

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06256

研究課題名（和文）植物におけるアポミクシス分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms of apomixis in plants

研究代表者

高木 優（TAKAGI, MASARU）

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40357348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：開発した遺伝子サイレンシング技術（CRES-T法）を基盤として、植物における未受精でクローン種子をつくるアポミクシス現象を人為的に誘導する目的で、高頻度で不定胚を誘導するキメラリプレッサーを単離し、母方2n組織である胚嚢内皮で発現させた結果、一つの胚珠内に受精胚とアポミクシス性胚と考えられる2つの魚雷型胚を胚珠内に同時に持つ形質転換体の単離に成功した。また、未受精で胚乳を肥大させるESPと名付けた5種類の転写因子に対するキメラリプレッサーを見出した。それらのイネオーソログに対するキメラリプレッサーを発現するイネを作製し、受精なしで明瞭な胚珠の肥大と胚乳形成を誘導できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果を基に、植物における受精と種子形成の制御機構の全容である「受精機構の謎」と、その進化的役割も解き明かすことができると考えられる。加えて、受精は子孫となる胚に遺伝的バリエーションをもたらし、生存戦略にとって有利になることは明白であるが、「植物の胚乳発生に受精は必須なのか」という問いに対しての解答を得ることができる。加えて本アポミクシス誘導技術をベースに、主要穀物でF1ハイブリッド種を固定できれば、20%の増産が見込まれ、増産分をバイオエタノール生産に流用した場合、主要穀物の世界レベルの一年間の生産量から概算して下2億トンCO₂削減効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Using the newly developed gene silencing technology (CRES-T), we isolated chimeric repressors that frequently induces adventitious embryos for the purpose of artificially inducing the apomixis phenomenon. As a result of expression in the embryonic endothelium, which is a maternal 2n tissue, we succeeded in isolating a transformant having two torpedo-type embryos, which are considered to be a fertilized embryo and an apomixis embryo, in one ovule at the same time. We also found a chimeric repressor for five transcription factors named ESP, which enlarges the endosperm without fertilization. It was revealed that rice plants expressing a chimeric repressor for these rice orthologs could be produced endosperm formation without fertilization.

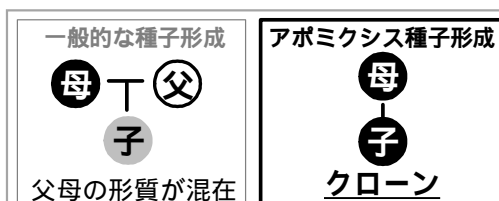
研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写因子 アポミクシス キメラリプレッサー 転写制御 胚発生 胚乳発生

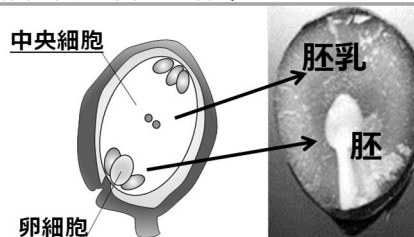
1. 研究開始当初の背景

植物では、未受精で母親由来のクローン種子を形成する無融合生殖(アポミクシス)現象が知られている。アポミクシス(図1)は、自然界では400種ほどの植物品種で確認されているが、主要穀物では見つかっていない。アポミクシスの原理を解明し、人為的にアポミクシスを誘導する事ができれば、高い生産性を持つエリート植物やF1ハイブリッドの特性を固定することが可能となり、育種に革命をもたらすと考えられている。これまでにアポミクシス植物種において、アポミクシス性喪失変異体がいくつか単離されているが、これらの関連遺伝子を用いてアポミクシスを誘導することに成功した例は未だない。

植物の種子は、『胚』と『胚乳』の二つから成り、2つの発生は相互に密接に関連しているが、それぞれの発生は独立に制御されているため、人為的アポミクシス誘導には、胚と胚乳の個々の発生誘導と、その統合による種子の形成が不可欠である(図2)。しかし、胚と胚乳のそれぞれの発生制御機構の難解さから、個別の発生現象の解析に終始せざるを得ず、統合的な研究は進んでいなかった。これまでの研究で、母ゲノム特異的なエピゲノム制御が、アポミクシスの抑制に関与していることが判ってきた。最近、減数分裂を回避して2nの卵細胞を作る多重変異体が単離され、また、母ゲノムでインプリントされているBBM転写因子が卵細胞の発生に関与している事が示されているが(Khanday et al., 2019)、自然のアポミクシスを再現する為に必要な鍵因子の同定はなされていない。胚乳においては、Polycomb repressive complex 2 (PRC2)が、胚乳の単為性発生抑制に関与していることが判っているが、PRC2の下流の制御遺伝子などの抑制機能の詳細については、ほとんど判っていない。本研究で「アポミクシス分子機構の解明」が達成できれば、植物が受精システムの獲得によりどのようにアポミクシス抑制機構を獲得したのか、受精と種子形成の制御機構の全容である「受精機構の謎」と、その進化的役割も解き明かすことができると考えられる。加えて、受精は子孫となる胚に遺伝的バリエーションをもたらす、生存戦略にとって有利になることは明白であるが、「植物の胚乳発生に受精は必須なのか」という問いに対する明瞭な解答は未だ無い。これら、胚乳においても単為発生抑制機構を解明できれば、胚乳発生に関わる受精の役割を解き明かすことが可能になると考えられる。



【図1】アポミクシスとは母植物が受精せずに胚発生する現象。母親と全く同じクローン種子を作ることからF1雑種形質の固定が可能。



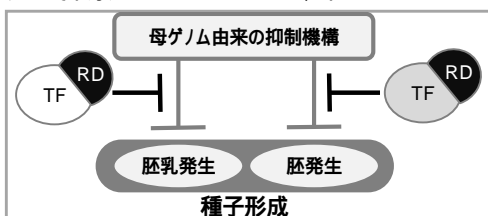
【図2】種子形成の仕組み
植物の種子形成は、卵細胞と中央細胞がそれぞれ独立に精核と受精(重複受精)することで「胚」と「胚乳」を形成する。「胚」と「胚乳」の2つの発生イベントが必要である。

2. 研究の目的

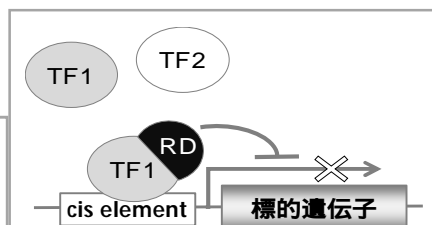
本研究では、独自性の高い植物転写因子リソースと胚発生研究・転写因子研究の経験を活かして、受精を介さずにクローン種子を形成する『アポミクシス』を制御する分子機構の解明と、育種的、産業的にも重要なアポミクシスを人為的に誘導する技術確立することを目指す。それにより、バイオ燃料・バイオ素材の生産に有用な高バイオマス、高生産性を持つ新品種の育種を加速し、また、F1有用形質の固定によって生産量を増加させ、直接的には増産した糖や油脂をバイオ燃料・素材生産に用いることで、持続的な低炭素社会の実現に貢献する。

3. 研究の方法

これまでのアポミクシス研究は、ゲノム比較解析により、アポミクシス座の探索が主であったが、未だアポミクシス誘導遺伝子の単離は成功していない。研究代表者は、これまでのゲノム解析とは異なり、「植物は進化の過程で受精機構の



【図3】本研究の独自のアプローチ
通常では「胚」と「胚乳」発生を抑制している因子を、キメラリプレッサーを用いて解除することで、受精なしでの種子形成=アポミクシスを実現する。



【図4】キメラリプレッサー(CRES-T法)の概要
任意の転写因子に植物特有の転写抑制ドメイン(RD)を結合させることにより人為的にリプレッサーに変換したものを、多重変異体同様の表現型をドミナントに引き起こすことができる。(Hiratsu et al., Plant J, 2003)。

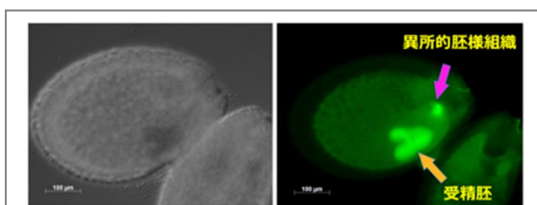
獲得に伴い、アポミクシスの胚・胚乳発生を抑制するシステムを発達させた」という仮説に基づき(図3)、抑制を解除することによってアポミクシスを誘導できると考え、研究代表者が開発した遺伝子サイレンシング法(Chimeric REpressor Silencing Technology: CRES-T、図4)を用いて、アポミクシスの脱抑制に関わるキメラリプレッサーの同定をおこなう。キメラリプレッサーは、機能重複する内在性の転写因子に優先して標的遺伝子の発現を抑制し、多重変異体と同様の表現型を引き起こすことのできる優れた研究ツールである(Hiratsu et al. 2003)。研究代表者は、この独自のツールを利用してアポミクシスに対する抑制を「解除する因子」の探索をおこなうため、シロイヌナズナ雄性不稔変異体(*ap3-1*)に形質転換した全転写因子(約2,000個)に対するキメラリプレッサー種子ライブラリーを作成し、受精なしでさやと胚珠が膨らむラインのスクリーニングをおこなう。加えて、受精なしで、胚、胚乳発生を誘導する制御因子を見だし、それらの作用機作を解析することによって「胚」と「胚乳」の発生プロセスを紐解き、アポミクシスの全容解明をおこなう。

4. 研究成果

本研究においては、「胚」および「胚乳」をそれぞれ未受精で誘導しうる候補因子の単離を行った。研究代表者のグループで独自に開発した「キメラリプレッサー遺伝子サイレンシング法(CRES-T法)」を用いたスクリーニングにより、シロイヌナズナ転写因子約1,600種の中から、アポミクシス形成に資すると考えられる未受精で胚乳発生、胚発生を誘導するキメラリプレッサーを単離した。さらに単離した因子について、それぞれが持つ胚発生、胚乳発生誘導能について詳細な解析を進めた。

(1) 不定胚形成因子を用いた胚珠内クローン胚誘導

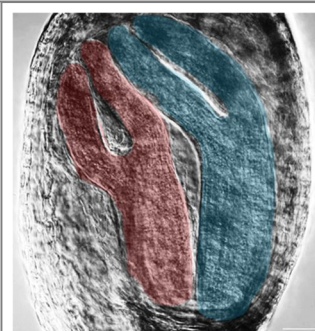
本研究では減数分裂の回避や卵細胞の単為発生を経ない、母親由来の細胞からの『不定胚形成型アポミクシス』を誘導するシステム開発をおこなった。胚珠の母親由来細胞からの不定胚形成誘導系は、多胚性の柑橘類で知られる珠心胚(母組織由来の不定胚)型のアポミクシスを模倣したものであり、多胚性柑橘類においては胚珠内で形成された不定胚が、交雑胚と同様に発生し、休眠、発芽することが一般的に知られている。未受精でのクローン胚形成の戦略として、母親由来細胞からの不定胚誘導系の開発を行った。本研究プロジェクトにおいては、不定胚誘導因子の単離と不定胚誘導能の強化。



【図5】強化WUSをVPEプロモーターで異所発現させたシロイヌナズナの胚珠
母親の組織である内珠皮で、胚マーカーである*ABI3pro::GFP*の蛍光がみられる(ピンク矢印)。
左:明視野、右:蛍光観察。

本研究プロジェクトにおいては、不定胚誘導因子の単離と不定胚誘導能の強化。内皮や珠心組織(母方由来の2nの組織)で発現するプロモーターの同定。強化型不定胚誘導因子と母組織プロモーターを組み合わせ、母組織からの不定胚誘導、の順で研究を遂行した。

これまでにホルモンフリー条件下で実生から不定胚を誘導するキメラリプレッサー3グループ7種を単離、これらのうち特に不定胚誘導率の高い転写因子であるWUS, RSE1を特定した。さらに各因子についてドメイン改変を行い、ほぼ100%不定胚を誘導する強化型コンストラクトを得た。不定胚誘導因子を胚珠内の母組織で特異的に発現するためのプロモーターとして、内珠皮の第2層3層で発現する δVPE 遺伝子プロモーター(上流約3 kbp)



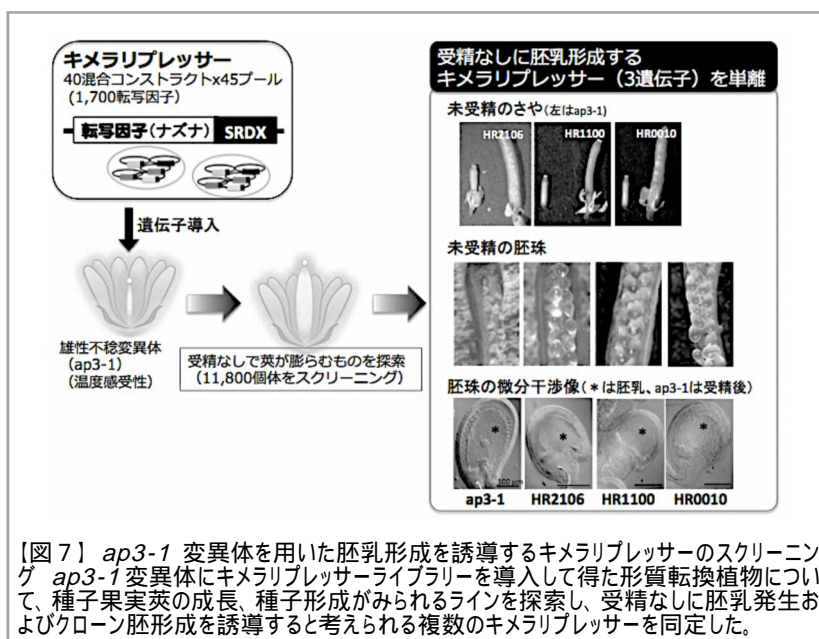
【図6】RSE1をTT12プロモーターで異所発現させたシロイヌナズナの胚珠
受精胚に加えて、2つ目の魚雷型胚が存在する。

と、内珠皮の第1層で発現する*TT12*遺伝子プロモーター(上流約2.2 kbp)を単離した。クローニングし、GFPレポーター遺伝子を用いて組織特異的発現を確認していた。また、新規に胚珠内に形成された組織が胚であることを確認するため、胚特異的に発現する*ProABI3::GFP*マーカー植物体を作成した。前述の2つのプロモーター(δVPE プロモーター、*TT12*プロモーター)を用いて、上記の強化型不定胚誘導因子と組織特異的プロモーターを組み合わせたコンストラクトを作成した。これを導入すべく、*ProABI3::GFP*マーカー植物体のライン化を進め、安定して胚組織のみが光るラインを選定しつつ、そのラインに作成したコンストラクトを順次導入した。これらのうち、強化WUSと δVPE プロモーターを組み合わせた結果、母親の組織である胚珠内に、異所的な胚組織を誘導することに成功した(図5)。さらに、RSE1キメラリプレッサーを

TT12 遺伝子プロモーターで誘導したキメラ遺伝子を発現する胚珠では、受精胚とアポミクシス性クローン胚と考えられる2つの魚雷型胚をもつラインが観察された(図6)。現在、一方の胚が未受精胚であることを確認するため、GFPを発現する花粉親と交配した。不定胚を用いたこれらの手法は、1980年代から国内で培われた不定胚培養技術を基盤としており、これまで行われていない独創的な試みとして、国内外の専門家から高い評価と強い期待を受けている。また、過剰発現、もしくは、キメラリプレッサー法により、優性的に形質を誘導するため、形質転換可能な実用品種には、直ちに应用可能という優位性があると考えられる。

(2) 受精非依存的に胚乳形成を誘導するキメラリプレッサーの解析

クローン胚誘導とは異なり、アポミクシス性胚乳誘導技術開発についての報告は、ほとんど無い。本研究では、「植物は多様な後代を得るために受精システムを獲得したため、未受精でのクローン次世代増殖システム(アポミクシス)を抑制する機構を進化させた」という考えに基づき、独自に開発した転写因子機能解析ツールであるキメラリプレッサーを利用してアポミクシスの抑制を「解除する



因子”の探索を行った。シロイヌナズナゲノムにコードされている全転写因子 2,000 個をほぼ網羅する 1,600 個の転写因子に対するキメラリプレッサーコンストラクトを作成し、40 個ずつのグループに分けて温度感受性雄性不稔変異体である *ap3-1* を形質転換し、約 18,000 の T1 個体を探索、未受精で胚乳発生を誘導するキメラリプレッサーのスクリーニングを行なった。

受精非依存的に胚珠が発達する 5 種 3 グループのキメラリプレッサーを単離し、それぞれの元となる遺伝子を *ELONGATION OF SILIQUE WITHOUT POLINATION1a-c (ESP1a-c)*, *ESP2*, *ESP3* と名付けた。これらの植物において受精非依存的に発生した胚珠を観察した結果、*Pro35S:ESP1aSX*, *Pro35S:ESP2SX*, *Pro35S:ESP3SX* において、異常な細胞分裂などを伴わない、より正常に近い胚珠肥大が観察されたことから、*ESP1a*, *ESP2*, *ESP3* をアポミクシスに資する受精非依存的胚乳発生誘導因子候補とし、それぞれ個別にアポミクシス実現に向けた解析を行った。これらの植物において受精非依存的に発生した胚珠を観察した結果、*Pro35S:ESP1aSX*, *Pro35S:ESP2SX*, *Pro35S:ESP3SX* において、異常な細胞分裂などを伴わない、より正常に近い胚珠肥大が観察されたことから、*ESP1a*, *ESP2*, *ESP3* をアポミクシスに資する受精非依存的胚乳発生誘導因子候補とし、それぞれ個別にアポミクシス実現に向けた解析を行った(図7)。

(2)-1. 受精非依存的に胚乳発生を誘導する *ESP3* の解析

未受精での胚珠肥大を効率的に誘導する *Pro35S:ESP3SX* 発現植物は、バニリン染色により未受精で種皮が形成されることを確認した。発現解析の結果、*ESP3* プロモーターは受精後の胚乳で発現し、未受精の胚珠では発現しないことがわかった。この結果は、*Pro35S:ESP3SX* による未受精胚珠の肥大が *ESP3* の機能抑制によって誘導されたものではないことを示唆する。そこで、*ESP3* 過剰発現体 (*Pro35S:ESP3*) の表現型を確認したところ、未受精胚珠の肥大が確認され、キメラリプレッサー植物体の表現型は実際には *ESP3* 過剰発現体の表現型であることが明らかとなった。つまり、*Pro35S:ESP3SX* における未受精での胚珠肥大は、本来ならば受精後のみ発現するはずの *ESP3* が異所的に受精前に発現したことによって誘導された、人為的な

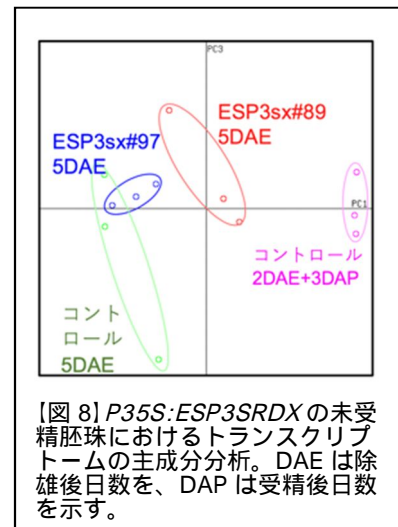
変化であると考えられる。

Pro35S:ESP3SX で誘導された未受精の胚乳が胚を養育できるかについて single fertilization 法を用いて調べた結果、自立して植物体まで生育できる魚雷型胚まで養育する能力があることがわかった。胚珠のトランスクリプトーム解析の結果、*Pro35S:ESP3SX* の未受精で肥大した胚珠は、未受精胚珠と受精胚珠の中間的な遺伝子発現パターンを示した(図8)。特に顕著な変化としては、受精胚珠特異的に発現上昇する細胞分裂や細胞壁形成関連遺伝子群の発現が上昇していた。これは、バニリン染色でも確認された種皮形成に伴う現象と考えられる。一方で、胚の発生(養育)に関連する遺伝子の発現を個別に確認したところ、受精後に発現上昇する糖代謝関連酵素インペルターゼや、糖トランスポーター SWEET の発現が、*Pro35S:ESP3SX* の未受精胚珠で発現していることがわかった。そこで胚珠の糖分析を行ったところ、

Pro35S:ESP3SX の未受精胚珠においては、野生型の受精後特異的に蓄積するヘキソース類やデンプンの蓄積が確認された(PCT/JP2019/008706)。これらの結果から、*Pro35S:ESP3SX* における未受精での胚珠肥大と、胚養育能力の獲得に、未受精での糖の蓄積が関与する可能性が示唆された。ESP3 キメラリプレッサー植物体の表現型は過剰発現体の表現型と同様であることから、ESP3 は植物体内でリプレッサーとして機能し、糖関連遺伝子の発現を抑制する因子を抑制することで糖蓄積を誘導すると考えられる。ESP3 のターゲット遺伝子を特定し、ゲノム編集などでその遺伝子を破壊することで、遺伝子組換えによらない自発的胚珠発達が可能になると考えられる。本研究により単為性胚乳発生を人為的に誘導できれば、これまでいずれの機関も達成できていない受粉を必要としない完全アボミクシスの誘導が可能となる。

(2)-2. 受精非依存的に胚乳発生を誘導する ESP1a の解析

未受精胚珠の肥大を誘導する ESP1a キメラリプレッサー (*Pro35S:ESP1aSX*) 発現体は、バニリン染色によって種皮の形成を確認するとともに、精細胞が一つしかない *kokopelli* 変異体を用いた Single fertilization 実験によって、*Pro35S:ESP1aSX* の未受精で肥大した胚乳が受精胚を養育しうることを確認した。オリジナルプロモーターの制御下で ESP1a キメラリプレッサーを発現させる *ProESP1a:ESP1aSX* ラインの作成と評価を行ったところ、未受精での胚珠肥大、種皮形成(プロアントシアニジンの蓄積)が効率よくみられた。しかし一方で、表現型が顕著なラインでは、成育遅延、花成遅延に加えて、深刻な稔性低下が見られた。稔性低下の原因は未受精時に先に胚乳のみが発生を開始することで、胚珠が肥大し、胚嚢内の細胞の配置が変化したために、正常な受精が妨げられることが原因と考えられる。人為的アボミクシス誘導においては胚も未受精で発達することから、この稔性低下は問題にならないが、成育遅延は問題なため、より適したプロモーターを用いる必要があると考えられる。一方で、ゲノム編集などの非遺伝子組換え法で ESP1a キメラリプレッサーにおける胚乳自動発生の形質を再現しうるかどうかを検証するため、CRISPER—Cas9 法を用いて *esp1a* ノックアウト体を作成し、観察を行った。その結果、*esp1a* の受精胚珠において胚乳の過剰発達と胚の発達不全が見られた。これは、既知の未受精胚乳発生変異体である *mea* 変異体や *fis* 変異体と類似の表現型であり、すなわち、*esp1a* ノックアウト体においても未受精で胚乳が発生しうることを示す。この結果から *ESP1a* キメラリプレッサーラインで観察された未受精胚乳発生の表現型がゲノム編集でも再現しうる可能性が示された。



【図8】*P35S:ESP3SRDX* の未受精胚珠におけるトランスクリプトームの主成分分析。DAE は除雄後日数を、DAP は受精後日数を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 高崎寛則, 池田美穂, Yilin Zhang, 丸山大輔, 光田展隆 木下哲, 高木優
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるENDOSPRM3の機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yilin Zhang, Hironori Takasaki, Miho Ikeda, Daisuke Maruyama, Nobutaka Mitsuda, Tetsu Kinoshita, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 Analysis of ENDOSPERM3, which regulates fertilization-independent endosperm development
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山潤, 山形翼, 高崎寛則, 池田美穂, 高木優
2. 発表標題 分化全能性を制御する転写因子RSE1 の機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho Ikeda, Tsubasa Yamagata, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 RSE1(REPRESSOR OF SOMATIC EMBRYOGENESIS 1) is a transcription factor that regulates cell totipotency in Arabidopsis
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hironori Takasaki, Miho Ikeda Nobutaka Mitsuda, Tetsu Kinoshita, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 ENDOSPERM3 is a transcription factor that regulates fertilization-independent endosperm development
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubasa Yamagata, Miho Ikeda, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 Analysis of RSE1 (REPRESSOR OF SOMATIC EMBRYOGENESIS 1) transcription factor that control cell totipotency in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物生理学会 第59回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山形翼、池田美穂、高木優
2. 発表標題 分化全能性を制御する転写因子CR117の機能解析
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会 第35回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林陽葉莉、池田美穂、高木優
2. 発表標題 SNB1転写因子による単為結果性誘導メカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会 第35回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hibari Hayashi, Miho Ikeda, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 Analysis of SNB1 transcription factor that induces parthenocarpy
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsubasa Yamagata, Miho Ikeda, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 Analysis of transcription factor that regulates plant cell totipotency in Arabidopsis
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hibari Hayashi, Miho Ikeda, Masaru Ohme-Takagi
2. 発表標題 Analysis of SNB1 transcription factor that positively regulate parthenocarpy
3. 学会等名 日本植物生理学会 第59回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 受精無しで胚乳発生を誘導する遺伝子	発明者 高木優、池田美穂、 光田展隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P190098W0	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 受精無しで果実委肥大発生を誘導する遺伝子	発明者 高木優、池田美穂、 光田展隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P190099W0	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 受精を介さず種子植物の胚乳発生を誘導する核酸分子及びベクター、並びに受精を介さず胚乳を発生しうる組換え種子植物及びその作製方法	発明者 高木優、池田美穂、 光田展隆、大島良美	権利者 産業技術総合研 究所生物 埼玉 大学
産業財産権の種類、番号 特許、039033	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 受精を介さず種子植物の果実の生長を誘導する核酸及びベクター、並びに受精を介さず果実の生長が誘導される組換え種子植物及びその製造方法	発明者 高木優、池田美穂、 光田展隆、大島良美	権利者 産業技術総合研 究所生物 埼玉 大学
産業財産権の種類、番号 特許、039074	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 分担者	木下 哲 (Kinoshita Tetsu) (60342630)	横浜市立大学・木原生物学研究所・教授 (22701)	

	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	池田 美穂 (Ikeda Miho)		
研究 協力者	大島 良美 (Oshima Yoshimi)		
研究 協力者	高崎 寛則 (Takasaki Hironori)		

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
---------	---------