

## ISDSB2016 開催報告 2

文責 山根隆(名古屋大学名誉教授)

### (講演概要)

シンポジウムの講演プログラムおよびポスターのタイトル・発表者は、本員会のホームページの「ISDSB2016 報告」を参照されたい。

講演 35 件の内訳

プレナリー講演 4 件 (講演時間は 45 分)

一般講演 31 件(講演時間は基本的に 25 分か 30 分 (\*), 15 分 (#)、20 分 (“) の講演もあった)

### 7<sup>th</sup> August 2016 Sunday

Opening	Paul Langan
PL1 X-ray1	<b>Jack Johnson, Scripps Research Institute</b> “Structural Studies of Virus Particle Maturation: An Experimental Laboratory for Large-Scale Macromolecular Dynamics” 最初、Dengue Virus のマチュレーションでは、サブユニットの 4 次構造が多きく変化す例が示され、RNA virus である <i>Nadaurelia capensis</i> の virus(N $\omega$ V)が、その構成要素を取り込んだのち、マチュレーションによりコンパクトになる現象が、X 線、SAXS、cryo-EM を駆使することにより解明された過程が紹介されたが、共同研究者の多彩さが目立った。 1) X 線では CHESS で収集した 2.8Å 分解の結果、N $\omega$ V の capsid (外殻) は A、B、C、D の 4 サブユニットからなるが、procapsid と capsid では A、B、C、D のコンフォメーションは異なり、capsid では密なパッキングになるように 4 次構造が多きく変化している。サブユニットの RNA と相互作用する inner helical domain も伸びた構造から密な構造に変化する。 2) SAXS データは APS で収集。Virus の粒径が pH 7.6 (procapsid)から pH 5.0 (capsid)に変わると、480Å から 410Å に縮んでいる。pH 5.5 で capsid protein が切断され、コンパクト化する機構が示された。 3) cryo-EM サブユニットの電子密度にフィットさせたモデルの時間経過による変化がしめされ、virus のコンパクト化は virus が接触するリポソームの分解活性を発現するために必要との生物学的意義が紹介された。
Session 1	<b>Sources and facilities</b>
1-1 X-ray2	<b>Jean Jakoncic, National Synchrotron Light Source II</b> “NSLS-II Biomedical Beamlines for Micro-Crystallography, FMX and for

	<p>Highly Automated Crystallography, AMX: New Opportunities for Advanced Data Collection”</p> <p>FMX system (focus 1-20 <math>\mu\text{m}</math>, <math>12 \times 12 \mu\text{m}</math> に設定)、および AMX (focus 5-200 <math>\mu\text{m}</math>, <math>12 \times 99 \mu\text{m}</math> に設定)の紹介がなされた。ロボットアームによる試料の操作や資料の可視化の工夫のシステムへの組み込みを含め、装置の立ち上げ状態が説明された。検出器は FMX では Eiger 16M detector (<math>311 \times 328 \text{ mm}^2</math>, ピクセルサイズは <math>75 \mu\text{m}</math>)で、1組のデータを 15s で収集できるが、1日で 25TB のデータ処理が必要になるようだ。将来的には Cryo-EM との併用も目指している。</p>
1-2 X-ray3	<p><b>Nadia Zatsepin, Arizona State University</b></p> <p>“Serial Femtosecond Crystallography at LCLS: The First 5 Years”</p> <p>Stanford にある LCLS (Linac Coherent Light Source) の成果の紹介であった。ビームは, flux <math>10^{12} \sim 10^{13}</math> pulse, 幅は <math>10 \sim 200</math> fs, 波長 <math>1.5 \sim 6.2 \text{ \AA}</math>, 径は <math>100 \text{ nm}</math>。SFX (serial femtosecond crystallography)の 2011 年 2 月からの実験のレビューがなされた。実験には <math>10,000 \sim 1,000,000</math> の結晶を使用するが、結晶の種々の性質に依存した monte carlo merging of FSX averaging のさらなるアルゴリズムの研究の必要性が言及された。大きな結晶を作るのが困難な GPCR の結果 (Nature commu. 2014, 5 (3309) 1-6) ,PYP の時分割測定による酵素学的基盤がわかる構造、不完全結晶による解説のイメージングの改良 (<math>\sim 4.5 \text{ \AA}</math> Bragg data と <math>4.5 \sim 3.5 \text{ \AA}</math> diffuse data の組み合わせにより分解能を格段に向上させるアイデア)、ナノ結晶の ab initio phasing、ASU におけるコンパクト XFEL の計画など多彩な報告であった。コンパクトといえば、コンパクト SOR では日本がかなりアイデアを出したけど、コンパクト XFEL の計画は日本ではないのかと思った。</p>
1-3 X-ray4	<p><b>Atsushi Nakagawa, Osaka University</b></p> <p>“SPring-8 BL44XU, A Beamline for Large Biological Macromolecular Assemblies”</p> <p>SPring-8 の BL44XU に設置された超巨大分子複合体の回折装置の最近の高度化を含めた紹介で、1)格子の長さ、2)弱い回折能、3)微小結晶サイズ、4)X線ダメージ、の解決の過程が説明された。新たに縦集光ミラーを設置することでビーム強度が約 10 倍増強された。また、高性能 CCD に交換などのアップグレードなども行われ、回折強度が非常に弱いイネ萎縮ウイルス結晶について、振動角 <math>0.1^\circ</math>、露出時間 1 秒でデータ収集されている。</p>
1-4 X-ray5	<p><b>Richard Gillian, Cornell University</b></p> <p>“CHESS, CHESS-U, and Future: Modeling Signal AND Noise on BioSAXS Beamlines”</p>

	4m の Undulator を導入し第 4 世代のリングに適合させた CHESS-U に設置された MacCHESS(biological small angle X-ray scattering 測定装置)と bioSAXS 訓練コースの照会がなされた。タイトルにもあるノイズ処理結果もレビューされた。
1-5 Neutron1	<b>Paul Langan, Oak Ridge National Laboratory</b> “Opportunities for Biology at the New and Improved Oak Ridge Neutron Sources” 高輝度、cold neutron の high flux isotope reactor (HFR)、パルス熱中性子の spallation neutron source (SNS)、ピーク輝度が 40 倍の high pulsed cold neutron を出す second target station (STS)が紹介された。最近の研究結果として、HIV protease not two proton transfer、可逆的に photpswitch する chromogenic protein のキャラクタリゼーションが報告された。

### 8<sup>th</sup> August 2016 Monday

PL2 Simu1	<b>Michael Crowley, National Renewable Energy Laboratory (NREL)</b> “Cellulose and Diffraction: Connecting Molecular Structure to Measurements” 前半はセルロース合成の構造生物学的理解のため、静的構造間のギャップを埋める手法としての計算科学について紹介された。Michaelis コンプレックスの構築とその検証、SANS による活性 pH でのコンフォメーションの柔軟性と正しい protonation モデルによるシミュレーションが示された。後半はセルロース形成 (フィブリル形成、およびシート形成)のシミュレーションとその妥当性の評価であった。
<b>Session 2</b>	<b>Drug Design</b> PL1 に続く計算科学 (シミュレーション) の講演であった。
2-1* Simu2	<b>Jeremy Smith, University of Tennessee</b> “Proteins: Forever Aging?” Virtual high throughput screening (J. Comp. Chem.32, 1202 (2011), 34, 2212 (2013)の報告がなされた。1) Docking部位の形状を変えるための、ensemble-based docking (1 結晶構造+MD simulation)を、coagulation cascadeの分子effectorの発見を例に紹介された。2) Protein dynamicsの非定常状態のモデル構築の例として、SANSによる domain—domain間距離の変化から、部分構造の揺らぎを評価していた。Dynamicsの効果を取り入れたとしても、一般的なシミュレーション手法の説明のような気がした。
2-2 Simu3	<b>Irene Weber, Georgia State University</b> “Protein Crystallography for Tackling the Problem of HIV Drug

	<p>Resistance”</p> <p>新規インヒビター的设计ガイドが紹介された。活性部位の protonation state, Protease—水間の水素結合の親和力の強さ鍵となり、中性子構造がその洞察を与えるが、分解能が低く測定に時間を要するのが問題である。</p>
2-3 Simu4	<p><b>Mayank Aggarwal, Oak Ridge National Laboratory</b></p> <p>“Mapping the H-Bonding Patters in Human Carbonic Anhydrase II Complexed with Clinical Drugs”</p> <p>Carbonic Anhydrase、およびその sucrose 複合体の構造を中性子で決定し、水素結合の正確なネットワークを決定した。静的構造の欠点を補うために、中性子構造と MD により、target と ligand の dynamics の必要性和その評価が報告された。</p>
2-4 Simu5	<p><b>Jerry Parks, Oak Ridge National Laboratory</b></p> <p>“Discovery of Inhibitors of Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria”</p> <p>抗生物質を排出する AcrAB—TolC pump の分子モデルを、16 Å 分解能の cryo-EM 解析と 8.2 Å の結晶解析から作成した。Pump の形成阻害のターゲットは AcrA であり、そのヒンジ部分の構造に影響する変異体 (E67A) の ensemble docking form MD simulation を行い、effective potential inhibitor が AcrA の構造を変えることが示された。Full assembled AcrAB—TolC のシミュレーションは進行中とのことであった。</p>
	<b>Conference Photos</b>
<b>Session 3</b>	<b>New Instruments and Methods</b>
3-1 Neutron2	<p><b>Paul Adams, Lawrence Berkeley National Laboratory</b></p> <p>“Computational Methods for Neutron Crystallography in Phenix”</p> <p>X線と中性子の回折データ処理の補完性の向上について The Macromolecular Neutron Consortium で進めている構造解析システム phenix のレビューであった。Phenix を構造生物学のハブにするために、phenix.refine で X線も中性子も精密化が可能とし、joint X-ray/neutron refinement で複数のデータに対する精密化の例が紹介された。ただ、X線と中性子のデータの分解能が違いすぎると、そのデータセット間の重みづけがチャレンジングとなるとのコメントもあった。</p>
3-2 EM1	<p><b>Wah Chiu, Baylor College of Medicine</b></p> <p>“CryoEM of Molecular Machine with Variable Conformations of Its Components”</p> <p>唯一の CryoEM の話題で、direct electron detector の使用により (本体は JEOL) 分解能が向上している。厳密なマップとモデル構造の検証のための image</p>

	processing softwareの説明がなされた。3.7 Å分解能のGroELの単粒子解析で、サブユニットの多重構造の検証がわかり易く示された。
3-3 “ Neutron3	<b>Ichiro Tanaka, Ibaraki University</b> “Cryoprotectant-Free High-Pressure Freezing and Dynamic Nuclear Polarization for More Sensitive Detection of Hydrogen in Neutron Protein Crystallography” ラディカルを結晶にドーピングすると、核偏極度に依存してHの散乱長が変化する (dynamic nuclear polarization, DNP)。DNPによりHの散乱長を増加させると感度の向上につながり、重水素化の必要がなくなるが、Hの高偏極度を実現するためには、極低温と高磁場環境が必要となる。リゾチームタンパク質ではあるが、200 MPaの高圧で比較的大型の単結晶を抗凍結剤なしで凍結させた実験と実際にDNPを2.5T, 0.5Kで行い22%まで偏極させた実験の説明と結果の紹介がなされた。
3-4 “ Neutron4	<b>Flora Meilleur, North Carolina State University</b> “IMAGINE, New Science and Capabilities at HFIR” HFIR CG-4ビームライン ( $\lambda$ 2~10 Å、ビームサイズ 2×3.2 mm、flux ~ $3 \times 10^7$ ) で $\lambda$ の選択3 Å/4 Å/4.5 Å、空間のオーバーラップを最小にする quasi-Laue中性子実験条件での解析結果が報告された。 RAS GTPase 0.7mm結晶で $\lambda$ 3.3~4.5 Å、露出24h、22フレームを測定。 Cholesterol oxidase $\lambda$ 2.8~4 Å、露出24h、28フレームを測定。61~2.2 Åのデータを収集し、フラビン補酵素の酸化還元状態におけるHの位置の決定とGlu361が塩基であることを示した。
<b>Session 4</b>	<b>Bioenergy</b> 光合成の国際学会と重なったため、バイオマス関係の講演が中心であった。
4-1* X-ray6	<b>Jochen Zimmer, University of Virginia, School of Medicine</b> “Crystallographic Snapshots of a Polysaccharide Secretion Machinery” セルロース合成酵素 (BcsA, BcsB, BcsC, BcsZ) の BcsA/ BcsB の構造と機能に関する研究報告であった。静止型の構造の BcsA に cyclic-di-GMP が結合すると、セルロース合成が刺激され活性型に構造が変化する。その時、2か所で大きなコンフォメーション変化が起こる。また、セルロースとの相互作用やセルロースの輸送のシミュレーションモデルが示された。
4-2* X-ray7	<b>Yoshiki Higuchi, University of Hyogo</b> “Structural Studies of [NiFe]-hydrogenases” O <sub>2</sub> 耐性[NiFe]-hydrogenases は酸化によりクラスタ構造がわずかに変化する。Hyd1 の耐性メカニズムが提案された。また Hyd2 の酸化型、還元型の構造比較から酸素耐性には[4Fe-4S]クラスタが重要である。

4-3# X-ray8	<p><b>William Brad O'Dell, University of North Carolina</b></p> <p>“Oxygen Species at the Active Site of a Fungal Polysaccharide Monooxygenase”</p> <p>セルロースを分解する過程で、Cu—O<sub>2</sub>がHを引き抜く Mononuclear Cu(I/II) オキシゲナーゼの構造研究である。静的状態の活性部位の構造と還元状態での活性部位の構造を比較し、Cu—O—O 構造を解析し、O<sub>2</sub>の占有率や酸素の移動のモデルが示された。</p>
4-4# Neutron5	<p><b>Naomi Plaza, University of Wisconsin</b></p> <p>“Understanding Moisture-Induced Swelling of Wood Nanostructure Using SANS”</p> <p>セルロースによる水の吸着の研究で、セルロースと水の相互作用に着目すると、細胞壁内の結合水とキャビティ内の自由水に分けられる。乾燥セルロース、の湿度による膨潤を SANS で測定した結果が報告された。</p>
Poster Session	<p><b>30件の発表</b></p> <p>日本から6件、若手支援を行った福田庸太氏はセッション6-4で講演されることとなった。若手支援を行った矢野直峰氏がポスター賞の3等賞を受賞。</p>

### 9<sup>th</sup> August 2016 Tuesday

PL3 X+N1	<p><b>Peter Moody, Leicester University</b></p> <p>“Combining Cryo-Neutron &amp; X-ray Crystallography with Single Crystal Spectroscopy to Catch Peroxidase Intermediates”</p> <p>ペルオキシダーゼのヘム鉄に結合する酸素の状態の研究であった。Fe—O 間の距離はX線照射とともに伸びる。ESRFのID14-2でFeの単結晶スペクトルを測定し解析すると、級数打ち切り誤差による位置エラーの補正が必要となる。NeutronとX線のデータを組み合わせた精密化でO—Oが曲がる間のprotonの可能な動きが解明された。</p>
Session 5	<p><b>Macromolecular Complexes</b></p>
5-1* N+NMR1	<p><b>Frank Gabel, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France</b></p> <p>“SANS, NMR and Crystallography: A Powerful Combination to Study Challenging Protein-RNA Complexes”</p> <p>rRNAを修飾するBoxC/Dの構造のNMR、結晶学,SANSの組浅瀬による解析の成果が報告された。NMR、結晶学からの個々の分子構造とSANSからの形状を組み合わせて、複合体中の蛋白質とRNAの位置が精密化され、RNAのメチル化に伴うコンフォメーションの変化のモデルが提案された。エンベロープの形状と原子レベルの分子構造の相補的な組み合わせた解析例として、XIST gene silencing systemが紹介された。SAXSから得られるエンベロープ</p>

	の形状と SANS からの内部情報を組み合わせて複合多中の RNA の位置が決定されている。
5-2 Neutron6	<b>Bret Freudenthal, University of Kansas Medical Center</b> “Molecular Snapshots of DNA Damage Processing” DNA の損傷を正す APE1 の活性部位における塩基対のミスマッチがレビューされた。DNA とタンパク質のコントラストマッチ法による APE1 単独と APE1/Beta/λ RCC1/DNA 複合体の SANS の解析から Rg を求め、複合体モデル構造の妥当性評価する手法が紹介された。
5-3 Neutron7	<b>Matthew Cuneo, Oak Ridge National Laboratory</b> “An Additional Allosteric Switch in ABC Transport” トランスポーターのサブユニット PBP のアポ構造の SANS データから Rg/Rmax を計算し、Rg(calc)との比較により、溶液中で homodimer となっていることが示された。またミュータントの Rg 計算から、homodimer の一部が monomer に解離することと、トランスポーターに PBP がさらに 1 個付加することによりアロステリック効果が誘起されるモデルが紹介された。
5-4 Neutron8	<b>Venu Vandavasi, Oak Ridge National Laboratory</b> “How Many Cellulose Synthases in the Cellulose Synthesis Complex?” 多数の CESA サブユニットからなるセルロース合成酵素複合体 (CSC) の構造に関する講演であった。CESA は Rosette と呼ばれる状態を形成するが、その膜ドメインサイズを Freeze Fracture-TEM で測定した。 サイトゾルドメインは SAS 測定から安定な 3 量体であることが示された。SAS データに基づく EM の解析から、3 量体の 6 量体モデルが示された。
<b>ORNL Tours</b>	・ TITAN ・ SNS ・ HFIR 田中伊知郎委員のレビューを参照してください
<b>Banquet</b>	<b>Ken Herwig, Oak Ridge National Laboratory</b> “Prospects at the Oak Ridge National Laboratory Spallation Neutron Source Second Target Station” 途中で、ORNL の Second Target Station の紹介と将来展望についての講演がなされた。

### 10<sup>th</sup> August 2016 Wednesday

PL4 X-ray9	<b>Greg Hura, Lawrence Berkeley National Laboratory</b> “Combining SAXS and Crystallography to Build Intuition in Functional Macromolecular Networks and Engineering”
---------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>High throughput SAXS の後ろに回折装置を取り付け、SAXA と結晶学を統合した実験ハッチ SIBYLS の紹介であった。1) SAVS shape の利用。ドメインが動いている分子の形状に一致させて分子モデルを置く例が紹介された。</p> <p>2) 巨大分子のエンジニアリング。サブユニットを遺伝子操作して、ウイルスの核のようなケージの構築を目指している。ケージの構成は SAXS で追跡しているが、理想モデルよりはどうしてもコンパクトになるようである。</p>
<b>Session 6</b>	<p><b>Enzyme Mechanism and Allostery</b></p> <p>古典的な研究内容が多かった。</p>
6-1* X-ray10	<p><b>Walter Chazin, Vanderbilt University</b></p> <p>“How Does Human DNA Primase Count?”</p> <p>DNA プライマーゼは DNA 複製に関係する酵素で、一種の RNA ポリメラーゼである。Modular protein と複合体を形成し、Dynamic multi-protein machinery として作用する。SAX で ssDNA との相互作用により生じるドメインの動きを、population weighted average でとらえようとしている。ドメインの揺らぎは NMR のデータを用いていた。primase hetero-dimer の X 線構造を基に、RNA—primase のモデルを作っていく過程が紹介された。</p>
6-2 Neutron9	<p><b>Donald Ronning, University of Toledo</b></p> <p>“Redefining Our Understanding of Nucleosidase Mechanisms One Proton at a Time”</p> <p>Helicobacter pylori 由来 5'-MTA nucleosidase (HpMTAN) ホモ 2 量体のプロトン移動から始まる触媒機構の研究である。4 種類の複合体の 2.5 Å 分解能の中性子解析の結果から、活性に必須の D198 の protonation、nucleophilic H<sub>2</sub>O の活性化について議論された。</p>
6-3 X-ray11	<p><b>Robert Phillips, University of Georgia</b></p> <p>“Structure of the Tryptophan Indole-lyase-Oxindolylalanine Complex”</p> <p>Phe459 の基質結合と触媒作用への寄与を中心とした反応機構における proton transfer の役割が示されたが、古典的内容の講演であった。</p>
6-4 X-ray12	<p><b>Yota Fukuda, Osaka University, Japan</b></p> <p>“New Hot Topics on Copper Nitrite Reductases”</p> <p>Copper Nitrite Reductases (CuNIR) は NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を NO に還元するが、その段階で Cu<sup>2+</sup> は Cu<sup>+</sup> となる。SACLA で収集した SFX データを基に構造を決定し、触媒部位 His255 の側鎖の回転を説明できる新しい触媒メカニズムが検討された。CuNIR—nitrite complex の 1.6 Å 分解能の解析より、nitrite の結合による proton coupled electron transfer が促進されることが示された。CuNIR—O<sub>2</sub> complex における O<sub>2</sub> 結合メカニズムが提案された。</p>
<b>Session 7</b>	<p><b>Membrane Proteins</b></p>



7-1* NMR1	<p><b>Chuck Sanders, Vanderbilt University</b></p> <p>“The Amyloid Precursor Protein C99 Domain Binds Cholesterol and Undergoes a Structural Change When Reconstituted into Raft-Like Model Membranes”</p> <p>LMPG ミセル中の C99 の構造についての講演。2 重膜の成分を DMPC, ECM, POPC, MSM と帰るとその厚さが変わるが、C99 の構造に影響はない。C99 とコレステロールの 1:1 複合体の NMR からの構造モデル、raft-like bicelles 中での NMR 解析についての説明がなされた。</p>
7-2* ?	<p><b>Geoffrey Chang, University of California, San Diego</b></p> <p>“Transporter: Structure, Function, and Application”</p> <p>ISDSB2016 のホームページのシンポジウム・ブックレットを参照してください。</p>
7-3* Neutron10	<p><b>Ella Mihailescu, University of Maryland</b></p> <p>“Neutron Diffraction Reveals Conformation and Interactions of a Voltage-Sensor Toxin with Lipid Membranes”</p> <p>ラメラ中の Voltage-gated channel とそのインヒビターとの相互作用を、中性子散乱で調べた結果が報告された。</p>
<b>Session 8</b>	<b>Membranes</b>
8-1* Neutron11	<p><b>John Katsaras, Oak Ridge National Laboratory</b></p> <p>“Lateral Membrane Organization in Model Systems and Live Bacteria”</p> <p>モデル系とバクテリア内の膜構造の研究である。膜脂質成分は何百もあり、非対称性やモルフォロジー(サイズ)を制御しているといわれている。HFIR での Bio-SANS で lateral bilayer の非対称区画を解析した報告である。アイソトープラベルした膜モデルの SANS データをコントラストマッチング法で収集した。Pair distance distribution function の Monte Carlo シミュレーションから Intact system では脂質の区画ができていたということであったが、よくわからなかった。</p>
8-2* ?	<p><b>Michael Wiener, University of Virginia, School of Medicine</b></p> <p>“Functional Recognition of Membrane-Bound Substrates by the Integral Membrane Protein Protease Ste24p”</p> <p>Ste24pはCaaX配列 (aは疎水性アミノ酸、Xは随意のアミノ酸)を切断するZnプロテアーゼで、HEXXHモチーフを持っている。ERAD(小胞体関連分解)でSte24pは膜に関連した基質を切断する。Ste24pの活性部位は膜に埋もれたキャビティ内に含まれるが、基質のキャビティへの挿入、移動、排出の模式図が示された。古典的な内容であった。</p>
8-3*	<b>Fred Heberle, University of Tennessee</b>

Neutron12	<p>“Toward a Better Plasma Membrane Model: Probing Lipid Bilayer Asymmetry with SANS”</p> <p>SAXS では 2 重膜のシートの非対称性を捉えられないが、SANS では非対称性を捉えることができる。一方を POPC、反対側を POPE/POPS で構成した脂質 2 重膜の MD simulation のモデル原計算した形状因子を、実験と比較したという報告であった。</p>
Closing 6962 6968	<p><b>Paul Langan, Oak Ridge National Laboratory</b></p> <p><b>Takashi Yamane</b></p>

ポスター受賞（受賞者は各第一著者）

1. Highly resistant HIV-1 proteases and strategies for their inhibition.

**Andres Wong-Sam**, Daniel W. Kneller, and Irene T. Weber.

2. Developing semi-synthetic composite materials for investigating cellulose and matrix polymer interactions during pretreatment.

**Riddhi Shah**, Hugh O'Neill, Daisuke Sawada, Sai Venkatesh Pingali, Loukas Petridis, Volker Urban, Paul Langan, Arthur J. Ragauskas, Jeremy C Smith.

3. Application of profile fitting method to neutron time-of-flight protein single crystal diffraction data collected at the IBiX.

**Naomine Yano**, Taro Yamada, Takaaki Hosoya, Takashi Ohhara, Ichiro Tanaka, Katsuhiko Kusaka.