

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22247002

研究課題名(和文) 相同DNA組換え開始自在制御による新規ゲノム多様化機構の検証と標的組換えの実現

研究課題名(英文) Toward manual control of the initiation of homologous recombination for genome diversification

研究代表者

柴田 武彦 (Shibata, Takehiko)

独立行政法人理化学研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70087550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：相同DNA組換えは二本鎖切断とその修復経路選択で制御される。SP011組換え開始蛋白質と、RecA/Rad51組換え酵素に注目し、(1) 新バイオアッセイ系でイネとシロイヌナズナのSpo11自身もつ二本鎖切断活性を同定した。(2) Rad51に結合するSrs2 DNA融解酵素の経路選択機能を明らかにした。(3) Rad51の非相同末端結合関与という意外な成果を得た。(4) RecA自身の機能制御機構を明らかにした。標的組換えと標的変異を自在に操る可能へ一歩近づいた。

研究成果の概要(英文)：Homologous DNA recombination (HR) is regulated by double-strand DNA-break (DSB) formation and recombination-pathway choice among two types of HR (non-crossing-over and crossing-over) and non-homologous end-joining (NHEJ). (1) Using new bio-assays, we identified rice and Arabidopsis SP011s (meiotic recombination-initiating proteins) and their intrinsic DSB-forming activity for the first time. (2) We identified using a newly devised genetic assay, DSB-repair pathway-choice functions of Srs2 helicase, which forms an active complex with Rad51 (a eukaryotic RecA-family recombinase). (3) We unexpectedly found that Rad51 functions in end-joining fidelity of the canonical NHEJ. (4) We revealed by structural and biochemical studies, roles of an acidic residue on a flexible loop of RecA in selecting ssDNA in its various in vitro functions, and in activation and inactivation of its recombinase activity. These results suggest new roles of RecA/Rad51 in all the three major DSB-repair pathways.

研究分野：生化学、遺伝学、タンパク質構造科学

キーワード：ゲノム構築 ゲノム再編 ゲノム維持 遺伝的多様化 二本鎖切断修復 経路選択 RecA/Rad51

1. 研究開始当初の背景

交配育種は、単なる変異体選択に比べ極めて高速である。この技術で多様な環境に適応した作物等が育種され、百年以上に渡る実績による安心感もある。しかし、比較的速く育種できるイネでさえ、懸念されている急激な環境変動対応には交配育種は不十分である。交配育種の作動原理はDNA二本鎖切断という傷の相同(DNA)組換えによる修復である(図1)。配偶子形成での相同染色体分離に伴う、両親に由来する一对の同じ遺伝子(対立遺伝子)の間でしか起こらない組換えから、10%程度もの塩基配列の食い違いを許容するトリの免疫遺伝子を創るDNA配列ファミリー間の組換えまで、組換えホットスポットで相同組換え開始が制御されている。株化細胞での人為的組換え開始・抑制制御による遺伝子創出によって任意抗原の特異抗体を迅速生産するADLib法を、我々が実現した。これは新規遺伝情報創出という、相同組換えのもつ遺伝的多様化機能の一端を示す。更に、相同組換えは、コピー・ペーストによる二本鎖切断修復(gene conversion)だけでなく、その外側に位置する染色体部分を入

れ替える交叉を伴うことがある(図1)。倍数体体細胞での相同染色体間の交叉は、発ガンの原因として知られるヘテロ接合性喪失(LOH)を招く。更に高等動植物では、二本鎖切断は、主に相同組換えと異なりエラー、即ち突然変異を伴うことが多いと考えられていた非相同末端結合(NHEJ)で修復されることが知られるようになった。これら3種の組換え経路のどれが選ばれるかは、二本鎖切断修復の結果を大きく左右する(図1)。

2. 研究の目的

相同組換えを誘導する二本鎖切断を能動的に制御する系を生体はもつ。その系に介入して相同組換えを自在に制御できれば、ゲノム上の指定した部位で修正、入れ替え、削除や追加という遺伝情報の編集、新規遺伝子創出によって、交配育種と同じ原理を使いながら、ゲノムの改変に要する時間を大きく短縮できる。また、組換え開始時に決まると言われている二本鎖切断修復の経路選択機構についての理解は、標的組換えになるかなど結果の予知と安全性確保に欠かせない。そこで、鍵になるSPO11組換え開始酵素と、二本鎖切断末端に働き組換えの運命を決めるRecA族組換え酵素(RecA, Rad51)、それと協力して働く酵素の機能と機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 異種バイオアッセイ系: Spo11 蛋白質自身が本当に二本鎖切断活性を持つかを示すため、また、植物の Spo11 候補のどれが、実際に二本鎖切断活性を持つかを検定するために、ショウジョウバエの卵母細胞で植物の Spo11 候補遺伝子だけを発現させ、二本鎖切断が起こるかどうかを細胞学的、および遺伝学的に検定する2種類の異種バイオアッセイ系を開発した(⑦)。(2) イネの Spo11 候補遺伝子発現解析: イネの穂の発達段階で形態的に減数分裂以後の花粉の発達段階が分かる。減数分裂期、その後の発達期に応じた試料を集め、real time RT (Reverse Transcription)-PCR により、Spo11 候補遺伝子の mRNA 量を計測した。(3) Double Holliday 中間体を経由する交叉型相同組換え、交叉を伴わない SDSA 経路による非交叉型相同組換え、NHEJ 結合の測定: 出芽酵母細胞と、レポーターDNAを用いる交叉組換えアッセイ系に加えて、SDSAによる相同組換えを特異的に抑制する系を新たに構築して解析を行った。(4) SDSA-NHEJアッセイ: レポーターDNA、ura3-int Δ isceI は、456bp 部分を欠いた URA3 遺伝子、選択マーカー(LEU2 遺伝子)、DNA複製開始点(ARSH4)とセントロメア(CEN6)をもつ。ura3の欠失部分の両側は3365塩基対、1492塩基対の、ゲノムDNA(染色体XI、染色体V)との相同配列をもつ(図2A; ⑥)。456bp部分を欠いた跡には、I-SceI エンドヌクレアーゼ切断配列が入れて

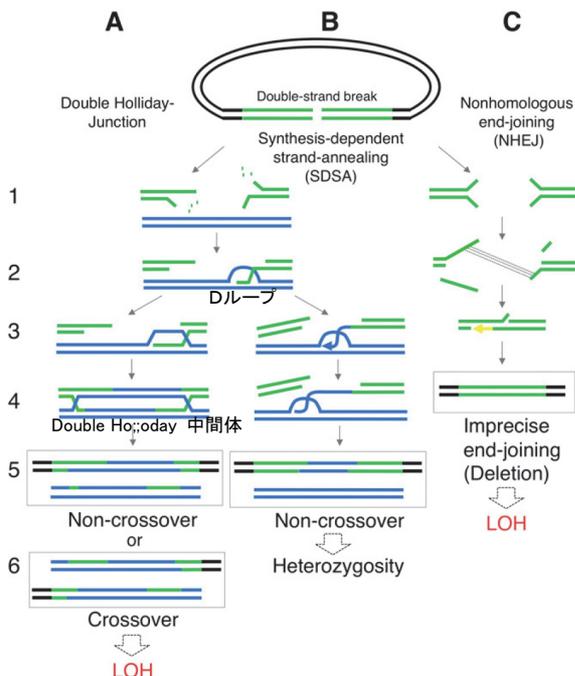


図1. 真核生物におけるDNA二重鎖切断の修復: 二本鎖切断は、相同DNA組換え、または、非相同末端結合(NHEJ; 経路C)の何れかの組換えで修復される。非相同末端結合は修復部分に欠失変異を生じることが多い。倍数体体細胞では、対立遺伝子部分が欠失部分に含まれると、ヘテロ接合性喪失(LOH)を生じる。相同組換えは更に、Double Holliday 中間体(A4)を経由し、交叉(crossover)体もできる経路Aと、SDSAと呼ばれる交叉体を伴わない経路Bがある。経路AもLOHを生じるリスクがあるが、経路BはLOHを生じない。1⇨2の段階で、相同組換えかNHEJかの選択が行われ、2⇨3の段階で、経路Aか経路Bかの選択が行われるが、機構が分かっていなかった。高等真核生物の体細胞では経路Cが優先する。体細胞での相同組換えでは経路Bが選ばれ、減数分裂ではAが選ばれ、相同染色体分離での半数体化働くキアズマを形成する。(図は⑥より改変)

ある。I-*SceI* で切断し、直鎖状 DNA として酵母細胞に導入する。この切断部位が修復され環状に戻ると細胞でプラスミドとして維持され、その *leu2* 変異を相補し、ロイシンのない培地でも生育できる (*Leu*<sup>+</sup>)。

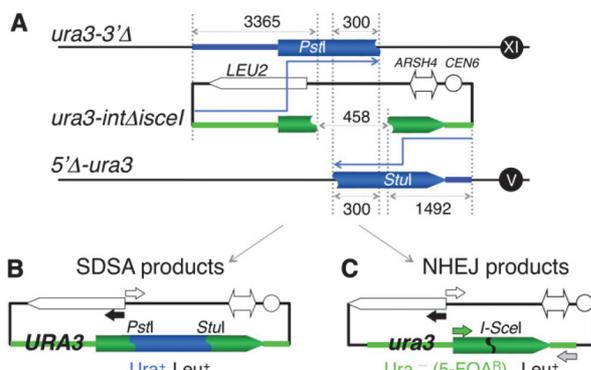


図 2. SDSA-NHEJ アッセイ (⑥): A. レポーター DNA、B. SDSA アッセイでの二本鎖切断修復産物 C. NHEJ アッセイでの二本鎖切断修復産物

SDSA アッセイでは、DSB の両端が染色体 XI、V 上のそれぞれの相同領域を鋳型にして欠けている部分をコピーして単鎖として伸長する。両切断端から合成され互いに相補配列をもつ一本鎖 DNA 部分が鋳型から離れアニールすることで、環状に戻り、*URA3* 遺伝子が回復し、細胞の *ura3* 変異を相補する (*Ura*<sup>+</sup>、生育にウラシル要求がなくなる)。この *Ura*<sup>+</sup> 形質転換体を計測する (図 2B)。

NHEJ アッセイでは、二本鎖切断端が結合し環状になれば、*Leu*<sup>+</sup> になるが、*Ura* 要求性のままで、細胞は薬剤 5-FOA に耐性である (5-FOA<sup>R</sup>; 図 2C)。正確に修復された場合、この細胞から回収したプラスミド DNA は I-*SceI* で切断でき、不正確な修復では I-*SceI* で切断できない。これで正確な NHEJ か不正確な NHEJ かを判別できる。(⑥)

(5) 変異 *RecA* の生化学機能解析：調べるアミノ酸残基の置換変異を導入した変異 *recA* 遺伝子を多量発現プロモーター制御下に置いたプラスミド DNA を構築し、本来の *recA* 遺伝子を欠いた大腸菌に導入した。発現を誘導した変異 *recA* 蛋白質を定法で精製した。*RecA* の生化学機能として、DNA 結合を電気泳動度シフトアッセイ (EMSA) で、活性化に有効な DNA 結合を DNA 依存型 ATPase アッセイと SOS repressor である *LexA* 蛋白質の自己切断アッセイで、組換え酵素活性をゲル電気泳動 D ループアッセイで調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 異種バイオアッセイ系を用いた、イネとシロイヌナズナの *Spo11* の同定

*Spo11* は、減数分裂期開始に働く二本鎖切断導入に必要なことは遺伝学、細胞生物学的な解析で明らかになっているが、その蛋白質自身が二本鎖切断活性を担うかは確定していなかった。そこで、ショウジョウバエを用いて構築した異種バイオアッセイ系で、植物 *Spo11* 候補のどれが二本鎖切断を入れること

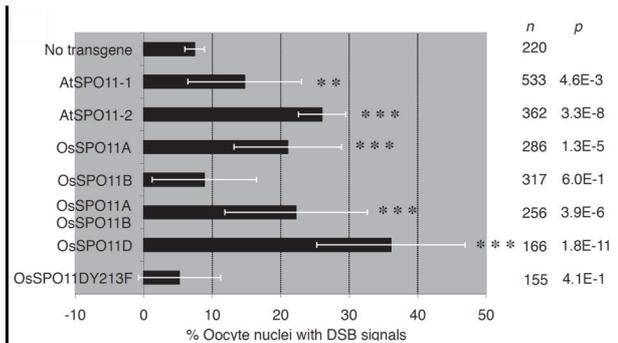


図 3. ショウジョウバエ *mei-w68* (*DmSpo11* 欠損) *mus301* (DNA helicase の一つを欠く) 二重変異体の卵母細胞を用いた、異種バイオアッセイ系によるシロイヌナズナ (*At*) とイネ (*Os*) *SPO11* 発現による二本鎖切断の検出。卵母細胞核の形態で見分ける方法でも同じ結果を得た。

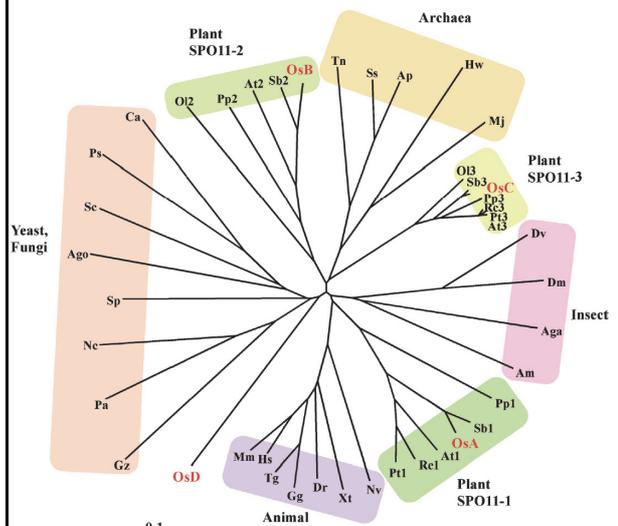


図 4. *AtSpo11-1*, *AtSpo11-2*, *AtSpo11-3*, *OsSpo11A*, *OsSpo11B*, *OsSpo11C*, *OsSpo11D* の進化系統樹解析

ができるかを解析した。シロイヌナズナでは *AtSpo11-1*, *AtSpo11-2* いずれもが二本鎖切断機能を示した (図 3; ⑦)。この結果は、他に植物由来の蛋白質は存在しないので、*Spo11-1*, *Spo11-2* 自身が二本鎖切断活性中心を持つことを示す。これらの遺伝子の変異はいずれも減数分裂が異常になることが知られており、いずれも *Spo11* であると結論した。一方、これらそれぞれのオルソログであるイネの *Spo11A*, *Spo11B* (図 4) の内、前者は二本鎖切断機能を示したが、後者は示さなかった。一方、シロイヌナズナにはオルソログが存在せず、進化系統樹では、酵母などカビの *Spo11* に近い *Spo11D* (図 4) が極めて強い二本鎖切断機能を示した (図 3; ⑦)。

そこで、イネの花粉母細胞の発達段階を追って試料を集め、細胞から mRNA を抽出して、体細胞で *TopoVI* として働く *Spo11C* も含めて発現レベル解析を行った。その結果、*Spo11D* だけが、減数分裂期に高いレベルで発現しその後発現が減少することが示された。これらの結果から、*Spo11D* がイネの *Spo11* であると結論した (図 5; ⑦)。

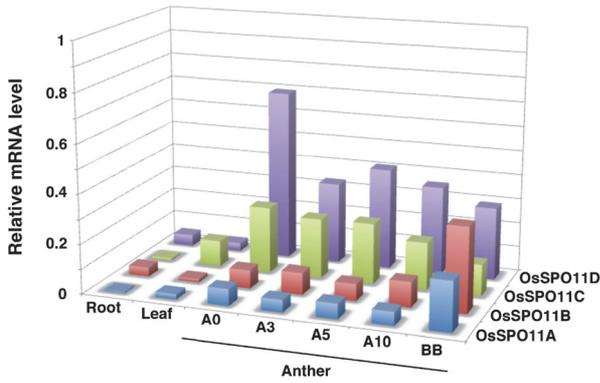


図 5. 定量的 real time RT-PCRによるイネの Spo11 パラログの発現解析。花粉母細胞での減数分裂からの発達段階(A0 から A10 までと開花直前(BB)),による発現レベルの変化と、根、葉細胞での発現レベルとの比較

(2) アンチ組換え酵素 Srs2 DNA 融解酵素 (helicase) の組換えでの機能

異種バイオアッセイ系では二本鎖切断が修復されないように *mus301* 変異ホモ接合体を用いた。ところが、Mus301 等 DNA 融解酵素の二本鎖切断修復での機能は明らかでは無かったので取り上げた。特に出芽酵母の Srs2 DNA 融解酵素の欠損変異は組換え促進となり、試験管内の系では、Rad51 の組換え酵素活性阻害の報告もあり、アンチ組換え酵素と言われていた。交叉型組換えを測るレポーターDNA の系では、*srs2* 欠失変異導入は組換えの 3 倍程度の促進になった (図 6C; ⑤)。即ち Srs2 は交叉の抑制に働いていることが示された。一方、新たに開発した SDSA アッセイと NHEJ アッセイで解析したとこ

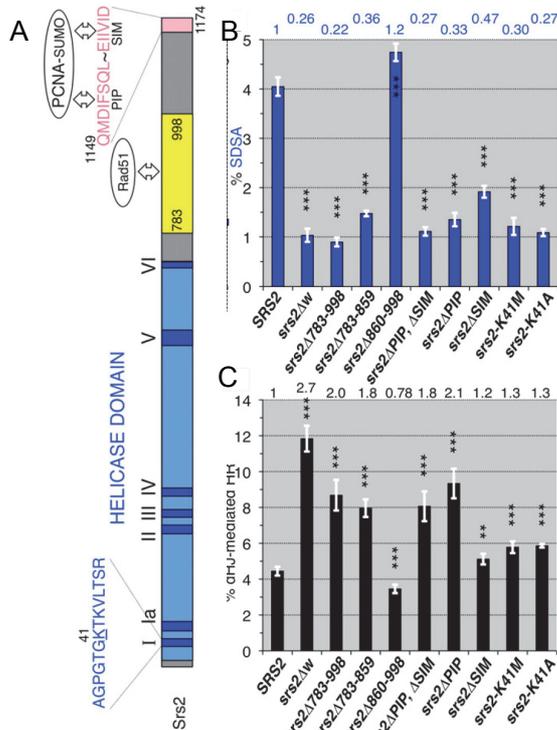


図 6. Srs2 の Rad51 結合ドメインと、DNA 融解活性の SDSA 経路と Double Holliday (dHJ) 中間体経路での働き。A. Srs2 の機能ドメイン。C. SDSA アッセイ、E. 交叉(dHJ) アッセイ

ろ、Srs2 は SDSA 経路による相同組換えには必要であった (図 7; ⑥)。更に、Srs2 は NHEJ には抑制的に働くが (図 7; ⑥)、その欠損は NHEJ を不正確にすることが分かった (⑥)。このように、Srs2 は、相同組換えと NHEJ を通して、組換え経路の選択に深く関わり、LOH の抑制に働くことが明らかになった。

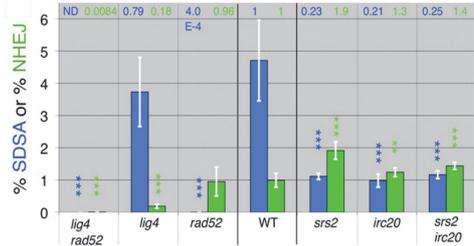


図 7. DNA 融解酵素 Srs2 と *irc20* の SDSA と NHEJ での働き

そこで、Srs2 の機能ドメイン (図 6A) を解析した。Rad51 への結合機能を残基 783-859 番領域に同定すると共に、Rad51 との結合は、SDSA 経路による相同組換えに必要で交叉型組換え抑制に働くことを明らかにした。さらに、Srs2 の DNA 融解酵素活性を損なう、Lys41 変異 (K41A, K41M) 解析の結果、この活性は SDSA には必要であるが、交叉抑制には不要であることが分かり (図 6B, C; ⑤)、図 1 に示した組換え経路選択機構の理解に重要な手がかりが得られた。

(3) RecA 族組換え酵素の NHEJ への関与

SDSA アッセイで Rad51 の必要性を確認したが、同じレポーターを用いる NHEJ アッセイで、*rad51* 欠失変異により NHEJ が著しく昂進することが分かった (図 8; ⑤)。この NHEJ は、*lig4* 変異で抑制されることから正統的 NHEJ であることが分かった。また、正統型 NHEJ は思いの外正確であるが、*rad51* 欠損変異はそれを著しく不正確にした (⑤)。このことは、Rad51 は、正統的 NHEJ の抑制に働く一方、その正確さ維持にも働くということを示す。従来 NHEJ は Rad51 の機能とは独立というのが定説であった。

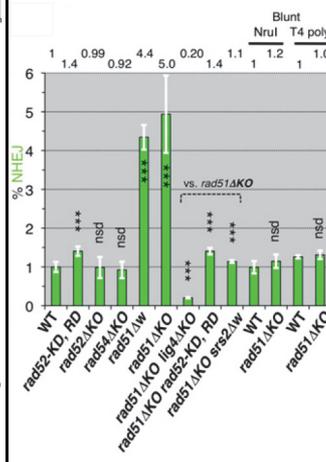


図 8. Rad51 は、NHEJ を強く抑制する。*rad51* 欠損変異はいずれも NHEJ のレベルを 4-5 倍増加させる。最近、NHEJ には Ku70-Ku80, Lig4 に依存する正統 (canonical) 型、数塩基以下の相補塩基対を基にし必ず欠失変異を伴う microhomology mediated 型、それ以外の変異を伴う不正確な NHEJ に分類できることが分かってきた。

(4) RecA 族組換え酵素原型の RecA の分子機能制御とその機構

ここまで述べた成果で、二本鎖切断修復の

3つの経路(図1、A-C)の経路選択に Rad51 と Srs2 が深く絡んでいることが明らかになった。特に Rad51 の NHEJ への関わりはこれまで確立してきたパラダイムと抵触する。

一方、以下述べるように Rad51 組換え酵素の原型 RecA の分子機能研究成果は、RecA/Rad51 の未知の機能を示唆した。

X線結晶構造解析の結果、ループ L1 中の Asp161 が DNA 結合の特異性に働くことが予測された(①)。DNA 結合アッセイ(EMSA)、DNA 依存型 ATPase アッセイ、LexA 蛋白質の自己切断アッセイのいずれに於いても、Asp161 を中性アミノ酸残基に置き換えた D161A、D161N 変異は、いずれも RecA の DNA 結合において、一本鎖型への選択性を失わせた(①)。

RecA/Rad51 族組換え酵素は、互いに相同な一本鎖 DNA と二重鎖 DNA とを塩基対切り換えにより対合して組換え中間体(Dループ、図1)を形成する組換え酵素活性をもつ。この反応でも RecA/Rad51 は、先に一本鎖 DNA に結合してから、二重鎖 DNA に反応してDループを作る。一方、先に RecA や Rad51 を二重鎖 DNA と反応させると組換え酵素活性が著しく阻害されるが、D161A 変異は、この阻害も解除することが分かった(図9; ①)。即ち、Asp161 は、一本鎖 DNA への優先結合だけでなく、先に一本鎖 DNA と反応するか、二重鎖 DNA と反応するかでおこる分子機能スイッチにも働き、組換え酵素阻害条件下で RecA/Rad51 が未知の機能を持つ可能性が示唆された。

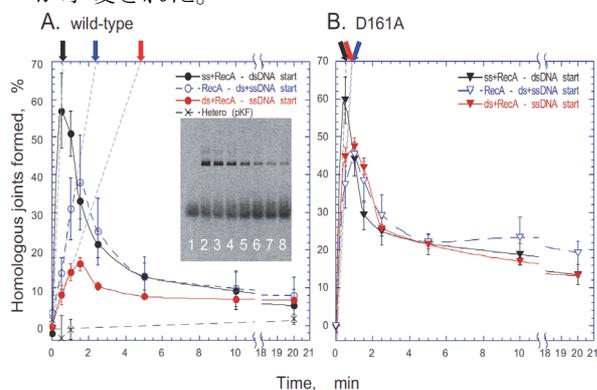


図9. RecAのAsp161の制御機能:A. 相同な一本鎖DNAと二重鎖DNAとが共存しているところに、RecAを加えると先ず一本鎖DNAに結合してDループ形成を行う(青の○と初速を示す矢印)。先ずRecAと一本鎖DNAとを反応させてから二重鎖DNAを加える(黒の丸と矢印)と初速で5倍速くなる(標準法)。ところが、RecAと二重鎖DNAとを先に反応させてから一本鎖DNAと加えると標準法に比べ、初速で1/10程度までDループ形成反応が抑えられる。

B. ところが、Asp161を中性のAlaに置き換える(D161A)と、この抑制が解除される。(時間経過でDループが減るのはできたDループが次段階の分岐移動でATP加水分解のエネルギーで解離されるため。)

#### (5) 今後の展望

高等生物同様、外来DNAのNHEJによる無作為挿入が高頻度に起こる一真菌種の

Rad51とSrs2酵素が、出芽酵母と同様に強く相互作用することを確認しつつある。また、Rad51/RecAの未知機能についても手がかりを得て、解析を進めている。Spo11の二本鎖切断機能と、Rad51とSrs2による組換え経路選択制御の理解の推進は、生体の相同組換え人為的促進制御による標的組換え実現への重要な一歩である。最近、CRISPR-Cas9により真核生物の標的部位に二本鎖切断を導入するゲノム編集が開発されたが、相同組換えとNHEJの制御が自在にできない。Rad51とSrs2が、NHEJにも機能することが確かなこととなり、その機構が理解できれば、標的組換えと標的変異とを自在に操ることも可能になるであろう。

#### <引用文献>

文献番号は以下の雑誌論文の番号と共通

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

- ① Shinohara, T., Ikawa, S., Iwasaki, W., Hiraki, T., Hikima, T., Mikawa, T., Arai, N., Kamiya, N. and Shibata, T.: "Loop L1 governs the DNA-binding specificity and order for RecA-catalyzed reactions in homologous recombination and DNA repair," *Nucleic Acids Res.*, **43**, 973-986 (2015). DOI: 10.1093/nar/gku1364.
- ② Shingu, Y., Kanno, Y., Tokai, T., Shibata, T. and Wakasa, K.: "A visible assay for meiotic homologous recombination in pollens of rice," *Plant Biotechnology*, **31**, 55-59 (2014). DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.1121a.
- ③ Kagawa, W., Arai, N., Ichikawa, Y., Saito, K., Sugiyama, S., Saotome, M., Shibata, T. and Kurumizaka, H.: "Functional analyses of the C terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein," *Nucleic Acids Res.*, **42**, 941-951 (2014). DOI: 10.1093/nar/gkt986.
- ④ Morozumi, Y., Ino, R., Ikawa, S., Mimida, N., Shimizu, T., Toki, S., Ichikawa, H., Shibata, T. and Kurumizaka, H.: "Homologous pairing activities of two rice RAD51 proteins, RAD51A1 and RAD51A2," *PLoS ONE*, **8**, e75451 (75410 pages) (2013). DOI: doi:10.1371/journal.pone.0075451.
- ⑤ Miura, T., Shibata, T. and Kusano, K.: "Putative antirecombinase Srs2 DNA helicase promotes noncrossover homologous recombination avoiding loss of heterozygosity," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16067-16072 (2013). DOI: 10.1073/pnas.1303111110.
- ⑥ Miura, T., Yamana, Y., Usui, T., Ogawa,

- H. I., Yamamoto, M.-T. and Kusano, K.: "Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the Irc20 and Srs2 DNA helicases," *Genetics*, **191**, 65-78 (2012). DOI: 10.1534/genetics.112.139105.
- ⑦ Shingu, Y., Tokai, T., Agawa, Y., Toyota, K., Ahamed, S., Kawagishi-Kobayashi, M., Komatsu, A., Mikawa, T., Yamamoto, M. T., Wakasa, K., Shibata, T. and Kusano, K.: "The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a Drosophila bioassay," *BMC Mol. Biol.*, **13**, 1 (20 pages) (2012). DOI: 10.1186/1471-2199-13-1.
- ⑧ Arai, N., Kagawa, W., Saito, K., Shingu, Y., Mikawa, T., Kurumizaka, H. and Shibata, T.: "Vital roles of the second DNA-binding site of Rad52 protein in yeast homologous recombination," *J. Biol. Chem.*, **286**, 17607-17617 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M110.216739.
- ⑨ Inoue, J., Nagae, T., Mishima, M., Ito, Y., Shibata, T. and Mikawa, T.: "A mechanism for single-stranded DNA-binding protein (SSB) displacement from single-stranded DNA upon SSB-RecO interaction," *J. Biol. Chem.*, **286**, 6720-6732 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M110.164210.
- ⑩ Shingu, Y., Mikawa, T., Onuma, M., Hirayama, T. and Shibata, T.: "A DNA-binding surface of SPO11-1, an *Arabidopsis* SPO11 orthologue required for normal meiosis," *FEBS J.*, **277**, 2360-2374 (2010). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07651.x.
- [学会発表] (計 60 件)
- ① Shinohara, T., Ikawa, S., Iwasaki, W., Mikawa, T., Arai, N. and Shibata, T.: "Selection of DNA in binding to RecA by its Li-loop region regulates homologous recombination and DNA repair," in *The 9th 3R Symposium*. Tokinosu, Gotenba, Shizuoka, Japan, November 17 (2014).
- ② Shibata, T.: "Roles of intrinsically unstructured proteins in homologous genetic recombination," in *1st International Symposium on Intrinsically Disordered Proteins*. Hamagin Hall, Yokohama, Japan, January 27-28 (1/28) (2011).
- ③ Shibata, T., Ling, F. and Mikawa, T.: "Mitochondrial DNA homoplasmy as gene homogenization of repeated sequences by rolling circle replication," in *7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM)*. Fukuoka Convention Center, Fukuoka, Japan, December 16-18 (2010).
- ④ Shibata, T.: "Bases of break-induced replication in mitochondrial genome dynamics," in *57th NIBB Conference: The Dynamic Genome*. NTBB, Okazaki, Japan, October 14-16 (2010).
- ⑤ Mikawa, T., Masuda, T., Ito, Y., Terada, T. and Shibata, T.: "The universal DNA structure in homologous recombination," in *The 24th Annual Symposium of The Protein Society*. San Diego, USA, August 3 (2010).
- [図書] (計 2 件)
- ① 柴田 武彦: "DNA 組換え," 分子生物学 (第3版). (田沼 靖一 編) pp. 72-83, 丸善出版株式会社, 東京 (2011).
- ② 柴田 武彦, 美川 務: "相同 DNA 組換えの機構理解から新規蛋白質創出へ," 酵素工学ニュース, 63 号, 16-22 (2010).
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: RecA組換え酵素および組換え活性をもつ蛋白質を用いた直鎖二重鎖DNA多量体形成技術  
発明者: 柴田武彦、此村直人、新井直人  
権利者:  
種類: 特許  
番号: 2014-209498  
出願年月日: 2014/10/10  
国内外の別: 国内
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
柴田 武彦 (SHIBATA, Takehiko)  
理化学研究所・環境資源科学研究センター・嘱託職員  
研究者番号: 70087550
- (2)研究分担者  
美川 務 (MIKAWA, Tsutomu)  
理化学研究所・生命システム研究センター・専任研究員  
研究者番号: 20321820
- 草野 好司 (KUSANO, Kohji)  
明治大学・研究知財戦略機構・研究推進員 (客員研究員)  
研究者番号: 70336098
- 新井 直人 (ARAI, Naoto)  
日本大学・生物資源科学部・講師  
研究者番号: 70297795