

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06222

研究課題名(和文) 貝類造血機構の解明を目指したシングルセル解析と遺伝子改変技術の開発

研究課題名(英文) Analyses of shellfish hematopoiesis using single-cell RNA-Seq and genetic engineering technology

研究代表者

長澤 一衛 (Nagasawa, Kazue)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：50794236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：造血機構と血球分化機構の解明のため、ホタテガイ血球の細胞学的解析とバルクRNA-seq解析を実施し、新規二枚貝血球マーカーで免疫細胞としての血球を明瞭に可視化した。さらにシングルセルRNA-Seqによりホタテガイ血球を10種類の細胞集団に細分化した。次に、二枚貝類で遺伝子改変技術を開発するため、海産二枚貝類の複数種に最適化されたマイクロインジェクション装置を構築し、受精卵にGFPを発現させることに成功した。さらにホタテガイ初代培養細胞と二枚貝細胞で高発現する新規ウイルスプロモーターを発見し、エレクトロポレーションを用いた培養細胞への遺伝子導入に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日本の重要な養殖対象種であるホタテガイの生体防御の要である血球について、細胞学的特徴や免疫細胞としての性質を初めて明らかにし、水産増殖業の防疫対策に資する成果を得た。さらにこれまで、遺伝組換え等の技術が全く開発されてこなかった二枚貝に対し、本研究では外来遺伝子を強制的に発現させることが可能な新規ウイルスプロモーターを発見した。以上、本研究の成果と開発された技術は、二枚貝や他の軟体動物の遺伝子工学を大きく発展させるものであり、学術的に重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of hematopoiesis and hemocyte differentiation in bivalves, cytological and bulk RNA-Seq analyses of scallop hemocytes were performed to clearly identify hemocytes cells as immune cells by using novel bivalve hemocyte markers. In addition, scallop hemocytes were classified into 10 different cell populations by single-cell RNA-Seq approach. Next, to develop gene engineering technology in bivalves, we constructed a microinjection system optimized for multiple species of marine bivalves and successfully expressed GFP in fertilized eggs. Furthermore, we discovered a novel viral promoter that is highly expressed in scallop primary culture cells, and succeeded in gene delivery to primary culture cells using electroporation.

研究分野：貝類生理学

キーワード：貝類 造血機構 幹細胞 シングルセル解析 遺伝子改変 プロモーター 強制発現系

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は二枚貝の生殖細胞形成過程に興味を持ち、科研費課題(若手研究B, 2017-2018)「ホタテガイの生殖細胞は毎年どこからやってくるのか? 二枚貝生殖腺の再形成機構の解明」において、産卵後に退縮した生殖腺からどのように生殖細胞が再形成されるのか? を研究してきた。この研究結果から、二枚貝の生殖巣内では浸潤した血球が生殖細胞の形成と分化に重要な働きをするのではないかと着想した。しかし研究開始当初、二枚貝血球の基礎生物学的知見は予想に反して乏しく、二枚貝類の造血機構はおろか、二枚貝類の血球の種類と、分子マーカー、機能について確固たる証明がなされていなかった。さらにホタテガイ等の二枚貝の血球は極めて強い細胞凝集活性を示すため、体外に単離した血球の形態やその細胞数を解析することが技術的に困難であった。以上、二枚貝類の血球における基礎生物学的な情報の多くが研究開始時点で欠落した状況にあり、本研究課題は二枚貝の血球を扱ううえで必須となる基礎的な細胞解析技術の開発から着手する必要がある。

2. 研究の目的

一般に貝類の血液は、酸素や栄養の運搬、生体防御、傷の治癒の機能を有すると考えられている。しかし、これら二枚貝類の血球は何種類あるのか? どの血球が何の機能を有するのか? これらの血球がどこで造られどのように分化するか? の問いに答えられる研究結果は依然として得られていない。そこで本研究では、これまで私たちの研究室がモデル動物として用いてきたホタテガイを対象として以下4項目を達成することを本研究の目的とした。

- (1) ホタテガイ血球の細胞形態、血中濃度、1年間における変動を解析する。
- (2) ホタテガイ血球のバルクトランスクリプトーム解析とシングルセル解析から血球の遺伝子発現パターンを解析し血球の種類を分類する。
- (3) 遺伝子導入技術をホタテガイで開発し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をホタテガイ血球で強制発現させることで可視化し、造血機構の一部始終をイメージングする。
- (4) ホタテガイ血球の機能を解析するためのバイオアッセイ法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ホタテガイ血球の細胞形態、血中濃度、1年間における変動の解析

ホタテガイ血球を体外に取り出し、凝集反応を阻止した状態で生きたまま維持できる手法の開発を行った。またフローサイトメトリーによる細胞形態の解析、コールターカウンターによる血球数の解析手法の開発を行った。さらに1年間毎月ホタテガイ成貝から採血し、その血球数とヘモリンパ量を調査した。

(2) ホタテガイ血球のバルクトランスクリプトーム解析とシングルセル解析

ホタテガイ血球についてバルク RNA-Seq 解析を実施した。さらにホタテガイ血球を単一細胞の状態で維持し、シングルセル RNA-Seq 解析を実施した。

(3) ホタテガイに対する遺伝子導入技術の開発

ホタテガイの受精卵や末梢器官、初代培養細胞に対し、遺伝子導入技法の開発に取り組んだ。具体的には、二枚貝で機能する各種プロモーターを検討し、GFP やルシフェラーゼ (Luc) 等のレポーター遺伝子の導入を試みた。

(4) ホタテガイ血球を機能解析するためのバイオアッセイ法の開発

ホタテガイとアカザラガイを用いて組織移植法を開発することで、宿主の血球が移植組織片に

対して示す挙動を解析した。

4. 研究成果

(1) ホタテガイ血球の細胞形態、血中濃度、1年間における変動の解析

本研究では、ホタテガイ血球について最適な凝集阻害溶液 (MAS) を見出した。この開発により、ホタテガイ血球に対して様々な細胞生理学的な解析が可能となった。種々の解析結果から、ホタテガイの遊走血から得られた血球集団の形態 (体積、サイズ、形態学的特徴) は均一であり、いずれも血球も明瞭な核を有する白血球様の接着性の細胞であった。よって本研究の結果から、ホタテガイ体内を遊走する血球は、1種類の細胞集団で構成されると結論付けた。これまでの二枚貝の血球の先行研究から、マガキ等多くの二枚貝類の血球は、2-3種類の細胞集団で構成されるとの報告が多くあった。これに対して本研究は、ホタテガイの血球集団が1種類の細胞で構成されていることを見出した。この知見は、二枚貝における免疫細胞である血球の機能進化について新たな知見を提供するものであり、同じ二枚貝でも血球を分化させ機能進化させた種とそうでない種があることは非常に興味深い。機能進化における1つのシナリオとして、外部環境の変化が少ないホタテガイは原始的で単純な血球組成を維持しているのに対し、カキ等の潮間帯に生息する二枚貝類は大きな外部環境の変化に適応するため、生体防御の要である血球を機能進化させていることが推測される。

またホタテガイの血球の季節変化を、血球濃度、総血液 (ヘモリンパ液) 量、総血球数、さらに軟体重量と生殖腺指数で表す性成熟度を測定し、1年間を通じた調査を実施した。その結果、ホタテガイの血球濃度は年間を通じて大きな変化はなく、 $5.4 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^7$ 個/ml、平均 9.9×10^6 個/ml であった。一方、1個体から採血したヘモリンパ液の総量は、殻長や軟体重量の増加に伴い、0.8ml から 6.9ml/個体へと増加した。特に、ホタテガイが生殖期に入る11月頃から血球量の著しい増加が検出された。また、測定した血球濃度と採血した巣血液量から算出した体内の総血球数は、5月から12月までの血球量の変化に伴って成長に伴い増加しその後は一定となった。本研究で得られたホタテガイの血球濃度の変動は、平均概ね年間を通して一定であり (約 1×10^7 個/ml で推移)、マガキの無顆粒球の周年変化を解析した先行研究と類似していた。また本研究で得られたホタテガイの平均血球濃度は、他の二枚貝や軟体動物種における血球濃度 ($1.3 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^6$ 細胞/ml) に対して比較的高いことが分かった。さらに本研究は、ホタテガイが生殖期に入るタイミングでそのヘモリンパ量が増加することを検出した。血球濃度自体は変化しないが、結果として体内の総血球数が1ヶ月間で2倍以上に増加した。興味深いことに、精原細胞が増殖する成熟初期から総血球数も増加しており、現在研究代表者らは、生殖巣発達における血球の新たな生物学的機能に注目している。

(2) ホタテガイ血球のバルクトランスクリプトーム解析とシングルセル解析

次に、ホタテガイ血球の遺伝子発現プロファイルを解析するため、雌雄からそれぞれ採血球を対象に、バルク RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を実施した。発現変動解析の結果、18個の発現差異のある遺伝子 (differentially expressed genes: DEGs) が同定され、13個の遺伝子はメスの血球で、5個の遺伝子はオスの血球で高い発現を示した。しかし今回の DEGs の発現量について、雌雄の血球間に有意差は認められなかった。先行研究では、ホンコンガキ *Crassostrea hongkongensis* において、血球の組成と免疫機能に雌雄間の有意な差異が無いことが報告されている。また一般に、脊椎動物では血球遺伝子の発現パターンに雌雄差がないことが知られている。よって、今回のホタテガイの雌雄の血球の遺伝子発現に関する知見も、動物界全

体で血球の遺伝子発現パターンに大きな雌雄差がないことを支持する結果となった。

続いて本研究では、先のバルク RNA-Seq において 6 つのライブラリーで一貫して高発現している上位 50 遺伝子のリストから、6 つの候補遺伝子を血球のマーカー分子として抽出し、in situ hybridization (ISH)を実施した。ISHの結果、ホタテの卵巣組織では、ソマフェリチン様遺伝子以外の 5 つの候補遺伝子で血球特異的な mRNA の局在が検出された。その中でも孵化酵素様遺伝子と、 β -クリスタリン B2 様遺伝子は、ホタテガイの血球で極めて強い mRNA のシグナルが検出された。これは二枚貝の血球の実用的なマーカー遺伝子を得ることに成功した最初の研究である。これらのマーカー遺伝子は、血球の局在を明瞭に可視化できることから、今後は生体防御反応で誘導される血球の分布や局在を示すことができる研究ツールとして二枚貝の免疫学に利用されると期待される。

さらに本研究では、ホタテガイ血球のシングルセル解析 (scRNA-Seq) を受託解析により実施した。貝類の血球は強い凝集能を示すこと、ハンドリングに弱いことから、生きた単一細胞を準備すること自体が極めて困難であった。しかし研究代表者らは、上述の MAS を開発したことで、凝集阻止と生残率の向上を同時に満たすことが可能となり、ホタテガイ血球のシングルセル解析に初めて成功した (Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v3, 10x Genomics)。その結果、ホタテガイ (n=1) の血球について 5122 細胞の良好なシーケンシング結果が得られ、1 細胞あたり平均 7 万リード、約 1800 遺伝子の発現を検出した。また遺伝子発現を t-SNE 解析により 2 次元平面上にプロットした結果、10 種類のクラスターに分類できることが明らかになった。しかし当初計画していた「ホタテガイの血球が何タイプあるのか？」という問いに対し、本解析結果を評価するための指標や解析経験が研究代表者に十分に無いことから、その答えに至っていない。これについては、2021 年度先進ゲノム支援活動のサポートや共同研究者の助言を受けながら現在も鋭意解析中である。

(3) ホタテガイに対する遺伝子導入技術の開発

まず、ホタテガイの受精卵に対しマイクロインジェクション法による遺伝子導入技術の開発に取り組んだ。4-5 月の産卵期にある成熟した雌雄のホタテガイを購入した。成熟卵はホタテガイの卵巣小片をセロトニン添加人工海水に浸漬して放卵を誘導することで獲得した。また精子は切り出し法によって獲得し、精子密度を調整して人工授精に用いた。得られた受精卵は第一極体の放出を顕微鏡下で確認し、確実に発生が進行している卵を選別してマイクロインジェクションに供した。まず合成 GFP mRNA をホタテガイ受精卵に導入したところ、24 時間後において合成 mRNA 注射区の 10/30 (33.3%) の胚で明瞭な GFP 蛍光が観察された。生存率は未処理区で 28/30 (93.3%) であり、mRNA 注射区では 10/30 (33.3%) であった。また GFP 蛍光が確認された卵のうち生存率は 6/10 (60%) であった。48 時間後になると mRNA 注射区の GFP 蛍光は全体的に退光し、胚発生も完全に停止した (生存率 0%)。一方で、未処理区では 10/30 (33.3%) の胚が繊毛運動を行うトロコフォア幼生まで発生した。

続いて、ホタテガイの初代培養細胞に対する遺伝子導入技術の開発に取り組んだ。軟体動物の細胞において正確なプロモーター活性を測定するためのアッセイ系を構築するため、二枚貝の中でも器官が形態的に独立したホタテガイを用い、初代培養細胞を樹立するための手法の開発に取り組んだ。その結果、ホタテガイ心筋を外植という方法で処理した場合に、安定的に初代培養細胞株を得ることに成功した。続いて、このホタテガイ心筋細胞への遺伝子導入法について検討した。その結果、エレクトロポレーション法 (電気穿孔法) により、細胞を生かした状態で遺伝子導入する条件を見出した。さらに、カキヘルペスウイルス 1 型のウイルスゲノム配列中に

ある全 136 遺伝子の発現パターンを RNA-Seq のデータから解析し、宿主への感染から速やかに高発現を示す最初期遺伝子 (immediate early gene) として 6 遺伝子を選出した。その後、最終的に最も高発現を示すプロモーターとして、Poshv117 を同定し OsHV-1 プロモーターと命名した。最後に、この OsHV-1 プロモーターの下流に GFP 遺伝子を接続した発現ベクターを構築し、様々な動物種の細胞に対して遺伝子導入を実施した。具体的には、エレクトロポレーション法によりホタテガイ心筋細胞へ導入、マイクロインジェクション法によりゼブラフィッシュ受精卵に導入、リポフェクション法により HEK293 細胞に導入した。その結果、全ての動物細胞において GFP 蛍光が観察され、OsHV-1 プロモーターが十分な活性を示すことが確認された。本研究により、軟体動物で機能する強力なプロモーターの同定に世界で初めて成功した。今後は、本プロモーターを利用することで、二枚貝をはじめとする軟体動物において、外来遺伝子を導入した遺伝子組換え動物の作製や、過剰発現系を用いた遺伝子の機能解析が可能になると期待される。

(4) ホタテガイ血球を機能解析するためのバイオアッセイ法の開発

アコヤガイを用いた真珠養殖では、外套膜組織片の同種間移植が確立されている。本研究ではホタテガイとその近縁種であるアカザラガイをドナーとして用い、ホタテガイを両ドナーの共通の宿主として用いて組織移植実験を実施した。本実験では特に、ドナー組織が宿主の体内でどのように生存するのか？また宿主の体内では、移植された組織片に対してどのような生体防御反応が起こるかを解析した。ドナーから外套膜の組織片を採取し、麻酔で閉殻筋を弛緩させた宿主の生殖巣内に外科的に移植した。移植 1 週間後における宿主の生残率は 100%で、移植時に切開した生殖巣の外傷も完全に治癒していた。また移植部位から組織切片を作製し観察したところ、ドナーの外套膜組織が宿主の生殖巣内に維持されていることが確認された。また移植した外套膜組織の周囲には、先の実験で同定したホタテガイの血球マーカーである孵化酵素様遺伝子および β -クリスタリン B2 様遺伝子の ISH で陽性となる血球が大量に集結し厚いシート構造を形成していた。このような宿主血球の生体防御反応は、ホタテガイとアカザラガイのどちらをドナー組織に使用した場合でも観察された。以上、本実験はホタテガイ血球の機能解析法の一つとして、組織移植により生体防御反応を実験的に再現することを可能にした。マガキの先行研究では、変性した自身の卵母細胞であっても無顆粒球により貪食されることから、本実験で観察された生体防御反応は、異種や同種のドナー組織だけでなく、宿主自身に由来する壊れた細胞等によっても誘導されると考えられる。今後は、血球の生体防御反応や免疫寛容が成立する過程を理解することで、二枚貝で同種間および異種間移植を確立するための方法論を開発したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yoon Jeongwoong, Gu Wen-Bin, Konuma Mizuki, Kobayashi Mutsuko, Yokoi Hayato, Osada Makoto, Nagasawa Kazue	4. 巻 119
2. 論文標題 Gene delivery available in molluscan cells by strong promoter discovered from bivalve-infectious virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2209910119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2209910119	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 Nagasawa Kazue, Kanamori Makoto, Yoon Jeongwoong, Kobayashi Mutsuko, Mokrina Mariia, Kato Takahiro, Osada Makoto	4. 巻 137
2. 論文標題 Hemocytes of Yesso scallop characterized by cytological, molecular marker, and functional analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 108751 ~ 108751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2023.108751	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 Konuma Mizuki, Nagasawa Kazue, Mokrina Mariia, Kobayashi Mutsuko, Osada Makoto	4. 巻 in press
2. 論文標題 Gonadal somatic cell-specific transforming growth factor- superfamily member in the Yesso scallop reveals gonadal somatic cell distribution during the reproductive phase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145627 ~ 145627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2021.145627	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 Mokrina Mariia, Nagasawa Kazue, Kanamori Makoto, Natsuike Masafumi, Osada Makoto	4. 巻 19
2. 論文標題 Seasonal composition of immature germ cells in the Yesso scallop identified by vasa-like gene (my-vlg) and protein expression, with evidence of irregular germ cell differentiation accompanied with a high mortality event	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture Reports	6. 最初と最後の頁 100613 ~ 100613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aqrep.2021.100613	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20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小沼瑞, 尾定誠, Jeongwoong Yoon, 小林睦子, 長澤一衛
2. 発表標題 マイクロインジェクションを用いた二枚貝類受精卵への遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeongwoong YOON, Mizuki KONUMA, Gu WEN-BIN, Mutsuko KOBAYASHI, Makoto OSADA, Kazue NAGASAWA
2. 発表標題 ホタテガイ生殖巣の初代培養およびエレクトロポレーションによる遺伝子導入の試み
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野里穂, Jeongwoong Yoon, 小林睦子, 小沼瑞, 尾定誠, 長澤一衛
2. 発表標題 二枚貝類における組織移植技術(グラフト)の開発
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazue Nagasawa
2. 発表標題 Recent efforts for reproductive immunology in placenta fish and bivalve using transplantation techniques
3. 学会等名 WUR-TU Immunity, Food Science, and Synchrotron Light Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長澤一衛
2. 発表標題 ホタテガイの夏季の異常成熟とその生殖細胞の解析
3. 学会等名 令和4年度青函水産試験研究交流会議（ホタテガイ部会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長澤一衛,金森誠,小林睦子,Mokrina Mariia,Yoon Jeongwoong,加藤嵩大,尾定誠
2. 発表標題 二枚貝の血球のRNA-Seq解析とグラフトによる細胞性免疫機構の解析
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeongwoong YOON,Wen-Bin GU,小沼瑞,小林睦子,横井勇人,尾定誠,長澤一衛
2. 発表標題 海産軟体動物由来の初代細胞培養の樹立と二枚貝感染ウイルスプロモーターを用いた遺伝子導入系の確立
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeongwoong Yoon,Wen-Bin Gu,Mizuki Konuma,Mutsuko Kobayashi,Hayato Yokoi,Makoto Osada,Kazue Nagasawa
2. 発表標題 Diverse viral immediate-early genes for genetic engineering: Application in Mollusca
3. 学会等名 Tohoku University OIST 3rd Joint Workshop on Biodiversity: From Genes and Species to Ecosystem Services and Resilience (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeongwoong YOON, Wen-Bin GU, 小沼瑞, 小林睦子, 横井勇人, 尾定誠, 長澤一衛
2. 発表標題 Attempts to establish a continuous cell line from marine bivalve species
3. 学会等名 第7回ユニーク会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長澤一衛, 小沼瑞, Yoon Jeongwoong, Mokrina Mariia, 坂口あかり, 小林睦子, 尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイの生殖工学に関する研究
3. 学会等名 第7回ユニーク会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長澤一衛, 金森誠, 道総研, 小林睦子, Mokrina Mariia, Yoon Jeongwoon, 加藤高大, 尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイ血球の形態・性状と遺伝子発現に関する研究
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeongwoong YOON, Wen-Bin GU, 小沼瑞, 小林睦子, 横井勇人, 尾定誠, 長澤一衛
2. 発表標題 水産軟体動物細胞で機能するウイルスプロモーターの発見
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 水生無脊椎動物用プロモーター	発明者 YOON Jeongwoong、長澤一衛、尾定誠、横井勇人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/03091	取得年 2022年	国内・外国の別 外国

〔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	横井 勇人 (Yokoi Hayato) (40569729)	東北大学・農学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	尾定 誠 (Osada Makoto) (30177208)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	

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