

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

目 次

重点研究

第1分野

KA11501	エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究	野崎智義 ……	1
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（総合研究報告）	石坂幸人 ……	11
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（平成17年度報告）	石坂幸人 ……	15

第2分野

課題番号

KA21503	HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	21
---------	--------------------------	---------	----

第3分野

KA31504	ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成とその応用	清水則夫 ……	27
KA31505	HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬	高橋秀宗 ……	35

国際研究グラント

SA14801	多剤耐性HIV-1 変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発	満屋裕明 ……	43
SA14802	酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発	木曾良明 ……	49
SA14803	HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析	横田恭子 ……	59
SA14804	多剤耐性HIV-1 の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬場昌範 ……	67
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（総合研究報告）	加藤郁之進 ……	76
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（平成17年度報告）	加藤郁之進 ……	81
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（総合研究報告）	赤川清子 ……	89
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（平成17年度報告）	赤川清子 ……	96
SA14831	エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発	片野晴隆 ……	104

SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤 正 顯 …… 109
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口 雅 文 …… 118
SA24809	細胞性免疫誘導型prime/boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本 直 樹 …… 128
SA24810	CD4+細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森 一 泰 …… 137
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森 亨 …… 144
SA34832	途上国における遺伝子多型に基づいたHIV治療法開発のための基盤整備	岡 慎 一 …… 148

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬

所属 国立感染症研究所 感染病理部

研究者 高橋秀宗

研究要旨 HIV-1 ゲノム RNA の核外輸送を含む複製を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を応用した分子プローブを使って観察し、新規抗ウイルス薬開発の標的としていくことを目的とした。HIV-1 Rev、Gag、宿主 Crm1、topoisomerase I のプローブを作成した。Gag, topoisomerase I については共焦点顕微鏡で FRET を観察することができた。Rev, Crm1 については新しく国産蛍光蛋白質を用いることにより、多細胞数を同時に扱えるフローサイトメトリー解析系を確立することができ、レプトマイシン B による阻害を検出することが可能になった。フローサイトメトリーによる解析は多くの細胞数を処理することができることから、薬剤スクリーニングに有用であると考えられた。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 感染病理部
飛梅実
- (2) 大阪大学微生物病研究所 松田道行
- (3) (株) イムノヘルス ジャパン
森山雅美
- (4) (株) 大道産業 山口靖雄

A. 研究目的

HIV-1 のアクセサリタンパク質の1つである Rev は、HIV-1 ゲノムの Env 上に位置する RRE(Rev response element)配列に結合し、ウイルス RNA を核外へ輸送する。Rev は、宿主細胞に存在する輸送タンパク質 Crm1 と結合し核外輸送を行うことが知られている。Crm1 は importin β ファミリ

ーに属する輸送タンパク質で、核外移行シグナルを持つ Rev と結合する。本研究では、これら複製過程を阻害する薬剤開発の基盤形成を目標に、国産蛍光タンパク質を用いて、生細胞における Rev と Crm1 の細胞内での結合をリアルタイムに検出できるプローブを作成する。また、薬剤スクリーニング系確立のために、作成したプローブの評価には、簡易で大量サンプルのアッセイが可能なセルソーターを解析方法を開発する。

一方、HIV-1 ゲノムにコードされている構造タンパク質 Gag はウイルスの主要構成成分であると同時に、ウイルスゲノム RNA をウイルス粒子内に取り込む役割を担っている。ここで宿主因子である topoisomerase I は、HIV-1 ウイルス粒子中

に取り込まれることが報告されており、またウイルスの複製、特に逆転写過程に重要な役割をしていることが明らかとなっている。

そこで、ウイルスゲノムの核内からウイルス粒子への輸送に topoisomerase I が関与しているかどうか明らかにすることを目的とし、Gag と topoisomerase I との相互作用を FRET 技術により可視化し、観察することも目的とした。

B. 研究方法

① FRET プローブの作成

Rev と Crm1 の FRET プローブ作成には、アマルガム社の蛍光タンパク質 AG (アザミグリーン) と KO (クサビラオレンジ) を、それぞれ FRET のドナータンパク質、アクセプタータンパク質として用いた。

Crm1 には AG を融合し、FRET ドナーとした。プローブとして、Crm1 の N 末 (AG-Crm1) または C 末 (Crm1-AG) に AG を融合させたもの、2 種類を作成した。

一方、Rev には mKO2L (改良型 KO) を融合し、FRET アクセプターとした。KO と mRFP (monomeric Red Fluorescence Protein) のアミノ酸配列を比較したところ、KO の C 末が短いことがわかった。これが、KO のフォールディング効率の低下の原因であると考え、mRFP の C 末 5 アミノ酸とリンカー 5 アミノ酸にあたる塩基配列を PCR プライマーに組み込み、C 末を長くした mKO2L を作成した。Crm1 と同様に、Rev の N 末 (mKO2L-Rev) または C 末 (Rev-mKO2L) に mKO2L を融合したプローブを作成した。

② Rev 及び Crm1 の細胞内局在の観察

ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞を、直径 35mm のガラス底培養皿に播き、上記のプローブをポリフェクトを用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 36 時間後に、観察のため自家蛍光のないフェノールレッド不含の無血清培地に置換した。観察には、倒立型蛍光顕微鏡 IX81

(Olympus 社) に、冷却 CCD カメラ CoolSNAP-HQ (日本ローパー製) を搭載したもので画像取り込みを行った。画像は、メタモルフソフトウェア (日本モレキュラーデバイス社) を用いて解析を行った。各蛍光分子に対応した光学フィルターは、クロマ社の物を用いた。対物レンズは 60 倍の油浸レンズ (Olympus 社) を使用し、メタルハライドからの光を照射した。

③ 恒常活性化型 Ran 共発現時の Rev、Crm1 の細胞内局在の観察

恒常活性化型 Ran は、pCAGGS ベクターを用いた。HeLa 細胞に、上記プローブと恒常活性化型 Ran を共発現させた。トランスフェクション比は、Crm1 : Rev : Ran = 1.5 : 2 : 1 とした。

④ Rev-Crm1 に対する恒常活性化型 Ran の効果の評価

Rev、Crm1 プローブ共発現時、そこへ更に恒常活性化型 Ran を共発現させた場合の FRET 効率の比較検討には、セルソーターを用いた。

⑤ プローブ発現細胞のセルソーターによる解析

ヒト腎臓由来浮遊系 293F 細胞を 6 穴プレートに撒き、上記のプローブを 293 フェクチンを用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 36 時間後に、FACSAria (ベクトンディッキンソン社) に

より解析した。407 nm の固形レーザーにより AG を励起し、AG 由来の蛍光を 480 nm のバンドパスフィルターで、KO 由来の蛍光を 575 nm のバンドパスフィルターで分光したのちに定量した。これらの蛍光強度の比を取るにより FRET 効率を比較した。また、クサビラオレンジ自身の発現量を調べるために、アルゴンレーザーの 488 nm ラインを用いて励起し、575 nm の蛍光を観察した。

今回のような 2 分子 FRET の系では、ドナー及びアクセプター自身の FRET チャンネルへの蛍光の漏れこみを除外し、純粋な FRET を算出する必要がある。そこでまず、AG 及び KO 単独発現細胞を用意し、AG 励起による KO チャンネルへの漏れこみ、KO 励起による KO チャンネルへの漏れこみを補正する係数を算出し、これらの係数を用いて実際に起きている FRET を算出した。

⑥最適な 2 分子 FRET プローブの選定
FRET は、ドナーとアクセプターに相当する AG 融合 Crm1、mKO2L 融合 Rev の距離に依存する。さらに 2 分子 FRET の系においては、ドナーとアクセプターの発現量にも依存する。そこで上記のセルソーターを用いて、AG-Crm1、Crm1-AG および mKO2L-Rev、Rev-mKO2L の 4 種類の組み合わせから、最も効率のよい FRET プローブの選択および最適なドナーとアクセプターの発現比の検討を行った。

⑦LMB 処理細胞の Rev 及び Crm1 の細胞内局在の観察
CRM1-AG、mKO2L-Rev 共発現細胞、およびさらに恒常活性化型 Ran を発現している細胞に対し、レプトマイシン B 処理前、処理後 30 分の細胞内局在を観察した。レプ

トマイシンの濃度は 5 ng/ml を用いた。

⑧セルソーターを用いたレプトマイシン B の効果の検討

CRM1-AG、mKO2L-Rev 共発現細胞、およびさらに恒常活性化型 Ran を発現している細胞を用いた。レプトマイシン B 添加前に、セルソーターにより FRET が目的の細胞で検出できることを確認した。その後レプトマイシンを 5 ng/ml の濃度で添加し、添加後 30 分に再びセルソーターにより FRET が減少しているか検討を行った。

⑨Gag 及び topoisomerase I FRET プローブの構築

HIV-1 Gag および topoisomerase I の細胞内局在および相互作用を解析するため、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現する系の構築を行った。Gag と融合発現する蛍光タンパク質として cyan fluorescent protein(CFP)および yellow fluorescent protein(YFP)を用いた。CFP は、励起波長 433 nm、蛍光波長 475 nm の特性をもち、YFP は励起波長 470nm で、530nm の蛍光を発する。発現ベクターとして β アクチンプロモーターを持つ pCAGGS を用いた。Gag の C 末端 (p6 領域の C 末端) に CFP もしくは YFP を融合させたベクターと、MA(p17)の C 末領域に CFP を挿入したベクターを構築した。

次に、topoisomerase I タンパク質の融合蛍光タンパク質として YFP を用いた。発現ベクターには、上記の Gag-CFP 融合タンパク質発現ベクターと同様に pCAGGS ベクターを用いた。Topoisomerase I の N 末端、C 末端にそれぞれ YFP を融合させたベクターを構築した。

本研究において、PCR によって増幅させ

た遺伝子領域は、すべて塩基配列が正しいことを確認した。

⑩FRET を観察するのに適した条件の検討と細胞内局在の観察

直径 35mm ガラス底培養皿にヒト胎児腎臓由来細胞株 293T 細胞を撒き、37°C で一晚培養し、上記で作成したプローブプラスミドを Fugene 6 (ロッシュ社製) を用いて遺伝子導入を行った。導入後 24 時間後に、観察のために自家蛍光の少ないフェノールレッド不含の無血清培養液に置換した。置換後 2 時間後に、蛍光顕微鏡による観察を行った。蛍光顕微鏡には倒立型蛍光顕微鏡 IX81 (Olympus 社) に冷却 CCD カメラ CoolSNAP-HQ (日本ローパー社) を搭載したものをを用いて、画像取り込みを行った。画像はメタモルフソフトウェア (日本モレキュラーデバイス社) を用いて、解析を行った。

⑪共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内局在と FRET の観察

先述「FRET を観察するのに適した条件の検討」と同様に遺伝子導入した 293T 細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡には LSM510META (カール ツァイス社) を用いた。取り込んだ画像は、LSM Image Browser (カール ツァイス社) を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

特に患者試料の使用や動物実験を行っていない。

C. 研究結果

①Rev 単独発現細胞の観察から、Rev の多

くは細胞質に局在し、一部核小体に存在することがわかった。また Crm1 単独発現細胞においては、Rev 同様に細胞質に多く存在し、一部核膜に局在する様子が観察された。Rev と Crm1 を共発現すると、Crm1 の一部が核小体に局在変化する様子が観察された。

AG と KO の FRET ペアをセルソーターを用いて検出する系は、これまで低分子量 G タンパク質 Ras とその標的分子 Raf で確立している。今回、Rev と Crm1 で同様の実験を行った。その結果、AG 融合 CRM1 と mKO2L 融合 Rev 共発現時に、最も FRET 効率が高かった。またこのとき、AG 融合 CRM1 と mKO2L 単体共発現時には、FRET は起きていなかった。このことは、CRM1 と Rev の特異的な結合を検出しているといえる。

効率のよい FRET プローブの組み合わせを検討した結果、Crm1 の C 末に AG を融合した Crm1-AG、Rev の N 末に mKO2L を融合した mKO2L-Rev が最も良く、各プローブのトランスフェクション比は Crm1 : Rev = 1.5 : 2 が最も適当であった。②Rev、Crm1 そして恒常活性化型 Ran を共発現させても、Rev および Crm1 の局在変化は観察されず、共に細胞質に多く存在していた。このとき、Rev、Crm1 発現時の FRET 効率よりも、更に高い FRET 効率を示す画分が検出された。今回は、恒常活性化型 Ran に蛍光タンパク質を融合していないため、セルソーターで恒常活性化型 Ran の発現している画分のみを抽出し、比較したわけではない。しかしながら、明らかに恒常活性化型 Ran 発現により FRET 効率の高い画分と、低い画分、すなわち

Rev-Crm1 の定常状態レベルの FRET 画分の 2 つを検出することができた。

③CRM1-AG、mKO2L-Rev 共発現細胞では、レプトマイシン B 処理により、Rev が細胞質から核へ局在変化した。一方で、Crm1 の局在は変化しなかった。セルソーターを用いて、レプトマイシン B 処理前後の FRET 効率を比較したところ、陰性コントロールである CRM1-AG、mKO2 発現細胞の FRET 効率まで低下する結果を得ることができた。しかし、恒常活性化型 Ran 存在下においてはレプトマイシン B の効果は検出できなかった。

④プローブの選択と細胞内局在：今回 Gag と topoisomerase I との相互作用を解析するために作成した FRET 用プローブは、Gag の C 末端に CFP を融合した Gag-CFP、Gag の p17 領域の C 末端側に CFP を挿入した Gag-CFP(MA)、topoisomerase I の N 末端に YFP を融合した YFP-topoI、および topoisomerase I の C 末端に YFP を融合した topoI-YFP である。

まず、Gag-CFP(MA)および topoI-YFP 単独で発現させたときの細胞内局在について検討した。その結果、Gag-CFP(MA)は細胞質、細胞膜に多く局在していることが観察され、topoI-YFP は主に核小体を中心として核内に存在することが観察された。

次に、構築したプローブの組み合わせを変えて遺伝子導入を行い、蛍光顕微鏡を用いて FRET の観察を行った。その結果 Gag-CFP(MA)と topoI-YFP の組み合わせが最も FRET が起こりやすいことが示された。また、その発現比は Gag-CFP(MA) : topoI-YFP が 1:5 で遺伝子導入した場合に最も高い FRET 値が得られることが示された。

Gag-CFP(MA)と topoI-YFP を同時に発現させた場合、両タンパクの局在パターンに大きな変化は生じなかったが、細胞膜および細胞膜近傍においてタンパク間の会合を示す FRET が観察された。一方 Gag-CFP と YFP-TopoI を発現させた場合には有意な FRET は観察されなかった。コントロールとして、既に相互作用すると報告されている Gag 同士の相互作用を観察した結果、Gag-CFP(MA)と Gag-YFP の組み合わせにおいて細胞膜で強い FRET が観察された。一方、ネガティブコントロールとして用いた cRaf-CFP と topoI-YFP の組み合わせ、もしくは Gag-CFP(MA)と hRas-YFP の組み合わせでは有意な FRET は観察されなかった。

⑤共焦点レーザー顕微鏡による FRET の観察：今回用いる CFP と YFP による FRET の観察では、共焦点レーザー顕微鏡を用いる場合、CFP 励起波長である 458nm の光を当てることにより、CFP は 500 nm 付近の蛍光を発する。この 500 nm 付近の光は YFP の励起波長に相当することから、CFP と YFP が近接している場合には CFP を励起することで YFP の蛍光を得ることができる。一方、CFP の蛍光は YFP を励起するために消費されるので、観察される光の強さは減衰する。そこで YFP の励起波長である 488nm の光を強く照射する photobleaching により YFP のみを蛍光褪色させると、消費されていた分の CFP の蛍光が検出できるようになり、蛍光が増強したように観察される。

まず Gag-CFP(MA)と topoI-YFP を同時に発現させ、488nm の光で細胞膜近傍を photobleaching したところ、YFP の蛍光のみが褪色することが確認された。そこで photobleaching した領域から放出される光

を分光解析したところ、photobleaching 前では YFP の蛍光である 527nm 付近の波長にピークがあったが、褪色後は 527nm の波長の光は減衰した。一方、CFP の蛍光波長である 500nm 付近の光は photobleaching 後に増強することが示された。以上の結果は Gag-CFP(MA) および topol-YFP が細胞膜付近で FRET が起こっていることを示唆している。

コントロールである Gag-CFP(MA) および Gag-YFP の組み合わせにおいても、同様に photobleaching 後に CFP の蛍光の増強が認められたが、ネガティブコントロールである cRaf-CFP と topol-YFP の組み合わせでは CFP の蛍光の増強はほとんど認められなかった。

D. 考察

AG と KO という国産蛍光タンパク質を用いて、Rev と Crm1 の 2 分子 FRET の系を確立することができた。この系は、フローサイトメトリーで十分な FRET 効率を検出することができた。フローサイトメトリーによる解析は蛍光顕微鏡と異なり、細胞全体の蛍光を検出するため、細胞内の局在情報を取得することはできない。しかし、多くの細胞数を簡易的に解析可能であることから、今後薬剤スクリーニングに非常に有用であると考えられる。また恒常活性化型 Ran を発現させることにより、より高い FRET 効率を示す画分をフローサイトメトリーにより確認することができた。

Crm1-AG、mKO2L-Rev 共発現細胞では、レプトマイシン B の効果が検出された。これに対し、恒常活性化型 Ran 存在下では、レプトマイシン B の効果が検出されなかつ

た。前回報告した CFP(Cyan fluorescence protein) と YFP(Yellow fluorescence protein) を用いた 2 分子 FRET の系より得られた結果から、Rev と Crm1 の複合体は、核内、核膜近辺に多く存在するが、細胞質でも若干結合している。また恒常活性化型 Ran により、Rev、Crm1 そして Ran の 3 者複合体が核内、核膜近辺でのみならず、細胞質でもより複合体を形成しやすい条件である。以上の結果を踏まえ、レプトマイシン B は核内、核膜近辺での Rev-Crm1 複合体の形成は阻害できるが、恒常活性化型 Ran により強固となった細胞質に存在する 3 者複合体を阻害することができないと考えた。

タンパク質間の会合、相互作用を解析する手段として、免疫沈降法が広く用いられているが、細胞を破壊した後で解析するため、細胞内のどこで会合が起きるのか調べることはできなかった。本研究の結果は、主に核内に存在する topoisomerase I が細胞膜近傍で Gag と会合していることを示している。これまでに topoisomerase I は HIV-1 ウイルス粒子中に取り込まれることが報告されており、細胞膜で会合した topoisomerase I が粒子中に取り込まれると推察される。また topoisomerase I の主要な局在部位である核から細胞膜への輸送機構については明らかとなっていないが、topoisomerase I と Gag を含む複合体がウイルスゲノムの輸送、ウイルス複製に関与している可能性も考えられる。本研究の FRET を観察する系は、topoisomerase I の結合もしくはウイルス粒子への取り込みを直接または間接的に阻害する薬剤、分子のスクリーニングに有効であると考えられる。

E. 結論

FRETを応用しHIV-1 Rev、Gag、宿主Crm1、topoisomerase Iのプロープを作成した。Rev、Crm1共に多くは細胞質に存在し、相互の会合は核内から核膜にかけて起きていることが判明した。Gag、topoisomerase Iについても共焦点顕微鏡でFRETを観察することができた。Rev、Crm1は新しく国産蛍光蛋白質を用いることにより、多細胞数を同時に扱えるフローサイトメトリーで解析する系を確立することができ、さらにレプトマイシンBによる阻害を詳細に解析することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T.

Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(3):807-814. 2006

Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, Takahashi H, Tanaka S, Hall WW, Nagashima K, Sawa H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep*, 6(5):452-457. 2005

Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the

Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med.* 2006

Itoh RE, Kurokawa K, Fujioka A, Sharma A, Mayer BJ, Matsuda M. A FRET-based probe for epidermal growth factor receptor bound non-covalently to a pair of synthetic amphipathic helices. *Exp Cell Res.* 307(1):142-152. 2005

Fujioka A, Terai K, Itoh RE, Aoki K, Nakamura T, Kuroda S, Nishida E, Matsuda M. Dynamics of the RAS/ERK map kinase cascade as monitored by fluorescence probes. *J. Biol. Chem.*, Vol. 281, Issue 13, 8917-8926, 2006

Kurokawa K, Nakamura T, Aoki K, Matsuda M. Mechanism and role of localized activation of Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 4):631-634. 2005

Takada E, Shimo K, Hata K, Abiake M, Mukai Y, Moriyama M, Heasley L, Mizuguchi J. Interferon-beta-induced activation of c-Jun NH2-terminal kinase mediates apoptosis through up-regulation of CD95 in CH31 B lymphoma cells. *Exp Cell Res.* 304(2):518-530. 2005

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書
国際研究グラント事業 研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社