凝集タンパク質の効率的再生と分光学的 フォールディング研究の接点 - 抗体分子を中心として -

東北大学多元物質科学研究所 梅津光央

東北大学大学院工学研究科生物工学専攻 津本浩平, 熊谷 泉

Advances in protein engineering, such as phage display technology, enable us to design antibodies. The recombinant proteins can be expressed in various bacterial hosts, but the expression of antibodies in *E. coli* often makes insoluble particles, which is considered to be attributed to the folding process of immunoglobulin-folded structure. In this article, the folding study of immunoglobulin structure is summarized and the refolding procedure for antibody fragments from inclusion bodies is elucidated on the basis of the physicochemical folding study of immunoglobulin structure.

antibody / disulfide-linkage / inclusion body / immunoglobulin / refolding / spectroscopy

1. はじめに

DNA に対するクローン技術・配列決定・有機的合成技術の確立は遺伝子工学という領域を生み出し、大腸菌などの生細胞を形質転換することによって外来タンパク質を大量産生するシステムを可能にした。この宿主 - ベクター系を用いたタンパク質発現は、本来の生細胞では微量にしか存在しない成分の大量調製やファージ提示法で選択されたタンパク質を産生するための基礎的操作となっており、現在のバイオ研究や医薬産業にとって不可欠なものである。しかし、組み換えタンパク質発現において最も汎用的に使われている大腸菌の系では、発現したタンパク質がその高発現の結果不活性な不溶性顆粒として宿主内に沈殿してしまうことがしばしばあり、汎用的かつ簡便な発現系を十分活かしていかないという問題がある^{1),2)}。機能ゲノム科学やテーラーメイド医療を狙ったバイオ医療が盛んに行われている現在において、目的遺伝子が最終的なタンパク質に表現できないことは致命的である。そのため、不溶性顆粒からタンパク質を再生する操作の確立に対

する要望は以前にも増して強くなっており、産業的にも重要な操作技術として認識されはじめている。このタンパク質の再生とは、一般的に不溶性顆粒から目的タンパク質を完全変性状態で可溶化し、その後タンパク質を活性のある状態へ適切にリフォールディングする（巻き戻す）というものである。これはまさに、生物物理学で蓄積されたフォールディング研究の成果が、タンパク質を生産している「現場」の需要として求められているということである。

現在、目的に沿ったタンパク質を設計したものの最終的に大量調製の段階まで到達できないことは、多くの研究者が経験している。なかでも抗体分子については、ファージディスプレイ法などの生体外選択系やドメイン組み換えなどによる人工タンパク質の創製が行われているが³⁾、それら抗体分子の多くは細胞内における発現で不溶性顆粒として産生されるため、発現系の選択が制限されるばかりでなく目的抗体も十分に取得できないことが多い。一方、抗体分子はその利用性の高さと立体構造の保存性の高さからフォールディング研究も盛んに行われてきた。そこで今回、抗体分子中に存在す

Application of Spectroscopic Folding Study to Highly Efficient Refolding Systems - With a Focus on Antibody Molecules -

Mitsuo UMETSU*, Kouhei TSUMOTO** and Izumi KUMAGAI**

* Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

** Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

イムノグロブリン骨格を例に取り上げ、これまでのフォールディング研究とタンパク質再活性法の接点を、著者らが開発してきた巻き戻し手法に見だし、今後のタンパク質再活性法開発に向けたフォールディング研究というものを考えてみたい。

2. 抗体分子の構造と内部ジスルフィド結合

抗体分子の基本構造は、Fig.1aのようにY字型をしており、約200残基の軽鎖（L鎖）と400残基の重鎖（H鎖）がジスルフィド結合し、さらにそれらがヒンジ領域で結合している。L鎖とH鎖にはイムノグロブリンとよばれるスーパーフォールドに分類できるドメインがそれぞれ2つと4つ存在し、断片の分け方によりFv、Fabなどというよび名がついている。このフォールドは、2つのβシートがジスルフィド結合によってサンドイッチ型に会合し、βバレル構造を形成しているものであるが（Fig.1b）³、内部に存在するジスルフィド結合は保存性が非常に高い。後藤らは、抗体分子の軽鎖中に存在する定常領域のC_L鎖を用いて、内部ジスルフィド結合がその構造形成と安定性に寄与していることをいち早く報告している⁵。抗体分子の変可領域であるV_H、V_L断片においても天然状態のものが還元状態で不可逆的に凝集していくことから⁶、ジスルフィド結合はイムノグロブリン構造の安定化にきわめて重要な役割を果たしていることがわかる。Frischらは、化学的還元やシステイン変異によるV_L断片の変性遷移変化を熱力学的に解析し、ジスルフィド結合の欠如で19 kJ/molの構造不安定化が起こっていることを示している⁷。彼らは、さらにその不安定化エネルギーを補う水素結合や塩橋を付加する変異導入を行うことにより、天然構造を崩さないジスルフィド結合が欠如したFv断片を作成したが、その変性剤に対する安定性をみるとかなり減少しており

同様な結果がWörnらによっても示されている⁸。このように、内部ジスルフィド結合によるイムノグロブリン構造の安定化はほかの水素結合や塩橋で完全に補うことは難しく、イムノグロブリン構造のフォールディング研究の中心的な位置を占めている。

3. 抗体分子のフォールディング

抗体分子のフォールディングに関しては、さまざまな断片で速度論的な考察が多くなされているが^{9,12}、ドメイン単独の場合とそれら複合体では巻き戻り速度が異なる¹³。ジスルフィド結合を保持した状態で完全変性させたV_L鎖の場合、単独では非常に速く巻き戻るが、C_L鎖が存在すると巻き戻り速度は遅くなる¹³。同じ現象は、V_H鎖とV_L鎖のヘテロ2量体であるFv断片やそれらがリンカーで連結した一本鎖Fv(scFv)についても見られ、単独のドメインでは見られない遅い速度定数が観測されている。FreundらはH/D交換法を導入してアミドプロトンを標識し、完全変性させた酸化型scFvからの巻き戻り過程をNMRと質量分析で解析している^{13,14}。それによると、scFvは巻き戻り開始から30秒以内ではV_L鎖内部にβストランドを形成するアミノ酸残基とV_H鎖ヘスタッキングする界面上の残基の重水素標識がほとんど保持される一方、V_H鎖ではほとんど標識が保持されない。その後の緩やかな巻き戻り過程において、V_L鎖では末端側にあるβストランド同士の

Fig.2 Schematic depiction of the scFv refolding.

Fig.1 (a) A simplified schematic representation of IgG antibody molecule. (b) A ribbon diagram of Fv fragment.

主鎖骨格が水素結合することによって最終的に天然型の β バレル構造を形成し、 V_H 鎖は緩やかな速度定数で一度に巻き戻る (Fig.2). 単独の V_L 鎖と V_H 鎖をそれぞれ別リフォールディングした場合、 V_L はホモ2量体を形成するものの安定な天然型構造を形成するのにに対し、 V_H は凝集体を形成してしまうことが知られている^(13, 15, 16). このことから、scFvにおいて V_L のフォールディングが遅いのは V_H の影響があるためであり、 V_H は部分的にフォールディングした V_L の界面と相互作用して巻き戻っていると思われる。

さらにRammらは、さまざまにジスルフィド結合を欠損させたscFvのフォールディング過程を蛍光スペクトルで追跡した⁽¹⁷⁾. それによると、化学的還元を行わず完全変性させたscFvをリフォールディング溶液で希釈した場合、天然型 $V_L + V_H +$ と V_L 鎖中のジスルフィド結合が欠損している $V_L + V_H +$ では2種速度定数が観測されたが、両鎖のジスルフィド結合が欠損している $V_L + V_H +$ ではプロリンの異性化と同程度の遅い速度定数のみが観測されている。これは、ジスルフィド結合が欠損することによってそのドメインの巻き戻りが遅くなっていることを示しており、ジスルフィド結合が存在する場合、各ドメインは基本的に独立でフォールディングすることができるが、それが欠損している場合、互いに相互作用しながら緩やかにフォールディングすると思われる。また、 $V_L + V_H +$ に関しても彼らは観測を行っているが、その場合scFvは凝集体を形成する。これに対する明確な答えはわかっていないが、彼らはフォールディングされた V_L とアンフォールドな V_H の状態が長時間存在する場合、scFvは凝集する方向へ進んでいくのではないかと考察している。

4. 不溶性顆粒からの抗体断片の再生

上記のように、イムノグロブリン構造をもつタンパク質では、2つの β シートを連結しているジスルフィド結合がその構造形成と安定性に大きく寄与しており、適切なジスルフィド結合のいち早い形成が迅速なフォールディングに繋がる。イムノグロブリン構造中のジスルフィド結合形成過程に関しては、まず後藤らが還元状態にある C_L 鎖のチオール基反応過程を変性剤存在・非存在下で電気泳動より詳細に解析している⁽¹⁸⁾. それによると、ジスルフィド結合が迅速に形成されるには、酸化剤と反応するためにチオール基がタンパク質界面へ露出していなければならない。かつ、適切なチオール基同士が速やかに遭遇する構造形成が必要である。通常、不溶性顆粒からの発現タンパク質巻き戻しは、高濃度の変性剤を用いて目的タンパク質を完全変性状態で可

溶化した後、リフォールディング緩衝液中に徐々に滴下して自発的リフォールディングを促す希釈法を用いる。Buchnerらは、リフォールディング緩衝液にジスルフィド交換を促進する酸化剤と還元剤を共存させたシャッフリング系と凝集抑制効果があるL-アルギニン(L-Arg)を導入することによって、Fab断片を40%の効率で巻き戻している⁽¹⁹⁾. これは、L-Argの凝集抑制効果のある環境でジスルフィド交換を促進し、リフォールディング当初に形成されるであろう誤ったジスルフィド結合を自発的フォールディングの進行とともに天然型へ近づけていくという戦略である。

Buchnerらの手法は、ジスルフィド結合をもつ一般的なタンパク質の構造形成を考慮したリフォールディング法であるが、イムノグロブリン構造形成が内部ジスルフィド結合駆動の迅速なリフォールディングであるという特性を十分活かしているとは言えない。これは、希釈法によるタンパク質巻き戻しは、アンフォールド状態から天然構造形成まで同じ環境(同じ緩衝溶液)下において行われるため、リフォールディング過程に存在する各々の中間体に沿って個別に適切な対応をとるには限界があるためである。そこで著者らは、希釈法ではなく段階的に変性剤を除去する透析法(段階透析法)を用い、適切な変性剤濃度段階で酸化還元剤やL-Argを外液に添加することによって巻き戻し効率を向上させるを試み、Fig.3に示す手法により多くのイムノグロブリンフォールドタンパク質を高効率で巻き戻すことに成功した (Table 1) この手法は、抗ニワトリリゾチーム抗体 (HyHEL-10) の一本鎖抗体 (HyHEL-10 scFv)

Fig.3 The optimal stepwise dialysis system for scFv in combination with additives (GSSG and L-arginine)⁽²⁰⁾. The GSSG and L-arginine are added at the stages where the concentrations of GdnHCl are 1 M and 0.5 M.

Table 1 The refolding ratio of immunoglobulin-folded protein from inclusion bodies in the optimal stepwise dialysis system. GSSG and L-arginine were added at the stages according to Fig.3.

Protein	Yield[%]	Activity
HyHEL-10 scFv	100	+
15E8 scFv	80	+
MUSE11 scFv	100	-
6D9 Fab	60	+
hIgG1 Fc	88	+
hIL-1-R	99	+

をモデルとして、イムノグロブリンフォールドのフォールディング研究をふまえて開発したものであり²⁰⁾、近年さまざまな分光学的手法を用いてその高効率な巻き戻り過程を明らかにしている²¹⁾。次章でこれまでのフォールディング研究と関連づけてその巻き戻り過程を紹介する。

5. 段階透析法によるscFv 巻き戻しの分光学的解析

scFv は添加剤を用いない単純な段階透析を行うと、変性剤として用いた Guanidinium 塩酸 (GdnHCl) 濃度を 2 M から 1 M へと変化させる透析段階 (1 M 透析段階) で凝集体を形成する (Fig.4)。各段階における巻き戻り中間体を円偏光二色性 (CD)、トリプトファン蛍光、bis-ANS 蛍光プローブを用いて解析したところ、1 M 透析段階で 2 次構造と 3 次構造の形成開始が確認され、凝集体を形成する 1 M GdnHCl 中で疎水的領域が最大となることがわかった。これは、構造形成開始時 (1 M 透析段階) に凝集形成が起きていることを明確に示している。また、ジスルフィド結合過程を Ellman 法により追跡したところ、2 次・3 次構造形成が始まる段階で自然酸化による不完全なジスルフィド結合が生じていた (Fig.5)。これは、scFv が 1 M 透析段階で天然型の構造形成をはじめ、それに共役して自然酸化により一部のジスルフィド結合が形成されることを示している。

1 M 透析段階での凝集体形成は、酸化型グルタチオン (GSSG) もしくは L-Arg をその透析段階の外液に添加しておくことで抑制することができる (Fig.4)。ここで注目すべきは、効果がまったく違う添加剤が同じ結果を示していることである。まず GSSG の効果を Ellman 法によるチオール基定量 (Fig.5) から見ると、GSSG 添加によりチオール基が完全に酸化されている。さらにその段階の CD スペクトルを測定したところ、GSSG 無添加の場合と比べて 2 次構造形成がより促進されていた。これは、1 M 透析段階の構造形成開始時の状況が後藤

Fig.4 Change in the absorbance at 320 nm for the scFv solution at each stage in the stepwise dialysis : no additives (open squares), addition of GSSG at the 1 M and 0.5 M stages (open triangles), addition of L-arginine at the 1 M and 0.5 M stages (solid triangles), and addition of GSSG and L-arginine at the 1 M and 0.5 M stages (solid squares).

Fig.5 Change in the amount of free thiol groups in scFv at each stage in the stepwise dialysis : no additives (open squares), addition of GSSG at the 1 M and 0.5 M stages (open triangles), and addition of L-arginine at the 1 M and 0.5 M stages (solid triangles).

らが示した「チオール基のタンパク質界面への露出」と「適切なチオール基同士が速やかに出会う構造形成」にまさしく当てはまり¹⁸⁾、その段階における GSSG 添加によって迅速に形成される天然型のジスルフィド結合が 2 次構造形成を促進させていると言え、それが凝集抑制の主要因と説明できる。また、1 M 透析段階において GSSG のみではなく GSH (還元型グルタチオン) も加えたシャッフリング系を導入した場合、その巻き戻り効率は GSSG のみの場合より減少した²⁰⁾。これは、GSSG によるジスルフィド結合の形成が巻き戻り中間体の構造を安定させていることを示し、GSH による解離が巻き戻り中間体の構造不安定化を招くことを示唆していよう。

次に、L-Arg 添加の場合のジスルフィド結合形成過程を見てみると、ほかの系とは異なり 1 M 透析段階ではジ

スルフィド結合は形成されず、その後の0.5 M透析段階で不完全な自然酸化が起こっている (Fig.5)。L-Argは紫外領域にCD活性をもつためL-Arg存在下での2次構造確認はできないが、トリプトファンの蛍光スペクトルを見る限り天然構造類似の構造形成はされている。しかし、bis-ANS蛍光プローブの結果では1 M・0.5 M段階で疎水の領域の界面への露出は非常に増加しており、そのメカニズムは解明されていないがL-Argは疎水の相互作用を抑制する傾向にある^{21), 22)}。そのことを考えると、1 M透析段階で形成される2次構造間の不適切な相互作用がL-Argに阻害される結果、ジスルフィド結合がない不安定な構造でも凝集体を形成しないが、適切な相互作用も阻害してしまうため「適切なチオール基同士が速やかに遭遇する」確率が非常に低くなりジスルフィド結合が形成されない、と実験結果を説明できる。

以上から、添加剤導入によるscFvの巻き戻り過程をまとめると、1 M透析段階での添加法の違いによりscFvはジスルフィド結合駆動による2次構造形成 (GSSG添加) とジスルフィド結合をもたないルーズな巻き戻り中間体 (L-Arg添加) へとリフォールディング経路が分かれる (Fig.6)。そして0.5 M透析段階において一方の添加剤しか存在しないと、前者は次の透析段階において不適切な疎水の相互作用で凝集し、後者はジスルフィド結合形成の不完全さにより凝集する。Fig.3に示す最適ナリフォールディングを達成する添加法では、1 Mと0.5 M透析段階でGSSGとL-Argを同時添加することによってほぼ完全ナリフォールディングを達成し

ている。これは透析という手法を考えるとL-Argはその効果を発揮するのにある程度の濃度が必要であることから、まず初めにGSSGが作用してジスルフィド結合駆動による2次構造形成がおき、その後の不適切な疎水の相互作用をL-Argが抑制することによってほぼ完全ナリフォールディングが達成されると解釈できる。この分光学的アプローチによるscFv巻き戻り過程の解析は、筆者らが開発した“添加剤導入”段階透析法がこれまでの抗体分子に関するフォールディング研究で指摘されてきた、早い段階での迅速な天然型ジスルフィド結合の形成が構造形成を促進させる、ということを的確に達成していたことを証明し、分光学的フォールディング研究を実際の凝集タンパク質の再生に応用した良いモデルと言えよう。

6. さいごに

最後に、不溶性顆粒からの活性タンパク質調製を行っている立場から見た巻き戻り中間体の研究意義を考えたい。タンパク質のフォールディングに関して現在まで多くの研究がなされており、モルテン・グロビュール状態や、フォールディング・ファネル中に存在するエネルギーの「落とし穴」として中間体が説明されている²³⁾。そのなかで、フォールディング・ファネル中にある凝集形成へ向かうエネルギーの「落とし穴」に留まることなく最小自由エネルギー構造へ到達するようにいかにタンパク質をフォールディングするかが、不溶性顆粒から活性タンパク質を調製している研究者が求めるものである。

Fig.6 The scFv folding pathway in the stepwise dialysis from 2 M to 0 M GdnHCl.

希釈法の場合、タンパク質のリフォールディングは基本的にリフォールディング緩衝液の設計で決まる。これは、1つのフォールディング・ファネルを設計しているようなものであり、ファネル設計後はその系でのタンパク質の自発的フォールディングに委ねられる。一方、今回紹介した段階透析法では、タンパク質を取り巻く緩衝液が変化するのでフォールディング・ファネル自身も変化しており、その変化のなかをタンパク質は最適構造へ向かってフォールディングしている。これは、各フォールディング・ファネルに存在している「落とし穴」に陥った巻き戻り中間体を、人為的にフォールディング・ファネルを変化させることによって最終的に最適立体構造へ到達させるものである。

このように考えると、フォールディング研究における巻き戻り中間体の解明は、不溶性顆粒からのタンパク質調製を行っている研究者には非常に重要な知見を与えとも言え、特に凝集体形成を促進する巻き戻り中間体の解明はフォールディング溶液の設計をするうえで必須の情報である。最近著者らは、不溶性顆粒中のタンパク質構造を利用した新規巻き戻し法を報告している^{24) 25)}。それは、不溶性顆粒中のタンパク質構造を適切なフォールディング中にファネルの「落とし穴」に陥った中間体と捉え、可溶化溶媒に工夫を凝らして、完全変性ではなく「落とし穴」から回復できる程度にほどよく変性させた巻き戻り中間体から再生を行うという手法である。この手法を用いて緑色蛍光タンパク質や超高温熱細菌由来タンパク質を巻き戻すことに成功しており、さらなる汎用化にはまさしく凝集開始点の巻き戻り中間体に関する知見が重要になる。

謝 辞

著者らの研究成果は、東北大学大学院工学研究科生物工学専攻熊谷研究室の伊藤剛彦、原 広樹両修士の多大な協力のもとに出されたものであり、ここに感謝の意を表したい。

文 献

- Williams, D. C., van Frank, R. M., Muth, W. L. and Burnett, J. P. (1982) *Science* **215**, 687-689.
- Georgiou, G., Telford, J. N., Shuler, M. L. and Wilson, D. B. (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1157-1161.
- Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. and Silverman, G. J. (2001) *Phage Display : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Alzari, P. M., Lascombe, M. B. and Poljak, R. J. (1988) *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 555-580.
- Goto, Y. and Hamaguchi, K. (1979) *J. Biochem.* **86**, 1433-1441.
- Glockshuber, R., Schmidt, T. and Plückthun, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 1270-1279.
- Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E., Usón, I., Schneider, T. R. and Fritz, H. -J. (1996) *Fold. Des.* **1**, 431-440.
- Wörn, A. and Plückthun, A. (1998) *FEBS Lett.* **427**, 357-361.
- Goto, Y., Azuma, T. and Hamaguchi, K. (1979) *J. Biochem.* **85**, 1427-1438.
- Lilie, H., Rudolph, R. and Buchner, J. (1995) *J. Mol. Biol.* **248**, 190-201.
- Lilie, H. (1997) *FEBS Lett.* **417**, 239-242.
- Thies, M. J. W., Talamo, F., Mayer, M., Bell, S., Ruoppolo, M., Marino, G. and Buchner, J. (2002) *J. Mol. Biol.* **319**, 1267-1277.
- Freund, C., Honegger, A., Hunziker, P., Holak, T. A. and Plückthun, A. (1996) *Biochemistry* **35**, 8457-8464.
- Freund, C., Gehrig, P., Holak, T. A. and Plückthun, A. (1997) *FEBS Lett.* **407**, 42-46.
- Steipe, B., Plückthun, A. and Huber, R. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 739-753.
- Freund, C., Ross, A., Plückthun, A. and Holak, T. A. (1994) *Biochemistry* **33**, 3296-3303.
- Ramm, K., Gehrig, P. and Plückthun, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 535-546.
- Goto, Y. and Hamaguchi, K. (1982) *J. Mol. Biol.* **156**, 891-910.
- Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) *Biotechnology* **9**, 157-162.
- Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T. and Kumagai, I. (1998) *J. Immunol. Methods* **219**, 119-129.
- Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T. and Kumagai, I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 8979-8987.
- 荒川 力, 勝山 巖, 熊谷 泉, 津本浩平 (2003) 蛋白質 核酸 酵素 **48**, 2310-2317.
- Dill, K. A. and Chan, H. S. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 10-19.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D. and Arakawa, T. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1383-1386.
- Umetsu, M., Tsumoto, K., Ashish, K., Nitta, S., Tanaka, Y., Adschiri, T. and Kumagai, I. (2004) *FEBS Lett.* **557**, 49-56.

梅津光央

梅津光央(うめつ みつお)

東北大学多元物質科学研究所 助手, 博士(工学). 2000年東北大学大学院工学研究科生物工学専攻博士課程修了, 00-01年日本学術振興会海外特別研究員(ライデン大学, オランダ), 01-02年東北大学大学院工学研究科助手, 02年より現職. 元々分光学的手法を用いてヘテロな現象を研究していましたが, 現在は不溶性顆粒からのタンパク質再活性化法やフォールディング技術を用いた自在なタンパク質操作法の構築を行っています.

連絡先: 〒980-8577 仙台市青葉区片平2丁目1-1

E-mail: mitsuo@tagen.tohoku.ac.jp

津本浩平(つもと こうへい)

東北大学大学院工学研究科生物工学専攻 助教授, 博士(工学). 1993年東京大学大学院工学研究科修士課程修了, 95年同大学博士課程退学, 同年東北大学大学院工学研究科助手, 01年同講師, 02年より現職, 97年博士(工学)取得(東京大学)

連絡先: 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉07

E-mail: tsumoto@mail.tains.tohoku.ac.jp

熊谷 泉(くまがい いずみ)

東北大学大学院工学研究科生物工学専攻 教授, 理学博士. 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了, 三菱化成生命科学研究所, マックスプランク分子遺伝学研究所, ベルリン自由大学, 東京大学工学部などを経て1995年より現職.

連絡先: 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉07

E-mail: kmiz@mail.tains.tohoku.ac.jp