

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25250024

研究課題名(和文)「個」のゲノム科学を実現するための統合的技術基盤の開発研究

研究課題名(英文) Development of the integrated technologies to analyze genomic bases of individuality

研究代表者

藤山 秋佐夫 (Fujiyama, Asao)

国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・教授

研究者番号：60142311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、一つ一つの細胞や個体を対象としたゲノム研究を可能にするために必要な技術の開発を目標に、トップクラスのゲノムデータ生産能力と情報解析能力を備えた日本を代表する研究組織が実施する計画として立案、実行しました。チンパンジーの親子トリオを対象とした研究から1世代経過時に仔のゲノムに生じる構造変異の種類と頻度を実測できたことと、ニホンザルのゲノム特性についての新たな知見を得ることができたことが本研究の成果です。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to establish technological bases to understand genomic characteristics of individual cell and body. The research group is one of the internationally recognized top-rate genome centers. The major finding of this research project is that the actual mutation rate is measured through large-scale genome analysis of chimpanzee parent-child trio and highly sophisticated bioinformatics. In addition, genomic characteristics of Japanese macaque (snow monkey) has also been decoded including establishment of the new reference genome sequence of the species.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノム解析技術 ゲノム変異 ゲノム構造 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

ゲノム科学及びゲノム情報学は、1990年代に20カ国を超える国際共同プロジェクトとして実施された国際ヒトゲノム計画がその源であり、我が国でも多様な分野の研究者が融合的に研究を行う複合研究領域として推進されてきた(文部科学省科学研究費特定領域研究ゲノム4領域、文部科学省科学研究費新学術領域研究(研究領域提案型)『生命科学系3分野支援活動』等)。2003年のヒトゲノム解読終了宣言以降(1、2)も国際HapMap計画(3)、1000ゲノム計画(4)、ENCODE計画(5)、国際がんゲノム計画(6)、ゲノム10K計画(7)、100K病原体計画(8)等、ヒトを中心に多くの国際プロジェクトが進められており、その成果は医学を含む生命科学の諸分野に大きな影響を与えている。この状況を加速させたのが、NGS(New-Generation Sequencing)と総称されるシーケンス技術と新型シーケンサの相次ぐ実用化である(9)。NGS技術は、生命研究にデータの大規模化と生産速度の高速化、低コスト化、情報の網羅性をもたらすものであり、分野の全体に新たな変革をもたらす可能性が高い。NGSを中核技術とするゲノム科学が、これからの生命科学の研究基盤として大きな役割を果たすことが期待されている。

本申請の研究代表者(藤山)は、1990年に始められた国際ヒトゲノム計画に当初から参加し、その後も世界初のチンパンジーゲノム解読などの成果を上げてきた(10)。また、平成16年度~21年度には科研費特定領域研究「比較ゲノム」の領域代表として活動し、それ以来、ナメクジウオ(11)、ヒメツリガネゴケ(12)、カイコ(13)、ラット(14)をはじめ、多くの進化系統上の重要種、モデル生物、実用上の重要生物種のゲノム構造解読プロジェクトを進めてきた。研究代表者が所属する国立遺伝学研究所は、いわゆるウエット系研究者とドライ系研究者とが共同で研究を行う、わが国を代表する大規模ゲノム研究施設である先端ゲノミクス推進センターを有しており、学術分野における我が国で最大規模のゲノム解読施設となっている。

これまでに報告されてきた完成度が高いゲノム構造情報の大部分は、クローン化や近交化が進んだ結果、均一性が高い(と思われる)ゲノムを持つ生物種に由来している。しかし、こうして得られたゲノム情報が野生生物種集団のゲノム構成をどの程度反映しているかについては、集団そのものを対象とした追加検討が必要である。一方、野生種を対象とする場合には集団のゲノム構造多型を考慮して可能な限り1個体から抽出したゲノムDNAの構造解析を行うことが多いが、その結果と集団全体のゲノム構造多型との関連性とを明らかにするためには、やはり集団を対象とした追加のゲノム解析が必要となる。いずれの場合においても、必要となるのは適当な集団から適当な方法で選別した複数の

個体を対象とする複雑なゲノム構造解析であり、さらには同種の生物ゲノム間の構造変異を精度良く比較し、構造変異の特性と変異部位の両方を同定することができる、統計手法を含む情報解析技術である。個体レベルでの研究においても、組織あるいは器官、さらには個体を構成する個々の細胞の特異性に着目した研究を行う際にゲノム科学の手法を導入することが選択肢の一つとなるが、その場合でも、やはり個々の細胞と細胞集団について同様な問題の生じることが予想される。

そこで本申請では、NGS技術の特徴の一つである大規模データ生産能力がもたらす網羅性と高感度化を最大限に生かし、個々の細胞と細胞(系統)群、あるいは個体と個体(系統)群のゲノムを材料に用いて、上記の問題点を解決するために必要な基盤技術の開発研究を実施した。

<引用文献1>

1. *Nature*, **409**, 860-921 (2001).
2. *Nature*, **431**, 931 - 945 (2004).
3. *Nature* **449**, 851-861 (2007).
4. *Nature* **526** 68-74 (2015).
5. *Nature* 447 799-816 (2007).
6. <https://icgc.org/>
7. <https://genome10k.soe.ucsc.edu/>
8. https://en.wikipedia.org/wiki/100K_Genome_Project
9. 豊田敦、藤山秋佐夫：次世代シーケンサーのシーケンス原理(「新型シーケンサー：目的別解析リファレンス」、鈴木穰、菅野純夫監修)、2012 細胞工学別冊、学研メディカル秀潤社
10. *Science*, **295**, 131-134 (2002).
11. *Nature* **453**, 1064-1071 (2008).
12. *Science*, 319(5859), 64-69 (2008).
13. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38** 1036-1045 (2008).
14. *Nature Genetics* **40**, 560-566 (2008).

2. 研究の目的

本研究は、従来ゲノム研究が主な対象としていた平均化、近交化されたモデル生物集団ではなく、個々の細胞や個体を対象としたゲノム科学研究を可能にする基盤技術の確立を目標に立案した。本研究の成果は今後の生命科学研究推進の基礎となるだけでなく、がん研究、幹細胞研究、育種学研究、進化学研究等、ゲノム情報を必要とする多くの研究分野に広く応用されることが期待される。

「個」のゲノム解析技術開発を進める目的で、チンパンジー親仔トリオ(両親と仔)由来のゲノムDNAを検討材料に用いてゲノム解析システム全体の検討と開発を進め、親子、兄弟等の近縁の個体間や体細胞ゲノム間、さらに野生由来個体のアレル間等で微少なゲノム構造変異を高精度・高感度に検出できる

実用解析システムの確立を目指した。一方、「個」のゲノム解析にもとづいて野生集団のゲノム特性を理解することも重要であるため、本申請の後年度には、異なる地域集団に由来するニホンザル個体のゲノム解読から、ニホンザルさらにはアジア地域マカク属サル類のゲノム特性と進化プロセスに関する洞察を加えるための研究を実施した。

3. 研究の方法

< 研究組織 >

本研究は、研究代表者である藤山が連携研究者の豊田と協力してゲノムデータについての質的量的な検討を行い、研究分担者の伊藤と連携研究者の野口とが連携して進める高度なゲノム情報解析と相互にフィードバックしながら実施した。また、情報解析のうち統計処理の必要な部分と遺伝研スーパーコンピュータの利用が必要な部分については、それぞれ福多賢太郎（国立遺伝学研究所生命情報解析センター博士研究員、現職：情報・システム研究機構データサイエンス共同利用基盤施設ゲノムデータ解析支援センター特任研究員）と辰本将司（情報・システム研究機構新領域融合研究センター特任研究員、現職：自然科学研究機構新分野創成センター特任研究員）が研究協力者として参加した。チンパンジー親子トリオからの血液試料採取は京都大学霊長類研究所の郷 康広（現職：自然科学研究機構新分野創成センター特任准教授）が研究協力者として担当した。ニホンザル及びマカク属サル類個体ゲノム解読に使用した試料は、京都大学霊長類研究所の共同利用研究(2013 - E - 26)として血液試料及び凍結保存組織を入手したほか、東京大学石田貴文教授の協力も得た。BAC ライブラリ構築が必要な場合には、藤山及び研究協力者の黒木（理化学研究所横浜研究所。現職：成育医療センター研究所准教授）が実施する。

本研究は、生命科学の永年の課題であった「個」の問題に、国際レベルのゲノム研究能力を持つグループが大規模ゲノム科学の視点で挑戦するものであり、当グループ以外には実行が困難な研究課題である。

< 研究方法 >

(1) チンパンジー親子トリオゲノム解析

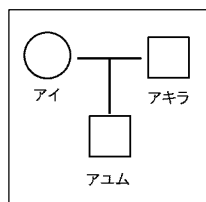
本研究の最終目標は、ヒトのように大型で複雑なゲノムを対象とした統合解析システムの開発であり、医学（がん、遺伝性疾患、幹細胞研究等）や農学（育種、遺伝子資源研究等）等への応用も可能なシステムの実現を目指すものである。そこで、ヒトと同程度に複雑なゲノム構成を持ち、かつ我々自身に十分な研究経験があり、今後も継続的に材料供給が可能なチンパンジーを初期研究対象として選択した。その際、ゲノム解読の対象とする個体を血縁関係が明確な親子（両親と子のトリオ）とすることにより、内在的ゲノム

構造多型に由来する不確定要因を限定的なものとする事ができる。

研究協力者の郷が所属する京都大学霊長類研究所では、ニシチンパンジーを中心に血縁関係の明確な個体群を継続的に飼育しており、長期間にわたる観察データを蓄積している。この中には、我々がゲノム解読に用いた個体（15、16）に加え、本研究に血液試料を提供した親子3個体、アキラ（父）、アイ（母）、アユム（仔）が含まれている。なお、チンパンジー個体からの血液試料採取は京都大学霊長類研究所の「サル類の飼育管理及び使用に関する指針第3版」に従い、許可を得て実施した（許可番号：2010-002、2011-063、2012-014、2012-124、2013-118、2013-175、2014-097）。

実際のゲノム解析は、以下の手順で進めた。まず、次図のチンパンジー親子について、子のゲノムを比較の基準とする。そこで、仔であるアユムのゲノム情報を高度化し、現在のNGS 技術レベルで実用的に到達可能な最高レベルの精度で、ゲノム参照配列を構築する。次に、子のゲノム情報を参照しながら父母のゲノム解読を行い、三者のゲノム情報を比較参照することにより、NGS データの精度及びゲノム構造多型情報の解析精度の両者について、詳細な検討を行う。親子関係を勘案すると矛盾の生じる仔ゲノム中の構造変異部位は、システムエラーであるか父母それぞれのゲノムに生じた配偶子形成の過程もしくは老化に伴う経年変化、もしくは仔の発生・成長過程で新たに生じた変異の可能性等が考えられるため、各ゲノムの対象領域についてPCR産物の直接シーケンス、もしくはライブラリ化クローンの構造解析、もしくはチップ解析等の独立した方法で再現性と精度についての検証を行う。研究開始当初の目標として、数百個以下の構造変異箇所を仔のゲノム中に同定できる程度の精度を実現でき、一般にも広く利用可能なゲノム解析システムを確立することを掲げた。

NGS データの生産には、イルミナ社製



HiSEQ2500 型装置を主に用い、参照ゲノムデータの高精度化には必要に応じて、PacBio-RS 装置およびキャピラリー型シーケンサによる BAC 配列決定を実施することとした。

両親のゲノムについては、データ中に含まれるエラー特性を同一にするため HiSEQ2500 型装置による PE (Paired End) データ (DNA 鎖の両端からそれぞれ 100 塩基) 平均 40X (両アレルとして) 以上を使用することとした。当研究グループは、チンパンジーを含む大型ゲノムのデータ生産と情報処理については十分な経験と装置を有するため、ここまでの段階で問題の生じる可能性は少ないものと予想した。

(2) 仔ゲノム中に新たに出現するゲノム構造変異の検出

ゲノムの各領域が両親のどちらに由来し、それらの機能的な使い分けをゲノムレベルで判別するためには、構造多型を判別するシステムが十分に高感度かつ高精度でなければならない。そのためには、仔ゲノムで新たに検出される構造変異の検出エラー率を情報・統計処理の過程で極小にし、両親のそれぞれに由来するゲノム領域(アレル)についても最大限の分離同定を行いたい。そのために必要なゲノム配列データ量を予測するため、当初 40x 程度のゲノムデータ量を使用し、試行的に配列比較を実施した。当初計画では、両親の各ゲノムデータセットから PE 配列をランダムに取り出し、それを元に仮想的仔ゲノム配列を再構成するシミュレーション実験を行う予定であったが、より現実的な予測結果を得るため、実データを使用することにした。以上により、仔のゲノムで新規に同定した構造変異(両親の配偶子形成過程で生じる変異を含む)や組換え部位を個体特異的に検出できることが期待できる。この段階では、どこまで情報処理と統計処理でエラー率を低減できるかがポイントとなるが、ゲノム情報処理の経験が豊富な研究分担者の伊藤と連携研究者の野口が研究を担当する。また、研究協力者の福多と辰本が、それぞれ統計解析部分と遺伝学研究所スーパーコンピュータを用いた計算を実施する段階で参加し、チンパンジー親子トリオゲノム解析の大部分を担当した。

当初計画では親子間での構造変異率が予想外に高いか、もしくはベンチ実験のエラー率が予想以上に高い場合(0.1%以上)には、マウス等の近交化ゲノムに解析対象を移すと共に、配列データ生産プロセスの見直しを行うことにしていたが、NGS 解析用試料調整時にライブラリの増幅を行わない等の技術改良により、配分予算内で十分に高精度のゲノム配列データを大規模に取得できる見通しがあったため、情報処理の段階で統計処理を徹底し、信頼性の高い頻度予測を行うことで当初目的は達成することができた。

(3) ニホンザルのゲノム解析

「個」のゲノム解析にもとづいて野生集団のゲノム特性を理解することも重要である。このため、野生集団でありながら地域性の高い生活集団を形成しているニホンザルを解析の対象に取り上げた。ニホンザルは数十万年前に大陸から日本列島に渡来した、ある意味では外来生物であり、大陸との往来が遮断された後は日本列島に定住し、環境変動の影響を受けながら本州北端まで生息域を広めている。我が国ではニホンザルを対象としたサル学が世界的にもユニークな展開を示しており、ミトコンドリア解析等の一定の先行研究が行われてきたことも、ニホンザルを対象とする上での有利な点である。また、ニホ

ンザルを含むマカク属サル類は東南アジア地域で最初に分化し、現在に至るまでアジア地域に生息域を広げながら分岐をつづけたと考えられている。近年はヒトに最も近い実験動物として医学・生物学研究に用いられており、アカゲザルについてはゲノム参照配列(RheMac2)が公表されている。以上の背景をもとに、本研究では、まず本州北端から九州に至る4つのニホンザル地域集団から取得した計4個体に由来するDNA試料についてゲノム解読を行い、ニホンザル参照ゲノム配列を構築した。また、アカゲザル以外のマカク属サル類として、カニクイザル、中国産アカゲザル、台湾ザルのゲノムを解読し、これらを総合的に比較解析することでニホンザルさらにはアジア地域マカク属サル類のゲノム特性と進化プロセスに関する知見を得た。

(4) バイオインフォマティクス技術開発
研究分担者の伊藤及び連携研究者の野口は、ゲノム中の多型部位に由来するNGSデータに着目し、アレル別に連続配列を生成できるソフトウェアの開発を進めてきた。本研究ではこの手法を拡張し、システムティックに取得した大規模ゲノム情報をもとにフェージングを可能にするアセンブラ等のソフトウェアの開発を進めた。また、連携研究者の豊田が中心となり、配列データの生産段階で生じるエラー等によるデータ精度の変動を最少に抑えるために必要な大規模シーケンシング手技の開発と検討、適当なゲノム解読プラットフォームの選定と検証とを実施した。

4. 研究成果

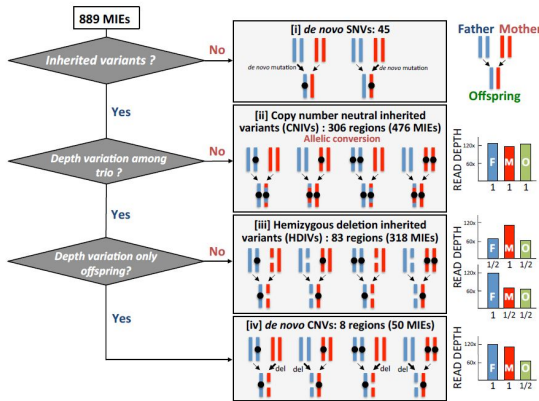
(1) 「個」のゲノムを極める：チンパンジー親子トリオゲノム解析

解析モデルとして、飼育下にある野生由来両親と仔チンパンジー個体を選び、各個体由来のゲノムDNAについて大規模解析を実施した。目的は、() 仔ゲノム中の父由来アレル、母由来アレルの配列を区別可能な情報解析システムを確立し、() 仔のゲノム配列を最大限分別すること、() 仔のゲノムに新たに出現した構造変異部位を検出同定して検証までを行い、1世代あたりの変異率を正確に測定すること、() 仔の細胞における父由来アレル、母由来アレルの発現状況をゲノムワイドに測定することである。

まず白血球由来の高分子DNA約20 µgを各個体から抽出し、イルミナ社HiSeq2500型シーケンサを用いて大規模ゲノムデータを取得した。当初、40Xゲノムのデータ量から解析を開始し、リードのカバー率 > 99.5%で約130x ~ 150Xのゲノム被覆率の配列データを使用する予定であったが、高精度解析に必要なデータ量を検討した結果、最終的に雄親個体から575Gb、194.6X、雌親個体から463 Gb、157.8X、雄仔個体から468Gb、158.3Xのゲノム配列を生産した。これまでにこの深度と精度のゲノム配列

データを基に変異率測定が行われた例はない。
このデータセットから出発し、構造変異部位検出エラーを低減させるための各種のフィルターを工夫してデータ処理を行ない、初期新規変異箇所候補については、さらにPCR/サンガー法シーケンスによる検証を行って最終的な結果を得た。

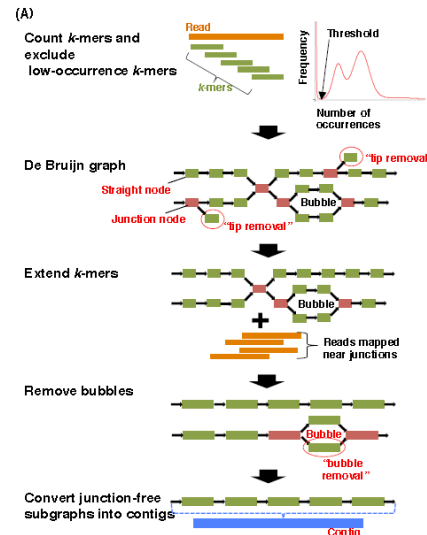
3個体間(と参照配列)で一意的に規定できる共通ゲノム領域内で解析を進めた結果、当初から存在が予想された新規塩基置換部位に加え、遺伝子変換、ヘミザイガス欠失、コピー数変異によると思われる新規構造変異部位を検出できた(論文投稿中のため、数値の詳細は省略した)。



(2)「個」のゲノムを極める：フェージング問題に対するインフォーマティクス技術開発
フェージング問題を解決するための情報技術側からのアプローチとして、研究分担者の伊藤を中心に、アレル間の構造差が大きい(ヘテロザイゴシティの高い)ゲノムの再構築に適用可能なアセンブリプログラムの開発と改良を続けており、実際のゲノム解析に適用して成果を上げている(引用文献17; 発表論文1, 2)。NGSゲノムデータのためにこれまで使われてきた主要なアセンブリプログラムではde Bruijnグラフに基づくアルゴリズムが使われているが、グラフの構造が複雑になるヘテロ性の高いゲノムに適用するためには、バブル処理の段階(次図に示した)とそれに続くスカフォールディングに問題があり、ヘテロ性に関する情報を保持したままで連続性の高いアセンブリ結果を得ることは困難であった。大型ゲノムには適用困難なプログラムも多い。伊藤らが開発したアセンブリプログラム(Platanus)は、設計当初からヘテロ性の高いゲノムから得たNGSデータの高精度アセンブリを目標としている。de Bruijnグラフに基づく点は他のプログラムと同じであるが、K-merサイズの自動伸張など多くの改良が施された結果、Gbサイズのゲノムにも適用可能なものとなっており(17)、さらに構造多型部位や、反復配列、低カバー領域の検出やハプロタイプを導入することで、ヘテロ性の高いゲノムのアセンブリを可能にしている。

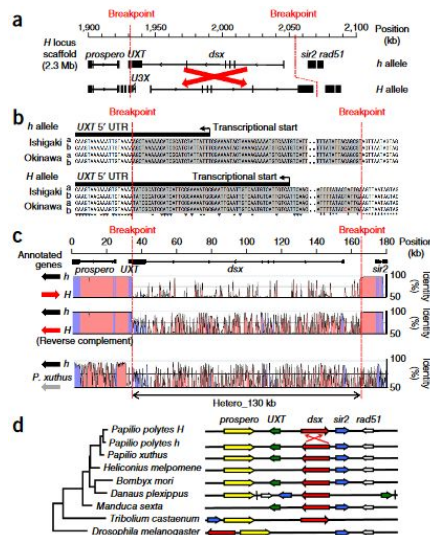
Platanusプログラムに実装されたバブル処理プロセスの略図を次図に示した(発表論文

1)。



Platanus開発の経験を生かし、伊藤らは鱗翅類昆虫、シロオビアゲハが性特異的に示す擬態表現形質発現に関わる遺伝子領域が、シロオビアゲハゲノムの中でも特にヘテロ性の高いゲノム領域に存在することを明らかにし、さらに詳細なゲノム構造を明らかにした(発表論文2)。

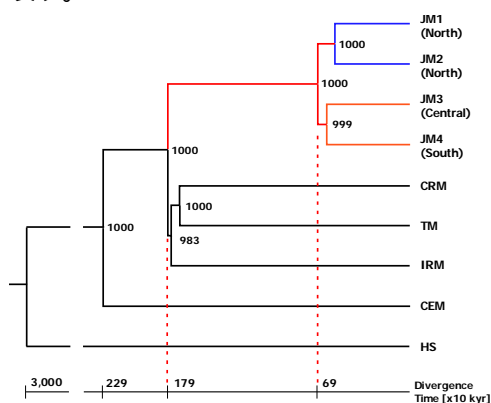
対象領域の構造を詳細に調べ比較検討した結果、擬態性を示す遺伝子領域と(H型)擬態性を示さない領域(h型)が逆位の関係にあり(a)、領域間で変異が蓄積していること(b、c)と、鱗翅類昆虫分岐のかなり古い時代から存在することを示唆する結果が得られている。



(3)「個」のゲノムから集団のゲノム特性を俯瞰する

ニホンザル(*Macaca fuscata*)は、英語でSnow monkeyともよばれ、ヒト以外の霊長類のなかでは生息分布域が寒冷地域に広がる種の一つとして知られている。そのため、南方にすむカニクイザルやアカゲザルに比べると体格が大きく短尾、体毛も多い等の寒冷地適応形質をもつと考えられている。マカク属サル類約20種のうち、ニホンザルはカニクイザル、ア

カゲザル、タイワンザルと同じサブグループに分類されているが、それらの類縁関係については議論のあるところである。一方、アカゲザルは医学・生物学研究用の実験動物として使われており、インド産アカゲザルゲノムの概要参照配列 (RheMac2) も発表されているが、分布域が広いために特定の個体とゲノム特性との関連づけについては注意を要することが提起されている。我が国ではニホンザルを対象とするサル学研究が伝統的に盛んであり、近年では脳機能研究等の実験動物としても使われているため、遺伝特性を議論する際に必要となるニホンザルゲノム参照配列の構築が待たれている。本研究では、ニホンザルゲノム参照配列の構築を進め、併せてカニクイザル、中国産アカゲザル、タイワンザルのゲノム解読を実施した。ニホンザルについては、さらに東北地方、中部地方北部、近畿地方、九州地方由来の4個体についてのゲノム配列データを得ている。現在も解析が進行中であるためデータの詳細は省略するが (福多、論文準備中) おそらくニホンザルでは限られた地域内での繁殖による近交化が進んだ結果、ゲノムのホモ接合性が高まっていることが確認できた。また、タイワンザル、アカゲザル、それらとニホンザルとの交雑種が特定外来生物に指定されて問題になっているが、それらを区別できるマーカ配列の抽出も可能である。また意外なことに、同じく島嶼性の生活域を持つタイワンザルでもホモ接合性が高くなっているが、ニホンザルとの近縁性は中国産アカゲザルと同程度であることがわかった。下図に、我々が得たゲノム配列及びインド産アカゲザル参照配列から作成した系統樹を示す。JM、TM、CRM、IRM、CEM、HSは、それぞれニホンザル、タイワンザル、中国産アカゲザル、インド産アカゲザル、カニクイザル、ヒトを表す。



< 引用文献 2 >

15. *Nature* **429**, 382-388 (2004).
16. *Nature Genetics* **38**, 158-167 (2006).
17. *Genome Research*, **23**, 1740-1748 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文・査読有〕(計2件)

1. Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H,

Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T: Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.*, **24**, 1384-1395 (2014).

2. Nishikawa H, Iijima T, Kajitani R, Yamaguchi J, Ando T, Suzuki Y, Sugano S, Fujiyama A, Kosugi S, Hirakawa H, Tabata S, Ozaki K, Morimoto H, Ihara K, Obara M, Hori H, Itoh T, Fujiwara H: A genetic mechanism for female-limited Batesian mimicry in *Papilio* butterfly. *Nature genetics*, **47**, 405-409 (2015).

〔学会発表〕(計1件)

1. Incorporation of long-read technologies into hybrid-*de novo* genome sequencing strategy: an assessment on PacBio and Moleculo reads: Asao Fujiyama, Masahiro Kasahara and Atsushi Toyoda. (AGBT 2014, 2014年2月12-15日, Marco Island, FL, USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://genome.nig.ac.jp/>

<http://www.bio.titech.ac.jp/laboratory/itoh-kotera/prof.html#itoh>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 秋佐夫 (Fujiyama, Asao)

国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・教授

研究者番号：60142311

(2) 研究分担者

伊藤 武彦 (Itoh, Takehiko)

東京工業大学・生命理工学研究所・教授

研究者番号：90501106

(3) 連携研究者

豊田 敦 (Toyoda, Atsushi)

国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・特任准教授

研究者番号：10267495

野口 英樹 (Noguchi, Hideki)

国立遺伝学研究所・先端ゲノミクス推進センター・特任准教授

研究者番号：50333349

(4) 研究協力者

福多 賢太郎 (Fukuta, Kentaro)

辰本 将司 (Tatsumoto, Shoji)

郷 康広 (Go, Yasuhiro)

石田 貴文 (Ishida, Takafumi)

黒木 陽子 (Kuroki, Yoko)