

原 著

I 型 IP₃ 受容体 / Ca²⁺ 放出チャネルを特異的に認識する モノクローナル抗体の作製

尾上 均*

宇高ちひろ**

中野麻衣子***

山崎 理紗**

武田 朋子***

<要 旨>

イノシトール1, 4, 5-三リン酸 (inositol 1, 4, 5-trisphosphate: IP₃) 受容体は、小胞体膜上で四量体を形成することにより、IP₃が結合すると開口して、Ca²⁺を細胞質へと動員するCa²⁺放出チャネルとして機能するタンパク質である。IP₃受容体には現在までにI~III型までの三つのタイプが同定されている。今回我々は、各タイプのIP₃受容体の機能を解析するための特異的プローブの開発を目的に、I型IP₃受容体の特異的に認識する抗体の作製を行った。

I型IP₃受容体の部分ペプチドでBALB/cマウスを免疫し、26日後にリンパ節細胞とミエローマ細胞株(P3U1)をPEG1500存在下に融合し、HAT選択培地中で培養した。酵素標識免疫吸着法 (enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA) によるスクリーニングで強く陽性反応を示したwell (1E12)の細胞群の中から、陽性細胞をクローン化してモノクローナルハイブリドーマ1E12/D4を樹立した。1E12/D4の上清を用いてWestern blot解析を行ったところ、ラット小脳膜分画からI型IP₃受容体のバンドが検出された。一方、ラット筋小胞体分画からリアノジン受容体のバンドは検出されなかった。これらの結果から、1E12/D4が産生するモノクローナル抗体は、I型IP₃受容体に特異的であり、I型IP₃受容体に特異的なプローブとして有用であると考えられた。

キーワード：IP₃、IP₃受容体、モノクローナル抗体、プローブ、Ca²⁺放出チャネル

緒言

生体にとって最も重要な細胞内情報伝達物質のひとつであるカルシウムイオン (Ca²⁺) の代表的な細胞内貯蔵部位は、小胞体である。小胞体の膜上に存在し、Ca²⁺を小胞体から細胞質へと動員するチャネルタンパク質は、細胞内Ca²⁺放出チャネルとよばれる。細胞内Ca²⁺放出チャネルには、IP₃受容体ファミリー、およびリアノジン受容体ファミリーのふたつのファミリーが知られている¹⁾。IP₃受容体ファミリーに属する細胞内Ca²⁺放出チャネルは、IP₃受容体が4分子

会合したサブユニット構造を持ち、IP₃依存性のCa²⁺の動員機構を担っている。ホルモン、成長因子、神経伝達物質、抗原などのシグナル分子が細胞表面の特異的な受容体に結合した結果、イノシトールリン脂質代謝が誘導されると、IP₃が産生される。このIP₃が小胞体に存在するIP₃受容体/Ca²⁺放出チャネルに結合してチャネルが開口することにより、Ca²⁺が細胞質へと動員される¹⁾。

IP₃受容体/Ca²⁺放出チャネルの四量体構造のサブユニットであるIP₃受容体は、現在までに3種類のタイプが同定されている¹⁾。IP₃受容体/Ca²⁺放出

* 西南女学院大学保健福祉学部栄養学科 教授
** 西南女学院大学保健福祉学部栄養学科 2006年度卒業生
*** 西南女学院大学保健福祉学部栄養学科 学生

チャンネルのサブユニットの会合様式には、I 型から III 型のいずれか一種類のタイプの IP₃ 受容体からなる homotetramer に加えて、異なるタイプの IP₃ 受容体からなる heterotetramer も知られている²⁾。また、いずれのタイプの IP₃ 受容体も広範な生体内分布が知られており、ほとんどすべての細胞種が、少なくともひとつのタイプの IP₃ 受容体を発現しているものと考えられている¹⁾。したがって、IP₃ 受容体ファミリーは、種々の細胞種での細胞内 Ca²⁺ 恒常性維持において多様な役割を持つものと考えられている^{1), 2)}。このような背景から、それぞれのタイプの IP₃ 受容体について、組織分布、四量体の会合様式、他のタンパク質との相互作用、チャンネル機能などに関する解析を進めることは、種々の組織・細胞における細胞内 Ca²⁺ 恒常性維持機構を解明していく上できわめて重要である。

特定の分子の生理機能の解析を進める上で、標的となる分子を特異的に認識するプローブがあれば強力なツールとなる。抗体は、非常に高い特異性、および親和性で抗原分子を認識し、結合するという性質を持ち、加えて、任意にデザイン、合成した抗原分子で動物を免疫することで、人為的に作製することができる点など、標的分子に対する特異的プローブとしての優れた特性を兼ね備えている。今回我々は、IP₃ 受容体の各タイプの機能を解析するための特異的プローブの開発を最終目的として、今回我々は、I 型 IP₃ 受容体の特異的に認識する抗体の作製を行った。免疫用の抗原として、IP₃ 受容体タンパク質 C-末端の細胞質領域の I 型 IP₃ 受容体特異的な配列を持つ部分ペプチドを合成して用いた。抗原ペプチドで免疫したマウスのリンパ節細胞をミエローマ細胞株、P3U1 と融合してハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマの上清に対して、抗原ペプチドでコーティングしたプレートを用いた ELISA 法による一次スクリーニングを行い、I 型 IP₃ 受容体に特異的な抗体を産生する細胞群を含む well (1E12) を選別した。選別した細胞群を限界希釈によりモノクローナル化し、一次スクリーニングと同様の ELISA 法による二次スクリーニングを行って、I 型 IP₃ 受容体に特異的な抗体を産生するモノクローナルハイブリドーマ (1E12/D4) を選別した。I 型 IP₃ 受容体は、小脳プルキンエ細胞で最も強く発現していることが知られている^{1), 2)}。そこで、1E12/D4 の上清を用いてラット小脳膜分画に対する Western blot 解析を行なった結果、見かけの分子量約 24 万の IP₃ 受容体のバンドが特異的に検出された。これらの結果から、今回得られたモノクローナル抗 I

型 IP₃ 受容体抗体は、I 型 IP₃ 受容体の生体内分布を検索していく上で有用であると考えられた。

略号

DMEM, Dulbecco's modified essential medium; FBS, fetal bovine serum; PEG, polyethylene glycol; HAT, hypoxanthine/aminopterin/thymidine; HCF, hybridoma cloning factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; NBT, nitroblue tetrazolium; BCIP, 3-chloro 4-bromo 5-indolyl pphosphate; Tris, tris(hydroxymethyl)-amino-methane; SDS, sodium dodecyl sulphate

材料と方法

抗原、免疫および細胞融合

抗原には、IP₃ の部分配列 (LGHPPHMNVNPQQA: ヒト I 型 IP₃ 受容体の 2681-2695 番目のアミノ酸配列に相当²⁾) の N 末端に Cys を付加した合成ペプチド (抗原ペプチド) を用いた。この領域は、細胞質側に突出していると推測され¹⁾、この領域を認識する抗体は、免疫組織化学への適用が期待される。免疫の際は、免疫原性を増すために抗原ペプチドにキャリアタンパク質として keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合して用いた。抗原ペプチドと KLH の結合は、マレイニミド活性化した KLH と抗原ペプチドを室温 2 時間反応させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対して透析を行った。免疫は、抗原ペプチド-KLH 溶液と Freund's 完全アジュバント (DIFCO 社) で形成したエマルジョンを 2 匹の BALB/c マウス (♀、8 週齢) の後肢裏皮内に注射して行った。26 日後に鼠蹊リンパ節を摘出し、DMEM 培地中でナイロンメッシュ (Cell Strainer, FALCON 社) を用いて細胞を分散させた。トリパンブルー染色にて生細胞を算定したのち、ミエローマ細胞株 (P3U1 細胞) と、細胞数比約 4 : 1 (リンパ細胞 1 × 10⁸ 個、P3U1 細胞 2.6 × 10⁷ 個) で混合した。混合細胞群は、DMEM 培地にて 3 回洗浄した。以下の細胞融合の操作は、試薬および培地を 37°C に加温した状態で行った。まず遠心後、培地を完全に除去して得た細胞ペレットをタッピングにてほぐした後、50% PEG1500 水溶液 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) 1 ml を 1 分間か

けて緩やかに攪拌しながら加えた。引き続き、容器を緩やかに攪拌しながらウォーターバス中 37°C で 7 分間加温した。次に DMEM 培地 1 ml を 2 回、それぞれ 1 分間かけて、細胞を緩やかに攪拌しながら加えた。さらに攪拌を続けながら DMEM 培地 8 ml を 2 分間かけて加えた。細胞を緩やかに攪拌しながら 37°C、5 分間温めた。遠心にて集めた融合細胞群は、10% FBS、HAT、5% HCF (エアブラウン社) を加えた DMEM 培地に 1×10^6 cell/ml で懸濁、96well 培養プレート中で培養した。

ELISA 法

すべての操作は室温で行った。50mg/ml NaHCO₃ 水溶液に溶解したペプチド (1 μ l/ml) を ELISA プレートに加え、一晚インキュベートすることにより ELISA プレートを抗原でコーティングした。プレートからコーティング液を完全に除去し、スキムミルク (雪印) を TBS (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl) に 0.5% (w/v) 溶解したブロッキング溶液を加え、1 時間インキュベートして、抗体タンパク質のプレートへの非特異的吸着に対するブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去した後、融合細胞の培養上清をそれぞれ 50 μ l ずつ ELISA プレートの well に加え、1 時間インキュベートした。各 well を TBST (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) にて 6 回洗浄した後、TBST で希釈した (1:2500) アルカリフォスファターゼ標識ロバ由来抗マウス Ig G 抗体 (二次抗体) を各 well に加え、30 分インキュベートした。各 well を TBST にて 6 回で洗浄した後、アルカリフォスファターゼ基質溶液 (1 mg/ml p-nitrophenylphosphate, 100 mM Tris-Cl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) を加え、発色させた。10 ~ 60 分後に 405 nm の吸光度 (OD₄₀₅) をマイクロプレートリーダー (モデル 550、BioRad 社) にて測定した。

Western blot 法

サンプル (ラット小脳膜分画、心筋小胞体分画、骨格筋小胞体分画) を SDS-アクリルアミドゲル (separating gel: 6.0%、stacking gel: 3.5%) にて、電気泳動し、次いで、ゲルをセミドライトランスファー装置 (バイオクラフト社) にセットし、5% transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 1.3 mM SDS, pH 9.2) 中で 40 分間通電 (600mA/cm², 25V) して、ゲル中で分離したタンパク質を PVDF メンブレ

ン (Immobilon-P、Millipore 社) に転写した。タンパク質を転写したメンブレンは、ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを溶解した TBST) で 20 分間ブロッキングした。ブロッキング溶液除去後、ラット小脳膜分画を用いての抗体産生クローンのスクリーニングを行った実験 (図 3) では、メンブレンをスクリーナープロッター (サンブラテック) にセットした。メンブレ全体 (図 4) または、スクリーナープロッターの各レーン (図 3) に培養した上清を加え、1 時間インキュベートした。メンブレあるいはレーンを TBST で 5 回洗った後、ブロッキング溶液で希釈したアルカリフォスファターゼ標識二次抗体 (ロバ由来抗マウス IgG) 中、90 分インキュベートした。メンブレを TBST で 5 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ基質 (NBT/BCIP) にて発色した。

結果と考察

抗 I 型 IP₃ 受容体抗体産生ハイブリドーマの選別

KLH に結合した抗原ペプチドで免疫したマウスのリンパ節細胞とミエローマ細胞株との融合細胞群を HAT 選択培地中 96 穴プレートで培養し、細胞が増殖してきた well の上清を抗原ペプチドを抗原とした ELISA 法によりスクリーニング (一次スクリーニング) した。一次スクリーニングの結果、強く反応した well のいくつかについての結果を図 1 に示した。図 1 中の 1A1 は、反応がほとんど見られなかった well (陰性 well) の結果の一例である。約 400 well のほとんどは、1A1 のように反応が弱く、吸光度は 0.200 程度であった。一方、いくつかの well では、1.5 以上の

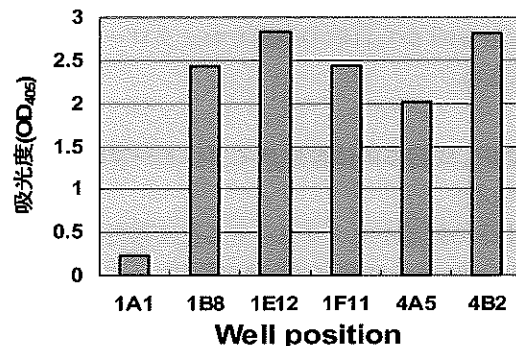


図 1 抗 I 型 IP₃ 受容体抗体産生 well (陽性 well) のスクリーニング

スクリーニングは、I 型 IP₃ 受容体抗体の C-末端の部分配列を持つ合成ペプチドでコーティングしたプレートを用いた ELISA 法でおこなった。二次抗体には、ロバ由来抗マウス Ig G 抗体 (Ig G) を用いた。代表的な結果を示した。

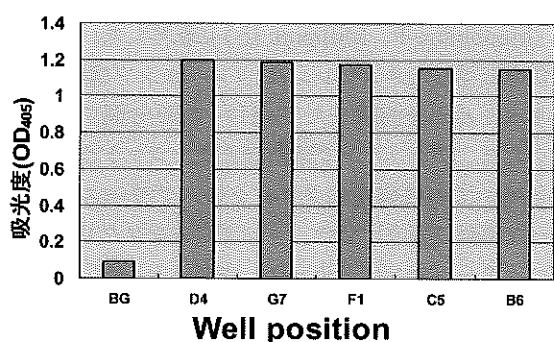


図2 Well 1E12からの抗 I 型 IP₃ 受容体抗体産生ハイブリドーマクローン (陽性クローン) の選別スクリーニングは、図1と同様の ELISA 法でおこなった。代表的な結果を示した。

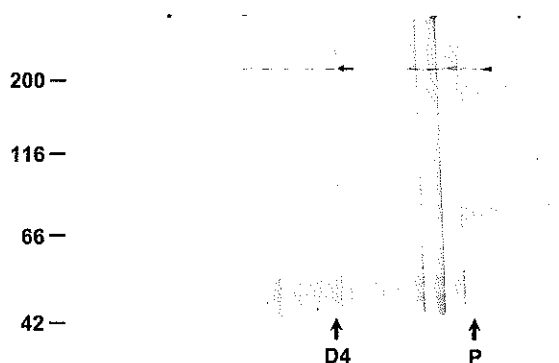


図3 Well 1E12から得られたモノクローナルハイブリドーマが産生する抗体による I 型 IP₃ 受容体タンパク質の認識

マウス小脳膜分画を泳動、転写したメンブレンに対して well 1E12 由来のモノクローナル上清を一次抗体として用いた Western blot 解析の結果。矢印および矢の根印は、I 型 IP₃ 受容体のバンドを示す。レーン D、クローン 1E12/D4 の上清を用いたレーン。レーン P、陽性コントロール。

高い吸光度が見られた。これら高い値を示した well の中には、抗原ペプチドを認識する抗体を産生する細胞が存在すると考えられた。これらの中で、1E12 の細胞群の上清は、最も安定して高い吸光度を示したので、この well から目的の細胞をモノクローナルで得ることにした。

抗 I 型 IP₃ 受容体抗体産生ハイブリドーマのモノクローナル化

1E12 中の細胞をモノクローナル化するために、この well の細胞を限界希釈 (0.25 cell/well) して培養した。増殖してきた well の上清に対して、まず ELISA 法による二次スクリーニングを行った。0.09 程度のバックグラウンド吸光度に比較して有意に高い吸光度を示す well の細胞は、目的の抗体を産生しているクローンと考えられた (図2にいくつかの例を示した)。

ここまでの ELISA 法では、免疫抗原として用いた I 型 IP₃ 受容体の部分ペプチドを認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別してきた。本研究の目的は、I 型 IP₃ 受容体タンパク質そのものを認識する抗体を得ることである。そこで次に、ここまでに選別してきたクローンの産生する抗体が部分ペプチドだけでなく I 型 IP₃ 受容体タンパク質全体を認識するかどうかを調べるために Western blot 解析を行った。その結果を図3に示した。すべてのレーンには、IP₃ 受容体の中で I 型を特異的に発現していることをあらかじめ確認しているラット小脳小胞体分画を泳動した。それぞれのレーンに対して異なるクローンの培養上清を反応させた。P と表示したレーンでは、陽性コントロールとして東京大学の御子柴先生からいただいた抗体を用いた。このレーンからは、見かけの分子量約 24 万の I 型 IP₃ 受容体のバンド (矢の根印) が検出された。ELISA 法で陽性を示したクローンの上清を反応させたすべてのレーン (P と表示したレーン以外のすべて) で I 型 IP₃ 受容体のバンドが特異的に検出された。したがって、この実験における陽性クローンは、抗 I 型 IP₃ 受容体抗体産生ハイブリドーマであると結論した。D4 と表示したレーンは、ELISA 法で一番強く反応した 1E12/D4 というクローンの上清を反応させたレーンである。IP₃ 受容体タンパク質そのもののバンド (矢印) が強く検出されており、1E12/D4 の細胞がベストクローンであると考えた。確実にモノクローナル化するために 1E12/D4 の細胞を再度限界希釈し ELISA 法でスクリーニングを行い、陽性クローンを選別することで抗 I 型 IP₃ 受容体抗体産生モノクローナルハイブリドーマの樹立を完了した。

1E12/D4 が産生する抗体の抗原特異性を Western blot で検討した結果を図4に示した。CerER と表示したレーンには I 型 IP₃ 受容体を発現するサンプルとしてラット小脳膜分画を、CSR および SkMSR とそれぞれ表示したレーンには、心筋および骨格筋小胞体分画をそれぞれ泳動した。心筋および骨格筋小胞体は、IP₃ 受容体と近縁のタンパク質である II 型、I 型リアノジン受容体をそれぞれ発現しており、かつ、IP₃ 受容体ほとんどあるいは全く発現していないので、陰性コントロールとして用いた。1E12/D4 の抗体は、小脳膜分画を泳動したレーンから I 型 IP₃ 受容体のバンドを検出し (図4 矢印)、一方、心筋、あるいは骨格筋のサンプルを流したレーンからは何も検出しなかった。これらの結果から、well 1E12/D4 は、抗 I 型 IP₃ 受容体抗体を産生すること、およびその抗体は、I 型

IP₃ 受容体と近縁のタンパク質であるリアノジン受容体に対しても交差反応しないことから、高い抗原特異性を持つことが示唆された。

免疫グロブリンのタイピング

最後にマウス Ig G1、Ig G2a、Ig G2b、Ig G3、Ig M および Ig A それぞれに対する特異的な抗体を二次抗体として用いた ELISA 法にて免疫グロブリンのタイピングを行った。その結果、1E12/D4 が産生する抗体に対して最も強く反応したのは、抗マウス Ig G1 抗体であった (図 5、Ig G1)。抗マウス Ig M 抗体は、抗マウス Ig G1 抗体の約半分の反応性を示した (図 5、Ig M)。Ig G2a、Ig G2b、Ig G3 および Ig A に特異的な抗体はいずれも 1E12/D4 が産生する抗体をほとんど認識しなかった (図 5)。これらの結果から、1E12/D4 が、IgG1 または Ig M であることを示された。これ以前の ELISA 法や Western blot 法において

用いた二次抗体が、タイピングの実験で用いたものとは異なる抗体ではあるものの、抗マウス IgG 抗体であり、それらを用いた実験で反応結果がでている事を考え合わせると、1E12/D4 が産生する免疫グロブリンのタイプは IgG1 である可能性が高いと考えられた。

展望

我々が今回作成したモノクローナルハイブリドーマ (1E12/D4) が産生する抗 I 型 IP₃ 受容体抗体は、Western blot 解析に適用可能であった。本モノクローナル抗体は、Western blot 解析を用いて、I 型 IP₃ 受容体の発現組織や発現量を調べていく上で有用であると考えられる。今回行った Western blot 解析では、最初に還元剤を用いた変性条件下、すなわち、IP₃ 受容体タンパク質の高次構造が破壊された条件下で電気泳動を行った。したがって、我々の作製した抗体が、native な I 型 IP₃ 受容体タンパク質を認識するかどうかは、現時点では不明である。今後は、1E12/D4 が産生する抗体を用いて、免疫沈降法や免疫組織化学といったタンパク質の native な構造を保持した条件下での実験を行うことにより、その点を明らかにしていきたい。1E12/D4 が産生する抗体が native な構造を保った状態でも I 型 IP₃ 受容体タンパク質を特異的に認識するものであるならば、I 型 IP₃ 受容体チャネルの精製や、相互作用するタンパク質を検索する実験など、適用範囲が格段に広がり、細胞内 Ca²⁺ 恒常性維持機構における IP₃ 受容体 / Ca²⁺ 放出チャネルの役割を生化学的に解析していくための有効なプローブとなることが期待される。

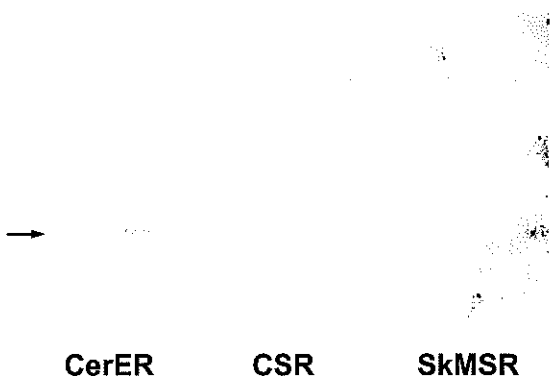


図 4 モノクローナル抗体 1E12/D4 の抗原特異性

解析は、Western blot 法により行った。各レーンに泳動したサンプルは、以下のとおりである。CerER、ラット小脳膜分画；CSR、ラット心筋小胞体分画；SkMSR、ラット骨格筋小胞体分画。

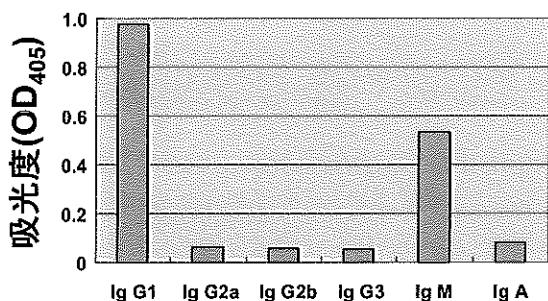


図 5 モノクローナル抗 I 型 IP₃ 受容体抗体 1E12/D4 の ELISA 法によるタイピング

タイピングは、図 1 および 2 と同様の ELISA 法で行った。ただし、二次抗体には、図中横軸に表示したタイプのマウス免疫グロブリンを特異的に認識する抗体を用いた。

謝辞

本研究は、2006 年度西南女学院大学共同研究費による助成を受けて行われたものである。

注

本研究は、尾上が研究責任者として立案計画した。本論文のすべての実験は、尾上の指導下に宇高が卒業研究として、他の共著者の協力のもとで中心的に行った。したがって、西南女学院大学紀要投稿規定に

より尾上が筆頭著者となっているものの、本来は、宇高ちひろが本論文の筆頭著者、尾上が責任著者としてそれぞれ認識されるべきものである。

参考文献

1. 古市貞一, 吉川文生, 米島宏幸, 安富大祐, 御子柴克彦: IP₃ 受容体の分子的多様性と IP₃/Ca²⁺ シグナル伝達. 細胞工学. Vol. 16, 30-39, 1997
2. Monkawa T., Miyawaki A., Sugiyama T., Yoneshima H., Yamamoto-Hino M., Furuichi T., Saruta T., Hasegawa M. and Mikoshiba K. : Heterotetrameric complex formation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 14700-14704, 1992

Preparation of a Monoclonal Antibody Specific for Type I IP₃ Receptor/Ca²⁺ Release Channel.

Hitoshi Onoue, Chihiro Udaka, Risa Yamazaki, Maiko Nakano, Tomoko Takeda

<Abstract>

The inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) receptors are the proteins that tetramerize in endoplasmic reticulum membranes to form the intracellular Ca²⁺ release channels that open and in turn mobilize Ca²⁺ into cytosol upon binding with IP₃. To date, three types of IP₃ receptors, namely type I, II and III, have been identified. With the aim of developing specific probes for studying functions of IP₃ receptor channels, we prepared a monoclonal antibody specific for the type I IP₃ receptor.

Two BALB/c mice were immunized with a synthetic peptide with an amino acid sequence specific to type I IP₃ receptor. After 26 days, lymph node cells were fused with myeloma cell line (P3U1) in the presence of PEG1500 and cultured in HAT selection medium. By means of ELIZA screening, a strongly positive well (1E12) was detected, and a monoclonal hybridoma 1E12/D4 was established by cloning a positive cell from the well 1E12. In Western blot analysis probed with the supernatant of 1E12/D4, the band of type I IP₃ receptor from rat cerebellum membrane fraction, but not the ryanodine receptor from rat sarcoplasmic reticulum fractions, was specifically detected. These results suggested that the monoclonal antibody produced by 1E12/D4 cells is specific for the type I IP₃ receptor that is a useful tool to probe the channel.

Key words: IP₃, IP₃ receptor, monoclonal antibody, hybridoma, probe, Ca²⁺ release channel