

〔短報〕

DNAマーカーを利用した水稲, 小麦, 大豆の 北海道優良品種判別技術

木内 均*¹ 玉掛 秀人*² 山下 陽子*³

主要農作物である水稲, 小麦, 大豆について, DNAマーカーを利用した迅速かつ客観的な品種判別法を開発した。水稲では8個のマーカーから成る品種判別マーカーセットを選定し, 北海道優良品種16点, 旧優良品種1点, 登録出願品種1点および地方番号系統10点の判別を可能とした。小麦では4個のマーカーから成る品種判別マーカーセットを選定し, 優良品種10点, 旧優良品種4点および地方番号系統5点の判別を可能とした。大豆では8個のマーカーから成る品種判別マーカーセットを選定し, 「ユキホマレ」の特定のDNA領域を置換した「ユキホマレR」を除き, 優良品種17点, 旧優良品種2点および地方番号系統9点の判別を可能とした。本研究の成果は北海道産農作物の適正表示の推進に寄与できるとともに, 種子生産における異型などの分析に活用でき, 種子の品質管理の一助となることが期待できる。

緒 言

安全・安心な農産物を供給するための食の偽装防止や知的財産である育成者権の保護のためには, 品種などに関する適正表示が不可欠である。それはまた, 生産者の利益や道産農産物の信頼性および競争力の向上にも結びつく。

近年, DNAマーカーを利用した品種判別技術が開発されてきており, 豆類での不正輸入の確認事例など, 様々な農作物においてその迅速で客観的な分析の有効性が認められてきている。

北海道立総合研究機構農業試験場は, 道立農試時代から多数の北海道優良品種を育成してきた。これらの優良品種に係わる表示問題への対応においては, 現在の優良品種を全て判別できるDNAマーカーを利用した品種判別技術が不可欠である。しかしながら, 大豆において2002年にDNAマーカーによる品種判別法が開発されたものの, その後の新品種および他作物には対応できていなかった。

一方, DNAマーカーについては, 水稲, 小麦および大豆で近縁品種でも高頻度に多型を検出できるSSRマーカー (simple sequence repeats) が多数開発され, その配

列情報が公開されている。

そこで本研究では, 水稲, 小麦および大豆について北海道優良品種および地方番号系統の全てを対象に, SSRマーカーをDNAマーカーとして利用した品種判別技術の確立を目指した。

試験方法

1. 水稲

(1) 供試材料

北海道優良品種16点 (「ななつぼし」, 「きらら397」, 「ほしのゆめ」, 「おぼろづき」, 「ふっくりんこ」, 「ゆめぴりか」, 「大地の星」, 「ほしまる」, 「あやひめ」, 「吟風」, 「ゆきひかり」, 「彗星」, 「はくちょうもち」, 「風の子もち」, 「しろくまもち」, 「きたゆきもち」), 旧優良品種1点 (「彩」), 2009年現在の登録出願品種1点 (「空育酒177号」), 2009年現在の地方番号系統10点 (「空育172号」, 「空育179号」, 「上育460号」, 「上育462号」, 「上育463号」, 「上育糯464号」, 「北海311号」, 「北海313号」, 「北海314号」, 「北海315号」), 計28点。

(2) 供試マーカー

イネゲノム解読国際コンソーシアム公開SSRマーカー (<http://www.gramene.org/markers/microsat/>) から3~4塩基の反復配列領域で, 期待されるPCR増幅断片サイズが250bp以下のマーカー81種を供試した。

(3) DNA抽出方法

多型分析においては葉齢が1.5葉の苗から長さ2cmの葉片を採取し, 改変CTAB法²⁾に基づいてDNAを抽出した。抽出の工程は以下の通りである。

2 mlマイクロ遠心チューブに1個のステンレスビー

2012年11月5日受理

*¹ 北海道立総合研究機構中央農業試験場 (現: 同機構上川農業試験場, 078-0397 上川郡比布町)

E-mail: kiuchi-hitoshi@hro.or.jp

*² 同上, 073-0013 滝川市

*³ 同上, 069-1395 夕張郡長沼町

ズ(5 mm)とともに2×CTAB溶液(CTAB:2%, Tris-HCl(pH8.0):100mM, NaCl:1.4M, EDTA:20mM) 800 μ lと葉片を入れ，シェイクマスターオートVer.2(バイオメディカルサイエンス)を用いて1,100rpmで2分間粉碎した。55°Cで1時間インキュベートし，クロロホルム/イソアミルアルコール(24/1) 600 μ lを加えて1分間攪拌した後，12,000rpmで10分間遠心した。上清600 μ lにクロロホルム/イソアミルアルコール(24/1) 600 μ lを加えて1分間攪拌した後，12,000rpmで10分間遠心した。上清400 μ lに2-プロパノール280 μ lを加えて転倒混和した後，12,000rpmで5分間遠心した。上清を廃棄し，沈殿したDNAにTE(Tris-HCl(pH8.0):10mM, EDTA:1 mM) 500 μ lを加えて溶解した。遺伝子型均一性の確認においては種子1粒から切り出した1/2切片を供試し，単粒DNA抽出法³⁾を改変した方法で行った。抽出の工程は以下の通りである。2mlマイクロ遠心チューブに1個のステンレスビーズ(5 mm)とともに使用直前にプロテナーゼK(20mg/ml) 2~4 μ l/mlを添加した抽出バッファー(Tris:200mM, EDTA:25mM, NaCl:200mM, SDS:0.5%, pH8.0) 600 μ lと種子切片を入れ，室温で30分間浸漬した後，シェイクマスターオートVer.2を用いて1,100rpmで3分間粉碎した。さらに，室温で1時間浸漬した後，再度1,100rpmで3分間粉碎した。65°Cで1時間インキュベートし，5%フェノール含有クロロホルム/イソアミルアルコール(24/1)を等量加えて1分間攪拌した後，14,000rpmで30分間遠心した。上清400 μ lにクロロホルム/イソアミルアルコール(24/1)を等量加えて1分間攪拌した後，14,000 rpmで15分間遠心した。上清300 μ lに2-プロパノール210 μ lを加えて転倒混和した後12,000rpmで5分間遠心した。上清を廃棄し，沈殿したDNAにTE500 μ lを加えて溶解した。

(4) PCR反応条件など

サーマルサイクラーはGeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems)およびMyCyclerサーマルサイクラー(BioRad)を使用した。反応液量は15 μ lとし，鋳型DNA 5~30ng, HotStarTaq DNA Polymerase(キアゲン) 0.5 units, 添付のバッファー1.5 μ l, dNTP 200 μ M, プライマー各0.13~0.33 μ Mを加えた。反応条件は94°C 7分の後，94°C 45秒，55°C 45秒，72°C 1分を33回繰り返し，最後に72°C 7分を付加した。PCR増幅断片の検出は7.5%非変性アクリルアミドゲルを用いて，スラブゲル電気泳動装置により泳動を行い，ゲルをサイバークリーンIで染色の後，紫外線照射下で写真撮影した。

2. 小麦

(1) 供試材料

北海道優良品種10点(「ホクシン」,「きたほなみ」,

「キタノカオリ」,「タクネコムギ」,「ホロシリコムギ」,「きたもえ」,「ゆめちから」,「春よ恋」,「ハルユタカ」,「はるきらり」), 2009年現在の旧優良品種4点(「チホクコムギ」,「タイセツコムギ」,「春のあけぼの」,「はるひので」), 2009年現在の地方番号系統5点(「北見83号」,「北見85号」,「北海262号」,「北見春71号」,「HW 5号」), 計19点。

(2) 供試マーカー

既報⁴⁾の2塩基反復配列SSRマーカー119種および独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所公開の3塩基反復配列SSRマーカー(http://www.naro.affrc.go.jp/nics/webpage_contents/dna_marker/index.html) 30種, 計149種について, 供試材料において多型を示すマーカーを探索した。

(3) DNA抽出方法

種子1粒から切り出した1/4切片を供試し，単粒DNA抽出法を改変した方法で行った。抽出の工程は水稲と同様であるが1回目の遠心を5分間，その後の上清回収量を350 μ l, 2回目の遠心を5分間，その後の上清回収量を250 μ lとした。それに添加する2-プロパノールを180 μ l, その後の遠心を15分間とした。

(4) PCR反応条件など

PCR装置はMyCyclerサーマルサイクラーを使用した。反応液組成は水稲と同様である。PCR反応条件は，95°C 7分の後，94°C 1分，53°C 1分，72°C 1分を33回繰り返し，最後に68°C 7分を付加した。PCR増幅断片の検出は，水稲と同様に行った。

3. 大豆

(1) 供試材料

北海道優良品種18点(「ユキホマレ」,「スズマル」,「トヨムスメ」,「ユキシズカ」,「トヨコマチ」,「トヨハルカ」,「トヨホマレ」,「キタムスメ」,「ツルムスメ」,「音更大袖」,「ユウヅル」,「ハヤヒカリ」,「大袖の舞」,「タマフクラ」,「ゆきびりか」,「ユキホマレR」,「いわいくろ」,「トカチクロ」), 2009年現在の旧優良品種2点(「晩生光黒」,「中生光黒」), 2009年現在の地方番号系統9点(「十育248号」,「十育249号」,「十育250号」,「十育251号」,「中育60号」,「中育61号」,「中育62号」,「中育64号」,「中育63号」), 計29点。

(2) 供試マーカー

2002年に開発された品種判別マーカー10種¹⁾, およびUSDA(United States Department of Agriculture)公開のSSRマーカーの情報(<http://soybase.org/resources/ssr.php>)から3塩基以上の反復配列領域で，期待されるPCR増幅断片サイズが250bp以下のマーカー113種を供試し，供試材料において多型を示すマーカーを探索した。

(3) DNA抽出方法

多型分析においては展開直後の本葉第1葉の1cm角の葉片を供試し、遺伝子型均一性の確認においては種子1粒から切り出した1/16切片を供試した。その後の工程はそれぞれ水稲と同様である。

(4) PCR反応条件など

サーマルサイクラーはGeneAmp PCR system 9700を使用した。反応液組成は水稲と同様である。PCR反応条件は95℃ 7分の後、94℃ 1分、46℃ 1分、68℃ 1分を33回繰り返す、最後に72℃ 7分を付加した。PCR増幅断片の検出は水稲と同様に行った。

試験結果

1. 水稲

供試した81種のマーカーのうち51種のマーカーで多型が得られた。そのうち判別のしやすいマーカーとして全12染色体に座乗する37種を水稲品種判別マーカー候補として選定した。これらのうち、表1に示したRM80, RM5927, RM5850, RM7474, RM5755, RM6914, RM6680およびRM6324の8種のマーカーにより供試した28品種・系統全ての判別が可能であった。また、道内主要8品種それぞれ96~192粒について、選抜した8マーカーの遺伝子型を調査した結果、RM80において「ななつぼし」の1粒、RM5850において「ふっくりんこ」の1粒、RM7474において「ほしのゆめ」、「はくちょうもち」、「ふっくりんこ」の各1粒、RM6324において「ななつぼし」の1粒でサイズの異なるPCR増幅断片が見られた他は、品種内で同一サイズのPCR増幅断片が得られた(表2)。

表1 選定した水稲品種・系統判別マーカー

マーカー名	染色体	フォワードプライマー	リバースプライマー
RM80	8	CTCATCTCCGCCCTTGATTCC	GCCCATCAACCTCGTCTTCACC
RM5927	12	TGTATAGCCCGAAGTATGATCC	TCTGGTCTCGTCTCATGTGC
RM5850	6	TTATACACAGATGACGCACACG	TGGGTTAAGGGACACACTTAGG
RM7474	4	TTTGGTACGGACAGAAAGG	CACGTCCACTCTTCAATCTCC
RM5755	3	CCATGGTCGCCATTGACACG	CCTGTATAAACAACCTCGCACAGATGC
RM6914	3	AAGAACCACCTGCGGTTAGC	CTACAGCTTTCTTGATTCGCTTGG
RM6680	11	CGACACAGTTACAAGCCACACG	TGGGAGGACGTTGATATGTCTCG
RM6324	1	CTGTACAAGAACGGCAGCAACC	GCACCACCAAAACAGAGACAGAGG

表2 水稲品種判別マーカーとPCR増幅断片サイズ

品種・系統名	PCR増幅断片サイズ (bp)							
	RM80	RM5927	RM5850	RM7474	RM5755	RM6914	RM6324	RM6680
ななつぼし*	170	168	158	119	198	170	153	171
空育179号	170	177	158	119	189	170	147	193
彗星	170	177	170	123	198	161	147	193
吟風	170	177	170	123	198	170	147	193
ゆきひかり	179	177	158	127	210	161	147	171
大地の星	179	177	200	123	189	170	147	193
しろくまもち	179	177	200	123	189	200	147	171
上育460号	179	177	200	127	189	170	147	171
上育463号	179	177	200	127	189	170	147	193
上育糯464号	179	177	200	127	210	200	147	171
きたゆきもち	182	156	200	127	210	161	147	171
はくちょうもち*	182	177	158	127	210	200	153	171
あやひめ	182	177	161	123	210	161	147	193
風の子もち*	182	177	170	127	210	161	147	171
北海311号	191	168	200	123	198	170	147	171
おぼろづき*	191	177	200	123	198	170	147	171
空育172号	200	168	158	119	189	161	147	171
北海314号	200	168	200	123	198	170	147	193
ほしまる	200	177	158	123	198	170	147	171
空育酒177号	200	177	170	123	198	161	147	193
ふっくりんこ*	200	177	200	119	189	170	147	171
彩	200	177	200	123	189	161	144	171
ほしのゆめ*	200	177	200	123	189	170	147	171
上育462号	200	177	200	123	189	170	147	193
ゆめびりか*	200	177	200	123	189	170	153	171
きらら397*	200	177	200	123	198	170	147	171
北海313号	200	177	200	127	189	170	147	171
北海315号	200	188	158	127	189	161	147	171

注1) PCR増幅断片サイズはサイズマーカー (10bpラダー) と比較して目視で判定した。
 注2) 判別はPCR増幅断片サイズが同一のものを右隣のマーカーで分けて行う。
 注3) 網掛けはPCR増幅断片サイズの標準品種。
 注4) *印は判別マーカーの品種内遺伝子型均一性を確認した品種。

2. 小麦

149種のマーカーのうち、50種のマーカーで多型が得られた。そのうち、比較的PCR増幅断片サイズの差が大きく判別のしやすいマーカーとして全21染色体中12染色体に座乗する29種を小麦品種判別マーカー候補として選定した。これらのうち、表3に示したXgwm294, Xgwm369, Xgwm122およびXgwm539の4種のマーカーにより供試した19品種・系統全ての判別が可能であった。また、道内主要4品種それぞれ200粒について、選抜した4マーカーの遺伝子型を調査した結果、Xgwm294およびXgwm539において「ホクシン」の2粒、Xgwm122において「春よ恋」の1粒でサイズの異なるPCR増幅断片が見られた他は、品種内で同一サイズのPCR増幅断片が得られた。(表4)。

表3 選定した小麦品種・系統判別マーカー

マーカー名	染色体	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>Xgwm294</i>	2A	GGATTGGAGTTAAGAGAGAACCG	GCAGAGTGATCAATGCCAGA
<i>Xgwm369</i>	3A	CTGCAGGCCATGATGATG	ACCGTGGGTGTTGTGAGC
<i>Xgwm122</i>	2A	GGGTGGGAGAAAGGAGATG	AAACCATCCTCCATCTCGG
<i>Xgwm539</i>	2D	CTGCTCTAAGATTTCATGCAACC	GAGGCTTGTCCTCTGTAG

表4 水稲品種判別マーカーとPCR増幅断片サイズ

品種・系統名	PCR増幅断片サイズ (bp)			
	<i>Xgwm294</i>	<i>Xgwm369</i>	<i>Xgwm122</i>	<i>Xgwm539</i>
春のあけぼの	72	150	143	134
きたもえ	76	176	143	160
タクネコムギ	76	180	143	146
はるひので	86	150	143	134
北見春71号	90	150	139	140
はるきらり	90	150	143	124
北海262号	96	150	131	140
ゆめちから	96	150	139	134
キタノカオリ	96	150	139	140
タイセツコムギ	96	150	143	142
きたほなみ*	96	176	131	140
北見85号	96	180	139	140
ホクシン*	100	176	143	142
北見83号	100	176	143	164
HW5号	104	182	123	124
春よ恋*	104	182	123	138
チホクコムギ	110	182	143	142
ホロシロコムギ	110	182	143	160
ハルユタカ*	114	182	139	140

注釈は表2と同じ

3. 大豆

113種のマーカーのうち、比較的PCR増幅断片サイズの差が大きく判別のしやすいマーカーとして20染色体中12染色体に座乗する15種を大豆品種判別マーカー候補として選定した。これらのうち、表5に示したSatt216, Satt244, Satt453, Satt243, Satt345, Satt022, Satt305およびSatt586の8種のマーカーにより、供試した29品種・系統のうち「ユキホマレR」を除く品種・系統を判別する事が可能であった。「ユキホマレR」は「ユキホマレ」の特定のDNA領域を置換した品種であるため、その判別には置換に用いたDNAマーカーを利用することとした。また、道内主要4品種それぞれ200粒について、選抜した8マーカーの遺伝子型を調査した結果、Satt216において「トカチクロ」の1粒でサイズの異なるPCR増幅断片が見られた他は、品種内で同一サイズのPCR増幅断片が得られた。(表6)。

表5 選定した大豆品種・系統判別マーカー

マーカー名	染色体	フォワードプライマー	リバースプライマー
Satt216	2	TACCCTTAATCACCGGACAA	AGGGAACCTAACACATTTAATCATCA
Satt244	16	GCGCCCATATGTTTAAATATAT GGAG	GCGATGGGGATATTTTCTTTATTAT CAG
Satt453	15	GCGGAAAAAACAATAAACAACA	TAGTGGGGAAAGGGAAGTTACC
Satt243	10	GCGCATTGCACATTAGGTTTCTG TT	GCGGTAAGATCACGCCATTATTTAA GA
Satt345	10	CCCCTATTCAAGAGAATAAGGAA	CCATGCTCTACATCTTCATCATC
Satt022	3	GGGGATCTGATTGTTTACCT	CGGGTTTCAAAAACCATCCTTAC
Satt305	6	TTCCCAACAACAGACAACAC	TTAATTCTCTTTATCATCATCAC
Satt586	11	GCGGCCTCCAACCTCCAAGTAT	GCGCCAAATGATTAATCACTCA

注1) Satt345は「豆類のDNA品種判別技術の開発」(道立中央農試, 2002)より引用した。

表6 大豆品種判別マーカーとPCR増幅断片サイズ

品種・系統名	PCR増幅断片サイズ (bp)							
	Satt 216	Satt 244	Satt 453	Satt 243	Satt 345	Satt 022	Satt 305	Satt 586
ツルムスメ	146	148	228	200	218	211	218	214
いわいくろ*	146	148	240	200	218	211	200	214
中育60号	146	148	240	200	218	211	200	220
ユキズカ	146	148	249	215	199	220	218	226
中育62号	146	181	240	200	199	211	200	214
トヨハルカ*	146	181	240	200	199	220	200	208
十育250号	146	181	240	200	218	232	200	208
中育61号	146	181	249	200	218	211	218	214
トカチクロ*	170	148	228	215	199	211	218	208
中生光黒*	170	148	228	215	218	211	218	196
中育63号	170	148	240	200	218	211	200	196
ゆきびりか	170	148	240	200	218	211	200	220
スズマル	170	148	240	215	218	220	218	220
晩生光黒*	170	148	249	230	218	220	218	226
ハヤヒカリ	170	169	271	200	218	220	200	214
十育249号	170	181	240	200	199	232	200	214
十育248号	170	181	240	200	218	211	200	214
中育64号	170	181	240	230	199	220	200	220
ユキホマレ*	170	181	240	230	199	232	200	220
ユキホマレR	170	181	240	230	199	232	200	220
トヨムスメ*	170	181	240	230	218	211	200	214
ユウヅル	170	181	240	230	218	211	218	208
音更大袖	170	196	228	215	199	220	218	220
大袖の舞	170	196	240	215	230	211	200	220
トヨコマチ	170	196	240	215	230	220	200	226
トヨホマレ	170	196	240	230	199	220	200	220
キタムスメ*	170	196	249	215	199	220	200	214
十育251号	200	181	240	215	199	232	200	214
タマフクラ	230	148	228	230	218	211	200	196

注1) ユキホマレとユキホマレRの判別にはダイズシストセンチュウ・レース1抵抗性に関与する遺伝子座Rhg1およびRhg4のマーカーを用いる。その他注釈は表2と同じ。

考 察

本研究では、安全・安心な農産物供給の推進を目的として、水稻、小麦および大豆について北海道優良品種および地方番号系統を迅速で客観的に判別することが可能なDNAマーカーを利用した品種判別技術を開発した。

選定したマーカーは、利用するDNA領域の遺伝子型品種内均一性が充分であることを確認しており、判別結果の信頼性は高いと考えられる。また、PCR増幅断片サイズを相対比較するための標準品種を各作物ともに8品種設定し(表2, 4, 6), 分析材料とともに供試することでDNA増幅量や泳動条件が変化した場合でも判別精度を確保している。

一方、大豆の「ユキホマレ」と、「ユキホマレ」にDNAマーカー選抜と戻し交配によりダイズシストセンチュウ・レース1抵抗性を導入した「ユキホマレR」を区別できるDNAマーカーは見出されなかった。しかし、これらは「ユキホマレR」育成時の選抜に用いた、ダイズシストセンチュウ・レース1抵抗性に関する遺伝子座*Rhg1*および*Rhg4*のマーカーで判別可能である。特定のDNA領域のみを置換した品種の育成は今後も想定されるが、選抜に用いたマーカーを利用することで同様に対応が可能である。

今後育成される新品种への対応は、本研究で供試された地方番号系統については、本研究結果が直接適用でき、さらにその後の育成品種については、選定したマーカーセットおよび多型が確認できた他のマーカーの併用による判別が期待できる。

いくつかの作物のDNA品種判別技術について、国は植物品種の育成者権を保護する目的で公定法を定めている。この公定法では訴訟などにおける証拠能力が必要とされ、妥当性試験の実施により、再現性の確認および技術の妥当性が保証できる範囲を明確にしている。本研究では公定法と同様な妥当性試験は実施していないものの、判別結果の信頼性と判別精度が確保されているため、流通農産物の品種に係わる表示の照会に対し、速やかに適切な対応を導く役割を十分に果たし得ると考えられる。

加えて、本研究結果の活用場面として、種子生産での利用が期待できる。種子生産の過程においては、異型などの除去作業が必須であり、異型の分析や品種の確認の要望が多数寄せられてきた。これらの要望へは本研究に係わるマーカーセットの選定過程において、その時点で選定されていたマーカーを用いた分析を行い、情報提供の参考としてきた。本研究で用いたSSRマーカーは共優性マーカーであり、ヘテロの判別が可能のため、異型の原因が交雑であるか、混入であるか、あるいはそれ以外であるかの推定が可能である。これらのことから、DNA

マーカーを利用した品種判別技術は、種子生産における異型の分析や品種確認などについても極めて有効な手段であり、北海道立総合研究機構農業試験場が担う基本系統選定や育種家種子生産をはじめとする種子生産に活用することで、種子の品質管理の一助となることが期待できる。

引用文献

- 1) Hasebe, R., Iwatsuki, K. *Adiantum capillus-veneris* chloroplast DNA clone bank: as useful heterologous probes in the systematics of the leptosporangiate ferns. *American Fern Journal*. 80(1), 20-25 (1990)
- 2) Kang, H. W., Yong, G. C., Yoon, U. H., Eun, M. Y. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16, 1-9 (1998)
- 3) 紙谷元一. 豆類のDNA品種判別技術の開発. 農業低温科学研究報告. 9(4), 23-25 (2003)
- 4) Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tikić, M., Leriy, P., Ganal, M. W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 149, 2007-2023 (1998)

Identification of recommended varieties for Hokkaido of rice, wheat and soybean using DNA markers

Hitoshi KIUCHI*¹, Hideto TAMAGAKE*²,
Yoko YAMASHITA*³

*¹ Hokkaido Research Organization Central Agricultural Experiment Station (Present; Hokkaido Research Organization Kamikawa Agricultural Experiment Station, Pippu, Hokkaido, 078-0397 Japan)
E-mail: kiuchi-hitoshi@hro.or.jp

*² ditto., Takikawa, Hokkaido, 073-0013 Japan

*³ ditto., Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan