

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370016

研究課題名(和文)液胞内における二次代謝化合物の糖修飾機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of modification mechanism of secondary metabolites in plant vacuoles.

研究代表者

小関 良宏(Ozeki, Yoshihiro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50185592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：アントシアニン修飾に関わる液胞型アシル-グルコース依存型配糖化酵素について、単子葉植物のアガパンサスにおいて機能していること、またシロイヌナズナの紅葉においてアシル化されたアントシアニン分子の最終ステップの配糖化に機能していることを明らかにし、この配糖化反応が植物界に一般的であることを示した。またデルフィニウム萼片において、p-hydroxybenzyl-glucose が液胞内において配糖化酵素およびアシル化酵素の基質として一物二役の役割を果たしていることから Zwitter donor という新しい概念を呈示した。

研究成果の概要(英文)：Acyl-glucose dependent glucosyltransferase (AAGT) gene was found in a monocot plant, Agapanthus, and Arabidopsis. AAGT acted to acyl-modified anthocyanin with glucosyl residues in red turnip leaves, indicating that AAGT reaction is common in the plant kingdom. In delphinium sepals, p-hydroxybenzyl-glucose (pHBG) acted as a glucosyl-donor at modification at the 7 position of anthocyanidin. The anthocyanin, violdelphin, consisted of three glycosyl and two p-hydroxybenzyl (pHBA)-residues, conjugated with alternately tandem and linear conjugation of glycosyl and pHBA-residues. In the reaction to form violdelphin, it was revealed that pHBG played a bi-functional role to be acyl donors and glucosyl donors for acyl-glucose dependent acyl-transferase and AAGT as Zwitter donor. The gene for UDP-glucose dependent pHBA glucosyltransferase was identified and the loss of this activity resulted not to modify at the 7 position of anthocyanidin.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：アントシアニン 配糖化酵素 アシル化酵素 液胞 Zwitter donor p-hydroxybenzyl-glucose デルフィニウム Delphinium grandiflorum

1. 研究開始当初の背景

高等植物は様々な二次代謝化合物を合成しており、その多くが配糖化やアシル化を受けて液胞に蓄積されている。これまで二次代謝化合物の配糖化は細胞質に存在する UDP-糖依存型の配糖化酵素で、アシル化についてもアシル-CoA 依存型アシル基転移酵素で行なわれているとされてきた。しかし二次代謝化合物の中には複雑な配糖化がなされているものがあり、その配糖化やアシル化機構については未解明の部分が多い。例えばアントシアニンについては、その基本骨格であるアグリコンは植物界に 6 種類しかなく、これに様々な糖やアシル基が複雑に付加・修飾されることによって、その分子種は 1,000 を超えるバラエティーに富んでいるが、その配糖化について、たとえばアントシアニジンの 7 位の配糖化や 3 個以上の糖や有機酸が結合する機構については未解明であった。特に 7 位の配糖化とアシル化によるポリアシル化アントシアニンはデルフィニウム、シネラリアなどの青い花色を発色するために必須であり、この配糖化機構の解明が求められていた。

そこで当研究者はカーネーション花卉から新規糖供与体としてアシル-グルコースの 1 種である vanillyl-glucose を見だし、さらにデルフィニウムにおいてもアシル-グルコースが基質となってアントシアニンの 7 位に配糖化することを見いだした。そこで、この反応を司る酵素タンパク質を赤色カーネーション花卉から精製し、その部分アミノ酸配列を決定して、そのアミノ酸配列を元に degenerate primers を合成してカーネーションの赤色花卉およびデルフィニウム萼片から PCR によって cDNA をクローニングし、さらに RACE 法によってその全長 cDNA を得たところ、glycoside hydrolase family 1 (GH1) に属する新規の液胞内酵素 (DcAA5/7GT) であることを明らかにした。またアントシアニンのアシル化について、唯一、チョウマメからアシル-グルコースをアシル基供与体とする酵素が見いだされ、その精製と cDNA のクローニングがなされ、これが serine carboxypeptidase like (SCPL) タンパク質に属する acyl-glucose dependent acyltransferase (AGAT) であることが見いだされ、これも液胞内に存在して機能していることが見いだされた。これらのことから、デルフィニウム萼片などにおけるポリアシル化アントシアニンは液胞内で合成されることが示唆されていたが、その全容は未解明であった。

2. 研究の目的

液胞型配糖化酵素については、当研究室が世界で初めてカーネーションおよびデルフィニウムから見いだしたものであり、その他の植物種において、未だに知られていない。そこで、当研究では、

(1) この AA7GT は双子葉植物においてのみ特異的であるのかどうかを明らかにするため、青色花を咲かせる単子葉植物アガパンサスからの AA7GT の同定を行なう。

(2) この液胞型配糖化酵素は花でのみ働くのか、それとも葉においても機能しているのかを明らかにするため、シロイヌナズナにおいて紅葉、すなわちアントシアニン合成を誘導できる実験系を確立し、その未同定の最後の配糖化酵素が液胞型配糖化酵素であるかを明らかにするため、AA5/7GT と同じ clade に入るカウンターパートと考えられる酵素遺伝子について、パイオリソースから入手した T-DNA 挿入変異体のホモ化ラインを確立するとともに、強制発現体を作成し、分担研究者である大阪府立大学の太田大策教授のグループによってメタボローム解析を行なうことと、どのような代謝系に参与しているのかを明らかにする。

(3) 大腸菌におけるタンパク質発現に成功している DcAA5GT および DgAA7GT から結晶を得て、連携研究者の養王田正文教授との共同研究による結晶構造解析、さらにモデリングによる解析を通して、活性中心部を明らかにするとともに、そのアミノ酸部位に変異を導入したタンパク質を作成することによって、その反応機構を明らかにする。

(4) ポリアシル化アントシアニンの合成メカニズムについて明らかにするため、デルフィニウム萼片における配糖化とアシル化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アガパンサスからの AA7GT の同定
すでにカーネーションおよびデルフィニウムにおいて AA7GT に高い相同性を有しているアミノ酸配列領域が明らかになっているので、そのアミノ酸配列領域に対する縮重プライマーを使って PCR を行い、これら植物種からの AA7GT のクローニングを行い、その発現プロファイルなどを解析した。

(2) シロイヌナズナ紅葉時における AA7GT 遺伝子の解析

AA5/7GT 遺伝子と相同性の高いシロイヌナズナの遺伝子をデータベース上から探索し、そのカウンターパート遺伝子候補のノックアウト体およびそれを相補させる強制発現体の作出とその代謝産物のメタボローム解析を行なった。

(3) AA5/7GT タンパク質の構造解析

大腸菌において DcAA5GT および DgAA7GT タンパク質を高発現する条件を決定し、得られたタンパク質について、結晶化を行い、X線結晶構造解析を行なうことを試みた。さらに、それと同時に、すでに他の GH1 タンパク質において結晶構造解析が解かれているものをリファレンスとしてモデリングを行い、その活性に重要なアミノ酸配列を見だし、そこに点突然変異を導入することによ

て、活性や基質特異性がどのように変化するのか、特にアントシアニンの 5 位と 7 位の結合位置をどのようにして、これら酵素が見極めているのかを調べた。

(4) ポリアシル化アントシアニン合成系の解明

デルフィニウムにおいて 7 位にグルコースを結合させる酵素である AA7GT については 2010 年に当研究者が明らかにしたが、その次のアシル基である *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA)、その次に結合するグルコース、さらにその先に結合する pHBA がどのような酵素メカニズムによって直鎖状に結合しているのか、デルフィニウム萼片から粗酵素抽出液での活性測定ならびに cDNA のクローニングと変異体の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) アガパンサスからの AA7GT の同定

アガパンサスの花弁から粗酵素液を得て、cyanidin 3-glucoside (Cy3G) を糖受容体、feruloyl-glucose を糖供与体として反応を行なわせたところ、cyanidin 3,7-diglucoside (Cy3,7dG) の合成が見られ、単子葉植物であるアガパンサスにおいても AA7GT 活性があることが明らかになった。さらにその cDNA をクローニングし、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて基質特異性を調べたところ、acyl-glucose について C6-C1-glucose でも C6-C3-glucose でも糖供与体となること、糖受容体としてはアントシアニンの 3 位にグルコース以外のガラクトースやルチノースが結合しているも配糖化されるが、5 位に糖が結合しているアントシアニンに対しては配糖化は起こらないことが明らかになった。さらに、アガパンサス AA7GT のアミノ酸配列を他の植物種の AA7GT および GH1 タンパク質と系統樹解析したところ、アガパンサス AA7GT は他の植物種の AA7GT と同じクレードに属することが明らかになり、このことから AA7GT は進化の過程において単子葉植物と双子葉植物に分かれる前から存在していたことが明らかになった。

(2) シロイヌナズナ紅葉時における AA7GT 遺伝子の解析

シロイヌナズナにおいて、切断葉を強光下に置くことでアントシアニン合成を誘導できる系を確立した。これまでの研究からシロイヌナズナにおけるアントシアニンはシアニジンに 4 つの糖と 4 つの有機酸が結合しており、それら 3 つの糖は UDP-glucose dependent glycosyltransferase (UGT) および 3 つの有機酸は acyl-CoA dependent acyltransferase および 1 つの有機酸である sinapoyl 基は SCPL タンパク質酵素によって結合することが報告されていたが、*p*-coumaroyl 基にグルコースを結合させる配糖化酵素は未同定であった。上述のように SCPL タンパク質酵素は液胞内で働くことか

ら、この *p*-coumaroyl 基にグルコースを結合させる配糖化酵素も液胞型、すなわち AAGT 様のタンパク質であると考えられた。そこで候補遺伝子群である AtBGLU 遺伝子のノックダウン変異体について、その紅葉時のアントシアニン分子種の解析を行なったところ、AtBGLU10 ホモ変異体において野生型が合成・蓄積しているアントシアニン分子の修飾末端の *p*-coumaroyl 基の先のグルコースが欠失していることが明らかになった。そこで AtBGLU10 ホモ変異体からこのアントシアニンを抽出・精製し、これを基質とし、アシル-グルコースを糖供与体として、野生型の紅葉から得た抽出液を用いて酵素反応を行なったところ、グルコースの付加が確認された。また AtBGLU10 ホモ変異体に AtBGLU10 プロモーター::AtBGLU10 cDNA のコンストラクトを導入した形質転換体の紅葉を解析した結果、アントシアニンの分子種が野生型に復帰し、相補されることが明らかになった。これまでに見いだされた AAGT は花弁においてのみ発現が見られ、しかもアントシアニンのアグリコンにグルコースを直接付加する酵素のみであったが、AtBGLU10 は花ではなく紅葉において発現が見られること、またアグリコンにグルコースを付加するのではなく、アシル基や糖で修飾されたアントシアニンの末端のアシル基の先に糖を付与することを明らかにした。

(3) AA5/7GT タンパク質の構造解析

大腸菌による AA5/7GT タンパク質の大量発現につき、すべてのコドンで大腸菌で最適となる合成 cDNA を用いるなど様々な条件検討を行なったが高発現が見られず、またピキア酵母の高発現を用いた場合にも発現量はわずかであり、大量の酵素タンパク質が得られず、酵素タンパク質の結晶化に至らず、その構造解析はできなかった。

(4) ポリアシル化アントシアニン合成系の解明

デルフィニウム萼片より得た AA7GT cDNA を大腸菌のタンパク質高発現系を用いて大スケールでの反応を行い、Cy3,7dG を大量に合成し、これを基質とするために精製した。これを受容体としてデルフィニウム萼片の粗抽出液において *p*-hydroxybenzoyl-glucose (pHBG) を加えて反応時間を追って、その酵素反応生成物の解析を行なったところ、まず pHBG がアシル基供与体となって AGAT によって *p*-hydroxybenzoyl 基が結合し、さらにそのアシル基の先に pHBG がグルコース供与体となって AAGT によってグルコースが結合し、さらにそのグルコースの先に pHBG がアシル基供与体となって AGAT によって pHBA が結合して、グルコース 3 分子と pHBA 2 分子が直鎖状に結合した violdelphin が合成されることを見いだした。そこで、その AAGT cDNA につき、これまでに得られた AAGT のアミノ酸配列において相同性の高い領域に対する宿重プライ

マーを設計し、10 個の DgBGLU cDNA の部分配列を得た。それらすべてについて全長 cDNA をクローニングし、大腸菌タンパク質発現用ベクターに導入し、得られた組換え大腸菌粗酵素抽出液における AAGT 活性を調べたところ、そのうちの 2 種類が AAGT cDNA であることが明らかになった。これらのアミノ酸配列について系統樹解析を行なったところ、これまでに得られた AAGT とは異なったクレードに属すること、すなわち今回明らかにした AAGT は、他の AAGT とは異なった GH1 に属する酵素遺伝子から独自に進化したこと、AAGT 遺伝子間における重複進化によるものではなく、別の GH1 タンパク質遺伝子として進化して生まれたものから由来していることが明らかとなった。また AGAT については、候補となる cDNA を 3 種類得ることができたが、大腸菌内でそのタンパク質活性を発現させることはできなかった。しかし、最初のステップの AGAT 活性が消失しているデルフィニウム変異体を見だし、その変異体においては 3 種類のうちの 1 つの AGAT 遺伝子の発現が消失していること、野生型デルフィニウム萼片の分化とアントシアニンの合成に伴って特異的に誘導されることが見いだされ、この遺伝子が AGAT の責任遺伝子であることが明らかになった。これらのことから、pHBA は液胞内においてアシル基供与体およびグルコース供与体の 2 つの役割を果たす Zwitter donor であることを明らかにした (図 1)。

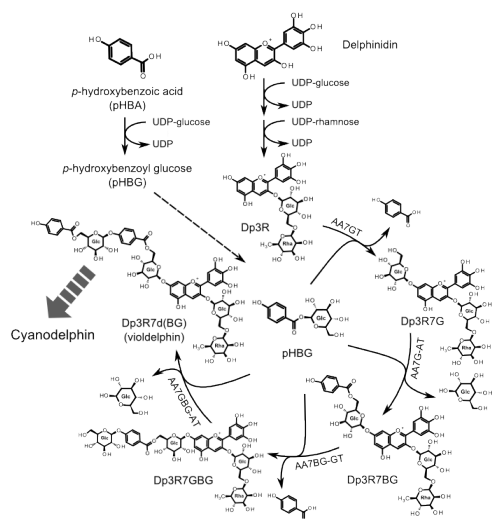


図 1. デルフィニウムにおける pHBG の Zwitter donor としての機能 (Nishizaki et al. Plant Cell 25: 4150-4165 (2013))

さらにデルフィニウム変異体群の中から delphinidin 3-rutinoside (Dp3R) を合成・蓄積している品種を 5 品種見だし、そのうちの 1 品種においては AA7GT 活性および AA7GT 遺伝子の転写が欠失していること、

しかしその他の 4 品種においては AA7GT 活性および AA7GT 遺伝子の転写が見られること、さらにこの 4 品種では pHBG の合成・蓄積が著しく低く抑制されていることを明らかにした。一方で、これら 4 品種においては pHBG の代わりに p-glucosyl-oxybenzoic acid (pGBA) を合成・蓄積していることを明らかにした (図 2)。このことは、これら 4 品種においては pHBG を合成する UDP-dependent glucosyltransferase (UGT) 遺伝子の発現が抑制もしくは消失していると考えられた。実際に野生型およびこれら 4 種類のデルフィニウム品種の萼片から得た粗酵素抽出液に pHBA と UDP-glucose を加えて反応を行なわせたところ、野生型では配糖化産物である pHBG が合成されたが、これら 4 品種由来の

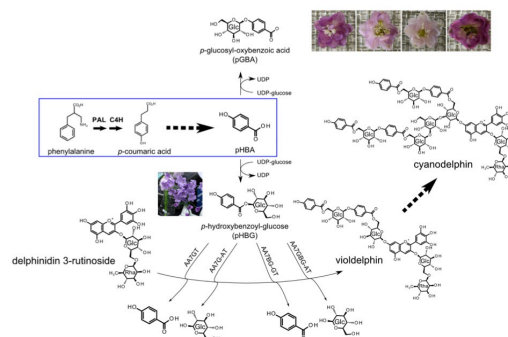


図 2. デルフィニウムにおける pHBA 配糖化酵素 (pHBAGT) の役割。これが発現することによって pHBG が合成され、Zwitter donor として機能してポリアシル化アントシアニンが合成される。一方、この pHBAGT の発現が抑制された品種 (右上の 4 品種) においては pHBG が合成されず、代わりに pGBA が合成され、Dp3R のステップで止まってしまう、ポリアシル化が行われなくなっている。

粗酵素抽出液においては、この活性は非常に低く抑制されており、その代わりに pGBA が合成されることが明らかになった。そこで野生型のデルフィニウム品種の萼片からこれまでに報告されている phenylpropanoid UGT に高く保存されているアミノ酸配列領域に対する宿重プライマーを設計して PCR を行なったところ 3 種類の cDNA が得られ、その全長 cDNA を獲得した。これらの塩基配列をもとに RT-PCR によって野生型のデルフィニウム萼片における発現プロファイルを調べたところ、それら 3 つのうちの 1 つである pHBAGT が萼片の分化過程とアントシアニン合成過程と強い相関が見られた。さらに 4 種類の変異品種において pHBAGT の発現が非常に強く抑制されていることを明らかにした。これら cDNA を大腸菌の高発現性ベクターに導入し、形質転換大腸菌から粗酵

素抽出液を得て、pHBA を糖受容体、UDP-glucose を糖供与体として反応させた時、他の 2 つの cDNA を導入したものにおいては pHBG の合成が見られず、pHBAGT cDNA のみにおいて pHBG の合成が見られた。これらのことから、ここで得られた pHBAGT cDNA に対する遺伝子が、デルフィニウム萼片のアントシアニン修飾において Zwitter donor として機能している pHBG を合成する責任遺伝子であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

(1) Nishizaki, Y., Sasaki, N., Yasunaga, M., Miyahara, T., Okamoto, E., Okamoto, M., Hirose, Y. and Ozeki, Y. Identification of the glucosyltransferase gene that supplies the *p*-hydroxybenzoyl-glucose for 7-polyacylation of anthocyanin in delphinium. *J. Exp. Bot.*、査読有、2014 DOI:10.1093/jxb/eru134.

(2) Yagi, M., Kosugi, S., Hirakawa, H., Ohmiya, A., Tanase, K., Harada, T., Kishimoto, K., Nakayama, M., Ichimura, K., Onozaki, T., Yamaguchi, H., Sasaki, N., Miyahara, T., Nishizaki, Y., Ozeki, Y., Nakamura, N., Suzuki, T., Tanaka, Y., Sato, S., Shirasawa, K., Isobe, S., Miyamura, Y., Watanabe, A., Nakayama, S., Kishida, Y., Kohara, M., and Tabata, S. Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Res.*、査読有、2013 DOI:10.1093/dnares/dst053.

(3) Nishizaki, Y., Yasunaga, M., Okamoto, E., Okamoto, M., Hirose, Y., Yamaguchi, M., Ozeki, Y. and Sasaki, N. *p*-Hydroxybenzoyl-glucose is a Zwitter donor for the biosynthesis of polyacyl-anthocyanin in delphinium. *Plant Cell*、査読有、**25**(10)、2013、4150-4165 DOI: 10.1105/tpc.113.113167.

(4) Sasaki, N., Matsuba, Y., Abe, Y., Okamura, M., Momose, M., Umemoto, N., Nakayama, M., Itoh, Y. and Ozeki, Y. Recent advances in understanding the anthocyanin modification steps in carnation flowers. *Sci. Hortic.*、査読有、**163**(1)、2013 37-45 DOI: 10.1016/j.scienta.2013.07.029.

(5) Luang, S., Cho, J., Mahong, B., Opassiri, R., Akiyama, T., Phasai, K., Komvongsa, J., Sasaki, N., Hua, Y., Matsuba, Y., Ozeki, Y., Jeon, J.-S., Ketudat Cairns, J.R. Rice Os9BGlu31 is a transglucosidase with the capacity to

equilibrate phenylpropanoid, flavonoid, and phytohormone glycoconjugates. *J. Biol. Chem.*、査読有、**288**(14)、2013、10111-10123 DOI: 10.1074/jbc.M112.423533.

(6) Momose, M., Nakayama, M., Itoh, Y., Umemoto, N., Toguri, T. and Ozeki, Y. An active *hAT* transposable element causing bud mutation of carnation by insertion into *flavonoid 3'-hydroxylase* gene. *Mol. Gen. Genomics*、査読有、**288**(3)、2013、175-184 DOI: 10.1007/s00438-013-0742-z.

(7) Miyahara, T., Sakiyama, R., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Acyl-glucose-dependent glucosyltransferase catalyzes the final step of anthocyanin formation in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.*、査読有、**170**(6)、2013、619-624 DOI: 10.1016/j.jplph.2012.12.001.

(8) Miyahara, T., Takahashi, M., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Isolation of an acyl-glucose-dependent anthocyanin 7-*O*-glucosyltransferase from the monocot *Agapanthus africanus*. *J. Plant Physiol.*、査読有、**169**(8)、2012、1321-1326 DOI: 10.1016/j.jplph.2012.05.004.

(9) Sasaki, N., Nishizaki, Y., Uchida, Y., Wakamatsu, E., Umemoto, N., Momose, M., Okamura, M., Yoshida, H., Yamaguchi, M., Nakayama, M., Ozeki, Y. and Itoh, Y. Identification of the *glutathione S-transferase* gene responsible for flower color intensity in carnations. *Plant Biotechnol.*、査読有、**29**(3)、2012、223-227 DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0120a

(10) Nishizaki, Y., Matsuba, Y., Okamoto, E., Okamura, M., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Structure of the acyl-glucose-dependent anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase gene in carnations and its disruption by transposable elements in some varieties. *Mol. Gen. Genomics*、査読有、**286**(3)、2011、383-394 DOI: 10.1007/s00438-011-0655-7.

(11) Miyahara, T., Matsuba, Y., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Identification of genes in *Arabidopsis thaliana* with homology to a novel acyl-glucose dependent glucosyltransferase of carnations. *Plant Biotechnol.*、査読有、**28**(3)、2011、311-315 DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.0111b

(他、14 件)

[学会発表] (計 30 件)

(1) Nishizaki, Y., Yasunaga, M., Okamoto, E., Okamoto, M., Hirose, Y., Yamaguchi, M., Ozeki, Y. and Sasaki, N. *p*-Hydroxybenzoyl-glucose plays a “Zwitter donor” in vacuolar acyltransferases and glucosyltransferases for biosynthesis of polyacyl-anthocyanin in delphinium. *In* 7th International Workshop on Anthocyanins. (September 9 - 11, 2013, University of Porto, Portugal).

(2) Nishizaki, Y., Yasunaga, M., Miyahara, T., Hirose, Y., Okamoto, M., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Analysis of anthocyanin modification enzymes involved in synthesis of flower pigments in delphinium. *In* 26th International Conference on Polyphenols. (July 23 - 26, 2012, University of Florence, Italy).

(3) Miyahara, T., Nishizaki, Y., Takahashi, M., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Isolation of an acyl-glucose-dependent anthocyanin glucosyltransferase from the monocot *Agapanthus africanus* and expression analysis of its homologous genes in *Arabidopsis thaliana*. *In* 26th International Conference on Polyphenols. (July 23 - 26, 2012, University of Florence, Italy).

(4) Sasaki, N., Miyahara, T., Nishizaki, Y., Matsuba, Y., Okamoto, E., Okamura, M. and Ozeki, Y. Identification of acyl-glucose dependent anthocyanin glucosyltransferases in higher plant. *In* 26th International Conference on Polyphenols. (July 23 - 26, 2012, University of Florence, Italy).

(5) Miyahara, T., Nakamura, H., Sakiyama, R., Matsuba, Y., Ozeki, Y. and Sasaki, N. Identification of genes in *Arabidopsis thaliana* encoding candidates of novel acyl-glucose dependent glucosyltransferases. *In* 6th International Workshop on Anthocyanins, 2011 in USA. (September 11 - 13, 2011, Great Wolf Lodge, North Carolina, USA).

(6) Sasaki, N., Matsuba, Y., Okamura, M., Abe, Y., Tera, M., Nagasawa K. and Ozeki, Y. Identification of acyl-glucose dependent anthocyanin glucosyltransferases. *In* 6th International Workshop on Anthocyanins, 2011 in USA. (September 11 - 13, 2011,

Great Wolf Lodge, North Carolina, USA).

(他、国内学会発表 24 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~ozeky/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 良宏 (OZEKI, Yoshihiro)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：5 0 1 8 5 5 9 2

(2) 研究分担者

太田 大策 (OHTA, Daisaki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：1 0 3 0 5 6 5 9

佐々木伸大 (SASAKI, Nobuhiro)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：8 0 4 2 2 0 8 8
(平成 24 年度まで)

(3) 連携研究者

養王田 正文 (YOHDA, Masahumi)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：5 0 2 5 0 1 0 5