

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）

氏 名	井川 達弘
論 文 名	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
論文調査委員	主査 九州大学大学院薬学府教授 植田正 副査 九州大学大学院薬学府教授 津田誠 副査 九州大学大学院薬学府准教授 田中宏幸 副査 九州大学大学院薬学府准教授 阿部義人

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者の研究室では、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)の組み換えタンパク質を大腸菌により発現し、試験管内で巻戻すことにより 3 次構造を持った rECD の調製し、この蛋白質に対するモノクローナル抗体 (以下抗 rECD 抗体と略す) を確立している。そこで、申請者が抗 rECD 抗体の特徴付けを行ったところ、抗 rECD 抗体はウエスタンブロッティング法で rP2X4 を染色することができたことから、この抗体は培養細胞での rP2X4 の発現確認には利用可能であった。しかし、抗 rECD 抗体は rP2X4 の発現細胞(1321N1 細胞)をイメージングすることはできなかった。一方で抗 rECD 抗体がウエスタンブロッティング法でヒト由来の P2X4 (以下 hP2X4) を染色できなかったことから、rP2X4 と hP2X4 の一次配列の保存性が低い配列部分に着目して結合部位を絞り込んだ後、rP2X4 のアミノ酸の欠損体や変異体を行いたウエスタンブロッティング法により、この抗体が rP2X4 の Gln113-Ala130 の領域に結合していることを示唆した。

この領域 (Gln113-Ala130) はゼブラフィッシュ P2X4 の立体構造解析でヘッドメインとよばれる領域内に存在する。ヘッドメインが一連の P2X 受容体のサブタイプ (P2X1~P2X7) において、一次配列が異なる領域であること、この領域が 3 次構造をもっていることに着目し、rP2X4 の HD 領域 (Gln111-Val167、以下 rHD と略す) の N 末端に His₆-Met を付加した蛋白質をデザインし、pET-大腸菌 Origami(DE3)系にてその蛋白質を発現した。大腸菌を破砕して可溶性画分から、Ni²⁺アフィニティーカラムを用いて目的の蛋白質を精製し、酸性条件下でその蛋白質をプロモシアン処理により His タグ部分を除去し rHD を調製した。さらに安定同位体ラベル rHD を調製し、3 次元 NMR 解析による NMR シグナルの帰属及びシグナル間の NOE 情報に基づく構造計算により、rHD の溶液中の構造を決定した。rHD には 3 つのジスルフィド結合が存在するが、rHD の溶液構造いずれのジスルフィド結合も形成していることがわかった。また、rHD の主鎖のフォールディングは X 線結晶解析で決定されているゼブラフィッシュのヘッドドメインのそれと類似していた。さらに NMR および ITC (滴定型熱分析解析) を用いた相互作用解析により、rHD がアデノシン (P2X4 のリガンドである ATP の構成成分)、P2X4 の活性調整に関わる 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。それぞれの結合部位は既報と矛盾していなかった。以上の結果から rHD が機能的な構造を持っていることがわかった。

次に、構造および機能を持っている rHD をスカシ貝由来ヘモシアニン (KLH) と架橋して、抗原性を向上させ、MRL マウスを用いて抗体を作成した。定法によりモノクローナル抗体を作成し、rHD と特異的に結合するハイブリドーマを確立することができた。申請者の研究室では、rP2X4

の C 末側に GFP 蛋白質が融合したリコンビナント蛋白質を培養細胞により発現し、その細胞から rP2X4 を粗精製した画分を界面活性存在下で蛍光ゲル透過クロマトグラフィーを行うと rP2X4 が 3 量体として溶出する方法が確立されている。この方法を用いて、インタクト rP2X4 に強く結合できるモノクローナル抗体を 5 種類選別した。これらの抗体はいずれも rP2X4 を発現する 1321N1 細胞をイメージングすることができた。表面プラズモン共鳴 (BIAcore) を用いて、モノクローナル抗体を樹脂に固定し、rHD 濃度を変化させ、抗体への結合・解離を行いセンサーグラムを測定した。その解析から、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。この解離定数はイメージングを行った抗体濃度 (約 10nM) で生細胞を染色することができるという結果を支持するものであった。

このように本研究では、既存の抗体の特徴付けの結果に基づいてデザインした rP2X4 の領域 (HD 領域) を抗原として、インタクトの rP2X4 に強く結合し、rP2X4 を発現した 1321N1 細胞をイメージングするモノクローナル抗体を作製することができた。これまでミクログリアに発現する P2X4 受容体の細胞外領域に強く結合する抗体が得られていなかったが、これらの結果は P2X4 受容体細胞外領域に強く結合する抗体を創製する上で有益な情報を与えるもので、申請者は博士 (創薬科学) の学位を取得するのにふさわしいと判断した。