様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 26 年　 6 月 23 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2010～2013
課題番号：22380186
研究課題名（和文）イネデンプン代謝に関わる糖タンパク質の新奇プラスチド局在化機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of plastid-targeting mechanism of glycoproteins involved in starch metabolism of rice

研究代表者
三ツ井　敏明（Mitsui, Toshiaki）

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：70183960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　14,000,000円、（間接経費）　4,200,000円

研究成果の概要（和文）：（1）分泌経路を介してプラスチドターゲティングする糖タンパク質の探索を行い、イネAmyI-1、NPP1、NPP2、NPP6およびMSD1がプラスチド糖タンパク質あることを見出し、さらに、NPP1のN-グライコーム（糖鎖構造）を明らかにした。（2）AmyI-1とNPP1のプラスチドターゲティングシグナル領域（PT）を同定した。また、プラスチド包膜上に糖タンパク質のプラスチドターゲティングに必要な因子があることを示した。（3）登熟イネ種子におけるα-アミラーゼの発現異常は澱粉顆粒形成不全をもたらすこと、また、NPP1は澱粉集積に対する抑制因子であることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：(1) We found that rice AmyI-1, NPP1, NPP2, NPP6, and MSD1 are glycoproteins targeting to plastid via the secretory pathway, and we characterized N-glycome (oligosaccharide structures) of plastidial glycoprotein NPP1. (2) The plastid targeting signal regions (PT) of AmyI-1 and NPP1 were identified. Furthermore, it was suggested that there exists plastid envelope factor(s) that required for plastid targeting of glycoprotein. (3) Abnormal expression of alpha-amylase during seed development led to the poor formation of starch granule. In addition, NPP1 was found to be a negative regulator for starch accumulation in rice leaves.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

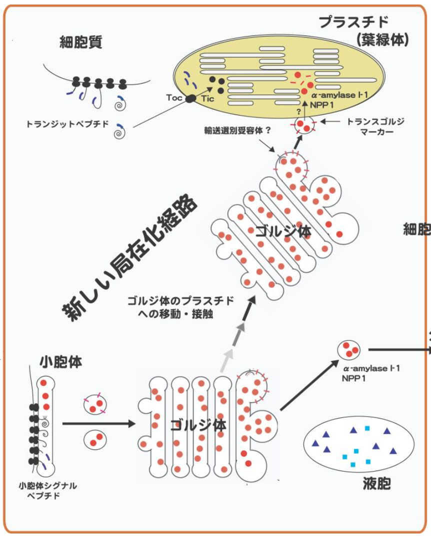
キーワード：アミラーゼ　ヌクレオチドピロホスファターゼ　スーパーオキシドジスムターゼ　ゴルジ体　プラスチド　葉緑体　糖タンパク質　イネ

１．研究開始当初の背景

葉緑体に代表されるプラスチドの分化・機能発現は、このオルガネラ自身がもつ遺伝子と細胞核ゲノム遺伝子によって統御されている。細胞核ゲノムにコードされたプラスチドタンパク質遺伝子は、細胞質ゾルで翻訳され、トランジットペプチド（プラスチド局在化シグナル）を持つ前駆体が合成される。この前駆体はプラスチド包膜に存在する Toc-Tic 複合体という膜透過装置を介してプラスチド中へ輸送される(Soll & Schleiff, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 198, 2004; Kessler & Schnell, *Traffic* **7**: 248, 2006)。しかし、我々は、典型的な N-結合型糖鎖を持つ分泌性酵素として知られているイネα-アミラーゼアイソフォーム AmyI-1(Hayashi et al., *Eur. J. Biochem*. **191**: 287,1990; Terashima et al., *Eur. J. Biochem*. **226**: 249, 1994)が緑葉などの生細胞におけるデンプン分解に関与すること、そしてこの分泌性糖タンパク質が分泌経路からプラスチドに輸送・局在化することを発見した（Asatsuma et al., *Plant Cell Physiol*. **46**: 858, 2005)。これに続いて、ヨーロッパの研究グループが、シロイヌナズナのカーボニックアンヒドラーゼが糖タンパク質であり、この酵素もゴルジ体からプラスチドへ輸送・局在化することを報告した（Villarejo et al., *Nat. Cell Biol.* **7**: 1224, 2005)。さらに我々は、イネ糖タンパク質、ADP-グルコース加水分解型ヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ（NPP1）もゴルジ体からプラスチドへ輸送･局在化することを報告した (Nanjo et al., *Plant Cell* **18**: 2582, 2006)。近年のプロテオミクス解析などから典型的なトランジットペプチドを持たないプラスチドタンパク質が存在することが推測されている。さらに興味深いことに、単離プラスチド中の全タンパク質の約８％を小胞体膜透過のためのシグナル配列を持つタンパク質が占めると算出されている (Jarvis, *New Phytologist* **179**: 257, 2008)。糖タンパク質の分泌経路を介したプラスチドターゲティングの分子メカニズムについては研究が始まったばかりであり、詳細は殆ど明らかになっておらずその解明が求められていた。

２．研究の目的

本研究課題では、イネにおけるデンプン代謝に関わる酵素、なかでも糖タンパク質として知られているα-アミラーゼおよびヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエスエラーゼの細胞内膜系からプラスチドへの新奇な輸送、局在化の分子メカニズム（図 1）を明らかにし、その成果を基に新たな米デンプン集積制御技術の開発を目指した。本研究期間（平成 22 年度～25 年度）においては下記の研究を行った。



（図１）糖タンパク質のプラスチドターゲティング

（１）分泌経路を介してプラスチドターゲティングする糖タンパク質の探索並びに糖鎖構造解析：
１）イネ細胞において、分泌経路を介した糖タンパク質のプラスチドターゲティングが AmyI-1 や NPP1 以外でも行われることを証明し、分泌経路を介したタンパク質のプラスチドターゲティングが１つの組織化された経路であることを明らかする。
２）プラスチド局在性糖タンパク質の糖鎖構造を解析し、その構造的特徴を明らかにする。
（２）糖タンパク質のプラスチドターゲティングに関わる分子装置の解明：
１）プラスチド糖タンパク質のプラスチドターゲティングシグナルを同定する。
２）プラスチド糖タンパク質の強発現細胞におけるゴルジ装置およびプラスチドの構造変化を捉える。
３）ゴルジ体からプラスチドへの輸送に関わる分子装置を同定する。
（３）プラスチド局在性糖タンパク質の機能発現調節によるデンプン集積制御：
　AmyI-1 や NPP1 などデンプン集積に対して抑制的に働く酵素が分泌経路を介してプラスチドターゲティングする。これらの酵素の異常な機能発現は玄米の収量、品質に悪影響を及ぼす。１）*AmyI-1* や２）*NPP1* などプラスチド局在性糖タンパク質を高発現する形質転換体および遺伝子破壊体の玄米収量、米形質、デンプン構造を詳細に解析し、プラスチド局在性糖タンパク質の機能改変による効率的なデンプン集積制御法を探る。

３．研究の方法

（１）－１）前駆体の N-末端にシグナルペプチドを持つイネ糖タンパク質 NPP-2、NPP3、NPP6 や MnSOD に蛍光タンパク質を連結したキメラタンパク質をイネ細胞やタマネギ

細胞において発現させ、レーザー焦点蛍光顕微鏡を用いてプラスチドターゲティングを解析する。

（１）−２）精製した NPP1 糖タンパク質をプロテイネースKで糖ペプチドにした後、グリコペプチダーゼＡで糖鎖を切断し、BlotGlyco®を用いたグライコブロッティングにより糖鎖を特異的に捕捉し、N□-((aminooxy)acetyl)tryptophanylarginine methylester (ao-WR)により標識する。標識糖鎖は Brucker Daltonics Ultraflex III および Thermo Fisher LTQ OrbitrapXL を用いて質量分析し、KEGG Glycan DB あるいは GlycoSuiteDB を用いて糖鎖構造を解析し、その特徴を明らかにする。

（２）−１）イネ AmyI-1 や NPP1 糖タンパク質の配列の中で、プラスチドターゲティングに必要な領域を決定するため、各遺伝子断片断片と *GFP* との融合遺伝子を作成し、細胞内局在性を解析する。大腸菌発現系を用いて AmyI-1 を大量に発現、精製し、ハンギングドロップ法を用いて結晶化を行い、X 線結晶構造解析によりプラスチドターゲティングに必須な領域の立体構造の特徴を明らかにする。

（２）−２）AmyI-1（あるいは NPP1）強発現細胞におけるゴルジ装置およびプラスチドの構造変化を明らかにするため、細胞を高圧凍結法により瞬間凍結し、電子顕微鏡を用いてオルガネラの微細な構造変化を捉える。さらに、形質転換細胞および野生型細胞からショ糖密度勾配遠心フローティング法を用いてゴルジ体膜を調製し、定量的ショットガンプロテオミクス解析を行い、プラスチド糖タンパク質の活発な発現によって変化するゴルジ体膜タンパク質を同定する。

（２）−３）イネの葉緑体外包膜に存在する LACS9 がゴルジ−プラスチド間コミュニケーションに関与することを LACS-9-GFP 発現細胞や *lacs9* 変異細胞における AmyI-1-GFP のプラスチドターゲティング能を解析することによって明らかにする。

（３）−１）米粒白濁化にα−アミラーゼが関与することを明らかにするため、白濁化部位の澱粉顆粒構造を走査電子顕微鏡で解析するとともに、澱粉鎖長分布を蛍光標識・ゲル濾過法を用いて調べる。加えて、白濁化部位のα−アミラーゼ活性並びに遊離澱粉・グルコース量を測定する。さらに、*Tos17* 挿入による *amyI-1*、amy1c 変異体を高温登熟させ、米粒白濁化の度合いの変化を調べる。

（３）−２）イネ *NPP1* 遺伝子の欠損変異体（*npp1*）を作出し、*npp1* 変異体の芽生えの高 CO_2・高温環境下における澱粉・ショ糖集積を調べるため、植物 CO_2 インキュベーターを用いて長日条件である明期(30,000lx)/暗期＝14 時間/10 時間で、28°C/23°C（通常条件）および 33°C /28°C（高温条件）、CO_2 濃度 400、1,600 および 2,800 ppm におけるイネ植物体の生重量、澱粉並びにショ糖を定量する。

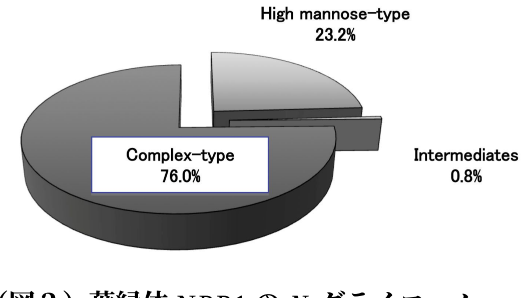
４．研究成果

（１）<u>分泌経路を介してプラスチドターゲティングする糖タンパク質の探索並びに糖鎖構造解析</u>：

（１）−１）*35S::NPP2-GFP*、*35S::NPP3-GFP* および *35S::NPP6-GFP* 遺伝子をイネ細胞やタマネギ細胞に導入し、その局在性をレーザー共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、NPP2-GFP および NPP6-GFP は NPP1-GFP と同様に葉緑体・プラスチドに局在化したが、NPP3-GFP は葉緑体・プラスチドには局在化せず、細胞内膜系に分布することが分かった（Kaneko et al., *Plant Biotechnol.*, 28(1), 69-76, 2011）。

エンドウマメやシロイヌナズナ等の MnSOD（MSD1）はミトコンドリア局在性であると報告されている。しかし、イネ MSD1 はその前駆体にはミトコンドリア局在化シグナルは見られず、シグナルペプチドを有し、糖タンパク質であると推測された。イネ MSD1 の細胞内局在性を明らかにするため、MSD1 の C-末端に黄色蛍光タンパク質（YFP）を連結した融合遺伝子 *MSD1-YFP* をパーティカルガン法によりタマネギ表皮細胞に導入し、一過的に発現させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。MSD1-YFP は、プラスチドおよびゴルジ体に局在することが明らかになった。加えて、MSD1-YFP の局在性に及ぼす小胞体−ゴルジ体間の小胞輸送を阻害する ARF1 と SAR1 G−タンパク質ミュータントの影響を調べたところ、MSD1-YFP はゴルジマーカー（ST-mRFP）とともに小胞体ネットワークに分布した。これらの結果から、イネ MSD1 は分泌経路からプラスチドに輸送、局在化し、機能することが分かった。（論文投稿中）

（１）−２）NPP1 を強発現するイネ幼芽からパーコール密度勾配遠心法を用いて単離した葉緑体より NPP1 を精製し、グライコブロッティング／質量分析(Kaneko et al., *Plant Proteomics, 2nd Ed.*, 469-480, 2013)し、糖鎖データベースを用いて糖鎖構造を解析し、葉緑体糖タンパク質 NPP1 の *N*-グライコームの特徴を明らかにした（図２）。



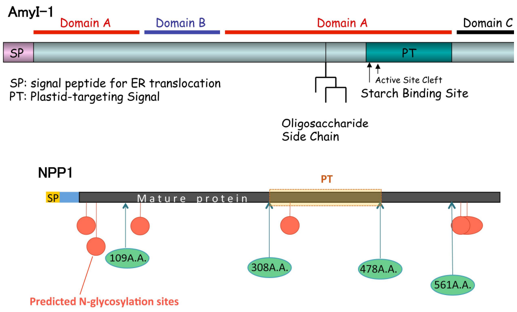
（図２）葉緑体 NPP1 の *N*-グライコーム

葉緑体 NPP1 の *N*-グライコームの 76%がフコースやキシロースなどの末端糖の付加を

受けていることから、NPP1はゴルジ体トランス区画を介してプラスチドに輸送・局在化していることが示された（論文作成中）。

（２）<u>糖タンパク質のプラスチドターゲティングに関わる分子装置の解明</u>：

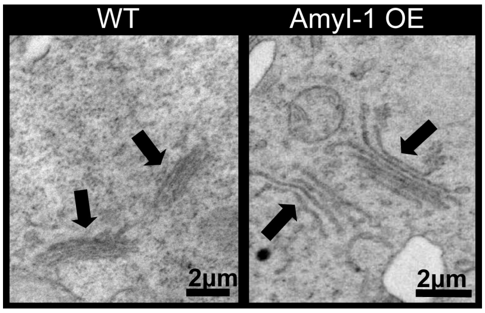
（２）-１）イネ AmyI-1 の配列の中で、プラスチドターゲティングに必要な領域を決定するため、*AmyI-1* 断片（⊿370-428, ⊿351-428, ⊿304-428, ⊿301-428, ⊿201-428, ⊿101-428, ⊿34-428）、*AmyI-1(W302A), (W302L), (G354N)*変異遺伝子と *GFP* との融合遺伝子を作成し、細胞内局在性を解析したところ、A ドメインのペプチド領域（301-369）の立体構造が AmyI-1 のプラスチドターゲティングに必要であることが明らかになった（Kitajima et al., *Plant Cell* **21**: 2844-2858, 2009)。NPP1 についてもその断片（⊿67-623, ⊿101-623, ⊿309-623, ⊿479-623, ⊿562-623）と *GFP* との融合遺伝子を作成し、細胞内局在性を解析した。得られた結果から、ほぼ中央のペプチド領域（309-478）が NPP1 のプラスチドターゲティングに必要であることが示された（図３)。



（図３）AmyI-1 と NPP1 のプラスチドターゲティングシグナル領域（PT）

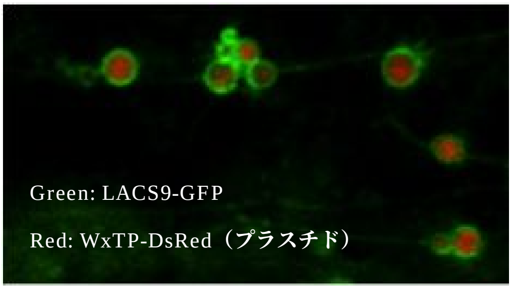
AmyI-1 については結晶構造が解かれており、PT の立体構造が明らかになりつつある（Ochiaki et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 2014, in press)。

（２）-２）野生型細胞と AmyI-1 過剰発現細胞におけるゴルジ体を比較したところ、AmyI-1 過剰発現細胞では *N*-アセチルグルコサミダーゼ-I (GNTI) 結合ゴルジ体の膜密度が、高密度側にシフトすることが分かった。また、電子顕微鏡による観察においても野生型細胞と AmyI-1 過剰発現細胞ではゴルジ体の層板構造に違いが見られた（図４)。さらに、AmyI-1 過剰発現細胞におけるゴルジ体プロテオーム解析の結果、エンドメンブレンタンパク質（EMP）等が特徴的に増加することが見出された。以上のことより、AmyI-1 のプラスチド輸送が活発な細胞では、構造が変化した特殊なゴルジ体が生成されている可能性が示された。



（図４）AmyI-1 過剰発現細胞(OE)におけるゴルジ体の構造変化

（２）-３）ゴルジ体からプラスチドへの輸送に関わる分子装置を同定する。
プラスチド包膜に局在する long-chain acyl-CoA synthetase 9 (LACS9) （図５）について解析を進めた。

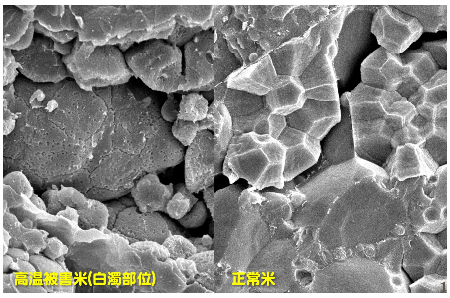


（図５）イネ LACS9 の細胞内局在性

LACS9 遺伝子に *Tos17* が挿入されたイネ変異体 *lacs9* の緑葉においては澱粉の蓄積増が観察された。興味深いことに LACS9-GFP 発現細胞においては AmyI-1 等の糖タンパク質のプラスチドターゲティングが抑制されることが見出された。この結果から、プラスチド包膜上に糖タンパク質のプラスチドターゲティングに必要な因子があると考えられた。

（３）<u>プラスチド局在性糖タンパク質の機能発現調節によるデンプン集積制御</u>：

（３）−１）米粒白濁化部位の澱粉顆粒構造を走査電子顕微鏡で観察すると、丸みを帯び表面に小穴などがある異常な澱粉顆粒が観察された（図６)。



（図６）米粒白濁化部位の澱粉顆粒構造

白濁部位の澱粉鎖長分布は整粒のそれとは差異が見られなかったが、α-アミラーゼ活性並びに遊離澱粉・グルコース量の増加が見出された（Hakata et al., *Plant Biotechnol. J.*, 10, 1110-1117, 2012; Tsutsui et al., *J. Applied Glycosci.*, 60, 61-67, 2013)。加えて、*Tos17* 挿入による *amyI-1*、amy1c 変異体を高温登熟させ、米粒白濁汰ところ野生型イネと比較して白濁化発生の軽減が見られた。以上の結果から、α-アミラーゼが米粒白濁化の原因因子の１つであることが分かった。

（３）－２）*NPP1* 遺伝子に１コピーの *Tos17* が挿入された変異体イネ（*npp1*）を作出し、*npp1* 変異体の芽生えの高 CO_2・高温環境下における澱粉・ショ糖集積を調べた。*npp1* 変異体では、通常温度条件、高温条件、CO_2 濃度条件にかかわらず、野生型に比べて成長が早く、澱粉蓄積も高まることがわかった。28°C／23°C（昼／夜）、CO_2 濃度条件 1,600 ppm において、生重量当たりの澱粉濃度が最も高く、大気条件である CO_2 濃度 400 ppm で育成した場合に比べ、約 3.5 倍上昇した。同条件下の野生型と比べると、*npp1* 変異体の澱粉濃度は約 1.6 倍大きかった。33°C／28°C、CO_2 濃度条件 1,600 ppm では、より成長促進が認められたが、生重量当たりの澱粉蓄積については若干低下した。以上の結果より、*NPP1* 遺伝子はイネの澱粉集積に対する抑制因子であることが明らかになった（Kaneko et al., *Plant Cell Physiol.*, 55, 320-332, 2014)。

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１４件）

① Kentaro KANEKO, Takuya INOMATA, Takahiro MASUI, Tsutomu KOSHU, Yukiho UMEZAWA, Javier POZUETA-ROMERO, Toshiaki MITSUI, Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 exerts a negative effect on starch accumulation and growth in rice seedlings under high temperature and CO_2 concentration conditions, Plant and Cell Physiology, 査読有, 55(2), 2014,320-332
DOI: 10.1093/pcp/pct139

② Akihito OCHIAI, Hiroshi SUGAI, Kazuki HARADA, Seiya TANAKA, Yohei ISHIYAMA, Kosuke ITO, Takaaki TANAKA, Toshio UCHIUMI, Masayuki TANIGUCHI, Toshiaki MITSUI, Crystal structure of α-amylase from *Oryza sativa*: Molecular insights into enzyme activity and thermostability, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 2014, in press
DOI: 10.1080/09168451.2014.917261

③ Kazumi TSUTSUI, Kentaro KANEKO, Isao HANASHIRO, Katsuyoshi NISHINARI, Toshiaki MITSUI, Characteristics of opaque and translucent parts of high temperature stressed grains of rice Journal of Applied Glycoscience, 査読有, 60,2013, 61-67
DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2012_014

④ Makoto HAKATA, Masaharu KURODA, Tomomi MIYASHITA, Takeshi YAMAGUCHI, Mikiko KOJIMA, Hitoshi SAKAKIBARA, Toshiaki MITSUI, Hiromoto YAMAKAWA, Suppression of α-amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature, Plant Biotechnology Journal, 査読有, 10(9), 2012, 1110-1117
DOI:10.1111/j.1467-7652.2012.00741.x

⑤ Akemi ONO, Katsushi YAMAGUCHI, Sachiko FUKADA-TANAKA, Rie TERADA, Toshiaki MITSUI, Shigeru IIDA, A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny, The Plant Journal, 査読有, 71(4), 2012, 564-574
DOI: 10.111/j.1365-313X.2012.05009.x

⑥ Naoko CROFTS, Katsumi ABE, Satomi AIHARA, Rumiko ITOH, Yasunori NAKAMURA, Kimiko ITOH, Naoko FUJITA, Lack of starch synthase IIIa and high expression of granule-bound starch synthase I synergistically increase the apparent amylose content in rice endosperm, Plant Science, 査読有, 62(9), 2012, 193-194
DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.05.006.

⑦ Nozomi Umezu, Nobuhisa Umeki,Toshiaki Mitsui, Kazunori Kondo, Shinsaku Maruta, Rice kinesin O12 is identical to kinesin OsKCH1, The Journal of Biochemistry, 査読有, 152(2), 2012, 207-208
DOI: 10.1093/jb/mvs 076

⑧ Yasuko HAYASHI, Akiko SHINOZAKI, Visualization of Microbodies in Chlamydomonas reinhardtii, Journal of Plant Reserch, 査読有, 125(4), 2011, 579-586
DOI: 10.1007/s10265-011-0469-z

⑨ Nozomi UMEZU, Nobue HANZAWA, Masafumi D. YAMADA, Kazunori KONDO, Toshiaki MITSUI, Shinsaku MARUTA, Biochemical characterization of the novel rice kinesin K23 and its kinetic study using fluorescence resonance energy transfer between an intrinsic tryptophan residue and a fluorescent ATP analogue, The Journal of Biochemistry, 査読有, 149, 2011, 539-550
DOI:10.1093/jb/mvr012

⑩ Kentaro KANEKO, Chie YAMADA, Ai YANAGIDA, Tsutomu KOSHU, Ukiho UMEZAWA, Kimiko ITOH, Hidetaka HORI, Toshiaki MITSUI, Differential localization and functions of rice nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase isozyme 1 and 3, Plant Biotechnology, 査読有, 28(1),2011, 69-76
DOI:10.5511/plantbiotechnology.10.1228a
⑪ Keiko TANAKA, Nobuhisa UMEKI, Toshiaki MITSUI, Zui FUJIMOTO, Shinsaku MARUTA, Crystallographic analysis reveals a unique conformation of the ADP-bound novel rice kinesin K16, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 401(2), 2010, 251-256
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.043

その他、査読有論文１件、査読無論文２件

〔学会発表〕（計２２件）
① 三ツ井敏明、イネα-アミラーゼの機能発現制御と米品質、植物化学調節学会第48 回大会、2013 年１１月１日、新潟大学
② 三ツ井敏明、稲澱粉代謝関連酵素の細胞分子生物学と高温耐性稲の開発戦略、日本水稲品質・食味研究会、2011 年 11 月 23 日、 新潟大学
③ Toshiaki Mitsui、Involvement of endomembrane-type superoxide dismutase in high temperature stress tolerance during grain filling of rice、農学プロテオーム学会、2011 年 11 月 09 日、つくば国際会議場
④ Toshiaki Mitsui、Golgi-to-Plastid traffic in higher plant cells、日本生化学会、2011 年 09 月 24 日、 京都国際会館
⑤ 三ツ井敏明、イネプラスチド局在型ヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼの N-グライコーム解析:機能糖タンパク質がゴルジ装置の後期区画からプラスチドに輸送される、日本プロテオーム学会、2011 年 07 月 29 日、朱鷺メッセ(新潟)
⑥ 三ツ井敏明、高温ストレスに強いイネを開発する、新農業展開ゲノムプロジェクト・富山シンポジウム 2010「ここまでできた!お米の研究最前線」、2010 年 12 月 10 日、富山県民会館

その他、16 件

〔図書〕（計２件）
① 三ツ井　敏明、金古　堅太郎　他、講談社、プロテオミクス辞典、２０１３、１２７（３２、９７、９８）
② Kentaro KANEKO, Takeshi SHIRAYA, Toshiaki MITSUI, Shin-ichiro NISHIMURA, Humana press, Plant Proteomics Methods and Protocols 2nd edition,2013, 789(469-480)

〔産業財産権〕
○出願状況（計２件）

名称：α-アミラーゼ遺伝子の発現を抑制するＲＮＡ又はＤＮＡ、及びそれらの利用
発明者：三ツ井敏明　他
権利者：新潟大学
種類：特許
番号：特許願　2012-080709
出願年月日：２４年３月３０日
国内外の別：国内

名称：高温登熟性イネ
発明者：三ツ井敏明
権利者：新潟大学
種類：特許
番号：特許願　2011-246579
出願年月日：２３年１１月１０日
国内外の別： 国内

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
三ツ井　敏明（MITSUI, Toshiaki）
新潟大学・大学院自然科学系・教授
研究者番号：７０１８３９６０

(2)研究分担者
伊藤　紀美子（ITOH, Kimiko）
新潟大学・大学院自然科学系・准教授
研究者番号： １０２８１００７

林 八寿子（HAYASHI, Yasuko）
新潟大学・大学院自然科学系・准教授
研究者番号：２０２２８５９７

花城　勲（HANASHIRO, Isao）
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：３０３３６３２５

大坪　研一（OHTSUBO, Ken-ichi）
新潟大学・大学院自然科学系・教授
研究者番号：８０３５３９６０