

吉田化学遺伝学研究室 Chemical Genetics Laboratory

主任研究員 吉田 稔
YOSHIDA, Minoru

微生物代謝産物は多様な生理活性物の宝庫である。劇的な作用を示す化合物には、必ず特異的な標的が存在する。そのような生理活性物質の標的分子を解明する最も重要なアプローチのひとつが化学遺伝学である。従来の遺伝学が変異体の取得とその形質を相補する遺伝子の解析によって進められるのに対し、化学遺伝学は細胞膜透過性の化学リガンド（例えば阻害剤）とその結合タンパク質の解析によって進められる遺伝学である。当研究室は新しい生理活性を引き起こすさまざまな低分子化合物の作用機構・標的分子を分子レベルで解明し、基礎生物学の新たな局面を展開するとともに癌をはじめとする疾病への新しい治療法の開拓を目指した基礎・応用研究を目指している。標的分子の解明に加えて、現在は化学遺伝学的手法によって明らかになった標的の中から特にタンパク質アセチル化を中心とするタンパク質の翻訳後修飾の制御機構や核・細胞質間分子輸送機構などについて解析を行っている。

1. アセチル化等のタンパク質修飾による細胞機能調節の研究

(1) タンパク質アセチル化の機能解析（吉田、島津*7、伊藤（昭）前田（里）*4、中老*4、中山*1、坂本*1、西野*5）

タンパク質脱アセチル化に関与する酵素（HDAC）の機能解析を目的に、前年度実施した新規アセチル化タンパク質の探索から得られたタンパク質を解析した結果、ヒートショックタンパク質 Hsp90 のコシャペロンである Aha1、アクチン結合タンパク質である cortactin が新規アセチル化タンパク質であることを見出した。まず、これらタンパク質のアセチル化を制御するアセチル化酵素、脱アセチル化酵素を同定した。アセチル化は Aha1 と Hsp90 の結合を阻害することにより、Aha1 のコシャペロン活性を低下させることを明らかにした。さらにアセチル化は、cortactin のアクチン結合活性を低下させることにより、細胞の運動性を抑制することを見出した。加えて、ミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素 SIRT3 の基質であるアセチル化タンパク質を同定する目的で、レトロウイルスを用いた shRNA 法により SIRT3 を恒常的にノックダウンさせた細胞を作製し、抗アセチルリジン抗体を用いたアフィニティー精製法により探索した結果、ミトコンドリアに局在する複数の新規アセチル化タンパク質の同定に成功した。

(2) タンパク質アセチル化を生細胞内で可視化するための蛍光プローブの開発（吉田、伊藤（環）*1、伊藤（昭））

真核生物のクロマチン構造はヒストンタンパク質のアセチル化修飾によってダイナミックに制御されている。生細胞内のヒストンアセチル化を時間・空間分解能を持って解析するための、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を原理とした蛍光プローブを開発することを目的とした。本年度、ヒストンアセチル化部位特異的な蛍光プローブの開発に着手し、ヒストン H4K12 のアセチル化を特異的に検出する蛍光プローブを作製した。

(3) 分裂酵母のタンパク質翻訳後修飾の網羅的解析（吉田、松山、高橋（秀）*5、白井*2、前田（和）*3、河村*8、橋本*4、宇野*1）

タンパク質の翻訳後修飾はタンパク質の活性制御などに重要な役割を果たしていることが知られているが、その全体像は明らかにされていない。これまでに行われてきたタンパク質翻訳後修飾の網羅的な解析では、ある一つの修飾に限定してプロテオームレベルで調べることが限界であった。そこで、これを大幅に拡張し、複数の翻訳後修飾について同時に解析すると共に、各修飾間の関係についても調べることが出来る系の構築を行った。本年度は ORF の 3'末端に FLAG および His₆ タグを融合した分裂酵母の約 5,000 の遺伝子を個別に発現する株を元に、His₆ タグを利用して各タンパク質をハイスループットに精製する系の構築を行い、実際にいくつかの翻訳後修飾特異的な抗体を用いて、同じ精製産物に対して複数の修飾が同時に検出できることを確認できた。

(4) 新しいタンパク質脱アセチル化酵素阻害剤の設計と評価（吉田、前田（里）*4、古米*3、小橋*5）

我々はトリコスタチン A やトラボキシンなど、天然由来の HDAC 阻害剤を多数見出してきた。HDAC はがんなどエビジェネティクスの制御異常に起因する各種疾患の治療薬として大きな期待を集めている。そこで新たな阻害剤を開発することを目的に九州工業大学西野教授、東京大学宮地助教授、名古屋市立大学宮田教授らのグループと共同して、新たな構造を有する HDAC 阻害剤の設計とその活性評価を行った。その結果、チオエーテルが新規リガンドとして機能することを見出した。

2. タンパク質の核-細胞質間輸送の制御機構に関する研究

(1) Localizome を利用した核・細胞質間輸送タンパク質の網羅的探索（吉田、八代田、岡田*1）

我々は、出芽酵母の核外輸送因子 Msn5/Kap142 およびヒトの核外輸送因子の exportin 5 とアミノ酸配列上の相同性をもつ分裂酵母 Spac328.01c を spMsn5 と名付けて解析を行った。spmsn5 遺伝子破壊株は様々なストレス感受性を示し、spMsn5 過剰発現株は形態異常を示した。我々はすでに約 5,000 個の YFP（Yellow Fluorescent Protein）融合型遺伝子コレクションを用いて、分裂酵母の全タンパク質の野生型株における細胞内局在を決定している。spMsn5 により核外輸送される基質タンパク質を同定するため、このコレクションから主に細胞質に局在する 561 クローンを選択し、spmsn5 破壊株に導入、発現させ、細胞内局在の可視化スクリーニングを行った。この結果、24 個のタンパク質が野生型株と異なる局在を示した。この中には、ストレス応答や細胞質分裂に関与する転写因子やストレス環境下での翻訳制御に関わるキナーゼなどが含まれていた。spMsn5 はこれらのタンパク質の局在制御を介して、ストレス環境適応メカニズムや細胞質分裂において機能すると考えられる。

(2) 核-細胞質間輸送を介した微小管制御機構の解析（吉田、荒井*5）

我々は昨年度までに、タンパク質核外輸送担体 Crm1 の阻害剤であるレプトマイシン B（LMB）の作用によって、分裂酵母の核内において異常に伸長した微小管束が形成される現象を見出した。この過程についてさらに詳細な解析を行ったところ、LMB の作用により、間期であるにも関わらず細胞質微小管の脱重合および核内へのチュープリンの蓄積が生じ、さらに間期 SPB（spindle pole body、動物細胞の中心体に相当）依存的に核内微小管が形成されることが明らかとなった。

3. 新しい生理活性物質の探索と分子標的に関する研究

(1) FR901464 の作用機構解析 (吉田、甲斐田^{*5}、Lo^{*7})

FR901464 およびそのメチルアセタール体である spliceostatin A (以下 SSA) は pre-mRNA の蓄積と翻訳を引き起こす抗腫瘍活性物質である。SSA はスプライシング因子である SF3b に結合することにより、スプライシング反応を阻害し、pre-mRNA を蓄積させる。驚いたことに pre-mRNA は本来、核内に係留されると考えられてきたが、SSA 存在下では一部の pre-mRNA が核内から翻訳の場である細胞質に漏れだし、タンパク質に変換されていた。そこで、SF3b 複合体の pre-mRNA 係留における役割を解析したところ、SF3b 複合体が結合するブランチ部位配列の違いによって、pre-mRNA の翻訳のされ方に違いがあることが明らかになった。さらに分裂酵母を用いて核内係留の機構を解析したところ、核膜孔周辺で pre-mRNA の核外輸送を抑制する機能を持つと推定される Mlp1 を過剰発現させると、SSA 存在下でも pre-mRNA の核内係留が促進されることが明らかになった。

(2) 新しい抗腫瘍活性物質の探索 (吉田、福田^{*2}、高橋(正)^{*1}、伊藤(昭)、高瀬^{*4})

タンパク質の SUMO 化を阻害する新規化合物を得るために、既に確立したスクリーニングシステムを用いて、微生物抽出物ライブラリーから探索した結果、SUMO 化阻害活性を有する複数の微生物抽出物サンプルを得た。また前年度、タンパク質のメチル化を阻害する化合物のスクリーニングから得られたグリオトキシンの *in vitro* での解析を行ったところ、グリオトキシンは、ヒストン H3K9 メチル化酵素である G9a および Suv39 の活性を阻害するが、ヒストン H3K4 メチル化酵素である Set9 は阻害しないことを見出した。

(3) ケミカルゲノミクスを用いた薬剤の作用機序解析 (吉田、西村^{*3}、松村^{*3}、松山、有田^{*1})

生理活性物質の作用機序の解明のためには、化学修飾を施した化合物を用いて物理的相互作用を足がかりに研究を進めることが定法である。しかし、化合物によっては物理的相互作用の検出は非常に困難であるため、より汎用性のある遺伝学的相互作用を指標にした化合物の作用機序解析を進めている。当研究室でクローン化に成功した分裂酵母全遺伝子約 5,000 の形質転換体を作製し、それらに対する薬剤の感受性の度合いを比較・解析することで化合物の標的分子候補を同定する、という方法論に基づいて研究を進めた。10種の作用機序既知の代表的な化合物に関してそれぞれ約 5,000 の遺伝学的相互作用を解析したところ、薬剤感受性が変化する遺伝子として標的分子や標的経路に含まれると予想されるタンパク質をコードする遺伝子群が同定された。本年度は、さらなる解析の結果、作用機序と密接に関連したオルガネラの推測が可能であることを明らかにし、作用機序未知の化合物にも本解析方法が有効であることを示すことに成功した。また、遺伝子導入株だけでなく、遺伝子変異体を用いた包括的な作用機序解析も併せて行っている。これまでに、京都大学の柳田充弘教授のグループと共同して 1,015 の温度感受性変異株コレクションからトリコスタチン A と特徴的な相互作用を示す変異株のスクリーニングを行い、興味深いクロストークを示す 100 弱の変異体を同定した。本年度は、それら変異株の原因遺伝子の同定をすすめた。

(4) 酵母を用いたヒト疾患関連遺伝子産物制御法の開発 (吉田、八代田、小林、関戸、田岡^{*6}、岡本^{*6}、倉本^{*1}、竹本^{*5})

Gateway化されたヒト完全長cDNAを分裂酵母に導入し過剰発現させ、生育阻害の表現型を示すヒト遺伝子をリストアップし、その表現型の回復を指標に遺伝子機能阻害物質を探索する。本年度は、ヒトcDNAを導入した分裂酵母株の作製が完了し、9,891株から化合物スクリーニング系に適用可能な株として389株(3.9%)を選択した。その他、既に作製していた約5,000個の分裂酵母遺伝子の過剰発現株からも化合物スクリーニングに適用可能な株を115株選択した。特定遺伝子の過剰発現で生育阻害を示す株の中からがん関連遺伝子である翻訳開始因子、細胞内シグナル伝達因子、ユビキチンリガーゼなどを対象とし、微生物培養サンプルを用いた化合物スクリーニングを実施した。抗がん剤の標的分子として注目を集めている翻訳開始因子を対象とした系からは、既知化合物であるが作用としては新規の化合物2種を同定した。その他、低分子量GTPaseのグアニンヌクレオチド交換因子の過剰発現株に対する活性物質を1種、クロマチン制御因子過剰発現株に対する活性物質としてヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤1種を同定した。

4. ミトコンドリア遺伝子における DNA 組換えの機能

(1) Ntg1 タンパク質がコンカテマーの形成に働く(凌、堀^{*2}、吉谷^{*2}、牛^{*4}、吉田)

相同 DNA 組換えは二本鎖切断の形成によって誘導される。前年度、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の複製開始点での二本鎖切断は酸化損傷を認識し、二本鎖 DNA にニックを導入するエンドヌクレアーゼ III のホモログである Ntg1 タンパク質によって形成されることを見出した。今年度は引き続き、相同対合タンパク質 Mhr1 の機能に依存したローリングサークル型複製の開始に必要なとされ、Ntg1 タンパク質により二本鎖切断が引き起こされる mtDNA の複製開始領域の構造について解析を行った。精製した mtDNA の複製開始領域は制限酵素に耐性を示し、一本鎖 DNA を特異的に認識して消化する S1 ヌクレアーゼに高い感受性を示したことから、mtDNA の複製開始点は一本鎖 DNA が露出した特殊な構造を有することが示された。

(2) *In vitro* 単離ミトコンドリア融合による mtDNA の量的変化 (凌、堀^{*2}、吉谷^{*2}、牛^{*4}、吉田)

ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返し、ダイナミックなネットワークを形成する。長年、ミトコンドリア融合が mtDNA の維持にどのように働くかは分かっていない。我々は mtDNA 維持におけるミトコンドリア融合の役割を解明するために、蛍光補完実験系 (BiFC) を用いて *in vitro* でミトコンドリアの融合を観察する実験系を構築した。蛍光を指標とし、融合ミトコンドリアから精製した mtDNA をサザンブロットで検出したところ、ミトコンドリア融合の進行を伴い、mtDNA コピー数が増加することを見出した。

(3) DNA ダメージによって誘導されるミトコンドリア局在のヌクレアーゼ Din7 の発現機構(凌、堀^{*2}、吉谷^{*2}、牛^{*4}、吉田)

DIN7遺伝子プロモーターの解析を行い、プロモーター領域内の 19 bp 配列が DNA 合成阻害剤ヒドロキシウレア処理による転写活性化に必要であることを明らかにした。

^{*1} 研修生、^{*2} ジュニア・リサーチ・アソシエイト、^{*3} 基礎科学特別研究員、^{*4} 研究補助員、^{*5} 協力研究員、^{*6} 訪問研究員、^{*7} 研究生、^{*8} 協力技術員

Microbial metabolites are the precious resource for diverse bioactive agents. A compound with dramatic biological activity should have a specific target in the cell. One of the most important approaches to the target molecule of a bioactive agent is chemical genetics. While classical genetics is based on genetic mutations, chemical genetics starts from a cell-permeable chemical ligand (e.g., inhibitor) and its goal is to identify the binding protein and its function. This laboratory devotes to the basic and application researches aiming at elucidating the molecular mode of action of a variety of bioactive small molecules and developing new therapeutics for the diseases including cancer. In addition to the drug target identification, we are currently working on the mechanisms by which important factors identified as the drug targets in our laboratory regulate posttranslational modifications such as acetylation and nucleo-cytoplasmic transport in the cell.

1. Regulation of protein post-translational modifications such as acetylation

(1) Functional analysis of protein acetylation

As a result of screening for the novel acetylated proteins, Aha1, a cochaperon of Hsp90 and cortactin, an actin-binding protein, were identified. The sites of acetylation of these proteins and the enzymes responsible for acetylation and deacetylation were determined. Interestingly, acetylation inhibited the binding between Aha1 and Hsp90, resulting in suppression of a cochaperon activity of Aha1. Furthermore, acetylation decreased the actin-binding activity of cortactin, resulting in suppression of cell motility. In addition, several novel acetylated proteins in the mitochondria were identified as substrates of mitochondrial HDAC, SIRT3, by affinity purification using anti-acetylated lysine antibodies with the mitochondria fraction from stable SIRT3 knock-down cells.

(2) Development of fluorescent indicators for protein acetylation in living cells

Histone acetylation dynamically regulates the change in chromatin structure. To detect the spatial and temporal dynamics of histone acetylation, we developed a FRET-based indicator. In this fiscal year, we tried to develop a fluorescent indicator specifically visualizing acetylation of histone H4K12.

(3) The fission yeast modicomome.

We have established a methodology to purify tagged proteins in a high-throughput manner from *S. pombe* strains expressing FLAG₂-His₆-tagged ORFs. Using several modification-specific antibodies against the set of purified proteins, we can analyze several posttranslational modifications of proteins at once, which will allow to compare multiple posttranslational modifications of proteins at the proteome level.

(4) Design and evaluation of novel HDAC inhibitors

In the past years, we have discovered several specific HDAC inhibitors from natural sources. HDAC inhibitors are expected to be therapeutic drugs against diseases caused by epigenetic abnormalities. In collaboration with synthetic organic chemists including Kyushu Institute of Technology, Tokyo University, and Nagoya City University groups, we designed and evaluated the inhibitors with novel structures. As a result, thioether was identified as a novel ligand of the HDAC inhibitors.

2. Mechanism of nucleo-cytoplasmic transport

(1) Global analysis of nucleo-cytoplasmic shuttling proteins using the localizome

The fission yeast SPAC328.01c gene encodes a protein homologous to an exportin Msn5/Kap142 (*Saccharomyces cerevisiae*) or Exportin 5 (mammal). Hereafter, Spac328.01c is named as spMsn5. Disruption of *spmsn5* caused sensitivity to various stresses and overexpression of *spmsn5* affected cell morphology. In order to identify cargo proteins for spMsn5, we screened for proteins whose localizations were altered in the Δ *spmsn5* cells compared with those in the wild-type cells using *S. pombe* ORF-YFP fusion library and identified that 24 proteins localized predominantly to the nucleus in the Δ *spmsn5* cells, whereas those proteins localized to the cytosol in the wild-type cells. These proteins include transcription factors involved in stress response, cytokinesis, and kinases involved in translation under stress conditions.

(2) A regulatory role of nucleo-cytoplasmic transport in organizing microtubule structure

Leptomycin B (LMB) is an inhibitor of Crm1 nuclear export factor. Previously, we found that the LMB treatment induced the formation of an intranuclear microtubule (MT) bundle within the interphase nucleus in fission yeast. Further analysis showed that the LMB treatment caused the depolymerization of cytoplasmic MTs, tubulin accumulation in the nucleus, and the nucleation of the intranuclear MTs in an interphase spindle pole body-dependent manner.

3. Screening and identification of molecular targets for novel bioactive compounds

(1) Mechanism of action of FR901464

FR901464 and its methyl acetal derivative spliceostatin A (SSA) are anticancer agents, which we have shown to cause accumulation and translation of pre-mRNA. SSA binds and inhibits the SF3b complex thereby blocking splicing and causing pre-mRNA accumulation. Because pre-mRNAs have to localize in the cytoplasm to be translated, we postulated that SF3b is involved in the pre-mRNA nuclear retention. We therefore wondered if the branch point sequence, the binding site of SF3b complex, is involved in anchoring of pre-mRNAs in the nucleus. In fact, mutations in the branch point sequence affected translation of pre-mRNA. Furthermore, using the fission yeast genetics, we identified Mlp1 as a protein that suppressed translation of pre-mRNA in the presence of SSA.

(2) Screening for novel anticancer agents and dissection of their modes of action

Using the previously established screening system, we successfully identified several microbial products that possess the ability to inhibit protein SUMOylation. Furthermore, gliotoxin that had been identified as a novel inhibitor of histone methylation in the last year, was shown to inhibit both histone H3K9 methyltransferases G9a and Suv39, but not Set9, a histone H3K4 methyltransferase.

(3) Analysis of modes of action of small molecules by chemical genomics

Affinity purification using a chemically modified small molecule is generally useful for the identification of its target

molecules. However, this approach is not always successful, because chemical modifications sometimes impair biological activity, and the physical interaction between a small molecule and the target molecule is not always robust. To overcome the potential difficulties, we constructed a novel system based on the genetic interaction using the ORF expression library of *S. pombe*. This system generates a chemical genomic profile as to which strain shows altered sensitivity to a particular small molecule, which provides information about chemical genetic interactions between a small molecule and all gene products. The acquisition of the chemical genomic profiles for 10 small molecules with known targets was completed, and we could demonstrate that the profiles were useful for identifying the genes encoding target proteins or the proteins involved in the target pathway. Another screening system was constructed using a temperature-sensitive mutant collection (1,015 strains) gifted from the Prof. Yanagida, and identified ~100 strains that show chemical genetic interactions with an HDAC inhibitor TSA.

(4) Screening for compounds that control human disease-related genes using yeast chemical genomics

We have developed a uniform and efficient platform to screen for specific inhibitors of various gene products that cause growth arrest when overexpressed in fission yeast. A specific inhibitor is expected to restore the growth arrest by gene overexpression. We introduced 9,891 human cDNA clones into the fission yeast cells and identified 389 genes that caused lethality when overexpressed. We identified chemical compounds that recovered the lethality of a tumor-relevant translation initiation factor, a guanine nucleotide exchange factor, and a protein involved in chromatin regulation.

4. The roles of DNA recombination in mitochondrial inheritance

(1) The Ntg1 protein recognizes an unusual DNA structure at a replication origin (*ori5*) in mtDNA and causes the double-stranded breaks.

Genetic recombination is induced by a DNA double-stranded break (DSB). Last year, we revealed that an oxidative DNA damage base excision repair enzyme, Ntg1, which causes nicks in oxidatively damaged double-stranded DNA, induces DSBs at *ori5* in mtDNA. The Ntg1-introduced DSBs are required for the initiation of Mhr1-dependent rolling-circle-type mtDNA replication. We have continued to investigate the structure of the *ori5* region responsible for the Ntg1-introduced DSBs. The *ori5* region in mtDNA extracted from mitochondria is resistant to single-cut restriction enzymes, but more sensitive to S1 nuclease, which digests the exposed single-stranded regions in double-stranded DNAs. These results suggest that the *ori5* site contains an unusual DNA structure with more single-stranded regions and the Ntg1 protein causes DSBs by introducing the nicks to complementary single-strands at the *ori5* site.

(2) An increase in mtDNA copy number promoted by *in vitro* mitochondrial fusion

Mitochondrial fusion and fission repeatedly occur and form dynamic networks during cell cycles. The relationship between mitochondrial fusion and mtDNA maintenance has remained unclear. To gain further insight into the mechanism of how mitochondrial fusion contributes to the maintenance of mtDNA, we constructed a system to observe *in vitro* mitochondrial fusion by using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). By using the fluorescence as an indicator of fused mitochondria, we found that mitochondrial fusion leads to an increase in the mtDNA copy number.

(3) Mechanism of DNA damage-induced expression of *DIN7* that encodes a mitochondrial nuclease.

Gene expression of *DIN7* is induced by hydroxyurea (HU), a DNA synthesis inhibitor. The promoter analysis revealed that a 19-bp sequence located in the *DIN7* promoter was responsible for the HU-induced expression.

Staff

Head

Dr. Minoru YOSHIDA

Members

Dr. Feng LING

Dr. Yoko YASHIRODA

Dr. Akihiro ITO

Dr. Akihisa MATSUYAMA

Dr. Makoto KIMURA

Dr. Saori KOSONO

Ms. Shigeko SEKIDO

Ms. Yumiko KOBAYASHI

Dr. Daisuke KAIDA*¹

Dr. Shinichi NISHIMURA*¹

Dr. Kazuhiro MAETA*¹

Dr. Takuhiro MATSUMURA*¹

Dr. Ryohei FURUMAI*¹

Dr. Hidekazu TAKAHASHI*¹

Dr. Ritsuko ARAI*²

Dr. Nobuyuki KOBASHI*²

Dr. Yasushi TAKEMOTO*²

Dr. Tomonori NISHINO*²

Dr. Atsuko SHIRAI*²

Dr. Rong NIU *⁴

Ms. Yumi KAWAMURA*³

Mr. Atsushi HASHIMOTO*⁴

Ms. Megumi TAKASE*4
Ms. Satoko MAEDA*4
Ms. Ayako YOSHITANI*5
Ms. Akiko HORI*5
Mr. Isao FUKUDA*5

*1 Special Postdoctoral Researcher *2 Contract Researcher *3 Contract Technical Scientist *4 Contract Technical Assistant *5 Junior Research Associate

Visiting Members

Dr. Hiroshi TAOKA (JBIC)
Ms. Reika OKAMOTO (JBIC)
Ms. Kaoru CHURO (Science Service, Inc.)
Dr. Tadahiro SHIMAZU (Fac. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)
Dr. Chor Wai LO (Fac. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Trainees

Ms. Tamaki ITO (Fac. Biosci. & Biotech. Univ. Saitama)
Ms. Yuko ARITA (Fac. Biosci. & Biotech. Univ. Saitama)
Mr. Masanari TAKAHASHI (Fac. Eng. Tokyo Denki Univ.)
Mr. Hajime NAKAYAMA (Fac. Eng. Tokyo Denki Univ.)
Mr. Shoji OKADA (Fac. Eng. Tokyo Denki Univ.)
Mr. Takashi KURAMOTO (Sch. Agric., Meiji Univ.)
Mr. Saroru SAKAMOTO (Fac. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci.)
Mr. Yasuhiko UNO (Fac. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci.)