

袖岡有機合成化学研究室
Synthetic Organic Chemistry Laboratory

主任研究員 袖岡 幹子 (薬博)
SODEOKA, Mikiko (D.Pharm.)



キーセンテンス：

1. 新規生物活性化合物を創製し、細胞内情報伝達の分子機構の解明とその制御を目指す
2. 細胞死制御分子を創製し、細胞死の分子生物学的なメカニズムに迫る
3. 複雑な構造を有する生物活性分子を効率よく合成するための方法論を新たに開発する

キーワード：

細胞内情報伝達、細胞死、生物活性分子、酵素阻害剤、タンパク質リン酸化酵素、タンパク質脱リン酸化酵素、ガングリオシド、不斉触媒、有機金属化学、天然物全合成

研究概要

当研究室では、有機合成化学を基盤として、1)生物活性物質を効率良く合成する為の新しい反応や方法論の開発、2)新しい生物活性をもつ化合物の創製、3)合成した化合物を用いた生物化学的研究を行っている。研究対象は、遷移金属触媒を用いた不斉反応の開発から、細胞内情報伝達を制御しうる新しい低分子化合物の創製、ならびにそれを用いた生物化学的研究まで幅広い範囲におよぶ。特に、細胞の増殖などに関わるタンパク質リン酸化酵素や脱リン酸化酵素に着目し、その選択的阻害剤の設計・合成を行うとともに、それを用いて標的酵素の生体内での働きを明らかにすることを目指している。また、独自に開発した新しい作用機序をもつ細胞死制御分子をプローブとして用い、未知の細胞死(ネクローシス)のメカニズムの解明を行っている。さらに、糖脂質であるガングリオシドの機能解明をめざしたプローブ分子の創製も行っている。その他、ユニークな生物活性をもつ天然物の全合成にも取り組んでいる。

1. 新規細胞死制御剤の開発と作用機序解明研究

細胞死(アポトーシスやネクローシス)は、分化や増殖と並んで最も重要な生体内イベントの一つであり、厳密に制御されると同時にその異常は様々な疾患の原因となる。本研究では、疾患と関与する細胞死を制御する化合物(細胞死制御剤)を開発し、これを用いて分子レベルでの細胞死誘導機構の解明を目指す。

これまでに当研究室では、カスパーゼを介して実行されるアポトーシスは抑制せず、酸化ストレスによって誘導されるネクローシス様の細胞死を抑制するユニークな低分子化合物IM (Indolylmaleimide) 誘導体を見いだしている。また、このIM誘導体で抑制可能なネクローシス様の細胞死を誘導する化合物としてNT (NecroTrigger) 化合物の開発にも成功している。ネクローシスは、神経変性疾患(アルツハイマー病、パーキンソン病)や虚血性疾患(脳梗塞、心筋梗塞)をはじめとして様々な疾患への関与が示唆されているものの、いまだその分子機構の詳細は明らかになっていない。そこで、本研究ではIM誘導体およびNT化合物の作用機序解明を通じて、そのメカニズムを分子レベルで解明することを目的としている。これまでにIM誘導体およびNT化合物の構造展開とプローブ化を行い、これら化合物がミトコンドリアに直接作用することを明らかにし、ミトコンドリアに存在する結合タンパク質の同定に成功している。現在これら結合タンパク質の機能解析を進めると共に、IM誘導体およびNT化合物の結合部位同定を目指している。

本研究において、細胞死制御剤の細胞内局在や結合タンパク質を明らかにすることは作用機序の解明において重要な命題である。しかしながら既存のタグ分子には様々な問題点があり、最も困難な課題でもある。そこで細胞内局在や結合タンパク質を効率的に調べるための化学的方法論の開拓も目指す。

(1) IM誘導体およびNT化合物結合タンパク質の機能解析(岡崎、姜、倉林、闔、袖岡)

昨年度に引き続き、大腸菌で発現精製したIM誘導体およびNT化合物の結合タンパク質に関して、その変異体を種々作製し、機能解析を行った。その結果、特定のアミノ酸残基が酸化ストレス誘導剤により修飾を受けて、タンパク質の機能が変化することを見出した。さらに細胞にこれらタンパク質に蛍光および発光タンパク質を融合させたものを発現させ、その細胞内での機能を評価する系も構築し、種々の細胞死誘導刺激に応じてこれらタンパク質の変化を見出した。

(2) 生物活性化合物の結合タンパク質および結合部位同定に向けた新規アフィニティー精製法の開発(早水、倉林、浅沼、園園、袖岡)

低分子化合物の結合タンパク質および結合部位の同定を目指し、低分子化合物に導入可能な小さなタグ分子とそのアフィニティー精製法を検討した。昨年度はアルキンタグをコバルト錯体固定化ビーズで精製することを検討し、複雑なペプチド混合物から非常に低濃度のアルキンを有するジペプチドを濃縮・精製することに成功した。本年度はその過程で得られた知見をもとにコバルト以外の金属錯体の固定化とその反応性を検討した。その結果、アルキンとは異なるタグ構造に関して固相上で安定に金属錯体として捕捉できることを見出した。

(3) 生物活性化合物の結合タンパク質および結合部位同定に向けた新規標識法の開発(大金、浅沼、寺山、倉林、山口、園園、袖岡)

低分子化合物の結合タンパク質および結合部位の同定を目指し、新規標識法の開発を検討した。昨年度は無蛍光から蛍光へと変化するO-NBDユニットを用いた新規標識手法の開発を行い、本年度はこれをもとにしてアフィニティー精製法への展開も検討した。またアルキンを足がかりとして、クリック反応で様々な機能性分子を導入し、アフィニティー精製法へと展開することを検討した。その結果、モデルペプチドに対して機能性分子の導入およびアフィニティー精製に成功した。

(4) 生物活性化合物の新規イメージング技術の開発(山越、園園、袖岡;安藤、Palonpon、藤田、河田(阪大工);木下、村田(阪大理);江越、上田(東北大理))

特定の化学構造が持つラマン散乱をもとに、化合物の細胞内局在を調べるイメージング技術の開発を引続き検討した。これまでに、サイレント領域(細胞内の生体成分がラマン散乱を示さない領域)に強いラマン散乱を持つ官能基としてアルキン、ニトリル、重水素などを見出している。中でもアルキンを二つ持つジインは、非常に強いラマンシグナルを持つことが明らかとなっている。本年度はこのジインを導入した分子の開発とラマンイメージングを中心に検討した。その結果ミトコンドリアに集積することが知られているトリフェニルホスホニウム塩にジインを導入することで、ミトコンドリアをイメージング可能なラマンプローブMitoBADYを開発することに成功した。さらにアルキンをタグとするラマンイメージングのその他の試料への適用の可能性についても検討を行った。

2. 細胞内情報伝達酵素の活性を制御する低分子化合物の創製

当研究室では、これまでになかった生物活性分子、特に細胞内でタンパク質の翻訳後修飾を制御できる化合物を、天然物や生体分子を元に新たに創製することを基盤として研究を展開している。これら分子のタンパク質レベル、細胞レベルでの活性、結合タンパク質解析を同時に進め、有機分子の構造と機能との相関関係明らかにし、有用分子を提供することを目的としている。

(1) DSP阻害剤RE誘導体の活性向上を目指した構造展開(小嶋、大沼、平井、袖岡)

当研究室ではこれまでに、VHR選択的阻害剤RE12を見出している。今年度は、新たに合成したRE12誘導体のHeLa細胞に対する増殖抑制活性を評価した。その結果、顕著にHeLa細胞の増殖を抑制するVHR阻害剤RE176を見出した。

(2) シアリダーゼ耐性型ガングリオシドGM3アナログの活性評価と機能性プローブへの展開(太田、深澤、大沼、越野、平井、袖岡;宮城(東北薬科大))

当研究室では細胞膜マイクロドメインの構成要素の一つと考えられているガングリオシドGM3の機能解明を目指した、分子基盤を構築しようと考えている。今年度は、これまでに創製したGM3アナログの細胞レベルでの活性評価に取り組み、また結合タンパク質同定に向けた新たな手法やGM3の代謝を追跡するためのプローブ分子の開発にも着手した。

(3) S_N2' 反応を利用した CF_2 連結型2糖ユニットの合成(酒井、平井、袖岡)

昨年度までに、糖骨格に含まれるジフルオロメチレン基に対し、様々な求核剤を S_N2' 反応で効率的に導入する手法を確立している。今年度は、本反応で構築した2糖ユニットの変換反応について検討した。

(4) $CFBr_3$ を用いる新規有機反応の開発(角本、森田、平井、袖岡)

当研究室では、昨年までに $CFBr_3$ を用いるWittig型反応を見出している。その過程で、これまでに報告のない新しい官能基変換法を見出した。本年度は、この変換法の最適化に取り組んだ。

(5) フィサリン類を基盤とした新規生物活性分子の創製と作用機序解析(森田、小嶋、小沢、平井、袖岡)

これまでに、合成と生物活性評価によって、フィサリン類の特徴的な右側構造が作用機序と生物活性に重

要であることを見出している。今年度は、より高活性な化合物の創製、および詳細な作用機序解析を志向し、様々な誘導体合成に取り組んだ。

(6) SUMO化阻害剤スペクトマイシン類の合成研究(野村、平井、袖岡)

SUMO化阻害剤として同定されたスペクトマイシン類の構造活性相関研究に取り組んでいる。今年度は、スペクトマイシンA1の全異性体を合成出来る手法を確立した。

(7) 新規糖脂質グルクロノシルジアシルグリセロール(GlcADG)の全合成(藏本、太田、平井、袖岡)

シロイヌナズナのリピドミクス解析によって見出された新規糖脂質GlcADGの誘導体合成を志向し、収束的なGlcADGの合成手法を確立した。

(8) In-cell NMRに用いる常磁性プローブの合成研究(彦根、平井、袖岡;伊藤、三島(首都大学東京))

昨年度、In-cell NMRに利用可能な改良型ランタノイド錯体の合成に成功した。今年度は、プローブ分子合成の最適化に取り組んだ。

(9) タンパク質メチル化検出法の開発(Barjau、寺山、五月女、袖岡)

眞貝細胞記憶研究室との共同研究として、分子タグを導入したSAM(S-adenosylmethionine)誘導体を用いるタンパク質メチル化反応の検出について検討している。本年度はメチル化酵素METTL10が非ヒストンタンパク質EF1A1のリジン残基をトリメチル化することを見出した。

(10) ヒストンメチル化酵素阻害剤の開発(Barjau、五月女、閼闔、袖岡)

昨年度、天然物ケトシンの構造展開から設計した(±)-PS-ETP-1が天然物に匹敵するヒストンメチル化酵素阻害活性を示すとともに、その細胞毒性が顕著に低減することを見出した。本年度は、更なる構造展開を目指し、キラルETPを合成するための手法を開発した。

3. 生物活性化合物の効率的合成を指向した新規触媒反応の開発研究

触媒反応は、省資源・省エネルギー型の化学合成を実現するための理想的な方法である。当研究室では、合成医薬品を含む様々な生物活性化合物の効率的な合成法開発を目指し、金属錯体を駆使した新規触媒反応の開発に取り組んでいる。具体的には、ゼロエミッションを目指した原子効率の高い次世代反応として、プロトン移動型の触媒反応および様々な分野での用途が期待される含フッ素化合物の新規合成法に関する研究を行っている。

(1) 含フッ素化合物の新規合成法の開発(河村、薄井、江上、袖岡)

当研究室ではこれまでに、銅触媒を用いたオレフィン類の二官能基化を伴うトリフルオロメチル化反応を開発してきた。本年度は、より高度な官能基変換を目的にジエンの1,4-選択的な酸素官能基の導入を伴うトリフルオロメチル化反応を開発した。さらに、レニウムを共触媒に用いることでプロパルギルアルコールを基質とするZ-選択的なトリフルオロメチルエノン類の合成にも成功した。

(2) 遷移金属触媒を用いる新規環化反応の開発(澤村、Bertlett、Basmadjian、五月女、袖岡)

昨年度に引き続き、 α -ケトエステルから生成するキラルエノラート種を用いる触媒的[3+2]環化付加型反応の開発を行い、その基質適用範囲を拡張することに成功した。また、その反応機構について知見を得るために、錯体触媒の結晶化の検討を行い、新規ニッケル-ジアミン錯体の構造を明らかにすることに成功した。

(3) 遷移金属錯体触媒を用いる酸化的不斉反応の開発(Pünner、澤村、五月女、袖岡)

触媒的不斉反応により分子の複雑性を効率的に増幅するために、分子状酸素を用いる酸化的不斉反応の開発にも取り組んでいる。本年度は、ヒドロキシル化、ヘテロカップリング反応の基質適用範囲を拡張するとともに、新規酸化的環化反応を見出した。

Key Sentences :

1. Create novel bioactive compounds to control intracellular signal transductions.
2. Clarify the molecular mechanism of cell death by using novel cell death control molecules.
3. Develop new and efficient methodologies for the synthesis of complex molecules having important biological activities.

Key Words :

intracellular signal transduction, cell death, bioactive molecule, enzyme inhibitor, protein kinase, protein phosphatase, ganglioside, asymmetric catalysis, organometallic chemistry, total synthesis of natural product

Outline

Our laboratory focuses on the following research areas based on synthetic organic chemistry: 1) development of new reactions and methodologies for the efficient synthesis of bioactive molecules, 2) design and synthesis of molecules having unique biological activity, 3) biological researches using these unique molecules as biological probes. Our research interests encompass from transition metal-catalyzed enantioselective reactions to the design and synthesis of intracellular signal transduction modulators and their application to cell biology research. Design and synthesis of selective inhibitors of protein kinases and phosphatases, which are involved in the signal transduction of cell proliferation, aiming for the clarification of the functions of their target enzymes are of particular interest. Clarification of the unknown molecular mechanism of cell death (necrosis) by using our original cell death control molecules is also currently underway. We are also working on the synthesis of ganglioside analogues and several other natural products having interesting biological activities.

1. Development and Mechanistic Studies of Novel Cell Death Control Molecules

Cell death is one of the most important events for multicellular organisms to live in healthy conditions and should be strictly regulated. Abnormal acceleration or suppression of cell death causes various diseases. In this study, we aim to develop cell death control molecules, by which we try to clarify the molecular mechanism of cell death related to diseases.

We have already found that indolylmaleimide (IM) derivatives are selective inhibitors for necrotic cell death induced by oxidative stress. Moreover, we developed NecroTrigger (NT) derivatives as a novel inducer of necrosis. Necrosis was found to play an important role in pathological cell death, for example, in neurodegenerative disorders and ischemia-reperfusion injury. However the molecular basis of necrosis remains to be elucidated. Therefore, using IM derivatives and NT derivatives as biological tools, we intended to clarify the molecular mechanism of necrosis.

Clarification of the binding proteins and cellular localization of cell death control molecules is of key significance in these studies. However, there are various difficulties encountered in their clarification using traditional methods. We are also planning to develop new chemical methods in order to achieve more efficient identification of the binding proteins.

1) Functional analysis of IM- and NT-binding proteins (Okazaki, Kang, Kurabayashi, Dodo, Sodeoka)

By using *E. coli*, we prepared wild or mutant recombinant IM/NT-binding proteins and analyzed their functions. As a result, oxidative stress was found to modify several amino acids and affect their function. Moreover, we established the functional assay system using fluorescent/luminescent fusion proteins expressed in living cells and succeeded in the detection of the changes induced by cell-death-inducing compounds.

2) Development of novel purification methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds (Hayamizu, Kurabayashi, Asanuma, Dodo, Sodeoka)

We explored the purification methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds. In the previous fiscal year, we examined the purification of alkyne-tagged molecules by using cobalt-complex-immobilized beads and succeeded in purification of alkyne-tagged dipeptide from peptide mixture at low concentration. This year, we investigated the preparation and reactivity of other metal-complex-immobilized beads. As a result, we found other combinations of non-alkyne tags and beads-immobilized metal complexes.

3) Development of novel labeling tags for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds (Ohgane, Asanuma, Terayama, Kurabayashi, Yamaguchi, Dodo, Sodeoka)

We explored the novel labeling/detection methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds. In the previous fiscal year, we established a new labeling method by using *O*-NBD unit, which is originally nonfluorescent but becomes fluorescent through the reaction with amine. This year, as an advanced study, we examined the affinity purification based on NBD-unit. Moreover, we tried to develop a new system for purification of tagged peptides using click chemistry.

- 4) Development of a novel imaging method for the determination of cellular localization of bioactive compounds (Yamakoshi, Dodo, Sodeoka; Ando, Palonpon, Fujita, Kawata (Osaka University); Kinoshita, Murata (Osaka University); Egoshi, Ueda (Tohoku University))

We planned to develop a novel Raman imaging method for the determination of cellular localization of bioactive compounds. We previously found the several functional groups, such as alkyne, nitrile, and deuterium, showed strong Raman scattering in the silent region, in which endogenous molecules showed negligible Raman peaks. Especially, diyne was found to show very strong Raman signal. This year, we synthesized and analyzed diyne-containing probes. As a result, by introducing diyne into mitochondria-targeting triphenylphosphonium, we have developed a novel Raman probe "MitoBADY", which can label mitochondria selectively. Possibility of the Raman imaging of other types of materials has also been examined.

2. Synthesis of small molecule modulators of enzymes controlling intracellular signal transduction

This laboratory also focuses on the development of novel biologically-active molecules especially regulators of post-translational modifications of proteins, based on natural products and biomolecules. Evaluation of their biological activities at both protein and cell levels and analyzing their binding proteins would contribute to understanding the relationship between the structure of molecules and their functions.

- 1) Structural evolution of dual-specificity protein phosphatase inhibitors, RE derivatives, for improvement of their inhibitory activity (Kojima, Oonuma, Hirai, Sodeoka)

We have developed the selective VHR inhibitor, RE12. This year, anti-proliferative activity of HeLa cells by newly synthesized RE12 derivatives was evaluated. As a result, RE176 was found to exhibit remarkable effect on HeLa cells among them.

- 2) Biological evaluation of sialidase-resistant ganglioside GM3 analogues and development of the functional probes (Ota, Fukazawa, Oonuma, Koshino, Hirai, Sodeoka; Miyagi (Tohoku pharmaceutical University))

We are addressing the development of molecular basis for clarification of molecular functions of ganglioside GM3, which is thought to be a component of membrane microdomains. This year, evaluation of previously synthesized GM3 analogues at the cellular level and development of new methods to identify binding proteins of GM3 and to trace the metabolism of GM3 was investigated.

- 3) Synthesis of the CF₂-linked disaccharide unit utilizing the unique S_N2' reaction (Sakai, Hirai, Sodeoka)

We have found the characteristic S_N2' reaction of various nucleophiles with difluoromethylene functionality in galactose unit. This year, we investigated the transformations from CF₂-linked disaccharide unit obtained by this method.

- 4) Investigation of a new reaction process using CFBr₃ (Kakumoto, Hirai, Sodeoka)

Last year, we have found the Wittig-type reaction of phosphorus ylide generated from HMPT and CFBr₃. During the course of these investigations, we discovered a new reaction process which would be useful in organic synthesis. This year, optimization of the reaction condition was examined.

- 5) Development of novel biologically-active molecules based on physalins and study of their mode-of-action (Morita, Kojima, Ozawa, Hirai, Sodeoka)

We have shown that right side partial structure of physalins played an important role both in potency of compounds and determination of the mode-of-action, which was clarified by natural and synthetic molecules. This year, further investigations to develop more potent compounds and to clarify the precise mode-of-action of physalins were performed.

- 6) Synthetic studies of a novel SUMOylation inhibitor, spectomycin B1 (Nomura, Hirai, Sodeoka)

We planned to examine structure-activity relationship study of spectomycins, promising candidates as protein SUMOylation inhibitors. This year, we finally established the synthetic methodologies for all stereo-isomers of spectomycin A1.

- 7) Total synthesis of the novel glycolipid, glucuronosyldiacylglycerol (GlcADG) (Kuramoto, Ota, Hirai, Sodeoka)

The convergent methodology toward plant glycolipids, GlcADG was established, which is necessary to prepare various derivatives.

- 8) Synthetic studies of paramagnetic probes for In-cell NMR (Hikone, Hirai, Sodeoka; Ito, Mishima (Tokyo Metropolitan University))

Last year, we completed the synthesis of a modified paramagnetic NMR probe molecule having DOTA scaffold for in-cell NMR. This year, the synthetic method was further optimized.

- 9) Development of chemical strategies to analyze protein methylation (Barjau, Terayama, Sohtome, Sodeoka)

Collaborated with Cellular Memory Laboratory, we have explored a chemical methodology to detect and analyze protein methylations. This year, we successfully identified that a methyltransferase METTL10 trimethylates the lysine residue in non-histone protein, EF1A1.

- 10) Exploring histone methyltransferase inhibitors (Barjau, Sohtome, Dodo, Sodeoka)

Last year, we successfully identified that (\pm)-PS-ETP-1, which was designed from naturally occurring chaetocin, was a potent G9a inhibitor with reduced acute cytotoxicity. This year, we have established the modified synthetic route to provide simple but optically active ETPs.

3. Development of novel catalytic reactions for the synthesis of bioactive molecules

Reflecting the growing importance of environmentally friendly chemical processes, catalytic reactions with high atom-economy have attracted much attention in modern organic chemistry. We have been working on the development of unexplored metal-catalyzed organic reactions, particularly focusing on atom-economical proton-transfer reactions as well as novel reactions for the synthesis of organofluorine compounds, as useful organic transformations for the synthesis of complex bioactive molecules.

- 1) Development of novel synthetic method for fluorinated compounds (Kawamura, Usui, Egami, Sodeoka)

We have developed copper-catalyzed difunctionalizing trifluoromethylation reactions to date. In this fiscal year, we addressed more challenging functional group transformation and developed 1,4-selective trifluoromethylation of dienes via introduction of oxygen functional group. In addition, *Z*-selective synthesis of trifluoromethylated enones was achieved by using rhenium as a co-catalyst.

- 2) Transition metal-catalyzed novel cyclizations (Sawamura, Bertlett, Basmadjian, Sohtome, Sodeoka)

We have continued to develop the formal [3+2] cycloaddition reactions by utilizing chiral nickel(II)-enolate generated from α -keto esters. Furthermore, in order to gain insight into mechanism, we have examined the crystallization of the newly developed catalyst, leading to identify a unique structure of nickel(II)-diamine complexes.

- 3) Synthetic methodologies for oxidative functionalization of small molecules using transition metal catalysts (Pünner, Sawamura, Sohtome, Sodeoka)

In order to efficiently increase the molecular complexity via bond-forming processes, we have recently studied on the development of a new methodology for the oxidative functionalization of small molecules by utilizing transition metal catalysts. This year, we have expanded the substrate scope of catalytic α -hydroxylation and hetero-coupling reactions. We have also found a new catalytic oxidative cyclization reaction.

Principal Investigator

袖岡 幹子 Mikiko Sodeoka

Vice Chief Scientist

越野 広雪 Hiroyuki Koshino

Research Staffs

平井 剛 Go Hirai
闖闖 孝介 Kosuke Dodo
五月女 宜裕 Yoshihiro Sohtome
Joaquin Javier Barjau Vallet
浅沼 三和子 Miwako Asanuma
岡崎 正晃 Masateru Okazaki
姜 文一 Moon-Il Kang
大金 賢司 Kenji Ohgane
森田 昌樹 Masaki Morita
Florian Pünner

Technical Staff

寺山 直樹 Naoki Terayama

Students

早水 健二 Kenji Hayamizu
太田 英介 Eisuke Ota
江越 脩祐 Shusuke Egoshi
酒井 基成 Motonari Sakai
野村 勇作 Yusaku Nomura
深澤 亮 Ryo Fukazawa
薄井 嘉彦 Yoshihiko Usui
小嶋 俊太郎 Shuntaro Kojima
藏本 悠太 Yuta Kuramoto
彦根 佑哉 Yuya Hikone
角本 大樹 Daiki Kakumoto
澤村 美紀 Miki Sawamura
三瓶 悠 Yu Mikame

Christine Basmadjian

Samuel Lee Bartlett

Assistants, Part-timers, Visiting Technicians

日比野 泰男 Yasuo Hibino
齊藤 泉 Izumi Saito
王 秀玲 Xiuling Wang
倉林 克枝 Katsue Kurabayashi

Cooperative members

小沢 正晃 Masaaki Ozawa
河村 伸太郎 Shintaro Kawamura
大沼 可奈 Kana Oonuma

Senior Visiting Scientist

岡本 晃充 Akimitsu Okamoto

Visiting Members

田村 結城 Yuki Tamura
江上 寛通 Hiromichi Egami
佐藤 綾人 Ayato Sato
山越 博幸 Hiroyuki Yamakoshi
山口 卓男 Takao Yamaguchi
宮崎 亜矢子 Ayako Miyazaki
中田 忠 Tadashi Nakata
藤田 克昌 Katsumasa Fujita
土屋 綾子 Ayako Tsuchiya
上田 実 Minoru Ueda
長澤 和夫 Kazuo Nagasawa