

200808018A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
(政策創薬総合研究事業)

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づく エイズワクチン戦略の再構築

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上野 貴将

平成21年(2009年)3月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
(政策創薬総合研究事業)

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づく
エイズワクチン戦略の再構築
平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上野 貴将

平成21年(2009)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築 3
研究代表者 上野 貴将 (熊本大学エイズ学研究センター 准教授)

II. 分担研究報告書

1. ヒト T 細胞による HIV 抗原認識の解析 9
上野 貴将 (熊本大学エイズ学研究センター 准教授)
2. 抗体工学を用いた HIV 抗原検出プローブの開発と応用 13
熊谷 泉 (東北大学大学院工学研究科 教授)
3. プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析 16
荒木 令江 (熊本大学大学院医学薬学研究部 准教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 27

I . 総括研究報告書

総括研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築

研究代表者	上野貴将	熊本大学エイズ学研究センター	准教授
研究分担者	熊谷 泉	東北大学大学院工学研究科	教授
	荒木令江	熊本大学大学院医学薬学研究部	准教授

研究要旨

ヒトの HIV 感染に伴って提示される細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 抗原の包括的な解析を目指して、新たな蛋白化学的アプローチの基盤システム立ち上げを目指した。その結果、本年度は以下の成果を得た。(1) 日本人 HIV 感染者の CTL 応答を包括的に解析して、HLA-B35 拘束性 CTL では Nef 由来の抗原が最も抗原性が高いことを明らかにした。さらにこの抗原階層性は病態進行とともに経時的に変遷することを明らかにした。(2) T 細胞レセプター (TCR) の相補性決定領域を抗体フレームワークに移植する新しい方法を確立して、抗原ペプチド・HLA 複合体を特異的に認識する新規分子の創製に成功した。(3) HIV 感染細胞上の抗原ペプチドを包括的に解析するプロテオミクスの新技術として、ペプチドを 10 att mol レベルの高感度で定量的に解析する質量分析システムの立ち上げに成功した。

A. 研究目的

ヒト感染免疫系に関する基盤情報は非常に限られており、エイズワクチン開発の障壁となっている。中でも抗原提示に関わる分子群は動物種間で大きく異なるため、ヒト検体での情報の充実化が望まれている。本研究では、プロテオームを主体とした新しい蛋白化学的アプローチを確立して、ヒトで提示される極微量の HIV 抗原を包括的に明らかにすることにより、エイズワクチン開発と厚生労働行政に貢献することを目指している。

B. 研究方法

(1) さまざまな病態にある HIV 感染者から提供していただいた血液検体 (国立国際医療センター・岡先生の協力の下) を用いて、CTL の抗原特異性と抗ウイルス機能を解析した。

(2) T 細胞レセプター (TCR) の相補性決定領域 (CDR) を抗体可変領域断片のフレームワーク領域へ移植する構造分子モデリングを構築し、TCR グラフト抗体をデザインした。これを大腸菌発現系により調製、巻き戻

し、精製後、円偏光二色性 (CD) スペクトルにより高次構造を確認した。最後に、表面プラズモン共鳴 (SPR) 試験を用いて、TCR グラフト抗体とペプチド・MHC 複合体の結合試験を行った。

(3) 高感度タンデム質量分析計 nanoLC-ESI-QqTOF (QStarApplied-Biosystems) は網羅的なペプチドの同定用に、nanoLC-MALDI-TOF-TOF (MAALDI-TOF/TOF4700 Applied-Biosystems) はペプチドの高感度検出用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQ (QTRAP4000 Applied-Biosystems) は高感度定量用に組み合わせて使用した。高感度定量解析法として、iTRAQ (isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation) 法および MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を用いた。

(倫理面への配慮)

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関 (熊本大学および国立国際医療センター) の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。また、HLA

遺伝子タイピングについては、ヒト遺伝子解析に関わる研究として、同じく関連機関の倫理審査委員会の審議を受け、承認されている。どちらの場合も、提供者の文書による承諾と個人情報の保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

C. 研究結果

(1) ヒト T 細胞による HIV 抗原認識の解析(上野)

ヒト CTL が応答する HIV 抗原とその階層性を明らかにするために、日本人 HIV 感染者の検体を用いて、Pol, Env, Nef 由来の 5 種類のエピトープに対する CD8 陽性 T 細胞数を HLA テトラマー法で解析した。その結果、HLA-B35 拘束性エピトープでは Nef に特異的な CTL が最も主要な応答を形成していた。約 20 人の日本人 HIV 感染者の検体を用いて、Nef に対する CTL 応答をさらに詳しく調べたところ、HIV 感染症の急性期と慢性期で認識するエピトープが異なっていることを見いだした。

(2) 抗体工学を用いた HIV 抗原検出プロトコルの開発と応用(熊谷)

ヒト細胞上の HIV 抗原を追跡に必要な抗体作製を、T 細胞受容体(TCR)と抗体の機能・構造が類似している点に着目し、TCR の相補性決定領域(CDR)を抗体フレームワークに移植することで、HIV 抗原ペプチド-主要組織適合性抗原複合体(pHLA)認識能を賦与した TCR グラフト抗体断片の作製を行った。その結果、設計した TCR グラフト抗体は、大腸菌発現系において不溶性画分に発現されたが、巻き戻し操作によって調製することに成功し、表面プラズモン共鳴測定により pHLA への結合能も確認した。

(3) プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析(荒木)

高感度定量的質量分析で、スタンダードサンプルにおける最も高感度な最適定量解析条件、およびそれに付随する解析プログラムを検討した。nanoLC-ESI-QqTOF(四重極飛行時間型ハイブリッド型質量分析計)および nano-LC-ESI-trapQQQ(四重極型タンデム

質量分析計)を用いて、iTRAQ (isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM (Multiple Reaction Monitoring)法を確立し、少なくともスタンダードペプチドの定量解析において、1-10 att mol の感度で検出同定可能であることが判明した。生体から分離され、多くの夾雑物が混入しているサンプルにおいても、10 att mol レベルのペプチドはかなりの確率で定量的に解析できることが示唆された。

D. 考察

(1) 日本人 HIV 感染者における HLA-B35 拘束性 CTL 応答の階層性を明らかとした。興味深いことに最も主要な CTL 応答は急性期にのみ観察され、慢性期にはほぼ消失していることが分かった。このことから、病態進行に伴い、提示される抗原ペプチドが変遷することが示唆された。

(2) CDR グラフティングは、抗体のヒト型技術として開発されたが、今回の研究によって、構造上の類似性が高ければ、抗体間に限らず TCR と抗体間でも可能であることが示された。現在の TCR グラフト Fv, scFv 断片は大腸菌から調製可能であったが、構造が不安定であり、今後の高機能化や HIV 抗原探索等の利用へ向けて構造の安定化が必要である。

(3) 通常のペプチド/タンパク質同定で用いるプロトコルに加えてMRM用に構築したプロトコルを用いることで、従来法では定量的なスコアが不十分であった特定のペプチドに関しても非常に高感度に定量的に検出することができることが判明した。通常、MRM は同位体を内部標準とすることで、タンパク質の絶対定量、相対定量が可能であるが、今回、iTRAQ 法を用いることにより相対的な定量プロトコル開発することができた。次の課題として、最も高感度に定性の高いデータを得るためのサンプルの前処理法を最適化する必要がある。

E. 結論

本年度は、3年計画の初年度として、HIV 感染者の基礎的なデータ取得、新しい方法論創製のための材料作りとアッセイ法の検討

を中心に研究を展開した。その結果、(1) HIV感染者でCTLに認識される抗原ペプチドは病態進行とともに変遷すること、(2) TCR グラフティングによりペプチド・MHC複合体を特異的に認識する抗体工学スキームを確立したこと、(3) 10 att mol レベルで抗原ペプチドの構造と量を測定可能な質量解析法を立ち上げたことの3つの成果を得た。

F. 研究発表

詳細は別紙参照。

研究代表者

上野貴将

- (1) **T. Ueno**, C. Motozono, S. Dohki, P. Mwimanzi, S. Rauch, O. T. Fackler, S. Oka, M. Takiguchi (2008) CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J. Immunol.* 180, 1107-1116
- (2) T. Tsukamoto, S. Dohki, **T. Ueno**, M. Kawada, A. Takeda, M. Yasunami, T. Naruse, A. Kimura, M. Takiguchi, T. Matano (2008) Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 22, 993-994
- (3) C. Motozono, S. Yanaka, K. Tsumoto, M. Takiguchi, **T. Ueno** (2009) Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, in press

研究分担者

熊谷泉

- (1) Asano R., Kawaguchi H., Watanabe Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., **Kumagai I.**: Diabody-based recombinant formats of humanized IgG-like bispecific antibody with effective

retargeting of lymphocytes to tumor cells.", *J. Immunother*, 31, 752-761 (2008)

- (2) Asano R., Sone Y., Ikoma K., Hayashi H., Nakanishi T., Umetsu M., Katayose Y., Unno M., Kudo T., **Kumagai I.**, "Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized anti-EGFR antibody 528", *Protein Engineering Design & Selection*, 10, 597-603 (2008)
- (3) Hattori T., Umetsu M., Nakanishi T., Tsumoto K., Ohara S., Abe H., Naito M., Asano R., Adschiri T., **Kumagai I.**, "Grafting of material-binding function into antibodies Functionalization by peptide grafting", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, 751-757 (2008)
- (4) Umetsu M., Hattori T., Kikuchi S., Muto I., Nakanishi T., Watanabe H., **Kumagai I.**, "Nanoparticles with affinity for biopolymer: Bioassisted room-temperature selective multi stacking of inorganic particles on biopolymer film", *Journal of Materials Research*, 23, 3241-3246 (2008)

荒木令江

- (1) Junking M, Wongkham C, Sripan B, Sawanyawisuth K, **Araki N**, Wongkham S. Decreased expression of galectin-3 associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur. J. Cancer*. 2008 44(4):619-26
- (2) Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H,

- and Araki N. Neurofibromatosis Type I tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neurite outgrowth of PC12 cells *via* its associating protein, CRMP-2. *J. Biol. Chem.* 2008, Apr 4;283(14):9399-413.
- (3) Sakamoto T, Uezu A, Kawauchi S, Kuramoto T, Makino K, Umeda K, Araki N., Baba H, Nakanishi H. Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain. *Genes Cells.* 2008 13(4):295-312.
- (4) Zhang D, Shimizu T, Araki N., Hirota T, Yoshie M, Ogawa K, Nakagata N, Takeya M, Saya H. Aurora A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene.* 2008 17;27(31):4305-14.
- (5) Ihara T, Ishii T, Araki N., Wilson A, and Jyo A. Silver Ion Unusually Stabilizes the Structure of Parallel-motif DNA Triplex. *Journal of the American Chemical Society.* In press.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特願 2008-135007
発明者：熊谷泉、梅津光央、渡邊秀樹、上野貴
将、本園千尋
発明の名称：T細胞受容体を模倣する抗体断片
及びその製造方法

Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築
（ヒト T 細胞による HIV 抗原認識の解析）

研究代表者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨

ヒト CTL が応答する HIV 抗原とその階層性を明らかにするために、日本人 HIV 感染者の検体を用いて、Pol, Env, Nef 由来の 5 種類のエピトープに対する CD8 陽性 T 細胞数を HLA テトラマー法で解析した。その結果、HLA-B35 拘束性エピトープでは Nef に特異的な CTL が最も主要な応答を形成していた。約 20 人の日本人 HIV 感染者の検体を用いて、Nef に対する CTL 応答をさらに詳しく調べたところ、HIV 感染症の急性期と慢性期で認識するエピトープが異なっていることを見いだした。このような CTL 応答の変化と病態進行が相関することは極めて興味深い。翌年度以降、ヒト抗原提示システムの寄与を解析する上で極めて有効なモデル系になると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、3 年計画で HIV の自然感染過程で、ヒト CTL が応答する抗原とその階層性を明らかにすることを目的としている。本年度は、HLA テトラマー技術を用いてさまざまな HIV 抗原に対する CTL 応答を解析することを目指した。HLA クラス I 遺伝子型が明らかな多くの日本人感染者検体を集めるとともに、CTL 特異性と階層性を解析した。

B. 研究方法

さまざまな病態にある HIV 感染者（表 1）から提供していただいた血液検体（国立国際医療センター・岡先生の協力の下）から、血漿（ウイルス RNA の抽出）と血球（CTL の解析）を調製した。同時に血球の一部を用いて、HLA クラス I 遺伝子タイピングを行った（HLA 研究所）。また、HIV 抗原に対して特異的な CTL クローンを樹立して、クロミウム放出アッセイを用いて CTL の抗ウイルス活性を評価した。ペプチド・HLA クラス I 複合体（HLA テトラマー）は、大腸菌で生産した組換え蛋白質をリフォールディング後、クロマトグラフィーを組み合わせて精製した。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関（熊本大学および国立国際医療センター）の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。また、HLA 遺伝子タイピングについては、ヒト遺伝子解析に関わる研究として、同じく関連機関の倫理審査委員会の審議を受け、承認されている。どちらの場合も、提供者の文書による承諾と個人情報の保護に万全を期すことを含め、承

表 1 Summary of HLA-B35* subjects used in this study

Pat.	HLA class I allele	Months since seroconversion (log10/ml)	Viral load (copies/ml)	CD4 (copies/ml)	Antiretroviral therapy	Nef sequence	PRAC availability
001	A2402/A2603, B3501/B4002	132	ND	227	+	SPQVFLAINTY	-
		192	3.9	223	+	SPQVFLAINTY	+
003	A2402/A2601, B3501/B5101	72	ND	480	-	SPQVFLAINTY	-
		144	ND	252	+	SPQVFLAINTY	+
006	A24A26, B35B52	48	ND	102	+	SPQVFLAINTY	+
015	A11A24, B35B54	147	BD	383	+	SPQVFLAINTY	+
018	A24A33, B35B44	7	ND	43	-	SPQVFLAINTY	-
017	A24A24, B35B48	192	BD	254	+	SPQVFLAINTY	-
019	A2402*, B3501/B5201	18	4.7	524	-	SPQVFLAINTY	-
		80	BD	1574	+	SPQVFLAINTY	+
025	A24A31, B35	36	ND	50	+	SPQVFLAINTY	+
027	A24A26, B35B44	4	ND	84	+	SPQVFLAINTY	-
033	A5207/A3101, B3501/B4601	72	5.3	326	-	SPQVFLAINTY	+
034	A2402/A2601, B3501/B4601	48	4.4	207	-	SPQVFLAINTY	+
042	A24A31, B35B60	58	3.8	311	-	SPQVFLAINTY	+
044	A2, B35B41	48	BD	263	+	SPQVFLAINTY	+
069	A2402*, B3501/B401	12	3.9	964	-	SPQVFLAINTY	+
100	A2601*, B3501/B4001	18	5.0	614	-	SPQVFLAINTY	+
102	A2402/A2206, B3501/B5702	17	2.8	482	-	SPQVFLAINTY	+
131	A2402/A2207, B3501/B4601	10	1.9	563	+	SPQVFLAINTY	+
136	A2402/A2601, B3501/B5201	15	4.4	306	-	SPQVFLAINTY	+
141	A2201/A3101, B3501/B5401	10	5.3	382	-	SPQVFLAINTY	+
		20	5.1	360	+	SPQVFLAINTY	+
145	A2207/A2601, B3501/B5101	6	BD	845	-	SPQVFLAINTY	+
		18	4.8	885	-	SPQVFLAINTY	+
181	A2402/A2601, B3501/B5401	13	2.3	955	-	SPQVFLAINTY	+
188	A2601*, B3501*	6	2.3	408	+	SPQVFLAINTY	+
179	A2601/A3101, B3501/B4601	8	2.7	568	+	SPQVFLAINTY	+

ND, not determined; BD, below detection limit

認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

C. 研究結果

(1) HIV 抗原に対する CTL 応答の階層性の解析

HIV に感染するとヒト CTL は HIV 由来の複数の抗原に応答することが知られている。しかしながら、欧米あるいはアフリカの cohorts を用いた解析結果は多く報告されているが、日本人でのデータはほとんど分かっていない。そこで、日本人の約 15% が保有する HLA-B35 アリルをもとに、HIV に対するヒト CTL 応答を日本人感染者の検体を用いて検索した。HLA-B35 に提示されることが知られている Pol. Env, Nef 由来の 5 種類の CTL 抗原ペプチドを用いて HLA テトラマーを合成した。まず 5 人の健常ボランティア検体を用いて、バックグラウンドを測定したところ、全 CD8 陽性 T 細胞の 0.025% 以下という極めて低い値を得た。次に、7 人の慢性感染者から得た PBMC 試料を HLA テトラマーで染色して、フローサイトメトリーで解析した。その結果を統計学的に解析したところ(図 1)、ヒト CTL は、Nef 由来エピトープに対して最も強い応答を示したが、Pol 由来エピトープに対する応答は非常に低いことが分かった。

(2) CTL 応答の経時的変化

この 11mer から成る Nef エピトープの配列 (RPQVPLRPMTY) を注意深く見たところ、HLA-B35 と結合するモチーフが 2 つ含まれていることに気が付いた。そこで、互いに相重なる 2 つの抗原ペプチド {VY8 (VPLRPMTY) と RY11 (RPQVPLRPMTY)} の HLA テトラマーを別々に調製して、感染者の PBMC 検体を解析した。その結果、それぞれのペプチドは、互いに異なるエピトープとして CTL に認識されていることが明らかとなった(図 2A)。さらに 19 人の HIV 感染者検体を用いて、両エピトープに対する CD8 陽性 T 細胞応答を解析した。両エピトープに対する応答性は感染者ごとに異なっていたが、興味深いことに、両エピトープに対して同時に強い応答性を示した感染者は

いなかった(図 2B)。さらに、VY8 または RY11 に主要な応答を示した感染者を分類して、病態やウイルス量などさまざまな要因について比較検討した。その結果、HIV に感染してからの期間に統計学的に有意な差が認められた(図 2C)。すなわち、感染急性期または早期(感染後 2 年以内)の感染者では VY8 に対して強い CTL 応答を示すが、慢性期(感染後 5 年以上)では RY11 に強い応答を示すことが分かった。

D. 考察

本研究では、日本人 HIV 感染者における CTL 応答の階層性を明らかとしたが、興味深いことに最も主要な CTL 応答は急性期にのみ観察され、慢性期にはほぼ消失していることが分かった。病態進行に伴うこのような CTL 応答の経時変化に抗原提示システムがどのように関わっているか非常に興味深い。翌年度以降の研究計画に組み込んでいくことが期待される。

E. 結論

HLA-B35 拘束性 CTL 応答をモデルとして、日本人感染者の HIV に対する CTL 応答の全体像が明らかとなった。CTL が応答するエピトープが病態進行とともに経時的に変化することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) **T. Ueno**, C. Motozono, S. Dohki, P. Mwimanzi, S. Rauch, O. T. Fackler, S. Oka, M. Takiguchi (2008) CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J. Immunol.* 180, 1107-1116

2) T. Tsukamoto, S. Dohki, **T. Ueno**, M. Kawada, A. Takeda, M. Yasunami, T. Naruse, A. Kimura, M. Takiguchi, T. Matano (2008) Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 22, 993-994

3) C. Motozono, S. Yanaka, K. Tsumoto, M. Takiguchi, T. Ueno (2009) Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, in press

2. 学会発表

- 1) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将: 抗原ペプチド・MHC 複合体の安定性は T 細胞の抗ウイルス機能に影響する、ワークショップ「ウイルス感染-2」第 38 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館、2008 年 12 月 1 日-3 日
- 2) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将: HIV 特異的 T 細胞の抗原特異性と抗原変異に対する交差反応性、一般口演「レンチウイルス、HIV(7)」第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山コンベンションセンター、2008 年 10 月 26-28 日
- 3) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The decay of peptide-MHC complex influences antiviral activity of HIV-specific CTLs. 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- 4) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effect of TCR-peptide-MHC interactions on antiviral activity and cross-reactive capacity of HIV-specific CTLs. Keystone Symposia (HIV vaccine and HIV pathogenesis), March 26-April 1, 2008, Banff, Alberta, Canada.
- 5) Takamasa Ueno: The balance of power: Nef and CTL, Immunology I 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- 6) 上野 貴将: ヒト免疫監視システムと HIV の適応馴化、シンポジウム 4 「ヒトはなぜエイズになるのか」第 22 回日本エイズ学会学術集会・

総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日-28 日

- 7) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将: 抗原ペプチド複合体の内在的安定性は CTL の抗ウイルス活性に影響する、一般口演「O-37 免疫」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日-28 日
- 8) Mwimanzhi Philip, Mamoru Fujiwara, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages, Poster session 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- 9) Mwimanzhi Philip, 藤原守、滝口雅文、上野 貴将: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages, 一般口演「O-35」アクセサリー」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日-28 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2008-135007

発明者: 熊谷泉、梅津光央、渡邊秀樹、上野 貴将、本園千尋

発明の名称: T 細胞受容体を模倣する抗体断片及びその製造方法

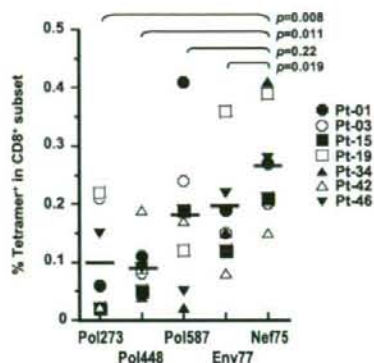


Fig. 1 HLA-B*35-restricted CD8 T cell responses to HIV-1

Cryo-preserved PBMC of 7 HIV-infected patients were stained with HLA-B*35 tetramers in complex with indicated peptides. The PBMC samples used for each patient were as follows: Pt-01, Sep. 1999; Pt-03, Jun. 2002; Pt-15, Jun. 2001; Pt-19, May 2001; Pt-34, Apr. 2001; Pt-42, Aug. 2001; Pt-46, Apr. 2001 (see Table 1). The frequency of tetramer⁺ CD8⁺ in the total CD8⁺ subset was plotted in the graph. Bars indicate the mean for each group. It should be noted that the background level of staining was 0.025% for all tetramers used, as determined by the data with at least 5 HIV-negative donors (mean + 3x SD).

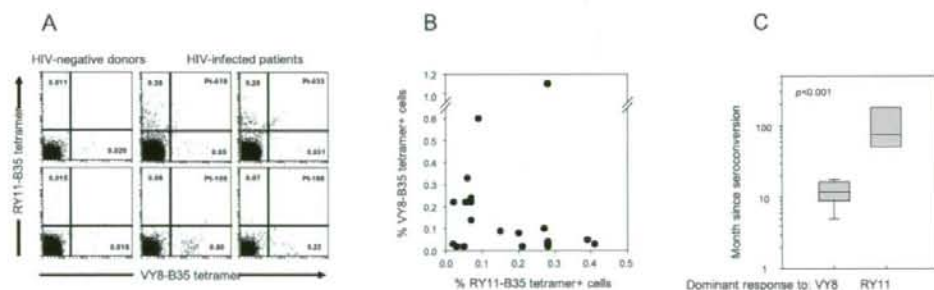


Fig 2. HLA-B35-restricted CTL responses toward Nef.

(A, B) PBMC samples isolated from 5 HIV-negative and 19 HIV-positive donors were analyzed by flow cytometry by using HLA-B*3501 tetramers in complex with VY8 or RY11 peptides. Cells that were CD3⁺CD8⁺ were gated and then analyzed for their frequency of HLA-tetramer⁺ cells. Some representative dot plots of 2 HIV-negative and 4 HIV-positive donors are shown with frequencies of HLA-tetramer⁺ cells in each dot plot (A). The frequencies of HLA-tetramer⁺ cells for VY8 and RY11 epitopes in each individual subject are shown (B). It should be noted that reversing the fluorochromes of the tetramers gave identical results and that the background level of HLA-tetramer staining was 0.022%, as determined by the data from 5 HIV-negative donors (mean + 3 SD).

(C) Differences in months since seroconversion between the subject groups who showed dominant CD8 T cell responses to VY8 or RY11 epitope. Boxes indicate values between 25th and 75th percentiles. Horizontal lines across boxes indicate the median value \pm SD. Lines extend from the box to the highest and lowest values. Statistical analysis was performed by using the Mann-Whitney test.

分担研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築
（抗体工学を用いた HIV 抗原検出プローブの開発と応用）

分担研究者 熊谷 泉 東北大学大学院工学研究科 教授

研究要旨 本研究では、ヒト細胞上の HIV 抗原を追跡に必要な抗体作製を、T 細胞受容体 (TCR) と抗体の機能・構造が類似している点に着目し、TCR の相補性決定領域 (CDR) を抗体フレームワークに移植することで、HIV 抗原ペプチド-主要組織適合性抗原複合体 (pHLA) 認識能を賦与した TCR グラフト抗体断片の作製を行った。その結果、設計した TCR グラフト抗体は、大腸菌発現系において不溶性画分に発現されたが、巻き戻し操作によって調製することに成功し、表面プラズモン共鳴測定により pHLA への結合能も確認した。

A. 研究目的

本研究の「ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築」の達成には、ヒト細胞上の HIV 抗原を追跡し、抗原の動態が T 細胞の認識と抗ウイルス機能に与える影響を解析する必要がある。そのためには、HIV 抗原ペプチド-主要組織適合性抗原複合体 (pHLA) へ特異的な抗体分子の開発は、HIV 抗原の追跡とペプチドの提示動態解析に必要であるが、現在国際的な試みにも関わらず、成功例がきわめて限定的である。

そこで本分担研究では、T 細胞受容体 (TCR) と抗体の機能・構造上の類似に着目し、TCR の相補性決定領域 (CDR) に集約される抗原結合能を抗体フレームワークに移植することで、pHLA 認識能を賦与した TCR グラフト抗体の作製に向け取り組んだ。

B. 研究方法

抗体設計は CDR グラフティंगを基盤とし、TCR の CDR 全 6 箇所を抗体可変領域断片のフレームワーク領域へ移植した。設計した一次構造を基に分子モデリングを行い、予測される TCR 様抗体の構造モデルを立ち上げた。同様に鋳型とした TCR の構造モデルも構築し、両者を重ね合わせた上で比較し、移植に伴うループ形状の変化を極力抑制するために適宜、アミノ酸置換、変異導入を行

い、またフレームワークとして、大腸菌での高発現、高安定性が確認されているヒト抗体クローンの可変領域断片 (Fv) を用いることに留意した。作製した TCR グラフト抗体を大腸菌発現系により調製、遺伝子産物を菌体内不溶性顆粒として回収し、段階透析法により巻き戻した。ゲルろ過クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及び円偏光二色性 (CD) スペクトルにより巻き戻し産物の構造を評価した。さらに良好な構造を示す分子形状を模索するため、Fv 中の VH-VL ドメイン間を柔軟なポリペプチドリンカーで連結した一本鎖 Fv (scFv) を構築し、再度 CD スペクトルの測定を行った。次に、作製した抗体分子を用いて、フローサイトメトリー (FCM) と表面プラズモン共鳴 (SPR) 試験による結合試験を行った。SPR 試験では、結合パラメータの算出と共に、異なるペプチドを提示したクローンに対する交差活性の評価も行った。

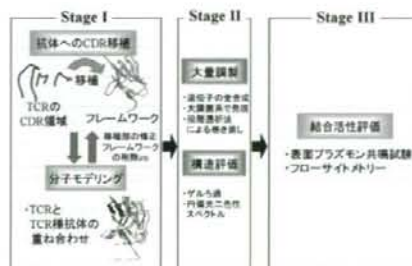


図1. CDR グラフティंगによる TCR グラフト抗体作製

C. 研究結果

TCR 様抗体の構造評価

TCR グラフト Fv 断片をゲル濾過クロマトグラフィー, SDS-PAGE, CD スペクトルにより分子形状を評価したところ、天然の抗体断片と同様に β 構造を含むヘテロ 2 量体を形成することを確認したが、天然の抗体と比較すると、ランダムな構造を含む割合が高かった (図 2a)。一方、ドメイン間をリンカーで連結した scFv の場合、CD スペクトルでは β 構造の存在を示す 200nm 付近のシグナル上昇が観測され、Fv 断片よりも β 構造の割合が高い分子が構築できたことが示唆された (図 2b)。これは、CDR グラフティングによって、VH-VL 間相互作用が弱くなるが、リンカーによる両ドメインの連結が相互作用の弱体化を補てんし、二次構造を天然型に近付けたためと考えている。

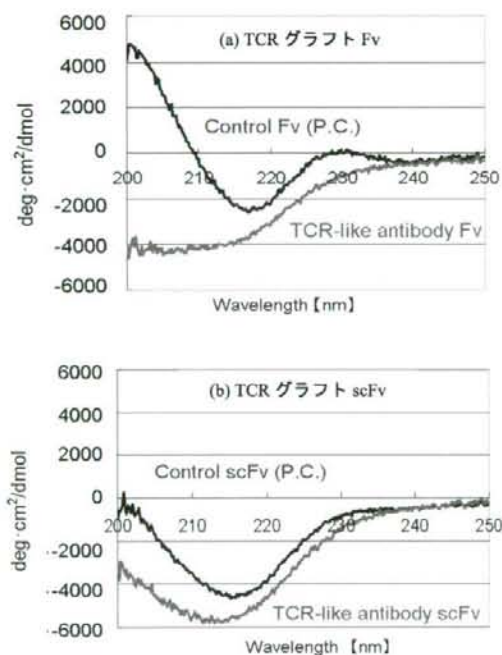


図 2. CDR グラフト Fv (a), scFv(b) の CD スペクトル

TCR 様抗体の結合活性評価

標的とした pHLA を固定化した樹脂ビーズを用いた FCM の結果、TCR グラフト scFv を用いた pHLA に対する結合が観測された。さらに TCR グラフト scFv を用いた SPR 試験の結果、TCR に類似した、解離の早い結合特性が観測された (図 3)。また、平衡値を用いたスキッチャードプロットを行い、結合パラメータの算出を行った結果、通常の TCR が pHLA への結合の際に示す結合パラメータに近い値 (解離平衡定数 $K_D = 10^{-5} \sim 10^{-6} M$) が得られた。さらに、提示ペプチドの配列が異なる pHLA に対する交差活性を評価したところ、TCR 様抗体は 3 残基の配列の違いを判別する特異性を有することが明らかになった (図 4)。これらの結果から、TCR 由来の CDR 配列が、抗体に移植された後も機能を保持していると示された。

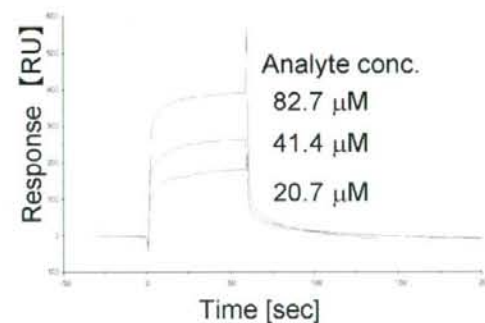


図 3. SPR による TCR グラフト scFv の pHLA に対する結合活性評価

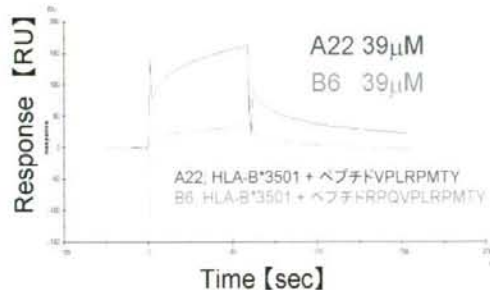


図 4. TCR グラフト scFv の提示ペプチドの配列が異なる pHLA に対する交差活性評価

D. 考察

CDR グラフティングは、抗体のヒト型技術として開発されたが、今回の研究によって、構造上の類似性が高ければ、抗体間に限らずTCRと抗体間でも可能であることが示された。現在のTCR グラフト Fv, scFv 断片は大腸菌から調製可能であったが、構造が不安定であり、今後の高機能化や HIV 抗原探索等の利用へ向けて構造の安定化が必要である。

E. 結論

TCR の CDR を抗体に移植するという新規な手法により、TCR 様の特異性及び結合活性を有する抗体の創出に成功した。今後、分子進化的手法を用いた高親和性・高安定性クローンの取得や多価化抗体の作製による高機能化・構造安定化が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Asano R., Kawaguchi H., Watanabe Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., "Diabody-based recombinant formats of humanized IgG-like bispecific antibody with effective retargeting of lymphocytes to tumor cells.", *J. Immunother*, 31, 752-761 (2008)
- (2) Asano R., Sone Y., Ikoma K., Hayashi H., Nakanishi T., Umetsu M., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., "Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized anti-EGFR antibody 528", *Protein Engineering Design & Selection*, 10, 597-603 (2008)
- (3) Hattori T., Umetsu M., Nakanishi T., Tsumoto K., Ohara S., Abe H., Naito M., Asano R., Adschiri T., Kumagai I., "Grafting of material-binding function into antibodies Functionalization by peptide grafting", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, 751-757 (2008)
- (4) Umetsu M., Hattori T., Kikuchi S., Muto I., Nakanishi T., Watanabe H., Kumagai I., "Nanoparticles with affinity for biopolymer: Bioassisted

room-temperature selective multi stacking of inorganic particles on biopolymer film", *Journal of Materials Research*, 23, 3241-3246 (2008)

2. 学会発表

- (1) 中西 猛, 渡邊 志緒美, 浅野 竜太郎, 梅津 光央, 熊谷 泉, "ヒト由来自己組織化ペプチドを利用した分子会合制御による低分子抗体の高機能化", 第8回日本蛋白質科学会年会, 船越, 2008
- (2) 梅津 光央, 中西 猛, 田中 圭介, 小池 博之, 水野 稔久, 田中 俊樹, 熊谷 泉, "会合機能ペプチドデザインによるビルドアップ抗体アセンブリ", 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 横浜, 2008
- (3) 小池 博之, 梅津 光央, 中西 猛, 田中 圭介, 水野 稔久, 田中 俊樹, 熊谷 泉, "コイルドコイルを用いた *in vitro* タンパク質間接合による機能性抗体の作製", 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008
- (4) 階上 健太郎, 中西 猛, 浅野 竜太郎, 梅津 光央, 熊谷 泉, "低分子抗体の多価化設計と物理化学的相互作用解析", 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特願 2008-135007 熊谷 泉, 梅津 光央, 渡邊 秀樹, 上野 貴将, 本園 千尋
"T細胞受容体を模倣する抗体断片及びその製造方法"

分担研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築
（プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析）

分担研究者 荒木令江 熊本大学大学院医学薬学研究部 准教授

研究要旨 プロテオミクスの新技術によるアプローチによって、ヒトで提示される HIV 抗原を網羅的、経時的、定量的に解析するシステムを構築している。本年は特に、高感度定量的質量分析で、スタンダードサンプルにおける最も高感度な最適定量解析条件、およびそれに付随する解析プログラムを検討した。nanoLC-ESI-QqTOF(四重極飛行時間型ハイブリッド型質量分析計)および nano-LC-ESI-trapQQQ(四重極型タンデム質量分析計)を用いて、iTRAQ (isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM (Multiple Reaction Monitoring)法を確立し、少なくともスタンダードペプチドの定量解析において、1-10 att mol の感度で検出同定可能であることが判明した。生体から分離され、多くの夾雑物が混入しているサンプルにおいても、10 att mol レベルのペプチドはかなりの確立で定量的に解析できることが示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症においてエイズワクチンへの期待は高い。しかし、ヒト感染免疫系に関する基盤情報は非常に少ないため、対応を極めて困難にしている。本研究では、ヒト細胞で提示される HIV 由来の T 細胞抗原を新たな蛋白化学的アプローチで包括的に解析し、ヒトの感染防御に関わる基盤情報として蓄積することによって、日本人に多い多型性遺伝子の影響を解析し、その情報をデータベース化することで、合理的なワクチン開発を推進することを目指している。そのために、本年度はまず、プロテオミクスによるアプローチにより、ヒト細胞で提示される HIV 抗原を網羅的・定量的に解析するための高感度定量法を確立することを目的とした。特に、高感度定量的質量分析法である iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM(Multiple Reaction Monitoring)法を確立し、スタンダードサンプルにおける最も高感度な最適定量条件、およびそれに付随する解析プログラムを検討した。

B. 研究方法

解析に用いる 3 台の高感度タンデム質量分析計、および付随する nano レベルのクロマトグラフィー装置(nanoLC)、解析ソフト(AnalystQS, AnalystMRM, GPS, ProteinPilot, MASCOT 等)は熊本大学医学総合研究施設にて設備され、我々が管理する体制にある。高感度タンデム質量分析計 nanoLC-ESI-QqTOF (QStarApplied Biosystems)は網羅的なペプチドの同定用に、nanoLC-MALDI-TOF-TOF (MALDI-TOF/TOF4700 Applied Biosystems)はペプチドの高感度検出用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ (QTRAP4000 Applied Biosystems)は高感度定量用に組み合わせて使用した。高感度定量解析法として、iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM(Multiple Reaction Monitoring)法を用いた。nanoLC-ESI-ionTrapQQQ は四重極の分離部を3つもつ質量分析装置で、Q1 でペプチドを分離、選択し、選択されたイオンのみを Q2 で分解し、その分解されたイオンをさらに Q3 で分離して検出を行い、得られたクロマトグラムからデータベース検索を行うことで、大量の

混合物の中から特定のペプチドの同定を高感度かつ定量的に行うことができる。今回用いるMRM法は、ペプチドのイオンとフラグメントイオンの2段階の選別を行うことで、夾雑ピークを軽減することができるため、高感度な検出が可能となる。又、iTRAQ法は、安定同位体によって異なる分子量をもつ4-8種類のペプチド標識試薬を用いて、これらを複数(4-8個)のサンプルの全てのペプチドを個々に標識したのち混合し、LC-MS/MS解析によって同時進行でそれぞれのサンプル由来のペプチドの定量と同定を高感度に行うことができる。しかし、ヒト細胞で提示されるHIV由来のT細胞抗原に関する解析例や方法論の報告はない。また、これらの方法論を組み合わせた定量的解析も例がない。したがって、まず、スタンダード蛋白質/ペプチドによってその感度と分解能、および定量的最適化を計った。

C. 研究結果

まず、スタンダード蛋白質としてBSA, HAS, Ovalbumin, Lysozyme, Caseinを用い、それぞれをトリブシン分解してペプチド化し、おのおの組成を量的に種々に変化させた混合状態で、定量がどのレベルまで可能かどうかを試みた。さらに細胞可溶化サンプルにスタンダードペプチドを添加し、これらのペプチドが特異的に高感度で定量可能であるかどうかを検討した。又、未知のペプチドの同定感度のレベルを検討した。それに伴う質量分析のプロトコール、および、iTRAQ法/MRM法の簡便なプログラムを構築した。

nanoLC (reversed phase) を用いてそれぞれのペプチドを分離した後、onlineでMRMを用いた検出を行った。100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 fmolのスタンダードサンプルの解析の結果、100 atto mol以上のペプチドは15個のチャンネルを組んだペプチドターゲットのうち15個(100%)、10 atto molでは11個、1 atto molでは4個が有意に検出されることが明らかとなった。又、未知のペプチドの最高同定感度は10 atto molレベルと見積もられた。クルードな細胞可溶化物からターゲットとするペプチドの同定感度

は20 atto molレベルであった。

次に、細胞可溶化物から得られたペプチドのiTRAQを用いた網羅的定量的最適化を行った。今回用いた細胞は、我々がもっともよくスタンダード細胞として用いているPC12細胞である。本細胞はラット由来の髄質褐色細胞腫由来神経系細胞であるが、NGF刺激によって神経分化する際に変化する分子群の蛋白質データベースを我々独自で構築しているため、統計学的な解析シミュレーションが可能である。この細胞を50 ng/mlのNGFにより刺激して、48時間後に8M Urea、4% CHAPSを含む溶液でタンパク質を抽出し、アセトン沈殿にて脱塩濃縮後、トリブシンによりタンパク質を消化した。得られたペプチドをiTRAQ(114, 115:NGF-, 116, 117:NGF+)試薬で修飾し、それぞれ等量混合して、陽イオン交換カラムクロマトにより分画したのち、同画分をnanoLC-ESI-QqTOF(Dionex/LCP Ultimate, AB QSTAR Pulsar i)、及びnanoLC-MALDI-TOF-TOF(KYA DiNa-MaP, AB 4700 Proteomics Analyzer)に平行して供し、iTRAQ修飾ペプチドの同定と定量解析を同時進行で行った。iTRAQ修飾を受けた総計約40000個のペプチドの配列を決定し、その結果約5,000種のnon redundantなタンパク質が同定された。そのうち定量的にハイスコアであった約1500種のタンパク質から、NGF刺激により発現上昇および減少を示した候補として、それぞれ135および123種のタンパク質(ペプチド約1000個)が定量的にリストアップされた。それぞれのMS解析において同定されたトータルペプチドの数はnanoESI-QqTOFにおいては12,769個、nanoMALDI-TOF-TOFにおいては14,710個で、これらのペプチドは95% (confidence)以上の高い信頼性で定量的に同定されていた。さらに、MRM法によって混合サンプル内の特定のペプチドの同定が可能であるかどうかを確認するため、定量的情報が不十分であったVGFペプチド(DDSVPEVR)に関して、同iTRAQ標識の細胞可溶化混合サンプルを用いてMRM法によって高感度解析を行ったところ、コントロールに対して対照群において3.3倍量であった。これらの結果から、従来の方法論では定量できなかった本ペプチ

下の定量的同定が、iTRAQ 法と MRM 法を融合的に用いることによって、ほぼ正確にできることが判明した。

D. 考察

通常のパプチド/タンパク質同定で用いるプロトコールに加えてMRM用に構築したプロトコールを用いることで、従来法では定量的なスコアが不十分であった特定のペプチドに関して非常に高感度に定量的に検出することができることが判明した。通常、MRMは同位体を内部標準とすることで、タンパク質の絶対定量、相対定量が可能であるが、今回、iTRAQ法を用いることにより相対的な定量プロトコール開発することができた。HLAクラスIに、自己由来の多種類のペプチドが載っているコントロール細胞と対象となる抗原を得意的に結合している細胞から、それぞれ分子量5000以下のペプチドを回収し、各々をiTRAQ標識することによって、バックグラウンドをsubtractionしながら、目的ペプチドを定量的に同定できるシステムが構築できる可能性がある。以下の抗原ペプチド候補に関しての定量的なシステム作りを現在行っている。

(1) VY8 (VPLRPMTY)

(2) RY11 (RPQVPLRPMTY)

(3) RM9 (RPQVPLRPM)

これらに加えて、サンプルの処理方法に関する最適化が重要であり、今後、最も高感度に定量性の高いデータを得るためのサンプル調製法の最適化を行う必要がある。

E. 結論

プロテオミクスの高感度かつ high throughput な新技術によるアプローチによって、ヒトで提示される HIV 抗原を網羅的、経時的、定量的に解析するシステムを構築する目的で、MRM法、およびiTRAQ法の最適化を行った。特に、高感度定量的質量分析で、スタンダードサンプルにおける最も高感度な最適定量解析条件、およびそれに付随する解析プログラムを検討した。nanoLC-ESI-QqTOFおよびnano-LC-ESI-trapQQQを用いて、iTRAQ (isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法およびMRM (Multiple

Reaction Monitoring)法を確立し、少なくともスタンダードペプチドの定量解析において、1-10 att mol の感度で検出同定可能であることが判明した。本法をもちいることによって、生体由来の混合物混在下におけるサンプルにおいても、少なくとも20 att mol以上のペプチドが確実に定量的に解析できることが示唆された。本方法論は、HIV抗原の高感度定量的同定法として応用可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Junking M, Wongkham C, Sripa B, Sawanyawisuth K, Araki N, Wongkham S. Decreased expression of galectin-3 associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur. J. Cancer*. 2008 44(4):619-26

2) Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, and Araki N. Neurofibromatosis Type I tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neurite outgrowth of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *J. Biol. Chem*. 2008, Apr 4;283(14):9399-413.

3) Sakamoto T, Uezu A, Kawauchi S, Kuramoto T, Makino K, Umeda K, Araki N, Baba H, Nakanishi H. Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain. *Genes Cells*. 2008 13(4):295-312.

4) Zhang D, Shimizu T, Araki N, Hirota T, Yoshie M, Ogawa K, Nakagata N, Takeya M, Saya H. Aurora A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene*. 2008 17;27(31):4305-14.

5) Ihara T, Ishii T, Araki N, Wilson A, and Jyo A. Silver Ion Unusually Stabilizes the Structure of Parallel-motif DNA Triplex. *Journal of the American Chemical Society*. In press.

2. 学会等発表

1) 第56回質量分析総合討論会、「データベースからひもとく質量分析情報学」シンポジウム招待講演、5月16日、つくば国際会議場エポカル、融合プロテオミクスによるデータベースの腫瘍研究への応用、荒木令江、茨

城県つくば市

2) 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会, シンポジウム, 7月30日, ホテル阪急エキスポパーク, Functional Analysis of Neuronal Cellular Tumor Suppressors by Assembled Proteomic Strategies, Norie Araki, 大阪府吹田市

3) MPSA2008, プレカンファレンス『プロテオミクスの最新技術』招待講演, 8月26日, 北海道大学学術交流会館, 疾患プロテオーム解析の新技術, 荒木令江, 北海道札幌市

4) MPSA2008, oral lecture, 8月29日, 北海道大学カンファレンスホール, Analysis of the specific proteins related to chemotherapy sensitivete in gliomas by assembled proteomic strategies, Norie Araki, 北海道札幌市

5) 第32回蛋白質と酵素の機能と構造に関する九州シンポジウム, 9月13日, 阿蘇リゾートグランリヴィオホテル, プロテオミクス手法を用いたNGF刺激により誘導されるPC12細胞の分化に関わる新規蛋白質の同定とその役割, 小林大樹, 荒木令江, 熊本県阿蘇市

6) 第67回日本癌学会学術総会, ワークショップ, 10月29日, 名古屋国際会議場, Regulation of neuronal cellular differentiation via NF1 tumor suppressor gene product, neurofibromin, 荒木令江, 愛知県名古屋市

7) 第54回日本病理学会秋季総会, 招待講

演(ランチョンセミナー), 11月20日, 松山市総合コミュニティーセンター, 最先端融合プロテオミクスによる疾患の病態解析への応用, 荒木令江, 愛媛県松山市

8) 日台シンポジウム, 招待講演, 12月4日, 台湾台北市中央研究院, Assembled Proteomics on Brain Tumors, 荒木令江, 台湾台北市

9) BMB2008, 12月9日~12月12日, ワークショップ, 12月11日, 神戸国際会議場, p53を介した虚血ストレスによる神経細胞死メカニズムの機能プロテオミクス, 荒木令江, 兵庫県神戸市

10) 大分大学平成20年度先端医工学研究センターセミナー, 招待講演, 1月23日, 大分大学卒後臨床研修センターセミナー室, プロテオミクスによる疾患メカニズム解析と治療標的分子検索への戦略, 荒木令江, 大分県由布市

11) 日本農芸化学会2009年度大会, シンポジウム招待講演, 3月28日, マリンメッセ福岡, 最新プロテオーム解析技術の健康科学への応用, 荒木令江, 福岡県福岡市

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)