

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02874

研究課題名(和文)黄麹菌における初期エンドソーム動態と有用物質高生産性の分子細胞生物学的解析

研究課題名(英文)Molecular and cellular biological analysis on early endosome motility and valuable material production in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

樋口 裕次郎 (Higuchi, Yujiro)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50732765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を含む糸状菌において、初期エンドソームは恒常的な長距離動態を示す。本研究では、初期エンドソーム動態が黄麹菌における有用二次代謝産物であるコウジ酸分泌生産にも遺伝子発現レベルで関与することを示した。また、転写物を細胞生物学的に解析する手法として、single-molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH) 法を確立し、アミラーゼ mRNA が転写される部位を明らかにした。さらに、mRNA を生細胞解析する MS2 システムを導入し、初期エンドソーム動態に依存しないアミラーゼ mRNA の動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の発酵・醸造産業で用いられる有用微生物であり、高い安全性でデンプン分解酵素であるアミラーゼなどの有用タンパク質を多量に生産します。また、黄麹菌細胞内において、初期エンドソームと呼ばれる細胞小器官がダイナミックに動き回っていることがわかっていました。本研究では、この初期エンドソーム動態が、黄麹菌の生産する美白作用を有するコウジ酸生産にも関与することを示しました。一方で、アミラーゼ mRNA の細胞内動態には初期エンドソーム動態は関与しないことを明らかにしました。今後、一層の有用物質生産に向けて、黄麹菌の分子細胞レベルでの研究の進展が期待されます。

研究成果の概要(英文)：In filamentous fungi, including the yellow Koji mold *Aspergillus oryzae*, early endosomes (EEs) exhibit constitutive long-range dynamics. In this study, we showed that EE dynamics is involved at the gene expression level in the secretory production of kojic acid, a useful secondary metabolite in *A. oryzae*. The single-molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH) analysis was established as a method for cell biological analysis of transcripts, and the sites where amylase mRNA is transcribed were identified. Furthermore, the MS2 system for live-cell imaging of mRNAs was introduced to clarify the dynamics of amylase mRNA independent of EE motility.

研究分野：応用微生物学

キーワード：黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 初期エンドソーム 有用物質生産 アミラーゼ コウジ酸 smFISH mRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) “国菌”黄麹菌について

黄麹菌は、我が国において古くから発酵・醸造産業に用いられてきた有用菌種であり、日本醸造学会において“国菌”に認定されている。そして、有用酵素タンパク質や二次代謝産物を大量に分泌生産することから、“セルフファクトリー”と呼ぶにふさわしい存在である。これまでの先行研究により、黄麹菌の菌糸先端部では、分泌(エキソサイトーシス)と相補的なエンドサイトーシスも活発に行われており、大規模なタンパク質分泌を可能にするにはエンドサイトーシスも重要であることが明らかになっている。また近年、黄麹菌の生産するコウジ酸を含む有用二次代謝産物が、細胞内膜交通によって積極的に分泌されることが示唆されてきた。しかし、そうした有用物質分泌の分子機構に関して全貌は未だ明らかになっていない。上述のように、エンドサイトーシスを含めた細胞内膜交通が有用タンパク質分泌生産に重要であることを考えると、エンドサイトーシス経路のオルガネラである初期エンドソームとその特徴的な動態の解析によって、有用物質分泌生産に関する新たな分子機構が解明される可能性が考えられる。

(2) 初期エンドソーム動態の生理的機能について

初期エンドソームは、細胞膜からエンドサイトーシスによって取り込まれたカーゴを選別し、細胞膜へと再びリサイクリングするもしくはリソソーム/液胞への分解へ導くためのエンドサイトーシス経路におけるオルガネラである。広く真核生物において、初期エンドソームは微小管・モータータンパク質系のはたらきにより、毎秒2~3 μmで恒常的な長距離動態を示す。しかしこれまでに、そうした初期エンドソーム動態の分子機構は比較的良く研究されてきたが、動態を示す必然性といった生理学的意義に関しては理解が進んでいなかった。

研究代表者は、初期エンドソーム動態の生理学的意義に関する研究を、その分子メカニズムが良く研究されている植物病原性のモデル糸状菌である *Ustilago maydis* を用いて行ってきた。そして、初期エンドソーム動態を欠損した細胞では、均一なりボソームの細胞内分布に異常を示し、初期エンドソーム動態がリボソームの細部内分布に重要な役割を持つことを明らかにした。

さらに、植物感染時の *U. maydis* における初期エンドソーム動態の寄与に関して解析を行った。植物病原菌は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を感染時特異的に発現して分泌することにより、植物の免疫システムを抑制する。*U. maydis* の植物感染時には、エフェクター遺伝子の発現調節のため、菌糸先端と核との間で情報伝達が行われていることが推測され、動態を示す初期エンドソームがその情報伝達を担っていると予想した。そして実際に、*U. maydis* が植物感染する際に、初期エンドソームの動態がエフェクター遺伝子の発現レベルにおいて重要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

細胞内膜交通において初期エンドソーム動態は、真核生物において広く保存された機構であり、これまでに述べたように、初期エンドソーム動態が及ぼす生理学的役割に関して近年理解が進んできた。しかし、未だ多くの生物種において、その生理学的意義に関する解析は進んでいない。この初期エンドソーム動態の生理的役割を“国菌”である黄麹菌で明らかにし、分泌タンパク質や二次代謝産物といった有用物質高生産性の分子メカニズムとの関連を探ることが本研究課題の核心である。

また、基礎及び応用研究において糸状菌のモデルとなっている黄麹菌を用いた解析により、初期エンドソーム動態の生理学的意義に関する基礎的知見を得ることで、さらには有用物質分泌高生産という応用研究に結び付く成果を生み出すことを目的とする。初期エンドソーム動態の意義に関する研究報告は未だ多くはなく、特に上述のように、これまでの解析は一部の生物種にとどまっており、より多くの生物種での初期エンドソーム動態の意義に関する報告が待たれている。そこで本研究により、糸状菌のモデルでありかつ申請者がこれまで研究対象としてきた黄麹菌を用いた解析を行うこと、さらに、これまで申請者が先駆的に行ってきた研究課題である初期エンドソーム動態の未知なる意義に関する知見を得る。さらに、日本の発酵・醸造産業で有用利用されている“国菌”黄麹菌を用いた解析により、初期エンドソーム動態に関する新規知見がそのまま有用物質生産といった応用研究にも適用できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) コウジ酸生産性解析

黄麹菌対照株、*Aohok1*破壊株(初期エンドソーム動態欠損株)を用い、10%グルコースを含むコウジ酸生産用培地において、コウジ酸の分泌生産を酸化鉄を含むプレート培地によるハロー形成もしくは液体培地にて生産量を定量した(Bentley 1957 Methods Enzymol)。また、コウジ酸合成遺伝子である *kojA*, *kojR*, *kojT* の発現量を定量 RT-PCR 解析にて行った。

(2) smFISH 解析

mRNA の局在解析を single-molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH) にて行った。-アミラーゼをコードする *amyB* の mRNA 配列(1,497 b)に対して、18~22 b ずつ 47 か所に緑色蛍光の FAM 分子を付加したプローブを設計した。また、アクチンをコードする *actA* の mRNA 配列(1,128 b) に対して、18~22 b ずつ 45 か所に赤色蛍光の CAL Fluor Red 610 分子を付加したプローブを設計した。両プローブは LGC Biosearch Technologies にて受託合成した。蛍光顕微鏡解析には Nikon Ti2-A および画像解析ソフト NIS Elements AR を使用した。

(3) MS2 システムによる mRNA 生細胞解析

mRNA 可視化系として、バクテリオファージ MS2 由来の RNA ループ(MBS, MS2 binding sites)にコートタンパク質(MCP, MS2 coat protein)を共発現させた(図1)。24 コピーの MBS ループを目的の mRNA の 3' UTR に挿入し、蛍光タンパク質を付加した MCP が MBS に結合することで mRNA 分子を可視化した。この MS2 システムを黄麹菌用に適用し、-アミラーゼおよびグルコアミラーゼの mRNA 可視化系を構築した。まず、MCP-NLS-EGFP 発現株を構築し、その株に、MBSV6 配列を *amyC* もしくは *glaA* 遺伝子座の下流に選択マーカー *pyrG* とともに導入した。次に、キシロース誘導性プロモーターによる自立脱落型 Cre-lox システムを用いて、1%キシロースを培地に添加することで Cre を誘導し、lox 配列で挟まれた選択マーカーである *pyrG* を含む本コンストラクトを切断・除去した。これにより、*amyC* または *glaA* と MBSV6 の融合 mRNA が構築できる株を作製した。蛍光顕微鏡解析は上記と同様に行った。

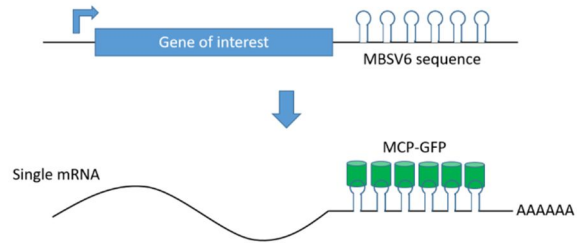


図1 MS2システムによるmRNA可視化の模式図

4. 研究成果

(1) 初期エンドソーム動態とコウジ酸生産性解析

先行研究において、初期エンドソーム動態が黄麹菌における -アミラーゼ生産において分泌および遺伝子発現レベルで寄与していることを明らかにしていた。また近年、タンパク質に限らず二次代謝産物も細胞内で輸送されていることが示唆されてきた。そこで、黄麹菌における代表的な二次代謝産物であるコウジ酸の分泌生産に初期エンドソーム動態が関与するかを解析した。初期エンドソーム動態を欠損した *Aohok1* 破壊株および対照株を用いて、コウジ酸の分泌生産を液体培地にて定量解析したところ、有意な減少が見られた(図2A,B)。またプレート培地においても、コウジ酸生産時に見られるハロー形成から、同様の結果が確認された(図2C)。さらに、コウジ酸合成に関与する *kojA*, *kojR*, *kojT* の遺伝子の発現量解析を行ったところ、*Aohok1* 破壊株において有意な減少が見られた(図2D)。以上の結果から、初期エンドソーム動態はコウジ酸の分泌生産において、遺伝子発現レベルで寄与することが明らかになった。

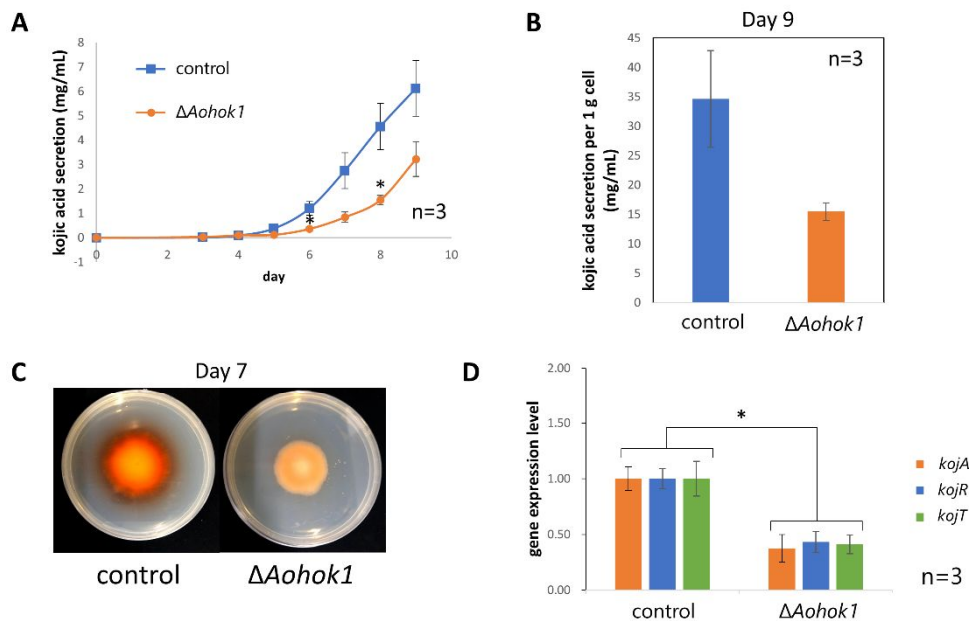


図2 コウジ酸分泌生産性解析

(A) 液体培地におけるコウジ酸分泌生産量 (B) 菌体量あたりのコウジ酸分泌生産量
(C) プレート培地におけるコウジ酸分泌生産 (D) コウジ酸合成遺伝子の発現量解析
*, $p < 0.05$ (t-test)

(2) smFISH 法による mRNA 可視化解析

これまでの解析から、初期エンドソーム動態がタンパク質ならびに二次代謝産物生産に関わる遺伝子の発現レベルで関与することが明らかになったが、実際に黄麹菌細胞において mRNA 発現を細胞生物学的に解析した報告は無かった。そこで、 α -アミラーゼをコードする *amyB* およびその分泌に関与する細胞骨格であるアクチンをコードする *actA* の mRNA 局在を、それぞれの塩基配列特異的なプローブを用いて smFISH により解析した。その結果、マルトースにより誘導される α -アミラーゼ mRNA の発現が菌糸先端部に限らず、菌糸基部においても観察されること、またアクチン mRNA は菌糸の先端に多く局在することを見出した(図 3, 4)。以上のことから、mRNA が細胞内で積極的に輸送されている可能性が示唆された。さらに、*egfp* 特異的プローブを用い、各 EGFP 融合タンパク質を発現した菌株を用いた smFISH 解析により、mRNA とタンパク質の同時可視化に成功した。これにより、各 mRNA 分子に特徴的な局在について明らかにした。

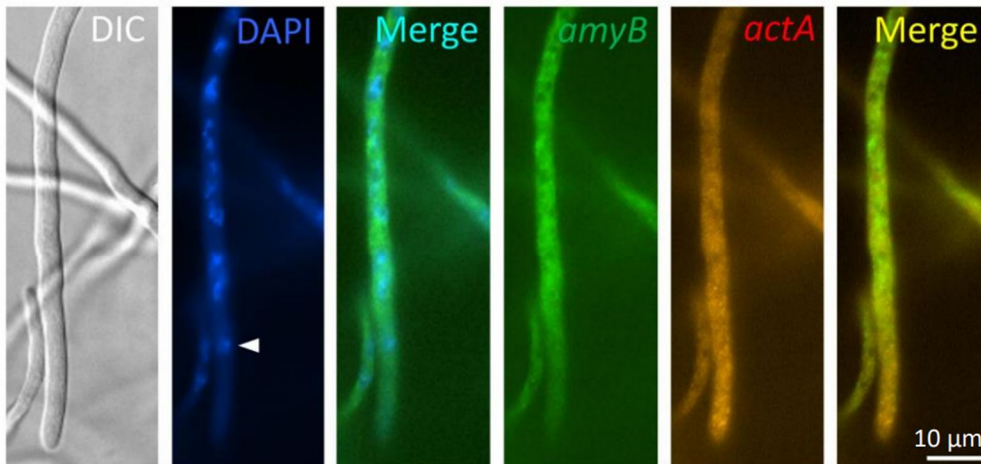


図 3 smFISHによるmRNA局在解析

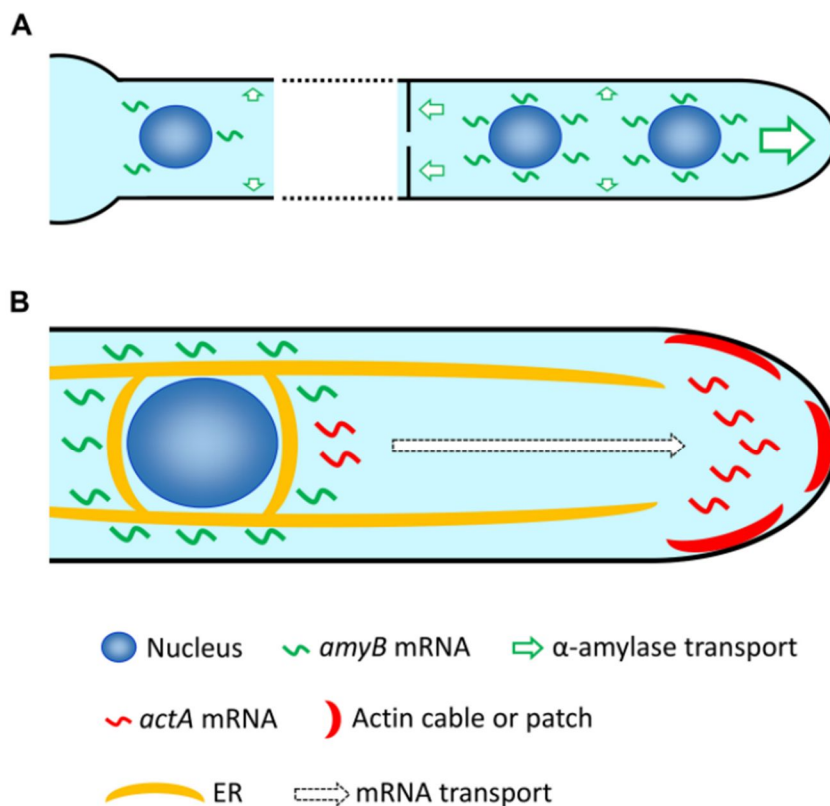


図 4 mRNA局在のモデル図

(3) MS2 法による mRNA 可視化解析

smFISH 解析により、黄麹菌細胞内での mRNA 局在について知見が得られてきたものの、固定化した細胞では動態についての知見は得られず、また初期エンドソーム動態との関連性についても解析できない。そこで、生細胞解析を行うために MS2 システムを導入した(研究の方法3参照)。解析対象の mRNA には、*-*アミラーゼ *amyC* およびグルコアミラーゼ *glaA* を選択した。それらのアミラーゼ遺伝子発現が誘導されないグルコースを炭素源とした培地で培養した細胞では、MCP-NLS-EGFP で可視化される核のみが観察された。一方、炭素源をマルトースとした場合、またグルコースからマルトースにシフトした場合において、アミラーゼ遺伝子の発現が誘導され、細胞質にも EGFP 蛍光が観察され、またそれらの動態が観察された(図5)。

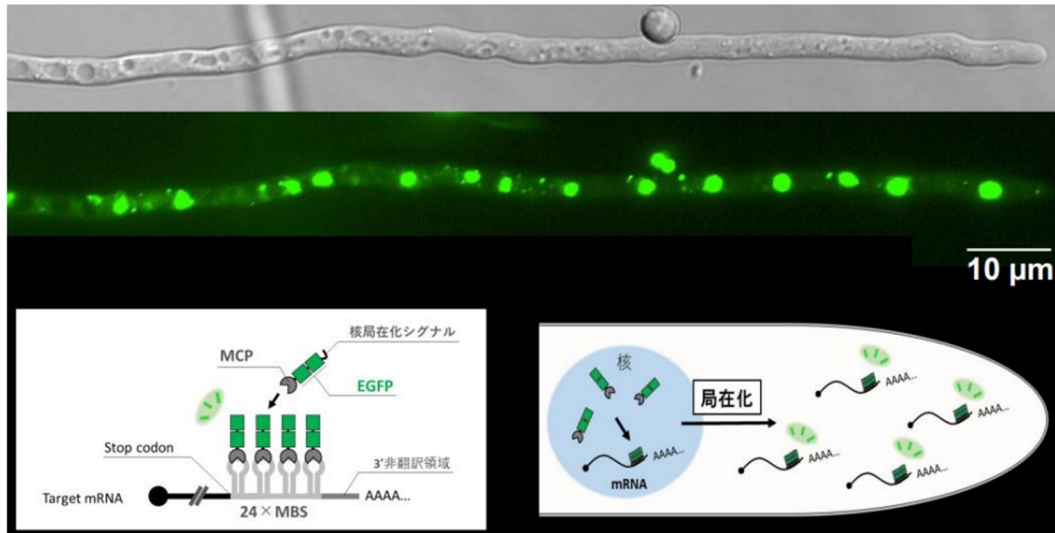
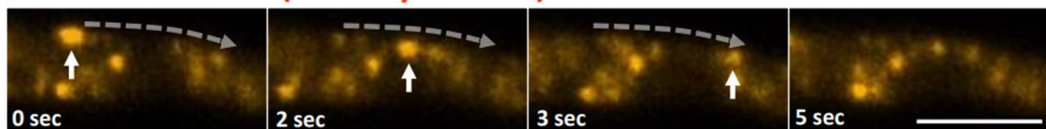


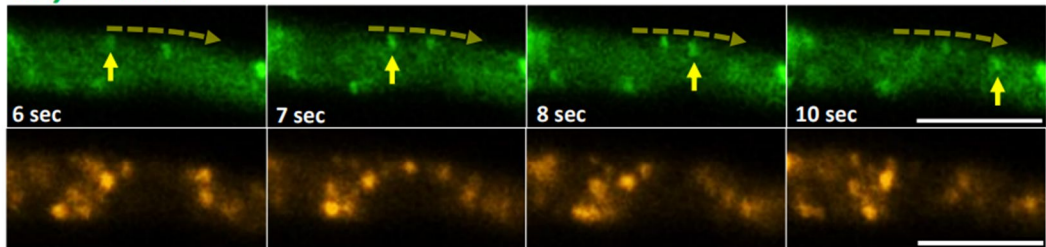
図5 *glaA* mRNAの細胞内局在

そこで、初期エンドソーム動態との関連を調べる目的で、初期エンドソームマーカーである mCherry-AoRab5 をさらに発現させて観察を行った。その結果、*amyC* mRNA は初期エンドソーム動態とは独立して動態を示すことが明らかになった(図6)。また、微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理後には、初期エンドソームと *amyC* mRNA の共局在が見られないものもあり、やはり初期エンドソーム動態とは独立した *amyC* mRNA 動態の存在が示唆された。今後この mRNA 動態の分子機構およびアミラーゼの高分泌生産性との関連解析が待たれる。

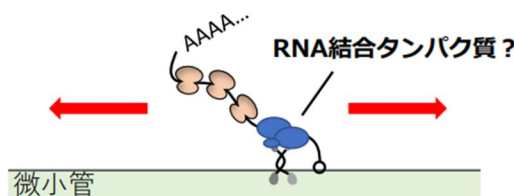
初期エンドソーム(mCherry-AoRab5)



amyC mRNA



Bars 5 μm



amyC mRNA が初期エンドソーム動態とは非依存的に微小管上を長距離移動する可能性が示唆された。

図6 *amyC* mRNAと初期エンドソームの動態解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hiasa Reiko, Kakimoto Ken-ichi, Takegawa Kaoru, Higuchi Yujiro	4. 巻 126
2. 論文標題 Involvement of AAA ATPase AipA in endocytosis of the arginine permease AoCan1 depending on AoAbp1 in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 149 ~ 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.funbio.2021.11.007	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 Higuchi Yujiro, Kitamoto Katsuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Traditional and Latest Researches on <i>Aspergillus oryzae</i> and Related Koji Molds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jof7121075	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 Morita Yuki, Katakura Yoshinori, Takegawa Kaoru, Higuchi Yujiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Correlative Localization Analysis Between mRNA and Enhanced Green Fluorescence Protein-Fused Protein by a Single-Molecule Fluorescence in situ Hybridization Using an egfp Probe in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 721398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ffunb.2021.721398	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 Higuchi Yujiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Membrane Traffic in <i>Aspergillus oryzae</i> and Related Filamentous Fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 534 ~ 534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jof7070534	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 Higuchi Yujiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Membrane traffic related to endosome dynamics and protein secretion in filamentous fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1038 ~ 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab004	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 Li Qiushi, Higuchi Yujiro, Tanabe Kana, Katakura Yoshinori, Takegawa Kaoru	4. 巻 129
2. 論文標題 Secretory production of N-glycan-deleted glycoprotein in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 573 ~ 580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.12.006	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 Morita Yuki, Kikumatsu Futa, Higuchi Yujiro, Katakura Yoshinori, Takegawa Kaoru	4. 巻 124
2. 論文標題 Characterization and functional analysis of ERAD-related AAA+ ATPase Cdc48 in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 801 ~ 813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.funbio.2020.06.004	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 Higuchi Yujiro, Takegawa Kaoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-Molecule FISH Reveals Subcellular Localization of α -Amylase and Actin mRNAs in the Filamentous Fungus <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 578862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.578862	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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守田 湧貴, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌における -アミラーゼmRNAのライブセルイメージング
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守田 湧貴, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるegfpプローブを用いたsmFISHによるmRNA局在解析（学生優秀ポスター賞）
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日浅 怜子, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> のエンドサイトーシス関連因子AipAとAoAbp1がエンドサイトーシスに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田 湧貴, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるsmFISH法を用いたEGFP融合タンパク質とmRNAの局在解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌の膜交通に関する分子生理機構
3. 学会等名 第41回糸状菌遺伝子研究会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日浅 怜子、竹川 薫、樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> のエンドサイトーシスにおけるAipAとAoAbp1の関係性の解析
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会九州部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌のメンブレントラフィックに関する分子細胞生理学研究
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会九州部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河西 建輔, 守田 湧貴, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> における光遺伝学的手法導入の試み
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幡野 若奈, 高田 歩未, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> における初期エンドソーム動態と液胞形成に関する解析
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本 憲亮, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> における後期エンドソームに関わるRab GTPaseの解析
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日浅 怜子, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> のエンドサイトーシスにおけるAAA ATPase AipAの分子機構解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田 湧貴, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるAoCdc48の生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌における有用物質生産に関連する膜交通の分子機構
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 歩未、竹川 薫、樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> における初期エンドソーム動態と他の細胞小器官との関連性解析
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守田 湧貴、菊松 風大、竹川 薫、樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるAoCdc48の機能及び有用物質分泌生産能に関する解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日浅 怜子、柿本 健一、竹川 薫、樋口 裕次郎
2. 発表標題 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるAAA ATPase AipAとAoAbp1のエンドサイトーシスにおける機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 秋実、田辺 佳奈、小谷 哲也、竹川 薫、樋口 裕次郎
2. 発表標題 N結合型糖鎖欠損糖タンパク質を分泌生産する黄麹菌AoGlycoDelete株の諸性質解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口 裕次郎、竹川 薫
2. 発表標題 黄麹菌における -アミラーゼmRNAの可視化解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 樋口裕次郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 296
3. 書名 発酵・醸造食品の最前線II	

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K005456/research.html https://researchmap.jp/yujiro_higuchi
--

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

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