

201009004A

**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22年度 総括・分担研究報告書**

研究代表者 上野 貴将

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書**

研究代表者 上野 貴将

平成23(2011)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	14
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	17
荒木 令江 (熊本大学大学院生命科学研究部 准教授)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
-----------------------	----

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	熊本大学大学院生命科学研究部	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と、それらを用いた CTL 抗原ペプチドの蛋白化学解析を目指した。その結果、本年度は以下の成果を得た。(1) CTL に強い抗ウイルス活性を与える抗原ペプチドは、HLA 分子と熱力学的に安定で、かつ構成分子が相互に共同的な複合体を形成していることを明らかとした。(2) 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 グラフト抗体断片を IgG 化させた TCR グラフト IgG 抗体の培養と、得られた TCR グラフト IgG 抗体の HLA 受容体に対する結合活性を表面プラズモン共鳴測定によって解析した。(3) nanoLC-ESI-QqTOF(四重極飛行時間型ハ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、より簡便かつ高感度なプロトコールを確立することによって、細胞表面からコンスタントに約 18000 個のペプチドを同定することが可能となった。

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)から、末梢単核球(CTL の解析)を調製した。その一部を用いて、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精製した。さらに T 細胞レセプター(TCR)遺伝子をクローニングして、TCR が欠損した T 細胞に遺伝子導入し、抗原ペプチド、HLA クラス I および TCR の相互作用を詳細に解析した。

(2) 昨年度に作製した TCR グラフト IgG 重鎖発現ベクター(pcDNA TCR VH-Fc)と TCR グラフト IgG 軽鎖発現ベクター(pcDNA TCR VL-CL)を用いて、当研究室において CHO 細胞発現系を用いた大量培養の際に利用している無血清培地である CHO 細胞用 SFM(Serum Free Medium、GIBCO)及び DMEM(SIGMA)を用い、HEK 293 細胞によるタンパク質一過性発現系の構築を行った。

(3) 質量分析を用いた解析には、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, MRM pilot, MRM quant, scheduled MRM program, GPS, ProteinPilot, MASCOT 等) を用いた。これらは当研究施設 (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 (QStar Elite, purler, および 5600, Applied Biosystems) は網羅的なペプチドの同定用に、nanoLC-MALDI-TOF-TOF (MALDI-TOF/TOF4700, 5800, Applied Biosystems) はペプチドの高感度検出用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ (QTRAP4000, 5800, Applied Biosystems) は高感度定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用した。高感度定量解析法として、IDA (Information Dependant Acquisition) 法の改良法および MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法、ProteinPilot 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)

ペプチドと MHC の結合を安定させる変異は、VY8-5A、RY11-8A とともに、Nef 蛋白質としては、同じく 82 番目のアミノ酸である。そこで、この側鎖をアラニンに置換した変異体をターゲット細胞に導入して、CTL の認識と傷害作用に対する影響を解析した。その結果、変異型の Nef 蛋白質の方が、野生型の Nef を発現している細胞よりも、いずれの CTL においても、CTL によって認識されやすくなっていることが明らかとなった (図

2)。このことから、ペプチド・MHC 複合体を安定させると、CTL によって殺傷されやすくなると示唆された。

さらに、よりよく CTL に認識されるペプチド・MHC 複合体とは、どのような性質を持っているかを明らかにするために、まず、ペプチド・MHC 複合体の熱力学的安定性を示差熱解析 (DSC) によって解析した。その結果、ペプチドの解離が遅い VY8 ペプチドおよび VY8-5A では、 T_m (融解温度) が他に比べて高く、熱力学的に見ても安定であることが明らかとなった (図 3)。また、融解曲線のパターンから、ペプチド、HLA 重鎖、 $\beta 2M$ の 3 分子が、互いに共同的に強く複合体を形成していることが明らかになった。

(2) 抗体工学を用いた HIV 抗原検出プローブの開発と応用 (熊谷)

精製した TCR グラフト IgG 抗体の、HLA-B35 に対する結合活性を SPR によって評価した。実験は、検出感度を向上させるために多価効果を有効的に活用した。そのために、センサーチップへは、受容体ではなく TCR グラフト IgG 抗体を固定化させ、展開 (アナライズ) 側を HLA-B35 受容体とした。HLA-B35 は、ビオチン化後にストレプトアビジンと相互作用させることによって 4 量体化させ、多価効果を利用できるようにした。ペプチド A22 (VPLRTPMY) と相互作用させた 4 量体 HLA-B35 を TCR グラフト IgG 抗体が固定化されているセンサーチップ上へ展開させたところ、平衡解離定数が 700 nM 程度の結合活性が観測された。これより、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することによる抗 HLA 抗体の作製は成功したと言える。

(3) プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析 (荒木)

実際のクルードな細胞画分からのペプチドの検出法を検討した。L Cell 細胞表面から回収したペプチド分画は nanoLC-ESI-QqTOF (Dionex/LCP Ultimate, AB QSTAR 5600) を用いて、検出ペプチドアミノ酸配列を同定した。サンプルの確認実験は nanoLC-MALDI-TOF-TOF (KYA DiNa-MaP, AB 5800 Proteomics Analyzer) にて行った。

3K分画。10K分画それぞれから、総計約46,000個(3K分画)、43000個(10K分画)のスペクトルを解析し、アミノ酸4merから36merからなる18156個のペプチドを同定した。confidence 66%以上のペプチドを3K分画では8290個、10K分画では7605個特定し、これらの中から、redundantな配列および、コントロール分画から同定された非特異的配列を除去し、263個のペプチドを細胞膜上に表現されているペプチドとして決定した。これらのアミノ酸配列から推測される蛋白質は約200種類であった。得られたペプチド配列の中から、HLA class I に結合する候補ペプチドとして、アミノ酸8mer~11merからなる約175種類の配列を選択し、Immuno Epitope Database (IEDB), T cell Epitope prediction MHC-I binding predictionにて解析を行なう方法論が構築された。

D. 考察

(1) CTLの抗ウイルス機能は一様ではなく、CTLの抗原特異性によって大きく異なっていた。加えて、強いCTL活性を与える抗原ペプチドは、熱力学的に安定な構造を有していた。本研究では、限られた数の抗原ペプチド・MHC複合体を解析したが、今後、さらに解析数を増やすことによって、CTL活性と抗原ペプチドとの関係をより包括的に明らかにできていくものと期待される。

(2) 昨年度、作製したCDRグラフトによりTCRグラフトIgGのSPRを測定し、ペプチドA22と相互作用させたHLA-B35との結合活性を確認することができた。ペプチドB6と相互作用させたHLA-B35とも同程度の結合が観測されたが、FvやscFv断片では結合が観測されていないことを考えると、多価効果による影響と考えている。

(3) 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HIV抗原を得意的に結合している細胞から、各々の提示ペプチドを回収し、各々から目的ペプチドを高感度に定量的に同定できる可能性が高い。HIV抗原ペプチドのレパートリーは最大で300通りと考えられているため、これら全ての一度に定量的に解析することも可能と考えられる。

E. 結論

本年度は、それぞれの分担課題について、昨年度までに得た成果をもとに、下記の3点について発展的な成果を得ることができた。

(1) CTLに強い抗ウイルス機能を与える抗原ペプチドの性質として、熱力学的な性質を明らかにすることができた。今後のワクチン抗原の選択に大きな示唆を与えるものと思われる。(2) CDRグラフトにより作製したTCRグラフトFv, scFv断片をIgG構造に組み込んだTCRグラフトIgGは、Fv, scFv断片と比較し構造が安定であり、結合活性を有していた。(3) 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、新たな高感度同定定量法をプロトコール化し、生体サンプルへの応用へ向けての最適化を行った。本方法論は、HIV抗原の高感度定量的同定法として有用であることが示唆された。

F. 研究発表

詳細は別紙参照。

研究代表者

上野貴将

- (1) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan, M.A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., Takiguchi, M. Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J. Virol.* 84: 5508-5519, 2010
- (2) Motozono, C., Mwimanzu, P., Ueno, T. Dynamic interplay between viral adaptation and immune recognition during HIV-1 infection. *Protein & Cell* 1, 514-519, 2010
- (3) Sato, Y., Takata, H., Kobayashi, N., Nagata, S., Nakagata, N., Ueno, T. Takiguchi, M. Failure of effector

function of human CD8+ T cells in NOD/SCID/JAK3-/- immunodeficient mice transplanted with human CD34+ hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* 5: e13109, 2010

- (4) Mwimanzi, P., Hasan, Z., Tokunaga, M., Gatanaga, H., Oka, S., **Ueno, T.** Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403, 422-427, 2010

研究分担者
熊谷泉

1. Asano R., Ikoma K., Kawaguchi H., Ishiyama Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Application of the Fc fusion format to generate tag-free bi-specific diabodies., *FEBS J.*, 277, 477-487 (2010)
2. Asano R., Ikoma K., Sone Y., Kawaguchi H., Taki S., Hayashi H., Nakanishi T., Umetsu M., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Highly enhanced cytotoxicity of a dimeric bispecific diabody, the hEx3 tetrabody., *J. Biol. Chem.*, 285, 20844-20849 (2010)
3. Badran A., Asano R., Nakayama M., Watanabe Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kumagai I., Target cell-restricted apoptosis induction by 528scFv-TRAIL fusion protein specific for human EGFR and expressed in *Escherichia coli.*, *Int. J. Oncol.*, 36, 1229-1234 (2010)
4. Umetsu M., Nakanishi T., Asano R., Hattori T., Kumagai I., Protein-protein interactions

and selection: generation of molecule-binding proteins on the basis of tertiary structural information., *FEBS J.*, 277, 2006-2014 (2010)

荒木令江

1. Nambu, T, **Araki, N***, Nakagawa, A, Kuniyasu, A. Kawaguchi, T, Hamada, A. Saito, H: The Contribution of BCR-ABL-independent Activation of ERK1/2 to Acquired Imatinib Resistance in K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Cancer Science*, 101(1):137-42, 2010.
2. Silsirivanit A, **Araki N***, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu H, Kuwahara K, Wongkham S*, Sakaguchi N: A novel serum carbohydrate marker for cholangiocarcinoma: values for diagnostic and prognostic indicators. *Cancer*, in press
3. Esaki K, Terashima Y, Toda E, Yoshinaga S, **Araki N**, Matsushima K, Terasawa H. Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. *Protein Expression and Purification*, 2010 in press

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

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

昨年までに、日本人 HIV 感染者の検体を用いて、ヒト CTL が応答する HIV 抗原とその階層性、および CTL の抗ウイルス活性を解析することにより、CTL が認識する抗原は病態進行とともに経時的に変化すること、抗原ペプチドと HLA が形成する複合体の安定性など抗原ペプチドに内在性の性質が、抗 HIV 機能に優れた CTL 応答に重要であることを明らかとした。本年度は、CTL の抗ウイルス活性に影響を与える抗原ペプチドに内在性の性質を明らかにするため、抗原ペプチド・HLA 複合体の蛋白質としての熱力学的解析を行った。その結果、CTL に強い抗ウイルス活性を与える抗原ペプチドは、HLA 分子と熱力学的に安定で、かつ構成分子が相互に共同的な複合体を形成していることが明らかとなった。本研究の成果は、抗ウイルス活性に優れた T 細胞抗原の選択に極めて重要な示唆を与えるものである。

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し、HIV に対する抗ウイルス活性との関連を解析することを目的としている。昨年までに、日本人 HIV 感染者の検体を用いて、ヒト CTL が応答する HIV 抗原とその階層性、および CTL の抗ウイルス活性を解析することにより、CTL が認識する抗原は病態進行とともに経時的に変化すること、抗原ペプチドと HLA が形成する複合体の安定性など抗原ペプチドに内在性の性質が、抗 HIV 機能に優れた CTL 応答に重要であることを明らかとした。本年度は、CTL の抗ウイルス活性に影響を与える抗原ペプチドに内在性の性質を明らかにするため、抗原ペプチド・HLA 複合体の蛋白質としての熱力学的解析を行った。

B. 研究方法

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）から、末梢単核球（CTL の解析）を調製した。その一部を用

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。さらに T 細胞レセプター（TCR）遺伝子をクローニングして、TCR が欠損した T 細胞に遺伝子導入し、抗原ペプチド、HLA クラス I および TCR の相互作用を詳細に解析した。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者から提供して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) CTLの抗ウイルス活性

昨年までに行った HLA-B35 拘束性の HIV 特異的 CTL の解析結果から、急性感染期に良く認識される VY8 (VPLRPMTY) 抗原に特異的な CTL の方が、慢性期に認識される RY11 (RPQVPLRPMTY) 抗原に特異的な CTL よりも、ウイルス感染細胞に対する傷害活性が高いことが明らかとなった。また、T 細胞レセプター導入細胞を用いたアッセイにより、VY8 ペプチドの方がペプチド・MHC 複合体から解離する速度が著しく遅く、そのことが CTL のターゲット細胞に対する傷害作用発現に影響すると示唆された。本年度は、まずこの現象を確認するために、いくつかの変異ペプチドを合成して、ペプチドのペプチド・MHC 複合体からの解離が遅くなる(より強く結合する)変異体を探した。その結果、VY8 の 5 番目、RY11 の 8 番目をアラニン置換した変異ペプチドは、顕著にペプチドの解離が遅くなることを明らかにした(図 1)。

(2) 変異抗原に対する CTL の傷害活性

ペプチドと MHC の結合を安定させる変異は、VY8-5A、RY11-8A とともに、Nef 蛋白質としては、同じく 82 番目のアミノ酸である。そこで、この側鎖をアラニンに置換した変異体をターゲット細胞に導入して、CTL の認識と傷害作用に対する影響を解析した。その結果、変異型の Nef 蛋白質の方が、野生型の Nef を発現している細胞よりも、いずれの CTL においても、CTL によって認識されやすくなっていることが明らかとなった(図 2)。このことから、ペプチド・MHC 複合体を安定させると、CTL によって殺傷されやすくなると示唆された。

(3) ペプチド・MHC 複合体の示差熱解析よりよく CTL に認識されるペプチド・MHC 複合体とは、どのような性質を持っているかを明らかにするために、まず、ペプチド・MHC 複合体の熱力学的安定性を示差熱解析(DSC)によって解析した。その結果、ペプチドの解離が遅い VY8 ペプチドおよび

VY8-5A では、 T_m (融解温度)が他に比べて高く、熱力学的に見ても安定であることが明らかとなった(図 3)。また、融解曲線のパターンから、ペプチド、HLA 重鎖、 $\beta 2M$ の 3 分子が、互いに共同的に強く複合体を形成していることが明らかになった。

(4) ペプチド・MHC 複合体の円二色偏光スペクトロメトリー

ペプチド・MHC 複合体のうち、 α ヘリックスを構成するのは、MHC 重鎖のみで、3つのヘリックスのうち、2つはペプチド結合領域に位置している。 α ヘリックスを持つ蛋白質は、円二色偏光(CD)スペクトルで特徴的なパターンを示すことが知られている。ペプチド・MHC 複合体の熱変性を CD スペクトルで解析したところ、MHC のペプチド結合領域の高次構造の変性は、VY8 や VY8-5A ペプチド複合体で顕著に異なったパターンを示していた(図 3)。

D. 考察

CTL の抗ウイルス機能は一様ではなく、CTL の抗原特異性によって大きく異なっていた。加えて、強い CTL 活性を与える抗原ペプチドは、熱力学的に安定な構造を有していた。本研究では、限られた数の抗原ペプチド・MHC 複合体を解析したが、今後、さらに解析数を増やすことによって、CTL 活性と抗原ペプチドとの関係をより包括的に明らかにできていくものと期待される。

E. 結論

本研究によって、CTL に強い抗ウイルス機能を与える抗原ペプチドの性質として、熱力学的な性質を明らかにすることができた。今後のワクチン抗原の選択に大きな示唆を与えるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan, M.A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., Takiguchi, M. Different in vivo

effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J. Virol.* 84: 5508-5519, 2010

- (2) ○Motozono, C., Mwimanzi, P., Ueno, T. Dynamic interplay between viral adaptation and immune recognition during HIV-1 infection. *Protein & Cell* 1, 514-519, 2010
- (3) Sato, Y., Takata, H., Kobayashi, N., Nagata, S., Nakagata, N, Ueno, T. Takiguchi, M. Failure of effector function of human CD8+ T cells in NOD/SCID/JAK3^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34+ hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* 5: e13109, 2010
- (4) ○Mwimanzi, P., Hasan, Z., Tokunaga, M., Gatanaga, H., Oka, S., Ueno, T. Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403, 422-427, 2010

2. 学会発表

- (1) Mwimanzi, P., Oniangue-Ndza, C., Allen T.M., and Ueno, T. Nef activity in down regulation of viral receptors and protection of HIV superinfection is modulated by Nef mutations that confer CTL escape during acute infection. 11th KUMAMOTO AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Grand Vrio

Hotel, Kumamoto, Japan, October 6-8, 2010.

- (2) Mwimanzi P., Ueno T. CTL-escape Nef variants influence CCR5 down regulation and HIV superinfection susceptibility. The 14th International Conference of Immunology (ICI), Kobe International Exhibition and Portopia Hotel, Kobe, Japan, August 23-27, 2010.
- (3) Mwimanzi P., Masafumi T., and Ueno T. CTL-escape Nef variants influence CCR5 down-regulation and HIV superinfection susceptibility. Keystone Symposia HIV Vaccines (X5), Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada, March 21-26, 2010.
- (4) Mwimanzi, P., Hassan R., Suzu S., Takiguchi M., Ueno T. The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages. 1st International Young Investigator Symposium, Gene Laboratory, Kumamoto University lecture hall, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, March 4-5, 2010.
- (5) Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution. The 11th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 6-8, 2010.
- (6) Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution. 24th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research. Grand Prince Hotel Takanawa, Prince Sakura Tower, Takanawa, Tokyo; November 24-26, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

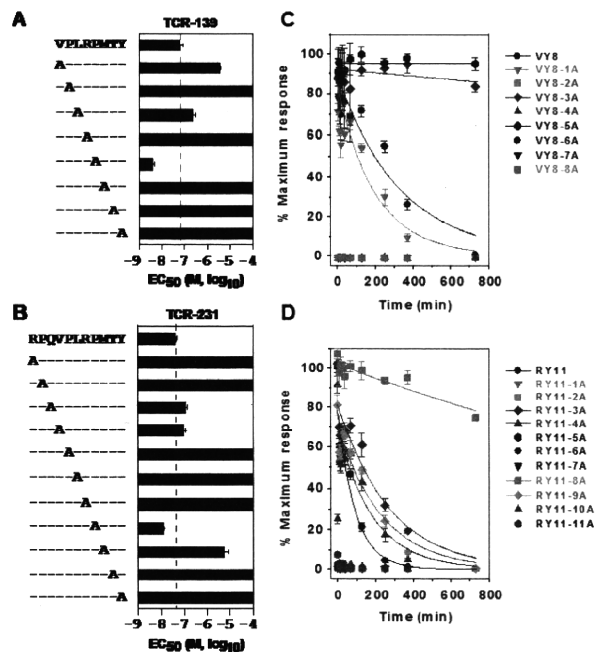


Fig 1. Effects of antigenic variations on pMHC decay.

(A, B) A panel of alanine variants of VY8 and RY11 were examined by conducting T cell sensitization assays for TCR-139 (panel A) and TCR-231 (panel B), respectively. Amounts of IL-2 secreted by TG40 cells were determined under the no-wash condition. The maximum concentration of the peptides tested was 100 μ M. The EC₅₀ values (means \pm SD) were obtained by performing triplicate assays, and an independent experiment gave similar results.

(C, D) Dissociation of the wild-type and the alanine variants for VY8 (panel C) and RY11 (panel D) from pMHC was analyzed as in Fig. 3E. Data are the means \pm SD of triplicate assays, and an independent experiment gave similar results. The lines are based on a single exponential decay and given only for the peptides showing positive responses.

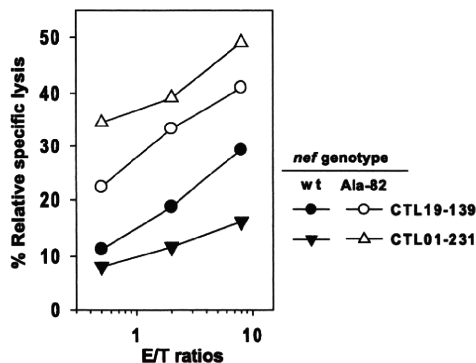


Fig 2. Effect of an amino acid substitution on CTL killing of Nef-expressing cells.

Primary CD4⁺ cells isolated from an HIV-negative donor (HLA-B*3501+) were transfected with a gene encoding GFP alone, wt, or the Ala-82 mutant of NefSF2-GFP fusion protein, and then mixed with CTL 19-139 or 01-231 at the indicated E/T ratios. The transfection efficiency was 60 \pm 5 % as determined by GFP expression. Cytotoxic activity toward cells expressing GFP alone was always <10%. Data are the means of duplicate assays, and an independent experiment using another PBMC donor and another set of CTL clones gave similar results.

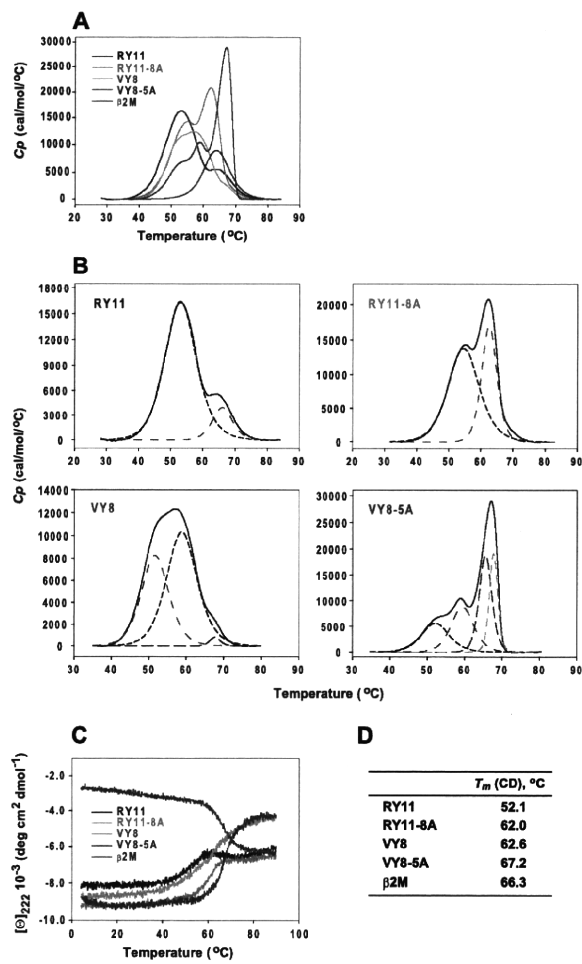


Fig 3. Thermostability analysis of peptide-HLA-B35 complexes.

(A, B) DSC analysis of pMHC complexes. The excessive heat capacity of β 2M alone and that of HLA-B35 in complex with indicated peptides was measured by DSC analysis (panel A). Deconvolution of the experimental curves (solid lines) of HLA-B35 in complex with the indicated peptides (panel B). Deconvolution results in two-state transitions (broken lines). T_m and ΔH_m values obtained are given in Table 1.

(C, D) CD analysis of pMHC complexes. The ellipticity Θ at 222 nm of β 2M alone and that of HLA-B35 in complex with the indicated peptides was measured by CD analysis (panel C). The CD melting temperatures, T_m (CD), are also shown (panel D).

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、昨年度 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 グラフト抗体断片を IgG 化させた TCR グラフト IgG 抗体の培養と、得られた TCR グラフト IgG 抗体の HLA 受容体に対する結合活性を表面プラズモン共鳴測定によって測定した。

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み、その可変領域断片 Fv およびその一本鎖抗体 scFv の作製に成功してきた。本年度は、作製に成功した TCR グラフト抗体断片の構造安定化を図るために IgG 化させた TCR グラフト IgG 抗体を CHO 細胞発現系により調製し、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって、pHLA に対する結合活性を評価した。

B. 研究方法

TCR グラフト IgG の CHO による発現

昨年度に作製した TCR グラフト IgG 重鎖発現ベクター(図 1, pcDNA TCR VH-Fc)と TCR グラフト IgG 軽鎖発現ベクター(図 2,

pcDNA TCR VL-CL) を用いて、当研究室において CHO 細胞発現系を用いた大量培養の際に利用している無血清培地である CHO 細胞用 SFM(Serum Free Medium, GIBCO)及び DMEM(SIGMA)を用い、HEK 293 細胞によるタンパク質一過性発現系の構築を行った。

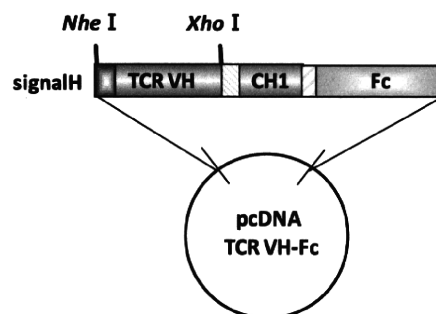


図 1. pcDNA TCR VH-Fc のベクターマップ

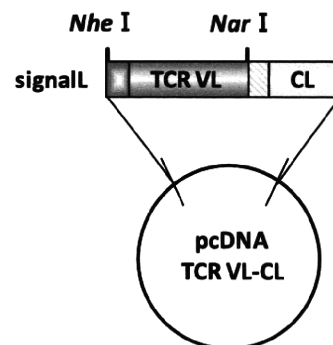


図 2. pcDNA TCR VL-CL のベクターマップ
通常、動物細胞の培養において、血清が添加剤として用いられるが、血清には抗体成分も含まれるため、動物細胞を用いて抗体を調製する際には、培養の条件検討が必要である。

SFM は血清を添加せずに細胞増殖及び維持が可能な培地である。また、DMEM は通常血清を添加して用いる培地であるが、本研究室では、培養上清から抗体を精製する場合には血清を添加せずに使用してもある程度の収量が得られることを既に確認している。HEK 293 細胞を用いた発現系は、トランスフェクション試薬添付のプロトコルを参考に、図 3 に示した流れで実験を行った。血清含有培地での培養時間は出来るだけ長いほうが、細胞が良い状態で保たれるのでと考え、トランスフェクションから 6 時間後まで血清含有培地を用いて培養を行った。

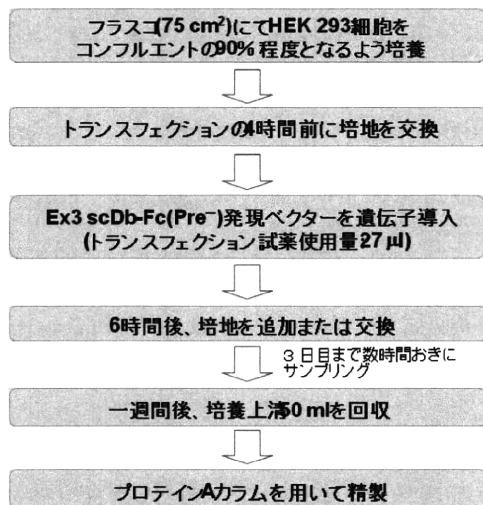


図 3. タンパク質調製の流れ

C. 研究結果

SPRによる TCR グラフト IgG の結合活性評価

精製した TCR グラフト IgG 抗体の、HLA-B35 に対する結合活性を SPR によって評価した。実験は、検出感度を向上させるために多価効果を有効的に活用した。そのために、センサーチップへは、受容体ではなく TCR グラフト IgG 抗体を固定化させ、展開(アナライト)側を HLA-B35 受容体とした。HLA-B35 は、ビオチン化後にストレプトアビジンと相互作用させることによって 4 量

体化させ、多価効果を利用できるようにした。

まず、ペプチド A22(VPLRTMPY)と相互作用させた 4 量体 HLA-B35 を TCR グラフト IgG 抗体が固定化されているセンサーチップ上へ展開させたところ、平衡解離定数が 700 nM 程度の結合活性が観測された(図 4a)。これより、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することによる抗 HLA 抗体の作製は成功したと言える。次に、可変領域断片のみでは結合しなかった、ペプチド B6(RPQVPLRTMPY) と相互作用させた 4 量体 HLA-B35 を TCR グラフト IgG 抗体が固定化されているセンサーチップ上へ展開させたところ、ペプチド A22 の時と同様な結合活性が測定された(図 4b)。これは、4 量体化することによって感度を上げたため、結合活性の差異が分からなくなったと考えている。

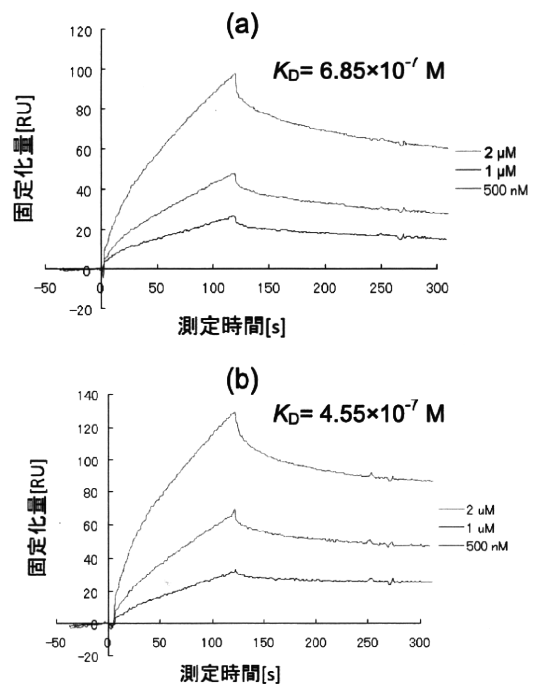


図 4. TCR グラフト IgG の表面プラズモン共鳴

D. 考察

昨年度、作製した CDR グラフティングにより TCR グラフト IgG の SPR を測定し、ペプチド A22 と相互作用させた HLA-B35 との

結合活性を確認することができた。ペプチド B6 と相互作用させた HLA-B35 と同程度の結合が観測されたが、Fv や scFv 断片では結合が観測されていないことを考えると、多価効果による影響と考えている。

E. 結論

CDR グラフティングにより作製した TCR グラフト Fv, scFv 断片を IgG 構造に組み込んだ TCR グラフト IgG は、Fv, scFv 断片と比較し構造が安定であり、結合活性を有していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Asano R., Ikoma K., Kawaguchi H., Ishiyama Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Application of the Fc fusion format to generate tag-free bi-specific diabodies., *FEBS J.*, 277, 477-487 (2010)
2. Asano R., Ikoma K., Sone Y., Kawaguchi H., Taki S., Hayashi H., Nakanishi T., Umetsu M., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., Highly enhanced cytotoxicity of a dimeric bispecific diabody, the hEx3 tetrabody., *J. Biol. Chem.*, 285, 20844-20849 (2010)
3. Badran A., Asano R., Nakayama M., Watanabe Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kumagai I., Target cell-restricted apoptosis induction by 528scFv-TRAIL fusion protein specific for human EGFR and expressed in *Escherichia coli.*, *Int. J. Oncol.*, 36, 1229-1234 (2010)
4. Umetsu M., Nakanishi T., Asano R., Hattori T., Kumagai I., Protein-protein interactions and selection: generation of molecule-binding proteins on the basis of tertiary structural information., *FEBS J.*, 277, 2006-2014 (2010)

2. 学会発表

1. 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, “ドメイン組換えに基づく次世代治療抗体創製に向けて”, 第 10 回 日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2010
2. 真田英明, 小林一樹, 中西 猛, 浅野竜太郎, 熊谷 泉, “結晶構造情報とファージ提示法に基づくヒト型抗 EGFR 抗体の高親和性化”, 第 10 回 日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2010

3. 浅野竜太郎, 熊谷 崇, 瀧 慎太郎, 熊谷 泉, “Functionalization of small bispecific antibodies by recombination of domain order”, 第 62 回日本生物工学会大会, 宮崎, 2010
4. 下村一平, 浅野竜太郎, 熊谷 泉, “IgG 様二重特異性抗体の機能向上に向けた検討”, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 大阪, 2010
5. 植田朝美, 階上健太郎, 中西 猛, 浅野竜太郎, 梅津光央, 熊谷 泉, “タンパク質工学的発想のピンポイント化学接合デザイン: 低分子多価抗体を例に”, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 大阪, 2010
6. 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, “Functionalization of bispecific diabody with specificity for EGFR by rearranging the domain order”, 第 68 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010
7. Asano R., Ikoma K., Umetsu M., Kumagai I., “Highly enhanced cytotoxicity of a dimeric bispecific diabody, the humanized EGFR x CD3 tetrabody”, *PEGS Summit Europe, Hannover*, 2010
8. 階上健太郎, 中西 猛, 梅津 光央, 浅野竜太郎, 熊谷 泉, “Protein engineering for site-specific bioconjugation chemistry: Design of small antibodies with no lysine residues”, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010
9. 浅野竜太郎, 熊谷 崇, 瀧 慎太郎, 熊谷 泉, “Optimization of small bispecific antibodies by converting structural formats”, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010
10. 下村一平, 浅野竜太郎, 熊谷 泉, “Functional improvement of IgG-like bispecific antibodies by domain recombination and mutation”, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし

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 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授
研究協力者 小林大樹 熊本大学大学院生命科学研究部 研究員

研究要旨 プロテオミクスの最新の解析技術を駆使することによって、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。本年度は、細胞表面に発現する MHC ClassI ペプチドの質量分析に最適化した調整方法、および超高感度ペプチド同定法、同定ペプチドの MHC ClassI ペプチドとしての確からしさ検定法を検討し、詳細な定量的解析プロトコールをほぼ確立した。nanoLC-ESI-QqTOF(四重極飛行時間型ハ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、より簡便かつ高感度なプロトコールを確立することによって、細胞表面からコンスタントに約 18000 個のペプチドを同定することが可能となった。この中から、重複ペプチドや非特異的配列を除去し、8~11 アミノ酸で構成されるのプチドを Immuno Epitope Database にてスクリーニングし、175 種類の MHC ClassI 結合ペプチドとして高いスコアを持つペプチド配列を抽出し、2H-Kk に結合しうる最もスコアの高い 60 ペプチドを同定することに成功した。目的ペプチドの定量解析が 1-10 att mol の感度でコンスタントに可能となることから、本法は細胞に提示される HIV 抗原の解析に応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

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、合理的なワクチン開発を推進することを目標としている。本年は昨年を引き続き、最新の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し、これをデータベース化することを目的とした実験を試みた。又、細胞表面に提示されるペプチドの有効な調製法を検討し、新型質量分析器による超高感度定量的解析に最適化することを試みた。高感度同定法として、主に nanoESI LCQqTOF 用いた IDA 法による解析の最適化、新しい定量的アミノ酸配列法解析ソフト:ProteinPilot の試行、および MRM(Multiple Reaction Monitoring)法、Immuno Epitope Database(IEDB)による T cell Epitope Prediction, MHC-1 binding prediction を用いた有効的な簡便スクリーニング法の確立を試みた。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方法論としての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、IDA法は、高感度LC-MS/MSによる同定のペプチドの同定冗長性を回避する方法である。又、ProteinPilotの検索方法を検討し、MHC結合ペプチドの検出と同定方法を本研究に最適化した。現在までに、ヒト細胞で提示されるHIV由来のT細胞抗原に関して、高感度かつ定量的な解析例や方法論の報告はなく、本研究に最適化した方法論を構築することが重要かつ有用であると考えられた。本年度は細胞表面ペプチドの有効な回収調製法、LC-MS/MS解析の感度と分解能および定量性の最適化、同定ペプチドの検索法とMHC-Class1に結合するペプチドのスクリーニング法をプログラム化するとともに、これをデータベース化するための方法論を検討した。

B. 研究方法

質量分析を用いた解析には、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, MRM pilot, MRM quant, scheduled MRM program, GPS, ProteinPilot, MASCOT 等) を用いた。これらは当研究施設 (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 (QStar Elite, purler, および 5600, Applied Biosystems) は網羅的なペプチドの同定用に、nanoLC-MALDI-TOF-TOF (MALDI-TOF/TOF4700, 5800, Applied Biosystems) はペプチドの高感度検出用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ (QTRAP4000, 5800, Applied Biosystems) は高感度定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用した。高感度定量解析法として、IDA (Information Dependant Acquisition) 法の改良法および MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法、ProteinPilot 法を用いた。ProteinPilot は数百の修飾、切断の同時検索ができる Paragon (TM) サーチエンジンによって多くの切断酵素とその切断部位が予測できないペプチド、およびそれらから構成されるタンパク質を同定、定量することができる。タンパク質アイソフォーム、サブセットなども高い精度で識別することができ、偽陽性を最小限に抑えた信頼性の高い結果が得られることから、本研究に最適化して用いることにした。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。方法論の最適化のための実験材料として、マウス線維芽細胞 (L cell) を用い、この細胞表面に提示されているペプチドの有効な回収法、濃縮法、分画法、nanoLC 法、検出法、同定法、抗原ペプチドとしての同定法を詳細に検討した。

C. 研究結果

実験の最適化のため、モデル実験として L 細胞 (マウス線維芽細胞) 表面に発現している主要組織適合遺伝子複合体クラス I (major histocompatibility complex class I: MHC class I) 上に保持されているペプチドをターゲットにした。L 細胞 (1×10^8) クエン酸 Buffer (pH 3.3-3.5) にて処理後、遊離したペプチドを遠心上清として回収した。TCA 沈澱処理により、蛋白質を除いた上清を、逆相クロマトにてペプチド画分を脱塩溶出した。遠心エバポレーションにより溶媒を除去し、限外ろ過膜にて、分子量 3000 (3K) Da 以下のペプチド、および 10000 (10K) Da 以下のペ

プチドサンプルを分画した。各々を凍結乾燥後、nanoLC-ESI-MS/MS 解析に供与し、ペプチド同定を行った。細胞を用いない同様の操作を行い得られた試料をコントロールとして用いた。標準ペプチドとして BSA のトリプシン分解物を用いた。細胞由来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、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ル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 IDA を用いた検出を行った。スタンダードサンプルペプチドの解析は、100 atto mol 以上のペプチドは 100%、1 atto mol では 30% のペプチドが有意に検出され、1 atto mol レベルでも検出同定が可能であることが明らかとなっている。又、未知のペプチドの最高同定感度は 10 atto mol であり、添加回収試験を行ったところ、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は

図 1 nanoLC-ESI-QqTOF MS によって得られた結果の一部 (TOF MS TIC, MS/MS TIC, MS スペクトル、MS/MS スペクトル)

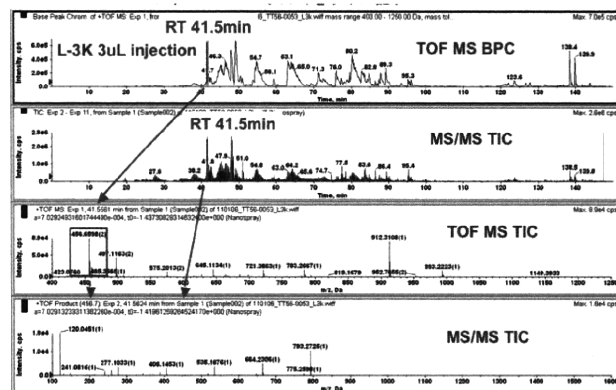


Table1 ProteinPilot による解析

質量分析によって同定された、ペプチドとそのペプチドの由来蛋白質の同定数(3K 画分)

Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>20 (99)	72	518	1862	4010	8.7
>13 (95)	129	892	2480	4949	10.8
>0.47 (66)	222	1396	4896	8290	18.0
Cutoff Applied: >0.47 (66%)	222	1396	4896	8290	18.0

10-20 atto mol がコンスタントに定量できるレベルであった。

Table2 ProteinPilot による解析

質量分析によって同定された、ペプチドとそのペプチドの親蛋白質の同定数(10K 画分)

ID Statistics (Protein-Thresholded): 43174 total spectra, 43174 non-empty spectra; 57597 proteins searched					
Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>2.0 (99)	57	274	1681	3079	7.1
>1.3 (95)	109	465	3965	5844	13.5
>0.47 (66)	167	867	5295	7605	17.6
Cutoff Applied: >0.47 (66%)	167	867	5295	7605	17.6

実際の細胞画分からのペプチドの検出法を検討した。L Cell 細胞表面から回収したペプチド画分は nanoLC-ESI-QqTOF (Dionex/LCP Ultimate, AB QSTAR 5600) を用いて、検出ペプチドアミノ酸配列を同定した。サンプルの確認実験は nanoLC-MALDI-TOF-TOF (KYA DiNa-MaP, AB 5800 Proteomics Analyzer) にて行った。nanoLC-

Table3, ProteinPilot による解析

質量分析によって同定された、ペプチドとそのペプチドの親蛋白質の同定数(上: コントロール 3K 画分、下: コントロール 10K 画分)

ID Statistics (Protein-Thresholded): 39826 total spectra, 39826 non-empty spectra; 57597 proteins searched					
Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>2.0 (99)	1	39	30	63	0.2
>1.3 (95)	2	155	57	93	0.2
>0.47 (66)	3	157	107	160	0.4
Cutoff Applied: >0.47 (66%)	3	157	107	160	0.4

ID Statistics (Protein-Thresholded): 46816 total spectra, 46816 non-empty spectra; 57597 proteins searched					
Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>2.0 (99)	1	37	36	88	0.2
>1.3 (95)	1	154	36	88	0.2
>0.47 (66)	2	154	134	221	0.5
Cutoff Applied: >0.47 (66%)	2	154	134	221	0.5

ベースには同じたんぱく質でも異なる複数の名前でも登録されていることがあるので、そういったものも重複してカウントされる)、**Proteins Detected** は、**Proteins Before Grouping** より、最終的に同定されたたんぱく質の数(同じたんぱく質でも名前が異なっているものは、ひとつにグループ化される)を示す。3K 画分。10K 画分それぞれから、総計約 46,000 個(3K 画分)、43000 個(10K 画分)のスペクトルを解析し、アミノ酸 4mer から 36mer からなる 18156 個のペプチドを同定した。confidence 66%以上のペプチドを 3K 画分では 8290 個、10K 画分では 7605 個特定し、これらの中から、redundant な配列および、コントロール画分から同定された非特異的配列を除去し、263 個のペプチドを細胞膜上に表現されているペプチドとして決定した。これらのアミノ酸配列から推測される蛋白質は約 200 種類であった (Table 1-3)。

得られたペプチド配列の中から、HLA class1 に結合する候補ペプチドとして、アミノ酸 8 mer~11 mer からなる約 175 種類の配列を選択し、Immuno Epitope Database (IEDB), T cell Epitope prediction MHC-1 binding prediction にて解析を行った。L 細胞の MHC Class 1 分子である H-2Kk に特異的結合が予測されるものを H-2Kk をネガティブコントロールとしてリストアップした (Table 4)。同定された 8-11 mer のペプチドのうち、最も多数同定されたのは 8 mer のペプチドであったが、IEDB による確からしさのスコアの上位には 9 mer のペプチドが主にリストアップされた。2H-Kk 特異的ペプチドとして最も確からしいペプチドを 60 個抽出した (Consensus Rank<10)。これらの同定分子には既に 2H-Kk 結合ペプチドとして報告されている配列が多数ふくまれていた。

D. 考察

ESI-QqTOF による解析結果の一部を示す (図 1, Table1. 2)。Table の % Total Spectra は全スペクトラルに対して、実際に de novo Sequencing 出来たスペクトラルの割合、Spectra Identified は、全スペクトラルに対する実際に de novo Sequencing 出来たスペクトラルの数、Distinct peptides は、Spectra Identified からタンパク質同定に用いられた peptides の数 (de novo Sequencing が出来ても、タンパク質にヒットしなかったのは省かれる)、Proteins Before Grouping は、Distinct Peptides をもとに同定されたタンパク質の数(ただしデータ

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 HIV 抗原を得意的に結合している細胞から、各々の提示ペプチドを回収し、各々から目的ペプチドを高