

研究報告書

「Vigna 属野生種群が独自に獲得した耐塩性機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年12月～平成30年3月

研究者: 内藤 健

1. 研究のねらい

本研究のねらいは耐塩性に優れた *Vigna* 属野生種がもつ耐塩性遺伝子を同定し、耐塩性作物の開発につなげることである。塩害は灌漑農業における最も深刻な問題であり、灌漑農地の約50%が塩害による耕作不能の危機に瀕している。また、塩性土壌に覆われた耕作不適地は、全世界で8億 haにも上る。したがって、耐塩性作物の開発は農地の回復および拡大を可能とし、本領域の課題である二酸化炭素資源化にも大きく貢献することができる。

Vigna 属はアズキ(*V. angularis*)やリョクトウ(*V. radiata*)などの仲間だが、野生種には過酷な環境に適応したものも多く、砂浜などの塩性環境に適応したものも複数存在する。特に、*V. marina*、*V. riukiensis* および *V. trilobata* の3種は近縁の感受性系統から分化して間もないため、耐塩性を支配する遺伝因子が単純かつ少数であることが期待されるだけでなく、交雑集団を用いた遺伝解析を実施することも可能である。何より、これらは耐塩性に優れるだけでなく、その耐性機構が互いに異なるという注目すべき特徴が見られる。以下に、本研究の中で明らかになった点も含め、これら3種について簡単に紹介する。

V. marina は、熱帯～亜熱帯の海岸地帯に生息し、400 mM (2%超) の塩ストレスにも耐える。原生地では植生の最も海寄りの位置を占めていることから、その耐塩性は草本性被子植物の中でも最高水準にあると考えられる。その耐性機構は、塩ストレス条件下でも Na^+ をほとんど吸収しないことが特徴である。

V. riukiensis は沖縄諸島の海沿いの丘陵地に生息し、葉に多量の Na^+ を蓄積するにもかかわらず塩ストレスに強いという珍しい特徴をもつ。

V. trilobata は主にインド内陸部の乾燥地帯に分布しており、乾燥に強い植物である。しかし興味深いことに、インドの *V. trilobata* は、耐塩性は極めて低いのに対して、スリランカの系統は海岸に進出しており、耐塩性も高い。このスリランカ型系統は、根および茎で Na^+ を除去し、葉への流入を防ぐ機構を獲得したと考えられる。

本研究では、上記の遺伝解析に加え、ゲノム解読とトランスクリプトーム解析を行うことで、上記3種が獲得した耐塩性機構の責任遺伝子を同定することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

まず、*Vigna* 属遺伝資源の耐塩性評価を行い、特に耐塩性に優れた系統を選抜した。一般にストレス耐性の向上は植物を小型化させる傾向があるが、*Vigna* 属では耐塩性と生長速度との間に強い相関は見られなかった。したがって、耐塩性の強化は生産性を犠牲にしにくいと考えられる。また、DNA 配列を使った系統解析から、*Vigna* 属において耐塩性は少なくとも4回は独立に進化したことが示唆された。さらに、葉に蓄積されるナトリウムの量が選抜系統間で大きく異なるため、耐性機構もまた多様だと考えられた。したがって、それぞれの耐塩性機構を集積することで、野生種以上の耐塩性を達成できる可能性がある。しかも、これらの選抜系統を塩害圃場で栽培すると、良好な生育を示すため、これらの耐塩性野生種がもつ耐性機構は圃場レベルでも十分通用すると考えられた。

次に、これらの耐塩性系統がもつ耐性機構の責任遺伝子を同定するため、*V. marina*、*V. riukiensis* および *V. trilobata* の3種について、それぞれ感受性系統との交雑集団を作成し、DNA マーカーを使った QTL 解析を実施した。その結果、3種とも2つずつ、寄与率の高い QTL が相異なる位置に同定された。したがって、やはり耐塩性進化が少数の遺伝変異によって生じることが示されたと同時に、その原因遺伝子も種ごとに異なると考えられた。

しかし DNA マーカーのみで耐塩性遺伝子を同定することは難しいため、耐塩性野生種3種の全ゲノム解読を行った。ロングリードのシーケンサーを利用したため、カバー率・正確性ともに高い全ゲノム配列を構築することに成功した。

最後に、このゲノム配列を参照配列として、*V. riukiensis* のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、耐塩性に関わることが知られている 586 の遺伝子群のうち、4 つが全身で恒常的に転写が活性化されていることが明らかとなった。すなわち、*V. riukiensis* はその 4 遺伝子の過剰発現体だと見做すことができる。しかも、そのうち1つは耐塩性 QTL 上に座乗しており、*V. riukiensis* の耐塩性進化における直接要因となった可能性が高い。なお、これまでの耐塩性研究は 586 もの耐塩性遺伝子のうち、どれをどう組み合わせれば実用的な耐塩性を達成できるか、という点を解明してこなかったが、*V. riukiensis* の解析結果はこの問いに対する模範解答になると期待される。

(2) 詳細

「*Vigna* 属の耐塩性評価」(業績1、3)

Vigna 属遺伝資源 28 種 67 系統について、目視、気孔コンダクタンス、光合成速度、クロロフィル蛍光、バイオマス等の指標を用いて耐塩性評価を行った。その結果、*V. marina*、*V. luteola*、*V. vexillata*、*V. trilobata*、*V. riukiensis*、*V. nakashimae* の6種 10 系統が何れの指標においても高い数値を示した。これらはどれも感受性系統から最近分化しており、耐塩性進化が比較的容易に生じることが示唆された(図1)。また、耐塩性系統には植物体が大きな系統もある一方で、

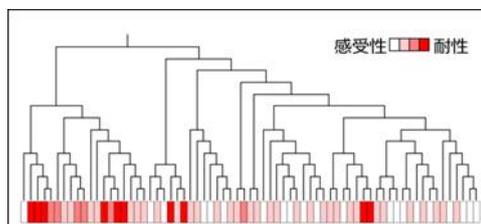


図1. *Vigna*属遺伝資源の進化系統樹と耐塩性

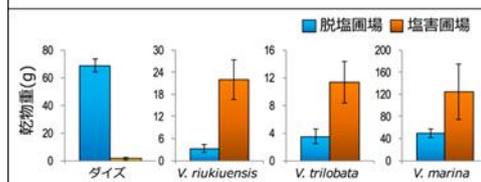


図2. 塩害圃場および脱塩圃場における栽培試験結果

小さい系統が全て耐塩性が高いとも限らず、植物体の大きさと耐塩性との間には明瞭な相関は見られなかった。これは耐塩性の向上によって失われる乾物生産が比較的少ないことを示唆している。さらに、津波塩害を受けた福島県相馬市の圃場で行った栽培試験では、ダイズが全滅したのに対して耐塩性系統は一般圃場よりも良好な生育を示した。したがって、これらの系統がもつ耐塩性機構は圃場レベルでも十分機能すると考えられた(図2)。

「耐塩性に関する QTL 解析」(業績 5)

上記の耐塩性野生種のうち、*V. marina*、*V. trilobata* および *V. riukuensis* の3種について、耐塩性遺伝子が座乗する染色体領域を同定するため、感受性系統との交雑集団を作成して連鎖解析を行った。その結果、*V. marina* からは第1染色体上に1つ、*V. trilobata* からは第1・第2染色体上にそれぞれ1つずつ、*V. riukuensis* からは第1染色体に2つ、第2染色体に1つの耐塩性 QTL が同定された。これらの QTL は何れも高い寄与率を示したため、耐塩性進化が少数の遺伝変異によって生じたという仮説を支持するものとなった。さらに、種間で共通する場所に検出された QTL が存在しなかったことから、それぞれの野生種がもつ耐塩性遺伝子もまた異なると考えられた。

「アズキおよび耐塩性野生種の全ゲノム解読」(業績 2, 4)

QTL から遺伝子を同定するには、ゲノム配列の整備が不可欠である。当初は Illumina のシーケンサーを使っていたが、アセンブルにはやはり多くのギャップが残されていた。しかし沖縄総合科学研究所の協力によってロングリードの Pacbio シーケンサーを優先的に利用できる状況となったため、シーケンスとアセンブルをやり直した結果、コンティグ長、正確性などが大きく改善した(表1)。それに伴い、遺伝子アノテーションの精度も大幅に改善した。当初のアセンブルでは約3千個の遺伝子アノテーションに誤りがあったが、現行のアセンブルではそれらのほぼ全てが修正された。特に Illumina を使ったアセンブルではユニークな配列の 15-20%が失われており、それが遺伝子のアノテーションに影響したと考えられる。

表1. IlluminaとPacbioによるゲノムアセンブルの比較

	<i>V. angularis</i>		<i>V. riukuensis</i>		<i>V. trilobata</i>		<i>V. marina</i>	
	Illumina	Pacbio	Illumina	Pacbio	Illumina	Pacbio	Illumina	Pacbio
Sequencer	Illumina	Pacbio	Illumina	Pacbio	Illumina	Pacbio	Illumina	Pacbio
Genome size	540 Mb	540 Mb	540 Mb	540 Mb	530 Mb	530 Mb	580 Mb	580 Mb
Assembly total	473 Mb	514 Mb	463 Mb	530 Mb	471 Mb	500 Mb	430 Mb	488 Mb
Scaffolds (n)	3,939	2,529	5,816	2,223	3,397	2,413	7,926	4,531
NG50	3.0 Mb	3.0 Mb	0.5 Mb	0.6 Mb	0.6 Mb	0.9 Mb	0.1 Mb	0.2 Mb
Coverage	87.8%	95.4%	87.5%	98.0%	89.0%	94.9%	73.1%	84.7%
Gap (% of N)	15.1%	0.8%	17.9%	0.0%	8.0%	0.5%	10.0%	1.0%

「*V. riukuensis* のトランスクリプトーム解析」

上記のゲノム配列を参照配列とし、*V. angularis* および *V. riukuensis* の塩ストレス条件下におけるトランスクリプトーム解析を行った。*V. angularis* は QTL 解析において感受性親として *V. riukuensis* と交雑した品種(京都大納言)を用いた。植物体は水耕で栽培し、第1本葉が展開したところで 100 mM NaCl を添加、その後 3 日目、7 日目、10 日目および 14 日目に葉および根から RNA をサンプリングして対照区と比較した。その結果、塩ストレスによって有意かつ 2 倍以上または半分以下に転写量が変動した遺伝子の数は図 3 のようになる。感受性の *V. angularis* の葉においては、1913 個の遺伝子の転写が上昇し、その中には塩ストレ

スを含めた様々な「ストレス応答」に関係する遺伝子が多く含まれていた。一方、転写が減少した遺伝子は 1385 個で、「光合成」や「生育」に関与する遺伝子が多数含まれていた。つまり、*V. angularis* の葉は塩ストレスによって生命活動が低下したことが

示唆された。一方、*V. riukiensis* の葉においては、転写が上昇した遺伝子は僅か 127 個しかなかった。転写が減少した遺伝子は 556 個あり、その多くが塩ストレス以外の「ストレス応答」に関与する遺伝子であった。したがって、*V. riukiensis* は塩ストレス以外のストレス応答経路を抑制することで、塩ストレスに順応したと考えられた。*V. angularis* の根において転写上昇が見られた遺伝子群は活性酸素除去に関わるものが多く、転写が減少した遺伝子群には塩ストレス以外の「ストレス応答」に関わるものが多かった。一方、*V. riukiensis* の根で転写上昇が見られた遺伝子群には「ジベレリン応答」に関与する遺伝子群が多く、浸透圧ストレスに対して根の伸長を促す適応的な反応が生じていることが示唆された。転写が減少した遺伝子群には両種間で大きな違いは見られず、いずれも塩ストレス以外の「ストレス応答」に関わる遺伝子群が多かった。

V. riukiensis で転写が上昇した遺伝子群があまりに少なかったため、塩ストレス応答に関わる 586 遺伝子の転写量を抽出してアズキと比較した。その結果、*V. riukiensis* では 4 つの遺伝子が塩ストレス処理の有無に関わらず恒常的に高い転写量を示すことが明らかとなった(図 4)。それらの転写量は少なくともアズキの 20 倍以上、最も高いもので 900 倍に達することが明らかとなった。一方、*V. angularis* においては顕著な塩ストレス応答を示す遺伝子は少なかったが、51 遺伝子が 14 日後に転写量を大きく増加させた(図 4)。これらの遺伝子群について、シロイヌナズナの同祖遺伝子のアノテーションを確認すると、「塩ストレス応答」だけでなく、「ABA 応答」が記載された遺伝子が半数を占めていた。一方、それらの遺伝子群は *V. riukiensis* では最も転写量が低い遺伝子群に属していた(図 4)。したがって、*V. riukiensis* は 100 mM NaCl の条件に適応しており、ストレスを受けていないことが示唆された。また、この結果は耐塩性関連遺伝子群の大部分は適応的な耐塩性の成立には重要ではないことを示すと考えられた。

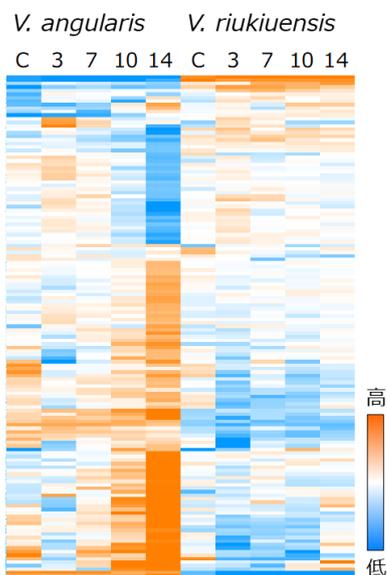


図4. *V. angularis* および *V. riukiensis* の 100 mM NaCl 条件下における塩ストレス関連遺伝子群の転写量 (葉)
C: 対照区、3: 塩処理3日後、7: 塩処理7日後、10: 塩処理10日後、14: 塩処理14日後

に座乗することが明らかとなった。したがって、この遺伝子の転写制御に影響する遺伝変異が、*V. riukiensis* の耐塩性進化に重要な役割を果たしたと考えられる。

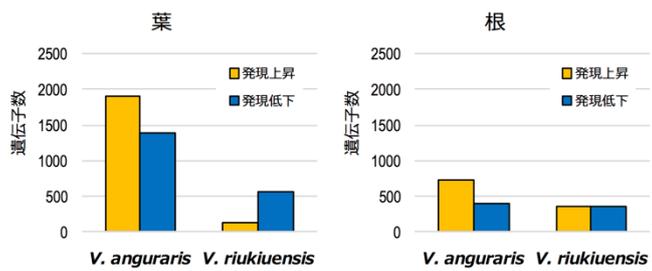


図3. *V. angularis* および *V. riukiensis* の葉・根において塩ストレス処理によって発現が2倍以上または半分以下になる遺伝子数

3. 今後の展開

本研究のような野生種を使った研究の最大の弱点は、形質転換による遺伝子の直接的な機能解析が難しいことである。本研究による膨大なトランスクリプトーム解析の成果も、現時点では相関を確認したに過ぎず、因果関係を解明するまでには至っていない。したがって、今後は野生環境で植物体に感染しているウイルスを探索し、それをもとに野生種で VIGS を可能にする系を開発する。VIGS とは Virus-induced gene silencing の略で、ウイルスをベクター化して遺伝子導入や RNAi を行う技術である。また、タバコやシロイヌナズナなど形質転換が容易な植物に、野生種由来の耐塩性関連遺伝子を複数導入した多重過剰発現体を作成することによってもある程度は機能解析を進めることができると考えられる。

また、まだ公開することはできないが、トランスクリプトーム解析により野生種の耐塩性 QTL に座乗する遺伝子の中から有力な候補遺伝子を選定する作業は完了している。今後はこれらの遺伝子について、上記の実験系を用いた機能解析を進める計画である。

これらの解析の結果、耐塩性に関わる機能をもつことが証明された遺伝子群については、それらをダイズに導入し、超耐塩性ダイズの作出へと繋げていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

2015 年度の 1 年間、所属研究所の不正会計のために予算が執行できなくなったことに対して、研究期間を 1 年延長するという特別措置を取って頂いたことに感謝したい。再開後、体制の立て直しに半年以上を要しており、もし延長されたこの 1 年がなかったら本研究は中間報告の段階からほとんど前に進めなかっただろう。

しかしながら、当初の目標であった野生種がもつ耐塩性遺伝子を同定するまでに至らなかった。予算執行停止に伴う研究チームの解散、および再開時に組織再編が重なったことに足を引っ張られた。最終年度に全力でデータ解析を進めたが、まだまだこの宝の山を掘り尽くすには至っていない。特に、オルソログの発現プロファイルを種間で比較する横断的な解析は極めて重要だが着手したばかりであり、今後も優先して進めていきたい。

しかしながら、現時点で公表している成果にも、すでに重要な知見が含まれていると考える。特に重要なのは図 4 に示した *V. riukiensis* の耐塩性関連遺伝子群のトランスクリプトーム解析の結果である。この図では耐塩性を有する *V. riukiensis* において 4~6 個の遺伝子の転写量が、感受性の *V. angularis* よりも明らかに高いことが目立つため、これらの遺伝子が耐塩性に重要な意味をもつように見受けられる。実際にそうである可能性は高いが、それ以上に重要な点がある。それは、耐塩性関連遺伝子群の大部分が、実際に耐塩性を有する野生種にとって重要ではないという点である。

これまでにも植物の耐塩性研究はシロイヌナズナやイネなどのモデル植物を用いて精力的に行われてきており、その成果として多くの耐塩性遺伝子が同定・単離されてきた。しかしながら同時に、それらの耐塩性遺伝子を単独で過剰発現させても、塩害圃場で実用可能な水準には達さないことも明らかとなった。それが研究者達を更なる耐塩性研究へと駆り立て、遂には 586 もの遺伝子に関わる非常に複雑な系として耐塩性を捉えるに至った。

では結局、実用的な耐塩性を達成するには 586 遺伝子のうち、どの遺伝子を幾つ、どのような組み合わせで応用すればよいのか。モデル植物を使った耐塩性研究では、その疑問に答えることは不可能に近い。しかし本研究の成果からは、そのうち少なくとも 530 個以上の遺伝子は考慮する必要がないという結論を導くことができるのである。これは植物の耐塩性研究における大きな前進だと言えるだろう。

また、当初の目論見であった「二系交雑を用いた遺伝解析と、ゲノム・トランスクリプトーム解析とを併用することによって候補遺伝子を絞り込むことができる」とした点については、正しかったと考えている。F₂ 集団の連鎖解析から見出された QTL の領域に座乗する遺伝子の数は数百～千以上であったが、トランスクリプトーム解析によって転写量が有意に異なる遺伝子だけに絞り込むと、何れの QTL においても候補遺伝子は 1～数個に落とし込むことができた。これらの遺伝子の効果については今後の検証が必要だが、この中には実際に耐塩性の向上に寄与することが示されている遺伝子もあることから、やはりこの戦略は正しかったと考える。

一方で、生理学的な解析を初期計画から敢えて排除してしまったことは早計だったと考える。私の企みは、F₂ 集団の連鎖解析と、両親系統のトランスクリプトーム解析のみで原因遺伝子を同定できることを示し、それによってこれまで研究対象から敬遠されてきた野生の遺伝資源に挑む研究者を増やそうというものだった。しかし昨年度から本格的に生理学的な調査を開始した結果、予想だにできなかった現象に遭遇し、新しい耐塩性機構を発見するチャンスに恵まれることとなった。そしてそのような現象に遭遇できること自体が、野生種を研究することの大きな魅力なのだと改めて感じた次第である。領域会議の度に「もっと生理学的な解析を」と言い続けて下さったアドバイザーの佐藤先生や、RI を使った画像解析を勧めて下さった西澤先生にはあらためてお礼を申し上げたい。

それらの解析の結果、野生種ごとに全く異なる耐塩性機構が見出されたことは、非常に重要だと考えられる。それらは起源が独立であるだけでなく、機能する器官も種ごとに異なっているため、集積すれば野生種以上の耐塩性を実現できる可能性が高い。研究開始時には塩害地で栽培できる作物を開発したいと考えていたが、*Vigna* 属野生種がもつ多様な耐塩性機構が明らかになるにつれて、これらを応用すれば海水で栽培できる作物を開発することも可能ではないかと考えられる。それが実現できれば、二酸化炭素の資源化はおろか、農業の最大の問題である水資源問題でさえ解決できると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

アズキ(*V. angularis*)を含む*Vigna*属の野生種には過酷な環境に適応したものも多い。内藤健研究者は*V. marina*、*V. riukiensis*および*V. trilobata*の3野生種の耐塩性に関わる遺伝子群を明らかにし、それらを環境ストレス耐性植物の開発に活用する道筋をつける事を目的に研究を進めた。5年型とはいえ、時間的にはかなりチャレンジングな要素を含む課題であったが、それぞれの植物に特徴的な耐塩性の責任遺伝子の特定に向けての研究は大きく進展したと判断される。また、放射性ナトリウムを用いて3種の耐塩性機構の生理学的な違いを明確にした点も評価される。更に、これらの耐性植物は、塩ストレス負荷条件下で、耐塩性遺伝子群の応答が比較的小さい事が明らかになるなどの興味深い現象も観察され、植物の耐塩性機構がどのよ

うに進化してきたのかを理解し、耐性植物の開発に繋げる重要な手がかりを得た。こうした野生種を材料とした研究成果は、モデル植物での研究では得られなかったもので、優れた研究成果である。今後、更に生化学的、生理学的解析、あるいは逆遺伝学的解析も進め、責任遺伝子の特定とその機能および耐塩性機構を明らかにし、*Vigna*属全体の耐塩性の解明とその分子育種への応用展開への道筋をつけることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表 (*責任著者)

1. Iseki K, Takahashi Y, Muto C, Naito K*, Tomooka N., Diversity and evolution of salt tolerance in the genus <i>Vigna</i> . <i>PLoS One</i> 11(10): e0164711 (2016)
2. Sakai H, Naito K , Takahashi Y, Sato T, Yamamoto T, Muto I, Itoh T, Tomooka N.*, The <i>Vigna</i> Genome Server, ‘ <i>Vig</i> GS’: a genomic knowledge base of the genus <i>Vigna</i> based on high-quality, annotated genome sequence of the azuki bean, <i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi & Ohashi. <i>Plant Cell Physiol.</i> 57(1): e2 (2016), doi: 10.1093/pcp/pcv189
3. Yoshida Y, Marubodee R, Ogiso-Tanaka E, Iseki K, Isemura T, Takahashi Y, Muto C, Naito K* , Kaga A, Okuno K, Ehara H, Tomooka N., Salt tolerance in wild relatives of adzuki bean, <i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi et Ohashi. <i>Genet Resour Crop Evol.</i> 63: 627-637 (2016), doi:10.1007/s10722-015-0272-0
4. Sakai H, Naito K* , Ogiso-Tanaka E, Takahashi Y, Iseki K, Muto C, Satou K, Teruya K, Shiroma A, Shimoji M, Hirano T, Itoh T, Kaga A, Tomooka N., The power of single molecule real-time sequencing technology in the <i>de novo</i> assembly of a eukaryotic genome. <i>Sci Rep.</i> 5: 16780 (2015), doi:10.1038/srep16780
5. Chankaew S, Isemura T, Naito K* , Ogiso-Tanaka E, Tomooka N, Somta P, Kaga A, Vaughan DA, Srinives P., QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in <i>Vigna marina</i> subsp. <i>oblonga</i> , a halophytic species. <i>Theor Appl Genet.</i> 127: 691-702 (2013), doi: 10.1007/s00122-013-2251-1

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

- ・ 2013年度日本育種学会奨励賞

学会発表(招待講演のみ)

- ・ Ken Naito, Hiroaki Sakai, Eri Ogiso, Akito Kaga and Norihiko Tomooka “The *Vigna* Genome Project” 3rd International Symposium of Genomics of Plant Genetic Resources (2013)
- ・ ゲノミクスが解き明かす *Vigna* 属野生種の限界環境適応性 植物科学シンポジウム「ラボとフィールドを結ぶ植物科学」(2015)
- ・ *Vigna* 属遺伝資源が有するストレス耐性の理解と応用 日本植物学会第 79 回大会シン

ポジウム「自然変異に学ぶ」(2015)

- ・ *Vigna* 属野生種の多様性と環境適応 日本進化学会第 17 回大会ワークショップ「ゲノム情報から野生植物の適応現象に迫る」(2015)
- ・ Genus *Vigna* –the Wild and Sexy– 第 5 回 NGS 現場の会ワークショップ「海と大地と NGS」(2015)
- ・ Genus *Vigna* –Finding Honey in the Wild– 第 56 回日本植物生理学会年会シンポジウム「Next generation researches in plant physiology: Extensive environmental adaptation in plants」(2015)
- ・ *Vigna* 属の多様性の秘密を知りたくて NGS イルミナ次世代シーケンシングフォーラム (2014)
- ・ 長いことは良いことだ 第 130 回日本育種学会講演会 ワークショップ「ついに来た！ゲノム解析第 3 世代の波」(2016)
- ・ ワリとイケてる！アズキのなかま 第 81 回日本植物学会第 81 回大会 理事会主催シンポジウム「あなたの研究は伝わっていますか？」(2017)

アウトリーチ

- ・ ワリとイケてる！アズキのなかま 島根県市民公開セミナー：第 2 回アズキに関するセミナー(2014)
- ・ ワリとイケてる！アズキのなかま サイエンスカフェ@多摩六都科学館(2015)
- ・ ワイルドはセクシーである～アズキのなかまがもつ多様性と可能性～ 日本育種学会公開シンポジウム「食料問題を解決する育種学の最前線」(2016)

著作物

- ・ 内藤健 *Vigna* 属植物：アズキのなかまがもつ多様性と可能性 化学と生物、54, 464-470 (2016)
- ・ 内藤健、坂井寛章 世界の現状：マメ科作物のゲノム解析とその利用 国際農林業協力、39, 12-19 (2016)

主催

- ・ 農学中手の会 第 1 回研究集会 2015
- ・ 農学中手の会 第 2 回研究集会 2016
- ・ 農学中手の会 第 3 回研究集会 2017