

## マウス IAP 様ウシレトロトランスポゾン LTR 配列の 転写プロモーター活性

加藤博己<sup>1,2</sup>、河野善衛<sup>3</sup>、高橋佳江<sup>3</sup>、甲田俊夫<sup>4</sup>、  
岸本学<sup>4</sup>、三谷匡<sup>1</sup>、松本和也<sup>1,2,3,4</sup>、  
佐伯和弘<sup>1,2,3,4</sup>、細井美彦<sup>1,2,3,4</sup>、入谷明<sup>1,2,4</sup>

### 要 旨

げっ歯類のゲノム中には、Intracisternal A Particle (IAP) と呼ばれるレトロトランスポゾンが存在する。IAP は、その両端に Long Terminal Repeat (LTR) と呼ばれる、強力な転写プロモーター活性やエンハンサー活性を持つ、長い末端反復配列を持つ (Dewannieux *et al.*, 2004)。この LTR 配列の転写プロモーター活性やエンハンサー活性は、ゲノム中の IAP 挿入部位の前後に存在する遺伝子の発現に影響を及ぼすことが報告されている (Barbot *et al.*, 2002, Jaenisch *et al.*, 2003, Morgan *et al.*, 1999)。

実験動物であるマウスにおいては、IAP を含むレトロトランスポゾンについて多くの研究が報告されているが、家畜であるウシにおいては、レトロトランスポゾンに関する研究はほとんどなされていない。ウシゲノムプロジェクトが進行中である現在、ウシゲノムにおけるトランスポゾンなどの機能未知である non-coding 領域の研究を行うことは、ウシゲノムの機能解析においても有効であると考えられる。

そこで本研究では、当研究室において得られたマウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列を転写プロモーターとして持つ、Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) 発現ベクターを構築し、マウス線維芽細胞、ウシ線維芽細胞およびマウス ES 細胞へ導入し、ウシゲノム中に存在するマウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列の転写プロモーター活性について検討した。

### 緒 言

近年様々な動物においてゲノム配列の解析が進み、ヒトゲノムにおいてタンパク質をコードする領域は、1.5% 程度にすぎないことが明らかとなった。哺乳類種間ではタンパク質をコードする配列そのものに大きな差は無く、魚類とヒトを比べてもほとんどの配列に大きな相違はないため、生物種間の差異をもたらすものとしては、ゲノムにおいてタンパク質をコードする領域ではない、これまでは「ジャンク DNA」と考えられていた機能未知の領域に注目が集まり始めている。

この「ジャンク DNA」と呼ばれていた領域の中に存在するエレメントの 1 つに、転移性遺伝因子がある。転移性遺伝因子は DNA 型と RNA 型に大別され、一般的に前者はトランスポゾン、後者はレトロトランスポゾンと呼ばれている。ヒトゲノムにおいてこれら転移性遺伝因子はゲノムの全配列中の 40% 以上を占めている。マウスをはじめとするげっ歯類では、レトロトランスポゾンのうち、その内部に逆転写酵素をコードし、自身の RNA を逆転写酵素によって DNA に逆転写した後、ホストゲノム中の様々な場所へ転移する機構を持つ、intracisternal A particle (IAP) と呼ばれるレトロトランスポゾンが存在する (Dewannieux *et al.*, 2004)。IAP はマウスにおいて、全ゲノム中に約 1000 コピー存在することが確認されている (Dupresspir *et al.*, 1997)。

1. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

2. 財団法人わかやま産業振興財団 〒649-6261 和歌山県和歌山市小倉 60

3. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

4. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

IAPにはその両端に long terminal repeat (LTR) と呼ばれる、強力な転写プロモーター活性及びエンハンサー活性を持つ、長い末端反復配列が存在している。このLTRの転写プロモーター活性及びエンハンサー活性は、IAPのホストゲノムへの挿入部位の近傍に存在する遺伝子の発現に影響を及ぼすことが報告されている (Barbot *et al.*, 2002, Jaenisch *et al.*, 2003, Morgan *et al.*, 1999)。マウスにおいては、実際にIAPのLTRをプロモーターとして持つベクターを作製し、同種及び異種細胞にトランスフェクションし、そのベクターの持つ chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子の発現が、特に異種細胞において促進されたことが報告されている (Leuders *et al.*, 1984)。このように、マウスなどの実験動物においてトランスポゾンの研究は進行しているが、産業動物であるウシにおいてはほとんどなされておらず、わずかに Normande 種ウシゲノムへのウシ LINE- I の挿入が同種のアグーチ遺伝子の発現に影響を及ぼしていることが報告されている程度である (Girardot *et al.*, 2006)。ウシゲノムプロジェクトが進行中である現在、ウシゲノムにおける機能未知である non-coding 領域におけるトランスポゾンなどの研究を行うことは、ウシゲノムへのトランスポゾンなどの挿入による系統・種間差の解明と、ウシゲノムの機能解析においても有効であると考えられる。

本研究では、当研究室においてウシゲノムより得られたマウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列を転写プロモーターとして持つ Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) 発現プラスミドベクターを構築し、この構築したプラスミドベクターを、細胞分化の状態や種の異なるマウス線維芽細胞、ウシ線維芽細胞およびマウス ES 細胞に導入して、EGFP の発現を観察することによって、ウシゲノム中に存在するマウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列の転写プロモーター活性について検討した。

## 材料と方法

### I. EGFP 発現ベクターの構築

#### ① pgk プロモーター導入 pIRES2-EGFP Vector の構築

pIRES2-EGFP Vector (Clontech, 632306) 3  $\mu$ g に、10 $\times$ T Buffer を 3  $\mu$ l、0.1% BSA を 3  $\mu$ l、*Aat* II (10U/ $\mu$ l, TaKaRa, 1112A) を 1  $\mu$ l と DW を加えて全体量を 30  $\mu$ l とし、37 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。反応後サンプルをフェノール・クロロホルム抽出した後、エタノール沈殿をおこない、得られた DNA のペレットを 10  $\mu$ l の TE (8.0) に溶解した。続いて 10 $\times$ K Buffer を 3  $\mu$ l、*Bam*H I (15U/ $\mu$ l; TaKaRa Code: 1010A) を 1  $\mu$ l と DW を加えて全体量を 20  $\mu$ l とし、30 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。反応後サンプルをフェノール・クロロホルム抽出した後、全量を 1% TAE Agarose gel で電気泳動を行い、EtBr で染色した。UV 照射下でメスを用いて約 4700bp の DNA 断片を切り出し、GeneElute<sup>TM</sup> Minus EtBr Spin Columns (SIGMA, 56501-70EA) を用いて DNA 断片を回収した。このプロモーター領域を除去したベクターと、pQBI pgk Vector から切り出した pgk プロモーターを DNA Ligaton Kit Ver.1 (TaKaRa Code: 6021) を使用して、ライゲーション反応を行い、pgk プロモーター導入 pIRES2-EGFP Vector を構築した。

#### ②マウス IAP 様ウシレトロトランスポゾン LTR 配列導入 pIRES2-EGFP Vector の構築

上記の pIRES2-EGFP Vector 3  $\mu$ g に、10 $\times$ T Buffer を 3  $\mu$ l、0.1% BSA を 3  $\mu$ l、*Aat* II を 1  $\mu$ l と DW を加えて全体量を 30  $\mu$ l とし、37 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。反応後サンプルをフェノール・クロロホルム抽出した後、エタノール沈殿をおこない、得られた DNA のペレットを 10  $\mu$ l の TE (8.0) に溶解した。続いて 10 $\times$ H Buffer を 3  $\mu$ l、*Sal* I (15U/ $\mu$ l; TaKaRa Code: 1080A) を 1  $\mu$ l と DW を加えて全体量を 20  $\mu$ l とし、37 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。反応後サンプルをフェノール・クロロホルム抽出した後、全量を 1% TAE Agarose gel で電気泳動を行い、EtBr で染色した。UV 照射下でメスを用いて約 4700bp の DNA

断片を切り出し、GeneElute™ Minus EtBr Spin Columns を用いて DNA 断片を回収した。このプロモーター領域を除去したベクターと、当研究室でクローニングしたマウス IAP 様ウシレトロトランスポゾン LTR 配列を DNA Ligaton Kit Ver.1 を使用して、ライゲーション反応を行い、マウス IAP 様ウシレトロトランスポゾン LTR 配列導入 pIRES2-EGFP Vector を構築した。

### ③マウス IAP の LTR 配列導入 pIRES2-EGFP Vector の構築

上記の pIRES2-EGFP Vector 3  $\mu$ g に、10×T Buffer を 3  $\mu$ l、0.1% BSA を 3  $\mu$ l、*Aat* II を 1  $\mu$ l と DW を加えて全体量を 30  $\mu$ l とし、37°C で一晩反応させた。反応後サンプルをフェノール・クロロホルム抽出した後、エタノール沈殿をおこない、得られた DNA のペレットを 10  $\mu$ l の TE (8.0) に溶解した。続いて 10×H Buffer を 3  $\mu$ l、*Sal* I を 1  $\mu$ l と DW を加えて全体量を 20  $\mu$ l とし、37°C で一晩反応させた。反応後サンプルをフェノール・クロロホルム抽出した後、全量を 1% TAE Agarose gel で電気泳動を行い、EtBr で染色した。UV 照射下でメスを用いて約 4700bp の DNA 断片を切り出し、GeneElute™ Minus EtBr Spin Columns を用いて DNA 断片を回収した。このプロモーター領域を除去したベクターと、当研究室でクローニングしたマウス IAP LTR 配列を DNA Ligaton Kit Ver.1 を使用して、ライゲーション反応を行い、マウス IAP LTR 配列導入 pIRES2-EGFP Vector を構築した。

## II. EGFP 発現ベクターの細胞への導入

ICR 系マウス 13.5 日齢胎児皮膚組織由来マウス初代線維芽細胞、ウシ初代線維芽細胞および B6D2F1 マウスの ICM より樹立された ES 細胞をそれぞれ EGFP 発現ベクター導入に用いた。各細胞への EGFP 発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法を用いた。

### ①マウス初代線維芽細胞へのエレクトロポレーション

100mm 細胞培養ディッシュにコンフルエントな状態にまで培養したマウス初代線維芽細胞から培地を除去して 3ml の PBS (-) で 2 回洗浄し、0.25% Trypsin/0.04% EDTA-PBS (-) を 1ml 加えて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 飽和湿度下で 5 分間処理した。10% FBS-DMEM を 10ml 加えて懸濁し、15ml コニカルチューブに移して細胞数を計測後、必要な細胞数分を新しい 15ml コニカルチューブに移して室温、500×g で 5 分間遠心した。上清を除去し、10ml の Cold PBS (-) で 3 回洗浄した。1×10<sup>6</sup> 細胞 / 700  $\mu$ l になるように PBS (-) を加えて懸濁し、700  $\mu$ l ずつ 1.5ml チューブに移してベクターを 2  $\mu$ g 加えた。GENE PULSER® II (BIO RAD) の Voltage を 0.9kV、Capacitance を 25  $\mu$ F にセットし、Gene Pulser Cuvette (0.4cm ; BIO RAD Code: 165-2088) に細胞・ベクター懸濁 PBS (-) を加え、Pulse を与えて室温で 10 分間静置した。15ml コニカルチューブに移して室温、500×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。2ml の 10% FBS-DMEM で懸濁し、ゼラチンコート済み 35mm ペトリディッシュに播種して 37°C、5% CO<sub>2</sub> 飽和湿度下で培養を開始した。エレクトロポレーションを行った 24 時間後に培地交換を行い、GENETICIN® (G418 ; GIBCO Code: 11811) を 200  $\mu$ g/ml になるように添加して薬剤セクションを行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 飽和湿度下で 1 週間培養した。

### ②ウシ初代線維芽細胞へのエレクトロポレーション

100mm 細胞培養ディッシュにコンフルエントな状態にまで培養したウシ初代線維芽細胞を用い、上記のマウス初代線維芽細胞へのエレクトロポレーションに従っておこなった。

### ③マウス ES 細胞へのエレクトロポレーション

エレクトロポレーションを行う前日に、ゼラチンコート済み 35mm ペトリディッシュに  $5 \times 10^5$  個のネオマイシン耐性フィーダー細胞を播種した。ゼラチンコート済み 35mm ペトリディッシュにコンフルエントな状態にまで培養した、継代培養 2 日目の ES 細胞から培地を除去し、0.25% Trypsin/0.04% EDTA-PBS (-) を  $500 \mu\text{l}$  加えて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  飽和湿度下で 5 分間処理した。10% FBS-DMEM を 1.5ml 加えて懸濁し、15ml コニカルチューブに移して細胞数を計測後、必要な細胞数分を新しい 15ml コニカルチューブに移して室温、 $500 \times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去し、10ml の Cold PBS (-) で 3 回洗浄した。 $1 \times 10^6$  細胞 /  $700 \mu\text{l}$  になるように PBS (-) を加えて懸濁し、 $700 \mu\text{l}$  ずつ 1.5ml チューブに移してベクターを  $2 \mu\text{g}$  加えた。GENE PULSER<sup>®</sup> II の Voltage を 0.8kV、Capacitance を  $3.0 \mu\text{F}$  にセットし、Gene Pulser Cuvette に細胞・ベクター懸濁 PBS (-) を加え、Pulse を与えて室温で 10 分間静置した。15ml コニカルチューブに移して室温、 $500 \times g$  で 5 分間遠心し、上清を除去した。1ml の 15% KSR-KO-DMEM+Lif で懸濁し、ゼラチンコート済み 35mm ペトリディッシュに播種した。 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  飽和湿度下で培養を開始した。エレクトロポレーションを行った 24 時間後に培地交換を行い、G418 (-) を  $200 \mu\text{g/ml}$  になるように添加して薬剤セレクションを行い、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  飽和湿度下で 1 週間培養した。培地交換は毎日おこなった。

### Ⅲ. EGFP 発現ベクター導入細胞の確認と EGFP 蛍光の観察

#### ①マウス初代線維芽細胞

G418 による薬剤セレクションを行いながら 1 週間培養した細胞から培地を除去し、1ml の PBS (-) で 2 回洗浄した。0.25% Trypsin/0.04% EDTA-PBS (-) を  $500 \mu\text{l}$  加えて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  飽和湿度下で 5 分間処理した。10% FBS-DMEM を 10ml 加えて懸濁し、15ml コニカルチューブに移して細胞数を計測後、室温、 $500 \times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去し、 $5 \times 10^4$  個 /  $500 \mu\text{l}$  になるように PBS (-) に懸濁し、Cytospin4 (Thermo Shandon) と Shandon Single Cytofunnel<sup>®</sup> Disposable Sample Chambers with White Filter Cards (Thermo ELECTRON CORPORATION, 5991040) を用いて 500rpm、8 分間遠心し、スライドガラスに細胞を展開した。VECTASHIELD Mounting Medium For Fluorescence with DAPI (VECTOR, H-1200) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で EGFP 蛍光を観察した。

#### ②ウシ初代線維芽細胞

上記①のマウス初代線維芽細胞の方法と同様におこなった。

#### ③マウス ES 細胞

G418 による薬剤セレクションを行いながら 1 週間培養した細胞から培地を除去し、0.25% Trypsin/0.04% EDTA-PBS (-) を  $500 \mu\text{l}$  加えて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  飽和湿度下で 5 分間処理した。10% FBS-DMEM を 10ml 加えて懸濁し、15ml コニカルチューブに移して細胞数を計測後、室温、 $500 \times g$  で 5 分間遠心した。上清を除去し、 $5 \times 10^4$  個 /  $500 \mu\text{l}$  になるように PBS (-) に懸濁し、Cytospin4 と Shandon Single Cytofunnel Disposable Sample Chambers with White Filter Cards を用いて 500rpm、8 分間遠心し、スライドガラスに細胞を展開した。VECTASHIELD Mounting Medium For Fluorescence with DAPI で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で EGFP 蛍光を観察した。

## 結 果

マウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列を転写プロモーターとして持つ EGFP 発現ベクターの導入後 1 週間培養した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、マウス線維芽細胞(図 1)、ウシ線維芽細胞(図 2) およびマウス ES 細胞(図 3) のいずれにおいても EGFP 蛍光が観察された。

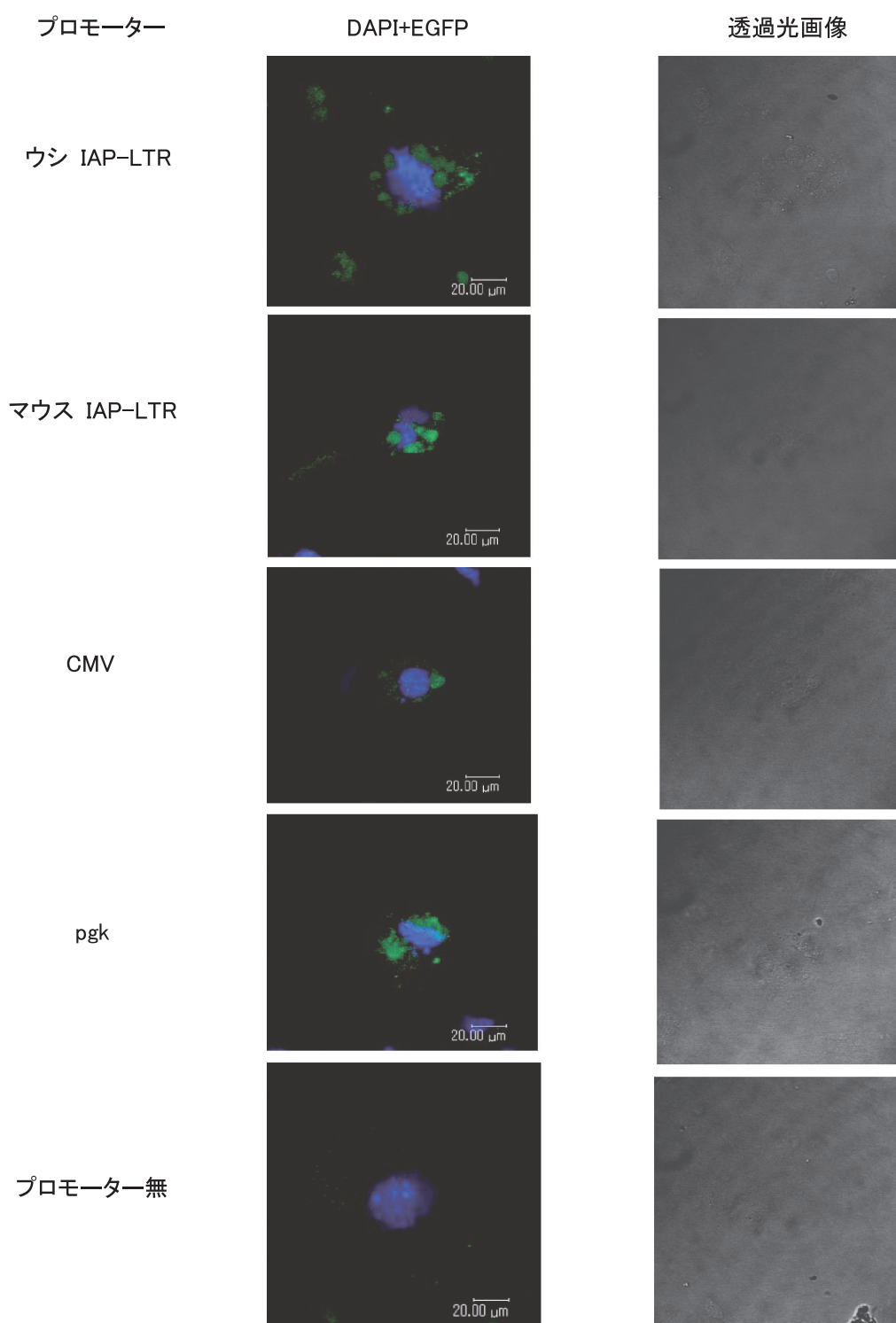


図 1. EGFP 発現ベクター導入マウス初代線維芽細胞の EGFP 蛍光像 (×630)

マウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列を転写プロモーターとして持つ EGFP 発現ベクター導入マウス線維芽細胞およびウシ線維芽細胞における EGFP 蛍光は、コントロールとして用いた CMV プロモーターおよび pgk プロモーターを持つ EGFP 発現ベクターを導入した細胞と比較して、同程度の EGFP 蛍光が観察された。

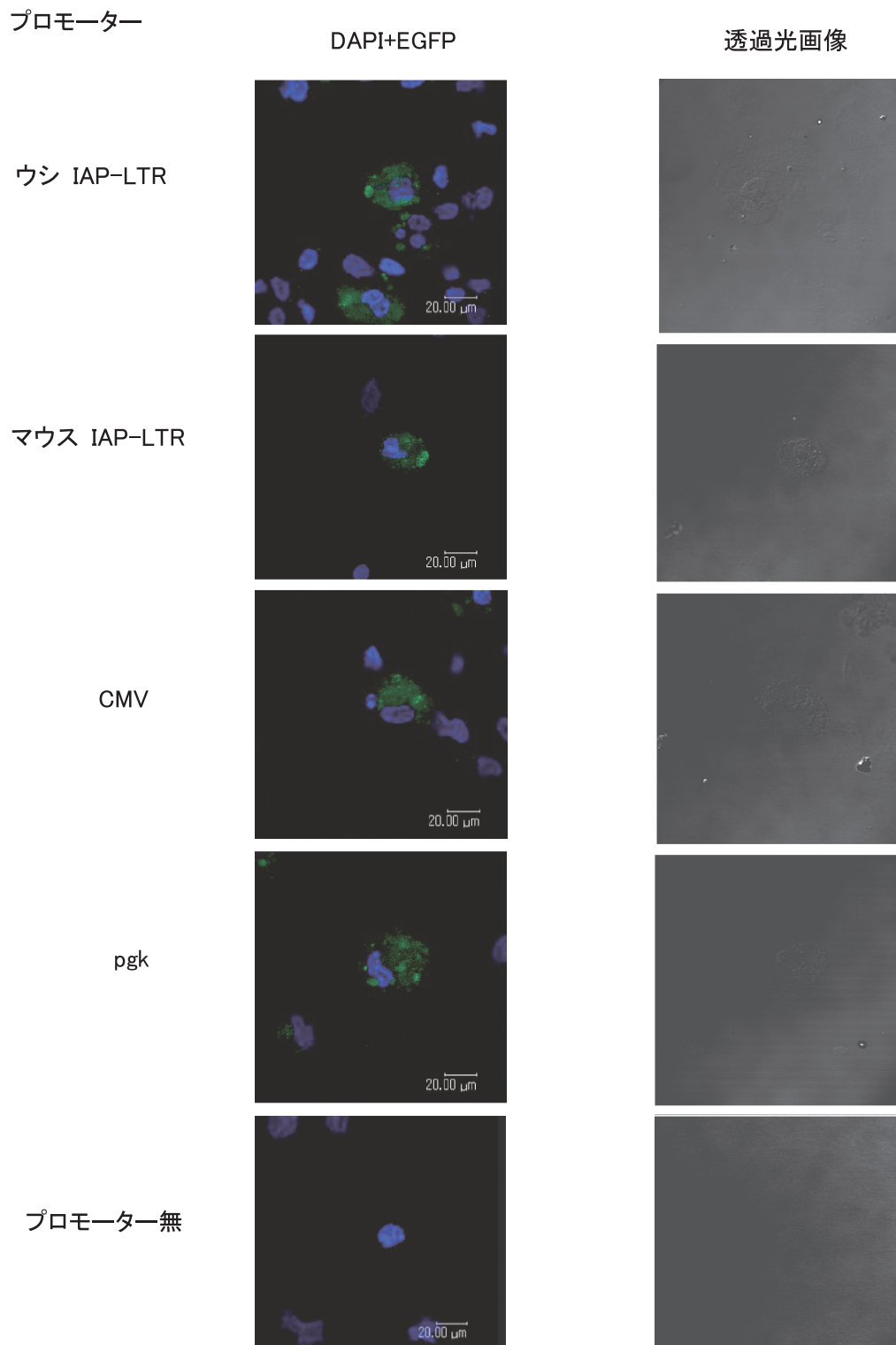


図2. EGFP 発現ベクター導入ウシ線維芽細胞の EGFP 蛍光像 (×630)

また、マウス IAP 様ウシレトロトランスポゾンの LTR 配列を転写プロモーターとして持つ EGFP 発現ベクター導入マウス ES 細胞における EGFP 蛍光は、未分化な細胞においても転写プロモーター活性を持つ pgk プロモーターを持つ EGFP 発現ベクターを導入した細胞、EGFP 発現ベクター導入マウス線維芽細胞およびウシ線維芽細胞における EGFP 蛍光と比較して、強い EGFP 蛍光が観察された。

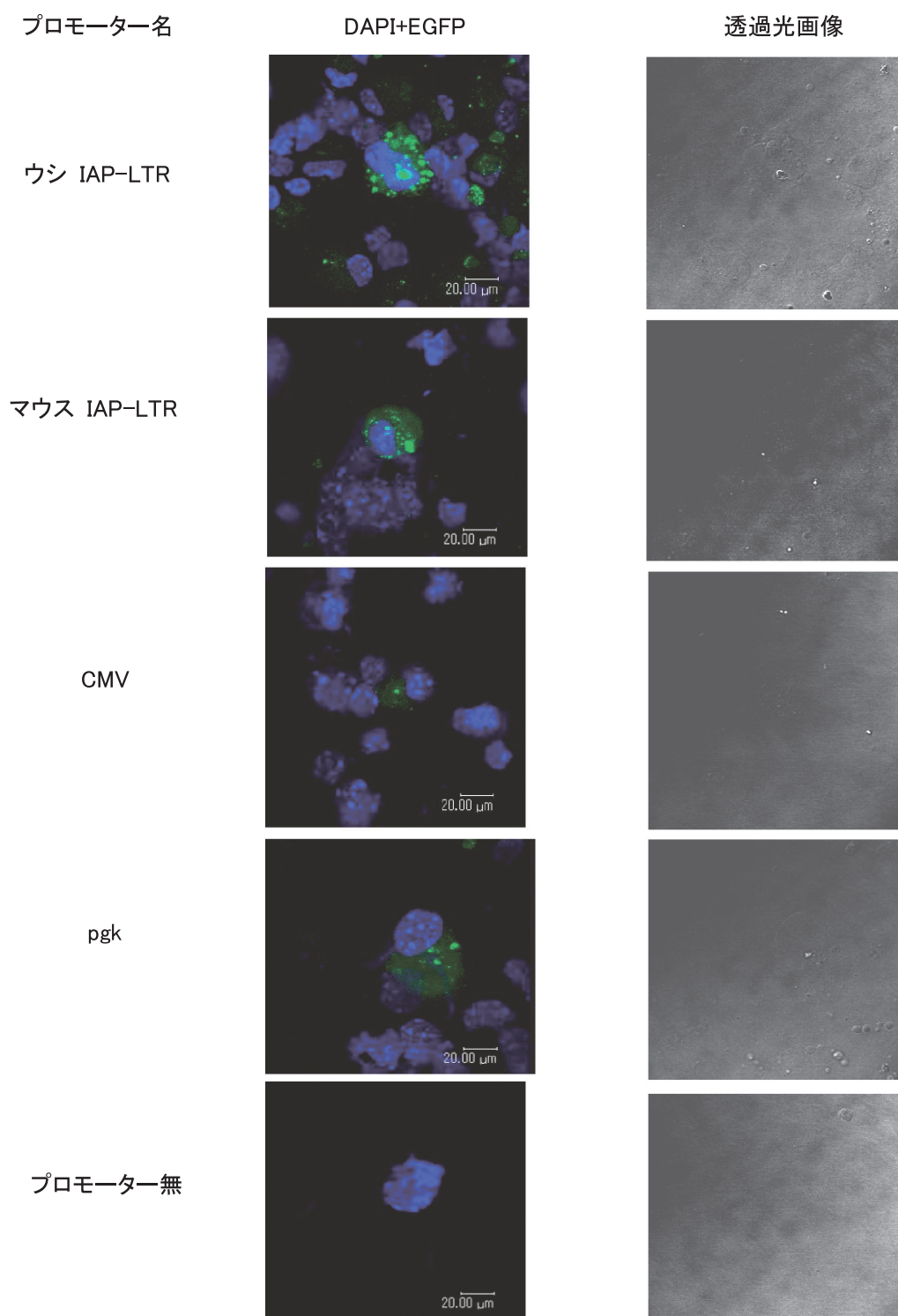


図 3. EGFP 発現ベクター導入マウス ES 細胞の EGFP 蛍光像 (×630)

## 考 察

EGFP 発現ベクター導入マウス線維芽細胞およびウシ線維芽細胞の観察結果から、マウス IAP 様ウシレトロトランスポソンの LTR 配列は、分化した細胞においても細胞の動物種に関わらず転写プロモーター活性を持つことが示された。

また、EGFP 発現ベクター導入マウス ES 細胞の観察結果より、マウス IAP 様ウシレトロトランスポソンの LTR 配列は、分化の進んだ細胞よりもより未分化な細胞において特に強いプロモーター活性を持つことが示された。

マウスにおいて、*lacZ* レポーター遺伝子を IAP 内に組込み、遺伝子導入することにより作製されたトランスジェニックマウスの解析により、体細胞において LTR は配列中のシトシンが高度にメチル化されておりその活性が抑制されているが、精巣中の精母細胞および減数分裂前の未分化な精原細胞において LTR 配列中のシトシンのメチル化状態は低く、IAP が発現していることが確認されている (Dupressoir *et al.*, 1996)。生体内における IAP の LTR 配列のこのような制御は、IAP の LTR 配列に本実験で使用したような EGFP のようなマーカー遺伝子を接続した融合遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成することにより、トランスジェニックマウス精巣からの精母細胞や未分化な精原細胞の選択と採集に役立てることができるのではないかと考えられる。

一般に、哺乳類では外来性遺伝因子や IAP を含むトランスポソンなどの転移性遺伝因子は、DNA のメチル化と呼ばれるシトシンの第五位の炭素にメチル基が付加されるエピジェネティックな機構によりその活動が抑制されている。また、先に述べたような報告もなされていることなどから、今回の実験結果として観察された EGFP 発現ベクター導入マウス線維芽細胞、ウシ線維芽細胞およびマウス ES 細胞における EGFP 蛍光の違いは、より分化の進んだ細胞においては、転写プロモーターとして用いたマウス IAP 様ウシレトロトランスポソンの LTR 配列中のシトシンがメチル化されることにより、その転写プロモーター活性が抑制されているため生じたのではないかと考えられた。

## 参 考 文 献

1. Dewannieux M, Dupressoir A, Harper F, Pierron G, Heidmann T. Identification of autonomous IAP LTR retrotransposons mobile in mammalian cells. *Nat. Genet.* 36 (5): 534-539. 2004.
2. Barbot W, Dupressoir A, Lazar V, Heidmann T. Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive de-methylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Res.* 30 (11): 2365-2373. 2002.
3. Jaenisch R and Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environment signals. *Nat. Genet.* 33 (suppl.): 245-254. 2003.
4. Dupressoir A and Heidmann T. Expression of intracisternal A-Particle retrotransposons in primary tumors of oncogene-expressing transgenic mice. *Oncogene* 14 (24): 2951-2958. 1997.
5. Morgan H, Sutherland H, Martin D, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.* 23 (3): 314-318. 1999.
6. Leuders K, Fewell J, Kuff E, Koch T. The Long Terminal Repeat of an Endogenous Intracisternal A-Particle Gene Functions as a Promoter When Introduced into Eukaryotic Cells by Transfection. *Mol. Cell. Biol.* 4 (10):2128-2135. 1984.
7. Girardot M, Guilbert S, Laforet M.P, Gallard Y, Larroque H, Oulmouden A. The insertion of a full-



length *Bos taurus* LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande Agouti gene. *Pigment Cell Res.* 19 (4): 346-355. 2006.

8. Dupressoir A and Heidmann T. Germ Line-Specific Expression of Intracisternal A-Particle Retrotransposons in Transgenic Mice. *Mol. Cel. Biol.* 16 (8): 4495-4503. 1996.

## 英文要旨

## Gene expression activity of the LTR of murine IAP-like bovine retrotransposon

Hiromi Kato<sup>1</sup>, Yoshihiro Kawano<sup>2</sup>, Yoshie Takahashi<sup>2</sup>, Toshio Koda<sup>3</sup>,  
Manabu Kishimoto<sup>3</sup>, Tasuku Mitani<sup>1</sup>, Kazuya Matsumoto<sup>1, 2, 3</sup>, Kazuhiro Saeki<sup>1, 2, 3</sup>,  
Yoshihiko Hosoi<sup>1, 2, 3</sup>, Akira Iritani<sup>1, 2</sup>

There is a retrotransposon, called as “Intracisternal A Particle(IAP)” in rodents’ genome. IAP has “Long Terminal Repeat(LTR)” which has strong promoter and/or enhancer activity in its both ends(Dewannieux *et al.*, 2004) . The promoter and/or enhancer activity in its LTR affects the expression of genes these exist around the insertion points in the host genome (Barbot *et al.*, 2002, Jaenisch *et al.*,2003, Morgan *et al.*, 1999) .

There are many reports concerning retrotransposons including IAP in experimental animals. However, there were little reports concerning retrotransposons including IAP in livestock including cattle. It would be significant to study the non-coding region of bovine genome including retrotransposons because the function of the non-coding region is unclear and bovine genome project is now progressing.

In this experiment, the promoter activity of the LTR of murine IAP-like bovine retrotransposon was evaluated by the transfer of the gene construction, which has the LTR of murine IAP-like bovine retrotransposon as a gene expression promoter and Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) into murine primary fibroblast, bovine fibroblast or mouse ES cell.

---

1. Institute of Advanced Technology, Kinki University, 642-0017 Japan

2. School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, 649-6493 Japan

3. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, 649-6493 Japan