九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ラットP2X4受容体に対する機能的抗体の調製とラットP2X4受容体ヘッドドメインの構造と機能に関する研究

井川，達弘

https://hdl.handle.net/2324/1500661

出版情報：九州大学，2014，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

ラット P2X4 受容体に対する機能的抗体の調製とラット P2X4 受容体ヘッドドメインの構造と機能に関する研究

創薬科学専攻　蛋白質創薬学分野　3PS12009T　井川　達弘

【序論】

細胞内でエネルギー源として利用されることが広く知られている ATP は細胞外において情報伝達物質としての役割も担っている。P2X4 受容体は ATP 受容体の一種であり、脳や脊髄などの中枢に高発現し、外科手術、癌、糖尿病および感染症等による末梢神経への損傷後に発症する神経障害性疼痛に関与することが明らかとなっている(1-3)。そのため P2X4 受容体を標的タンパク質として Drug Repositioning の基礎研究も実施されている(1)。一方、抗体は目的とするタンパク質に特異的に結合する分子で、最近では世界の医薬品市場で抗体医薬品が広く使用されるようになっている。しかし、これまで P2X4 受容体に対する抗体は P2X4 細胞内ドメインを認識する特異性の低い抗体しか市販されていない。P2X4 受容体において発現量が痛みの重症度に深く関係している。一般に痛みの指標は患者個人毎の主観的なスケールとして評価されており、痛みの病態を評価するには客観的な指標があれば、医薬品の臨床開発においては有益である。しかし細胞内ドメインに対する抗体では生細胞を用いたイメージングには用いることが出来ず、基礎研究において効果的なツールではない。抗体により神経障害性疼痛の重症度に応じて発現量が増えた P2X4 受容体を標的としたイメージングが可能となれば創薬に貢献できるであろう。一方、細胞外ドメインの機能である ATP 結合能やカルシウムイオンの流入等の機能を阻害しアンタゴニストとして機能する抗体の創製ができれば抗体そのものが神経障害性疼痛の治療薬となり得るであろう。そこで本研究では P2X4 受容体の立体構造を基盤とした機能的な抗体の獲得を目的として研究を行った。

当研究室では疼痛のモデル動物として広く利用されているラット由来の P2X4 受容体(以下 rP2X4)の細胞外ドメイン(以下 rECD)に着目し、大腸菌 BL21(DE3)株を用いた組み換えタンパク質の発現および巻戻しにより 3 次構造を持った rECD の調製法を確立した(4)。得られた rECD は β シート主体の二次構造を持っており、ATP 結合能が確認できた。そこで調製した rECD を用いて rECD を認識する抗体を作製し、モノクローナル抗体(以下抗 rECD 抗体)を獲得することに成功した(4)。本発表では、まず得られた抗 rECD 抗体のエピトープ同定を行い、本抗体が生化学的なツールとして利用できることを実証した。一方で抗 rECD 抗体は結合力が弱くイメージングには用いることができないこともわかった。そこで、抗 rECD 抗体のエピトープ領域がヘッドドメイン(以下 HD)と呼ばれるドメイン構造に含まれることに着目し rHD の発現系を構築しその領域の立体構造の決定と生理的機能について解析した。さらに rHD を抗原とした機能的な抗体獲得を行った。

【実験】

1.抗 rECD 抗体のエピトープ解析および生化学的な利用法の探索

当研究室で作製した抗 rECD 抗体のエピトープ解析を行った。抗体の交差反応性から ECD の一次配列に着目しエピトープ領域の絞り込みを行うために rECD およびヒト由来 P2X4 細胞外ドメイン(以下 hECD)の配列アライメントを行った。アライメントの結果をもとに rECD の N 末端欠損変異体を作製し、抗体反応性を評価することでエピトープ配列の同定を行った。さらに抗 rECD 抗体を

用いて細胞に発現した rP2X4 の検出をウエスタンブロッティング法により行った。

2.抗原調製を目的とした rHD の構造および機能解析

抗 rECD 抗体のエピトープ周辺領域に着目し HD(Q111-V167)としてクローニングを行い、大腸菌 Origami(DE3)株を用いた発現系および精製系の構築を行った。50 mM 尿素、10%重水を含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)、25 ℃条件下で核磁気共鳴(NMR)法の測定を行い rHD の立体構造を決定した。rHD とリガンドのアデノシン(~10 mM)および rP2X4 の活性制御に関わる 2 価の金属イオン(銅イオン、亜鉛イオン、~10 mM)との相互作用解析のために NMR および 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)、25 ℃条件下で等温滴定カロリメトリー(ITC)の測定を行った。

3.rHD を抗原とした機能的な抗体の作製

抗原として rHD を用いた抗体の作製を行った。抗原性の向上のためスカシ貝由来ヘモシアニン(以下 KLH)をキャリアタンパク質として rHD に化学修飾して自己免疫疾患モデルマウス(以下 MRL マウス)に免疫を行った。当研究室の永井氏らが開発した(unpublished result)蛍光ゲルろ過(FSEC)により細胞膜上に発現した rP2X4 に結合することが可能な抗体のスクリーニングを行った。得られた抗体を用いて生細胞の免疫染色実験を行った。さらに抗体 Fab 領域のアミノ酸配列の決定や 150 mM 塩化ナトリウム、3 mM EDTA、0.005% Tween20 を含む 10 mM HEPES 緩衝液(pH7.4)、25 ℃条件下で表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いた解離定数の算出を行った。

【結果・考察】

1.抗 rECD 抗体のエピトープ解析および生化学的な利用法の探索

抗 rECD 抗体のエピトープ解析では rECD および hECD 間において交差反応性がないため、保存されているアミノ酸が少ない Ile101-Lys180 に着目した。N 末端側からアミノ酸を欠損させた rECD 変異体(NΔ112 および NΔ130)を用いたウエスタンブロッティング法の結果 Gln113-Ala130 が抗 rECD 抗体のエピトープであると同定できた(Fig.1)。抗 rECD 抗体は生細胞を用いたイメージングには利用できなかったが、ウエスタンブロッティング法により細胞表面上に発現した rP2X4 の検出には利用できるツールであった(Fig.2)。イメージングに利用できなかった原因のひとつとして抗体作製に用いた rECD は二次構造や ATP 結合能は持っていたが細胞表面に発現しているインタクトの rP2X4 と同様の高次構造を持っていないことが示唆された。

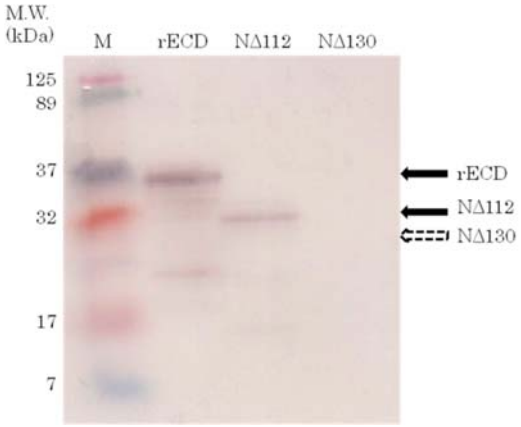

Fig.1 Reactivities of anti-rECD antibody against rECD mutants.

Western blotting for the full-length rECD, deletion mutants of rECD, ΔN112 and ΔN130. The amount of each protein is 0.4 μg. The arrow indicates rECD, NΔ112 and NΔ130,respectively.

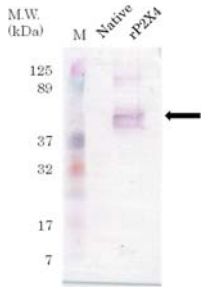

Fig.2　Detection of rP2X4 expressed on the cells.

Western blotting for rP2X4 expressed on human 1321N1 astrocytoma cells. The arrow indicates rP2X4.

2.抗原調製を目的とした rHD の構造および機能解析

本研究室で調製した抗 rECD 抗体のエピトープが HD に含まれることに着目し、大腸菌 Origami(DE3)株を用いた rHD 単独での発現系を構築し、NMR を用いた構造解析により rHD の構造を決定した (Fig.3)。この構造の主鎖の折りたたみは、X 線結晶解析法により決定されているゼブラフィッシュ由来 P2X4 の立体構造(5)における HD のそれとほぼ一致していた。さらに NMR および ITC を用いた相互作用解析により、rHD がリガンドであるアデノシン、活性制御に関わる 2 価の金属(銅イオン、亜鉛イオン)と相互作用することが確認できた(Fig.3,4)。それぞれの結合部位はこれまでの変異体解析に基づいた結果と矛盾していなかった(6,7)。よって rHD が機能的な構造を持っていることが確認できた。

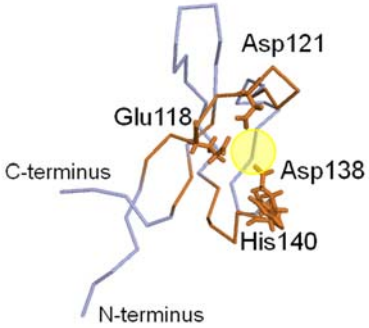

Fig.3 Cu^{2+} binding site in rHD structure.

Cu^{2+} binding site is mapped on rHD structure. Stick models shows the residues involved in Cu^{2+} binding. Putative bound Cu^{2+} indicates by yellow circle.

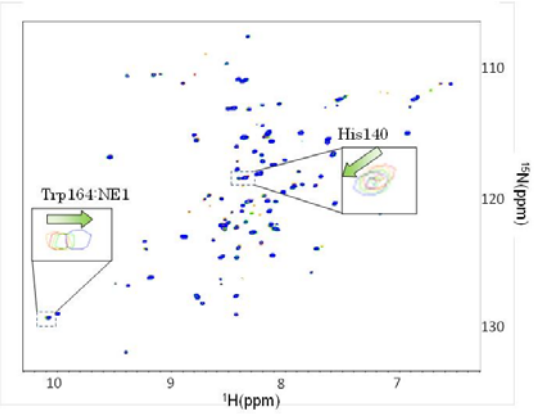

Fig.4 Adenosine binding site in rHD.

2D 1H-15N HSQC spectra of rHD (0.1 mM) in the absence (red) and presence of 1 mM (orange), 2 mM (yellow), 5 mM (green), 10 mM Adenosine (blue) at 25 ℃.

3.rHD を抗原とした機能的な抗体の作製

構造および機能を持っている rHD を用いて抗体を作製した。KLH を rHD に化学修飾して抗原性を向上させ、自己抗体を作製しやすい MRL マウスを用いた結果 38 種類の rHD を認識するポリクローナル抗体を獲得することができた。FSEC により細胞膜上に発現した rP2X4 を認識できるポリクローナル抗体のスクリーニングおよびモノクローン化を行い最終的に 5 種類の抗 rHD モノクローナル抗体を獲得した。得られたモノクローナル抗体も FSEC により細胞膜上に発現した rP2X4 を認識することを確認した(Fig.5)。一方、当研究室で調製済みの抗 rECD 抗体は結合力が弱く、生細胞を用いたイメージングには利用できなかったことがわかった(Fig.5)。しかし、本研究で得られたモノクローナル抗体は生細胞を用いたイメージングに用いることができ、機能的な抗体であることがわかった(Fig.6)。rHD に対して強く結合するモノクローナル抗体と rHD との複合体の解離定数を測定したところ約 50nM であった。この結果はイメージングを行った抗体濃度で生細胞を染色することができた結果を支持するものである。

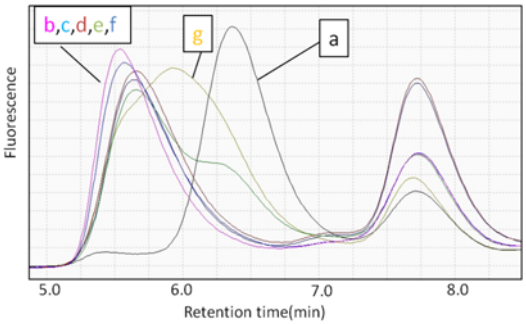

Fig.5 FSEC analysis of anti-rHD monoclonal antibodies and anti-rECD antibody binding to GFP fused rP2X4.

GFP fused rP2X4 with or without (a) antibodies 7-6C (b), 8-3H (c), 10-4G (d), 11-6B (e), 12-10H (f) and anti-rECD antibody (g) were anlyzed by FSEC. FSEC was performed with the Superdex 200 5/150 GL. The proteins were monitored by fluorescence at 525 nm with excitation at 490 nm.

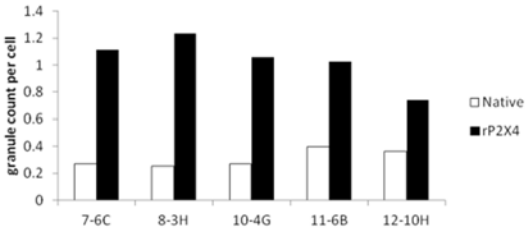

Fig.6 Detection of rP2X4 expressing on the cells.

The granules of native and rP2X4 expressing cells detected by fluorescence at 520 nm with excitation at 488 nm were counted with treatment of anti –rHD monoclonal antibodies at the concentration of 20 μg/mL.

【総括】

本研究では P2X4 受容体の機能的な抗体獲得を目指して実験を行った。本研究室で既に得られていたモノクローナル抗体は、ウエスタンブロッティング法などで rP2X4 分子の発現の確認には有益であった。インタクトな rP2X4 分子に対して強い抗体を作成するために、本研究室で既に作製した抗体のエピトープ領域である HD の組み換えタンパク質としての発現と溶液構造を決定した。また、HD と金属イオンとの結合実験を行った。これらの結果から、HD はインタクトの rP2X4 の立体構造と同様な構造を持っていることが示唆された。そこで、HD に対するモノクローナル抗体を作製したところ、インタクトの rP2X4 に強い結合力を持つ抗体作製ができた。この抗体では、rP2X4 を発現する生細胞を染色することができ、rP2X4 発現細胞のイメージングにこの抗体が利用できることを示唆した。このように本研究では、インタクトの rP2X4 に強く結合するモノクローナル抗体を作製する手法を示した。従って本研究は、薬学的に利用価値の高い P2X 受容体に対して強く結合する抗体の創製におけるマイルストーンである。

【引用論文】

(1)Nagata K. *et al.* (2009) *Mol. Pain*, **5**, 20., (2) Tsuda M. *et al.* (2009) *Mol. Pain*, **5**, 28., (3) Tsuda M. *et al.* (2003) *Nature*, **424**, 778-783., (4) 東貞行 (2008) 九州大学大学院薬学府　修士論文,(5) Kawate T. *et al.* (2009) *Nature*, **460**, 592-598(6) Jiang R. *et al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108(22)**, 9066-9071., (7) Coddou C. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282(51)**, 36879-36886.

【発表論文】* equal contributor

1. **Igawa T***, Higashi S*, Abe Y*, Ohkuri T, Tanaka H, Morimoto S, Yamashita T, Tsuda M, Inoue K, Ueda T. (2013) *J. Biochem.*, **153(3)**, 275-282.
2. **Igawa T***, Abe Y*, Tsuda M, Inoue K, Ueda T. (2015) *FEBS lett.* in press, doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.034