

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K21283
研究課題名(和文)イオウ元素に着目したサルファープロテオミクス解析技術確立と応用

研究課題名(英文)Development of sulfur proteomics technique.

研究代表者

榊原 陽一 (Sakakibara, Yoichi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90295197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：「二次元電気泳動によるイオウ存在形態のサルファープロテオミクス解析」において、翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明を目的に、ゼブラフィッシュをモデルに二次元電気泳動によるプロテオーム解析を実施した。タンパク質パーサルフィドの特異的検出法開発を目的に、研究を実施した。タンパク質中のシステインのチオール基(SH基)にさらに硫黄が付加し、パーサルフィド(SSH基)となったものをタンパク質パーサルフィドという。SH基の蛍光標識試薬CyDye maleimideを用いたタンパク質SSH化検出条件の検討を行った。さらに、新型コロナウイルス感染時の受容体ACE2のチロシン硫酸化を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスの受容体であるACE2のチロシン硫酸化を明らかにした。ACE2のペプチドを用いた結果、3種類のACE11ペプチドの内、2種類のACE2ペプチド(ACE2-1とACE2-2)の硫酸化を酵素活性測定にて見出すことが出来た。ACE2のペプチドを酵素的に硫酸化し、LC-MSを用いて解析した結果、ACE2-1ペプチドの硫酸化ペプチドを検出することが出来、さらに、MS/MSによる構造解析を行うことが出来た。これらの結果より、ACE2のチロシン硫酸化が新型コロナウイルスの感染制御に関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In "Sulfur Proteomic Analysis of Sulfation by Two-Dimensional Electrophoresis," proteome analysis by two-dimensional electrophoresis was conducted on a zebrafish model to elucidate the function of tyrosine sulfation as a post-translational modification. Research was conducted to develop a specific detection method for protein persulfide. We investigated the conditions for detecting protein SSH using CyDye maleimide, a fluorescent labeling reagent for the SH group. Furthermore, we investigated the tyrosine sulfation of the ACE2, a receptor protein during SARS-CoV-2 infection.

研究分野：応用生物化学

キーワード：チロシン硫酸化 プロテオミクス 翻訳後修飾 イオウ レドックス制御

1. 研究開始当初の背景

我々は、食品機能研究にプロテオーム解析をいち早く取り入れ、特に蛍光ディフュージョン二次元電気泳動に関する新技術開発に取り組んできた。食品の抗酸化と一口で言っても化学的なラジカル消去活性から細胞における遺伝子発現を伴ったものまで有るが、タンパク質のイオウ元素に特異的に標的をあてた食品機能評価系はない。本研究において開発を目指したイオウ存在形態のサルファープロテオミクス解析技術は、従来の抗酸化作用評価法[DPPH ラジカル消去活性やORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) による食品や食品成分の化学的な評価]と異なる。食品や食品成分の化学的な性質の評価にとどまることなく、培養細胞や生体においてその構成成分として重要なタンパク質中のイオウ (S) に着目しその酸化や翻訳後修飾への影響を解析する。そのため、イオウを解析標的とした独自の革新的技術である。この解析技術を活用することで、食品や食品成分が持つ抗酸化ストレス効果に関して生体応答 (イオウのレドックスバランス) を指標に評価できる点に特色を有する。

2. 研究の目的

「イオウ (S)」は、酸素より巧みに軌道電子を利用することで、生体内で必須元素として高い反応性を生み出している。イオウはタンパク質中に種々の形態で存在することが知られている。本研究ではタンパク質中のイオウに着目し、システイン残基などタンパク質ポリペプチド骨格に含まれるイオウと硫酸化など翻訳後修飾としてのイオウを含む化学修飾に着目したタンパク質解析技術の開発とその食品科学分野での応用を目指す。タンパク質中のイオウの酸化還元状態や修飾形態は生体の酸化ストレスやレドックスバランス、病気と密接な関係が知られる。そのため、抗酸化作用を中心とした食品の機能を活用し、タンパク質に結合するイオウの酸化還元状態に積極的に介入して制御する技術開発を最終目的とする。これにより、新しい作用機構でイオウのレドックスバランスを標的とした機能性食品開発につながる独創的な基盤技術の確立が可能となる。

近年、システイン残基の新しい翻訳後修飾であるパースルフィド化が注目されている。タンパク質パースルフィドはシステインのチオール (SH) 基に過剰な硫黄原子が付加し、パースルフィド (SSH) となったものである。システインパースルフィドは、通常のシステインと比較して、抗酸化性や求核性が活性化されている状態にある。そこで、システインパースルフィドの電気泳動による分析法の確立を目的として研究した。

さらに、イオウ関連の翻訳後修飾にチロシン硫酸化が知られる。このチロシン硫酸化はウイルスの感染などにおいて様々な重要な役割を担っており、CCR-5 の硫酸化が HIV の感染に関与することが知られる。そこで、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染にチロシン硫酸化が関与するか明らかにすることを目的として研究した。

3. 研究の方法

現在のタンパク質パースルフィドの検出法は、主に Biotin switch 法を改良した方法が利用されている。Biotin switch 法の大まかな手順は、求核性が高く不安定であるタンパク質パースルフィドをまず安定な誘導体にするために、親電子アルキル化剤の SH 基標識試薬として利用されている N-エチルマレイミド (NEM) やヨードアセトアミド (IAA) などを用いて末端の SH 基をブロッキングする。その後、ビオチンで標識後、アビジンなどによって検出するという方法が行われている)。この Biotin Switch 法には、実験手順が煩雑である点、誤差を生みやすく定量的な解析が困難である点、S-S 結合や SH 基と区別して検出することが困難であり特異性に問題がある点などの問題が挙げられる。そのため、本研究では Biotin Switch 法の弱点を克服したタンパク質パースルフィドの検出法を確立することを目的にした。

システインのパースルフィド化

ウシ血清アルブミン (BSA) のシステイン残基パースルフィド化処理を行うために、50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.0)、1% CHAPS、1 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) にタンパク濃度 1 mg/mL となるように調製し、室温で 30 分間静置し、還元処理を行った。還元処理後、TCEP を取り除くために、限外ろ過スピナラムを用いて 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.0)、1% CHAPS に交換した。バッファー交換後、10 mM / 3mM ストック溶液となるように調製し、30 分間静置 (室温、暗所) することで BSA のパースルフィド化を

行った。このストック溶液は、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ aq を調製し、硫化物濃度を 5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いた比色定量法の DTNB 法で測定した。 NaOCl aq 濃度は、292 nm ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で測定した。そして、最終濃度比が 20 mM $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ /6 mM NaOCl となるように、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ aq に NaOCl aq を滴下して調製した。BSA のパースルフィド反応後、限外ろ過スピカラム (アンテグラル社, 10 K, 0.5 mL) を用いて 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.0)、1% CHAPS に交換した。

BSA のパースルフィド化確認

パースルフィド化した BSA を、限外ろ過スピカラムを用いて 100 mM 酢酸/酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) にバッファー交換をした (タンパク質濃度 1 mg/mL)。その後、1mM 1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン (FDNB) となるように添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。未反応の FDNB を除去するために、クロロホルムによる液液抽出を 3 回行った。得られた水層に、10 mM DTT を 0.1 mL、20% ZnSO_4 を 0.1 mL、1 N NaOH を 0.1 mL 順番に加え、よくボルテックスした。遠心分離 (208×g, 5 min) を行い、上清を回収後、上清と等量の 1N NaOH を加えアルカリ性にした。408 nm の吸光度を測定 (紫外可視分光光度計 UV-1800, 島津) し、モル吸光係数 $13800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて濃度を計算した。

CyDye maleimide の脱離によるシステインパースルフィド検出

システインのパースルフィド化処理を行った BSA を、10 μM CyDye-Maleimide を 1 時間反応させ蛍光標識をした。その後、未反応の Cy5 Maleimide を除去するために脱塩を行った。脱塩後、1 mM DTT で 1 時間還元処理をした。過剰な DTT は 20 %TCA、Sodium Deoxycholate、Acetone を用いたタンパク質沈殿法によって除去した。

メタンチオスルホン酸 S-メチルを用いたシステインパースルフィド検出

システインのパースルフィド化処理を行った BSA を、20 mM メタンチオスルホン酸 S-メチル (MMTS) , 2.5 % SDS となるように調製し、50°C で 20 分間振とうした。脱塩後、10 μM Cy5 Maleimide を 1 時間反応させることで蛍光標識をした。そして、20 %TCA、Sodium Deoxycholate、Acetone を用いたタンパク質沈殿法により Cy5 Maleimide を除去した。

SARS-CoV-2 の宿主側の受容体である ACE2 の細胞外領域のアミノ酸配列からもチロシン硫酸化部位予測ツール Sulfinator (<https://www.expasy.org/resources/sulfinator>) により、細胞外領域において 6 か所のチロシン硫酸化部位 (158, 196, 199, 202, 207, 497 残基) が予測された。そのため、今回チロシン硫酸化が予測された ACE2 もチロシン硫酸化されることにより、何らかの役割を担っている可能性が考えられる。そこで本研究では、予測されたチロシン硫酸化部位を含む ACE2 のペプチドを調製し、これを基質としてチロシン硫酸化反応を行い、ACE2 のチロシン硫酸化の検討を行った。

ACE2 ペプチド (ACE2-1, 2, 3) の調製

ACE2-1, 2, 3 が組み込まれたベクターを組み込んだ大腸菌 *E. coli* BL21 を 0.1 mg/mL ampicillin を含む LB 培地 3 mL で 37°C、15 時間の前培養後、0.1 mg/mL ampicillin を含む LB 培地 200 mL で 37°C、2~3 時間の大量培養 ($\text{O.D}_{600}=0.6$) を行い、終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を添加し、25°C、15 時間培養し発現誘導を行った。発現誘導後、遠心分離を行い、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) を用いて菌体の洗浄を行った。洗浄後、遠心分離を行い、Lysis buffer で再懸濁しフレンチプレス (1, 200 kg/cp²) を 2 回行い菌体の粉砕を行った。粉砕溶液を遠心分離し、上清を回収し、Lysis buffer によって平衡化しておいた Glutathione Sepharose 4B 1.5 mL に添加し、4°C で 15 時間回転混和させ GST 融合タンパク質を Glutathione Sepharose 4B に吸着させた。5 回の洗浄後、Lysis buffer と同様にして Thrombin buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) で 3 回洗浄した。洗浄後、ACE2 ペプチドは 10 mM のグルタチオン (還元型) で溶出を行った。Thrombin 処理後、再度 Glutathione Sepharose 4B による GST の除去を行い、ACE2 ペプチドを得た、その後 Waters 製 Sep-pack Plus C18 カートリッジを用いて固相抽出により精製した。

E. coli Origami からの human TPST-2 の精製

LB 培地 (ampicillin 0.05 mg/mL、アラビノース 0.5 mg/mL、クロラムフェニコール 0.02 mg/mL) で 37°C で 15 時間前培養した後、200 mL の LB 培地 (ampicillin 0.05 mg/mL、アラビノース 0.5 mg/mL、クロラムフェニコール 0.02 mg/mL) に培養した大腸菌を加え、5~6 時間の大量培養 ($\text{O.D}_{600}=0.6$) を行い、IPTG を終濃度が 1 mM となるように添加し、30°C で 15 時間培養し発現誘導を行った。発現誘導後、遠心分離により菌体を回収し洗浄した。その後、15 mL の Native Binding buffer で再懸濁し、フレンチプレス (1, 200 kg/cp²) で菌体を破碎した。破碎溶液を 4°C、10,000 ×g、20 分の条件で遠心分離を行い、上清を回収した。回収後、Native Binding buffer によって平衡化しておいた Ni-NTA アガロース 1 mL に添加し、上清除去後、Ni-NTA アガロースに Native Wash buffer (組成) を加え洗浄した。洗浄後、Native Elution buffer を 1 mL 添加し、遠心分離し、上清をマイクロチューブに回収した。

4. 研究成果

BSA のシステインパースルフィド化の確認

1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンによるパースルフィド化の確認により、 $1.38 \pm 0.76 \mu\text{M}$ のシステインがパースルフィド化されているということが分かった。このことから、BSA 1 分子中の SSH 化率は、 $9.54 \pm 5.24 \%$ であり、全システインを考慮した SSH 化率は $0.27 \pm 0.14 \%$ であるということが示唆された。

CyDye-Maleimide の脱離によるシステインパースルフィド検出

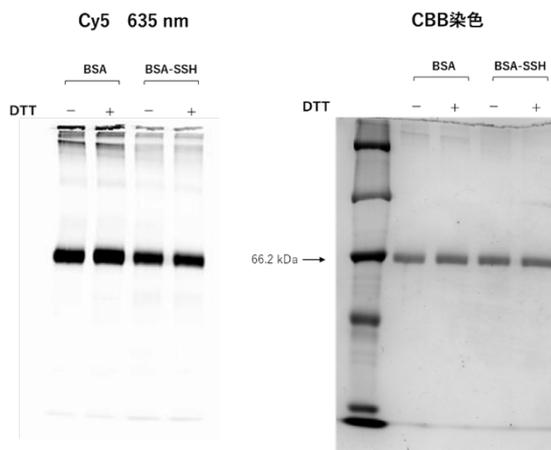


Fig. 1 CyDye-Maleimide による SSH 化の検出
(左: 蛍光イメージ画像, 右: CBB 染色画像)

$$\text{計算法: } \frac{\text{DTT(-) Cy5のVolume}}{\text{CBBのVolume}} \div \frac{\text{DTT(+) Cy5のVolume}}{\text{CBBのVolume}}$$

SDS-PAGE 結果から、定量解析を行ったところ、BSA-SSH では DTT 処理によって蛍光強度が 0.893 ± 0.070 倍に低下したことが分かり、SSH 化を検出できたのではないかと示唆された。

メタンチオスルホン酸 S-メチルを用いたシステインパースルフィド検出

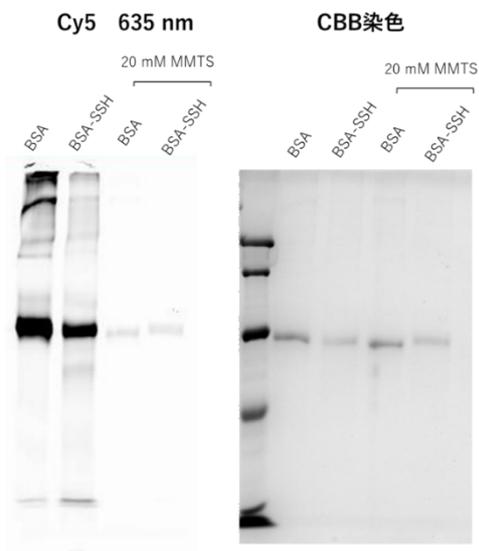


Fig. 2 MMTS による SSH 化の検出
(左: 蛍光イメージ画像, 右: CBB 染色画像)

$$\text{計算法: } \frac{\text{BSA-SSH Cy5のVolume}}{\text{CBBのVolume}} \div \frac{\text{BSA Cy5のVolume}}{\text{CBBのVolume}}$$

SDS-PAGE 結果から、定量解析を行ったところ、20mM MMTS 処理を行った BSA-SSH では BSA と比較して、蛍光強度が 1.378 ± 0.146 倍になっていることが分かり、SSH 化を検出できたのではないかと示唆された。

ACE2-1, 2, 3 のチロシン硫酸化

放射性同位体標識 PAPS [^{35}S] を用いて基質ペプチドのチロシン硫酸化反応を行った。結果として、細胞から調製した粗酵素溶液を用いて行った反応ではチロシン硫酸化が確認できなかった。しかし、大腸菌 Origami から精製した hTPST-2 にて ACE2-1、ACE2-2 のチロシン硫酸化が確認できた (Fig. 3)。また、表 1 の結果より、ACE2-1 よりも ACE2-2 で活性が高くなっていることが分かった。

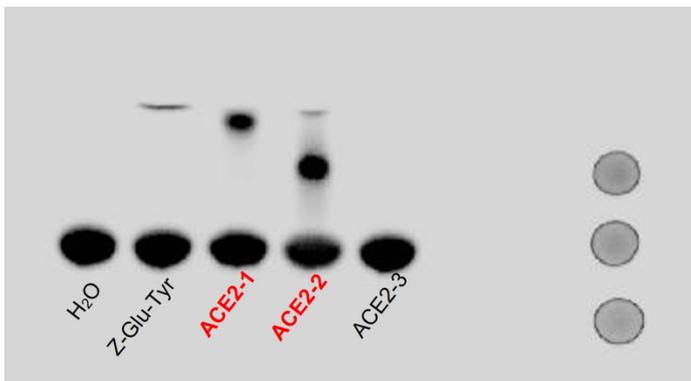


Fig.3 大腸菌 origami から精製した hTPST-2 を用いたチロシン硫酸化

Table 1. ACE2 ペプチドの比活性

	比活性(pmol/min/mg)(n=3)
Z-Glu-Tyr	11.74 ± 2.00
ACE2-1	72.70 ± 12.02
ACE2-2	167.96 ± 19.37
ACE2-3	N.D.

平均値 \pm SD N. D. : not detected

今回大腸菌 Origami から精製した hTPST-2 によるチロシン硫酸化において、ACE2-1 および ACE2-2 のチロシン硫酸化が確認できた。このことより、ACE2 のチロシン硫酸化も HIV や PSGL-1 などと同様にウイルスの結合やアンジオテンシン II からアンジオテンシン (1-7) への変化において重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、ACE2-1 より ACE2-2 のほうで酵素活性が高くなっていた。さらに ACE2-1 および ACE2-2 の Kinetics の結果から、ACE2-1 よりも ACE2-2 の方が親和性が高いことが分かった。これは ACE2-2 のほうに硫酸化が予測されたチロシン残基が複数含まれていたためであると考えられる。今後、ACE2-2 においてどのチロシン残基が硫酸化されているかを確認するために ACE2-2 に含まれる 4 つのチロシン残基のうち 1 つ以外をフェニルアラニンに変えた変異体を 4 種類作製し、どのチロシン残基が硫酸化されているのかを確かめる必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurogi Katsuhisa, Manabe Yoko, Liu Ming-Cheh, Suiko Masahito, Sakakibara Yoichi	4. 巻 85
2. 論文標題 Molecular cloning and characterization of common marmoset SULT1C subfamily members that catalyze the sulfation of thyroid hormones	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2113~2120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab141	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
1. 著者名 Teramoto Takamasa, Nishio Takeaki, Kurogi Katsuhisa, Sakakibara Yoichi, Kakuta Yoshimitsu	4. 巻 562
2. 論文標題 The crystal structure of mouse SULT2A8 reveals the mechanism of 7 -hydroxyl, bile acid sulfation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 15~20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.113	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 Kai Ayako, Tokuyoshi Takahiro, Fujikawa Takashi, Kawano Yoshihiro, Ueki Toshiyuki, Nagamine Miyuki, Sakakibara Yoichi, Suiko Masahito, Inoue Kengo	4. 巻 87
2. 論文標題 Proteolytic Maturation of the Outer Membrane <i>c</i> -Type Cytochrome OmcZ by a Subtilisin-Like Serine Protease Is Essential for Optimal Current Production by <i>Geobacter sulfurreducens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0261720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02617-20	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 黒木勝久、榊原陽一	4. 巻 4
2. 論文標題 イオウ元素に着目したプロテオミクス解析技術確立と応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 69-70
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 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 Tsutsumi Shuhei, Tokunaga Yuki, Shimizu Shunsuke, Kinoshita Hideki, Ono Masateru, Kurogi Katsuhisa, Sakakibara Yoichi, Suiko Masahito, Liu Ming-Cheh, Yasuda Shin	4. 巻 45
2. 論文標題 Effects of indole and indoxyl on the intracellular oxidation level and phagocytic activity of differentiated HL-60 human macrophage cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 569 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.569	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 Tsutsumi Shuhei, Tokunaga Yuki, Shimizu Shunsuke, Kinoshita Hideki, Ono Masateru, Kurogi Katsuhisa, Sakakibara Yoichi, Suiko Masahito, Liu Ming-Cheh, Yasuda Shin	4. 巻 84
2. 論文標題 Investigation of the effects of indoxyl sulfate, a uremic toxin, on the intracellular oxidation level and phagocytic activity using an HL-60-differentiated human macrophage cell model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1715782	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 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 黒木勝久、秋山克樹、榊原陽一
2. 発表標題 プロテオミクス基盤技術の畜産分野への応用に関する研究
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野悠, 黒木勝久, Ming-Cheh Liu, 榊原陽一
2. 発表標題 ヒトSulfataseによるポリフェノール脱抱合反応解析
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 岩切裕哉, 永瀨清子, 大田輝, 黒木勝久, 水光正仁, 榊原陽一
2. 発表標題 ターゲットプロテオミクスによる天然化合物の機能性予測システム
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 Kiyoko Nagahama, Akira Ota, Katsuhisa Kurogi, Kunihiro Yamamori, Yoichi Sakakibara
2. 発表標題 Simultaneous estimation of multiple food functions of food components using a targeted proteomics approach
3. 学会等名 10th AOHPPO (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬川浩志, 黒木勝久, 児玉直輝, Ming-Cheh Liu, 水光正仁, 榊原陽一
2. 発表標題 プロスタグランジン硫酸転移酵素SULT7A1の機能解明
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Pongsakorn Banpakulsiriwut, Katsuhisa Kurogi, Ming-Cheh Liu, Masahito Suiko, Yoichi Sakakibara
2. 発表標題 Enzymatic sulfation of vitamin B6 by human cytosolic sulfotransferases
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田菜月、黒木勝久、水光正仁、榊原陽一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュをモデルとしたチロシン硫酸化の生理機能解明
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田輝、黒木勝久、永瀨清子、水光正仁、榊原陽一
2. 発表標題 マーカータンパク質の発現パターンによる食品機能予測システムの確立
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒木勝久・Ming-Cheh Liu・水光正仁・榊原陽一
2. 発表標題 細胞質硫酸転移酵素の核内受容体応答に対する網羅的な発現定量解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2021年度大会
4. 発表年 2021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 分担者	黒木 勝久 (Kurogi Katsuhisa) (20647036)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	服部 秀美 (Hattori Hidemi) (80508549)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	

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