

酵母から見えてきたオートファジーの世界 —細胞内リサイクルシステム—

大隅良典

ご紹介ありがとうございました。私は思いもかけず、このたび、基礎科学部門の京都賞という身に余る賞を受けることになりました。生命科学分野では、尊敬する故西塚泰美先生が1992年に受賞されて以来の日本人の受賞だということだけでも、光栄に思うと同時に、身の引き締まる思いであります。

私は元来、実験室で試験管を振ったり、顕微鏡観察をすることが楽しいと思う人間であり、これまで自分の興味に忠実に研究を進めてまいりました。しかし一方で、私自身がまさしく人類の科学の歴史の中にあるということを感じています。私はよく学生たちに向かって、もし私が陸の孤島に住んでいたら、酵母のオートファジーの研究をしたいと考えただろうか、という話をしていました。科学は社会的な存在であり、私が生きてきた時代と切り離すことはできないものだと思います。科学は少数の優れた科学者によって進められてきたという様に思われがちですが、私は、科学とは、人類が総体としてその長い歴史に刻んできた知の体系だと思っています。

ここで、私自身を振り返ってみたいと思います。

私は、1945年、終戦の半年前に生まれ、まさしく日本の戦後の歴史と共に生きてまいりました。兄、2人の姉の4人兄弟の末っ子として生まれました。戦後の食料事情が悪かったこともあって、大変虚弱な幼年期だったようです。母は、戦後まもなく結核にかかり、私が小さかった頃は長く病床にありました。運良く抗生物質が輸入されて、奇跡的に回復することができました。私は、ストレプトマイシンやパスなどの名前だけは、それが何かも知らずに覚えていました。

家の周りには農家が多く、たくさん残されていた自然の中、川や山や浜辺で子ども時代を過ごしました。昆虫採集に夢中になったり、満天の星を見ながら宇宙にもあこがれを持っていました。中高時代はまじめな学生だったように思いますが、高校時代は化学部に所属して、薬品を混ぜては遊んでいました。

私は、父や祖父が大学人であったので、将来、自然科学の研究者になることに関してはハードルが比較的低い状況にありましたが、両親の思いも暗々に影響を与えたと思っています。それに私自身、芸術、文学、そしてスポーツに全く才能がなかったもので、選択枝がいろいろあったわけでもありません。

とはいえ、私が今日あるのは、様々な偶然や人との出会いに導かれた細い細い道のりだったと思います。

私は大学に入るに当たっては、化学に興味を持っていました。しかし、講義を受

けるうちにもう少し若い学問に挑戦できないかという思いに駆られました。さんざん迷った末、新設されたばかりで専攻を決めずに広く学べる、教養学部の基礎科学科に進学することにしました。そこで今堀和友先生に出会い、将来、分子生物学の道に進みたいと強く思うに至りました。

修士時代が分子生物学の黎明期で、セントラルドグマが確立し、遺伝暗号が次々と解明されていく様子を学ぶことができたことも、私にとって大変幸運な巡り合わせでした。初めて取り組んだテーマが大腸菌のタンパク質生合成装置、リボソームの機能解析であり、以来、私の中にタンパク質合成が細胞の基本であるという考えが定着しました。

博士課程では、大腸菌のタンパク質合成を瞬時に止めてしまうタンパク質、コリシンの研究に取り組みました。指導して頂いた前田章夫先生が移られたこともあって、博士課程の2年目から、創設間もない京都大学理学部生物物理学教室に研究の場を移すこととなります。1年後に研究室の2年後輩の萬里子と結婚し、この地、京都での短い生活は、私にとって忘れられない思い出となりました。

翌年には長男が生まれることになり、妻は博士課程を中退し、設立時の三菱化成の生命科学研究所に職を得たのを期に私も東京に戻り、今堀先生のもとで研究を続け、学位を得ました。しかし、なかなか職が得られず、東大農学部で研究生としての浪人時代は妻が生活を支えてくれました。

そして、1974年の暮れに先生の勧めもあって、米国ロックフェラー大学のノーベル賞学者のG. M. Edelmanの研究室に留学することになりました。初めての海外生活は新鮮で楽しいものでしたが、肝心の研究はそれまで扱ってきた大腸菌とマウスのギャップは大きく、勉強不足の私には大変つらい時期となりました。マウスの試験管内受精系を確立したものの、次の展開に確信が持てませんでした。それで、最後の1年には一転して、細胞周期で先駆的な研究がなされている酵母の系で、DNA合成の開始機構をM. Jazwinskiと研究することになりました。随分大きなテーマの変更でしたが、実に、これが私の酵母との出会いとなりました。

酵母は直径がわずか5ミクロンの小さな単細胞生物ですが、お酒をはじめ、様々な醸造に使われ、太古から人類に恩恵を与えてくれている生き物です。一方、この小さな細胞は、私たちの体を構成している細胞の特性をほぼ完全に備えており、生命科学の基本的な問題、複雑な生命現象の解明に大変大きな貢献をしてきた生物でもあります。遺伝学が確立しているなど、様々な研究上の利点を持ち、膨大な情報が蓄積している点でも大変魅力的な研究材料なので、私は既に35年もの間、飽きずに付き合ってきました。

1977年の暮れに、東大理学部植物学教室の安楽泰宏先生に、全く実績のない私を助手として呼んで頂くことになり、帰国しました。安楽先生の研究室のメインテーマは大腸菌の輸送機構でしたが、考えた末、私は酵母の細胞の中の膜、当時は

まだほとんど関心を集めることがなかった液胞膜の問題に取り組むことにしました。

私は競争することが苦手で、人のやらないことをやりたいと常々思っていました。それは今も変わらぬ私の信条です。研究に競争は付きものですが、誰が一番乗りかを競うことに、私はあまり意味を見出すことができません。初めて見る世界が自分の手で広がることこそ、科学者の最も大きな喜びだと私は思っています。

これは酵母細胞の電子顕微鏡像ですが、細胞質には細胞小器官と呼ばれる膜で囲まれた構造が見えます(Fig. 1)。核、小胞体、ゴルジ体などです。この大きな膜で囲まれた構造が液胞です。細胞のかなりの体積を占めています。当時は、細胞のゴミタメと考えられ、ほとんど興味を持たれていませんでした。ロックフェラー大学で核の単離をしていた時に、遠心管の最上部に液胞が真っ白い層として単離されることに気がついたのも、そのきっかけとなりました。

理学部での約10年の間に、液胞がアミノ酸やイオンの輸送V-ATPaseを通じて、細胞内の恒常性に重要な役割をもっていることを初めて示すことができましたし、酵母を何十リットルも培養しては液胞を単離して、ほんのわずかの精製した液胞膜を解析するという地道な仕事でした。

1988年、東大の教養学部の生物学教室に助教授として転出する機会を得て、自身の最小の研究室が立ち上がりました、既に43歳になっていましたので、新しい研究テーマに挑戦する数少ないチャンスだと思いました。就任後初めての教室のセミナーで、酵母の液胞における分解機構を研究の柱にすると話したのを今でも鮮明に覚えています。

本題の酵母のオートファジーの話に入る前に、ここで少し細胞内のタンパク質分解について考えてみたいと思います。生命活動は、基本的にタンパク質という優れた高分子の機能によって支えられています。タンパク質はDNAに書き込まれた塩基配列情報がRNAに読み替えられ、20種類のアミノ酸が決まった配列で結合した直鎖状の高分子で折りたたまれて、固有の立体構造を取って、それぞれの機能を果たします。タンパク質の合成は遺伝子発現の問題であり、分子生物学の王道としてたくさんの研究が今も続けられています。一方、分解は受動的で、それほど重要ではないと長らく思われて、あまり関心を集めてはおりませんでした。しかし、タンパク質が固有の寿命を持って分解されることは、先駆的な研究によって既に分かっていました。

私は、東大の教養学部で、1年生に向けた生物学の講義をこんな問題から始めていました。いくつかの数字を与えて、「君たちがあっと言う1秒間に、体の中で赤血球が何個作られているか計算して下さい」。実に簡単な計算で、毎秒約300万個という答えが得られます。赤血球細胞の中で、酸素を運ぶ役目を担うヘモグロビンという赤いタンパク質は、1秒間に実に10の15乗、1000兆個という数に

なります。私たちは、外から見れば、毎日それほど変化をしているようには見えませんが、2、3ヶ月ほどで体を構成しているタンパク質のほぼすべてが入れ替わっていることは、驚くべき事実です。

私たちは、学校で必須の栄養素の一つとしてタンパク質を習います。毎日食事として摂るタンパク質は、タンパク質として働くわけではなく、構成要素であるアミノ酸にまで分解されて、体内に吸収されて、新しいタンパク質の合成の材料となります。私たちは、1日に約3-400グラムのタンパク質を合成していると考えられています。このことは、同じ量のタンパク質が分解されていることを意味すると同時に、食事のタンパク質から生じるアミノ酸は、この量の合成に遙かに及ばないことを示しています。私たちの体を構成するタンパク質が分解されて生じるアミノ酸が、合成に再利用されていることが分かります。

栄養が枯渇した、いわゆる飢餓状態になると、これはもっと顕著になります。時々新聞を賑わす山や海の遭難で、何日も水だけで生きながらえたという記事に出会います。生体は、自分自身のタンパク質を分解して、必要なタンパク質を作ることによって生きながらえることができるわけです。

自然界では、生物は食べ物がいつも得られるわけではありませんから、飢餓の中でも生き残る機構を獲得することは、生物の進化の重要なことであつたと思われまふ。このようにタンパク質の分解は、生命の持っている本質の一つです。

細胞の中での自分自身のタンパク質の分解機構に関して、今から半世紀以上も前に、ノーベル賞学者のC. de Duveが、動物の細胞分画で分解酵素を含んだオルガネラを発見して、リソソームと名付けました。その後、ロックフェラー大学のグループを中心に、電子顕微鏡を用いて、細胞が自分の細胞質成分をリソソームへ送る経路が明らかにされました。今年も奇しくも、de Duveがその過程を自分(auto)を食べる(phagy)という意味で、オートファジー(autophagy)と名付けて50年の記念すべき年に当たります。ロックフェラー大学留学時に、私はde Duve先生と同じ建物で研究していましたが、その当時、私自身が将来オートファジーを研究することになるとは思いもしませんでした。

その後、長い間、オートファジーは生物学研究の表舞台には登場せず、大きな進展を見ませんでした。その間に、もう一つの細胞内分解経路であるユビキチン/プロテアソーム系が発見され、様々な生理機能の制御に重要な役割を持つことが次々に明らかとなり、分解の重要性が広く認識されてきました。一方のリソソームでの分解のメカニズムは長らく謎のままでした。その理由の一つは、オートファジーは私たちのほとんどの組織器官で見られる現象にもかかわらず、専門的な技術を要する電子顕微鏡でしか検出ができないことであつたと思われまふ。

さて、私自身の話に戻りますが、私は液胞の分解機能を解明したいと考えました。このスライドに見られるように(Fig. 2)、液胞はvacuoleと呼ばれる通り、何

の内部構造も持たない内部が酸性の膜構造で、様々な分解酵素が含まれていることから、リソソームと相同なオルガネラであろうと考えられていました。生体膜は、細胞内を区画化する細胞の最も基本的な構造です。危険な分解酵素を生命活動の場である細胞質から膜で隔離するのは、優れた戦略に見えます。しかし、この膜の内で分解が進むとすると、何をどのような機構で、この膜障壁を超えて運ぶかという問題に帰着します。従って、リソソーム／液胞における分解は、必ず膜の変化を伴うことが必要となります。それが面白さであり、難しさでもあります。

さて、この問題にどこから手をつければいいのか、全くの手探りでした。

私はこの問題に当たって、酵母でいつ劇的な分解が起こるかを考えてみました。酵母は、外界から窒素源が枯渇した時には減数分裂を誘導し、4つの胞子を形成します。この作り替え作業には、大規模な自己の構成成分の分解が必要に違いありません。飢餓が第一のキーポイントです。

液胞は、酵母では唯一、光学顕微鏡下に見ることができるオルガネラなので、私はいつも顕微鏡で酵母を見ていました。蛍光顕微鏡が発達していなかった当時は、酵母の中を光学顕微鏡で見ている人間はそれほど多くはありませんでした。顕微鏡は、一つひとつの細胞が様々なことを語ってくれるので、私は顕微鏡観察を今でも大変大事に思っています。顕微鏡観察が第二のポイントでした。

ある時、液胞内の分解酵素を欠いた細胞を使うと、飢餓下に液胞内に送られたものが分解されずに顕微鏡で見えるのではないかと思いました。幸いなことに、アメリカの遺伝学者E. Jonesが、既に様々な液胞酵素の欠損した変異株を構築し、酵母遺伝子貯蔵センターに寄託していたので、早速手紙を書いてその株を取り寄せ、窒素源飢餓培地に移してみることにしました。

まさしく予想通り、いやそれ以上に、鮮やかな変化を認めることができました。液胞の中に、激しく動き回る球形の構造体が、徐々にたまって行くことを発見しました。運動能のない酵母細胞の中で激しく動き回る構造は、興味深く感動的で、何時間も見続けていました。きっと間違いなく新しい現象に出会うことができたこと、その時確信しました。この観察こそが、その後の私の研究を決定付けることになり、私のオートファジー研究の原点となりました。

その後、馬場美鈴さんの超一流の電子顕微鏡観察により、誰もが否定し難い美しい形態像として、この現象の概要を把握することができました。こうして20数年前に、私たちは酵母のオートファジーの模式図を提示することになりました。液胞がリソソームに比べると遥かに大きいことを除くと、それまで動物細胞で知られていたオートファジーと同じ過程であり、酵母がオートファジーのいいモデル系になることを示しています。

次の、しかも最も重要な展開は、酵母の系の利点を活かして、オートファジー研究に初めて遺伝学を適用できたことでした。オートファジーを分子レベルで理解す

るためには、オートファジーに関わる遺伝変異を見つけ、その過程に関わる遺伝子を見出すことが、最も有効な手段となります。そのためには、まずオートファジーができない不能変異株を取ればいいのですが、オートファジー不能になると細胞がどのようになるか、つまりオートファジー不能株を選び出す方法について、当時は当然何も分かりません。オートファジックボディの蓄積を指標に、不能変異株を取ろうということになりました。変異を起こさせた細胞を培養しては、1個ずつ飢餓培地に移して、オートファジックボディを観察する作業になります。こうして、千数百という細胞の中からただ一つだけ、最初のオートファジー不能変異株が取れ、*apg1* (後に*atg1*に改名)と名付けました。

もっと多数の遺伝子が関わっているに違いないので、もっと網羅的にオートファジー遺伝子が取れないかと思いました。一つだけ取れた*atg1*変異株が示す飢餓条件下に、2日後から死んでしまう性質がオートファジー不能に起因していると仮定して、まず、飢餓下で死にやすい株をたくさん取って、その中からオートファジー不能株を選ぶという方法を取りました。今度は一気に約100個の変異株を分離することができ、遺伝解析の結果、14の遺伝子変異を同定することができました。このように、初めに多数の遺伝子を網羅的に同定することができたことが、その後の研究を進める上で決定的な意味を持っていました。これらの遺伝学的解析は、私の最初の大学院生となった塚田美樹さんの、わずか1年余りのすばらしい仕事の成果でした。

次の課題は、得られていた変異を頼りにオートファジーに関わるATG遺伝子一つずつ単離しては、どんなタンパク質が関わっているかを調べることです。

小さな研究室で15個を相手にすれば、かなりの時間を要すると思われましたが、当時、私立大学にラボを持っていた大隅萬里子の研究室の協力と、折しも酵母の全ゲノムが解読されたことにより、思いの外短時間に、ほぼすべてのATG遺伝子を同定することができました。しかし、どのATG遺伝子も新規の遺伝子で、予想されるアミノ酸配列からその機能を推測することができず、暗中模索の苦しい時期が続いていました。

1996年に一つの転機が訪れました。岡崎市の基礎生物学研究所に教授として異動する機会を得ました。既に51歳になっていましたので、今のように“若い人を教授に迎えよう！”という時代であったら、あり得なかった人事だったのではないかと思います。基礎生物学研究所は基礎研究を推進できる最も恵まれた環境の国立研究機関です。ありがたいことにスタッフを持つことができたので、オートファジー研究では先行していた動物の系を平行して進めようと考え、吉森保氏を助教授に迎えました。野田健司、鎌田芳彰両氏を助手に迎え、翌年には水島昇氏がポスドクとして加わり、次第にポスドクや大学院生も全国から集まり、大きな活気ある研究室になりました。高等植物のオートファジー研究も、大学院生が開始しました。

こうして、基礎生物学研究所の優位さを活かし、ラボを挙げて、オートファジーを合い言葉に酵母、動物、植物の研究を展開するという、世界にも類のない研究室となりました。

研究はいつも直線的に進むものではないもので、その後数年の間に目覚ましい発見が相次ぎました。ここでは詳細を述べる時間ありませんが、*ATG*遺伝子の機能が一気に明らかになる大変実りある時代でした。こうして、*ATG*遺伝子がコードするタンパク質の実体をようやく見ることができた大変エキサイティングな時代でした。これらの成果が一気にオートファジーの研究を表舞台に登場させ、このグラフの関連論文の数が示すように(Fig. 3)、急激な発展を遂げることになりました。

吉森、水島両氏は、その後、これらの成果を元に高等動物の*ATG*遺伝子の解析に着手しました。シロイヌナズナの*ATG*に関する世界に先駆けて解析が進みました。酵母で得られた*ATG*遺伝子が、ほぼ完全に高等動植物にも保存されていることは、オートファジーが真核細胞の出現の初期に獲得された基本的なメカニズムであることを示しています。

酵母のAtg8と相同なタンパク質、LC3に蛍光タンパク質を融合したタンパク質を全身に発現したマウスは、オートファジーの可視化に、Atg5のノックアウトマウスは、オートファジー不能の個体を調べる上で決定的な役割を持ち、それらは世界中の研究室に配布され、多大な貢献をすることとなりました。

このように、酵母に始まったオートファジー遺伝子の同定は、それまでのオートファジー研究の質を一転させました。時代も高等動植物で自由に遺伝子を操作することが可能になり、様々な生物種の細胞や個体で、オートファジーの生理的な役割が解析できるようになったからです。こうして、世界中でオートファジー研究が開始され、オートファジーは単に飢餓を乗り切る役割だけではなく、細胞に有害なタンパク質やその凝集体の除去、ミトコンドリアをはじめとしてオルガネラの品質や量の管理、細菌感染からの防御、胚発生、抗原提示から、様々な病態との関連が明らかになってきました。アルツハイマーに代表される神経変性疾患やガンなどの病態への関わりも、近年、続々と報告されてきています。このように、私たちの研究室からの発信が、国際的な爆発的なオートファジー研究を牽引することができました。オートファジーは細胞の持つ最も基本的な機構なので、今後ますます、様々な生理機能との関連が明らかになるに違いありません。しかし、オートファジーはまだ研究が始まって日が浅い若い研究領域であり、極めて多様なオートファジーの生理機能に関しては、まだまだたくさんの実験がなされる必要があります。今はまだ、眼をつぶったまま、大きな象のいろんな部分を触っては、象について語っている状態に近いかもしれません。

私は、3年前(2009年)に東工大の特任教授となりましたが、私の研究室は一

貫して酵母の系で、オートファジーの分子機構、どのような仕組みでオートファゴソームという膜が細胞質の一部を取り囲んで隔離することができるかに焦点を当て、Atgタンパク質の機能を明らかにする努力を続けています。少し話が専門的になるので、これ以上踏み込まないことにします。この25年もの間、酵母のオートファジーに関わってきて、随分たくさんの方が分かったと思うと同時に、まだまだ基本的な謎がたくさん残されていることを実感しています。

ともあれ、このような膨大な裾野を持つ課題に巡り会えて、私は大変幸せだと思っています。

残りの時間、ここまで述べてきました私自身の歴史から、私なりに思うことを述べさせていただきます。今の季節、京都の最大の魅力の一つは美しい紅葉です。紅葉は、冬を迎えるにあたって葉っぱを落とす前に、光合成のために必要な緑色の葉緑素などのタンパク質を分解し、アミノ酸として幹に回収する際に、分解されずに葉に残った光合成の補助色素が鮮やかに彩る現象です。植物はこうしてタンパク質を分解し、次の春に備えているわけです。これまで述べてきたように、細胞の中でも、オートファジーなどによって見事なりサイクルシステムを作り上げています。生物は貴重な資源をむやみに浪費することはありませんし、分解は新たな新生への必須の過程でもあります。

一方、人類は現在多くの難題を抱えていることを、私自身、大変強く意識するようになりました。東日本を襲った地震と津波、原発事故の生々しい現実、我々の生活の基盤がそれほど盤石ではないことを痛感させられました。地球は大きな物質の循環系を作っています。生物は食物連鎖で互いに深く関わりながら、安定な生態系を形作っています。私たちは、地球が大きな復元力を持っていると信じてきました。

人間の社会も、私が子どもだったつい数十年前までは、人は地域の中で自然と一体となって生きてきました。最近、江戸時代の歴史を知るにつけ、今から2-300年前の東京、即ち江戸は、世界的な大都会でありながら見事なエコ社会を造っていたことを知り、日本の先人が、生産と消費を無駄なく工夫し、心豊かな生活を送っていたことに感動しました。ひるがえって、先進国となった私たちのエネルギーの消費が、一人当たり一年で石油4トンに相当するという現実があります。

産業革命以降、科学と技術の進歩は人間の生活を大きく変化させ、電化製品、プラスチックなど、人間は様々な人工物を作り出してきました。原子力もその最たるものと言えましょう。様々な生産活動をする以上、資源の有効利用と的確な処理の方法を意識し、遠い将来を見据えて、いかに自然に負荷を掛けずに生活できるかについて、生物に学ぶことがあると思っています。

最後に、基礎研究について私なりの考えを述べさせていただきます。なぜ合成の研究に比べて分解の研究がなかなか進まなかったかと言えば、多くの方が、合成に比べ



て分解が受動的でそれほど重要な制御に関わっていないという、漠然とした思い込みがあったからだと思います。私がオートファジーを始めた頃は、研究者の間でもそれって何、と言われることの方が多く、たくさんの説明が必要でした。私は前にも述べましたが、流行の研究は今まさに流行なのだから、それは先人に任せようという精神が科学に大事なのではないかと、特に若い世代の人に言いたいと思います。自分が面白いと思うことを続けることが大切であり、それを可能にするシステムが重要であると思います。

科学はヒトの持っている“ものを理解したい”という活動に他なりません。科学に関わりたいと思う動機は、人それぞれでよいと思います。役に立ちたいということも、大いに動機になるに違いませんが、近視眼的に、すぐに役に立つということだけが強調されて研究の方向性が決まるのは大変危険です。現在、日本は、いや世界中が、効率を求める傾向が強まっています。若い人たちは、早く研究者として確立したいという思いから、今流行のことをやろうとして、研究者として画一的になってしまいがちです。論理的に、とことん問題を突き詰める人も、じっと自然を見つめることから何かを発見できる人もいるはずです。少し回り道したことで、初めて見えて来る世界もあると私は信じています。基礎科学を志す若者がいかに育つ環境を作るかが、私たちに問われていると思います。

オートファジーの研究の展開を例にとっても、現在、オートファジーの研究が病態克服や健康の維持に役に立つ可能性が見え始めて来ました。もちろん、このことは私にとって大変嬉しいことです。しかし、私が研究を始めた時に、将来、病気の解明につながるに違いないと思った訳ではありません。研究は一つの発見を契機に時に大きな展開を見せますし、今日ではそのスピードは大変早いのです。

社会が精神的な余裕を持ち、知的好奇心に溢れ、目の前の経済の論理のみで突き動かされないことが、人類の未来にとっても大切だと思うのです。

私は、25年に亘ってオートファジーの研究を進めてきましたが、その中にもたくさんの壁やドラマがありました。現代生物学は、様々な研究手法を駆使することが必要とされ、到底一人の力で達成できるものではありません。私の研究が大きく展開できたのも、この四半世紀に関わった80人を超えるスタッフ、ポスドク、大学院生、それに技術員の方々の日々の努力のおかげです。私は、うらやまれるほどたくさんの優れた仲間たちに恵まれたことに感謝し、この栄誉を共に分かち合いたいと思います。

これまで研究を進める上でお世話になった諸先生、先輩、東京大学、基礎生物学研究所、東京工業大学、それに文科省の科学研究費のサポートに心から感謝の意を表します。

さらに、これまで私を、両親、兄弟姉妹、息子たちも支えてくれました。とりわけ、私の研究中心のわがままな生活にも関わらず、仕事を持ちながら家庭の仕事を

献身的に進めてくれた妻、万里子に感謝します。

最後に、今日の晴れがましい場を頂きました京都賞の推薦者、選考委員の諸先生方、稲盛財団の方々、そして稲盛和夫理事長に心より厚く御礼申し上げます。本日はありがとうございました。

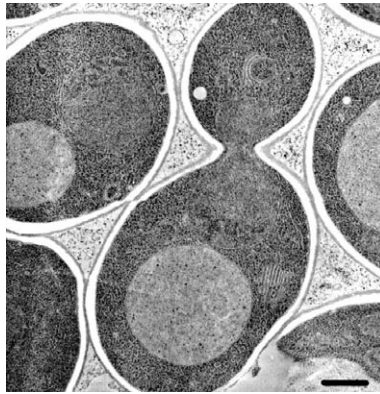


Fig. 1

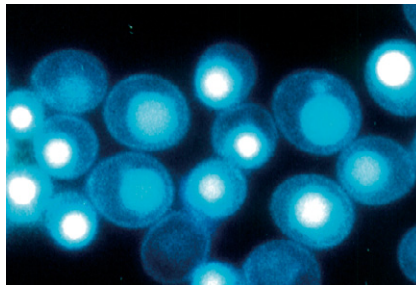


Fig. 2

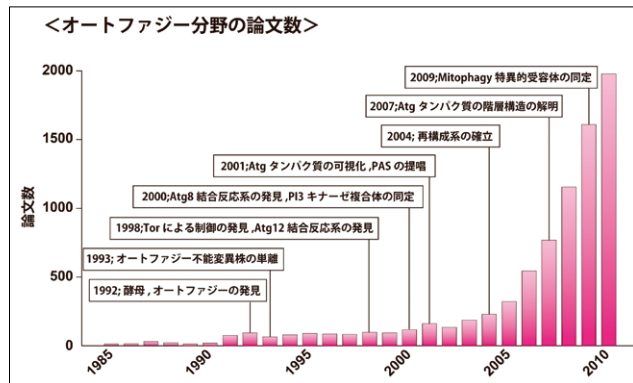


Fig. 3