

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06586

研究課題名(和文) クライオ電顕とAFMのためのアンルーフ法とパーフォレーション法の開発と普及

研究課題名(英文) Development and dissemination of unroof and perforation methods for cryo-EM and AFM

研究代表者

白倉 治郎 (Usukura, Jiro)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・名誉教授

研究者番号：30143415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞膜の細胞質側表面を露出させ、膜細胞骨格などを電顕やAFMで立体的に観察するための試料作製法であるアンルーフ法(unroofing method)の開発、改良と普及を目的としている。研究期間中に三つのアンルーフ法を開発改良し、誰でも使えるようにした。

A型インフルエンザ感染サイクルの視覚化にこの方法を用いた。複製されたゲノムを含むリボヌクレオタンパク(vRNP)は細胞膜の細胞質側表面に集積され、そこで宿主細胞膜細胞骨格アクチン線維の運動性を利用して、vRNPのパッケージングを行い、子孫ウイルスの形成を行うことが明らかになった(投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜は細胞の内外を隔てるだけでなく、内外の積極的な情報交換の場でもある。ウイルスなどの病原体もレセプターを介して、膜の飲食作用により取り込まれる。言わば生命現象の最前線でもある。細胞膜の細胞質側表面の構造を立体的に観察できるようになったことは学術的に極めて有意義なことである。また、我々の応用研究からA型インフルエンザの子孫ゲノムが細胞膜の細胞質側表面に集積し、そこでパッケージングされ子孫ウイルスとして排出されることが分かった。これはインフルエンザ感染症の対策や創薬にとって重要な知見であり、社会的にも重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop, improve and disseminate the unroofing method, a sample preparation method for exposing the cytoplasmic surface of the cell membrane and observing the membrane cytoskeleton attached to it in three dimensions by electron microscopy and AFM. Three unroofing methods, the sonication, adhesion and perforation methods, were developed and improved during the research period.

We used this method to visualise the influenza A infection cycle. Ribonucleoproteins (vRNPs) containing the replicated genome were found to accumulate on the cytoplasmic side surface of the plasma membrane, where vRNPs are packaged for the formation of progeny viruses exploiting the motility of host plasma membrane cytoskeletal actin fibres (under submission).

研究分野：細胞生物学

キーワード：アンルーフ法 unroofing 膜細胞骨格 アクチン線維 細胞膜 インフルエンザAウイルス genom packaging 電子顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

本研究は細胞膜の裏打ち構造を電顕やAFMで観察するための試料作製法であるアンルーフ法(unroofing method)の更なる改良と普及を目指して、2020年度から3年間の予定で開始されたが、2020年の後半より、コロナウイルス感染症が蔓延し、各学会の学術講演会の開催はオンライン開催又は中止となった。アンルーフ法の普及活動は十分ではなかったため、2022年度末に2023年度1年間の期間延長を行い、学会活動を通して普及活動を続けた。アンルーフ法(unroofing method)は細胞に孔を空け細胞質の一部を除去し、細胞膜の細胞質側表面を露出させるユニークな標本作製法であるが、厳密には新しい方法ではない。初期のころは、ポリ-L-リジン(PLL)を用いて細胞を基板に接着させた後、パストゥールピペットや注射器の針から排出されるリンゲル液や緩衝液の水流で、先端の細胞膜や細胞質を除去し、腹側細胞膜の細胞質側表面を露出させていた[1-6]。しかし、収量、再現性が悪く普及しなかった。膜の裏打ち構造とも言える細胞膜の細胞質側表面は生命現象の最前線とも言える場所で、その構造解析は極めて重要である。そこで、我々は再現性のあるアンルーフ法の開発とその普及を目指して、研究を開始した。本研究はコロナウイルス感染症の蔓延中に行われたが、奇しくもウイルスの感染サイクルの形態学的研究に役立つ事が分かった。応用研究として行ったA型インフルエンザの感染サイクルの形態学的研究に於いて、A型インフルエンザの子孫ゲノムのパッケージングが宿主細胞の細胞膜の細胞質側表面で膜細胞骨格であるアクチン線維を利用して行われることが明らかになった(下記研究成果参照)。

2. 研究の目的

細胞膜の細胞質側表面の構造(膜の裏打ち構造)は外界との情報交換、細胞運動、感染初期過程に於いて重要な役割を果たしており、生命現象の最前線とも言える。したがって、この部分の構造解析は多くの生命現象を解明する上で必須である。しかし、その観察法は未だに確立されていない。そこで、再現性の良いアンルーフ法の開発を始めた。アンルーフ法の再現性は実際に応用しその成果によって評価することになる。このために、応用研究としてA型インフルエンザの感染過程における膜の裏打ち構造の役割を調べた。したがって、本研究の目的はアンルーフ法の確立とその普及、およびアンルーフ法を用いて、膜の裏打ち構造がA型インフルエンザの子孫ゲノムのパッケージングに重要な役割を演ずることを示すことである。

3. 研究の方法

細胞がアンルーフされる場所を生細胞イメージングし、どのように細胞膜が剥がされるかを明らかにすることで、効率の良いアンルーフ法を確立する。

応用研究：A549細胞を2.5mm×2.5mmのカバーガラス上に蒔き、80%コンフルエントまで培養する。MOI 10の濃度でA型インフルエンザウイルスを培養液中に播種し、約16時間培養する。その後、細胞をアンルーフし、2%グルタルアルデヒドで10分間固定し、洗浄後、ゲノムを含むvRNPに対する抗体、およびアクチン、ミオシンに対する抗体で標識し、急速凍結エッチングレプリカ(immuno-freeze-etching;以後、免疫-FEと名付ける)として、電子顕微鏡による観察を行う。標本処理の概略は概ね図1のとおりである。

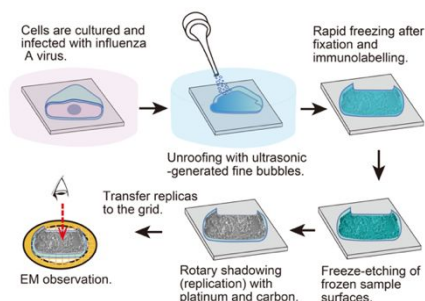


図1 Immuno-freeze-etching 法の手順を示す図。A549細胞を培養し、A型インフルエンザウイルスに感染させ、16時間後にアンルーフする。その後、固定し、抗体標識をする。標識後は洗浄し、急速凍結し、freeze-etchingレプリカとして観察する。

4. 研究成果

アンルーフ法の開発、改良とそのメカニズムの解明

腹側の細胞膜の裏打ち構造を観察するために超音波によるアンルーフ法(sonication unroofing)と背側の細胞膜の裏打ち構造を観察するための接着によるアンルーフ法(adhesion unroofing)の二つ方法を主に開発、改良した。収量(yield)は sonication unroofingの方が高いが、低出力の超音波発生装置など機器が必要である。一方、adhesion unroofingではアルシアンブルー処理により接着性を高めたカバーガラスやグリッドで背側の細胞膜を剥がし取るので特別な機器を必要としない。しかし、細胞への接着が不十分で

あることが多く、収量(yield)は悪い。我々が開発した sonication unroofing 装置の写真を図 2 に示す。

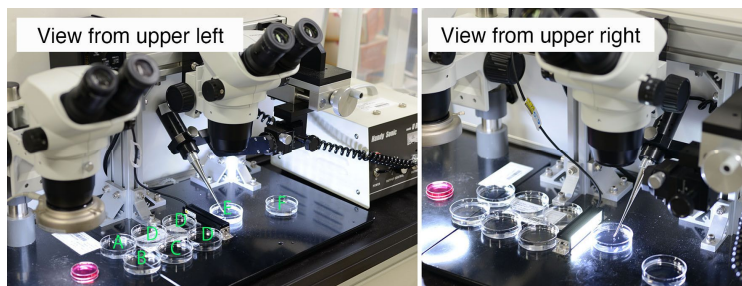


図 2 実体顕微鏡とカスタマイズされた超音波発生装置からなるアンルーフィング装置。写真はそれぞれ右上(右の画像)と左上(左の画像)から見たところ。A: HEPES ベースのリンゲル液。B: Ca を含まない HEPES ベースのリンゲル液。C: Ca を含まない HEPES ベースのリンゲル液に溶解したポリリジン (0.5 mg/mL)。D: 低張または等張 KHMgE 緩衝液。E: タンパク質分解酵素阻害剤 (ペプターブロック) を含む KHMgE 緩衝液 (アンルーフィングバッファー)。F: アンルーフ細胞洗浄用の新鮮なアンルーフィングバッファー。

応用研究：インフルエンザ A 型ウイルスは、宿主細胞内でのゲノムパッケージングのために、膜細胞骨格アクチンフィラメントの運動性を利用している。

オルソミクソウイルス科のインフルエンザ A ウイルス (IAV) は、公衆衛生と獣医衛生の両面で大きな脅威となっている [7]。IAV のゲノムは異なる 8 つのウイルスリボヌクレオタンパク質 (vRNP) に分配されているため、パンデミックの可能性を持つ組み換え株の出現が容易である [7-10]。それぞれが異なるウイルス RNA (vRNA) (ゲノム) をヌクレオタンパク質 (NP) が包み込み、その末端は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) ユニットによって固定されている [11, 12]。RdRp 複合体は、ポリメラーゼ酸性 (PA) タンパク質とポリメラーゼ塩基性 1 および 2 (PB1 および PB2) タンパク質から構成されている。各 vRNA セグメントは、ウイルスの複製と集合に不可欠な特定のウイルスタンパク質をコードしている。さらに、IAV RNA ポリメラーゼはエラーを起こしやすい性質を持っているため、ゲノムドリフトが起こりやすく、その結果、既存の集団免疫を回避できる変異型が発生する [13]。そして、これらの変異は毎年の流行を引き起こす上で極めて重要な役割を果たしている。

vRNP のパッケージング過程の形態学的アプローチ。

子孫 vRNP がどこに輸送され、そこでどのように子孫ビリオンのコアにパッケージされるかを解明するためには、感染細胞の皮質領域、特に細胞膜の細胞質側表面の形態学的観察が不可欠である。この目的のために、アンルーフ法 [14, 15] と組み合わせた免疫-FE が用いられた。多数の vRNP 免疫金標識 (すなわち vRNP) が、アンルーフによって露出した細胞膜の細胞質側表面に集積し、様々なサイズと多くの形の異なる凝集体を形成していた (図 3)。拡大すると、免疫標識 vRNP を相互接続している細いフィラメントが観察される (図 3b)。これらのフィラメントは、抗アクチン抗体による標識 (図 4a) とその構造的特徴 (すなわち、約 7 nm の太さと約 5.5 nm の周期的な筋) から、アクチン線維と同定された。これらの

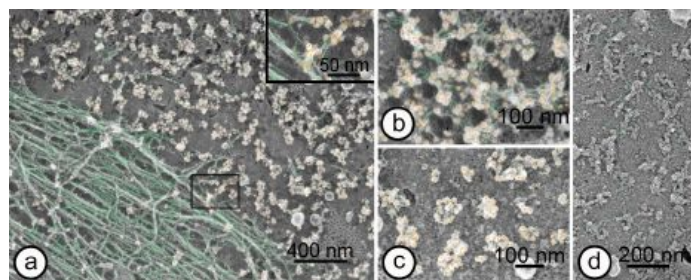


図 3 IAV に感染した細胞のアンルーフ免疫-FE 電子顕微鏡写真。a: 抗 vRNP 抗体標識は細胞膜の細胞質側表面に分布し、様々なサイズの凝集体を形成している。ストレスファイバーには抗体標識 (すなわち vRNP) はほとんど観察されないが、細胞膜と接触している側枝には vRNP の線状配列が見られる (挿入図)。b: やや拡大した免疫-FE 顕微鏡写真、vRNP と結合しているアクチン線維を示す。c: 円形に密に集合した標識 vRNP を示す免疫-FE 顕微鏡写真。d: 一次抗体の代わりに非免疫血清を用いた免疫-FE コントロールを示す電子顕微鏡写真。抗体に結合した免疫-金粒子はオレンジ色で着色されている。アクチンフィラメントは緑色で着色されている。

アクチン線維の多くは細胞膜に接していたことから、膜細胞骨格の一部であると考えられた。抗ミオシン抗体標識によってミオシンもまたアクチンフィラメントに沿って検出され (図 4b)、ミオシンによるアクチンフィラメントの運動が示唆された。ヌクレオタンパク質 (NP) とアクチンとの生化学的親和性はすでに報告されていたが [16]、vRNP をつなぐアクチンフィラメントは今回初めて画像としてとらえられた。これは vRNP のパッケージングのメカニズムとプロセスを解明する上で重要な発見である。太いアクチン束上では、抗体標識 vRNP は直線的に並ぶ傾向があったが、様々な形の凝集体を形成

している vRNP は細いアクチンフィラメントと結合していた (図 5 a-e)。細いアクチンフィラメントはしばしば鋭く曲がっており、凝集体中の vRNP と複雑に絡み合っていた (図 3, 4)。図 2b に示すように、凝集体はアクチンフィラメント (凝集体間アクチンフィラメント) によっても互いに連結されていた。vRNP が円形にぎっしり詰まると、凝集体間アクチンフィ

ラメントは崩壊し、各凝集体は独立した状態になった（図 3c と図 5e）。しかし、細く短いアクチンフィラメントの一部は凝集体の中に残り、vRNP と絡み合っていた（図 5e）。実際、ウェスタンブロッティングでも、精製 IAV 中のアクチン、ミオシン、コフィリンが検出された。これらの結果は、アクチン、ミオシン、および関連タンパク質が vRNP のパッケージングに使用され、その一部が vRNP と絡み合いながら子孫ビリオンに組み込まれたことを示唆している。

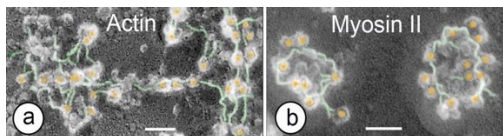


図 4 アクチン(a)、ミオシン(b)の免疫局在を示す免疫 FE の高倍率電子顕微鏡写真。コロイド金標識二次抗体はオレンジ色で着色され、アクチン線維は緑色で着色されている。スケールバー：50 nm

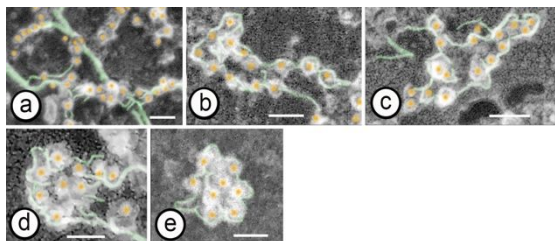


図 5. アクチンフィラメントによって連結されている vRNP は様々な形状の凝集体を形成する。線状から円形凝集体までを並べた免疫 FE 電子顕微鏡写真 スケールバー：50 nm

ゲノム vRNP パッケージングにおけるアクチンフィラメントの機能性

上述のように、アクチンフィラメントに沿ってミオシンが存在することは、アクチンフィラメントが活発に動いていることを示唆している。vRNP パッケージング過程をより詳細に理解するためには、アクチンフィラメントがどのように、どの程度動くのかを知ることがさらに不可欠である。そこで、原子間力顕微鏡 (AFM) ライブセルイメージングにより、細胞膜直下の膜細胞骨格アクチンフィラメントの動きを可視化した。カンチレバー先端を細胞表面に密着させて走査することで、ラメラポディアのような細胞表面の動きだけでなく、細胞膜直下のアクチンフィラメントの動きも検出することができる。実際、細胞膜直下の細いフィラメントがランダムに高速で動いていた。これらの動くフィラメントは、後述するように、その太さ、動き、プレッピスタチンに対する感受性から判断して、アクチン線維と推定される。もしそうであれば、免疫-FE で観察された vRNP に結合したアクチンフィラメントも、このように活発に動いているはずである。このようなアクチン線維の活発な動きは、それに結合した vRNP 間の相互接触を促進し、それによって 8 つの異なる vRNP の選別と集合を可能にするであろう。アクチンフィラメントに沿ってミオシンが存在すること(図 4b) は、アクチン線維の運動がミオシンとの相互作用によって誘導されることを強く示唆している。実際、プレッピスタチンによってミオシン活性を阻害すると、細いフィラメントの動きが減少し、vRNP の適切な集合が妨げられ、しばしば大きな凝集体が出現した。さらに、プレッピスタチン処理によって誘導された vRNP 凝集体の形態学的変化を、プレッピスタチンを添加せずに培養した細胞と統計的に比較した(図 6)。細胞膜の細胞質側表面に 4 個以上の抗 vRNP 抗体標識 (免疫金標識) を含む凝集体の分布密度は、プレッピスタチン非投

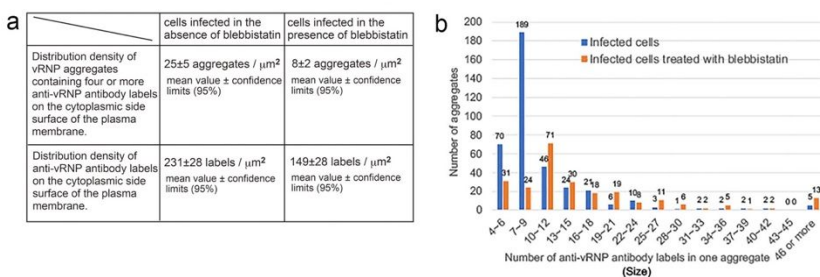


図 6 抗 vRNP 抗体標識の細胞質側細胞膜表面への分布と集合体の統計解析 a: プレッピスタチン存在下または非存在下における、4 個以上の vRNP 抗体標識を含む凝集体の分布密度と、抗 vRNP 抗体標識の細胞質側細胞膜表面への分布密度をそれぞれ示す表。プレッピスタチン存在下では、vRNP 凝集体の数だけでなく、細胞膜に到達する vRNP の総数も減少する。b: 凝集体のサイズ別ヒストグラム。プレッピスタチン非存在下では、7-9 個のラベルを含む凝集体が最も多く検出され、グラフ上に鋭いピークを形成している(青棒)。しかし、プレッピスタチン存在下では、グラフ上に顕著なピークは形成されない(オレンジ色のバー)。

ピスタチン存在下では、10-12 個の抗体標識を含む凝集体の数がわずかに多かったものの、グラフ上有意なピークは形成されなかった。全体として、プレッピスタチン処理細胞における vRNP の凝集体形成は、より大きなサイズにシフトした。これらの結果は、ゲノム vRNP のパッケージングにアクトミオシンが大きく関与していることを示唆している。細胞膜の細

胞質側表面に分布する抗 vRNP 抗体標識の総数にも有意差が認められた。プレビスタチン非存在下では、単位面積あたりの抗体標識数 (抗体標識の分布密度) は 231 ± 28 標識 / μm^2 (平均値 \pm 信頼限界 (95%)) であったのに対し、プレビスタチン存在下では 149 ± 28 標識 / μm^2 (平均値 \pm 信頼限界 (95%)) であった (図 7a)。すなわち、ミオシン活性の阻害は、細胞膜の胞質側表面に到達する vRNP の総数をも減少させた。アクトミオシン系は、子孫 vRNP の細胞膜への輸送にも何らかの形で関与しているのかもしれない。

以上のような観察データから我々は子孫 IAV のゲノムパッケージングは宿主細胞の膜細胞骨格アクトミオシン線維の動きにより、図 7 のような過程を辿り行われるという仮説を立てた (図 7)。

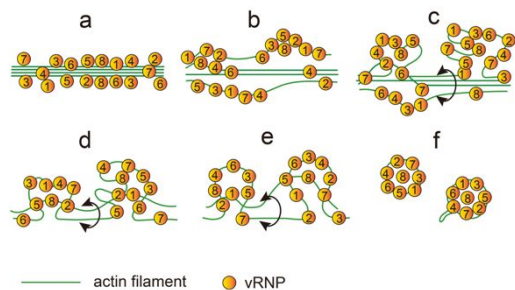


図 7. 8 つの異なるゲノム vRNP がアクチンフィラメントによってパッケージされる過程を示す仮説図。a: アクチン束上の vRNP の整列が最初のステップと思われる。b: ポリヌクレオチドのようなポリアニオンが太いアクチン束を細いアクチンフィラメントに横方向に分離し [17]、その結果 vRNP が細いアクチンフィラメントに移動すると考えられる。vRNP 同士の相互接触は、vRNP-vRNP 相互作用による選択的パッケージングを促進する。e: 異なる vRNP からなる凝集体の部分は引き締まり始め、重なり合った vRNP セグメントは緩んで凝集体から排除される。f: 8 つの vRNP が集合すると、アクチンフィラメントの助けを借りて、より密に詰まったように見える。最終的には、凝集体間のアクチンフィラメント (二重頭曲線の矢印で囲まれている) は消失する。vRNP に与えられた番号 (1-8) は任意である。

参考文献

1. Vacquier V D (1975) The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge. *Dev. Biol* 43: 62–74.
2. Clarke M, Schatten G, Mazia D, and Spudich J A (1975) Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1758–1762.
3. Heuser J (2000) The production of 'cell cortices' for light and electron microscopy. *Traffic* 1: 545–552.
4. Yumura S, and Kitanishi-Yumura T (1992) Release of myosin II from the membrane-cytoskeleton of *Dictyostelium discoideum* mediated by heavy-chain phosphorylation at the foci within the cortical actin network. *J. Cell Biol* 117: 1231–1239.
5. Nermut MV (1982) The 'cell monolayer technique' in membrane research. *Eur. J. Cell Biol* 28: 160-172.
6. Nermut M V, Williams L D, Stamatoglou S C, and Bissell D M (1986) Ultrastructure of ventral membranes of rat hepatocytes spread on type IV collagen. *Eur. J. Cell Biol* 42: 34–55.
7. Blut, A. Influenza virus. *Transfus. Med. Hemother* 36, 32-39 (2009).
8. Krammer, F. et al. Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 3 (2018).
9. te Velthuis, A. J. W. & Fodor, E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 479-493 (2016).
10. Eisfeld, A. J., Neuman, G. & Kawaoka, Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 28-41 (2015).
11. Arranz, R. et al. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* 338, (6114):1634-1637 (2012).
12. Miner, J. C. et al. Modeling the influenza A NP-vRNA-polymerase complex in atomic detail. *Biomolecules* 11, 124 (2021).
13. Stubbs, T.M. & te Velthuis, A.J.W The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. *Future Virol.* 9, 863-876 (2014). doi: 10.2217/fvl.14.66.
14. Usukura, E., Narita, A., Yagi, A., Ito, S. & Usukura, J. An Unroofing method to observe the cytoskeleton directly at molecular resolution using atomic force microscopy. *Sci. Rep.* 6, 27472 (2016).
15. Morone, N., Usukura, E., Narita, A. & Usukura, J. Improved unroofing protocols for cryo-electron microscopy, atomic force microscopy and freeze-etching electron microscopy and the associated mechanisms. *Microscopy (Oxf)* 69, 350-359 (2020).
16. Digard, P. et al. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol.* 73, 2222-2231 (1999).
17. Tang, J. X. & Janmey, P. A. The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation. *J. Biol. Chem.* 271, 8556-8563 (1996).

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 白倉治郎	4. 巻 47
2. 論文標題 原子間力顕微鏡で細胞を見る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 2 - 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Usukura J, Narita A, Matsumoto T, Usukura E, Sunaoshi T, Watanabe S, Tamba Y, Nagakubo Y, Mizuo T, Azuma J, Osumi M, Nimura K, Tamochi R, Ose Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 A cryo-TSEM with temperature cycling capability allows deep sublimation of ice to uncover fine structures in thick cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 21406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00979-z.	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 白倉治郎	4. 巻 47
2. 論文標題 原子間力顕微鏡で細胞膜を見る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 2 - 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hayakawa E.H., Kato H., Nardone G.A., Usukura J.	4. 巻 80
2. 論文標題 A prospective mechanism and source of cholesterol uptake by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes co-cultured with HepG2 cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol. Int.	6. 最初と最後の頁 102179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2020.102179	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 該当する

1. 著者名 Morone N, Usukura E, Narita A, Usukura J	4. 巻 69
2. 論文標題 Improved unroofing protocols for cryo-electron microscopy, atomic force microscopy and freeze-etching electron microscopy and the associated mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 350-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa028	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白倉 治郎, Wang I-Hsuan, 三宅康之, 白倉 英治, 成田 哲博, 山内 洋平, 河岡 義裕
2. 発表標題 細胞膜内表面上のアクトミオシンによるインフルエンザAウイルスのゲノムパッケージング
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白倉 治郎, Wang I-Hsuan, 白倉 英治, 成田 哲博, 山内 洋平, 河岡 義裕
2. 発表標題 AFM live-cell imaging と免疫freeze etching電顕によるインフルエンザ感染過程の解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会
4. 発表年 2022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

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