

pH・温度ジャンプトリガーによる 結晶相酵素反応の追跡を目指して

神谷 信夫 (かみやのぶお)



所属：理学研究科 物質分子系専攻

専門分野：構造生物化学

趣味：読書と雑学

1. はじめに

私たちは現在、20世紀と21世紀の境界をまたいで生きています。これまでの自然科学の歴史をふりかえってみると、21世紀はまず、数学を含め、19世紀までに蓄積した知識の上に物理学と化学を発展させました。従来から博物学に分類されてきた鉱物学や生物学も、時代とともに物理学・化学の手法を取り入れて大きく変化し、21世紀初頭の現在では、新たな機能を持つ物質を生み出すマテリアルサイエンスと、生命現象の本質を解明して人類の福祉に貢献するバイオサイエンスにつながっています。

19世紀までの鉱物学は、美しい結晶の外形を記述することを主な目的としていましたが、レントゲンにより発見されたX線が容易に物質を透過し、3次元的な回折現象を引き起こすことが判明すると、一躍、結晶内部の物質・分子の化学構造を解明する学問へと進化しました。X線結晶構造解析法は、20世紀初頭の岩塩の構造決定に始まり、それからほぼ100年を経過した現在では、無機物から有機物、タンパク質や核酸などの生体巨大分子まで、あらゆる物質・分子を対象とする最も一般的な化学構造解析法として定着しています。最近では、X線発生装置や回折実験装置、X線検出器やコンピュータなど、主要な装置群が著しく進歩し、また簡単に利用できるソフトウェアも合わせて開発されて、現在では、研究対象の化学構造を知りたいと考える研究者・大学院学生にとって必須の分析ツールとなっています。

一方、生物学の歴史を考えても、ダーウインの進化論も含めてもっぱら分類学の範疇にあったものが、20世紀半ばのワトソン・クリックのDNA 2重らせん構造の発見をかわきりに、現在のバイオサイエンスの土台となる分子生物学を発展させました。ワトソン・クリックの発見は、それまで「生命力」という神秘のヴェールに包まれていた生命現象も、物理学・化学の原理に基づいて説明できることを示した点で画期的な出来事ということができます。一見、非常に複雑に見える生命現象も、現在では、多くのタンパク質・酵素がになう個別の化学反応が、互いに密接に相関したものとして説明されています。

本稿では、既に膨大な研究成果が報告されている酵素を取り上げます。酵素の触媒反応は、

その特徴的な立体構造によって作り出される反応キャビティの中で進行します。分子量が数万をこえる巨大な酵素も、上述したように単なる物質であり、無機物や有機物と同様に結晶化することができます。結晶化すれば、X線結晶構造解析法を適用してその立体構造を決定します。生物学のひとつの分野として最近の20年間に急速に発展した構造生物学では、タンパク質の立体構造に基づいて様々な生命現象を説明できるようになりました。また昨年までの5年間には、生体を構成する膨大な数のタンパク質について、その立体構造を網羅的に決定しデータベース化する「構造ゲノム科学」が世界的規模で展開されました。我々の研究室でもこの流れに参加し多数の立体構造を報告しましたが、ここに来て新たな問題が顕在化してきました。それは、これまでに蓄積した酵素の3次元構造情報は、反応キャビティの骨組みを示しているのみで、それから、酵素が実際に化学反応を進行させている反応中間体の構造を類推するには情報量が不足しているかもしれないという懸念です。我々の研究室では、この問題を解決して「構造ゲノム科学」を、引いてはバイオサイエンスをさらに発展させる一つの方策として、これまでのX線結晶構造解析法に、新たに時間分解能を持たせた4次元解析法を開発しつつあり、本稿では表題の内容も含めて、研究の進行状況を紹介したいと思います。

2. 結晶とは何か

結晶は、あたりまえと思われるでしょうが、基本単位となる単位胞の3次元的な並進です。単位胞の構成要素はひとつの分子であったり、多数の分子が集合したものであったりします。無機化合物のように分子を定義しにくい場合には、特定の化学種あるいはその集合が単位となり、タンパク質や核酸などの生体巨大分子では、分子が多数集合した超分子複合体を単位とする場合もあります。さて結晶の中で単位胞が3次元的並進により積み重なるのは、結晶を構成する分子間に働く様々な相互作用によりますが、無機結晶では共有結合やイオン結合など結合エネルギーの大きいものが主要な働きをしているのに対し、有機結晶やタンパク質結晶では、エネルギーの小さい水素結合やファンデアワールス結合、電価移動結合、などが多数寄与して結晶を維持しています。一方、分子量の増大につれて単位胞が大きくなると、単位胞を積み重ねる相互作用の割合は相対的に低下するため、結晶の固さは、無機結晶、有機結晶、タンパク質結晶の順に減少します。結晶は、ダイヤモンドを例に挙げるまでもなく、その固さと連動して不変なものと考えられがちですが、水晶の α 相と β 相に代表されるように、温度と圧力を大きく変化させると、結晶に固有の相転位を引き起こします。この結晶相転位では、結晶内の分子や化学種の化学的変化ではなく、単位胞を積み重ねる相互作用とその様式の変化、すなわち単位胞の形の単純な切り替えが多く見受けられます。X線結晶構造解析では、その原理上、単位胞はあらかじめ確定していなければならないため、結晶相転位前後の構造をそれぞれ独立に決定することはできても、相転位途中で単位胞が切り替わりつつある中間的構造を時間分割的に追跡することは容易ではありません。

3. 結晶相反応とは何か

化学の世界では、無機化学や有機化学、高分子化学などの分野を問わず、それぞれの反応の場として、多くの場合、溶液状態が選ばれます。これは化学反応を一様に進める上で溶液の流動性が有利に働くためですが、ある種の化学反応は、顕著な流動性は期待できない結晶状態においても進行します。まず最も身近な例としては、光や熱などの外部刺激により結晶の色が変化するフォトクロミズムやサーモクロミズムと呼ばれる現象が挙げられます。例えば分子中の π 電子共役系において、プロトンが移動して共役系の長さに変化すれば、それに伴って吸収スペクトルのピーク位置がシフトして同時に結晶の色が変化します。プロトンの結晶中に占める体積は小さく、短い距離であれば、分子が密につまった有機結晶内でもプロトンの移動は可能となり、その反応過程を時間分割X線構造解析法により追跡できます。ただし、上記の結晶相転位の場合とは異なり、反応の前後とその途中において、結晶はその単位胞を切り替えない、すなわちプロトン移動は、単位胞を積み重ねる相互作用に大きな影響を与えてはならないし、またそれによって生じた空間の増減は、分子の局所的構造変化によって打ち消される必要があります。このような反応は、結晶相転位と区別して、結晶相反応と呼ばれています。

4. 光トリガーによる結晶相金属錯体反応の追跡

結晶相反応の例として、図1に、ジメトキシカルボニルエチルコバロキシム錯体の光ラセミ化反応を紹介します。この錯体結晶の単位胞には、図1左下に化学構造を示したコバロキシム錯体が2分子含まれます。結晶に可視光を照射すると、その内の片方のみで、コバルトに配位したジメトキシカルボニルエチル (DMCE) が一旦解離し、炭素原子の周りの配置が反転する結果、結晶内に2つの対掌体が共存してラセミ化します。図1には構造の変化する分子のみを示しました。まず照射前の錯体構造 (I) を決定した後、光を照射して反応を開始させ、その後10時間にわたり複数の独立なX線回折強度データを測定してそれぞれの

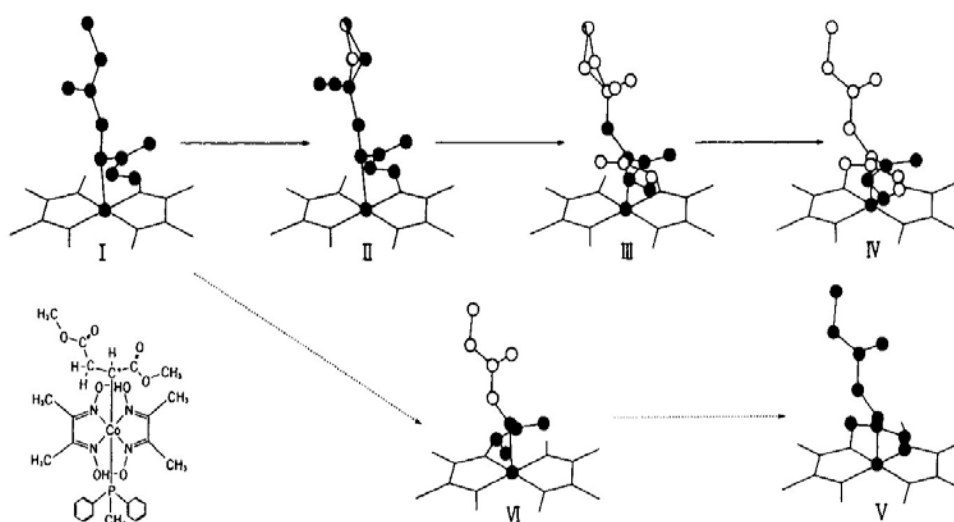


図1 ジメトキシカルボニルエチルコバロキシム錯体の結晶相反応 (植草秀裕、日本結晶学会誌、44、70-74、(2002) より転載)。図中、原子を表す黒丸と白丸では、黒丸の占有率の方が高い。

結晶構造を決定しました。状態 II ではコバルトから離れた位置にある DMCE の上半分で構造が揺らぎ始め、状態 III ではその向きが反転しています。残りの下半分はこの段階で初めて揺らぎ始め、一部反転した構造を確認できます。状態 IV では、DMCE の上半分は既に反転構造に収束していますが、下半分の反転構造の割合は状態 III に比べてなお増加しており、予想される反応生成物の構造 (V) には収束していません。状態 II と III の構造からは、この反応が DMCE の上半分のみ構造を反転させた不安定中間体 (VI) を介して、反応速度の異なる 2 段階で進行することが明らかになりました。また単位胞中の 2 分子の内の片方のみが反応する理由を、それぞれの DMCE が結晶中で占める反応空間の体積を比較して説明することもできました。反応空間は、考察の対象となる部分を結晶構造から取り除き、残りの原子に適当な半径を与えて分子の占める空間を計算し、それを単位胞から差し引いた残りの空間、すなわち考察対象の部分が単位胞内で占めることのできる空間であり、その大小は考察対象部分の動き易さの目安となります。

さてここで、単位胞内の反応空間の意味についてももう少し説明しておきます。複数の分子により単位胞が構成される場合、各分子を取り巻く環境はそれぞれ異なっており、結晶内では、上述した DMCE のように、同じ部分構造に割り当てられる反応空間は微妙に異なることとなります。反応空間の体積が小さいほど、その部分を占める物質は回りの構造との相互作用が多く、より安定化されており、逆に反応空間の体積が大きくなれば、そこに存在する物質の反応性は増大します。この局所的なエネルギーの上昇は、反応空間を占める物質とそれを取り巻いている分子の間の相互作用のエネルギーにより補償されることとなりますが、有機物程度の低分子量の分子結晶では相互作用エネルギーの総和はたかが知れており、大小様々な反応空間を任意にデザインして思いのままに結晶相反応を研究するには原理的な困難を伴うことがわかります。

5. 光トリガーによる結晶相酵素反応の追跡

理想的な結晶相反応は、有機物に比べて遥かに大きな分子量を持つタンパク質・酵素にその例を見いだすことができます。図 2 にロドコッカス菌から単離されたニトリルヒドラーゼ (NHase) と呼ばれる酵素の機能と構造の概略を示しました。NHase は、それぞれ 23kDa の分子量を持つ α 、 β サブユニットの会合体として機能し、ニトリル化合物に水を付加して対応するアミド化合物に変換します。両サブユニットの会合面に形成された非ヘム鉄反応中心は、暗条件下では一酸化窒素 (NO) を配位して顕著な活性を示しませんが、可視光により NO が解離すると、代わりに水を配位して活性化します。不活性型 NHase の結晶構造を図 2 の左下に、非ヘム鉄反応中心の回りの構造を拡大して右下に示しました。鉄の配位子場は、 α サブユニットのポリペプチド主鎖に由来する 2 個の窒素原子、システイン残基に由来する 3 個のイオウ原子、NO の窒素原子から構成されています。3 個のイオウは、チオール、酸素原子が 1 個結合したスルフェン酸、酸素原子が 2 個結合したスフィン酸として、それぞれ異なる酸化状態にあります。大腸菌を利用して α 、 β サブユニットを大量発現させ、3 個ともチオールの形で調製された試料はまったく活性を示さず、それを好気条件に放置する

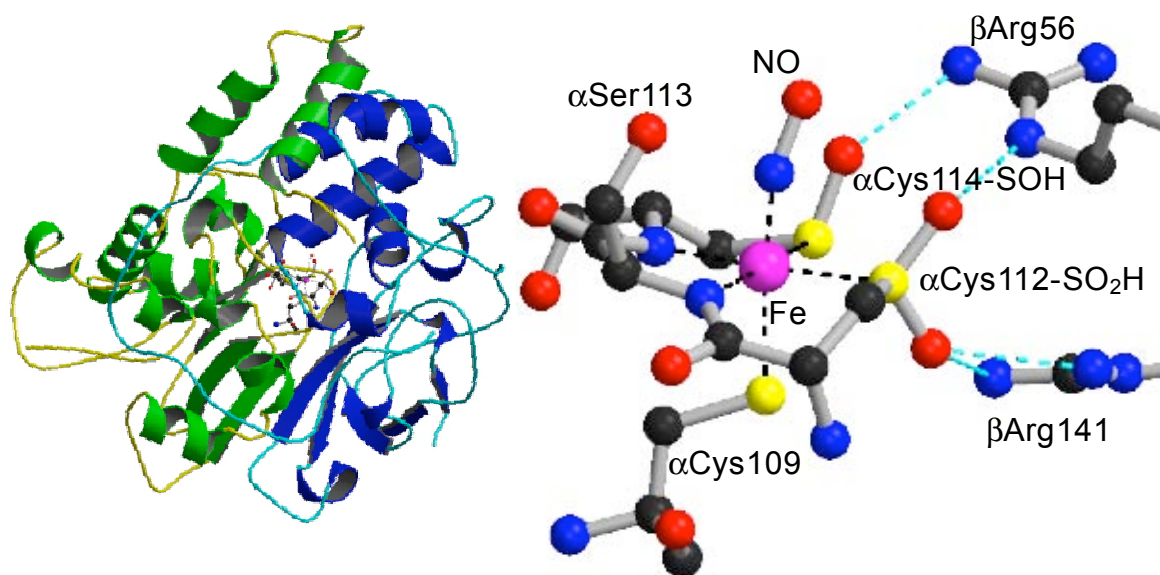
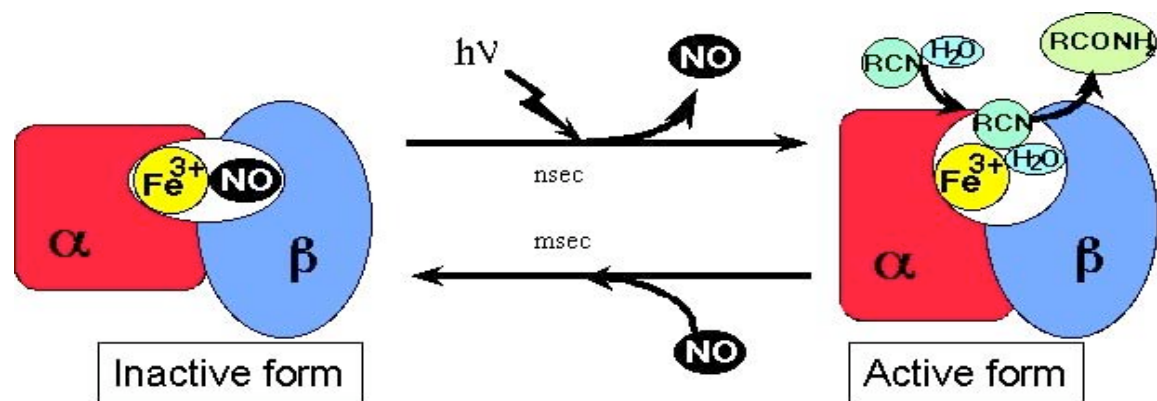


図 2 ニトリルヒドラーゼの機能と構造。図中の黒い点線は錯体結合を、淡い点線は水素結合を示す。

と徐々に活性が増大すること、また活性型 NHase を好気条件に放置するとスルフェン酸の酸化が進み、1 個のチオールと 2 個のスルフィン酸の形態に変化して完全に失活することから、NHase では図に示された特異な酸化状態の反応中心構造においてのみ活性を示すことが明らかにされています。しかしながら、この新規な構造に類似したモデル錯体に関する知見はほとんど蓄積されておらず、NHase の結晶構造のみからその反応機構を議論することは困難であったため、我々は、時間分割 X 線結晶構造解析により、その水和反応を直接その場観察することを計画しました。

結晶相で進行する化学反応を追跡するための系として、分子量の小さい有機結晶より、分子量の大きいタンパク質・酵素の結晶の方が遥かに有利である理由は、図 1 と図 2 のそれぞれの左下に示した分子構造を比較していただければ、即座に理解できるものと思います。小さな有機分子では、結晶内で反応する部分が隣接する分子と直接相互作用しますが、タンパク質は巨大な分子であるため、その反応中心領域は分子間相互作用の領域から完全に分離されています。化学反応が進行すれば、多かれ少なかれ、その際の構造変化が結晶を維持する相互作用に影響しますが、タンパク質・酵素の場合には、その影響を巨大な分子構造により

容易に吸収・拡散させることができます。

NHase の水和反応を追跡するにあたり、我々は本来の基質としてシクロヘキシルニトリル (cH-CN)、基質類似化合物としてシクロヘキシルイソシアニド (cH-NC) を利用しました。図3左は、不活性型 NHase の cH-NC 複合体の結晶について、反応中心回りの電子密度図に構造モデルを重ねて示したものです (試料温度: 90K)。下部中央の鉄原子の直上に配位した NO に対応する歪んだ球形の電子密度と、さらにその上に、cH-NC に対応する電子密度が明瞭に確認できます。枠外にはこの電子密度に重なる cH-NC の構造モデルを示しました。この状態から試料温度を 140K まで上昇させた後、Xe ランプを点灯して結晶に可視光を照射し続け、照射開始から 2 時間経過後、8 時間経過後の構造を、図3中央、右にそれぞれ示しました。この結晶では中央の図と同様、光照射開始後 30 分で cH-NC の電子密度はほとんど見えなくなり、一方 NO の電子密度は、光照射開始後 2 時間までゆっくり減少するとともに、最初の歪んだ形状がほぼ完全な球形に変化しました。基質あるいは基質類似化合物を含まない不活性型 NHase の結晶を試料として光活性化過程のみを追跡した結果から、この電子密度の変化は、光照射により NO が鉄から解離し、代わりに水分子が配位したことに対応していることが分かっています。cH-NC の電子密度が一旦見えなくなるのは、解離した NO 分子が衝突して cH-NC の運動性が上昇したためです。その後 NO 分子が反応キャビティから分子の外へ出ると、cH-NC の電子密度は時間経過とともに上昇し、8 時間後には最初とは異なる形状となって現れました。この電子密度には枠外に示した cH-NC の構造がぴったり当てはまります。すなわち NO が反応キャビティから出ると、cH-NC はそのコンフォメーションを変えてイソシアニド基の先端の炭素で鉄に配位して安定化したことが分かります。生化学的な活性測定から、NHase では cH-NC に対する水付加反応は cH-CN に比べてはるかに遅く、図3右の電子密度とその形状も、この後大きく変化することはありません。一方、本来の基質である cH-CN 複合体の結晶では、一旦ニトリル基の窒素原子が鉄に配位するまでは同様の経過をたどり、さらにその後も追跡を継続すると、cH-CN の電子密度がゆっくり低下しました。これは基質のニトリル基に水が付加し、生成したシクロヘキシルアミドが鉄から外れて反応キャビティの外に出たことを意味しています。

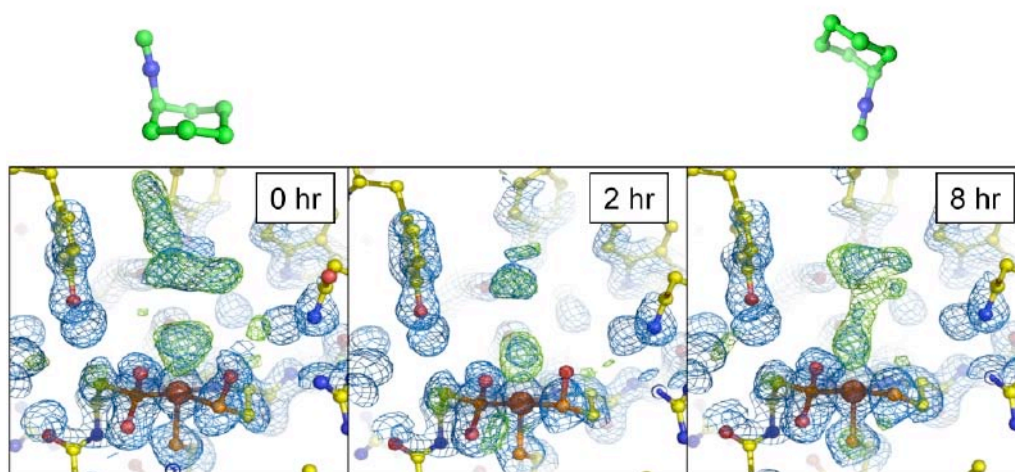


図3 ニトリルヒドラーゼの水和反応。各図の右上には、光照射開始後の経過時間

6. 結晶相酵素反応のための新たな反応開始トリガーを目指して

これまで時間分割X線結晶構造解析の成功例を2つ紹介してきましたが、いずれも光トリガーを利用したものでした。光は、様々な光学素子を利用して、その特性を容易に制御することができ、結晶相反応を開始するトリガーとして非常に優れています。しかしながら、最初に述べた「構造ゲノム科学」により3次元構造が報告された膨大な数の酵素の中で、NHaseのように光トリガーで反応を開始できる特性を持つものは極めて稀であり、時間分割X線結晶解析によりバイオサイエンスの新たな地平を切り開くためには、より一般的な酵素に適用可能な反応開始トリガーが必要となります。

表題の pH・温度ジャンプトリガーは、酵素が高い活性を示す至適 pH と、タンパク質のガラス転移という、2つの酵素に一般的に見られる現象に着目したものです。酵素の触媒作用には、多くの場合、ポリペプチド鎖を構成するアミノ酸残基の内、pH が上昇すると側鎖からプロトンを解離して負電荷を帯びるアスパラギン酸とグルタミン酸、ヒスチジン、逆に、プロトンを付加して正電荷を帯びた状態からプロトンを解離して中性化するリジンとアルギニンの各残基が関係します。酵素活性は、これらのアミノ酸残基が所定の電離状態をとって初めて発現されるものであり、活性状態を実現する上で最適となる pH 条件が至適 pH です。我々が新たに研究対象とした、高度好熱菌に由来する ADP リボースピロリン酸分解酵素 (ADPRase) は、pH6-7 の至適 pH で、亜鉛イオンの存在下、基質となる ADP リボース (ADPR) のピロリン酸結合を加水分解します (図6の右図を参照)。ADPRase は pH4.5 の条件で結晶化し、結晶化後の母液に ADPR を混ぜれば、10-15 時間の間に ADPR が結晶内に侵入して酵素の反応キャビティに結合します。しかしながらこの状態では、結晶内の pH が至適 pH を大きく外れており、また活性発現に必要な亜鉛イオンが存在しないために、反応は全く進行しないこと、この状態の結晶を、亜鉛イオンを含み pH4.7 の高濃度緩衝液に移せば (すなわち pH ジャンプすれば) 反応が始まるものの、それを完結させるには、室温で1時間以上の時間を要することがわかっています。すなわち、数分程度の短時間だけ上記の緩衝液に結晶を浸した後、窒素ガス吹付け低温装置により 90K の温度で速やかに凍結すれば、ほとんど反応が開始されていない状態を固定することができます。

一方、タンパク質のガラス転移とは、150K 前後の温度を境にタンパク質の運動性が著しく変化する現象であり、室温では固体状で流動性がないガラスが高温に加熱すると流動性を示す、文字どおりのガラス転移との類似性にその名前の由来があります。タンパク質は一般に、 α ヘリックスや β シートの2次構造を含み、ガラス転移点を境に2次構造単位の運動性が高まるとされています。こうした知見をふまえ、上記のように pH をジャンプさせた後 90K で固定した ADPRase の結晶について、ガラス転移点を越えて、例えば 170K 程度まで温度をジャンプさせれば酵素反応を開始できるのではないかと考えた訳ですが、効率の良いトリガーを実現するためには、pH ジャンプに用いる緩衝液の濃度や亜鉛イオンの濃度、緩衝液に結晶を浸す時間や温度、温度ジャンプの前後に設定する温度など、多数の条件を詳細に検討する必要があります。

7. タンパク質結晶低温保存装置

図4に、pH・温度ジャンプトリガーの条件検討のために工作技術センターに制作を依頼したタンパク質結晶低温保存装置の概観を示しました。装置は市販の窒素ガス吹付け低温装置（写真上部中央）と試料保存部分から構成されています。窒素ガス吹付け低温装置は、空气中から分離した窒素ガスを、写真の上部中央奥にある断熱圧縮冷却器で液体窒素温度近くまで冷却し、目的温度に加熱した後フレキシブルパイプで試料位置まで搬送します。図4の右に試料保存部を拡大して示しましたが、窒素ガスはノズルの先端から吹き出して試料を一定温度に保ちます。試料は、鉛直軸まわりに回転する回転テーブルに固定した5本の水平回転軸にそれぞれ1つずつマウントされ、その様子は、仰角45°で見上げる顕微鏡により拡大され、CCD画像として左上のノートPCに表示されます。図4のPC画面では、微小な結晶試料を水平回転軸にマウントする際に利用するクライオループ（太さ20ミクロンのナイロン製）が5個映し出されています。なお本装置には、上記とは独立に6番目の回転軸（試料保存部拡大図の右下参照）が用意されており、微小電極の間に置いた試料に電場を引荷したり、電気分解により強制的に結晶中のイオンを移動させるなど、他の実験も合わせて行えるように設計されています。

図5に、本装置を用いた実験結果の一例を示します。ニワトリの卵白には糖鎖を分解する酵素としてリゾチームが含まれていますが、そのリゾチームをpH4.2の条件でから結晶（無色透明）として析出させた後、pH指示薬のメチルレッド（pH4.2からpH6.3の間で赤から黄に変色）で着色しました。リゾチームの結晶は、結晶の内部まで均一に、ピンク色の混じった赤色に染まります。これを1.5分だけpH5.0の緩衝液に移した後、-50°Cで本装置にマウントすると、結晶の表面ではピンク色がやや濃くなりますが、それ以上は変化しません。この様子を、装置の回転テーブルを72°間隔で回転させて5枚の写真を撮影し、図5の左

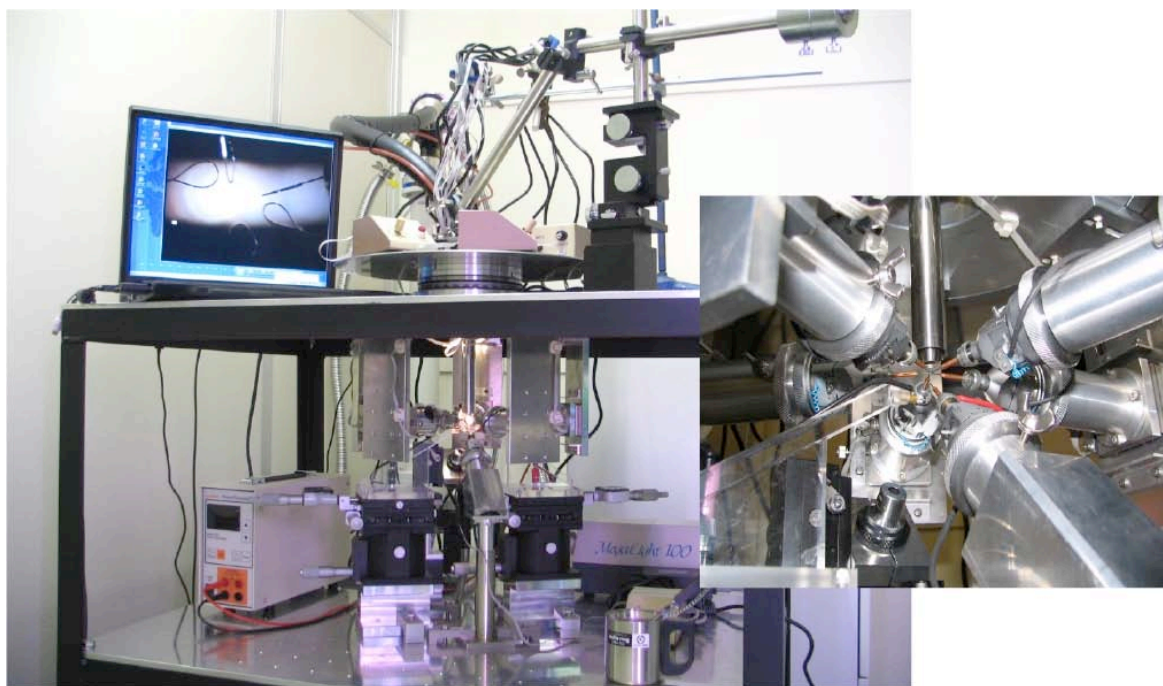


図4 タンパク質結晶低温保存装置。

端のカラムに並べました。本装置では結晶の水平回転軸は固定しておき、代わりに回転テーブルを回転することで、水平回転軸回りの5つの方向から結晶を観察することができます。回転テーブルの鉛直軸に対して顕微鏡の光軸が仰角 45° に設置されているため、結晶には直接触れることなく、結晶を異なる方向からいつも同じ条件で観察することができます。実験では、左端カラムの5枚の写真を-50℃で撮影した後、ただちに保存温度を-20℃に変更しました。その後、図の上部に示した所定の時間だけ保存し、左端カラムと同様に撮影しました。本稿は白黒で印刷されるため読者の皆さんに色の変化を確認していただけないのは残念ですが、結晶の色は、ピンク色がかった赤色から黄色がかったピンク色に変わりました。プロトンが pH4.2 の結晶内部から結晶まわりの pH5.0 の緩衝液に移動した結果であり、-50℃から-20℃への温度ジャンプ後にプロトン移動が加速され、pH・温度ジャンプトリガーが実際に働いたことを示しています。なお、タンパク質のガラス転位に基づく当初の想定に従って、初期温度を 90K (-183℃)、温度ジャンプ後の温度を 170K (-103℃) として、1週間まで観察を続けましたが、プロトン移動の反応速度が遅すぎて、上記のような色の変化を確認することはできませんでした。

結晶 5, -50℃ -20℃, 53min -20℃, 21hr -20℃, 69.5hr -20℃, 150.5hr

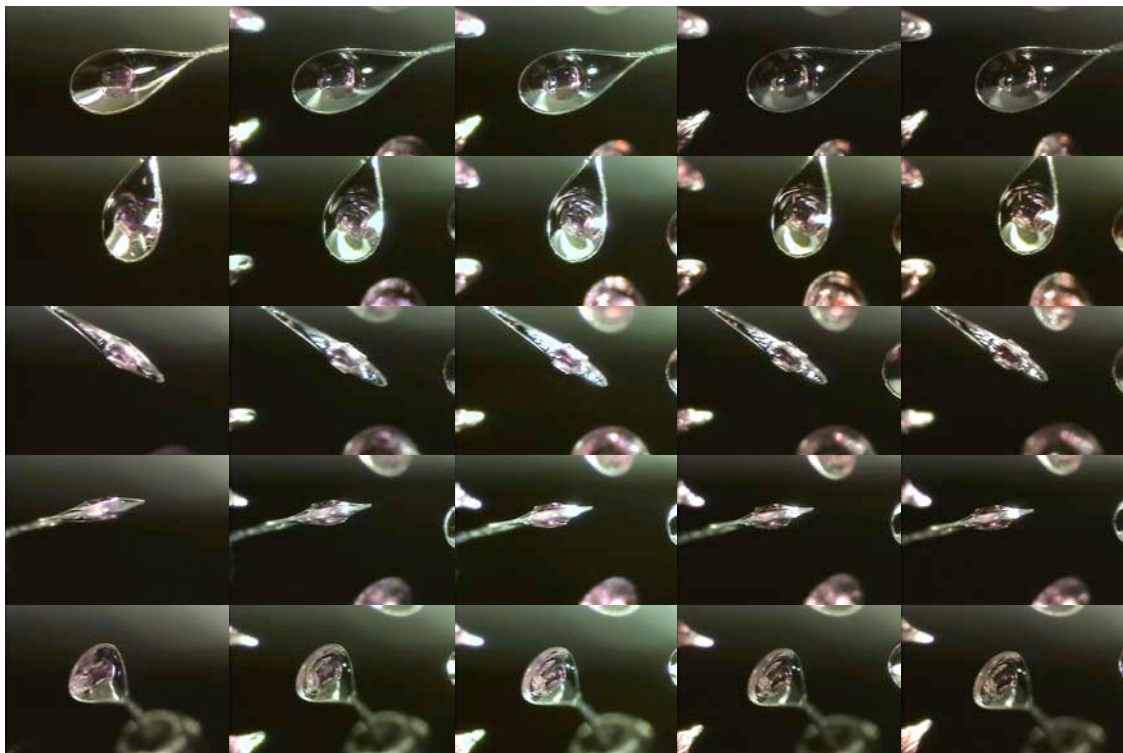


図 5 メチルレッドで着色したニワトリ卵白リゾチーム結晶の保存実験。各カラムを構成する5枚の写真は、タンパク質結晶保存装置のテーブルを 72° 間隔で回転させて撮影した。各カラムの上部には、それぞれの保存温度と保存時間を示す。

8. 亜鉛イオンのソーキングをトリガーとする ADPRase の酵素反応過程の追跡

リゾチームの結晶に対する実験結果は、十分に我々を勇気づけてくれるものでしたが、その後 ADPRase の結晶では、結晶まわりの緩衝液の pH を 4.7 より上げると結晶の X 線回折能が著しく低下すること、また結晶を -20°C に保存しても徐々に結晶が乾燥して X 線回折能を損なうことが判明したため、ADPRase の時間分割 X 線結晶構造解析では pH・温度ジャンプトリガーは適用しないこととしました。代わりに、結晶を移す緩衝液の pH は結晶化条件とほぼ同じ pH4.6 とし、結晶内へ亜鉛イオンのみを浸透させて反応を開始させるクライオトラップ法に切り替えました。この方法では多数の結晶を用意し、室温条件下、それぞれに亜鉛イオンを添加して酵素反応を進行させ、異なる反応時間の結晶を 90K のクライオ温度で固定して、個別に X 線結晶構造解析を行っています。図 6 に結晶構造解析の結果を元にまとめた反応過程を示しましたが、亜鉛イオンは数分で結晶内に入り、ADPR とはコンフォメーションの異なる中間体 (ADPR*) を誘導した後、その亜鉛イオンにより活性化された水分子が、ADPR* を攻撃して AMP とリン酸化リボース (PR) に分解することが判明しました。図 6 の右には、反応開始前の反応キャビティに見いだされた ADPR の構造を示しました。

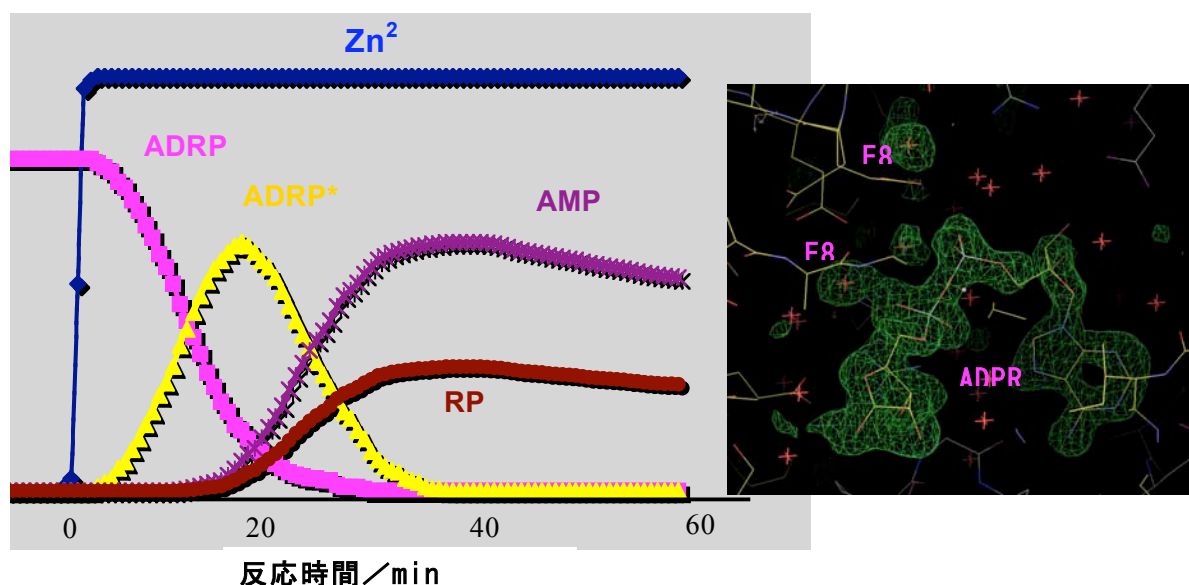


図 6 Zn^{2+} の導入により開始された ADPRase の酵素反応過程。ADPR : ADP リボース、ADPR* : ADPR 反応中間体、PR : リン酸化リボース。

9. おわりに

現在我々の研究室で進めている結晶相酵素反応の時間分割 X 線結晶構造解析について説明させていただきました。新しい反応開始トリガーとして考案した pH・温度ジャンプトリガーの条件を詳細に検討するために、工作技術センターに制作していただいたタンパク質結晶低温保存装置は順調に稼働し、十分にその目的を達成することができました。当初研究対

象とした ADPRase については、試料結晶の特性から、開発した pH・温度ジャンプトリガーを適用することはできませんでしたが、本装置を利用した実験結果をベースにしたクライオトラップ法により時間分割結晶解析を成功させることができました。今後は、「構造ゲノム科学」により 3次元構造が明らかとなった膨大な数の酵素群から、pH・温度ジャンプトリガーを適用できるものを多数見つけ出し、NHase や ADPRase と同様の 4次元構造情報を蓄積していきたいと考えています。最後に、pH・温度ジャンプトリガーの着想はこれまでの常識をかなり逸脱したものでしたが、その思いつきを確認するための装置の制作に積極的に協力していただきました工作技術センターのスタッフの方々、特に、中心となって制作を進めていただきました須賀辰美さんに感謝いたします。