA1-PYP 由来のハイブリッドプローブは、ナノボディ部分が EGFR に結合するとともに、NRDNB が細胞膜と結合し蛍光を発することが示された。NRDNB は、非特異的に細胞膜に結合するのではなく、ナノボディと EGFR の特異的な相互作用が蛍光検出に必要であることも分かった。一方、Nb7D12-PYP 由来のハイブリッドプローブで蛍光が観測されなかった原因は、NRDNB が EGFR 発現細胞特異的に細胞膜に結合していなかったことが考えられる。このナノボディは、EGFR のドメイン III 上部に結合するものであるが、その結合部位は、細胞膜から離れた位置にある。これに対し、NbEgA1 は、EGFR のドメイン III の下部に結合し、比較的細胞膜に近い。このことから、Nb7D12-PYP 由来のハイブリッドプローブでは、色素部位が細胞膜に空間的に届かなかったと考えられる。

(3) ハイブリッドプローブによる内在性 EGFR の生細胞イメージング

生細胞イメージング実験を内在性 EGFR が発現している A431 細胞を用いて行った。まず、NRDNB で NbEgA1-PYP をラベル化しハイブリッドプローブを構築し、A431 細胞に添加した。その結果、全ての細胞の細胞膜から蛍光が観測された。前項に示した過剰発現系の場合、蛍光が観測されなかった細胞も確認できたが、これはトランスフェクション効率が 100%ではなかったことに由来する。ハイブリッドプローブを添加した A431 細胞にラベル化していない過剰量の NbEgA1-PYP を更に添加したところ、蛍光の減少が観測された。これは、EGFR に対してナノボディ部位を介して結合していたハイブリッドプローブが、非ラベル化ナノボディに置き換わり EGFR から解離したものと考えられる。以上の結果から、ハイブリッドプローブは、内在性 EGFR を特異的に認識し蛍光強度を増大させていると考えられる。更に、内在性 EGFR の蛍光検出の確認を得るために、siRNA を用いた EGFR のノックダウンを行った。エレクトロポレーションにより、siRNA を導入し EGFR の発現量をウェスタンブロットで確認したところ、EGFR の発現量

は、約 30%にまで減少していた。そこで、この細胞に対して、ハイブリッドプローブを添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観測したところ、細胞膜上からの蛍光が顕著に減少した。更に、その蛍光強度を定量したところ、発現量と同程度の 30%程度にまで減少していた。以上の結果により、ハイブリッドプローブは、EGFR と特異的に結合し蛍光を発していることが明らかとなった。

本研究では、細胞膜染色色素とナノボディをタンパク質ラベル化技術によってハイブリッドプローブを構築することで、内在性膜タンパク質を可視化することに成功した。この結果、前述した免疫染色や蛍光タンパク質のこれまでの限界を克服することができたといえる。また、ナノボディを他の特異的結合タンパク質に変更することで、より広範なタンパク質への応用が可能であり、汎用性の向上が見込まれる。このように、本研究の成果は、内在性膜タンパク質の新しい解析技術を生み出したことであり、今後の膜タンパク質動態のイメージング研究への応用が期待される。

<引用文献>

- ① Reja, S. I., Minoshima, M., Hori, Y., Kikuchi, K. Development of an Effective Protein-Labeling System Based on Smart Fluorogenic Probes. *J. Biol. Inorg. Chem.* Vol. 24, pp. 443–455, 2019
- ② Kumar, N., Hori, Y., Kikuchi, K. Photoactive Yellow Protein and Its Chemical Probes: an Approach to Protein Labelling in Living Cells. *J. Biochem.* Vol. 166, pp. 121–127, 2019
- ③ Gao, J., Hori, Y., Nishiura, M., Bordy, M., Hasserodt, J., Kikuchi, K. Engineered Protein-Tag for Rapid Live-Cell Fluorogenic Visualization of Proteins by Anionic Probes. *Chem. Lett.* Vol. 49, pp. 232–235, 2020
- ④ Gao, J., Hori, Y., Takeuchi, O., Kikuchi, K. Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch. *Bioconjug. Chem.* Vol. 31, pp. 577–583, 2020
- ⑤ Kumar, N., Hori, Y., Nishiura, M., Kikuchi, K. Rapid No-Wash Labeling of PYP-Tag Proteins with Reactive Fluorogenic Ligands Affords Stable Fluorescent Protein Conjugates for Long-Term Cell Imaging Studies. *Chem. Sci.*, Vol. 11, pp. 3694–3701, 2020
- ⑥ Gao, J., Hori, Y., Shimomura, T., Bordy, M., Hasserodt, J., Kikuchi, K. Development of Fluorogenic Probes for Rapid High-Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin 3. *ChemBioChem*, Vol. 21, pp. 656–662, 2020
- ⑦ Reja, S. I., Minoshima, M., Hori, Y., Kikuchi, K. Near-Infrared Fluorescent Probes: a Next-Generation Tool for Protein-Labeling Applications. *Chem. Sci.*, Vol. 12, pp. 3437–3447, 2021
- ⑧ Schmitz, K. R., Bagchi, A., Roovers, R. C., van Bergen en Henegouwen, P. M., Ferguson, K. M. Structural Evaluation of EGFR Inhibition Mechanisms for Nanobodies/VHH Domains. *Structure*, Vol. 21, pp. 1214–1224, 2013
- ⑨ Sezgin, E., Kaiser, H. J., Baumgart, T., Schwille, P., Simons, K., Levental, I. Elucidating Membrane Structure and Protein Behavior Using Giant Plasma Membrane Vesicles, *Nat. Protoc.* Vol. 7, pp. 1042–1051, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kumar N, Hori Y, Kikuchi K	4. 巻 18
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of DNA Methylation Based on Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Rec	6. 最初と最後の頁 1672-1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.201800039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori Yuichiro, Otomura Norimichi, Nishida Ayuko, Nishiura Miyako, Umeno Maho, Suetake Isao, Kikuchi Kazuya	4. 巻 140
2. 論文標題 Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1686 ~ 1690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b09713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Reja Shahi Imam, Minoshima Masafumi, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Development of an effective protein-labeling system based on smart fluorogenic probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 443 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00775-019-01669-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kumar Naresh, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 166
2. 論文標題 Photoactive yellow protein and its chemical probes: an approach to protein labelling in living cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 121 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz051	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 52
2. 論文標題 Chemical Tools with Fluorescence Switches for Verifying Epigenetic Modifications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 2849 ~ 2857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.9b00349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Takeuchi Osamu, Kikuchi Kazuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 577 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Bordy Mathieu, Hasserodt Jens, Kikuchi Kazuya	4. 巻 49
2. 論文標題 Engineered Protein-tag for Rapid Live-cell Fluorogenic Visualization of Proteins by Anionic Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 232 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumar Naresh, Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Kikuchi Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid no-wash labeling of PYP-tag proteins with reactive fluorogenic ligands affords stable fluorescent protein conjugates for long-term cell imaging studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3694 ~ 3701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC00499E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gao Jingchi, Hori Yuichiro, Shimomura Takashi, Bordy Mathieu, Hasserodt Jens, Kikuchi Kazuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Development of Fluorogenic Probes for Rapid High Contrast Imaging of Transient Nuclear Localization of Sirtuin?3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 656 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Torii Kenji, Hori Yuichiro, Watabe Keiichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 93
2. 論文標題 Development of Photoswitchable Fluorescent Molecules Using Arylazopyrazole	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 821 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Reja Shahi Imam, Minoshima Masafumi, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Near-infrared fluorescent probes: a next-generation tool for protein-labeling applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0sc04792a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 堀 雄一郎
2. 発表標題 蛍光スイッチ機能を持つ エピジェネティクス可視化ツールの開発
3. 学会等名 生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichiro Hori
2. 発表標題 Development of Fluorogen/Protein Hybrid Probes for Imaging Endogenous Biomolecules
3. 学会等名 Institute for Protein Research International Seminar “Frontiers in Peptide Science 2018” (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hori, Y., Hirayama, H., Benedek, Z., Suzuki, T., Kikuchi, K.
2. 発表標題 Development of Multicolor Fluorogenic Probes for Elucidating Role of GLUT4 N-Glycan in Intracellular Trafficking
3. 学会等名 2017 KSMI-FASMI Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hori, Y.
2. 発表標題 Chemical Probes with Fluorogenic Switch for Imaging Modified Protein and DNA
3. 学会等名 ISBC2017 The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuichiro Hori
2. 発表標題 Fluorescence Imaging of Endogenous Biomolecules Using Synthetic Fluorogens and Proteins
3. 学会等名 Chemical Biology Mini-Symposium (Bath University) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	クマール ナレッシュ (Kumar Naresh)		
研究協力者	レジャ シャヒ イマーム (Reja Shahi Imam)		
研究協力者	西浦 美也子 (Nishiura Miyako)		
研究協力者	高 靖馳 (Gao Jingchi)		
研究協力者	森 和馬 (Mori Kazuma)		
研究協力者	山崎 のぞみ (Yamazaki Nozomi)		
研究協力者	鳥井 健司 (Torii Kenji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	ENS de Lyon			