

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390155

研究課題名(和文) ヒト P2X4 受容体の 3 次元構造を基盤とした神経障害性疼痛抑制分子の探索

研究課題名(英文) Study on the development of molecules for depressing neuropathic pain based on tertiary structure of human P2X4 receptor

研究代表者

植田 正 (Ueda, Tadashi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90184928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000 円、(間接経費) 4,290,000 円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の原因蛋白質 P2X4 受容体に結合して機能抑制する分子の探索を行った。既に確立済みのラット P2X4 受容体結合モノクローナル抗体(mAb)と同様な手法により、抗ヒト P2X4 受容体細胞外ドメイン mAb を作成した。それらの mAb はヒト P2X4 受容体のいくつかの領域に結合したが、P2X4 受容体発現細胞を用いた実験で疼痛抑制効果がなかった。この結果は、これらの mAb が生理的条件下で取りうるヒト P2X4 受容体の 3 量体構造に結合しない事が原因であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We planned to develop molecules for depressing neuropathic pain involved in P2X4 receptor. Since we prepared a monoclonal antibody bound to rat P2X4 extracellular region, we planned to prepare monoclonal antibodies bound to human P2X4 extracellular regions using similar methods. Although a couple of types of monoclonal antibodies bound to human P2X4 extracellular regions were prepared, they did not have a potential to depress neuropathic pain. We newly developed the method to evaluate the interaction of a monoclonal antibody with a functionally trimeric P2X4 receptor. Using the method, it was shown that prepared monoclonal antibodies prepared in this study did not bind to a functionally trimeric P2X4 receptor, which may be the reason why monoclonal antibodies bound to human P2X4 extracellular regions did not have a potential to depress neuropathic pain.

研究分野：疼痛学

科研費の分科・細目：境界医学

キーワード：抗体 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

(1) P2X 受容体は7つのサブタイプ (P2X1-P2X7) が存在し、カチオン選択的なチャネルであることが報告されていた (Khakh et al. Pharmacol. Rev. 2002 など)。連携研究者である井上と津田らは神経損傷後に脊髄内ミクログリアの異常な活性化と、そこに発現する ATP 受容体サブタイプ P2X4 の刺激により BDNF (脳由来神経栄養因子) が放出され、BDNF が後角ニューロンに働いて神経障害性疼痛を引き起こすことを示唆した (Nature 2003; 2005)。また、井上と津田らは P2X4 をノックアウトしたマウスでは神経障害性疼痛が発現しないことも明らかにした (Tsuda et al. Mol. Pain 2009)。また、神経障害性疼痛モデルマウスで P2X4 阻害作用を持つ抗うつ薬が神経障害性疼痛の緩和に有効であることがわかった (Nagata et al. Mol. Pain 2009)。これらのことは、P2X4 が神経障害性疼痛の作用点であることを示している。一方、Kawate ら (Nature 2009) によってゼブラフィッシュの P2X4 の3次元構造が解析され、立体構造を基盤とした痛み抑制分子開発が可能となった。

(2) 研究代表者の研究室では、ラットのリコンビナント P2X4 膜外ドメイン (以下 rP2X4 ECD と略す) を大腸菌を宿主として産生し、その粗精製不溶性画分を得た。還元変性抗体を効率的に再生した方法 (Maeda et al. Protein Eng. 1995) を応用して、この不溶性画分から可溶性でかつ ATP 結合性の rP2X4 ECD を得た。

(3) 可溶性でかつ ATP 結合性の rP2X4 ECD を抗原として、rP2X4 ECD 特異的なモノクローナル抗体を得た (以下 HS-mAb と略す)。HS-mAb のエピトープを解析して、ゼブラフィッシュ P2X4 の立体構造 (Kawate et al. Nature 2009) を基に構築したラット P2X4 のモデル構造にプロットしたところ、エピトープ部位はラットとヒトでアミノ酸配列の違いが大きいヘッドドメイン (P2X4 の113番目から130番目) であることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 1の(2)と(3)の方法で得られた抗ラット P2X4 受容体に対するモノクローナル抗体 (HS-mAb) の特徴付けにより、HS-mAb がラット P2X4 受容体に結合する構造的基盤を評価する。

(2) ゼブラフィッシュ P2X4 受容体 (Kawate et al. Nature 2009) の立体構造を基盤として、ソフトウェア MOE を用いて、ラット P2X4 受容体のモデル構造を構築する。また MOE を用いて市販されている分子の中から、ヒト P2X4 受容体の機能を阻害する分子との相互作用を解析する。

(3) (1)と(2)の結果を踏まえて、ヒト P2X4

受容体に結合し、その機能を阻害するモノクローナル抗体を探索する。

(4) (1)-(3)の目的が達成されない場合、その理由について、P2X4 受容体の立体構造を基盤として解析し、新たな神経障害性疼痛抑制分子の開発に向けた情報とする。

3. 研究の方法

(1) ラット P2X4 受容体のヘッドドメインにあたる領域 (Gln110 から Val167) の蛋白質を得るため、このアミノ酸配列の N 末側に Met-His-His-His-His-His-His-Met を連結したラット His-tag ヘッドドメインをデザインした。この蛋白質を発現するため、アミノ酸配列に相当する遺伝子をベクター pET22b(+) に組み込んだ。目的のアミノ酸配列が組み込まれていることは DNA 配列解析により確認した。このベクターで大腸菌 Origami 株を形質転換し、LB 培地を用いて 37°C で培養した。培地の濁度が OD₆₀₀ = 0.8 になった段階で、最終濃度 0.1mM の IPTG (イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド) にて、蛋白質の発現誘導を行った。蛋白質画分を SDS-PAGE により分離し、銀染色にて目的の蛋白質の溶出を追跡した。目的の蛋白質は大腸菌の可溶性画分に産生された、この蛋白質は His を6つ連結しているため、Ni セファロースカラムに結合する。そこで、大腸菌の可溶性画分を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8) で平衡化した Ni セファロースカラムに吸着させ、カラムを洗浄後、50mM イミダゾールを含む同緩衝液で溶出した。その画分を水に対して透析した。透析液を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8) で平衡化したトヨパールスーパー-Q 650M (内径 1.5cm x 30cm) に吸着させ、同緩衝液から 0.25M NaCl を含む同緩衝液の塩濃度勾配により溶出した。溶出は 280nm の吸光度にて検出した。蛋白質画分を SDS-PAGE により分析し、銀染色を行った結果、均一の蛋白質が得られていることがわかった。また、MALDI-TOF Mass により目的の蛋白質を得たことを確認した。1L の培養液から 13mg の目的の蛋白質 (ラット His-tag ヘッドドメイン) を得た。

(2) ラット His-tag ヘッドドメインの水溶液中での立体構造を調べるために、3の(1)で得た形質転換株を窒素源として ¹⁵NH₄Cl、炭素源として ¹³C 均一ラベルグルコースを用いた M9 培地 (ダブルラベル用培地) と窒素源として ¹⁵NH₄Cl を用いた M9 培地 (¹⁵N ラベル化用培地) にてそれぞれ培養した。3の(1)と同様の方法でダブルラベル (¹³C、¹⁵N 均一ラベル) 化、¹⁵N ラベル化したラット His-tag ヘッドドメインをそれぞれ精製した。1L あたりの収量はそれぞれ、0.6mg、2.1mg であった。凍結乾燥した蛋白質を 50mM 尿素、10% 重水を含む 10mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) にて溶解し、¹⁵N ラベル化体を用いて ¹⁵N TOCSY、ダブルラベル化体を用いて、HNCA、HNCOCa、HNCACB、

CACBCONH, C(CO)NH, HC(CO)NH をそれぞれ測定した。測定は 25°C で Varian UNITY INOVA 600MHz NMR スペクトメーターにて測定した。NMR シグナルの帰属は、稲垣冬彦博士らが開発した Olivia

(URL: <http://fermi.pharm.hokudai.ac.jp/Olivia>, NMR 法に基づくタンパク質立体構造自動化システム) と NMR PIPE を用いた。構造構築は ¹⁵N NOESY 及び ¹³C NOESY の NOE データを基に、立体構造構築ソフトウェア CYANA にて行った。

(3) HS-mAb が、ヘッドドメインのどの部分に結合しているのかを正確に解析するために、ヘッドドメイン内の K122A, I125V, N127K の 3 アミノ酸変異体の調製を行った。3 の (1) で調製したベクターを基に、目的の変異を含んだプライマーを用いてメガプライマー法にて調製した。配列確認は DNA シークエンサーにて行った。目的の遺伝子変異の入ったベクターで、大腸菌 Origami 株を形質転換した。3 の (1) と同様に培養、精製を行った。このようにして、ラット His-tag ヘッドドメイン変異体 (K122A/I125V/N127K) を得た。

(4) HS-mAb とラット His-tag ヘッドドメインとの相互作用解析は ELISA 法及びドットプロット法にて行った。ELISA 法は、ELISA プレートに His-tag ヘッドドメイン及びその変異体蛋白質を吸着し、定法により HS-mAb が結合するかどうかを評価した。一方、ドットプロットでは、His-tag ヘッドドメイン及びその変異体とそれぞれの還元アルキル化体 (His-tag ヘッドドメインには 3 つのジスルフィド結合が存在するので、それを還元して、カルボキサミドメチル化したもの) を PVDF 膜に濃度を変えて吸着させた後、ウエスタンブロット法に準じて、HS-mAb の結合の有無を評価した。それぞれの解析方法、条件は Igawa らの論文 (J. Biochem. 2013) と同様に行った。

(5) rP2X4ECD と抗うつ薬の相互作用はソフトウェア MOE (ケミカルコンピューターグループ社製) のアルファサイトファインダーにて解析した。標準プロトコールに従い、P2X4 内の 50 個程度の窪みをアルファサイトファインダーで検出した。次に、MOE の ASEDock にて、各々の窪みと一連の抗うつ薬の結合エネルギーを評価した。抗うつ薬の構造は日本化学物質辞書 Web (http://nikkajiweb.jst.go.jp/nikkaji_web/) から得た。

(6) ヒト P2X4 受容体細胞外ドメイン (以下 hP2X4ECD と略す) にあたる領域 (Tyr54 から Phe330) を得るため、このアミノ酸配列の N 末側に Met-His-His-His-His-His を連結したヒト His-tagP2X4 細胞外ドメインをデザインした。この蛋白質を発現するため、アミノ酸配列に相当する遺伝子をベクター

pET22b(+) に組み込んだ。目的のアミノ酸配列が組み込まれていることは DNA 配列解析により確認した。このベクターで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、LB 培地、37°C で培養し OD₆₀₀=0.6-0.8 になるところで、最終濃度 0.5mM になるように IPTG を添加して、蛋白質の発現誘導を行った。IPTG 誘導後の培養液を遠心分離後、菌体を 20mM トリス緩衝液 pH 8 に懸濁して超音波破碎を行った。遠心分離にて沈殿物を回収し、20mM MOPS 緩衝液 pH 7 に懸濁して、デオキシリボヌクレアーゼ I、リボヌクレアーゼ A を添加して 1 時間、40°C で振盪した。4°C で遠心分離し、沈殿を 0.8M NaCl にて懸濁した。この懸濁液を遠心分離し、上清の OD₂₆₀ が 0.1 以下になるまでこの操作を繰り返し、概ね核酸類を除去した。次に沈殿物を 6M グアニジン塩酸を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 pH 8 (1mM EDTA を含む) 50mL に溶解し、5mM のメルカプトエタノールを加え、40°C で 2 時間インキュベーションした。この溶液を透析チューブに入れ、7M 尿素、5mM メルカプトエタノールを含む 20mM トリス緩衝液に対して透析した。透析にて生じた沈殿物は遠心分離により除去した。透析液は 7M 尿素を含む 20mM トリス緩衝液で平衡化した、Ni セファロース ファーストフロー (8 mL, GEヘルスケア社製) に吸着させた。同緩衝液 50mL で洗浄した後、400mM イミダゾールを含む同緩衝液で蛋白質を溶出した。SDS-PAGE にて分析を行い、CBB 染色を行った結果、主たる蛋白質は目的の分子量の位置に溶出していた。この画分を透析チューブに入れ、水に対して十分に透析した。その後沈殿物を含め凍結乾燥した。凍結乾燥した蛋白質の試験管内の再生は、Igawa らの方法 (J. Biochem. 2013) に準じて行った。

(7) 3 の (6) の方法により得た、3 次構造を持つ hP2X4ECD に対するモノクローナル抗体の作成は、Igawa らの方法 (J. Biochem. 2013) に準じて行った。但し、抗体作成に用いたマウスは自己免疫不全マウス、連携研究者の井上教授から供与された P2X4 ノックアウトマウスを用いた。

(8) ヒト P2X4 受容体モノクローナル抗体が一次配列上でどの領域に結合するのかを解析するために、hP2X4ECD に相当する Tyr54 から Phe330 を N 末側及び C 末側から、それぞ

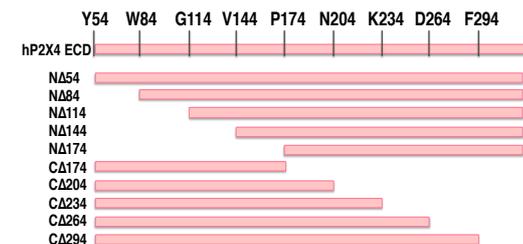


図 1 ヒト P2X4 細胞外ドメイン欠損変異体

れ 30 アミノ酸毎に削除した hP2X4ECD 欠損変異体を 10 種類作成した(図 1)。すなわち、目的とする蛋白質を発現できるように、3 の(6)で調製したベクターを鋳型として、5' 及び 3' プライマーにそれぞれ制限酵素サイトを含んだ適切なプライマーをデザインして、PCR により目的の遺伝子を増幅させた。目的の遺伝子を含んだ pET22b(+) で大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。各々の形質転換株を 3 の(6)と同様に LB 培地で培養し、IPTG 誘導したところ、10 種類の蛋白質は封入体として産生された。封入体を集めて、SDS-PAGE を行ったところ、主として目的の分子量を持つ蛋白質が生成していることがわかった。これらの蛋白質を用いて ELISA 法により、モノクローナル抗体との相互作用を評価した。解析条件は Igawa らの論文 (J. Biochem. 2013) と同様に行った。

(9)生理条件に近い状態で存在するヒト P2X4 受容体とモノクローナル抗体との相互作用を解析するため、ヒト P2X4 遺伝子の C 末側に GFP(緑色蛍光蛋白質)が連結するような遺伝子を含むベクターを Shinozaki ら (PLoS Biol. 2009) の方法により、1321N1 細胞に導入した。DEM 培地 (FCS+) で培養し 1321N1 細胞を集菌し、懸濁用緩衝液 (10mM HEPES pH7.5、い 10mM MgCl₂、20mM KCl、1mM EDTA) に懸濁し、ダウンスホモジナイザーで破碎した。次に、超遠心 (50,000rpm、30min、4°C) にて膜を回収した。ヒト P2X4 受容体を可溶化するため、緩衝液 (50mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5、200mM NaCl 及び界面活性剤を含む) 1mL に対しヒト P2X4 の膜を 50 μL 加え、4°C で一時間ゆっくり攪拌したのち、超遠心分離 (50,000rpm、30min、4°C) にて、不溶化物を除いた可溶化物を回収した。この可溶化物を作製した抗体産生ハイブリドーマの培養上清と混和し、4°C で一時間静置した。また、ポジティブコントロールとして市販されている P2X4 の細胞内ドメインに結合する抗体も同様に可溶化物と混和して静置した。その後、遠心分離 (14,000rpm、15min、4°C) し、上清をゲル濾過クロマトグラフィーにて解析した。カラムは STR SEC-300 (4.6 x 250mm) (Sepax Technology 社製) を用いた。移動相は 0.15M NaCl 及び界面活性剤を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5 とした。流速は 0.35mL/min、検出は GFP の蛍光波長とした (励起波長 490nm、検出蛍光波長 525nm)。

4. 研究成果

(1) HS-mAb が rP2X4ECD に特異的に結合していることの構造学的基盤を知る目的で、ラット His-tag ヘッドドメインの水溶液中での立体構造を解析した (図 2)。この構造は、NOE を基に算出された 20 種類の構造を重ね合わせたもので、r. s. m. d. は 0.5Å であった。この折れたたみ構造は、X線結晶構造解析法を用いて Kawate ら (Nature 2009) が決定したゼブ

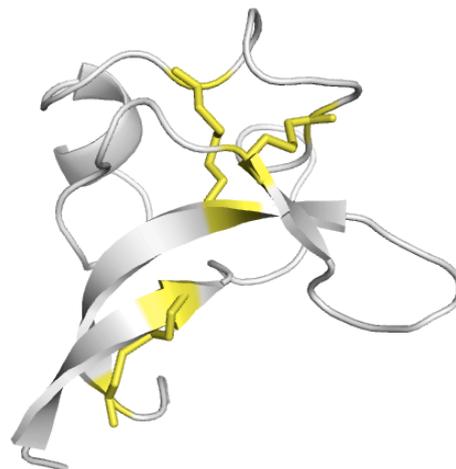


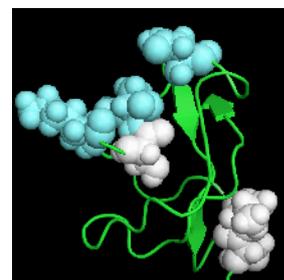
図 2 ラット P2X4 受容体ヘッドドメインの水溶液構造。黄色は 3 つのシスチンを表している。

ラフィッシュ P2X4 受容体のそれとほぼ一致していた。

HS-mAb は rP2X4ECD には結合するが、hP2X4ECD には結合しない結果が既に得られているので、ヘッドドメイン領域でラットとヒトの配列 113 番目から 130 番目を比較した。

ラット : QTQSTCPEIP DKTSICNSDA
ヒト : QTQGLCPEIP DATTVCXSDA

違いがあるアミノ酸残基を下線で示した。また、下線部のアミノ酸残基をラット P2X4 受容体ヘッドドメインの水溶液中の構造 (図 2) にプロットした (図 3)。



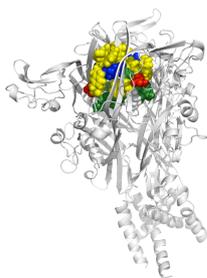
そのうち、Lys123、Ile125、Asn127、Lys123らのアミノ酸残基をヒト型に変えた (図 3)。

ラット His-tag

ヘッドドメインの変異体 (K122A/I125V/N127K) を作成した。この変異体と HS-mAb との相互作用を ELISA 及びドットプロットによって解析したところ、HS-mAb はこの変異体には結合しないことがわかった。この結果から、HS-mAb がラット P2X4 受容体のヘッドドメインと選択的に結合する構造的基盤を得ることができた。

(2) 連携研究者の井上、津田はパロキセチンなどの抗うつ薬が神経障害性疼痛の抑制効果があることを報告した (Nagata et al. Mol. Pain, 2009)。そこで、ゼブラフィッシュ P2X4 受容体の立体構造を基に、ソフトウエア MOE

を用いたモデリングによりラット P2X4 受容体の構造を構築し、パロキセチンの結合部位を解析した。モデル構造では 5 カ所の結合サイト候補が見つかった。その中でもサイト 5 に最も強く結合することが MOE



による計算からわかった。Nagata らの論文 (Mol. Pain 2009) で、多種の抗うつ薬の神経障害性疼痛抑制を評価している。本研究で、多くの抗うつ薬がサイト 5 に結合していることは示唆されたが、抗うつ薬の疼痛抑制の程度と計算により算出された抗うつ薬とラット P2X4 受容体のモデル構造との結合力とは、有意な相関性はなかった。

(3) (1) (2) の結果から、ラット P2X4 受容体の構造的基盤から、相互作用を解析できることがわかった。そこで、(1) の方法を用いて、hP2X4ECD に対して結合するモノクローナル抗体の調製を行った。研究方法 (6) (7) の方法によりモノクローナル抗体を調製し、(8) の方法により結合部位の評価を行った

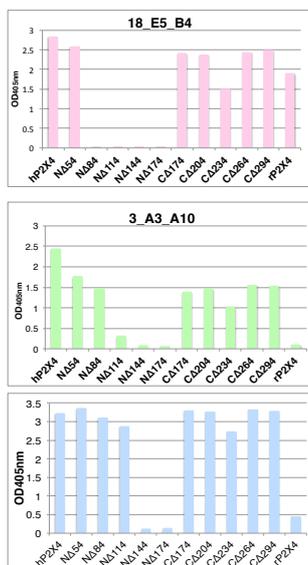


図 5 hP2X4ECD に対するモノクローナル抗体と P2X4 欠損体との結合

(図 5)。図 1 に示した蛋白質を用いて、本研究で調製したモノクローナルの特徴付けを行ったところ、概ね 3 つの領域配列に結合するモノクローナル抗体が得られた。すなわち、ヒト P2X4 受容体 55-84 の領域に結合するもの (図 5 上)、ヒト P2X4 受容体 84-114 の領域に結合するもの (図 5 中)、ヒト P2X4 受容体 114-134 領域に結合するもの (図 5 下) であった。これらのモノクローナル抗体を用いて、Nagata らの方法 (Mol. Pain 2009) にて、P2X4 受容体が発現する細胞を用いて神経障害性疼痛抑制効果を評価したが、いずれも抑制効果はなかった。

(4) (3) で得られた抗ヒト P2X4 細胞外ドメイン

モノクローナル抗体は、ヒト P2X4 細胞外ドメインには結合するが、疼痛抑制効果を示さなかった。この理由について、細胞表面発現蛋白質に蛍光物質 GFP を連結して細胞表面蛋白質の存在状態を評価する方法にて解析を行った。研究方法 (9) に従って、ヒト P2X4 受容体の C 末端側に GFP が結合したものを 1321N1 細胞にて調製して、ゲル透過分析を行ったところ、図 6 の A の位置に溶出した。こ

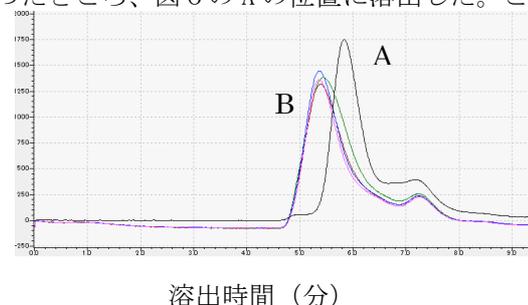


図 6 ヒト P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質のゲル透過クロマトグラフィー (B は市販の抗体存在下での溶出時間)

の溶出時間は、標準物質との比較から、P2X4 受容体-GFP 融合体が 3 量体を形成していることを示唆している。一方、1mM ATP の存在下と非存在下で 1321N1 細胞発現ヒト P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質を 4℃、40℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃ の各温度で 10 分間ずつ加熱し、4℃ で静置した。これらのサンプルを同様のクロマトグラフィーを行ったところ、ATP 存在下では、より高温の加熱で A の位置に溶出するピークの高さが低下したことから、A の位置に溶出した P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質には ATP が結合していることが示唆された。次に、P2X4 受容体の細胞内ドメインに結合することが知られている市販のモノクローナル抗体 (0.7mg/mL) を 25、50、100、200 倍希釈したものを 1321N1 細胞発現ヒト P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質に加え、ゲル透過クロマトグラフィーを行ったところ、いずれも B の位置に溶出した。この結果は、ヒト P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質にモノクローナル抗体が結合すると溶出時間が早くなることがわかった。

そこで、4 の (3) で得られた 3 種類のモノクローナル抗体を 1321N1 細胞発現ヒト P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質に加え、ゲル透過クロマトグラフィーを行った (図 7)。3 種類のモノクローナル抗体の種々の濃度で解析を行ったが、溶出位置はヒト P2X4 受容体-GFP 融合蛋白質 3 量体の位置 (図 7 の A) と変わらなかった。この結果から、本研究で得たモノクローナル抗体は 3 量体を形成しているヒト P2X4 受容体に結合していないことがわかった。すなわち、本研究で得たモノクローナル抗体はヒト P2X4 受容体のいくつかの一次配列領域には結合するが、生理条件下と同様なコンフォメーションを持った P2X4 受容体には結合しないので、神経障害性疼痛の抑

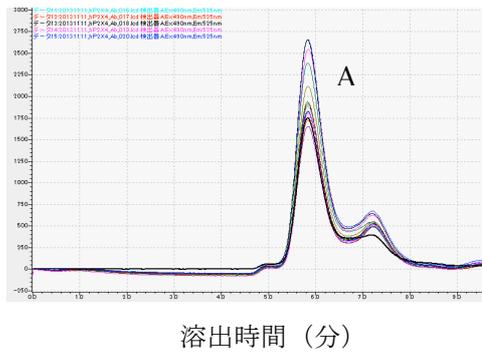


図7 ヒトP2X4受容体-GFP融合蛋白質のゲル
 濾過クロマトグラフィー（本研究で得たモノ
 クローナル抗体存在下での溶出結果）

制効果がないことが示唆された。しかしながら、本項で構築したゲル濾過クロマトグラフィーは、ATP結合型ヒトP2X4受容体に結合するモノクローナル抗体を選別するのに有効であることがわかった。

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① Tatsuhiro Igawa、Sadayuki Higshi、Yoshito Abe、Takatoshi Ohkuri、Hiroyuki Tanaka、Satoshi Morimoto、Tomohiro Yamashita、Makoto Tsuda、Kazuhide Inoue、Tadashi Ueda、Preparation and characterization of a monoclonal antibody against the refolded and functional extracellular domain of rat P2X4 receptor, *The Journal of Biochemistry*、査読有、153巻、2013、275-282、doi: 10.1093/jb/mvs143

〔学会発表〕（計7件）

- ① 永井咲妃、白石充典、井川達弘、齋藤秀俊、山下智大、津田誠、井上和秀、阿部義人、植田正、P2X4受容体細胞外ドメイン認識抗体のスクリーニング系の確立、平成26年度日本生化学会九州支部会、平成26年5月18日、九州大学コラボレーションI（福岡市）
- ② 植田正、バイオベター医薬品の創製を目指したプロテインエンジニアリング、第86回日本生化学会大会、平成25年9月11日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ③ 井川達弘、阿部義人、白石充典、津田誠、井上和秀、植田正、NMRを用いたラットP2X4受容体ヘッドドメインと金属イオンとの相互作用解析、第13回日本蛋白質科学会、平成25年6月12日、とりぎん会館（鳥取市）
- ④ 井川達弘、阿部義人、白石充典、津田誠、井上和秀、植田正、NMRを用いたラットP2X4受容体headドメインの構造決定およびリガンド相互作用解析、第85回日本生化学会、平成24年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ（福岡市）
- ⑤ 井川達弘、阿部義人、白石充典、津田

誠、井上和秀、植田正、ラットP2X4受容体Headドメインの構造および機能解析、第12回日本蛋白質科学会、平成24年6月20日、名古屋国際会議場（名古屋市）

- ⑥ 望月志保、白石充典、阿部義人、津田誠、井上和秀、植田正、ヒトP2X4受容体細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体の作製、第84回日本生化学会、平成23年9月22日、京都国際会議場（京都市）
- ⑦ 井川達弘、阿部義人、東貞行、白石充典、津田誠、田中宏幸、井上和秀、植田正、抗ラットP2X4抗体の抗原認識機構、第11回日本蛋白質科学会、平成23年6月7日、ホテル阪急エキスポパーク（吹田市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://meneki.phar.kyushu-u.ac.jp/Protein/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田正 (UEDA Tadashi)

九州大学大学院・薬学研究院・教授

研究者番号：90184928

(2) 研究分担者

阿部義人 (ABE Yoshito)

九州大学大学院・薬学研究院・准教授

研究者番号：60315091

研究分担者

田中宏幸 (TANAKA Hiroyuki)

九州大学大学院・薬学研究院・准教授

研究者番号：30253470

研究分担者

白石充典 (SHIROISH Mitsunori)

九州大学大学院・薬学研究院・助教

研究者番号：00380527

研究分担者

齋藤秀俊 (SAITO Hidetoshi)

九州大学大学院・薬学研究院・助教

研究者番号：90444792

（平成24年度より連携研究者）

(3) 連携研究者

井上和秀 (INOUE Kazuhide)

九州大学大学院・薬学研究院・教授

研究者番号：80124379

連携研究者

津田誠 (TSUDA Makoto)

九州大学大学院・薬学研究院・准教授

研究者番号：40373394