

令和元年6月13日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293129

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛モデル動物を用いた「痛みの客観的評価」の研究基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of research foundation on "objective pain assessment" using animal models suffering from neuropathic pain

研究代表者

植田 正 (UEDA, Tadashi)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：90184928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛は世界で2000万人以上が罹患している疾患である。この原因蛋白質の一つがP2X4受容体である。痛みの発症機構は多様であり、痛みの評価は患者の主観的なものであることから、治療薬の開発において「客観的な痛みの評価」が必要である。本研究では、ラットP2X4に選択的に結合する抗体分子を調製し、培養細胞上に発現したP2X4分子を可視化できた。この結果は、客観的に痛みを評価する研究基盤の確立に寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は多くの要因により発症する。本研究では、ラットのP2X4受容体に着目し、優先的かつ強く結合するモノクローナル抗体を初めて調製した。併せて、この抗体が、P2X4受容体のどの部分に結合しているのかを明らかとした(論文報告済)。この抗体を用いれば、神経障害性疼痛時にラットのP2X4受容体の発現をin vivoで評価できる可能性があり、神経障害性疼痛におけるP2X4受容体の関与を知ることができる。その点から、本研究は基礎的な創薬研究と位置付けられ、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：There are more than 20 million patients suffering from neuropathic pain in the world. One of the proteins involved in neuropathic pain is P2X4 receptor. Pain develops from various causes. In general, pain assessment depends on individual subject. In order to develop novel medicines to cure neuropathic pain, objective pain assessment must be necessary. In this study, we prepared antibodies bound to conformational structure of rat P2X4 receptor, and then visualized rat P2X4 receptors expressed on 1321N1 culture cells using those antibodies. These results contribute to the fundamental research on the pain assessment caused by neuropathic pain.

研究分野：疼痛学、蛋白質工学

キーワード：神経障害性疼痛 蛋白質工学 P2X4受容体

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は慢性難治性疾患であり、世界で約 2000 万人以上の患者がいる。連携研究者である井上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、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 424, 778-783, 2003; Nature, 438, 1017-1021, 2005)。また、井上らは P2X4 をノックアウトしたマウスでは神経障害性疼痛が発症しないことも明らかにした (Mol. Pain 5, 28, 2009)。さらに、P2X4 阻害作用を持つ薬剤がヒトでも神経障害性疼痛を抑制することが報告されている (Mol. Pain 5, 28, 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、最近ゼブラフィッシュの P2X4 の 3 次元構造が解析され、その立体構造を基盤とした研究の展開が可能となっている (Kawate et al. Nature 2009; Hattori & Nature 2011)。

臨床で用いられる痛みの指標は VAS (Visual Analogue Scale) 法が用いられている。これは患者の主観的な痛みの相対的な指標であり、患者間の個体差が存在する。従って、ヒトの神経障害性疼痛の治療薬の開発や治療効果を評価する上では、神経障害性疼痛の客観的な指標が必要であるが、痛みの客観的指標に向けた臨床治療薬の開発が行われていない現状があった。

そこで、我々の研究グループは、ラット P2X4 細胞外ドメインのリコンビナント大腸菌発現系を構築し、封入体として産生された蛋白質を試験管内で巻き戻して、なんらかの高次構造を持つ分子群を得た。これを抗原として、マウスに免疫し、得られた B 細胞を定法によりハイブリドーマ化し、クローニング後、ヒト P2X4 には結合せず、ラット P2X4 細胞外ドメインに選択的に結合するモノクローナル抗体 (mAb) を確立した (Igawa et al. J. Biochem. 2013)。ラット P2X4 の抗原の変異体を作成し、エピトープ領域を同定したところ、P2X4 分子の「ヘッドドメイン」(Gln110 から Val167) と呼ばれる領域に結合していることを示唆した。しかしながら、この抗体は立体構造を持ったラット P2X4 の細胞外ドメインには結合せず、変性した P2X4 細胞外ドメインに特異的に結合することがわかった (Igawa et al. J. Biochem. 2013)。

2. 研究の目的

本研究は、神経障害性疼痛のターゲット蛋白質であるラット P2X4 (rP2X4) 受容体を選択的に結合する mAb 調製し、細胞表面上に発現した rP2X4 受容体の発現をイメージングすることである。そのためには、立体構造を持った rP2X4 受容体に強く結合する抗体を調製すること、その抗体を用いて、細胞上に発現した rP2X4 受容体を可視化することが本研究の

目的である。

3. 研究の方法

(1) ラットヘッドドメイン (rHD) の調製

Igawa らが FEBS Lett. (2015) に報告している方法により調製した。すなわち、rHD 領域 (rP2X4 受容体の Gln110 から Val167 に相当) の蛋白質を得るため、このアミノ酸配列の N 末側に Met-(His)₆-Met を連結した rHD をデザインした。リコンビナント蛋白質は、pET22b(+)/大腸菌 Origami 株で発現した。精製は、Ni セファロースカラム、トヨパールスーパー Q 650M を用いた。精製は、蛋白質画分の SDS-PAGE 分析 (銀染色)、MALDI-TOF Mass 解析により確認した (詳細は Igawa ら FEBS Lett. 2015 に記載)。

(2) rHD 変異体のデザインと調製

図 1 にラットとヒトのヘッドドメインの配列のうち、ラットとヒト間でアミノ酸置換が起こっている領域を示す。

PKDTSICNSDADCTPGSVVDTHSSGVATGRCVVFNGS
PDATTVCKSDASCTPGSVVDTHSSGVATGRCVAFNGS

図 1 ヘッドドメイン内の Pro120-Ser155 配列。青字はラット、黒字はヒトの配列 (異なるアミノ酸残基は下線を付した)

ラットとヒトのヘッドドメイン内には、7 つのアミノ酸残基の違いがある。rHD 内で、これらのアミノ酸残基をヒト型配列に 1 アミノ酸置換した、rHD (K122A)、rHD (S124T)、rHD (I125V)、rHD (N127K)、rHD (D131S)、rHD (P151A) 及び rHD (E154G) をデザインし、3. (1) で得た rHD の発現ベクター上の cDNA 配列上で部特異的変異導入法によりアミノ酸置換を行った。目的のアミノ酸置換の確認は、DNA 配列解析により行った。いずれの変異体も 3. (1) と同様に発現、精製した。

(3) ラットヘッドドメイン (rHD) 及び変異体を用いた免疫実験

KLH (スカシ貝由来ヘモシアニン) を 150mM NaCl を含むリン酸緩衝液 (pH7.4) (PBS) に対して十分透析を行った後、3. (1) により得られた rHD を KLH に対し 50 倍のモル比を加えた。この混合溶液に PBS で希釈したグルタルアルデヒド (0.2%) 溶液を等容量加え、4 で 1 時間反応させた。その後架橋反応を停止するため、PBS で溶解したグリシンを終濃度 200 mM になるように加え、4 で 1 時間インキュベーションし、rHD-KLH 抗原を得た。

7 週齢のメスの BALB/c マウス、C57BL/6 マウスを用いて、2 週間毎に rHD-KLH 抗原で免疫した。初回はフロイントの完全アジュバンドのエマルジョンとして、2 次免疫フロイントの不完全アジュバンド、3 次免疫以降はアジュバンドなしで、抗原を腹腔内に投与した。2 次免疫以降のマウスから免疫 3 日後に眼

窩採血を行い、血液を遠心分離し、血清を回収した。この血清を用いて ELISA 法にて、rHD 特異的な抗体の産生を定量した。

(4)ELISA 法

96 穴の免疫用プレート (NUNC 社製) に 15 mM Na_2CO_3 -35 mM NaHCO_3 緩衝液 (pH 9.6) で溶解した 1 mM rHD 溶液、100 μl を入れ、37 で 1 時間静置した。非特異的吸着を避けるために、5% スキムミルクと 0.005% Tween 20 を含む 300 μl の PBS (T-PBS) を加え、37 で 1 時間静置した。その後、プレートを T-PBS で十分に洗浄した。次に、100 μl の種々の濃度のモノクローナル抗体を加え、37 で 1 時間静置した。プレートを T-PBS で 3 回洗浄した後、T-PBS で 1000 倍希釈した、ペルオキシダーゼが連結したヤギ由来抗マウス IgG (アブカム社から購入) を加え、37 で 1 時間静置した。プレートを再び T-PBS で 3 回洗浄した後、0.003% の過酸化水素を含む 60 mM クエン酸-40 mM クエン酸ナトリウム緩衝液で溶解した ABTS (0.3 mg/ml) を 100 μl ずつウエルに加え、37 で、30 分、酵素反応を行った。その後、MULTISKAN FC プレートリーダーで 405nm の吸光度を測定した。

(5)rHD に対するモノクローナル抗体 (mAb) の調製

細胞融合は PEG 法 (Glafre and Milistein, Methods Enzymol. 1981) により行った。融合蛋白質は 15% FCS を含む e-RDF 培地に懸濁させ、96 穴無菌培養プレート各ウエルに 1 滴ずつ分注した。37、5% CO_2 で 1 日培養した後、10% FCS を含む 2 倍濃度の HAT 培地を 1 滴ずつ分注した。4 日おきに HAT 培地を添加しながら、コロニーが形成するまで約 2 週間、37、5% CO_2 で培養を行った。培養上清を ELISA 法で評価し、陽性のウエルを 24 穴プレートにスケールアップし、再度 37、5% CO_2 で 4 日間培養して細胞のストックを行った。

細胞のモノクローン化は限界希釈法 (Goding J. Immunol. Methods. 1980) にて行った。凍結保存した細胞を 10% FCS を含む eRDF 培地に懸濁し、4 日間 37、5% CO_2 存在下で培養した。その後、限外希釈として培養後の細胞懸濁液を 1 ウエルあたり、625 個、125 個、25 個、1 個、0.2 個と希釈系列を作製し、96 穴プレートにそれぞれの希釈倍率で、1 滴ずつ分注し 2 週間培養した。培養上清を回収し、ELISA にて抗体価の評価を行い陽性のウエルをスケールアップした。限界希釈をコロニーが見られた全てのウエルが単一に発色するまで繰り返した。

(6)rP2X4 の立体構造を認識する mAb の選別 (Fluorescence Detection Size Exclusion Chromatography : FSEC)

mAb がコンフォメーションを持った P2X4 受容体と結合することを評価するために、蛍光検出器に連結したゲルろ過クロマトグラフ

により解析した。すなわち、GFP 融合 rP2X4 受容体発現 1321N1 細胞の膜画分から rP2X4 受容体を可溶性緩衝液 (200mM 塩化ナトリウム、界面活性剤、を含む 50mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.5) を用いて可溶性し、モノクローナル抗 rHD 産生細胞の培養上清と混和し、4 で 1 時間静置した懸濁液を遠心分離後、上清を界面活性剤を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液、pH 8 で平衡化したゲルろ過カラム (Superdex 200 5/150 GL) にアプライし、GFP (励起波長: 490nm、測定波長: 525nm) の蛍光値を測定した。

(7)抗 rHD mAb 抗体の精製

COSMOGEL®Ig-Accept Protein A を用いて、モノクローナル化ハイブリドーマ上清から抗 rHD 抗体モノクローナル抗体の精製を行った。50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7) にて平衡化した COSMOGEL®Ig-Accept Protein A にハイブリドーマの細胞上清をアプライし、同緩衝液にて洗浄し、100 mM グリシン緩衝液 (pH 3) で溶出させた。溶出液は同容量のトリス塩酸緩衝液 (pH 9) と素早く混合した。その後、混合液を PBS に対し十分に透析した。

(8)滴定型熱分析法、表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用解析の解析

等温滴定型熱量装置 (MicroCal Auto-iTC₂₀₀) を用いた相互作用解析は以下のように行った。抗 rHD mAb 及び rHD を PBS に対して十分に透析した。透析外液を用いて、3 μM の抗 rHD mAb、60 μM の rHD を調整した。測定温度を 25 に設定し、サンプルセルに抗 rHD mAb、測定シリンジに rHD を充填し、滴定を行った。データはオリジンソフトウェアにて解析した。

表面プラズモン共鳴法による相互作用解析は BiacoreX100 を用いた。抗 rHD 抗体 IgG をセンサーチップ CM5 にアミンカップリング法により固定した。その後、ランニング緩衝液 HBS-EP [150 mM 塩化ナトリウム、3 mM EDTA、0.005% Tween 20 を含む 10 mM HEPES (pH 7.4)] 中で、アナライトとして rHD の濃度を変動させ、それぞれのセンサーグラムを得た。それぞれの濃度で 2 回ずつ測定したデータを用いて、1 対 1 の結合様式でフィッティングを用い、解離定数を求めた。

(9)抗 rHD mAb を用いた細胞染色

rP2X4 を発現していない 1321N1 細胞および rP2X4 発現 1321N1 細胞の継代時に 96 穴プレート 1 ウエルあたり 5×10^3 個となるように細胞を分注した。一晚、37、5% CO_2 条件下でインキュベートして、細胞をプレートに定着させた。平衡塩溶液で洗浄し、50、20、10、2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整し、37 で 30 分間プレインキュベーションした抗 rHD 抗体を添加した。37 で 30 分インキュベーション後、冷却した PBS で 10 倍希釈したパラホルムアルデヒドにプロッキング溶液 (3% ヤギ血清を含む

PBS) を加え、室温で 15 分間インキュベーションした。その溶液を除いた後、ブロッキング溶液で 1000 倍希釈した抗マウス IgG に Alexa 488 及びファロイジンを 2 次抗体として加え、遮光して室温にて 1 時間静置した。PBS による洗浄を 3 回行い、PBS で 200 倍希釈した Hoechst を加え、遮光して室温にて 15 分静置し核染色を行った。PBS で 6 回洗浄を行い、In Cell Analyzer により、励起波長を 488nm、蛍光波長を 525nm として、蛍光画像を読み取った。

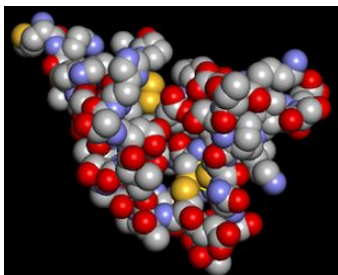
(10) 抗 rHD mAb を用いたフローサイトメトリ

抗 rHD mAb とコントロール抗体 (抗ニワトリリゾチーム mAb: LKS103) を 3. (7) の方法により精製した。PBS に対して透析した mAb 溶液に 1M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) を溶液量の 1/10 加えた。次に、Alexa Fluor 488 NHS Ester を 10mg/ml になるように DMSO に溶解し、重量比で mAb の 1/20 量、mAb 溶液に加え、室温で 1 時間反応させた。エタノールアミンを加え (終濃度 100 mM)、反応を停止した。その後、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200 10/300) にて、低分子を除去し、蛋白質画分を Amicon Ultra-2 30MWCO を用いて、限外濾過した。それぞれの mAb に結合した蛍光色素量を分光光度計にて評価したところ、mAb 1 分子あたり、約 2 分子の蛍光色素が結合していた。

4. 研究成果

(1) ラットヘッドドメイン (rHD) 及び変異体の免疫実験

コンフォメーションを保持したラット P2X4 に結合する mAb を作成するため、糖鎖付加の影響が少なく、ラットとヒトの種間の 1 次配列が異なり、P2X のサブタイプ間の 1 次配列が異なるヘッドドメインを抗原として用いた。NMR で解析した溶液中のヘッドドメインの立体構造並びに 1 次配列を図 2 に示す。



MQTQSTCPEIPDKTSLCNSDADCTPGSVDTHTSSGV
ATGRVCVPFNESVKTCEVAAWCPV

図 2 ラット P2X4 受容体ヘッドドメイン (rHD) (P2X4 受容体 Glu110 から Val167 に相当) の水溶液中の構造 (PDB 2RUP) と一次配列 (N 末の M は大腸菌による発現のため付加している。黄色は硫黄原子)

このように rHD は溶液中で平衡論的には安定な構造を持っていることがわかった (Igawa et al. 2015) ので、KLH をキャリア蛋白質として、マウスに免疫した。用いたマウスの種間の抗体産生能の比較では、BALB/C の方が、C57BL/6 よりも rHD 特異的な抗体産生量が多かった。

(2) rP2X4 の立体構造を認識する mAb の選別

rHD 特異的抗体産生マウスの脾臓から定法により、ハイブリドーマを作成し、クローニングを行った。確立されたハイブリドマクローンから産生される抗体のうち、コンフォメーションを持った rP2X4 分子に結合する mAb かどうかを識別するために、FSEC を行った (図 3)。

図 3 の結果から明らかなように、rHD を用いて確立した mAb 5 種においては、細胞上に発現している rP2X4 に結合することが示唆された。Igawa et al. (2013) で調製された mAb (g, 図 3) は、細胞上に発現している rP2X4 受容体に強くは結合できないことがわかった。

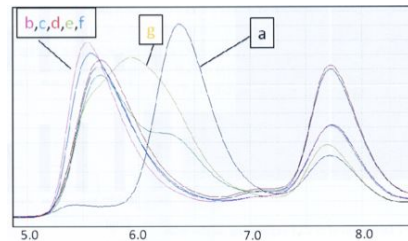


図 3 FSEC 分析 (縦軸、GFP 蛍光; 横軸、流出時間 (分)) a、抗体なし; b-f、本実験で確立したモノクローナル抗体存在下; g、Igawa et al. (2013) で確立した抗体存在下 (Adapted from Fig. 1c in Purinergic Signal. (2019) 15:27-35 with permission by Springer Nature)

(3) 5 種の mAb と rHD との相互作用解析

4. (2) で評価した 5 種の mAb (図 3 b-f) を

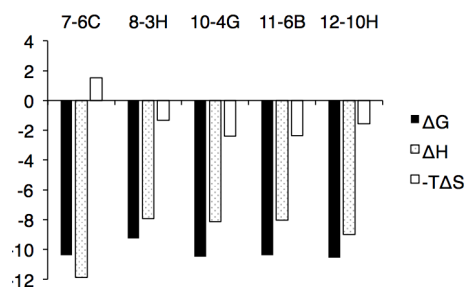


図 4 滴定型熱分析装置を用いた抗 rHD mAb と rHD との相互作用解析。

縦軸はエネルギー (kcal/mol)、黒が自由エネルギー変化、ドットがエンタルピー変化、白がエンタルピー変化に絶対温度を乗じたもの (Adapted from Fig. 2 in Purinergic Signal. (2019) 15:27-35 with permission by Springer Nature)

産生するハイブリドーマから、それぞれ mRNA を抽出して cDNA 配列を解析したところ、いずれの mAb も CDR 配列が異なっていることがわかった（データは割愛）。そこで、5 種の mAb と rHD との相互作用を滴定型熱分析装置（Auto iTC₂₀₀）を用いて解析した（図 4）。mAb と rHD との相互作用を滴定型熱分析装置（Auto iTC₂₀₀）を用いて解析した（図 4）。

いずれの測定結果においても、結合数は 2 であった（抗体は 1 分子に Fab を 2 分子持っており、抗原 2 つに結合できる）。7-6C 以外の mAb は、相互作用においてエントロピーとエンタルピーのいずれも優位に参与していることがわかった。また、いずれの mAb の rHD との結合力も 10 kcal/mol 程度であり、数十 nM オーダーの抗原抗体複合体の解離定数を持っていた。

一方、5 種の mAb のうち、8-3H と 12-10H を固定化した rHD に対する相互作用を表面プラズモン装置を用いて解析した。その結果、8-3H は 100 nM、12-10H は 60 nM の抗原抗体複合体解離定数を持っていた。表面プラズモン共鳴法は rHD を固定化するため、一般に解離定数が等温滴定型熱量計に対して大きくなる傾向がある。これが解離定数の違いに反映されたと考察した。

(4) 抗 rHD に対する mAb のエピトープ解析

3. (2) で調製した rHD 変異体を抗原として、ELISA 法により 5 種の mAb（図 4 に相当するもの）のエピトープ解析を行った（図 5）。

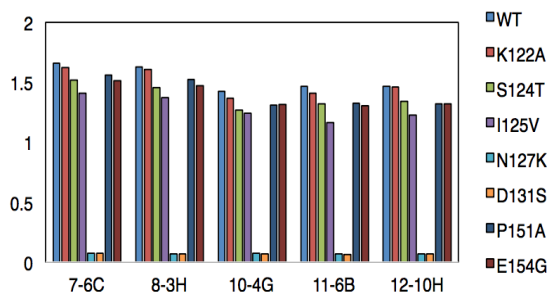


図 5 rHD 野生型 (WT) と rHD 変異体を用いたエピトープ解析 (ELISA 法)。縦軸は 405nm の吸光度。

(Adapted from Fig.3b in Purinergic Signal. (2019) 15:27-35 with permission by Springer Nature)

この結果は、表面プラズモン共鳴法を用いて、8-3H、12-10H と rHD 及び 7 種の rHD 変異体との相互作用を解析した結果と同一であった（データは割愛）。これらの結果から、Asn127 と Asp131 がエピトープ内の重要なアミノ酸残基であることがわかった。rHD 内でアミノ酸変異を施した残基を rHD 構造上にプロットした（図 6）。Asn127 と Asp131 は近接しており、この領域に本研究で確立した 5 種の mAb が結合していることが示唆された。

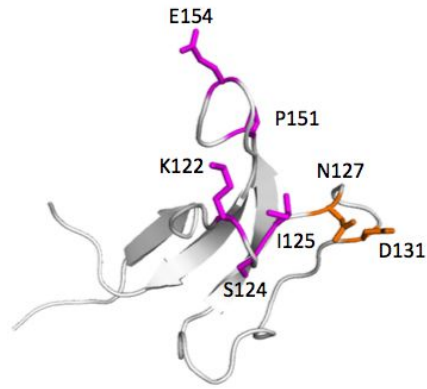


図 6 rHD 上でのアミノ酸変異部位。抗体との相互作用が極端に低下した部分を橙色で示している。

(Adapted from from Fig.3c in Purinergic Signal. (2019) 15:27-35 with permission by Springer Nature)

(5) 抗 rHD mAb を用いた細胞染色

5 種の mAb を用いて、3. (9) の方法で細胞染色した。一例として 12-10H の抗体濃度 10 μg/ml を用いた場合の細胞染色の結果を図 7 に示す。1321N1 細胞（野生型）は Hoechst により核染色されているのみだが、rP2X4 受容体発現 1321N1 細胞には、核と rP2X4 受容体が同時染色されていることがわかった。

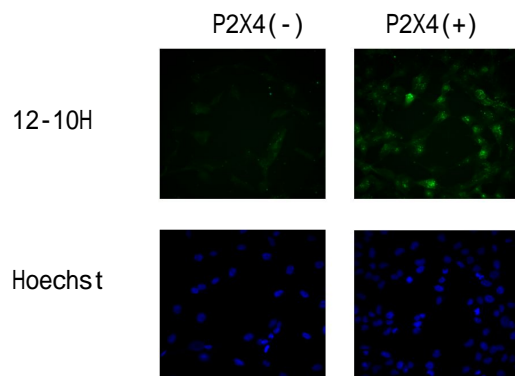


図 7 1321N 細胞上の rP2X4 受容体の検出（図 7）。また、残り 4 種の抗体においても 20 μg/ml の濃度を用いたとき、有意に細胞上の P2X4 受容体を染色することができた。(Adapted from Fig.5 in Purinergic Signal. (2019) 15:27-35 with permission by Springer Nature)

(6) 抗 rHD mAb を用いたフロサイトメトリー
3. (10) の方法で調製した蛍光ラベル化抗体 rHD mAb (12-10H) を用いてフロサイトメトリーを行った。ネガティブコントロールとして、蛍光ラベルした抗ニワトリリゾチーム mAb (LKS103) を用いた（図 8）。

LKS103 抗体と rP2X4 発現細胞を混合した場合や rP2X4 を発現していない細胞に 12-10H

を混合した場合は、無処理の場合とピーク
の分離が不十分であった。一方、12-10HとrP2X4
発現細胞を混合したサンプルは最大細胞数
が右にシフトし、無処理の場合とピークを分
離できた。この結果は、12-10H抗体はrP2X4
発現細胞のイメージングツールとして利用
できることを示している。

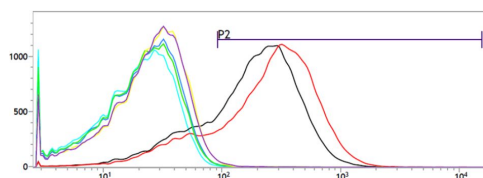


図8 rP2X4発現1321N1細胞と蛍光ラベル化
した12-10HおよびLKS103抗体を用いたフロ
サイトメトリー。縦軸：細胞数。横軸：蛍
光強度。黒（室温）と赤（37℃）でプレイン
キュベーションした12-10H由来。水色（無
処理）、青（室温）、緑（37℃）でプレイン
キュベーションしたLKS103由来。黄、紫は
1321N1細胞（野生型）と12-10H由来。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tatsuhiro Igawa, Shuhei Kishikawa, Yoshito Abe, Tomohiro Yamashita, Saki Nagai, Mitunori Shiroishi, Chinatsu Shinozaki, Hiroyuki Tanaka, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Tadashi Ueda, Evidence for detection on rat P2X4 receptor expressed on cells by generating monoclonal antibodies recognizing the native structure, PURINERGIC SIGNALING, 査読有, 15巻, 2019, 27-35, doi: 10.1007/s11302-019-09646-5.

Tatsuhiro Igawa, Yoshito Abe, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Tadashi Ueda, Solution structure of the rat P2X4 receptor head domain involved in inhibitory metal binding, FEBS LETTERS, 査読有, 589巻, 2015, 680-688, doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.034.

〔学会発表〕(計5件)

篠崎知夏、岸川秀平、白石充典、河野敬太、津田 誠、阿部義人、植田 正、神経障害性疼痛の定量化に向けた抗ラットP2X4 head domain抗体の標識に関する研究、第91回日本生化学会大会、2018年9月10日（京都市）

岸川秀平、阿部義人、井川達弘、齊藤秀俊、山下智大、津田 誠、井上和秀、植田 正、抗ラットP2X4受容体抗体の抗原抗体反応の特徴づけ、第17回日本蛋白質科学会年会、2017年6月21日、仙台国際センター（仙台市）

阿部義人、痛み受容体P2X4細胞外ドメインの調製及び抗体作成、平成28年度

大阪大学蛋白質セミナー、2016年11月1日、九州大学コラボレーションI 視聴覚室（福岡市）

岸川秀平、阿部義人、井川達弘、齊藤秀俊、山下智大、津田 誠、井上和秀、植田 正、抗ラットP2X4受容体ヘッドドメイン抗体を用いた痛みのイメージングに関する研究、第33回日本薬学会九州支部会、2016年12月3日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島市）

永井咲妃、白石充典、井川達弘、齊藤秀俊、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蛍光ゲルろ過法によるスクリーニング系の確立、第25回クロマトグラフィー会議、2014年12月12日、京都大学（桂キャンパス）船井哲良記念館（京都市）

〔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

白石充典(SHIROISHI 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

日下部宜宏(KUSAKABE Takahiro)
九州大学大学院・農学研究院・教授
研究者番号:30253595

(平成29年度より研究分担者に追加)

(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

(4) 研究協力者

津田 誠(TSUDA Makoto)
九州大学大学院・薬学研究院・教授
研究者番号:40373394