

(千葉大学学位申請論文)

遺伝子改変マウスを用いた
アデノシン A3 受容体の研究

2006年1月

山野 和也

目次

要旨	3
緒論	4
第1章 ヒト A3AR 置換マウスの作製と評価	
1-1. はじめに	6
1-2. 実験材料および方法	6
1-3. 結果	18
1-4. 考察	21
図	23
第2章 キメラ A3AR 置換マウスの作製と評価	
2-1. はじめに	42
2-2. 実験材料および方法	42
2-3. 結果	48
2-4. 考察	51
図	53
第3章 膵臓における A3AR の機能的発現	
3-1. はじめに	73
3-2. 実験材料および方法	73
3-3. 結果	78
3-4. 考察	80
図	82
結語	93
引用文献	94
謝辞	100

略号

A3AR	:	アデノシン A3 受容体
BMMC	:	骨髄細胞由来マスト細胞
CHO 細胞	:	チャイニーズハムスター卵巣細胞
Cl-IB-MECA	:	2-chloro- <i>N</i> ⁶ -(3-iodobenzyl)adenosine-5'- <i>N</i> -methyl-uronamide
COPD	:	慢性閉塞性肺疾患
DMEM	:	dulbecco's modified eagle medium
DT-A	:	ジフテリア毒素 A 断片
EPO	:	エリスロポエチン
ERK1/2	:	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ES 細胞	:	肺性幹細胞
GPCR	:	G タンパク質共役受容体
HAT	:	ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン
HPRT	:	ヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ
[¹²⁵ I]AB-MECA	:	<i>N</i> ⁶ -(4-amino-3-[¹²⁵ I]iodobenzyl) adenosine-5'- <i>N</i> -methyluronamide
KF26777	:	2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1 <i>H</i> -imidazo [2,1- <i>i</i>] purin-5(4 <i>H</i>)-one dihydrochloride
MAPK	:	mitogen-activated protein kinase
MIP-1 α	:	macrophage inflammatory protein-1 α
PCR	:	polymerase chain reaction
PI3K γ	:	phosphoinositide 3-kinase γ
PKB	:	protein kinase B
PLC β	:	phospholipase C β
PTX	:	pertussis toxin
(<i>R</i>)-PIA	:	(<i>R</i>)- <i>N</i> ⁶ -phenylisopropyladenosine
RANTES	:	regulated on activation of T cell expressed and secreted
RLU	:	relative luminescence unit
RT-PCR	:	reverse transcription-PCR
TNP-BSA	:	2,4,6-trinitrophenyl ウシ血清アルブミン

要旨

Gタンパク質共役受容体であるアデノシン A3 受容体 (A3AR) に対するアンタゴニストは喘息やアレルギー疾患に対する治療薬として注目されているが、げっ歯類 A3AR に対するアンタゴニストが存在しないためにマウスやラットを用いた *in vivo* 評価試験が行えず、医薬品としての開発は未だ進展していない。そこで本研究では、ヒト A3AR アンタゴニストの評価が可能なモデル動物として、染色体上の A3AR 遺伝子をヒト A3AR 配列に置換したマウスを作製した。しかしながら、マウス体内においてヒト A3AR は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) γ を介したシグナル伝達経路を活性化することが出来ず、ヒト A3AR と特定のマウス Gタンパク質とのカップリングには種差が存在することが明らかとなった。次に我々は、この種差の問題を克服するため、染色体上の A3AR 遺伝子をキメラ A3AR 配列 (細胞内領域はマウス A3AR 配列、それ以外はヒト A3AR 配列より成る) に置換したマウスを作製した。マウス体内においてキメラ A3AR は PI3K γ を介したシグナル伝達経路を正常に活性化し、これらの活性はヒト A3AR 特異的アンタゴニストによって完全に抑制されることを確認した。さらに我々は、アポエクオリン発現マウスおよびキメラ A3AR 置換マウスを用いて、膵臓における A3AR の機能的発現を初めて発見した。本研究で作製したキメラ A3AR 置換マウスは、ヒト A3AR アンタゴニストの薬理評価が可能な唯一の “A3AR ヒト化マウス” として有用であるとともに、未だ不明な点の多い A3AR の生理学的解析を行う上でも非常に強力なツールとなると考えられる。

緒論

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は多種多様な生命現象に関与していることが報告されている受容体であり、それゆえに様々な疾患に対する治療薬の標的としても注目を集めている¹⁻⁴⁾。実際、現在市販されている医薬品の 50% 以上は GPCR を標的とした治療薬であることが知られている⁵⁾。

医薬品の開発過程において、げっ歯類を用いた前臨床試験は医薬品候補化合物の *in vivo* 評価を行う上で非常に重要なステップである。しかしながら、GPCR に対するアゴニストやアンタゴニストの親和性にはヒトとげっ歯類の間で種差が観察されることが多く、その結果ヒト GPCR に対する化合物がげっ歯類モデルで評価出来ないということがしばしば見受けられる⁶⁾。特に、アデノシン受容体の 1 つであるアデノシン A3 受容体 (A3AR) は、ヒトとげっ歯類間でのアミノ酸レベルでの相同性 74% と低いことが知られており (通常の GPCR におけるヒトとげっ歯類間での相同性は 85~95%)、この問題に強く直面している^{6,7)}。

生体内において、アデノシンはその受容体を介して様々な生理現象に関与することが知られており、現在までに 4 種類の GPCR がアデノシン受容体として単離されている (アデノシン A1、A2A、A2B、および A3 受容体)⁸⁻¹⁰⁾。A3AR は G_{i/o} タンパク質がカップリングする GPCR であり、脳や精巣、マスト細胞や顆粒球を始め、多くの臓器においても広くその発現が確認されている⁸⁻¹²⁾。アデノシンなどのリガンドが結合することにより活性化された A3AR は、phospholipase C (PLC) β を介した細胞内 Ca²⁺ 量の上昇や phosphoinositide 3-kinase (PI3K) のクラス IB アイソフォームである PI3K γ の活性化を誘導することが知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。A3AR によって活性化された PI3K γ は、protein kinase B (PKB、別名 Akt) や、mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーである extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2、別名 p42/44) や p38 などのリン酸化を引き起こし、細胞増殖やアポトーシス、細胞周期などを制御していると考えられている^{14,16,19-23)}。また、A3AR によって活性化される PI3K γ を介したシグナル伝達経路は、IgE および抗原特異的マスト細胞における脱顆粒の増強や A3AR の細胞内移行などを引き起こすためにも重要であることが報告されている^{20,24)}。

A3AR と疾患の関連について、現在まで数多くの報告が行われている。脳や心臓、血管における A3AR の発現およびその予測される機能より、A3AR に対する化合物が脳や心臓における抗虚血症の保護剤となり得る可能性が考えられている⁷⁾。また、様々なガン細胞において A3AR の発現上昇が観察されることより、A3AR は抗ガン剤の標的としても注目を集めている²⁵⁻²⁷⁾。さらに近年、マスト細胞や A3AR のノックアウトマウスを用いた実験より、A3AR アンタゴニストは喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などに対する新規治療薬となり得ることが強く示唆され始めている^{6,7,25,28-33)}。

このような背景の下、A3AR に対するアゴニストおよびアンタゴニストの探索が行われた結果、現在までに様々な化合物が単離されてきた^{6,7)}。我々も、喘息や COPD に対する治療薬の候補化合物として、非常に強力なヒト A3AR アンタゴニスト KF26777 を単離した³⁴⁾。しかしながら、ヒト A3AR に対する強力なアンタゴニスト (K_i 値 0.1 nM オーダー) は、げっ歯類 A3AR に対して 1000 倍以上弱い親和性しか示さず、加えてげっ歯類 A3AR に対するアンタゴニストは K_i 値が μ M オーダー以上と非常に弱い化合物しか見出されていない^{6,7)}。そ

のため、げっ歯類を用いた A3AR アンタゴニストの *in vivo* 評価を行うことは事実上不可能であり、このことが治療薬としての A3AR アンタゴニストの開発が未だ進展していない大きな原因となっている。

そこで本研究では、ヒト A3AR アンタゴニストの評価が可能なモデルマウスとして、A3AR ヒト化マウスの造成を開始することとした。まず第 1 章において我々は、マウス A3AR 遺伝子をヒト型に置換した“ヒト A3AR 置換マウス”を作製した。しかしながら、マウス体内においてヒト A3AR は PI3K γ を介したシグナル伝達経路を活性化することが出来ず、PI3K γ の活性化に関与するマウス G $_{i0}$ タンパク質はヒト A3AR にカップリング出来ない可能性が示唆された。この問題を克服するために、第 2 章において我々は、マウス A3AR 遺伝子をヒト/マウスのキメラ A3AR (細胞内領域はマウス A3AR 配列より成り、細胞外領域および細胞膜領域はヒト A3AR 配列から成る) に置換した“キメラ A3AR 置換マウス”を作製し評価を行った。その結果、キメラ A3AR 置換マウスはヒト A3AR アンタゴニストの評価を行うことの出来る“A3AR ヒト化マウス”であることを証明した。最後に第 3 章では、細胞内 Ca $^{2+}$ 量の変動をモニタリング出来るマウスとしてエクオリン発現マウスを作製し、このマウスを用いることによって膵臓における A3AR の機能的発現を初めて発見することが出来た。また、A3AR ヒト化マウス由来膵臓において、A3AR アンタゴニストを用いた A3AR の機能解析を行った。本研究で作製した A3AR ヒト化マウスはヒト A3AR アンタゴニストの薬理評価を行うための唯一のモデル動物として非常に有用であるとともに、未だ不明な点の多い A3AR の生理学的解析を行う上でも強力なツールとなると考えられる。

第1章 ヒト A3AR 置換マウスの作製と評価

1-1. はじめに

A3AR に対するアンタゴニストは、喘息やアレルギー疾患に対する治療薬として期待されており、現在までに多数の化合物がスクリーニングされている^{6,7,25,28-33}。しかしながら、ヒト A3AR アンタゴニストはげっ歯類の A3AR に対して低い親和性しか示さず（ヒト A3AR と比べて 1000 倍以上弱い）、げっ歯類の A3AR に対する効果的なアンタゴニストも未だ見出されていない^{6,7}。そのため、A3AR アンタゴニストは医薬品の初期開発ステージにおいて必須であるげっ歯類を用いた *in vivo* での前臨床評価を行うことが出来ず、このことが A3AR アンタゴニストの医薬品としての開発が遅れている大きな要因となっている⁷。そこで本章では、ヒト A3AR アンタゴニストの評価が可能なモデル動物として、染色体上の A3AR 遺伝子をヒト A3AR 配列に置き換えた“ヒト A3AR 置換マウス”の作製およびその評価を行った。

1-2. 実験材料および方法

1) 主な試薬

- ・放射線標識 A3AR 特異的アゴニスト

*N*⁶-(4-amino-3-[¹²⁵I]iodobenzyl) adenosine-5'-*N*-methyluronamide ([¹²⁵I]AB-MECA)⁷
アマシャムより購入した

- ・A3AR 特異的アゴニスト

(*R*)-*N*⁶-phenylisopropyladenosine ((*R*)-PIA)⁷
シグマより購入した

- ・A3AR 特異的アゴニスト

2-chloro-*N*⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-*N*-methyl-uronamide (Cl-IB-MECA)⁷
協和発酵工業（株）医薬研究センターにて合成した

- ・ヒト A3AR 特異的アンタゴニスト

2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1*H*-imidazo [2,1-*f*] purin-5 (4*H*)-one dihydrochloride (KF26777)^{7,34}

協和発酵工業（株）医薬研究センターにて合成した

- ・2,4,6-trinitrophenyl ウシ血清アルブミン (TNP-BSA)

コスモバイオより購入した

- ・抗 TNP IgE 抗体

抗 TNP IgE 抗体を生産するマウス B リンパ球細胞株 (ATCC 番号: TIB-142) の無血清培養上清より、ゲルろ過カラムを用いて精製した

2) ヒト A3AR cDNA クローニング

市販のヒト肝臓 polyA⁺ RNA (インビトロジェン) 4 μg を鋳型とし、SUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis (インビトロジェン) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。

一本鎖 cDNA を 0.5 μl 含む 20 μl の反応液 (Pyrobest buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の Pyrobest polymerase (タカラバイオ)、各 0.5 μM のプライマー-hA5 (5'-TAC AgA Cgg ATC

TTg CTg gCT CAC-3') および hA3 (5'-CAg gCC CTC AAg TgT TTg TTg ATg g-3') (プロリゴ) を調整し、94°Cで1分間、68°Cで2分間からなる反応を1サイクルとして計30サイクル行った。PCR反応後、全量を1.5%アガロースゲル電気泳動に供し、約1.0-kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction kit (キアゲン) を用いて回収した。上記で得た250 ngのヒトA3AR cDNAを含むDNA断片を、50 ngのプラスミドpT7Blue T-Vector (タカラバイオ) と共に10 µLの蒸留水に溶解し、Ligation high (東洋紡) を10 µl加え16°Cで2時間連結反応を行った。続いて、上記連結反応で得られた組換えプラスミドを用いて大腸菌DH5 α (東洋紡) を形質転換させた後、アンピシリン耐性コロニーよりQIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを単離した。インサートの有無は、アガロース電気泳動によるサイズ比較により確認し、塩基配列はDNAシーケンサーABI PRISM 377 および Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver.2 (アプライドバイオシステム) を使用して決定した。シーケンスプライマーには、M13 primer M4 (5'-gTTTTC CCA gTC ACg AC-3')、M13 primer RV (5'-CAg gAA ACA gCT ATg AC-3') (以上、プロリゴにて合成) を使用した。以下、上記で得られたヒトA3AR cDNAを含むプラスミドをTA-hA3Rと称す。

3) A3AR 遺伝子を含むマウスゲノム DNA の取得および解析方法

129/SvEv 系統マウスゲノム DNA ライブラリー (ゲノムシステムズ) より A3AR 遺伝子を有するクローンをゲノム PCR によってスクリーニングするため、マウス A3AR のエクソン1の塩基配列³⁵⁾よりセンスプライマー (5'-AgC ATg gAA gCC gAC AAC ACC AC-3') とアンチセンスプライマー (5'-TAC CTg ACT gTC AgC TTg ACC Cg-3') のプライマーセット (約0.36-kbの増幅バンドが検出される) と、センスプライマー (5'-TgT gAC ATT CTA ACT TCT gg-3') とアンチセンスプライマー (5'-CAg TTT gAC TCA TTT CTA Cg-3') のプライマーセット (約0.56-kbの増幅バンドが検出される) を設計した。上記プライマーは、プロリゴにて合成した。上記プライマーセットをゲノム DNA ライブラリーPCR スクリーニングサービス (倉敷紡績) へ送付し、上記2セットのPCRで陽性を示すマウス DNA 導入 pBeloBac II プラスミドを購入した (受付ロット番号: GS1199238、クローン番号: 207 (A2))。

上記の pBeloBAC II プラスミド 5 µg を EcoR I にて切断したのちアガロースゲル電気泳動に供し、エクソン1領域を含む約9.0-kbのDNA断片およびエクソン2領域を含む約6.5-kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction kit を用いて回収した。

上記で得た各 EcoR I 断片 10 ng を EcoR I で切断後、ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ (タカラバイオ) で脱リン酸化したプラスミド pBluescript II SK(-) (ストラタジーン) 40 ng と共に 10 µl の蒸留水に溶解し、Ligation high を 10 µl 加え 16°C で 3 時間連結反応を行った。続いて、上記連結反応で得られた組換えプラスミドを用いて大腸菌 DH5 α を形質転換させた後、得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミド DNA を単離した。インサートの有無は、アガロース電気泳動によるサイズ比較により確認した。以下、上記で得られたマウス A3AR 遺伝子のエクソン1領域を含むプラスミドを pBS-ex1、エクソン2領域を含むプラスミドを pBS-ex2 と称す。

4) ヒト A3AR 相同組換えベクターの構築

マウス A3AR 遺伝子をヒト A3AR cDNA 配列に置換するための相同組換えベクターとして、以下に示す 6 つのユニットから成るヒト A3AR 相同組換えベクターを設計した (図 1-1)

1. ネガティブセレクションマーカーとしての、ジフテリア毒素 A 断片 (DT-A) 発現ユニット (RNA polymerase II プロモーター下流に DT-A 遺伝子と SV40 由来ポリ A 付加配列を配置)
2. 約 6.0-kb の 5'側の相同組換え用アーム (Sma I からマウス A3AR 遺伝子のエクソン 1 内の ATG 翻訳開始コドンまでのマウスゲノム DNA 由来³⁵⁾)
3. 約 1.0-kb のヒト A3AR cDNA 配列 (ATG 翻訳開始コドンから TAG 翻訳停止コドンまでを含む)
4. 約 0.5-kb のマウスゲノム DNA 配列 (マウス A3AR 遺伝子のエクソン 2 内の TAG 翻訳停止コドンからポリ A 付加配列までを含む³⁵⁾)
5. 両端に loxP 配列が付加された、ポジティブセレクションマーカーとしてのヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子発現ユニット (ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター下流に HPRT 遺伝子を配置)
6. 約 2.8-kb の 3'側の相同組換え用アーム (マウス A3AR 遺伝子のエクソン 2 内の BamH I から Apa I までマウスゲノム DNA 由来³⁵⁾)

上記のヒト A3AR 相同組換えベクターは、以下に示す方法 (全 15 工程) で構築した。全ての工程において、DNA 断片はアガロースゲル電気泳動によって分離した後、QIAquick Gel Extraction kit (キアゲン) を用いて精製した。各プラスミドは、形質転換した大腸菌 DH5 α より QIAprep Spin Miniprep Kit もしくは QIAfilter Midi Kit (キアゲン) を用いて精製することにより取得した。連結反応を行った制限酵素の認識配列周辺の塩基配列ならびに PCR 増幅断片の全塩基配列は、各工程において DNA シークエンサー ABI PRISM 377 および Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver.2 (アプライドバイオシステム) を使用して決定し、塩基配列の確認を行った。

工程 1: マウス A3AR 遺伝子のエクソン 2 領域を含むマウスゲノム DNA が挿入されたプラスミド pBS-ex2 を BamH I と Apa I で切断して得られる約 2.8-kb の DNA 断片を (Apa I で切断した末端は DNA Blunting Kit (タカラバイオ) を用いて平滑化しておく)、Sma I と BamH I で切断した両端に loxP 配列が付加されたポジティブセレクションマーカーとしてのヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子発現ユニットを有するプラスミド pKO select HPRT ベクター (レキシコン) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-HPRT-hA3R-arm2 を作製した (図 1-2)。

工程 2: 合成オリゴ (センス鎖: 5'-CTA gCT AgC TAC Cgg AAT TCC TCC CCg Cgg ggA ggT AC-3'、アンチセンス鎖: 5'-CTC CCC gCg ggg Agg AAT TCC ggT AgC TAg CTA g-3'、プロリゴにて合成) を 90°C で 10 分間加熱したのち室温でアニーリングさせ、Hpa I と Kpn I で切断したプラスミド ploxP-HPRT-hA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-RE-HPRT-hA3R-arm2 を作製した (図 1-2)。

工程 3: プラスミド pBS-ex2 を Pst I と BamH I で切断して得られる約 1.8-kb の DNA 断片を、Pst I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) に Ligation High を用い

て導入し、プラスミド A3R-C1 を作製した (図 1-2)。

工程 4 : 合成オリゴ (センス鎖 : 5'-TTT CCg Cgg TTT ggT AC-3'、アンチセンス鎖 : 5'-CAA ACC gCg gAA A-3'、プロリゴにて合成) を 90°C で 10 分間加熱したのち室温でアニーリングさせ、Hinc II と Kpn I で切断したプラスミド A3R-C1 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-C2 を作製した (図 1-2)。

工程 5 : マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-Cgg AAT TCT gAg TAg TTA CCT TgA CAg-3' および 5'-Cgg gAT CCT TCg gAg CAg gTT CT-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて PCR 反応を行った後、増幅された約 0.38-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-C3 を作製した (図 1-3)。

工程 6 : プラスミド A3R-C2 を Sac II と BamH I で切断して得られる約 0.15-kb の DNA 断片を、Sac II と BamH I で切断したプラスミド A3R-C3 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-C4 を作製した (図 1-3)。

工程 7 : プラスミド A3R-C4 を Sac II と EcoR I で切断して得られる約 0.5-kb の DNA 断片を、Sac II と EcoR I で切断したプラスミド ploxP-RE-HPRT-hA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-C-HPRT-hA3R-arm2 を作製した (図 1-3)。

工程 8 : マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-Cgg gAT CCA Tgg AgC TCg AAA gTT CTC-3' および 5'-Cgg gAA TTC ggC ATg CTg TCT CAg AAA Ag-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて PCR 反応を行った後、増幅された約 0.35-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N1 を作製した (図 1-3)。

工程 9 : マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-Cgg gAT CCA gCA TgC CCA ACA ACA gCA C-3' および 5'-Cgg AAT TCC ATg ACC AgC ACC CCAAC-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて PCR 反応を行った後、増幅された約 0.2-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N2 を作製した (図 1-4)。

工程 10 : プラスミド A3R-N2 を EcoR I と Sph I で切断して得られる約 0.2-kb の DNA 断片を、EcoR I と Sph I で切断したプラスミド A3R-N1 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N3 を作製した (図 1-4)。

工程 11 : プラスミド A3R-N3 を Sac I と Nco I で切断して得られる約 0.4-kb の DNA 断片を、Sac I と Nco I で切断したプラスミド TA-hA3R に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N4 を作製した (図 1-4)。

工程 12 : プラスミド pBS-ex1 を Sac I と Sma I で切断して得られる約 5-kb の DNA 断片を、Nde I と Sac I で切断したプラスミド A3R-N1 (Nde I で切断した末端は DNA Blunting Kit を用いて平滑化しておく) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N5 を作製した (図 1-4)。

工程 13 : プラスミド A3R-N4 を Sac I と EcoR I で切断して得られる約 1.2-kb の DNA 断片

を、Sac I と EcoR I で切断したプラスミド A3R-N5 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N6 を作製した (図 1-5)。

工程 14: プラスミド A3R-N6 を Spe I と EcoR I で切断して得られる約 7-kb の DNA 断片を、Nhe I と EcoR I で切断したプラスミド ploxP-RE-C-HPRT-hA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-arm1-HPRT-hA3R-arm2 を作製した (図 1-5)。

工程 15: プラスミド pKO Select DT (レキシコン) を Rsr II で切断して得られる約 1.3-kb の DNA 断片を、Rsr II で切断後ウシ小腸由来アルカリホスファターゼで脱リン酸化したプラスミド ploxP-arm1-HPRT-hA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、ヒト A3AR 相同組換えベクターを作製した (図 1-5)。

5) ヒト A3AR 置換 ES 細胞株の樹立

129/SvEv 系統のマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 株である AB2.2 (レキシコン) は、M15 培地 (DMEM 培地 (レキシコン) に 15% ウシ胎児血清 (レキシコン)、0.1 mM の β メルカプトエタノール (レキシコン)、2 mM の L-グルタミン (レキシコン)、50 単位/ml のペニシリン (レキシコン) および 50 μ g/ml のストレプトマイシン (レキシコン) を添加) を用いて、フィーダープレート上で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。

フィーダープレートは、ゲラチンコート処理を施した細胞培養用ディッシュにマイトマイシン C 処理マウス胚線維芽細胞株 STO 細胞 (レキシコン) を培養して作製した。すなわち、0.1% ゲラチン溶液 (レキシコン) で 2 時間以上細胞培養用ディッシュの培養面を覆うことによりゲラチンコート処理を行い、STO 細胞を 7% のウシ胎児血清および 2 mM の L-グルタミン、50 単位/ml のペニシリンおよび 50 μ g/ml のストレプトマイシンを含む DMEM 培地 (レキシコン) に 4.4×10^5 個/ml になるよう懸濁後、96 穴プレートに 0.07 ml/穴、24 穴プレートに 0.5 ml、3 cm ディッシュに 2 ml、6 cm ディッシュに 4 ml、8.5 cm ディッシュに 12 ml を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 48 時間以上培養したものをフィーダープレートとした。

AB2.2 細胞へのヒト A3AR 相同組換えベクターの導入は、エレクトロポレーション法を用いた。まず、 3.0×10^6 細胞の AB2.2 細胞を 6 cm ディッシュのフィーダープレートへ播種し 48 時間培養後、8.5 cm ディッシュのフィーダープレートへ継代しさらに 24 時間培養した。培養後 7 ml の PBS (レキシコン) で 2 回洗浄したのち、2 mL のトリプシン溶液 (レキシコン) を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間放置した。AB2.2 細胞が完全にプレートより剥がれたことを確認したのち、2 ml の M15 培地を添加し 40 回程度激しくピペッティングし、 1.0×10^7 細胞を遠心分離で沈殿させた後 0.9 ml の PBS 緩衝液に懸濁した。

PBS に懸濁した AB2.2 細胞 (1.0×10^7 細胞) を、Sal I で切断することにより直鎖状としたヒト A3AR 相同組換えベクター 25 μ g とともに Gene Pulser Cuvette (バイオラッド、電極間距離 4 mm) 内で混合した後、細胞融合装置ジーンパルサー (バイオラッド) を用いてパルス電圧 0.23 kV、電気容量 500 μ F の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、AB2.2 細胞は 70 ml の M15 培地に懸濁し、10 ml/枚で計 7 枚の 8.5 cm フィーダープレートに播種した。

遺伝子導入より 24 時間培養後、HAT Supplement ($\times 100$) (インビトロジェン) を 1 \times 濃度で含む M15 培地で 5 日間培養した。その後、HT Supplement ($\times 100$) (インビトロジェン) を 1 \times 濃度で含む M15 培地でさらに 3 日間培養することによりアミノプテリン耐性コロ

ニーを出現させたのち、PBS で 2 回洗浄し 30 μ l のトリプシン溶液を添加した丸底 96 穴プレートへ 1 コロニー/穴になるよう、コロニーを直接拾いあげて採取した。37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間以上放置した後、70 μ l/穴の M15 培地を添加しピペッティングを行なった後、細胞懸濁液をあらかじめ 100 μ l の M15 培地を添加しておいた 96 穴フィーダープレートに播種し培養を行った。4 日後、レプリカプレートを作製し、さらに 5 日間培養した。レプリカプレートは、PBS 緩衝液で 2 回洗浄後 25 μ l のトリプシン溶液を添加して 37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間以上放置したのち、25 μ l の M15 培地で懸濁した。続いて 20% DMSO (シグマ) と 40% ウシ胎児血清 (レキシコン) を含む DMEM 培地 (以下、2×フリージング培地と称す) を 50 μ l 添加し、よく混合させた後、50 μ l の細胞懸濁液を分取し、あらかじめゲラチンコート処理後 1 穴につき 100 μ l の M15 培地を添加しておいた 96 穴プレートに移すことにより作製した。残りの細胞懸濁液を含むプレートはマスタープレートとして -80°C 凍結保存した。

レプリカプレートを用いたゲノムサザンプロット (後述) により、正確に相同組換えが行われていた ES 細胞クローン株を選別した後、Cre/loxP システムを用いて該 ES 細胞クローン株より薬剤耐性遺伝子発現ユニット (HPRT 発現ユニット) の除去を行った。まず、凍結保存用ストックより ES 細胞クローン株を起こし、3 cm ディッシュフィーダープレートまで拡大培養した。1 ml の PBS で 2 回洗浄後、1 ml のトリプシン溶液を添加し 37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間放置したのち、1 ml の M15 培地を添加し 40 回激しくピペッティングを行い、遠心分離により細胞を沈殿させた。沈殿した細胞を 0.9 ml の PBS に懸濁し Gene Pulser Cuvette (電極間距離 4 mm) 内で 25 μ g の Cre 発現プラスミド pBS185 (インビトロジェン) と混合した。pBS185 は 0.1 mM の EDTA を含む 1 mM のトリス (pH8.0) 溶液に溶解したものをを用いた。ジーンパルサーを用いて、パルス電圧 0.23 kV、電気容量 500 μ F の条件で遺伝子導入した後、10 ml の M15 培地に懸濁して 8.5 cm フィーダープレートディッシュに全量を播種し、24 時間培養した。24 時間後、培地交換を行い、さらに 3 日間培養した。培養後、PBS で 2 回洗浄したのち 2 ml のトリプシン溶液を添加し 37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間放置した後、2 ml の M15 培地を添加し 40 回激しくピペッティングしたのち、遠心分離により沈殿させた細胞を 10 ml の M15 培地に懸濁して細胞数を測定した。続いて、6-チオグアニン ($\times 1000$ 、シグマ) を 1 \times 濃度で含む M15 培地を用いて 500 個/ml、50 個/ml、5 個/ml に細胞を希釈し、各 10 mL ずつ 8.5 cm フィーダープレートディッシュに播種して 7 日間培養することで HPRT 発現ユニット欠失クローンのコロニーを出現させた。これらコロニーは PBS で 2 回洗浄した後、30 μ l のトリプシン溶液を添加した丸底 96 穴プレートへ 1 コロニー/穴になるよう、各クローンあたり 48 コロニーを直接拾いあげて採取した。続いて、37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間以上放置した後、70 μ l/穴の M15 培地を添加し 40 回激しくピペッティングを行い分散させた細胞懸濁液を、各穴に 100 μ l の M15 培地を添加した 96 穴フィーダープレートに播種して 3 日間培養を行った。4 日後、24 穴フィーダープレートへ継代し 2 日間培養を行った。3 日後、3 cm フィーダープレートディッシュに継代して 3 日間培養を行ったのち、継代方法と同様にディッシュより剥離後、遠心分離により沈殿させた細胞を 0.5 ml の M15 培地に懸濁して 0.1 ml ずつ細胞凍結用チューブに分注したのち、2 \times のフリージング培地を 0.1 ml ずつ添加し、凍結保存用ストックとして -160°C にて保管した。上記凍結保存用ストックを各 1 本ずつ融解し、2 ml の M15 培地の入ったゲラチンコート処理

済み 3 cm ディッシュに播種して 3 日間培養を行った。増殖させた ES 細胞クローン株は、次項に示す方法でゲノムサザンプロット解析を行い、薬剤耐性遺伝子 (HPRT 発現ユニット) が除去されたクローンを選別した。

6) ゲノムサザンプロット解析

グラチンコート処理済み (フィーダー細胞無し) の 96 穴プレートもしくは 3 cm ディッシュで培養した AB2.2 細胞を PBS で 2 回洗浄したのち、10 mM のトリス (pH7.5)、10 mM の EDTA、10 mM の NaCl、0.5% のサルコシル (インビトロジェン)、1 mg/ml の Proteinase K (インビトロジェン) を含む細胞溶解液を適当量添加し (96 穴プレートの場合 50 μ l、3 cm ディッシュの場合 2 ml)、60°C で 24 時間消化処理を行なった。処理後、75 mM の NaCl を含むエタノールを適当量 (96 穴プレートの場合 100 μ l、3 cm ディッシュの場合 4 ml) 加え、室温で 30 分以上放置することによりゲノム DNA を沈殿させた。沈殿したゲノム DNA を 70% エタノールで 3 回洗浄した後、96 穴プレートの場合には 0.4 単位/ μ l の EcoR I (タカラバイオ) と 167 ng/ μ l の RNase A (インビトロジェン) を含む溶液を 30 μ l 添加し、37°C で 20 時間消化反応を行った。3 cm ディッシュの場合には、70% エタノールでリンス後のゲノム DNA を TE 溶液 (インビトロジェン) に溶解したのち、5 μ g のゲノム DNA を 20 単位の EcoR I で切断した。EcoR I で処理後の溶液はアガロースゲル電気泳動に供したのち、DNA 断片を 0.4N の NaOH にて Hybond N+ ナイロンフィルター (アマシャムファルマシア) へ転写した。

相同組換えが正確に行われたかどうかを解析するためのゲノムサザンプロットに用いる 5' 側プローブには、マウス A3AR 遺伝子のエクソン 1 上流の EcoR I ~ Sma I 領域を用いた (図 1-6)。プラスミド pBS-ex1 を 100 pg 鋳型として含む 20 μ l の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase (タカラバイオ)、各 0.5 μ M のプライマー (5'-ATA gAg CAC CgC CAg TCC TAg ATg Tg-3' および 5'-TAg CAg CAC TTA CgA TTA AgT TTg gC-3') (ファスマックにて合成) を調整し、94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分間、60°C で 30 秒間、72°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 30 サイクル行った。PCR 反応後、全量を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、約 0.3-kb の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction kit を用いて回収した。回収した DNA 断片はサザンプロット用プローブとして用いるため、T7 QuickPrime Kit (アマシャムファルマシア) を用いて [α -³²P] Deoxycytidine 5'-triphosphate (³²P-dCTP) (MEN) 標識を行った。以下、この DNA 断片を 5' 側プローブとして用いる。

相同組換えが正確に行われたかどうかを解析するためのゲノムサザンプロットに用いる 3' 側プローブには、マウス A3AR 遺伝子のエクソン 2 下流の Apa I ~ EcoR I 領域を用いた (図 1-6)。プラスミド pBS-ex2 を 100 pg 鋳型として含む 20 μ l の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase (タカラバイオ)、各 0.5 μ M のプライマー (5'-CCT TTC CTA TAg TCA TCC TCA CTT CC-3' および 5'-ATT Tgg CAg TgT gAT gTg TgT CTT TC-3') (ファスマックにて合成) を調整し、94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 30 サイクル行った。PCR 反応後、全量を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、約 0.24-kb の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction kit を用いて回収した。回収した DNA 断片はサザンプロット用プローブとして用いるため、T7 QuickPrime Kit により ³²P-dCTP 標識した。以下、この DNA 断片を 3' 側プローブとして用いる。

EcoR I で切断したゲノム DNA を泳動後転写した Hybond N+ ナイロンフィルターと 5' 側プローブもしくは 3'側プローブをハイブリッド溶液 (5×SSPE (インビトロジェン)、5×デンハルト溶液 (和光純薬)、0.5% SDS) 中にて 65°C 下で一晩ハイブリッドさせたのち、2×SSPE と 0.1%SDS を含む溶液を用いて 65°C で 15 分間の洗浄を 3 回、0.2×SSPE と 0.1%SDS を含む溶液を用いて 65°C で 15 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄後のメンブレンは X 線フィルム Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT™ AR (コダック) と重ね合わせて -80°C で一晩感光させ、翌日現像した。

7) ヒト A3AR 置換マウスの作製

相同組換えが正常に行われた ES 細胞は、8 週齢の C57BL/6J メスマウス (日本クレア) より取得した受精後 3.5 日胚の胚盤胞内にマイクロインジェクター (成茂科学) を用いて導入した。胚盤胞 1 個あたり、10~15 個の ES 細胞を導入した。導入後、8 週齢の ICR 偽妊娠マウス (日本クレア) の子宮内に移した。子宮内への移植胚数は、片側あたり 10 個とし、マウス 1 匹あたり 20 個の胚盤胞を移植した。移植後 17 日で得られる産仔からのキメラマウスの判定は被毛の色 (コートカラー) より行った。産仔の全身の被毛色を観察し、129SvEv マウス由来である茶褐色の被毛が全身に占める % をキメラ率として算出した。被毛がすべて C57BL/6J マウス由来の黒色であった場合キメラ率は 0%、被毛すべてが茶褐色であれば、キメラ率は 100% と判定した。キメラマウスの生殖細胞が導入した ES 細胞由来であるかは、キメラマウスを C57BL/6J メスマウスと交配させ、得られた産仔のゲノム DNA をゲノムサザンブロット解析することにより確認した。マウスの尾 (5~10 mm) を切り取り、300 μ l の細胞溶解液で溶解したのち、上記 6) に従ってゲノムサザンブロットを行った。

8) 骨髄細胞由来マスト細胞 (BMMC) の作製

マウスからの骨髄細胞由来マスト細胞 (BMMC) の作製は、Supajatura らの方法³⁶⁾に従った。まず、10 週齢のオス BALB/cA マウス 20 匹 (日本クレア) より摘出した脾臓をスライドガラスを用いてすり潰した後、それぞれ最終濃度 10%(v/v) のウシ胎児血清 (JRH)、10 mM の HEPES Buffer Solution (インビトロジェン)、0.1 mM の 2メルカプトエタノール (インビトロジェン)、50 mg/l のゲンタマイシン (ナカライテスク)、3.4 mg/l の *Phytolacca americana* (pokeweed) レクチンを添加した RPMI1640 培地 (インビトロジェン) に 2×10^6 細胞/ml となるように懸濁し 37°C、5% CO₂ 条件下で 5 日間培養後、培養上清を回収した。この培養上清を PWM-SCM³⁷⁾ とする。

続いて、8 週齢オスの野生型マウス (C57BL/6、日本クレア) および遺伝子改変マウスの大腿骨を摘出後、注射針にて骨髄腔内に BMMC 培地 (RPMI1640 培地 (インビトロジェン) に、それぞれ最終濃度 10% のウシ胎児血清 (JRH)、0.1 mM の sodium pyruvate (インビトロジェン)、0.1 mM の non-essential amino acid (インビトロジェン)、50 μ M の 2メルカプトエタノール (インビトロジェン)、50 mg/l のゲンタマイシン、10%(v/v) の PWM-SCM を添加) を注入して骨髄細胞を取得したのち、BMMC 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。培地交換は 4 日おきに行った。

骨髄細胞が BMMC に分化しているかを確認するため、以下に示す FACS 解析を行なった。28 日間培養した骨髄細胞より 2×10^5 細胞を分取し、PBS (インビトロジェン) で 1 回洗浄

したのち、0.2 μg の PE 標識 抗マウス c-kit 抗体 (BD バイオサイエンス) と 0.2 μg の FITC 標識 抗 TNP IgE 抗体 (EZ-Label FITC Protein Labeling kit (ピラス)) を用いて、抗 TNP IgE 抗体を FITC で標識した) を含む PBS に懸濁し、氷上で 1 時間反応させた。反応後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、FACS Calibur (BD バイオサイエンス) を用いて PE および FITC の蛍光強度を測定した。また、コントロールとして、抗体を反応させていない細胞を用いて同様の測定を行った。

9) RT-PCR

8 週齢オスの野生型マウス (C57BL/6、日本クレア) および遺伝子改変マウスより脳、肝臓、腎臓、精巣を摘出しハサミで細かく刻んだ後、各 30 mg 分をテフロン製ホモジェナイザーを用いてすり潰し、total RNA を抽出した。BMMC は 1×10^7 細胞を PBS で 2 回洗浄した後、total RNA を抽出した。total RNA の抽出には、QIAshredder (キアゲン) および RNeasy Protect Mini Kit (キアゲン) を用いた。抽出した total RNA 各 5 μg より、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェン) を用いて逆転写反応を行い、一本鎖 cDNA を合成した。

マウス A3AR 特異的増幅断片 (0.913-kb) を増幅させるプライマーとして、マウス A3AR cDNA 配列よりプライマー-mA3AR-5' (5'-AAC ACC ACg gAg ACg gAC Tgg CTg-3') および mA3AR-3' (5'-AAT CTg Agg TCT gAC AgA gCC TgA g-3') を設計した。また、ヒト A3AR 特異的増幅断片 (0.912-kb) を増幅させるプライマーとして、ヒト A3AR の cDNA 配列よりプライマー-hA3AR-5' (5'-AAC AgC ACT gCT CTg TCA TTg gCC-3') および hA3AR-3' (5'-TCA gAg ggA Tgg CAg ACC ACA CAg-3') を設計した。さらに、 β アクチン特異的増幅断片 (0.793-kb) として、マウス由来 β アクチン cDNA 配列よりプライマー-bAC-5' (5'-gAT ATC gCT gCg CTC gTC gTC gAC-3') および bAC-3' (5'-CAg gAA ggA Agg CTg gAA gAg AgC-3') を設計した。プライマーはファスマックにて合成した。

一本鎖 cDNA を 0.5 μl 含む 20 μl の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase (タカラバイオ)、各 0.5 μM のプライマー) を調整し、PCR を行った。マウス A3AR 特異的増幅断片は、プライマー-mA3AR-5' および mA3AR-3' を用いて 94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 30 サイクル行った。ヒト A3AR 特異的増幅断片は、プライマー-hA3AR-5' および hA3AR-3' を用いて 94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 30 サイクル行った。 β アクチン特異的増幅断片は、プライマー-bAC-5' および bAC-3' を用いて 94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行った。PCR 反応後、10 μl を 1.2% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片を検出した。

10) 細胞膜を用いた結合実験

佐木らの方法³⁴⁾を用いて、BMMC より細胞膜画分を調整した。各 BMMC を PBS で洗浄後、テフロン製ホモジェナイザーを用いて 5 ml の膜調整溶液 (5 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl_2) に懸濁した。懸濁溶液を 40,000 $\times g$ で 20 分間遠心し、得られた沈殿物は再度テフロン製ホモジェナイザーを用いて 2 ml の膜調整溶液に懸濁した。膜蛋白質懸濁溶液の蛋白質濃度は、BCA Protein Assay reagent kit (ピラス) を用いて測定した。

[¹²⁵I]AB-MECA を用いた結合実験は、佐木ら³⁴⁾および Salvatore ら²⁹⁾の方法に準じて行った。膜結合溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、2 U/ml adenosine deaminase (シグマ)) に膜蛋白質懸濁溶液 100 μg を加え、最終濃度 0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 nM の [¹²⁵I]AB-MECA を添加した。各反応液には、最終濃度 1% (v/v) となるように DMSO (シグマ) を加えた。非特異的結合は、上記反応液に最終濃度 100 μM の (*R*)-PIA を添加して測定した。反応液は 25°C で 120 分間反応させた後、マルチスクリーン FB/DV グラスファイバーB (ミリポア) を用いたフィルトレーションにより反応を停止させた。蛋白質の吸着したフィルターを氷冷した膜結合溶液を用いて 3 回洗浄した後、コブラγカウンター (パッカー) を用いて放射線量を測定した。 [¹²⁵I]AB-MECA の A3AR 特異的結合量は、 [¹²⁵I]AB-MECA の結合量より非特異的結合量を引いた値より算出した。

結合阻害実験は、上記の反応系に最終濃度 0.8 nM の [¹²⁵I]AB-MECA と、最終濃度 0.001、0.01、0.1、1.0、10、100 nM の A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 を添加し、測定した。

1 1) 細胞内 Ca²⁺量の測定方法

BMMC を最終濃度 100 ng/ml の坑 TNP IgE 抗体を含む BMMC 培地を用いて 5% CO₂、37°C 条件下で 16 時間培養した後、カルシウム測定緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.4)、115 mM NaCl、5.4 mM KCl、0.8 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、13.8 mM グルコース (以上、ナカライテスク)、0.2% (w/v) ウシ血清アルブミン (シグマ)、2.5 mM Probenecid (シグマ)) で 2 回洗浄したのち、最終濃度 5 μM の Fluo-3 AM もしくは Fura-2 AM (モリキュラプローブ) と最終濃度 0.5% の Pluronic F-127 (シグマ) を添加したカルシウム測定緩衝液に懸濁して 5% CO₂、37°C 条件下で 1 時間培養した。

Fluo-3 を用いた測定は以下の方法で行った。上記の 1 時間培養後、BMMC をカルシウム測定緩衝液で 2 回洗浄後、カルシウム測定緩衝液にて 2.5 × 10⁵ 細胞/ml になるよう懸濁し 100 μl ずつ 96 穴プレートに分注した。96 穴プレートは 5% CO₂、37°C 条件下で 30 分間培養した後、最終濃度 100 nM の A3AR 特異的アゴニスト Cl-IB-MECA もしくは 10 ng/ml の TNP-BSA (コスモバイオ) を添加し、FDSS 6000 (浜松ホトニクス) を用いて 480 nM の励起波長によって生じる 530 nM の蛍光波長を、ブルーダイクロイックミラーに透過させたのち、吸光 520~560 nM のフィルターで 1 分間測定した。530 nM の蛍光波長は、Cl-IB-MECA や TNP-BSA の無添加時を 1.0 とした場合の相対値として表記した。A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 は、Cl-IB-MECA を添加する 10 分前に、最終濃度 100 nM で添加した。

Fura-2 を用いた測定は以下の方法で行った。上記の 1 時間培養後、BMMC をカルシウム測定緩衝液で 2 回洗浄後、カルシウム測定緩衝液にて 5 × 10⁵ 細胞/ml になるよう懸濁し、500 μl 分を測定用チューブに分注した。測定用チューブは 5% CO₂、37°C 条件下で 30 分間放置した後、蛍光測定装置 CAF-110 (日本分光) にセットし、最終濃度 100 nM の Cl-IB-MECA の添加およびその 2 分後に添加する 10 ng/ml の TNP-BSA (コスモバイオ) による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を測定した。KF26777 は、Cl-IB-MECA の添加 2 分前に、最終濃度 100 nM で添加した。細胞内 Ca²⁺量は、340 nm および 380 nm の励起波長によって生じる 510 nm の蛍光波長を CAF-110 を用いてモニターし、蛍光比 (340/380 nm) をチャート紙に記録した。蛍光比は、Cl-IB-MECA や TNP-BSA の無添加時を 1.0 とした場合の相対値として表記した。

1 2) 脱顆粒活性の測定方法

BMMCにおける脱顆粒活性として、BMMCより放出される脱顆粒マーカーである β ヘキソサミニダーゼ量を測定した。測定方法は、以前に報告されている方法^{29,36)}を一部改良して行った。BMMCを最終濃度100 ng/mlの坑TNP IgE抗体を含むBMMC培地を用いて5% CO₂、37°C条件下で16時間培養した後、Tyrode緩衝液(10 mM HEPES (pH7.4)、130 mM NaCl、5 mM KCl、0.6 mM KH₂PO₄、0.6 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.1%(w/v) グルコース(以上、ナカライテスク)、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(シグマ))に懸濁して96穴プレートへ 5×10^5 細胞/ウェルずつ播種した。各ウェルに、最終濃度0、0.1、10、1000 nMのCl-IB-MECAを添加して1分間37°Cでインキュベートした後、最終濃度10 ng/mlのTNP-BSAを添加して30分間37°Cでインキュベーションを行った。ケモカインを添加する場合は、最終濃度10 nMのmacrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)もしくはregulated on activation of T cell expressed and secreted (RANTES)をCl-IB-MECAの代わりに添加した。

反応後、2,000 gで5分間遠心を行って上清を回収し、最終濃度2 mMの*p*-Nitrophenyl N-acetyl- β -glucosaminide(シグマ)と最終濃度20 mMのクエン酸溶液(pH4.5)を上清に添加して37°Cで1時間反応させた後、最終濃度100 mMのグリシン溶液(pH10.7)を添加し、マイクロプレートリーダー(バイオラッド)を用いて405 nMの吸光度を測定した。BMMC中に含まれる全 β -hexosaminidase量は1% Triton X-100を添加することによって測定した。各 β -hexosaminidase活性は、BMMC中の全 β -hexosaminidase活性を100%とした場合の%表記で示した。

1 3) ウェスタンブロット法によるリン酸化蛋白質の検出方法

リガンド結合によって活性化されたA3ARによって誘導されるPKBおよびERK 1/2のリン酸化は、以下の方法で検出した。各BMMCに最終濃度1 μ MのCl-IB-MECAを添加して37°Cで0、3、15分間インキュベートした後、冷PBSにて2回洗浄し、細胞溶解液(62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2%(w/v) SDS、10% glycerol、50 mM dithiothreitol(インビトロジェン)、0.1%(w/v) bromphenol blue(シグマ))に溶解した。細胞溶解液を95°Cで5分間熱した後、遠心により沈殿物を除き、5-20%グラジエントe-PAGEL(アトー)によるSDS-PAGEに供した。分離した蛋白質バンドは電気泳動転写装置ホライズプロットAE-6677型(アトー)を用いてImmobilon Transfer Membranes(ミリポア)に転写し、5% (w/v) スキムミルクを含むTBST(20 mM Tris-HCl (pH7.6)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20(シグマ))を用いて室温で1時間ブロッキングを行った。

一次抗体には、抗リン酸化PKB(Ser473)抗体(セルシグナルテクノロジー)もしくは抗リン酸化ERK1/2(Thr202/tyr204)抗体(セルシグナルテクノロジー)を5% (w/v) BSA入りTBSTで1000倍希釈したものをを用いた。メンブレンに対して1次抗体を4°Cで1晩反応させたのち、3回TBSTで洗浄した。続いて、Horseradish Peroxidase標識抗ラビット2次抗体(セルシグナルテクノロジー)を5% (w/v) スキムミルク入りTBSTで2000倍希釈した2次抗体を室温で1時間反応させた後、メンブレンを3回TBSTで洗浄し、Phototope HRP Western Blot Detection Kit(セルシグナルテクノロジー)を用いて特異的バンドを検

出した。

また、同じサンプルを泳動したメンブレンを作製し、1次抗体として抗 PKB 抗体（セルシグナルテクノロジー）もしくは抗 ERK1/2 抗体（セルシグナルテクノロジー）を用いることにより、非リン酸化 PKB および ERK 1/2 の検出を行った。

1 4) A3AR の細胞内移行の測定方法

A3AR の細胞内移行は Cl-IB-MECA で刺激した後の細胞膜上の A3AR 量の変化を測定することより算出した。各 BMMC に最終濃度 1 μ M の Cl-IB-MECA を添加し 15 分間、37°C で反応させた後、冷 PBS で 2 回洗浄して細胞膜上より Cl-IB-MECA を除去した。細胞膜上の A3AR 量は、最終濃度 2 nM の [¹²⁵I]AB-MECA を用いた細胞膜結合実験により測定した（1-2. 実験材料および方法の 1 0）参照）。A3AR 量は、Cl-IB-MECA を添加しなかった場合の A3AR 量を 100%とした場合の%表記で示した。

1 5) データ解析

[¹²⁵I]AB-MECA 結合実験から得られる K_d 値および B_{max} 値は、Prism ソフトウェア（グラフパッド）を用いて算出した。アンタゴニストの K_i 値は、結合阻害実験より求められた IC_{50} 値より Cheng-Prusoff の計算式³⁸⁾を用いて求めた。

1-3. 結果

1) ヒト A3AR 置換マウスの作製

1.0×10⁷個の 129 系マウス由来 ES 細胞株 AB2.2 にヒト A3AR 相同組換えベクター 25 μg をエレクトロポレーション法で導入後、アミノプテリン耐性 ES 細胞株よりゲノムサザンブロット解析を用いて相同組換え体の選択を行った。本サザンブロット解析では、野生型マウスのゲノム DNA を EcoRI で切断した場合、5'側プローブを用いることにより約 9.0-kb の DNA 断片が、3'側プローブを用いることにより約 6.5-kb の DNA 断片が検出される。一方、相同組換え体のゲノム DNA を EcoRI で切断した場合、5'側プローブを用いることにより約 8.5-kb の DNA 断片が、3'側プローブを用いることにより約 8.8-kb の DNA 断片が検出される (図 1-6)。400 クローンのアミノプテリン耐性 ES 細胞株を用いて上記のゲノムサザンブロット解析を行った結果、片方の染色体上のマウス A3AR 遺伝子がヒト A3AR 遺伝子に置換された組換え体が計 16 クローン同定された (図 1-7)。

続いて、Cre/loxP システムを用いて、相同組換え体の染色体上より HPRT 発現ユニットの除去を行った。16 クローンの相同組換え体より、コロニー形態と増殖能が良い 4 クローンを選択し、Cre 発現ベクターを一過性発現させた後、6-チオグアニン耐性株よりゲノムサザンブロット解析を用いて HPRT 発現ユニットが除去された株の選択を行った。本サザンブロット解析では、HPRT 発現ユニットの除去された相同組換え体のマウスゲノム DNA を EcoRI で切断した場合、3'側プローブによって約 5.0-kb の DNA 断片が検出される (図 1-8)。12 クローンの 6-チオグアニン耐性株を用いて上記のゲノムサザンブロット解析を行った結果、全てクローンにおいて HPRT 発現ユニットの除去が観察された (図 1-9)。

HPRT 発現ユニットが除去された相同組換え体より、コロニー形態と増殖能が良いクローンを選択し、C57BL/6J マウスの胚盤胞内へと導入した。ES 細胞を導入した胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮内に入れることにより、60~100%のキメラ率を有するオス個体が計 20 匹産仔され、うち 4 匹は ES 細胞由来の生殖系列細胞を有していた。この生殖系列キメラ体を C57BL/6J マウスと掛け合わせることによって片方のアリルがヒト A3AR に置換されたヘテロ体を取得し、さらにヘテロ体同士を掛け合わせることによって両方のアリルがヒト A3AR に置換されたホモ体を取得した。ヘテロ体およびホモ体の出現率はメンデルの法則に従っていた。これらヘテロ体およびホモ体の判別は、ゲノムサザンブロット解析にて行った (図 1-10)。

2) ヒト A3AR 置換マウスにおけるヒト A3AR の発現

ヒト A3AR 置換マウスにおいてヒト A3AR が正常に発現されているか調べるために、脳、肝臓、腎臓、精巣および BMDC における A3AR の mRNA 量を、RT-PCR 法を用いて解析した。使用した BMDC は、pokeweed レクチン刺激脾臓細胞の培養上清 (インターロイキン 3 などのマスト細胞分化誘導因子を含む³⁷⁾) を含んだ培地を用いて、骨髄細胞より分化誘導させて作製し、マスト細胞の分化マーカーである IgE 受容体および c-kit が発現していることを確認した (図 1-11)。RT-PCR 解析の結果、ヒト A3AR 置換マウスの各臓器および BMDC におけるヒト A3AR の mRNA 発現パターンは、野生型マウスにおけるマウス A3AR の mRNA 発現パターンと同等であった (図 1-12)。また、ヒト A3AR 置換マウスでは、マ

ウス A3AR の mRNA を検出することが出来なかった (図 1-12B)。

次に、BMMC 細胞膜上における A3AR の発現を、A3AR 特異的アゴニスト^[125I]AB-MECA を用いた結合実験より確認した。野生型マウスおよびヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC の細胞膜上における A3AR の発現量 (B_{max} 値) は、それぞれ 186.2 ± 18.9 および 178.8 ± 11.5 fmol/mg であり、その発現量は同等であった (図 1-13A)。

3) ヒト A3AR 置換マウスにおいてヒト A3AR はアゴニスト結合能が低下している

A3AR に対する^[125I]AB-MECA の親和性には種差が存在し、ヒト A3AR に対する K_d 値は 0.6 nM である一方、ラット A3AR に対する K_d 値は 1.5 nM であることが知られている³⁹⁾。我々は、野生型マウス由来 BMMC 上のマウス A3AR に対する^[125I]AB-MECA の K_d 値は 1.45 ± 0.17 nM であり (図 1-13A)、ラット A3AR に対する K_d 値と同等であることを確かめた。一方、ヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC 上のヒト A3AR に対する^[125I]AB-MECA の K_d 値は 1.42 ± 0.27 nM であり (図 1-13A)、ヒト細胞上のヒト A3AR に対する K_d 値 (0.6 nM) と比べて 2 倍以上弱いことが確認された。

続いて、同様にヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 の親和性を測定した結果、ヒト A3AR 置換マウス BMMC 上のヒト A3AR に対する K_i 値は 0.27 ± 0.11 nM であり (図 1-13B)、ヒト細胞上のヒト A3AR に対する KF26777 の K_i 値 (0.20 ± 0.038 nM³⁴⁾) と同等であった。また、マウス A3AR に対する KF26777 の K_i 値は 10,000 nM 以上であり (図 1-13B)、ラット A3AR に対する K_i 値 (10,000 nM 以上³⁴⁾) と同等であることを確認した。

4) KF26777 はヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC での Cl-IB-MECA 添加による細胞内 Ca^{2+} 量上昇を抑制する

リガンドにより刺激された A3AR は、 $G_{i/o}$ タンパク質を介して細胞内 Ca^{2+} 量を上昇させる^{14,15)}。マウス体内においてヒト A3AR が細胞内 Ca^{2+} 量上昇を誘導出来るか調べるために、A3AR アゴニスト Cl-IB-MECA の添加によるヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC での細胞内 Ca^{2+} 量の変動を Fluo-3 (図 1-14) および Fura-2 (図 1-15) を用いて解析した。野生型マウスおよびヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC では、100 nM の Cl-IB-MECA 添加によって細胞内 Ca^{2+} 量の上昇が観察された (図 1-14B と E および図 1-15A と C)。野生型マウス由来 BMMC では、KF26777 を添加しても Cl-IB-MECA による細胞内 Ca^{2+} 量上昇は抑制されなかったが (図 1-14C および図 1-15B)、ヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC では KF26777 の添加によって Cl-IB-MECA による細胞内 Ca^{2+} 量上昇が完全に抑制された (図 1-14F および図 1-15D)。

5) ヒト A3AR 置換マウスでは A3AR によるマスト細胞の脱顆粒増強が起こらない

IgE 抗体および抗原で刺激されるマスト細胞の脱顆粒は、A3AR によって活性化される PI3K γ を介したシグナル伝達経路により増強されることが知られている^{17,20)}。マウス体内においてヒト A3AR がマスト細胞の脱顆粒増強を誘導出来るか調べるために、Cl-IB-MECA 添加によるヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC での脱顆粒を β ヘキソサミニダーゼ (脱顆粒時にマスト細胞より放出される脱顆粒マーカー⁴⁰⁾) の放出量として測定した。IgE 抗体および抗原で刺激した野生型マウス由来 BMMC では、添加した Cl-IB-MECA の濃度依存的に β ヘ

キソサミニダーゼ放出量の増強が観察された (図 1-16A)。一方、ヒト A3AR マウス由来 BMMC では Cl-IB-MECA の添加による β ヘキソサミニダーゼの放出量の変化は観察されなかった (図 1-16B)。続いて、ヒト A3AR 置換マウスにおいて PI3K γ が正常に機能しているか確認するために、ケモカイン受容体によって活性化される PI3K γ がマスト細胞の脱顆粒増強を増強出来るかどうか調査した。その結果、野生型マウス由来 BMMC と同様に、ヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC をケモカイン MIP-1 α もしくは RANTES で刺激すると β ヘキソサミニダーゼ放出量の増強が観察された (図 1-16C)。以上より、ヒト A3AR 置換マウスにおいて、PI3K γ はケモカイン受容体によって正常に活性化されることが示された。

6) ヒト A3AR 置換マウスでは PI3K γ を介したヒト A3AR からのシグナル伝達が流れないリガンド結合により刺激された A3AR は、PI3K γ を介して PKB および ERK1/2 のリン酸化を誘導する^{13,16)}。マウス体内においてヒト A3AR がこのリン酸化を誘導出来るか調べるために、Cl-IB-MECA 添加によるヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC 内での PKB および ERK1/2 のリン酸化をウェスタンブロット法を用いて解析した。野生型マウス由来 BMMC では Cl-IB-MECA 添加 3 分後において PKB および ERK1/2 のリン酸化が検出された (図 1-17A)。一方、ヒト A3AR マウス由来 BMMC では、Cl-IB-MECA 添加による ERK1/2 のリン酸化は観察されず、また PKB のリン酸化も非常に弱い程度であった (図 1-17B)。

A3AR によって活性化された ERK1/2 は A3AR 自身のリン酸化を誘導し、その結果 A3AR の細胞内移行が引き起こされる²⁴⁾。マウス体内においてヒト A3AR の細胞内移行が正常に行われるか調べるために、Cl-IB-MECA 添加 15 分後におけるヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC 細胞膜上の A3AR 量を [¹²⁵I]AB-MECA の結合量として測定した。野生型マウス由来 BMMC では Cl-IB-MECA 添加により約 50% の A3AR の細胞内移行が観察されたが、ヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC ではその A3AR の細胞内移行率は 20% 程度に過ぎなかった (図 1-18)。

1-4. 考察

A3AR に対するアンタゴニストは喘息やアレルギー疾患に対する治療薬として期待されているにも関わらず、げっ歯類の A3AR に効果的なアンタゴニストが存在しないためにげっ歯類モデルを用いた *in vivo* 評価試験を行えず、その結果 A3AR アンタゴニストの開発は現在停滞している^{6,7)}。本章において我々は、ヒト A3AR 特異的アンタゴニストの薬理的評価が可能なモデル動物として、マウス A3AR 遺伝子をヒト A3AR の配列に置換した“ヒト A3AR 置換マウス”の作製を試みた。現在までに、 α ラクトアルブミン遺伝子⁴¹⁾やプリオン遺伝子⁴²⁾、エリスロポエチン (EPO) 受容体遺伝子⁴³⁾をヒト型に置換したヒト化マウスが報告されているが、GPCR をヒト化した例は本研究が初めてである。GPCR に対するアゴニストやアンタゴニストの多くは、ヒトとげっ歯類の GPCR 間においてその親和性に種差がみられることが知られており、ヒト GPCR に対する化合物の評価をげっ歯類で行うことが困難な場合が多い⁹⁾。GPCR ヒト化マウスは、このような種差の問題を解決するために非常に有力なモデル動物となると考えられる。

我々は、マウス A3AR 遺伝子の ORF 領域をヒト A3AR cDNA 配列に置換する方法として、相同組換え法を用いた。一般的に、相同組換え法を用いると置換後の染色体上にはポジティブセレクションマーカーが挿入されたまま残される。しかしながら、相同組換え法を用いて EPO 受容体遺伝子をヒト型に置換したマウスにおいて、EPO 受容体遺伝子の近傍に挿入される相同組換えベクター由来のポジティブセレクションマーカーの影響によって EPO 受容体の mRNA 発現量が抑制されることが観察されている⁴³⁾。そのため本研究では、相同組換え後の染色体上より、Cre/loxP システムを用いて相同組換えベクター由来のポジティブセレクションマーカー (HPRT 発現ユニット) を除去した。その結果、ヒト A3AR 置換マウスにおけるヒト A3AR の発現量は、mRNA レベルおよびタンパク質レベルにおいて、野生型マウスにおけるマウス A3AR と同等であることを確かめた (図 1-12 および 1-13)。

次に我々は、ヒト A3AR がマウス体内で正常に機能するかどうか確認するために、A3AR によって引き起こされる様々な細胞応答を調べた。ヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC では、A3AR アゴニスト Cl-IB-MECA の添加によって細胞内 Ca^{2+} 量の上昇が誘導され、さらにその上昇はヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 の添加によって完全に抑制されることを確認した (図 1-14 および 1-15)。

しかしながら、予期外な事に、ヒト A3AR は IgE 抗体および抗原で刺激されたマスト細胞の脱顆粒を増強することが出来なかった (図 1-16B)。A3AR によるマスト細胞の脱顆粒の増強は、PI3K γ の活性化を介していることが知られているが²⁰⁾、ヒト A3AR 置換マウスでは A3AR が PI3K γ の活性化を介して誘導することが知られている PKB および ERK1/2 のリン酸化¹⁶⁾を検出することが出来なかった (図 1-17)。また、ERK1/2 のリン酸化によって誘導される A3AR の細胞内移行²⁴⁾の割合も、野生型マウスと比べてヒト A3AR 置換マウスでは顕著に低下していた (図 1-18)。ヒト A3AR 置換マウスでは、ケモカイン受容体を介した PI3K γ の活性化による脱顆粒の促進²⁰⁾は正常に観察されることから (図 1-16C)、我々は“ヒト A3AR は PI3K γ の活性化に関与するマウス G タンパク質とカップリングすることが出来ない”という仮説を考えた (図 1-19)。

一般的に、G タンパク質がカップリングしている GPCR と比べて、G タンパク質がカップ

リングしていない GPCR では、そのリガンドに対する親和性が有意に低下することが知られている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。本研究において我々は、ヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC 上のヒト A3AR に対する A3AR アゴニスト [¹²⁵I]AB-MECA の親和性 (K_d 値 1.42 ± 0.27 nM) は、ヒト細胞株上のヒト A3AR に対する親和性 (K_d 値 0.6 nM³⁴⁾) と比べて 2 倍以上弱くなっていることを示した (図 1-13A)。この結果は、“ヒト A3AR は、あるマウス G タンパク質と正常にカップリングすることが出来ない” という我々の仮説を支持している。

PI3K γ の活性化に関与するマウス G タンパク質がヒト A3AR とカップリング出来ない理由として、ヒトとマウス間における A3AR の細胞内領域のアミノ酸配列の相同性の低さが考えられる。実際、ヒトとマウス間での A3AR の細胞内領域のアミノ酸配列の相同性は 78% と、他の GPCR の場合 (相同性の平均 90%) と比べて有意に低い。また、PI3K γ の活性化に関与するマウス G タンパク質は、細胞内 Ca²⁺ 量の上昇に関与するマウス G タンパク質よりも、この種差の影響を受けやすいと考えられる。

我々以外にも、Auchampach らのグループは、イヌ A3AR をアフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞株⁴⁷⁾ やマウス⁴⁸⁾ に発現させた場合、A3AR アゴニストに対する親和性が低下することを示しており、A3AR と G タンパク質のカップリングにおける種差の存在を示唆している。また、GPCR ではないが、ヒト EPO 受容体置換マウスの報告において、マウス体内ではヒト EPO 受容体はマウスの細胞内シグナル伝達因子と正常にカップリング出来ない可能性が示唆されている⁴⁹⁾。

現在まで、ヒト A3AR からの細胞内シグナル伝達経路を解明するための研究が数多く報告されているが、その多くの研究においてヒト A3AR を発現させたげっ歯類由来細胞 (主にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞) が用いられている。その報告の中には、今回の我々の仮説とは異なり、CHO 細胞においてヒト A3AR による PI3K γ を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化 (PKB や ERK1/2 のリン酸化) が観察されている場合もある¹⁴⁾。もしかしたら、これら CHO 細胞におけるヒト A3AR からの細胞内シグナル伝達は、ヒト A3AR の生体内を反映しないレベルでの過剰発現による結果であるかもしれない。我々は、発現量を低く抑えたヒト A3AR 発現 CHO 細胞株ではヒト A3AR からの PI3K γ を介した細胞内シグナル伝達が観察されず、この細胞株にヒト G_{i/o} タンパク質を共発現させるとヒト A3AR からの PI3K γ を介した細胞内シグナル伝達が正常に流れるようになることを確認している (データ示さず)。

本章では、ヒト A3AR 特異的アンタゴニストの薬理的評価が可能なモデル動物として、ヒト A3AR 置換マウスを作製した。マウス体内において、ヒト A3AR は細胞内 Ca²⁺ 量の上昇させることが出来たが、マスト細胞の脱顆粒増強などを含む PI3K γ を介したシグナル伝達経路を活性化することは出来なかった。本研究は、A3AR と G タンパク質のカップリングに関する種差の存在を初めて明確にし、マスト細胞の脱顆粒増強に起因する喘息やアレルギー疾患に対する A3AR アンタゴニストの効果を評価出来る A3AR ヒト化マウスの作製のためには、マウス A3AR をヒト型に置換するだけでは不十分であることを示している。この問題を解決するためには、ヒト A3AR 特異的アンタゴニストとの結合およびマウス G タンパク質とのカップリングの両方を維持する、ヒト/マウスのキメラ A3AR などの開発などが必要であると考えられる。

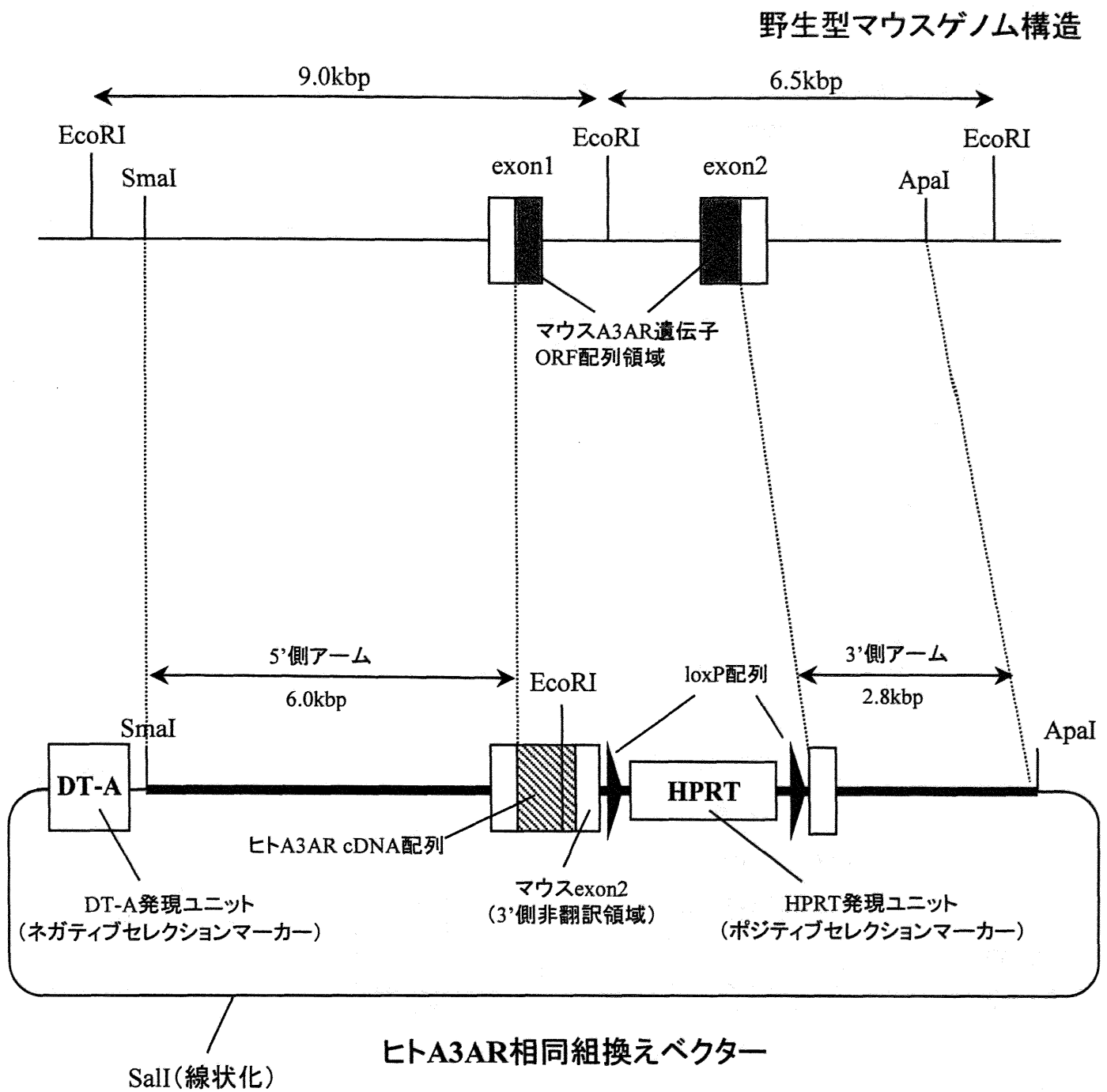
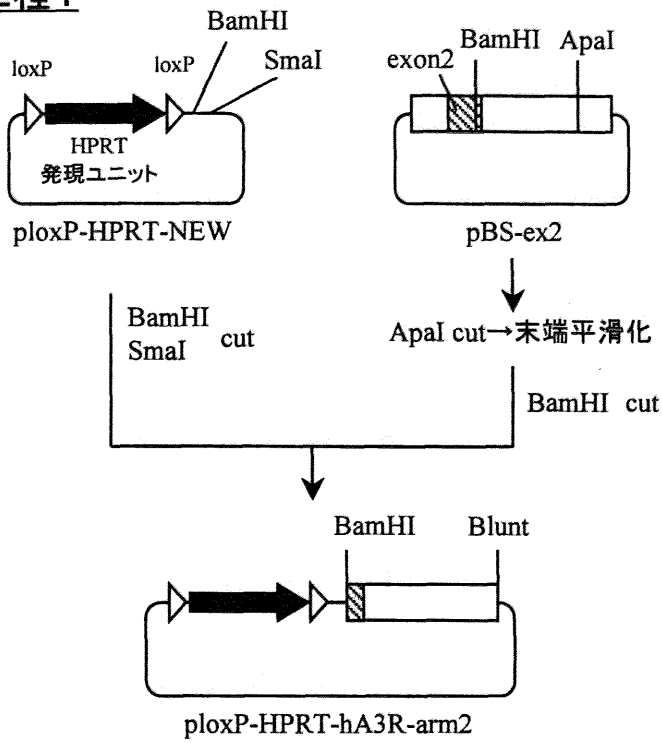


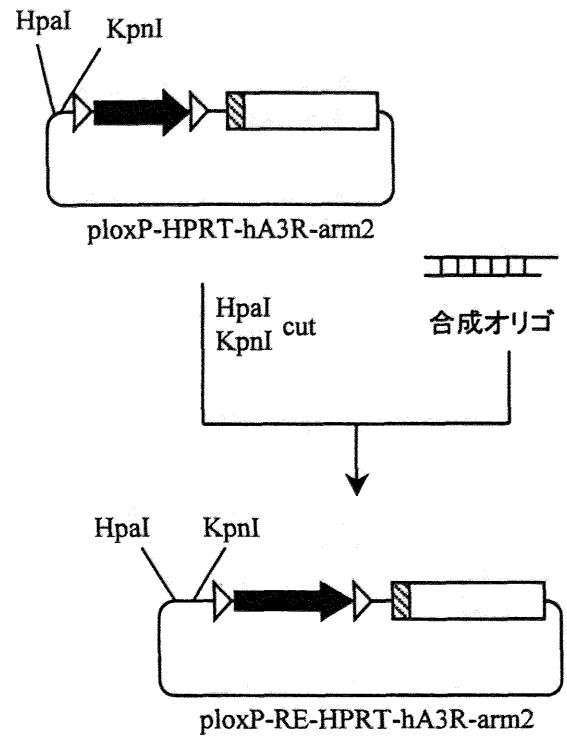
図1-1 ヒトA3AR相同組換えベクターの設計

ヒトA3AR相同組換えベクターの構造を示す

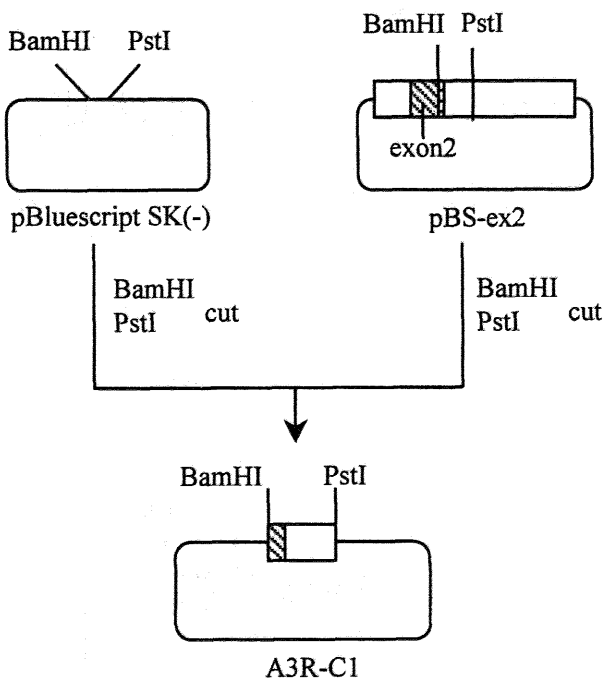
工程1



工程2



工程3



工程4

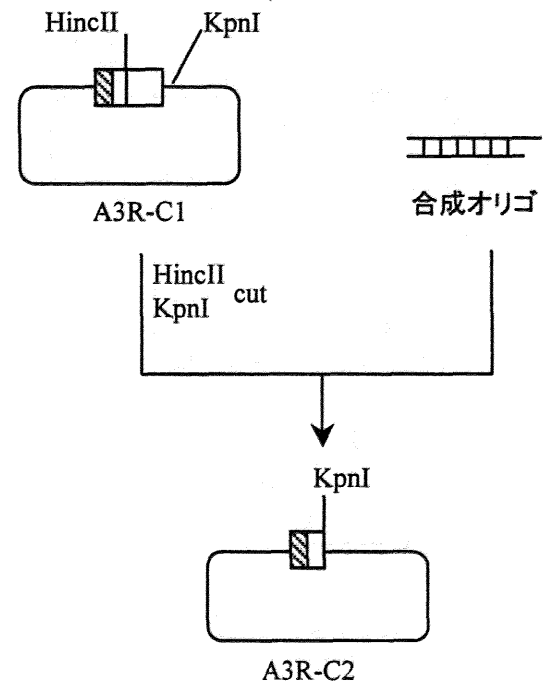
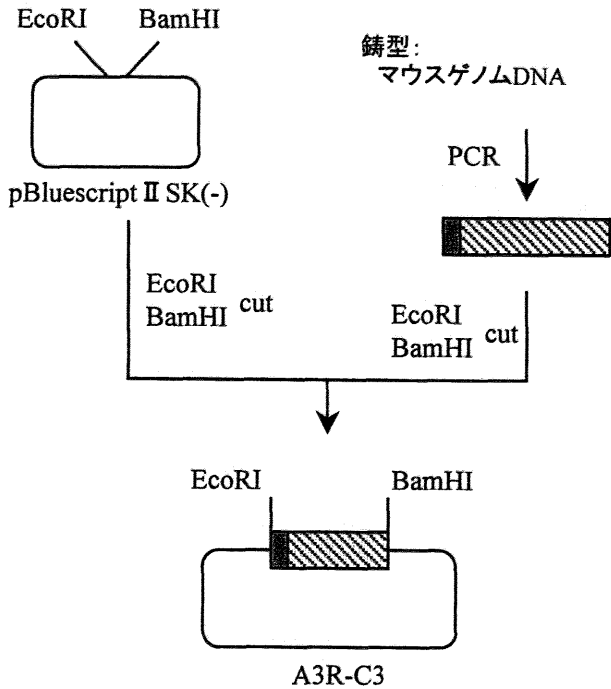


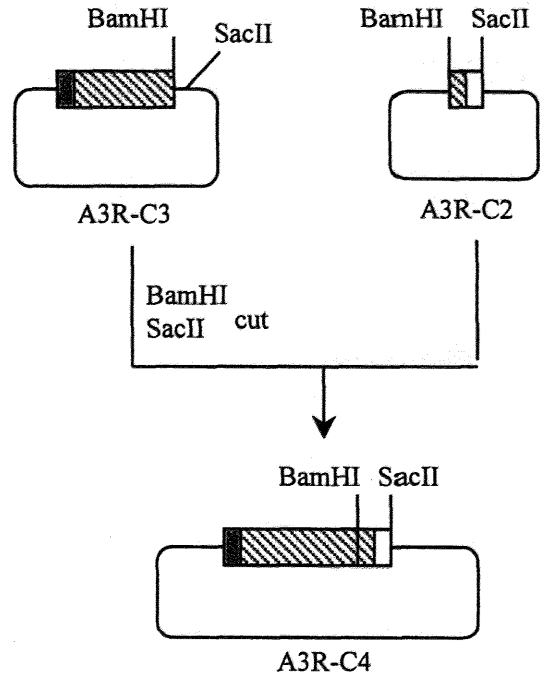
図1-2 ヒトA3AR相同組換えベクターの構築①

ヒトA3AR相同組換えベクター構築のための工程1~4を示す

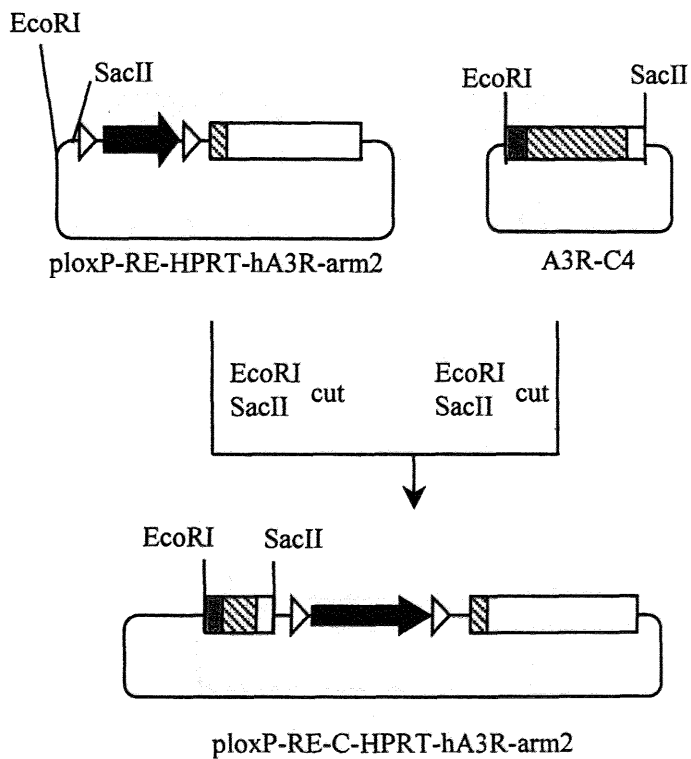
工程5



工程6



工程7



工程8

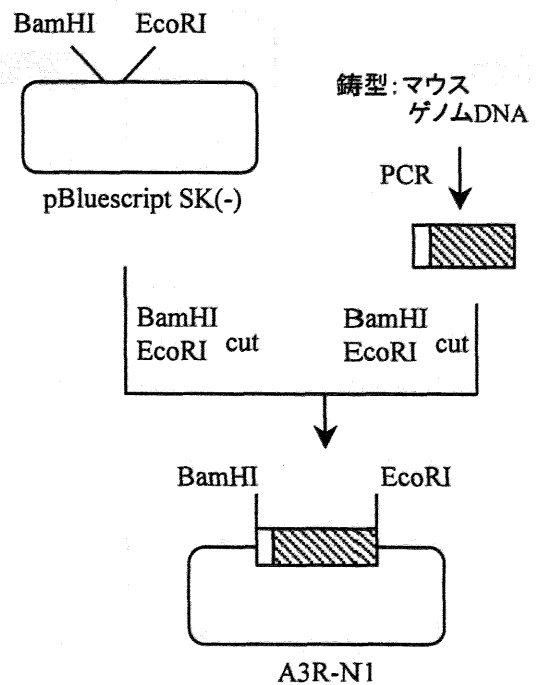
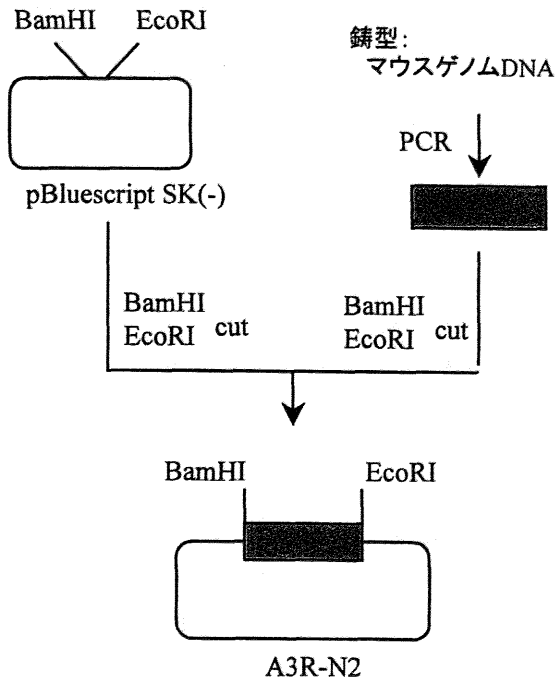


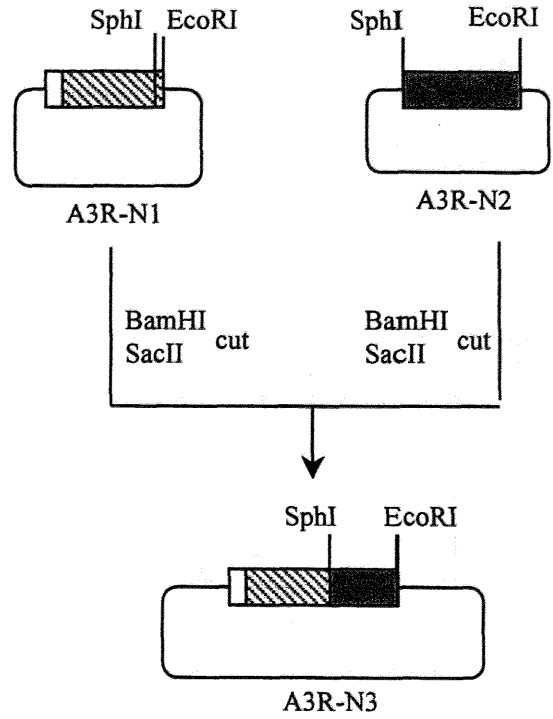
図1-3 ヒトA3AR相同組換えベクターの構築②

ヒトA3AR相同組換えベクター構築のための工程5~8を示す

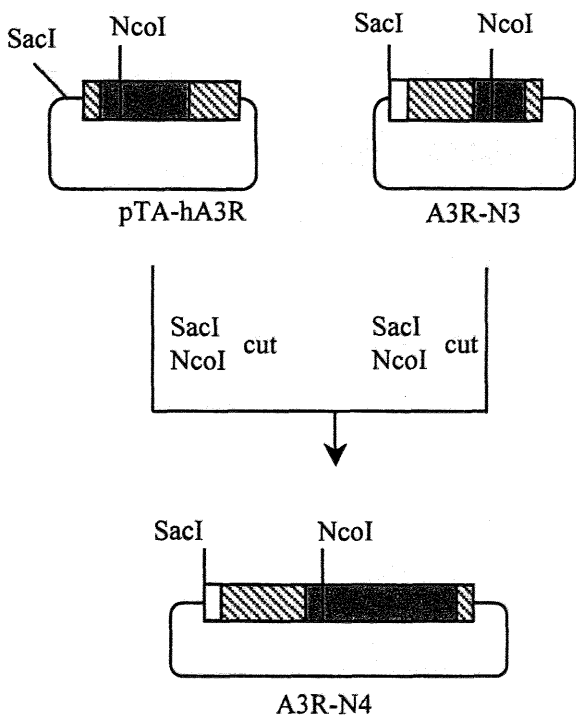
工程9



工程10



工程11



工程12

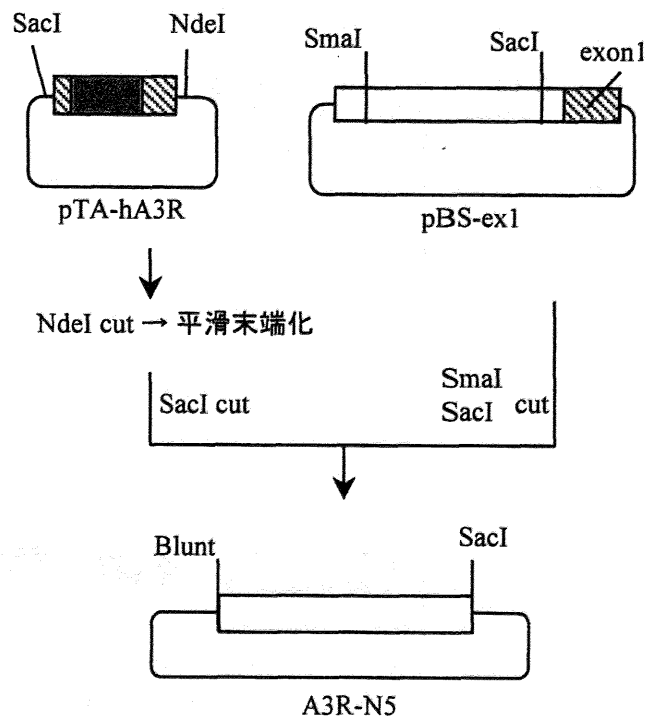
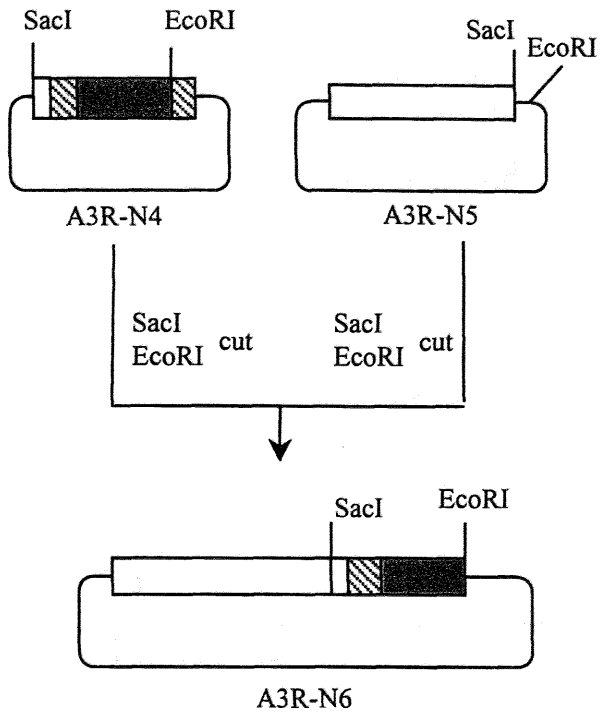


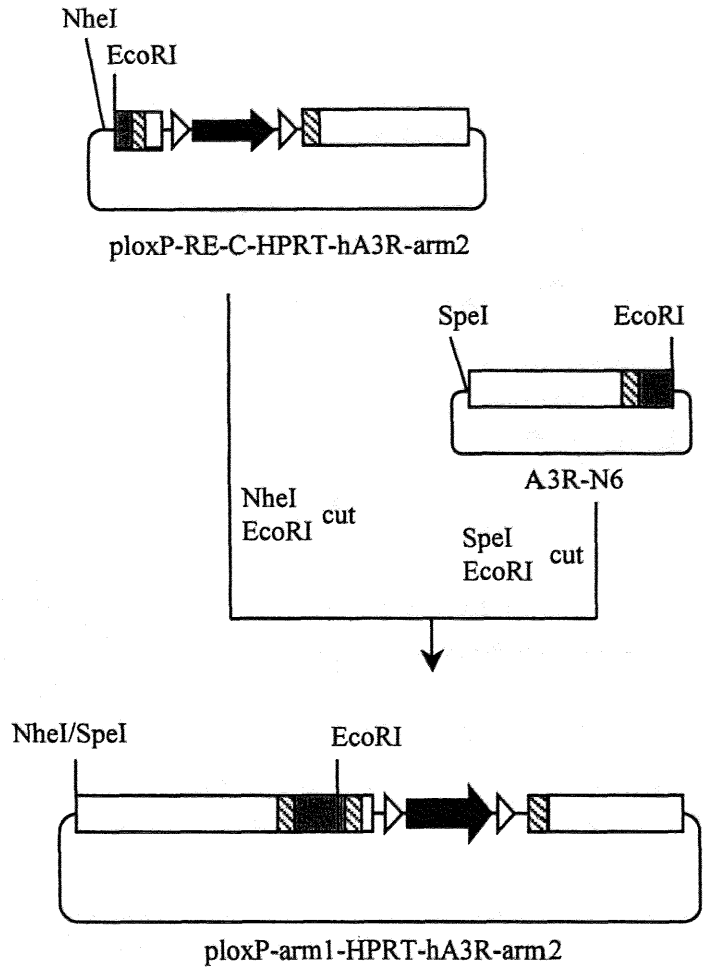
図1-4 ヒトA3AR相同組換えベクターの構築③

ヒトA3AR相同組換えベクター構築のための工程9~12を示す

工程13



工程14



工程15

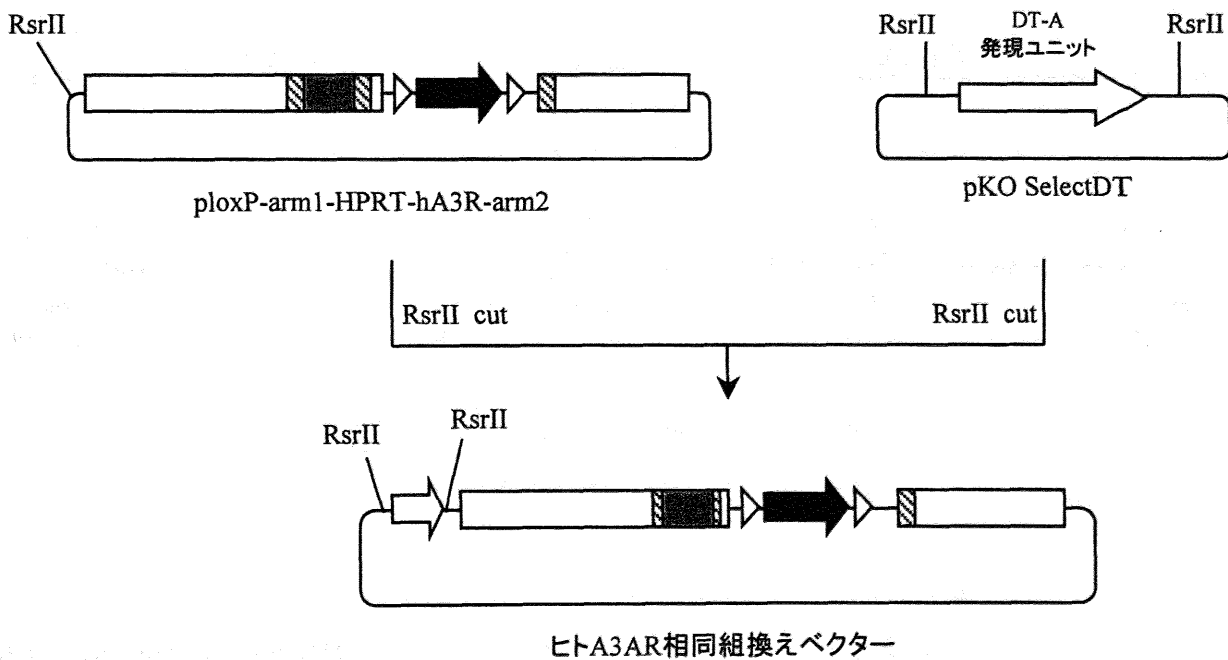
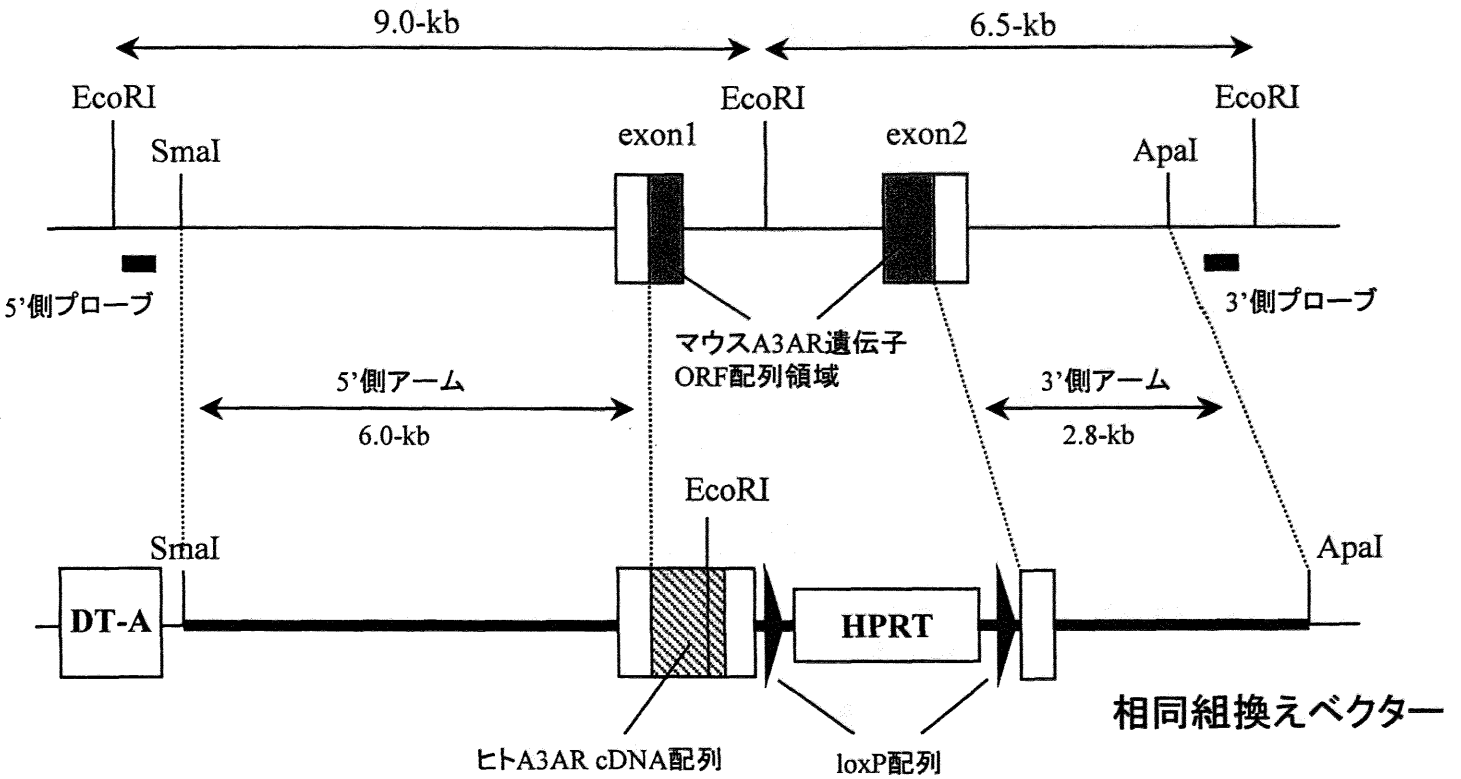


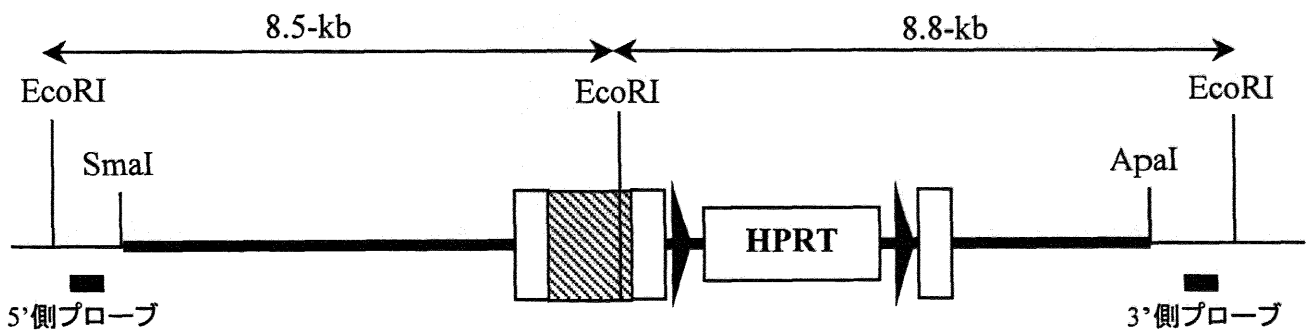
図1-5 ヒトA3AR相同組換えベクターの構築④

ヒトA3AR相同組換えベクター構築のための工程13~15を示す

野生型マウスゲノム構造



↓ 相同組換え



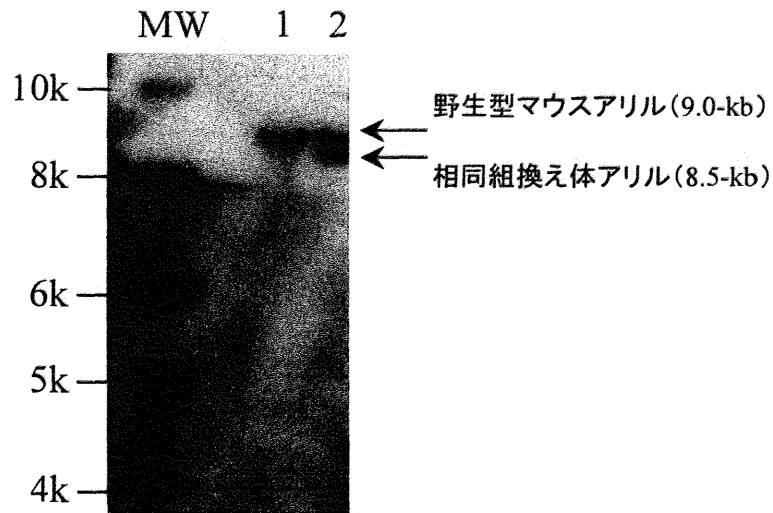
相同組換え後のマウスゲノム構造

図1-6 ヒトA3AR相同組換えベクターを用いたA3AR遺伝子の置換方法

相同組換え法による、マウスA3AR遺伝子のORF領域をヒトA3AR cDNAへと置換する方法およびその置換に伴うマウスゲノム構造の変化を模式図で示す。

A

5'側プローブを用いたサザンブロット解析

**B**

3'側プローブを用いたサザンブロット解析

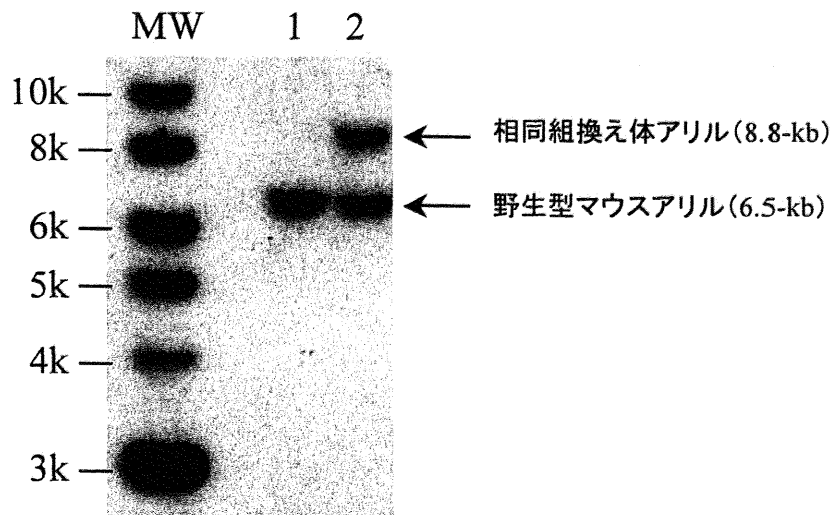


図1-7 マウスES細胞における相同組換え体の同定

マウスES細胞のゲノムDNAをEcoRIで切断したのち、5'側プローブ(A)もしくは3'側プローブ(B)を用いてサザンブロット解析を行った。
 レーン1にはAB2.2細胞由来ゲノムDNAを、レーン2には相同組換え体由来ゲノムDNAを泳動した。
 MWのレーンには分子量マーカーを泳動した。

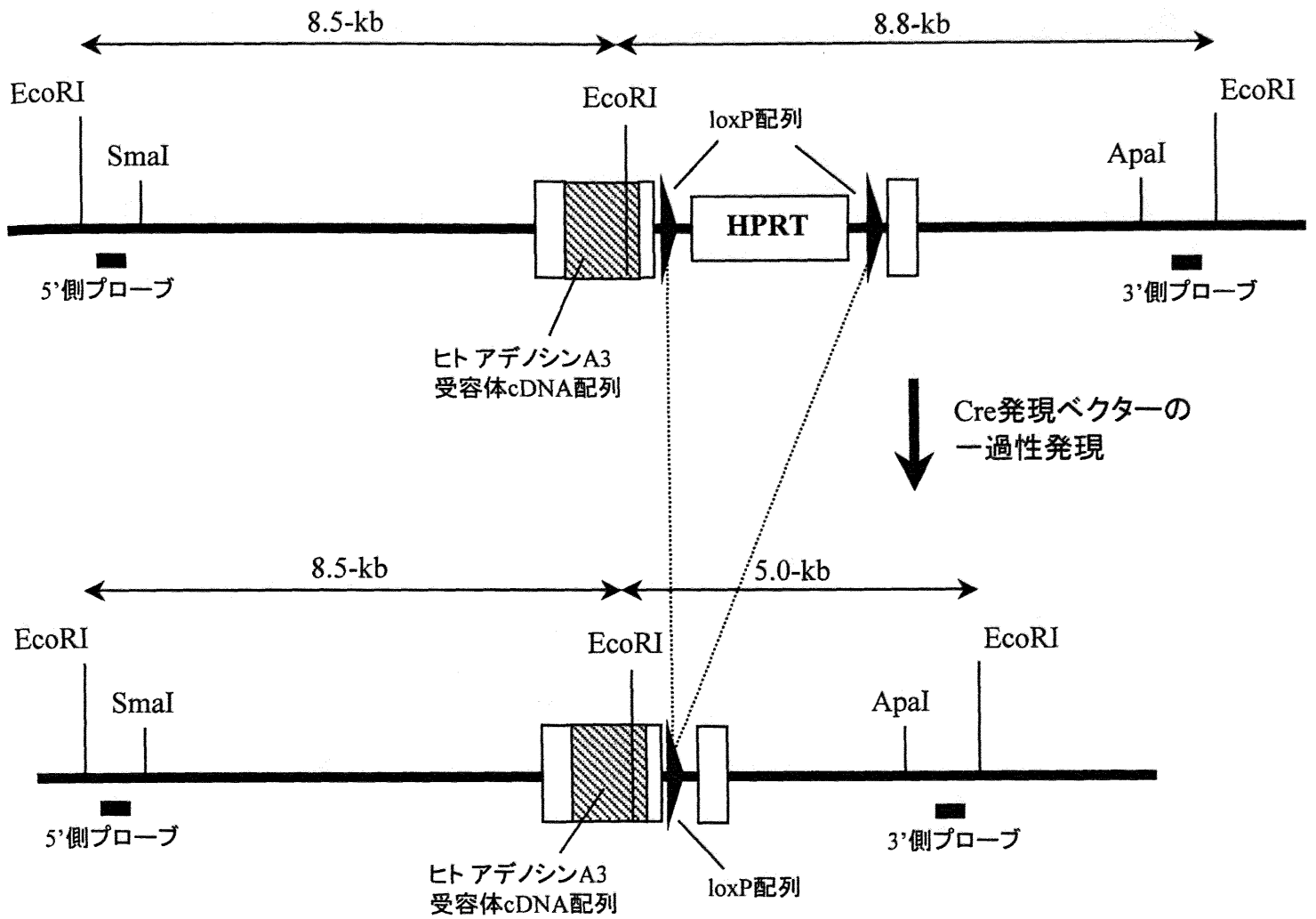


図1-8 Cre発現によるloxP配列間に存在するHPRT発現ユニットの除去

Creの一過的発現による組換え体のゲノム構造の変化を模式図で示す。

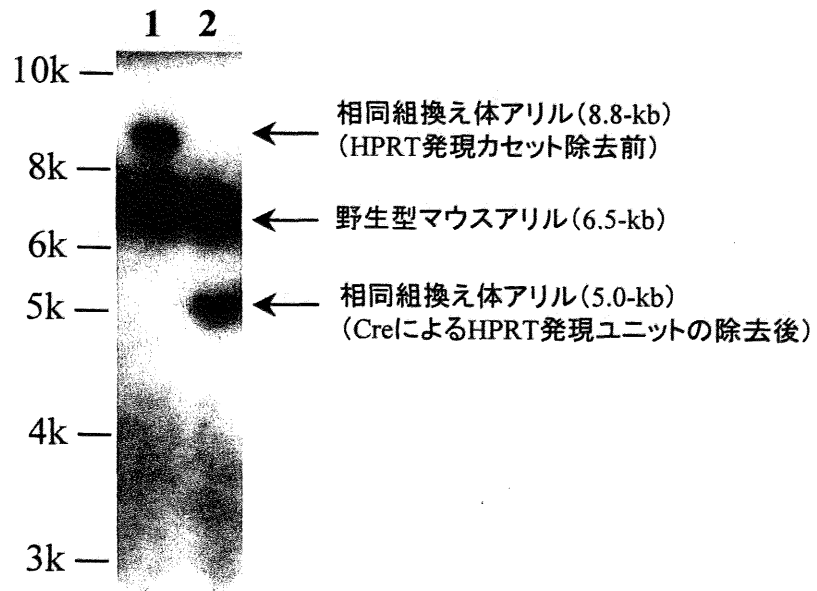
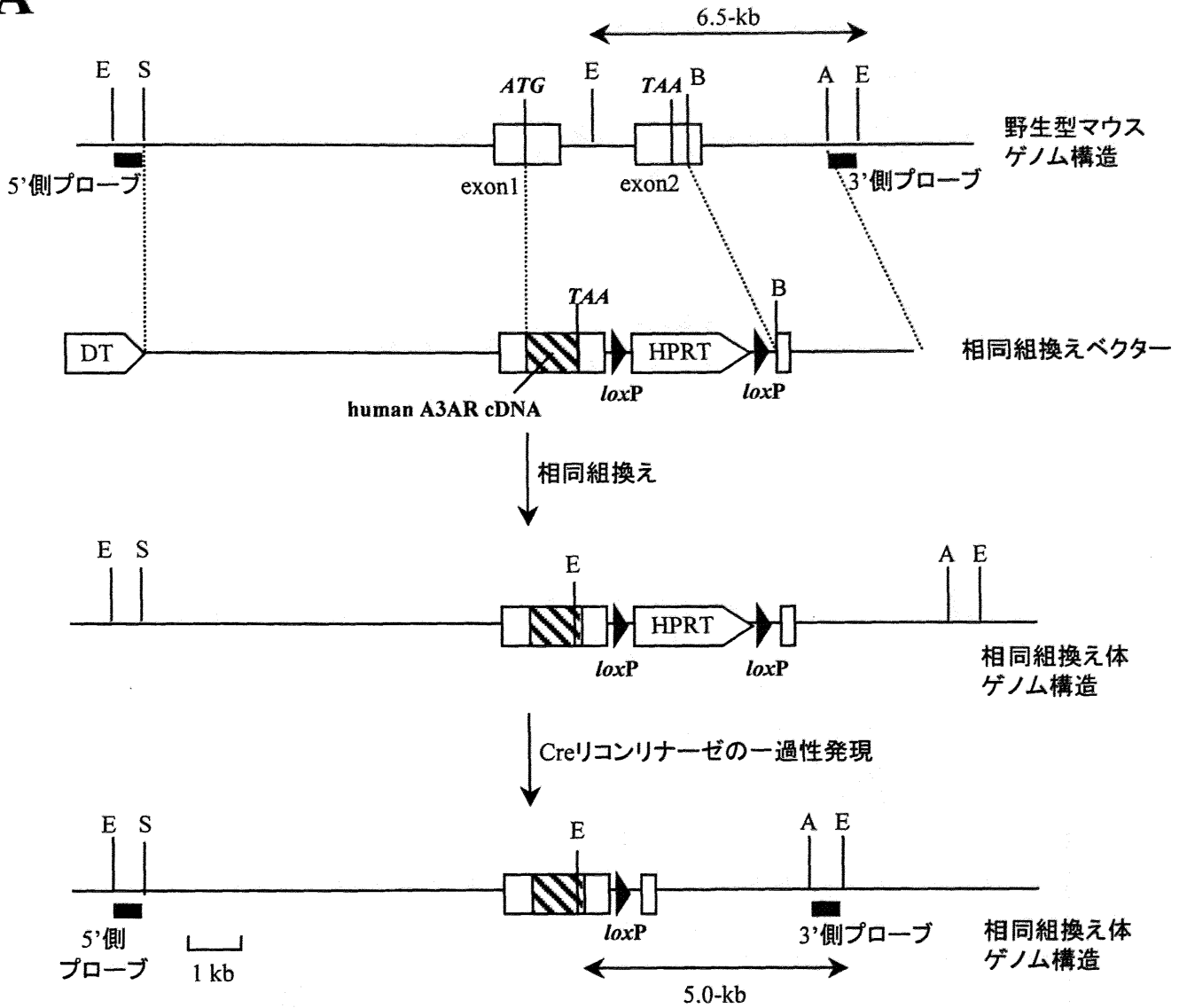


図1-9 Creの一過性発現によるHPRT発現ユニットの除去(サザンブロット解析)

相同組換え体およびCre発現ベクターを一過的に発現させた相同組換え体のゲノムDNAをEcoRIで切断したのち、3'側プローブを用いてサザンブロット解析を行った。

レーン1にはCre発現前の相同組換え体由来ゲノムDNAを、レーン2にはCre発現ベクターを一過性発現させた相同組換え体由来ゲノムDNAを泳動した。

A



B

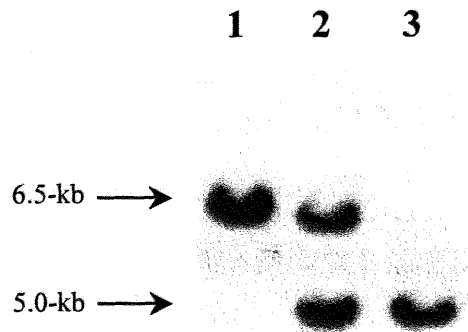


図1-10 ヒトA3AR置換マウスの同定

(A) 相同組換え法による、ヒトA3AR置換マウスの作製方法を模式図で示す。

(B) マウス尾由来ゲノムDNAをEcoRIで切断したのち、3'側プローブを用いてサザンブロット解析を行った。レーン1には野生型マウス、レーン2には片方のアレルがヒトA3ARに置換されたヘテロ体、レーン3には両方のアレルがヒトA3ARに置換されたホモ体由来のゲノムDNAを泳動した。

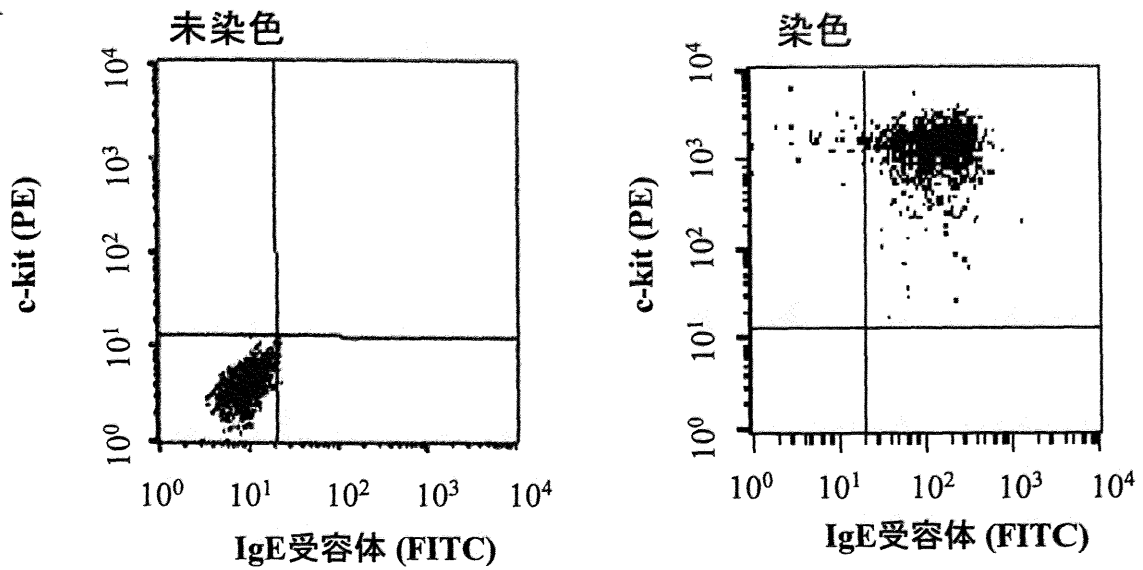
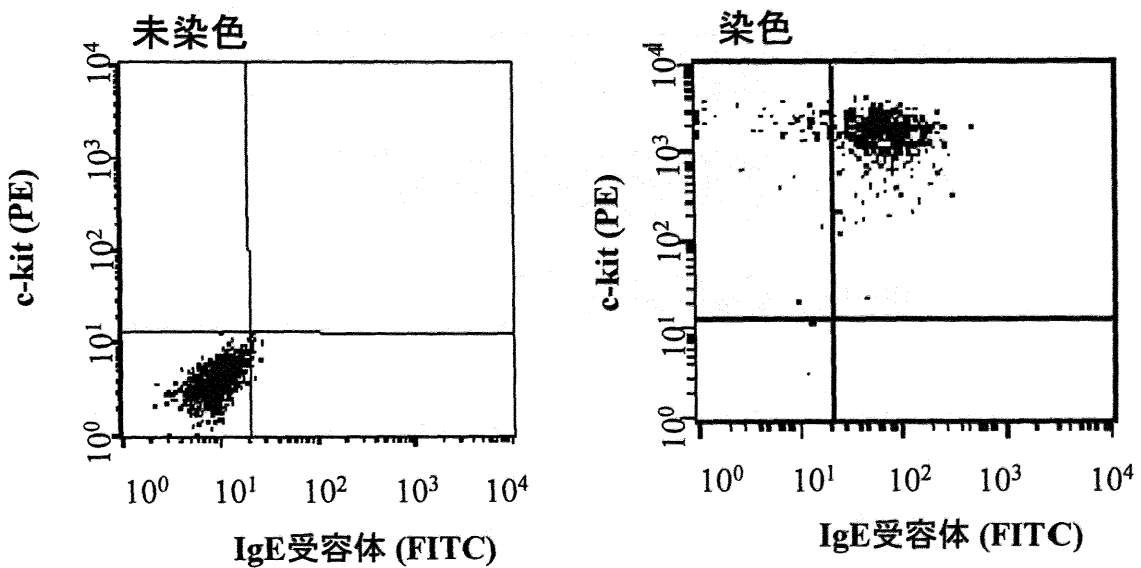
A**B**

図1-11 フローサイトメーターを用いたマスト細胞特異的マーカーの検出

FACSを用いて、野生型マウス(A) およびヒトA3AR置換マウス(B)由来BMMCにおける、IgE受容体(X軸:FITC標識IgE抗体を用いて染色)とc-kit(Y軸:PE標識抗c-kit抗体を用いて染色)の発現量を測定した。

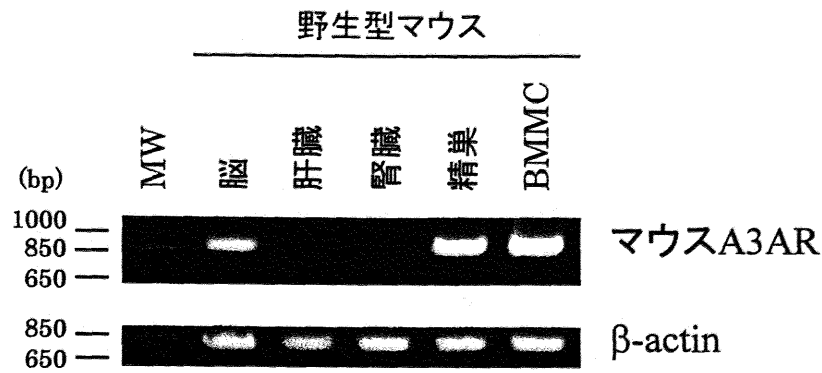
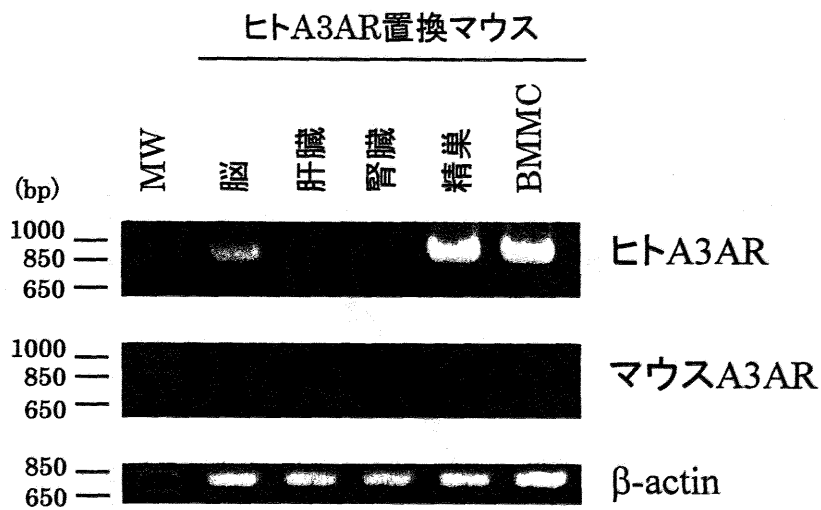
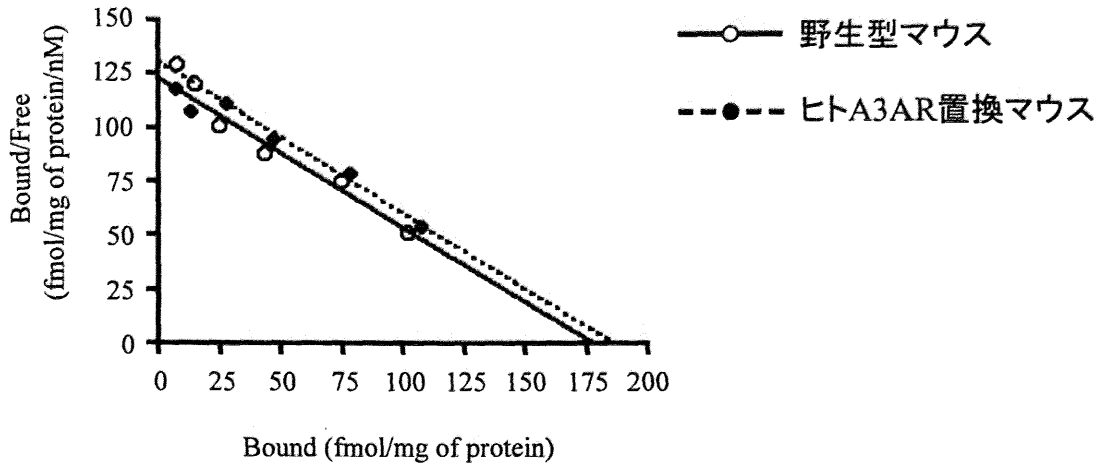
A**B**

図1-12 RT-PCR法によるA3AR遺伝子の発現解析

RT-PCR法を用いて、野生型マウス(A) およびヒトA3AR置換マウス(B) における、各臓器およびBMMCでのA3AR遺伝子の発現を検出した。PCRには、ヒトA3AR、マウスA3ARおよび β アクチンを特異的に増幅するプライマーセットを用いた。

A



B

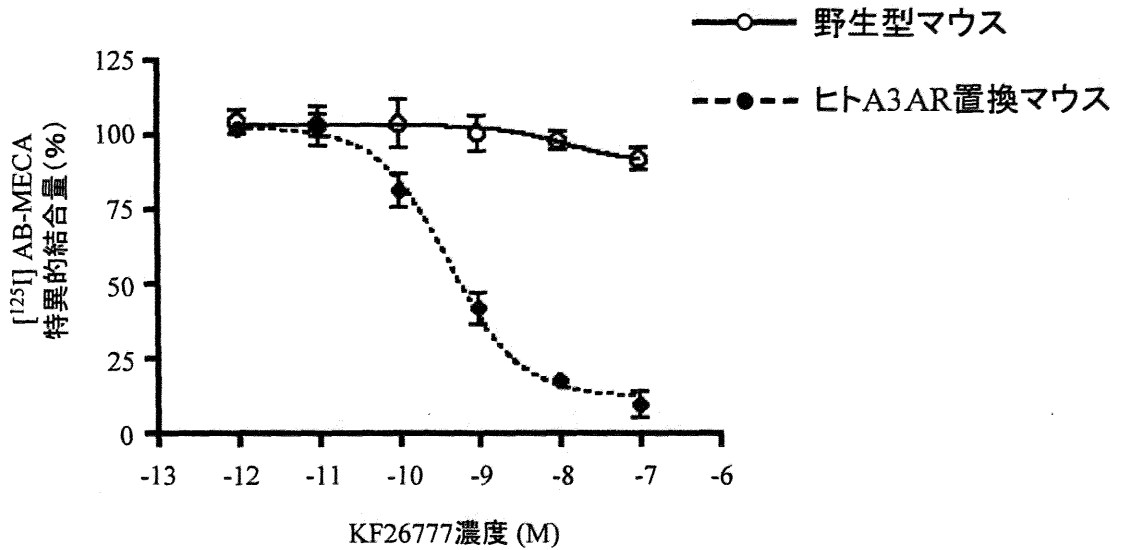


図1-13 A3ARアゴニスト $[^{125}\text{I}]$ AB-MECAを用いた細胞膜結合実験

(A) 野生型(O)およびヒトA3AR置換マウス(●)由来BMMCの細胞膜に対する $[^{125}\text{I}]$ AB-MECA結合量のScatchard plot解析結果を示した。

野生型マウス由来BMMC上のマウスA3ARの K_d 値は 1.45 ± 0.17 nM、 B_{\max} 値は 178.8 ± 11.5 fmol/mgであった。一方、ヒトA3AR置換マウス由来BMMC上のヒトA3ARの K_d 値は 1.42 ± 0.27 nM、 B_{\max} 値は 186.2 ± 18.9 fmol/mgであった。

(B) 野生型(O)およびヒトA3AR置換マウス(●)由来BMMCの細胞膜に対する、KF26777による $[^{125}\text{I}]$ AB-MECAの結合阻害率を示した。

野生型マウス由来BMMC上のマウスA3ARの K_i 値は10,000 nM以上であり、ヒトA3AR置換マウス由来BMMC上のヒトA3ARの K_i 値は 0.27 ± 0.11 nMであった。

全ての値は3回の実験の平均値で示し、エラーバーはその標準偏差(S.D.)値を示した。

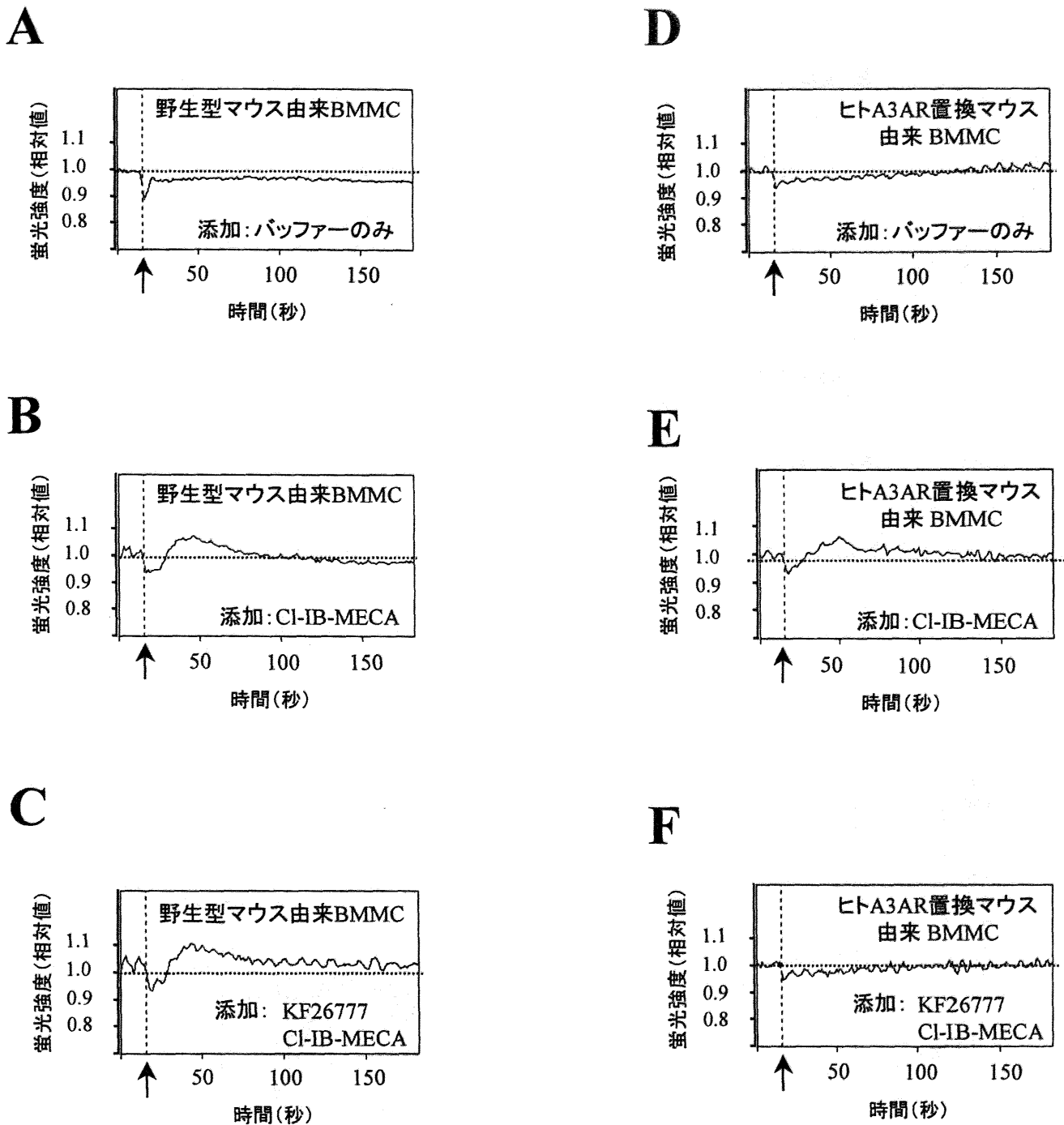


図1-14 A3ARアゴニスト添加によるBMMCの細胞内Ca²⁺濃度の上昇(Fluo-3)

野生型マウス由来BMMC(A-C)およびヒトA3AR置換マウス由来BMMC(D-F)に、バッファーのみ(AおよびD)、100 nMのCI-IB-MECA(BおよびE)、もしくは100 nMのCI-IB-MECAを添加する前にKF26777を添加した時(CおよびF)の細胞内Ca²⁺量の変化をFluo-3を用いて検出した。

Fluo-3の蛍光強度は、リガンド非添加時の蛍光量を1とした相対値で示す。

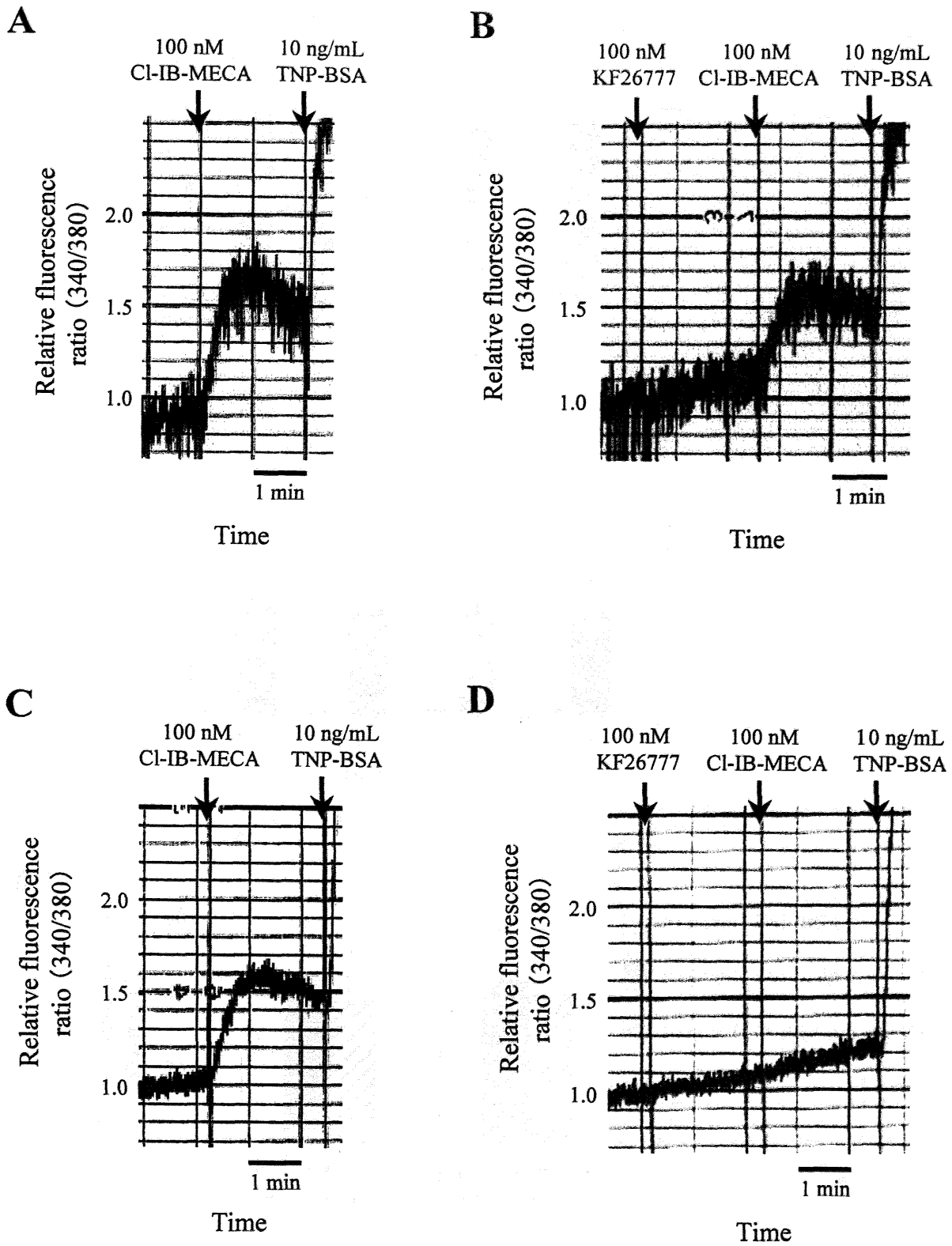
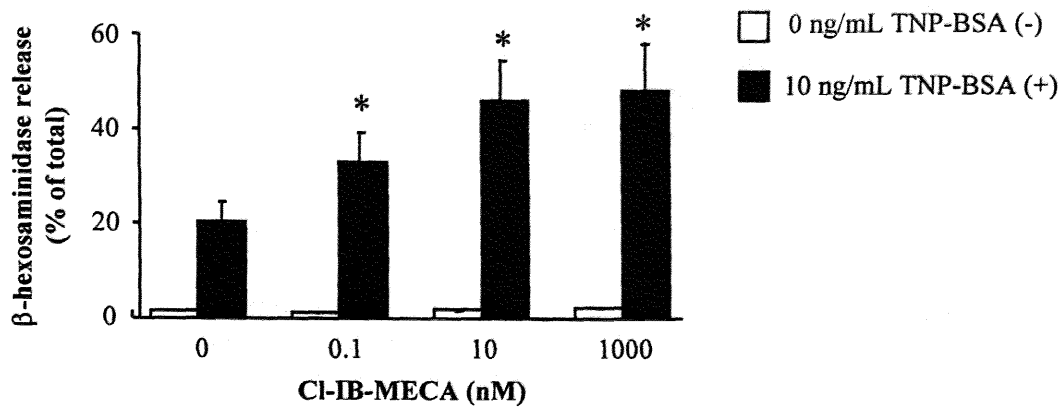


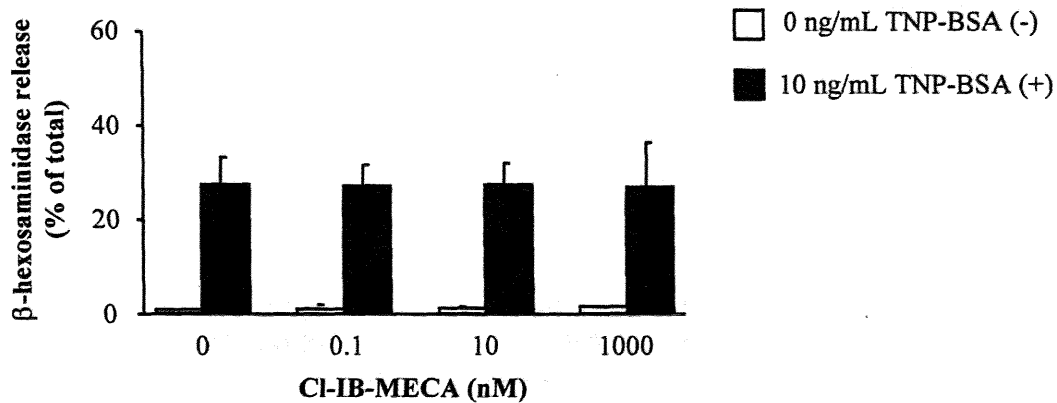
図1-15 A3ARアゴニスト添加によるBMMCの細胞内Ca²⁺濃度の上昇(Fura-2)

野生型マウス由来BMMC(AおよびB)もしくはヒトA3AR置換マウス由来BMMC(CおよびD)に、100 nMのCl-IB-MECAと10 ng/mLのTNP-BSA(AおよびC)、もしくはCl-IB-MECAの添加前にKF26777を添加した時(BおよびD)の細胞内Ca²⁺量の変化をFura-2を用いて検出した。Fura-2の蛍光強度は、リガンド非添加時の蛍光量を1とした相対値で示す。

A



B



C

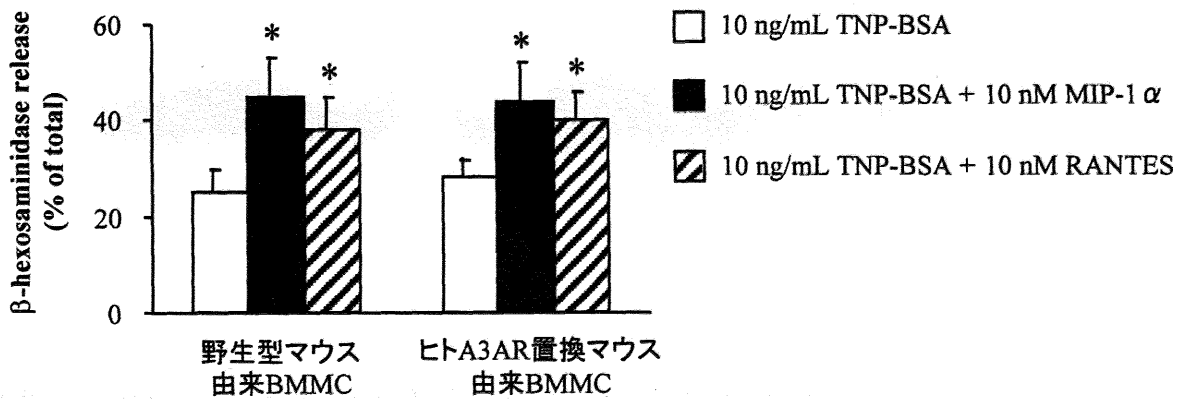


図1-16 リガンド添加によるIgEおよび抗原刺激BMMCでの脱顆粒の増強

(A、B) IgEで刺激した野生型マウス由来BMMC(A)およびヒトA3AR置換マウス由来BMMC(B)の抗原非添加時(□)もしくは抗原としてTNP-BSA添加時(■)における、CI-IB-MECA添加による脱顆粒量の増強を、 β ヘキソサミニダーゼ放出量として測定した。

(C) IgEで刺激した野生型マウスおよびヒトA3AR置換マウス由来BMMCに、抗原(TNP-BSA)と共にケモカインであるMIP-1 α (■)もしくはRANTES(▨)を添加した時の脱顆粒量を β ヘキソサミニダーゼ放出量として測定した。

β ヘキソサミニダーゼ放出量は、全 β ヘキソサミニダーゼ量を100%とした場合の%表記で示した。全ての値は3回の独立した実験群の平均値で示し、エラーバーはその平均値の標準誤差(SEM)を示す。
*, $P < 0.05$, CI-IB-MECA非添加時との比較(Student's t testによる)

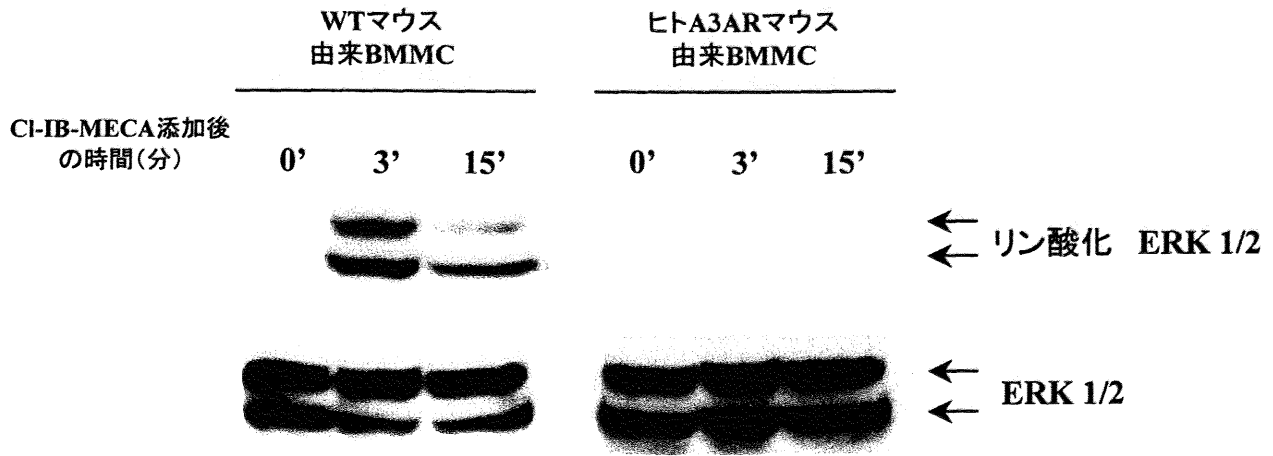
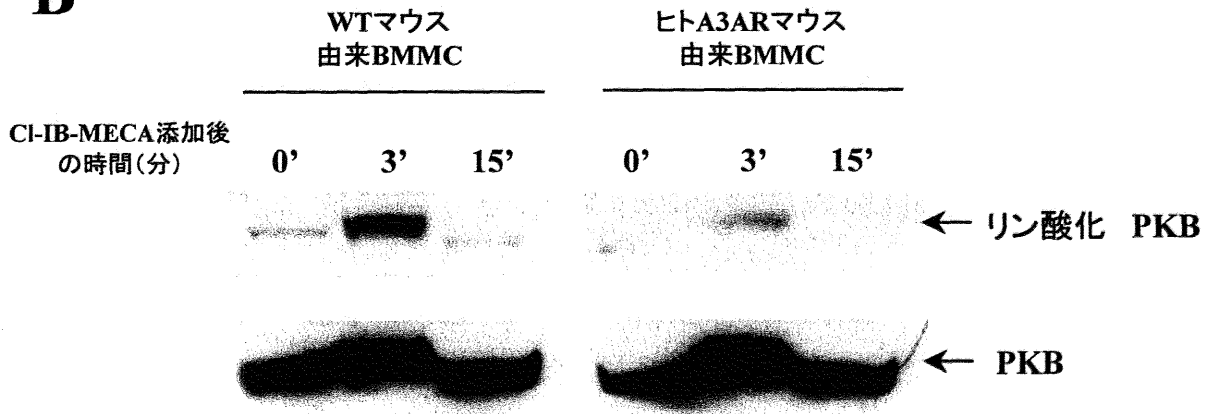
A**B**

図1-17 CI-IB-MECA添加によるERK1/2およびPKBのリン酸化

野生型マウスおよびヒトA3AR置換マウス由来BMMCに1 μ MのCI-IB-MECAを添加し、0、3、15分後におけるERK1/2(A)およびPKB(B)のリン酸化をウエスタンブロット法を用いて検出した。

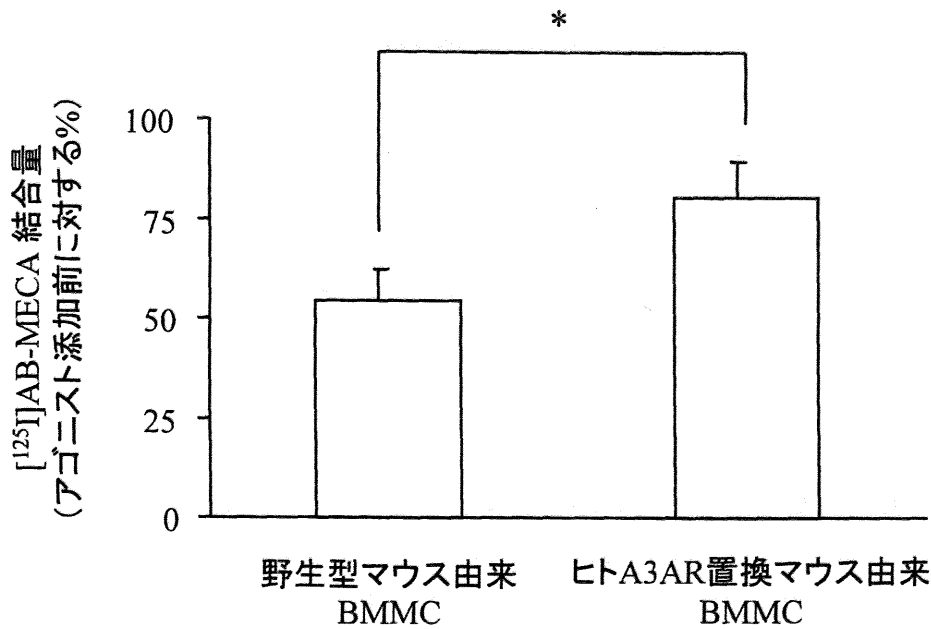


図1-18 BMMC細胞膜上からのA3ARの細胞内移行

野生型マウスおよびヒトA3AR置換マウス由来BMMCを1 μ MのCI-IB-MECAで15分間刺激した後、細胞膜上のA3AR量を[¹²⁵I]AB-MECAの結合量として測定した。データは、CI-IB-MECAを添加しない時の[¹²⁵I]AB-MECAの結合量を100%とした場合の%表記で示した。

全ての値は独立した3回の実験群の平均値を示し、エラーバーはその平均値の標準偏差(SEM)値を示す。*, $P < 0.05$, 野生型マウス由来BMMCとの比較(Student's *t* testによる)

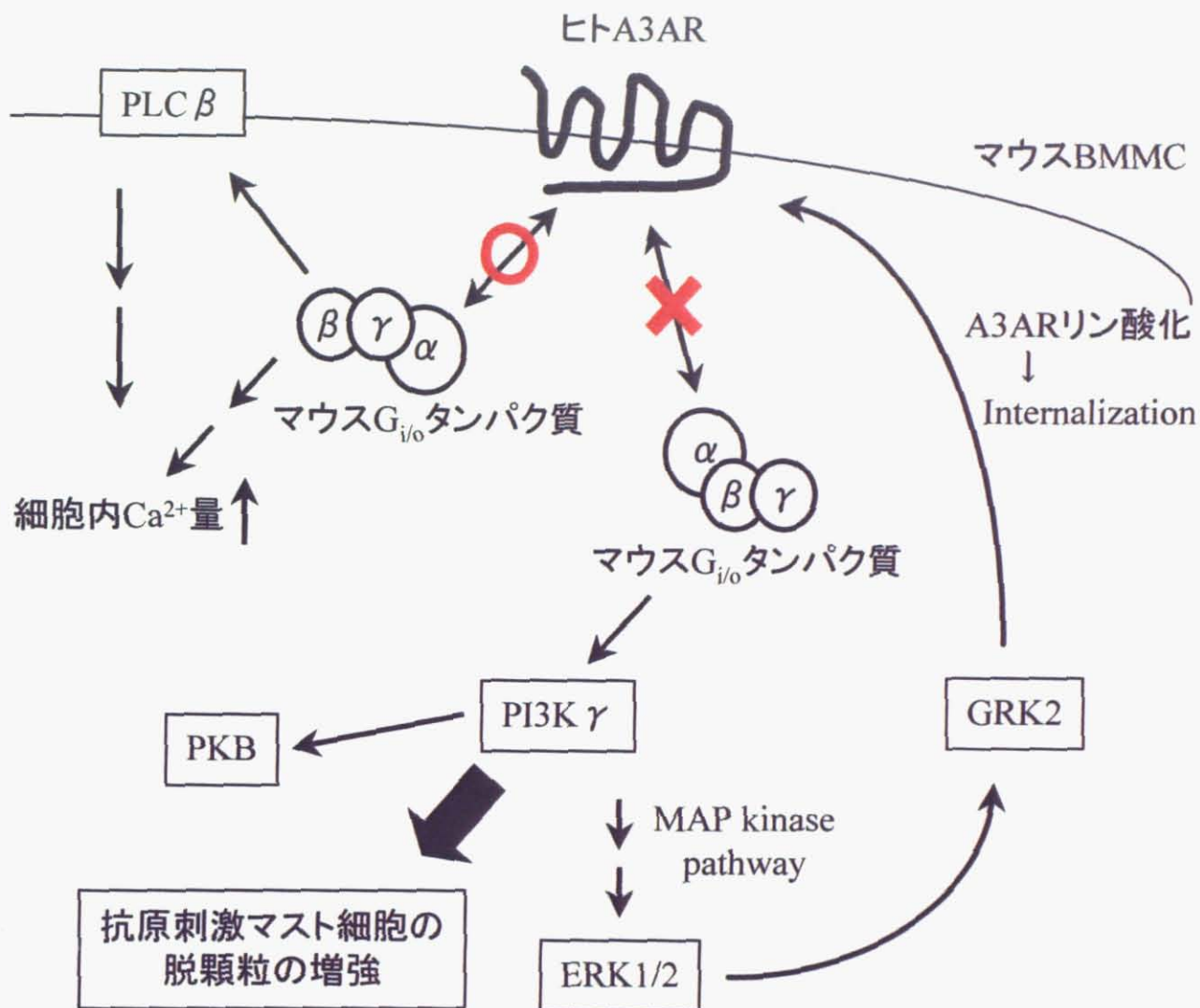


図1-19 マウスBMMCにおけるヒトA3ARの細胞内情報伝達経路の推定図

ヒトA3AR置換マウス由来BMMCにおける、ヒトA3ARを介した細胞内情報伝達経路の推定図を示す。細胞内Ca²⁺量の上昇に参与するマウスG_{i/o}タンパク質はヒトA3ARと正常にカップリング出来るが、PI3Kγの活性化に参与するマウスG_{i/o}タンパク質はヒトA3ARとカップリング出来ないと推定される。

第2章 キメラ A3AR 置換マウスの作製と評価

2-1. はじめに

第1章において我々は、ヒト A3AR アンタゴニストの評価が可能なモデル動物として、染色体上の A3AR 遺伝子をヒト A3AR 配列に置換した“ヒト A3AR 置換マウス”を作製した。しかしながら、ヒト A3AR はマウス体内において PI3K γ を介した細胞内情報伝達を伝えることが出来ず、その原因としてヒト A3AR は一部のマウス G タンパク質とカップリング出来ないことが推察された。そこで本章では、ヒト A3AR の細胞内領域をマウス A3AR 由来配列に置換したヒト/マウスのキメラ A3AR を設計し、染色体上の A3AR 遺伝子をキメラ A3AR 配列に置換した“キメラ A3AR 置換マウス”の作製および評価を行った。

2-2. 実験材料および方法

1) 主な試薬、材料

- 放射線標識 A3AR 特異的アゴニスト

[¹²⁵I] N⁶-(4-amino-3-iodobenzyl) adenosine-5'-N-methyluronamide ([¹²⁵I]AB-MECA)⁷⁾

アマシャムより購入した

- A3AR 特異的アゴニスト

(R)-N6-Phenylisopropyladenosine ((R)-PIA)⁷⁾

シグマより購入した

- A3AR 特異的アゴニスト

2-chloro-N⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyl-uronamide (Cl-IB-MECA)⁷⁾

協和発酵工業 (株) 医薬研究センターにて合成した

- ヒト A3AR 特異的アンタゴニスト

KF26777 (2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo [2,1-I] purin-5 (4H)-one dihydrochloride)^{7,34)}

協和発酵工業 (株) 医薬研究センターにて合成した

- 2,4,6-trinitrophenyl ウシ血清アルブミン (TNP-BSA)

コスモバイオより購入した

- 抗 TNP IgE 抗体

抗 TNP IgE 抗体を生産するマウス B リンパ球細胞株 (ATCC 番号: TIB-142) の無血清培養上清より、ゲルろ過カラムを用いて精製した

- プラスミド pBS-ex1 および pBS-ex2 (A3AR 遺伝子を含むマウスゲノム DNA)

第1章にて作製

- ヒト A3AR 置換マウス

第1章にて作製

2) 相同組換えベクターの構築

マウス A3AR 遺伝子をヒト/マウスのキメラ A3AR 配列に置換するための相同組換えベクターとして、以下に示す6つのユニットから成るキメラ A3AR 相同組換えベクターを設計した (図 2-1)

1. ネガティブセレクションマーカーとしての、ジフテリア毒素 A 断片 (DT-A) 発現ユニット (RNA polymerase II プロモーター下流に DT-A 遺伝子と SV40 由来ポリ A 付加配列を配置)
2. 約 6.0-kb の 5'側の相同組換え用アーム (Sma I からマウス A3AR 遺伝子のエクソン 1 内の ATG 翻訳開始コドンまでのマウスゲノム DNA 由来³⁵⁾)
3. 約 1.0-kb のキメラ A3AR cDNA 配列 (図 2-2)
4. 約 0.5-kb のマウスゲノム DNA 配列 (マウス A3AR 遺伝子のエクソン 2 内の TAG 翻訳停止コドンからポリ A 付加配列までを含む³⁵⁾)
5. 両端に loxP 配列が付加された、ポジティブセレクションマーカーとしてのヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子発現ユニット (ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター下流に HPRT 遺伝子を配置)
6. 約 2.8-kb の 3'側の相同組換え用アーム (マウス A3AR 遺伝子のエクソン 2 内の BamH I から Apa I までマウスゲノム DNA 由来³⁵⁾)

上記のキメラ A3AR 相同組換えベクターは、以下に示す方法 (全 24 工程) で構築した。全ての工程において、DNA 断片はアガロースゲル電気泳動によって分離した後、QIAquick Gel Extraction kit (キアゲン) を用いて精製した。各プラスミドは、形質転換した大腸菌 DH5 α より QIAprep Spin Miniprep Kit もしくは QIAfilter Midi Kit (キアゲン) を用いて精製することにより取得した。連結反応を行った制限酵素の認識配列周辺の塩基配列ならびに PCR 増幅断片の全塩基配列は、各工程において DNA シークエンサー ABI PRISM 377 および Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver.2 (アプライドバイオシステムズ) を使用して決定し、塩基配列の確認を行った。

工程 1: マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-Cgg AAT TCC CgT CCA TAA AAT gCA C-3'および 5'-CCA CTA gTT gTC ATg TgT gCC ATC TAC-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分、58°C で 30 秒、72°C で 1 分からなる反応を 1 サイクルとして計 8 サイクル行ったのち、94°C で 1 分、68°C で 2 分からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行う PCR 反応を行った後、増幅された約 0.11-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と Spe I で切断し、EcoR I と Spe I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) (ストラタジーン) に Ligation High (東洋紡) を用いて導入し、プラスミド chimera-1 を作製した (図 2-3)。

工程 2: プラスミド TA-hA3R (第 1 章 1-2 参照) を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-gCT CTA gAg ggA TgA AAA TCC Agg Tg-3'および 5'-AAG gAT CCA AAg ATC Tgg CTg gCC CTg gg-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分、58°C で 30 秒、72°C で 1 分からなる反応を 1 サイクルとして計 8 サイクル行ったのち、94°C で 1 分、68°C で 2 分からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行う PCR 反応を行った後、増幅された約 0.2-kb の DNA 増幅断片を Xba I と BamH I で切断し、Xba I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-2 を作製した (図 2-3)。

工程 3: プラスミド TA-hA3R を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-TTg

gAT CCT TCT TTg AgT ggT gAC CgT TCT gTA TC-3'および 5'-ggA CTA gTC CgT ACg ACC ACC TTC TAT TTC ATT g-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分、58°C で 30 秒、72°C で 1 分からなる反応を 1 サイクルとして計 8 サイクル行ったのち、94°C で 1 分、68°C で 2 分からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行う PCR 反応を行った後、増幅された約 0.25-kb の DNA 増幅断片を Spe I と BamH I で切断し、Spe I と BamH I で切断したプラスミド TA-hA3R に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-3 を作製した (図 2-3)。

工程 4: プラスミド TA-hA3R を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-gCT CTA gAA CCA Tgg AAA TTT TCA TTg g-3'および 5'-AAg AAT TCT CgT ACg CAg AgT ggg gTT CAg CTT g-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分、58°C で 30 秒、72°C で 1 分からなる反応を 1 サイクルとして計 8 サイクル行ったのち、94°C で 1 分、68°C で 2 分からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行う PCR 反応を行った後、増幅された約 0.1-kb の DNA 増幅断片を Xba I と EcoR I で切断し、Xba I と EcoR I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-4 を作製した (図 2-3)。

工程 5: プラスミド chimera-1 を EcoR I と Spe I で切断して得られる約 0.11-kb の DNA 断片とプラスミド chimera-2 を BamH I と Xba I で切断して得られる約 0.2-kb の DNA 断片を、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-1+2 を作製した (図 2-4)。

工程 6: プラスミド chimera-3 を Spl I と EcoR I で切断して得られる約 0.25-kb の DNA 断片を、Spl I と EcoR I で切断したプラスミド chimera-4 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-3+4 を作製した (図 2-4)。

工程 7: プラスミド chimera-1+2 を BglII と EcoR I で切断して得られる約 0.3-kb の DNA 断片を、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド chimera-3+4 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-1+2+3+4 を作製した (図 2-4)。

工程 8: マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-Cgg gAT CCA Tgg AgC TCg AAA gTT CTC-3'および 5'-Cgg gAA TTC ggC ATg CTg TCT CAg AAA Ag-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて PCR 反応を行った後、増幅された約 0.35-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N1 を作製した (図 2-4)。

工程 9: マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-Cgg gAT CCA gCA TgC CCA ACA ACA gCA C-3'および 5'-Cgg AAT TCC ATg ACC AgC ACC CCA AC-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて PCR 反応を行った後、増幅された約 0.2-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N2 を作製した (図 2-5)。

工程 10: プラスミド A3R-N2 を EcoR I と Sph I で切断して得られる約 0.2-kb の DNA 断片を、EcoR I と Sph I で切断したプラスミド A3R-N1 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N3 を作製した (図 2-5)。

工程 11 : プラスミド A3R-N3 を Sac I と Nco I で切断して得られる約 0.4-kb の DNA 断片を、Sac I と Nco I で切断したプラスミド chimera-1+2+3+4 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド cA3R-N を作製した (図 2-5)。

工程 12 : プラスミド pBS-ex1 (第 1 章 1 - 2 参照) を Sac I と Sma I で切断して得られる約 5.0-kb の DNA 断片を、Nde I と Sac I で切断したプラスミド A3R-N1 (Nde I で切断した末端は DNA Blunting Kit (タカラバイオ) を用いて平滑化しておく) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-N5 を作製した (図 2-5)。

工程 13 : プラスミド cA3R-N を Sac I と EcoR I で切断して得られる約 1.0-kb の DNA 断片を、Sac I と EcoR I で切断したプラスミド A3R-N5 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド arm1+cA3R-N を作製した (図 2-6)。

工程 14 : プラスミド TA-hA3R を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-gCg gAA TTC AAg ACg gCT AAg TCC-3' および 5'-TTg gAT CCA TAC gCg TAg ACg ATA ggg TTC-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分、58°C で 30 秒、72°C で 1 分からなる反応を 1 サイクルとして計 8 サイクル行ったのち、94°C で 1 分、68°C で 2 分からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行う PCR 反応を行った後、増幅された約 0.18-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-5 を作製した (図 2-6)。

工程 15 : マウスゲノム DNA を鋳型として、Pyrobest Polymerase およびプライマー (5'-CTg AAT TCT ACg CgT ATA AAA TAA AAA AgT TC-3' および 5'-Cgg gAT CCT TCg gAg CAg gTT CTg-3' (以上、プロリゴにて合成)) を用いて 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 1 分、58°C で 30 秒、72°C で 1 分からなる反応を 1 サイクルとして計 8 サイクル行ったのち、94°C で 1 分、68°C で 2 分からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行う PCR 反応を行った後、増幅された約 0.47-kb の DNA 増幅断片を EcoR I と BamH I で切断し、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-6 を作製した (図 2-6)。

工程 16 : プラスミド chimera-5 を Mlu I と EcoR I で切断して得られる約 0.18-kb の DNA 断片を、Mlu I と EcoR I で切断したプラスミド chimera-6 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド chimera-5+6 を作製した (図 2-6)。

工程 17 : プラスミド pBS-ex2 (第 1 章 1 - 2 参照) を Pst I と BamH I で切断して得られる約 1.8-kb の DNA 断片を、Pst I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-C1 を作製した (図 2-7)。

工程 18 : 合成オリゴ (センス鎖 : 5'-TTT CCg Cgg TTT ggT AC-3'、アンチセンス鎖 : 5'-CAA ACC gCg gAA A-3'、プロリゴにて合成) を 90°C で 10 分間加熱したのち室温でアニーリングさせ、Hinc II と Kpn I で切断したプラスミド A3R-C1 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド A3R-C2 を作製した (図 2-7)。

工程 19 : プラスミド A3R-C2 を Sac II と BamH I で切断して得られる約 0.15-kb の DNA 断片を、Sac II と BamH I で切断したプラスミド chimera-5+6 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド cA3R-C を作製した (図 2-7)。

工程 20 : プラスミド pBS-ex2 を BamH I と Apa I で切断して得られる約 2.8-kb の DNA 断

片を (Apa I で切断した末端は DNA Blunting Kit を用いて平滑化しておく)、Sma I と BamH I で切断した両端に loxP 配列が付加されたポジティブセレクションマーカーとしてのヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子発現ユニットを有するプラスミド pKO select HPRT ベクター (レキシコン) に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-HPRT-hA3R-arm2 を作製した (図 2-7)。

工程 21: 合成オリゴ (センス鎖: 5'-CTA gCT AgC TAC Cgg AAT TCC TCC CCg Cgg ggA ggT AC-3'、アンチセンス鎖: 5'-CTC CCC gCg ggg Agg AAT TCC ggT AgC TAg CTA g-3'、プロリゴにて合成) を 90°C で 10 分間加熱したのち室温でアニーリングさせ、Hpa I と Kpn I で切断したプラスミド ploxP-HPRT-hA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-RE-HPRT-hA3R-arm2 を作製した (図 2-8)。

工程 22: プラスミド cA3R-C を Sac II と EcoR I で切断して得られる約 0.8-kb の DNA 断片を、Sac II と EcoR I で切断したプラスミド ploxP-RE-HPRT-hA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-RE-C-HPRT-chiA3R-arm2 を作製した (図 2-8)。

工程 23: プラスミド arm1+cA3R-N を Spe I と EcoR I で切断して得られる約 7.0-kb の DNA 断片を、Nhe I と EcoR I で切断したプラスミド ploxP-RE-C-HPRT-chiA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、プラスミド ploxP-arm1-HPRT-chiA3R-arm2 を作製した (図 2-8)。

工程 24: プラスミド pKO Select DT (レキシコン) を Rsr II で切断して得られる約 1.3-kb の DNA 断片を、Rsr II で切断後ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ (タカラバイオ) で脱リン酸化したプラスミド ploxP-arm1-HPRT-chiA3R-arm2 に Ligation High を用いて導入し、キメラ A3AR 相同組換えベクターを作製した (図 2-8)。

3) キメラ A3AR 置換 ES 細胞株の樹立

第 1 章参照。ES 細胞へは、Sal I で切断することにより直鎖状としたキメラ A3AR 相同組換えベクターを 25 µg 導入した。

4) ゲノムサザンプロット解析

第 1 章参照。

5) キメラ A3AR 置換マウスの作製

第 1 章参照。

6) 骨髄細胞由来マスト細胞 (BMMC) の作製

第 1 章参照。

7) RT-PCR

第 1 章参照。キメラ A3AR 特異的増幅断片 (0.913-kb) を増幅させるプライマーとして、ヒト A3AR cDNA 配列よりプライマー-hA3AR-5' (5'-AAC AgC ACT gCT CTg TCA TTg gCC-3') および mA3AR-3' (5'-AAT CTg Agg TCT gAC AgA gCC TgA g-3') を用いた。

8) 細胞膜を用いた結合実験

第1章参照。

9) 細胞内 Ca^{2+} 量の測定方法

第1章参照。測定は Fluo-3 AM (モリキュラプローブ) を用いて行った。

10) ウェスタンブロット法によるリン酸化蛋白質の検出方法

第1章参照。

11) A3AR の細胞内移行の測定方法

第1章参照。

12) 脱顆粒活性の測定方法

第1章参照。最終濃度 10 nM のヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 は、最終濃度 10 nM の Cl-IB-MECA を添加する 1 分間前に加えた。

13) データ解析

第1章参照。

2-3. 結果

1) キメラ A3AR の設計

ヒト A3AR と同じ親和性でヒト A3AR 特異的アンタゴニストと結合し、且つマウス G タンパク質と正常にカップリングし A3AR からの細胞内シグナルを流すことの出来る A3AR として、細胞外領域および細胞膜領域がヒト A3AR 配列から成り、細胞内領域はマウス A3AR 配列から成るヒト/マウスのキメラ A3AR を設計した (図 2-2)。

2) キメラ A3AR 置換マウスの作製

1.0×10^7 個の 129 系マウス由来 ES 細胞株 AB2.2 にキメラ A3AR 相同組換えベクター 25 μ g をエレクトロポレーション法で導入後、アミノプテリン耐性 ES 細胞株よりゲノムサザンブロット解析を用いて相同組換え体の選択を行った。本サザンブロット解析では、野生型マウスのゲノム DNA を EcoRI で切断した場合、5'側プローブを用いることにより約 9.0-kb の DNA 断片が、3'側プローブを用いることにより約 6.5-kb の DNA 断片が検出される。一方、相同組換え体のゲノム DNA を EcoRI で切断した場合、5'側プローブを用いることにより約 8.2-kb の DNA 断片が、3'側プローブを用いることにより約 9.1-kb の DNA 断片が検出される (図 2-10)。288 クローンのアミノプテリン耐性 ES 細胞株を用いて上記のゲノムサザンブロット解析を行った結果、片方の染色体上のマウス A3AR 遺伝子がヒト A3AR 遺伝子に置換された組換え体が計 18 クローン同定された

続いて、Cre/loxP システムを用いて、相同組換え体の染色体上より HPRT 発現ユニットの除去を行った。16 クローンの相同組換え体より、コロニー形態と増殖能が良い 4 クローンを選択し、Cre 発現ベクターを一過性発現させた後、6-チオグアニン耐性株よりゲノムサザンブロット解析を用いて HPRT 発現ユニットが除去された株の選択を行った。本サザンブロット解析では、HPRT 発現ユニットの除去された相同組換え体のマウスゲノム DNA を EcoRI で切断した場合、3'側プローブによって約 5.3-kb の DNA 断片が検出される (図 2-11)。12 クローンの 6-チオグアニン耐性株を用いて上記のゲノムサザンブロット解析を行った結果、全てクローンにおいて HPRT 発現ユニットの除去が観察された (図 2-12)。

HPRT 発現ユニットが除去された相同組換え体より、コロニー形態と増殖能が良いクローンを選択し、C57BL/6J マウスの胚盤胞内へと導入した。ES 細胞を導入した胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮内に入れることにより、60~100%のキメラ率を有するオス個体が計 15 匹産仔され、うち 6 匹は ES 細胞由来の生殖系列細胞を有していた。この生殖系列キメラ体を C57BL/6J マウスと掛け合わせることによって片方のアレルがキメラ A3AR に置換されたヘテロ体を取得し、さらにヘテロ体同士を掛け合わせることによって両方のアレルがキメラ A3AR に置換されたホモ体を取得した。ヘテロ体およびホモ体の出現率はメンデルの法則に従っていた。これらヘテロ体およびホモ体の判別は、ゲノムサザンブロット解析にて行った (図 2-13)。

3) キメラ A3AR 置換マウスにおけるキメラ A3AR の発現

キメラ A3AR 置換マウスにおいてキメラ A3AR が正常に発現されているか調べるために、脳、肝臓、腎臓、精巣および BMCC における A3AR の mRNA 量を、RT-PCR 法を用いて

解析した。使用した BMMC は、pokeweed レクチン刺激脾臓細胞の培養上清（インターロイキン 3 などのマスト細胞分化誘導因子を含む³⁷⁾）を含んだ培地を用いて、骨髄細胞より分化誘導させて作製し、マスト細胞の分化マーカーである IgE 受容体および c-kit が発現していることを確認した（図 2-14）。RT-PCR 解析の結果、キメラ A3AR 置換マウスの各臓器および BMMC におけるキメラ A3AR の mRNA 発現パターンは、野生型マウスにおけるマウス A3AR の mRNA 発現パターンと同等であった（図 2-15）。また、キメラ A3AR 置換マウスでは、マウス A3AR の mRNA を検出することが出来なかった（図 2-15B）。

次に、BMMC 細胞膜上における A3AR の発現を、A3AR 特異的アゴニスト^{[125I]AB-MECA}を用いた結合実験より確認した。野生型マウスおよびキメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC の細胞膜上における A3AR の発現量 (B_{max} 値) は、それぞれ 194.9 ± 5.6 および 150.3 ± 12.1 fmol/mg であり、その発現量は同等であった（図 2-16A）。

4) キメラ A3AR はヒト A3AR と同じ親和性で A3AR 特異的リガンドと結合出来る

A3AR に対する^{[125I]AB-MECA}の親和性には種差が存在し、ヒト A3AR に対する K_d 値は 0.6 nM である一方、ラット A3AR に対する K_d 値は 1.5 nM であることが知られている³⁹⁾。我々は、野生型マウス由来 BMMC 上のマウス A3AR に対する^{[125I]AB-MECA}の K_d 値は 1.71 ± 0.09 nM であり（図 2-16A）、ラット A3AR に対する K_d 値や第 1 章で測定した同測定値と同等であることを確認した。また、ヒト A3AR 置換マウスにおけるヒト A3AR とは異なり（第 1 章参照）、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC 上のキメラ A3AR に対する^{[125I]AB-MECA}の K_d 値は 0.73 ± 0.14 nM であり（図 2-16A）、ヒト細胞上のヒト A3AR に対する K_d 値 (0.6 nM) と同等であることが確認された。

続いて、同様にヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 の親和性を測定した結果、キメラ A3AR 置換マウス BMMC 上のヒト A3AR に対する K_i 値は 0.15 ± 0.11 nM であり（図 2-16B）、ヒト細胞上およびヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC 上のヒト A3AR に対する KF26777 の K_i 値と同等であった（第 1 章参照）。また、マウス A3AR に対する KF26777 の K_i 値は 10,000 nM 以上であり（図 2-16B）、ラット A3AR に対する K_i 値 (10,000 nM 以上) と同等であることを確認した（第 1 章参照）。

5) KF26777 はキメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC の細胞内 Ca^{2+} 量上昇を抑制する

リガンドにより刺激された A3AR は、 $G_{i/o}$ タンパク質を介して細胞内 Ca^{2+} 量を上昇させる^{14,15)}。マウス体内においてキメラ A3AR が細胞内 Ca^{2+} 量上昇を誘導出来るか調べるために、A3AR アゴニスト Cl-IB-MECA の添加によるヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC での細胞内 Ca^{2+} 量の変動を蛍光 Ca^{2+} 量インディケーター Fluo-3 を用いて解析した。野生型マウスおよびキメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC では、100 nM の Cl-IB-MECA 添加によって細胞内 Ca^{2+} 量の上昇が観察された（図 2-17）。また、野生型マウス由来 BMMC では KF26777 を添加しても Cl-IB-MECA による細胞内 Ca^{2+} 量上昇は抑制されなかったが（図 2-17A）、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC では KF26777 の添加によって Cl-IB-MECA による細胞内 Ca^{2+} 量上昇が完全に抑制された（図 2-17B）。

6) マウス体内においてキメラ A3AR は PI3K γ を介したシグナル伝達を正常に誘導出来る

第1章において我々は、マウス体内においてヒト A3AR は PI3K γ を介した ERK1/2 や PKB のリン酸化および A3AR の細胞内移行を誘導することが出来ないことを示した。今回我々は、マウス体内においてキメラ A3AR がこの PI3K γ を介したシグナル伝達を誘導出来るか調べるために、CI-IB-MECA 添加によるキメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC での PKB および ERK1/2 のリン酸化をウェスタンブロット法を用いて解析した。その結果、野生型マウス由来 BMMC と同様に、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC においても CI-IB-MECA 添加 3 分後において PKB および ERK1/2 のリン酸化が検出された (図 2-18A)。

次に我々は、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC 細胞膜上のキメラ A3AR の細胞内移行率を調べるために、CI-IB-MECA 添加 15 分後における BMMC 細胞膜上の A3AR 量を [¹²⁵I]AB-MECA 結合量として測定した。その結果、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC 細胞膜上のキメラ A3AR の細胞内移行率は、野生型マウス由来 BMMC 細胞膜上のマウス A3AR と同等であることが確認された (図 2-18B)。

7) キメラ A3AR はマスト細胞の脱顆粒を増強し、その増強はヒト A3AR 特異的アンタゴニストにより完全に抑制される

マウス体内において、キメラ A3AR が IgE 抗体および抗原で刺激されたマスト細胞の脱顆粒増強を誘導出来るか調べるために、CI-IB-MECA 添加によるヒト A3AR 置換マウス由来 BMMC での脱顆粒を β ヘキソサミニダーゼ (脱顆粒時にマスト細胞より放出される脱顆粒マーカー⁴⁰⁾) の放出量として測定した。第1章で示した通り、ヒト A3AR 由来 BMMC では CI-IB-MECA を添加しても β ヘキソサミニダーゼの放出量に変化はみられなかった (図 2-19B)。一方、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC では、野生型マウス由来 BMMC と同等の CI-IB-MECA 添加による濃度依存的な β ヘキソサミニダーゼ放出量の増強が観察された (図 2-19A および C)。

次に我々は、キメラ A3AR によって増強されるマスト細胞の脱顆粒がヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 によって抑制されるか調査した。野生型マウス由来 BMMC では KF26777 を添加しても CI-IB-MECA による脱顆粒の増強は抑制されなかったが (図 2-20A)、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC では KF26777 添加により CI-IB-MECA による脱顆粒の増強が完全に抑制された (図 2-20C)。

2-4. 考察

第1章では、ヒト A3AR 特異的アンタゴニストの薬理的評価が可能なモデル動物として、マウス A3AR 遺伝子をヒト A3AR の配列に置換した“ヒト A3AR 置換マウス”を作製した。しかしながら、マウス体内においてヒト A3AR はマスト細胞の脱顆粒増強を始めとする PI3K γ を介したシグナル伝達経路を活性化することが出来ず、その原因としてヒト A3AR は一部のマウス G タンパク質とカップリング出来ない可能性が推察された。そこで本研究は、ヒト A3AR の細胞内領域をマウス G タンパク質が正常にカップリング出来るようマウス A3AR 配列へと置換したヒト/マウスのキメラ A3AR を設計し、染色体上の A3AR 遺伝子をキメラ A3AR 配列に置換した“キメラ A3AR 置換マウス”を作製した。

他種の A3AR 配列を組み合わせたキメラ A3AR について、今まで報告された例はない。しかしながら、A3AR アゴニストおよびアンタゴニストとの結合には、A3AR の細胞外領域および細胞膜領域が重要であることが知られている⁴⁹⁻⁵²。また、よく知られている GPCR の一つであるロドプシン受容体の解析より、G タンパク質のカップリングには GPCR の全ての細胞内領域が関与していることが報告されている⁵³。そこで本研究では、細胞外領域および細胞膜領域はヒト A3AR と同じ親和性でヒト A3AR 特異的アンタゴニストと結合出来るようにヒト A3AR 配列から構成し、細胞内領域はマウス G タンパク質とカップリングし A3AR からの細胞内シグナル伝達を正常に伝えることが出来るようにマウス A3AR 配列から構成した、ヒト/マウスのキメラ A3AR を設計した (図 2-2)。

キメラ A3AR 置換マウスにおけるキメラ A3AR の発現パターンおよび発現量は、野生型マウスにおけるマウス A3AR と同等であった (図 2-15 および 2-16A)。また、キメラ A3AR 置換マウスにおいて、キメラ A3AR はヒト細胞株上のヒト A3AR³⁴⁾と同じ親和性で A3AR アゴニスト CI-IB-MECA と結合することが出来た (図 2-16A)。さらに、キメラ A3AR 置換マウス由来 BMMC を CI-IB-MECA で刺激することにより、1) 細胞内 Ca²⁺量の上昇 (図 2-17)、2) PKB および ERK1/2 のリン酸化 (図 2-18A)、3) A3AR の細胞内移行 (図 2-18B)、4) IgE および抗原で刺激された脱顆粒の増強 (図 2-19) の全てにおいて、野生型マウス由来 BMMC と同等の活性が観察された。以上の結果より、マウス体内においてキメラ A3AR は PI3K γ の活性化に関与するマウス G タンパク質とも正常にカップリングし、その細胞内シグナル伝達を正常に伝えることが出来ることが示された。

ヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 に対し、キメラ A3AR はヒト A3AR³⁴⁾と同等の親和性を示した (図 2-16B)。また、KF26777 の添加により、キメラ A3AR による細胞内 Ca²⁺量上昇および BMMC の脱顆粒増強が完全に抑制された (図 2-17 および 2-20)。アデノシンによる A3AR を介したマスト細胞の脱顆粒の増強は、喘息や COPD をはじめ、様々なアレルギー疾患の増悪に関与することが知られている^{6,7,25,28-33}。げっ歯類の A3AR に対する効果的なアンタゴニストが未だ見出されていない現在、本研究で作製したキメラ A3AR 置換マウスはこれらの疾患に対するヒト A3AR 特異的アンタゴニストの効果を評価することが出来る唯一の“A3AR ヒト化マウス”として非常に強力なツールとなる。また、上記の疾患以外にも、脳や心筋の虚血症、神経疾患、ガン、好酸球や好中球によるアレルギー疾患などの様々な疾患に対するヒト A3AR アンタゴニストの薬理的評価を行う上でも本マウスは広く有用であると考えられる。さらに、未だ不明な点の多い A3AR の生理学的機能を A3AR アン

タゴニストを用いて解析することが出来るモデルマウスとしても、本マウスは期待される。

本研究において我々は、ヒトとマウス間における A3AR と G タンパク質のカップリングにおける種差の存在を初めて直接的に示した。今回我々はキメラ A3AR を設計するにあたり、細胞内領域全ての配列をマウス型へと置換した。しかしながら、各細胞内領域の第 1、第 2、第 3 の細胞内ループおよび C 末端の細胞内テール構造のマウスとヒト間のアミノ酸の相同性はそれぞれ 80、85、84、62% であり、C 末端細胞内テール構造が特に相同性が低い。これら各細胞内領域を様々な組み合わせで置換したキメラ A3AR を作製して解析を行うことにより、A3AR と G タンパク質のカップリング機構に関する新たな知見が得られることが期待される。

本章で作製したキメラ A3AR 置換マウスは、世界で初めて GPCR のヒト化に成功した“GPCR ヒト化マウス”である。また、A3AR 以外の多くの GPCR おいても、ヒトとヒト以外の種の間でリガンドの親和性の違いが観察されている⁵⁾。特に、5-hydroxytryptamine 1B 受容体⁵⁴⁾や neurokinin-1 受容体^{55,56)}、 α 2-adrenergic 受容体⁵⁷⁾、neurotensin 受容体⁵⁸⁾では、ヒトとげっ歯類の間において、そのアゴニストもしくはアンタゴニストの親和性に大きな種差がみられる。A3AR 以外の GPCR におけるヒト化モデル動物を作製する上で、本研究で成功したキメラ化の技術は非常に有効であると考えられる。

野生型マウスゲノム構造

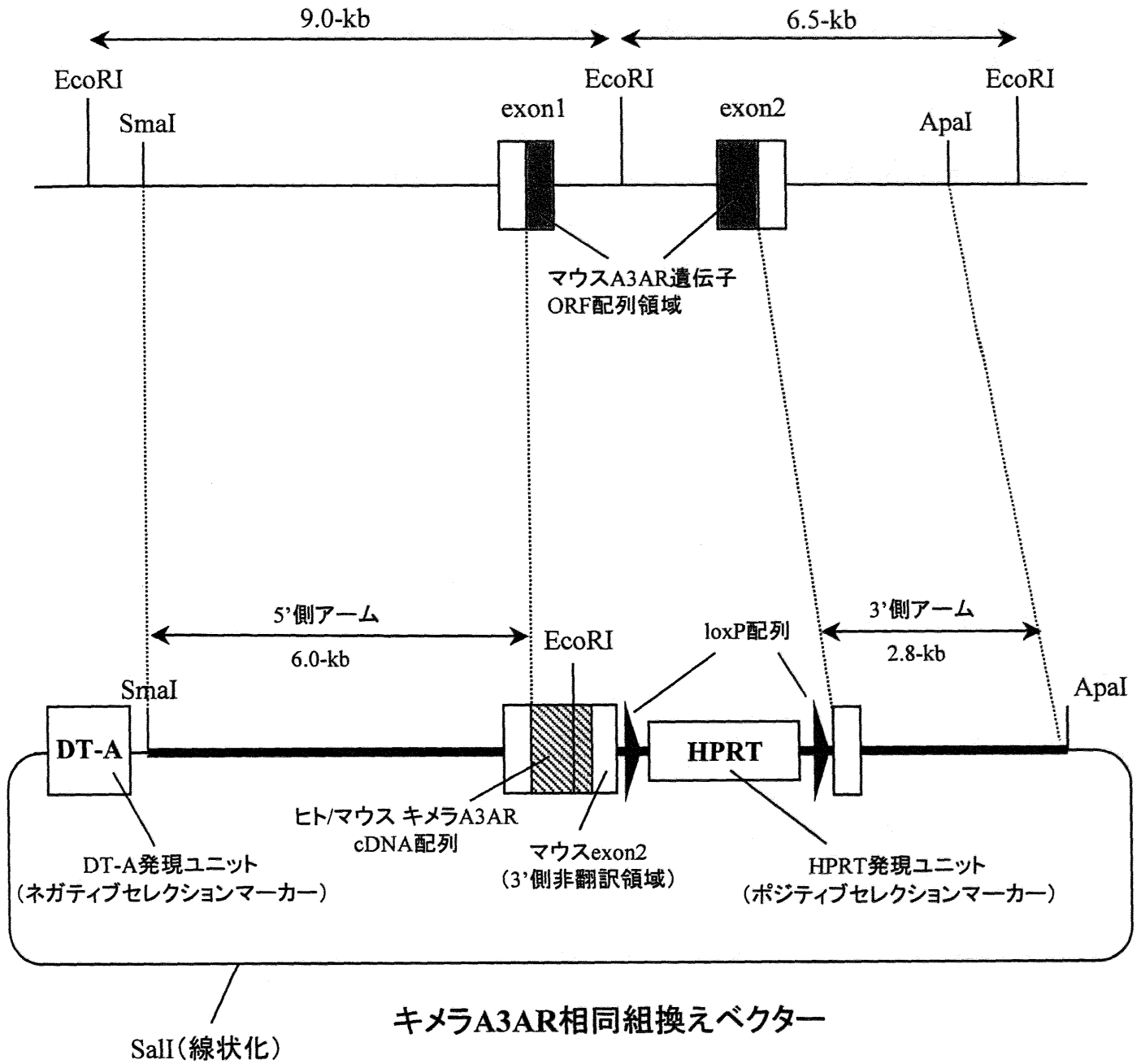
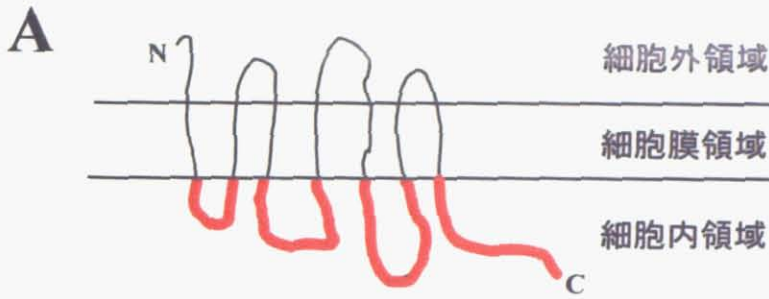


図2-1 キメラA3AR相同組換えベクターの設計

キメラA3AR相同組換えベクターの構造を示す



B

```

10      20      30      40      50      60      70      80
atgcccaacaacagcactgctctgtcattggccaatgttacctacatcaccatggaaatcttcattggactctgcgccat
M P N N S T A L S L A N V T Y I T M E I F I G L C A I

90      100     110     120     130     140     150     160
agtgggcaacgtgctggtcattctgcgtggtc aaactgaaccccaactctgcgtacgaccaccttctatttcattgtctctc
V G N V L V I C V V K L N P T L R T T T F Y F I V S L

170     180     190     200     210     220     230     240
tagccctggctgacattgctggttgggtgctggtcatgaccttggccattgtgtgcagcctggcatcacaatccacttc
A L A D I A V G V L V M P L A I V V S L G I T I H F

250     260     270     280     290     300     310     320
tacagctgcctttttatgacttgectactgcttatctttaccacgcctccatcatgctccttgctggccatcgctgtgga
Y S C L F M T C L L L I F T H A S I M S L L A I A V D

330     340     350     360     370     380     390     400
ccgatacttgagggtcaagcttacggctcagatacagaacgggtcaccactcaacgaaggatctggctggccctgggccttt
R Y L R V K L T V R Y R T V T T Q R R I W L A L G L C

410     420     430     440     450     460     470     480
gctggctggtgtcattcctggtgggattgacccccatgtttggctggaacatgaaactgacctcagagtaccacagaaat
W L V S F L V G L T P M F G W N M K L T S E Y H R N

490     500     510     520     530     540     550     560
gtcaccttcctttcatgccaatttgtttccgctcatgagaatggactacatgggtatacttcagcttcctcacctggatttt
V T F L S C Q F V S V M R M D Y M V Y F S F L T W I F

570     580     590     600     610     620     630     640
catccctctagttgtcatgtgtgccatctaccta gacatcttctacatcatccgaaataagctcagtcaaaaactgtctg
I P L V V M C A I Y L D I F Y I I R N K L S Q N L S G

650     660     670     680     690     700     710     720
gcttcagagagacgctgctcattttatggacgggaattcaagacggctaagctcctggttctggttctttctgtttgct
F R E T R A F Y G R E F K T A K S L F L V L F L F A

730     740     750     760     770     780     790     800
ctgtcatggctgcctttatctatcatcaactgcatcatctactttaatggtgaggtaccacagcttgtgctgtacatggg
L S W L P L S I I N C I I Y F N G E V P Q L V L Y M G

810     820     830     840     850     860     870     880
catcctgctgtcccatgccaaactccatgatgaacctatcgtctacgctat aaaataaaaaagttcaagagacactact
I L L S H A N S M M N P I V Y A Y K I K K F K E T Y F

890     900     910     920     930     940     950     957
ttctgatcctcagagctctcaggctctgtcagacctcagattctttggactcaaacatggaacagactactgagtaa
L I L R A L R L C Q T S D S L D S N M E Q T T E stop

```

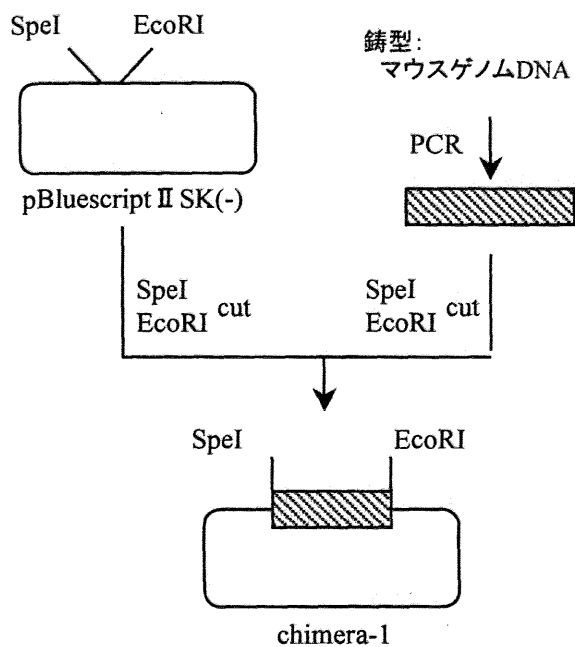
図2-2 ヒト/マウス キメラA3ARの構造

(A) A3ARの構造を模式図で示す。

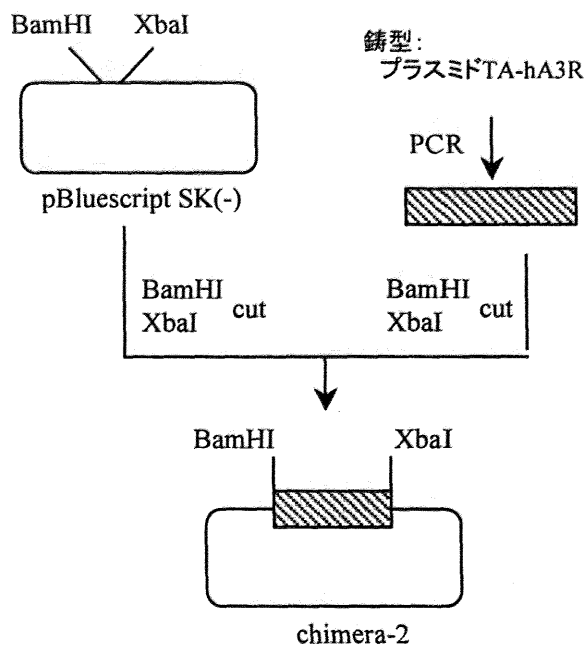
(B) ヒトとマウスのキメラA3ARのcDNA配列および推定されるアミノ酸配列を示す。

赤色で示す細胞内領域の配列はマウスA3AR配列より構成し、細胞外および細胞膜領域の配列はヒトA3AR配列より構成する。

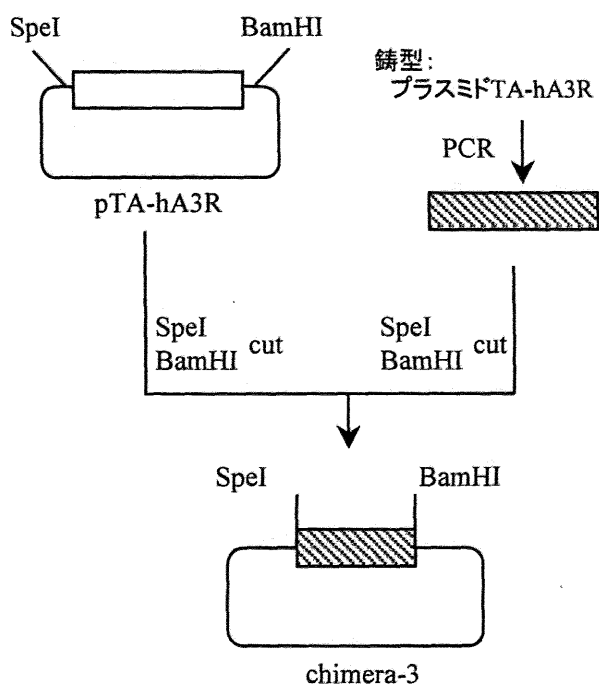
工程1



工程2



工程3



工程4

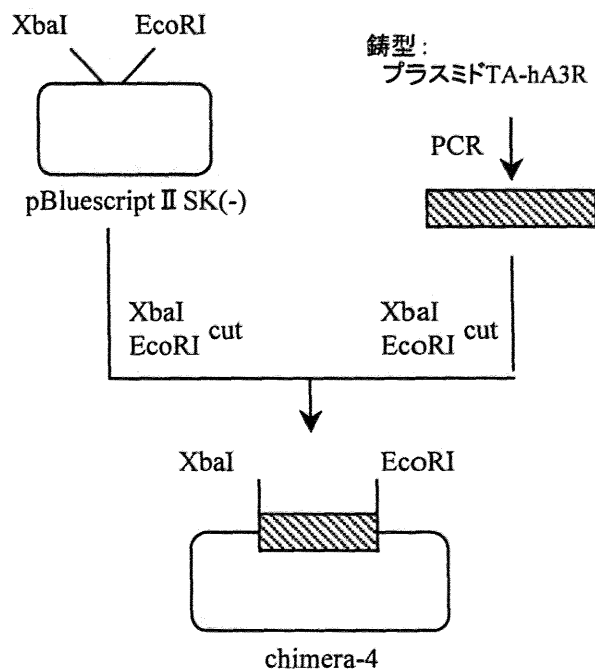
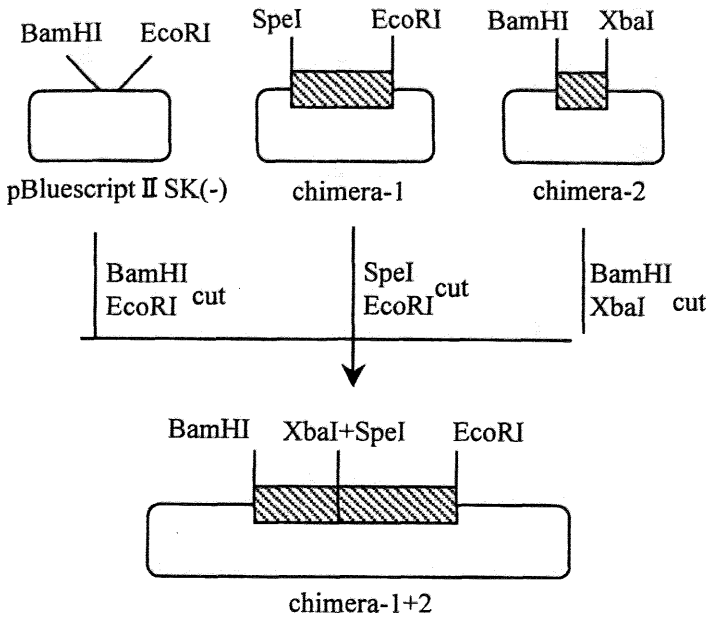


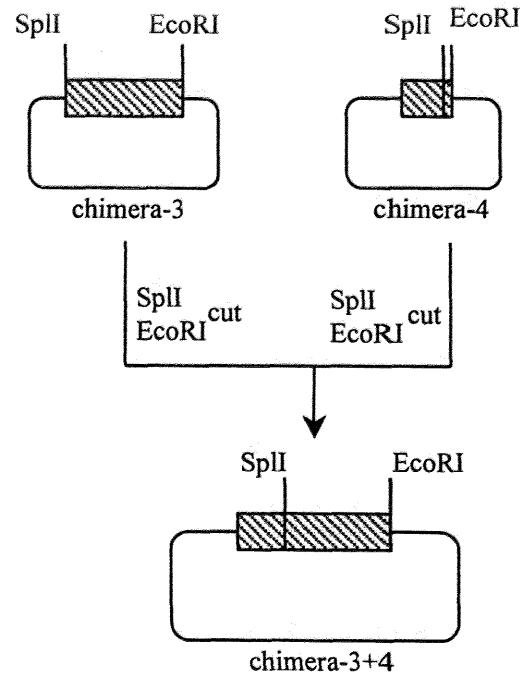
図2-3 キメラA3AR相同組換えベクターの構築①

キメラA3AR相同組換えベクター構築のための工程1~4を示す

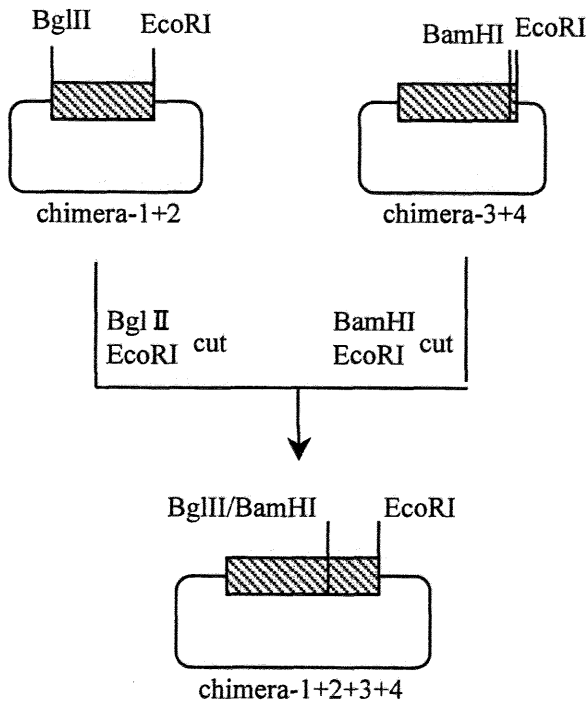
工程5



工程6



工程7



工程8

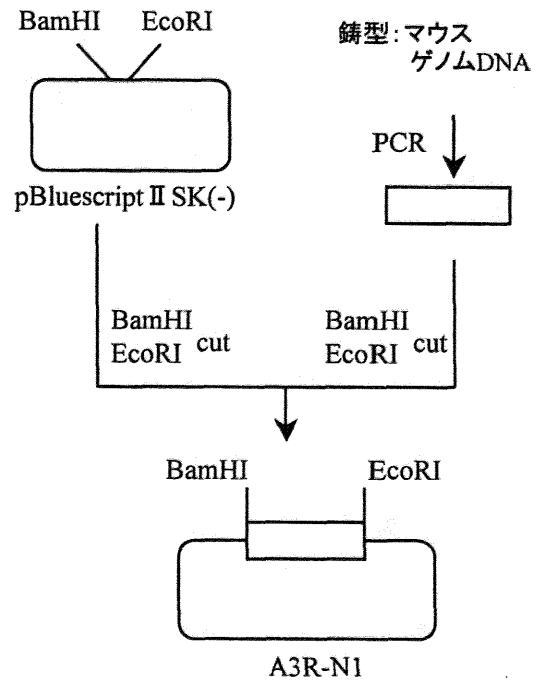
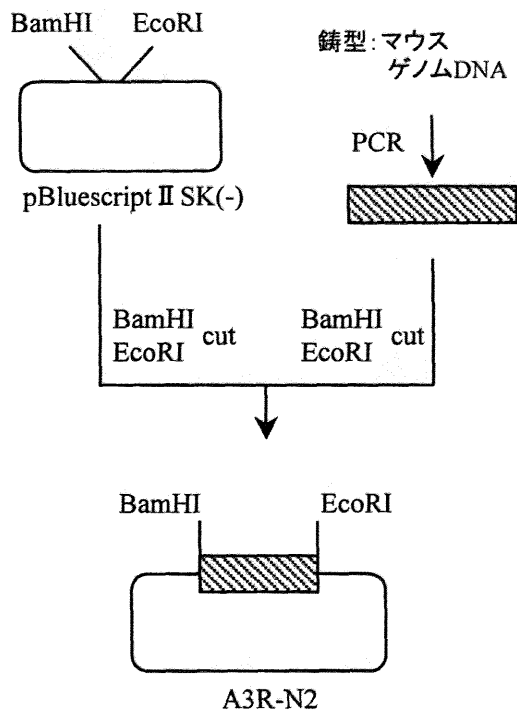


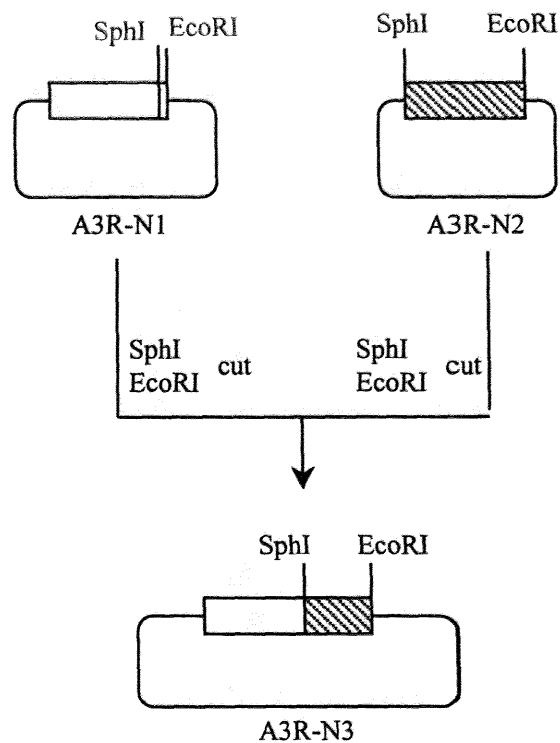
図2-4 キメラA3AR相同組換えベクターの構築②

キメラA3AR相同組換えベクター構築のための工程5~8を示す

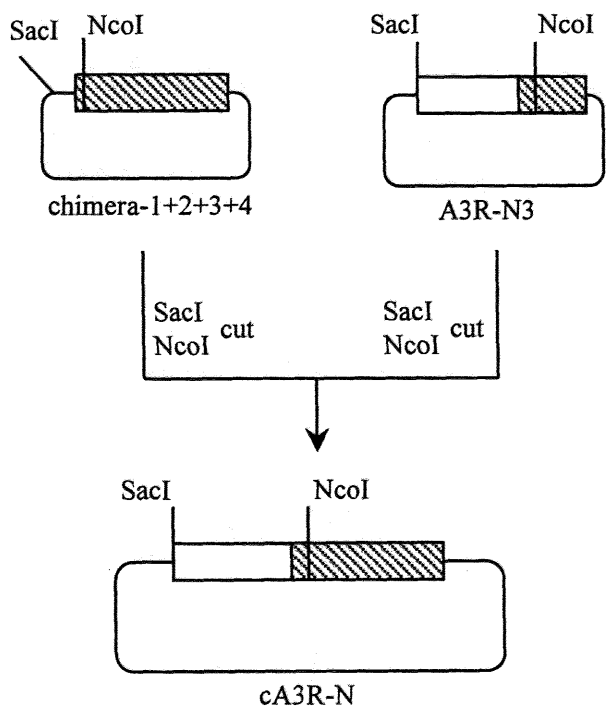
工程9



工程10



工程11



工程12

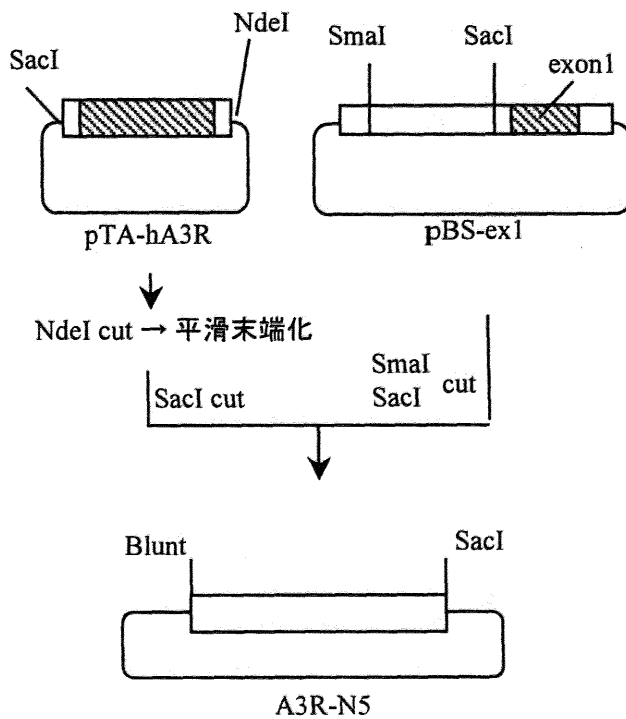
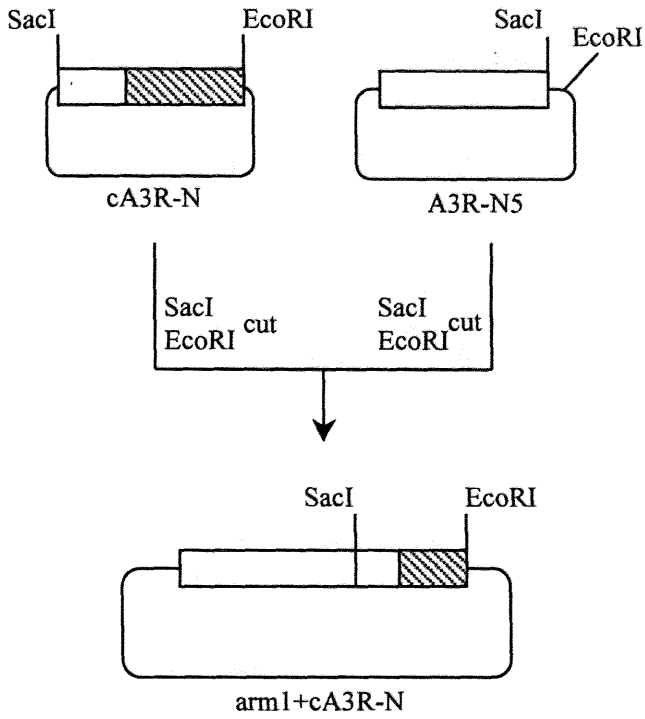


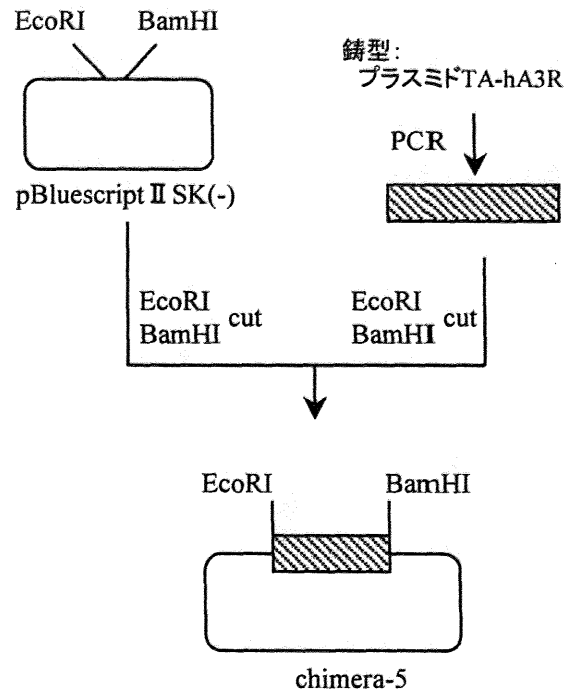
図2-5 キメラA3AR相同組換えベクターの構築③

キメラA3AR相同組換えベクター構築のための工程9~12を示す

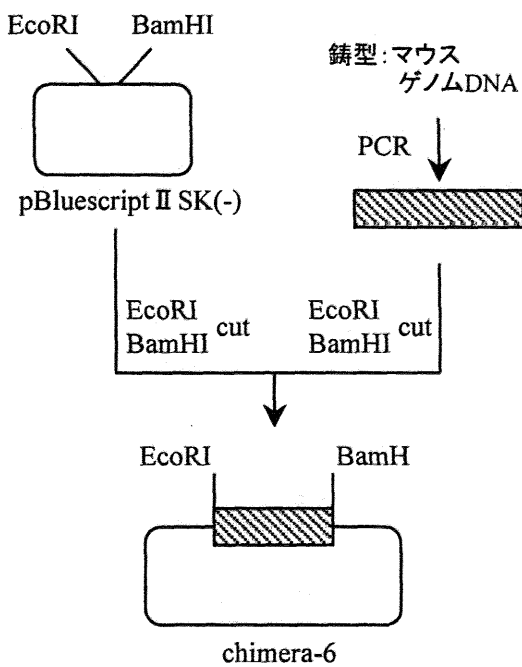
工程13



工程14



工程15



工程16

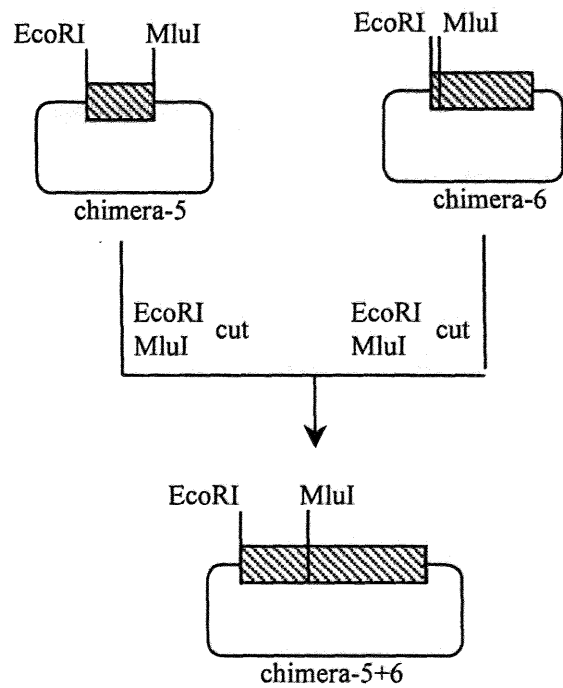
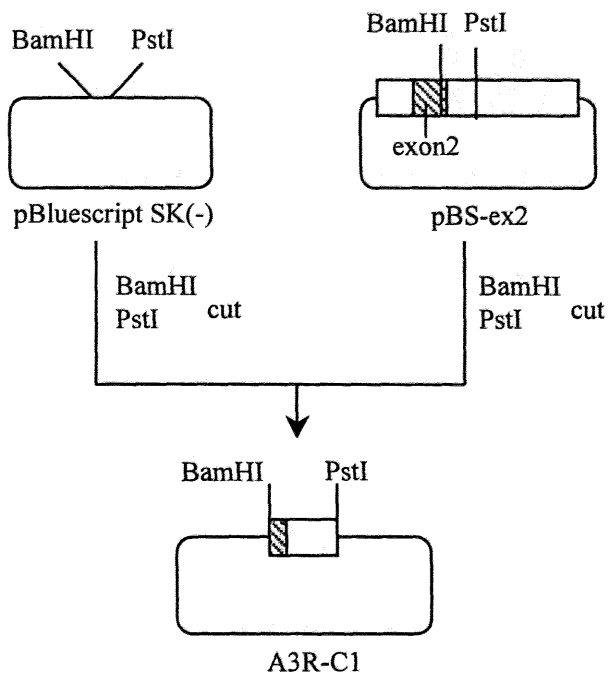


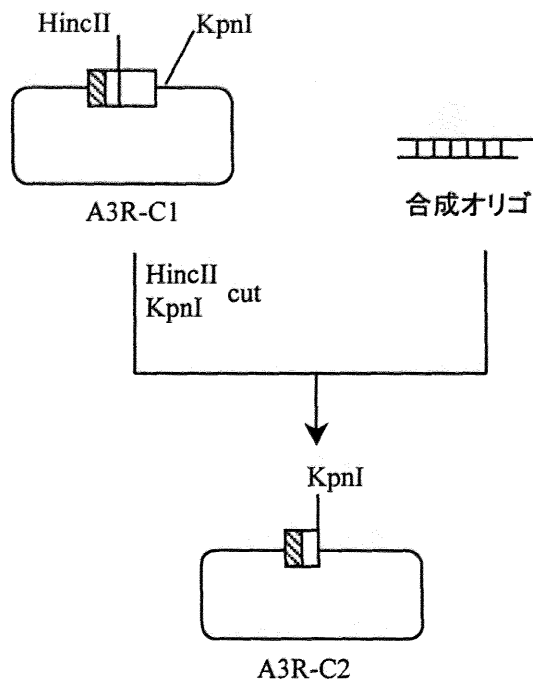
図2-6 キメラA3AR相同組換えベクターの構築④

キメラA3AR相同組換えベクター構築のための工程13~16を示す

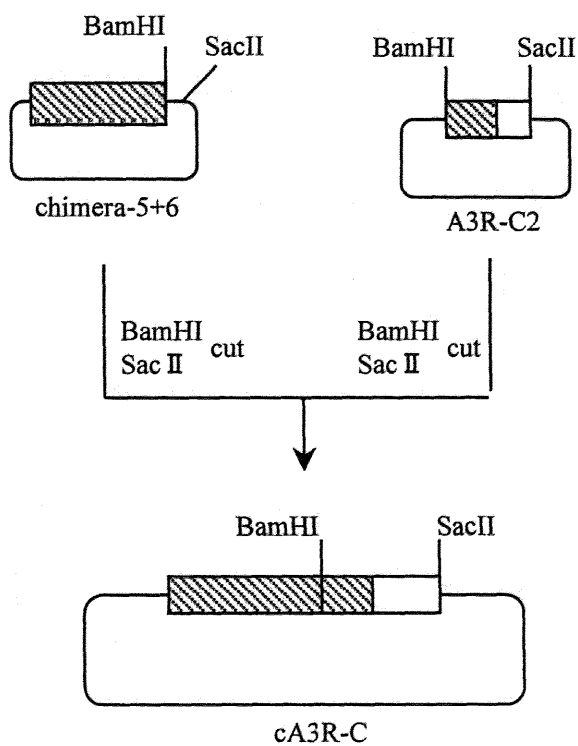
工程17



工程18



工程19



工程20

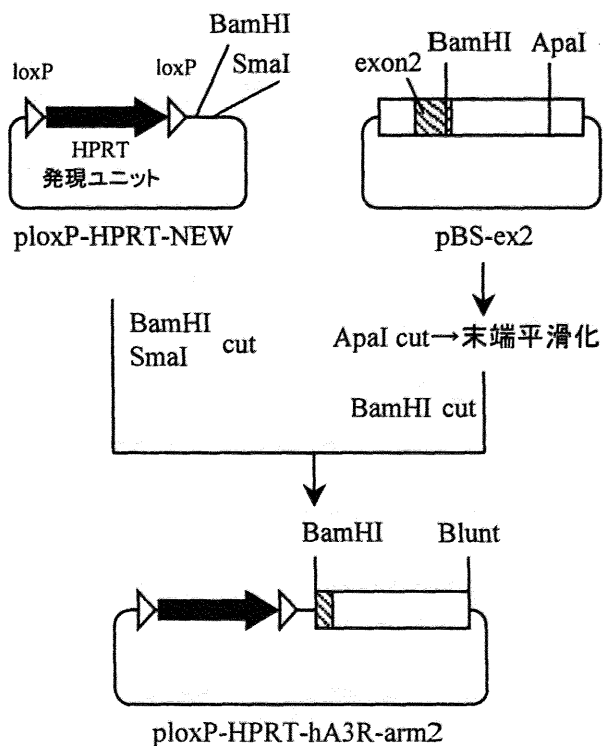
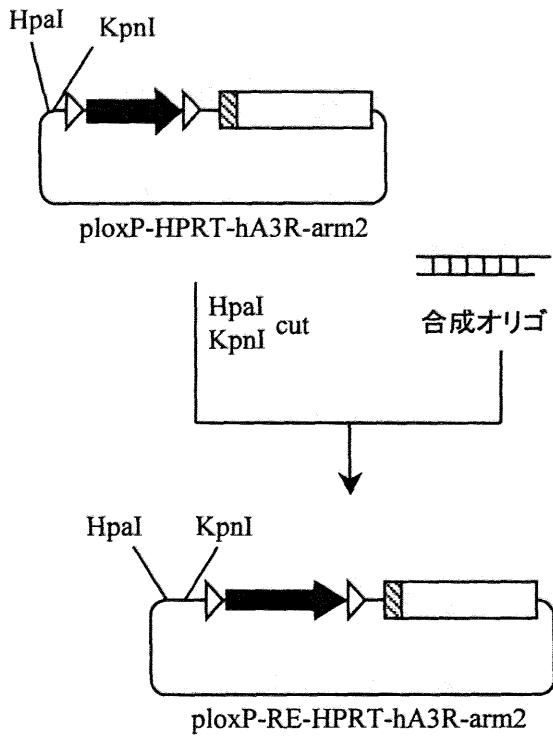


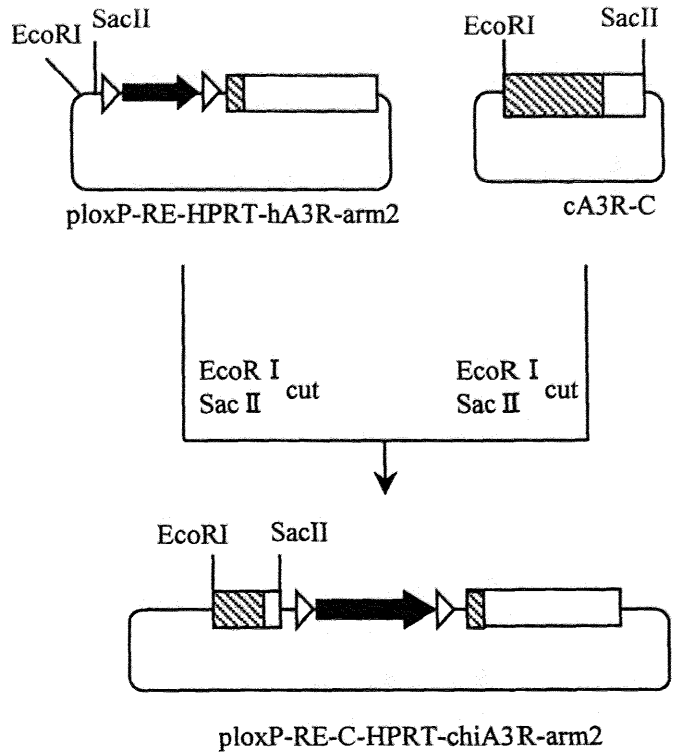
図2-7 キメラA3AR相同組換えベクターの構築⑤

キメラA3AR相同組換えベクター構築のための工程17~20を示す

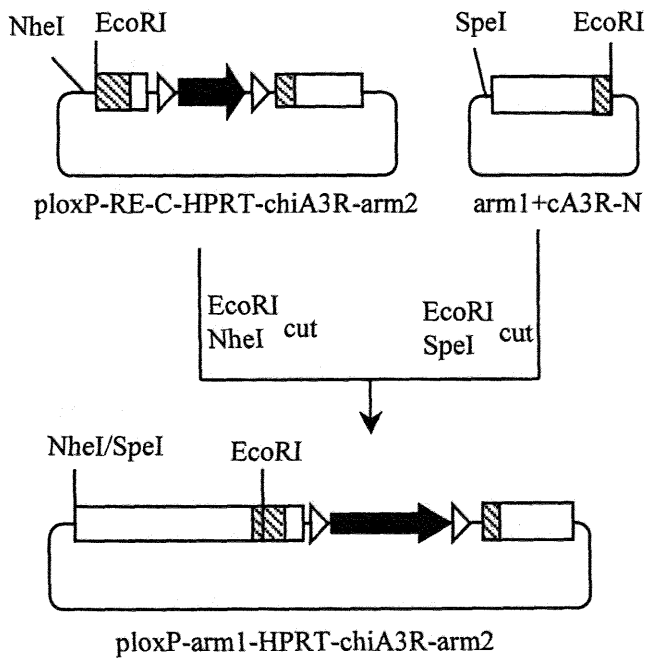
工程21



工程22



工程23



工程24

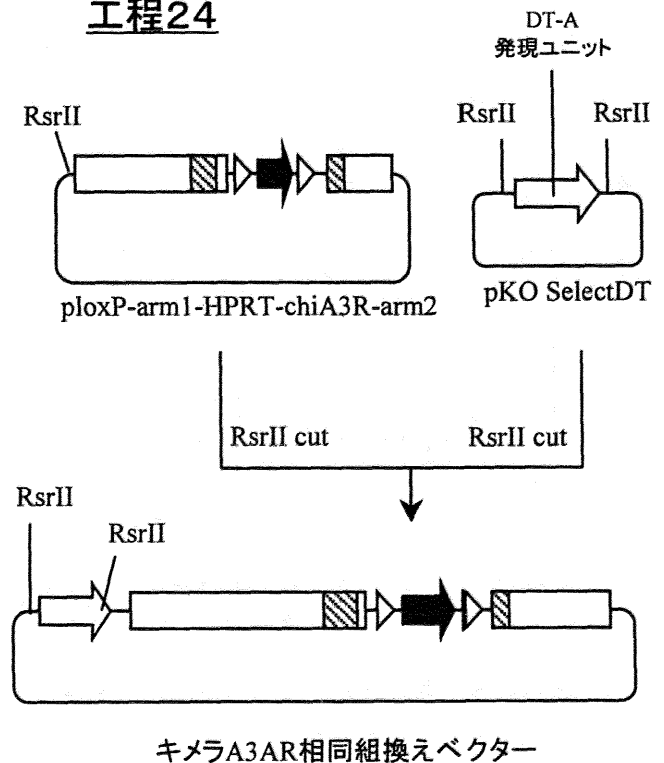


図2-8 キメラA3AR相同組換えベクターの構築⑥

キメラA3AR相同組換えベクター構築のための工程21~24を示す

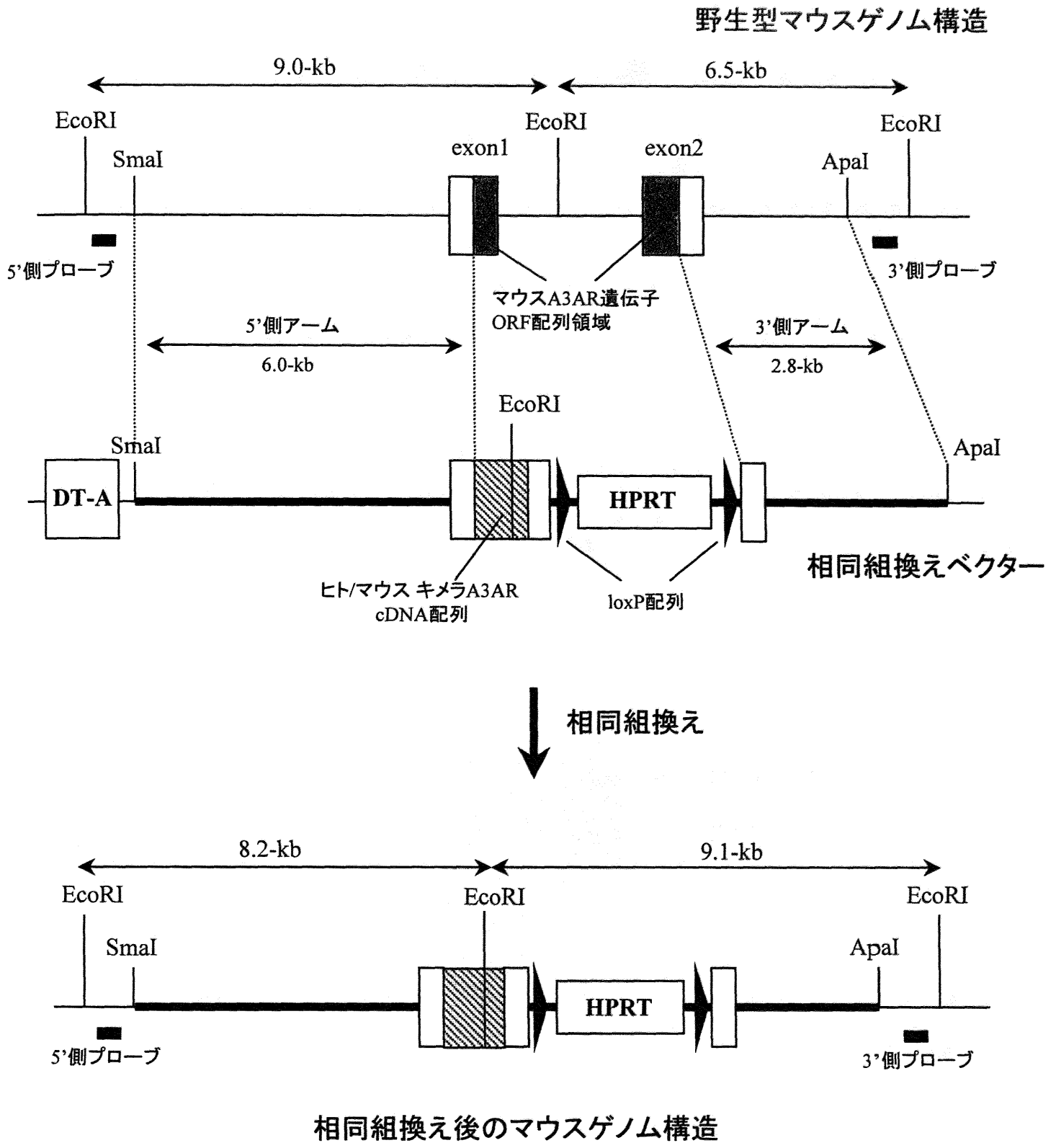
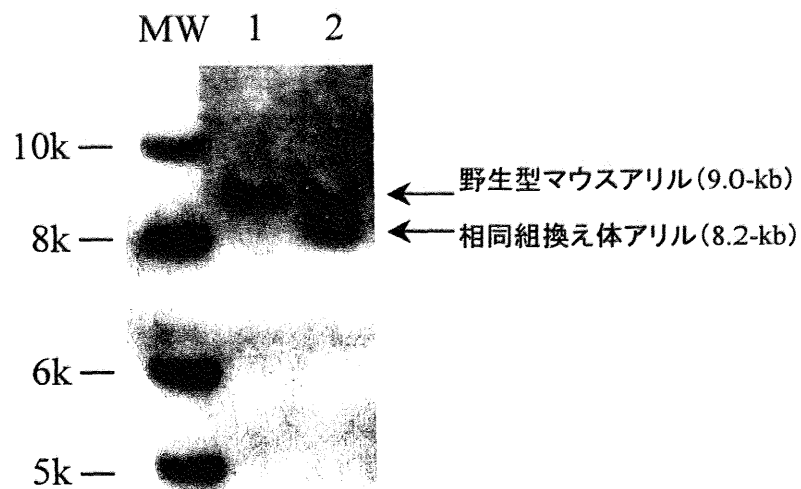


図2-9 キメラA3AR相同組換えベクターを用いたA3AR遺伝子の置換方法

相同組換え法による、マウスA3AR遺伝子のORF領域をキメラA3AR配列へと置換する方法およびその置換に伴うマウスゲノム構造の変化を模式図で示す。

A 5'側プローブを用いたサザンブロット解析



B 3'側プローブを用いたサザンブロット解析

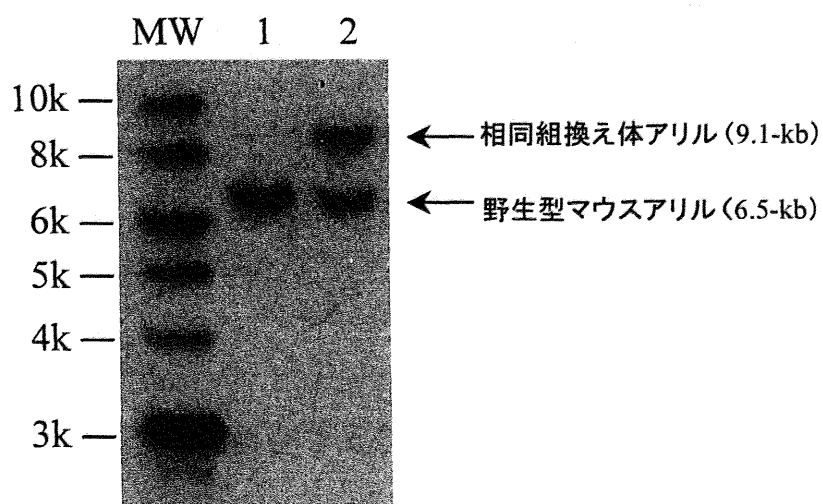


図2-10 マウスES細胞における相同組換え体の同定

マウスES細胞のゲノムDNAをEcoRIで切断したのち、5'側プローブ(A)もしくは3'側プローブ(B)を用いてサザンブロット解析を行った。レーン1にはAB2.2細胞由来ゲノムDNAを、レーン2には相同組換え体由来ゲノムDNAを泳動した。MWのレーンには分子量マーカーを泳動した。

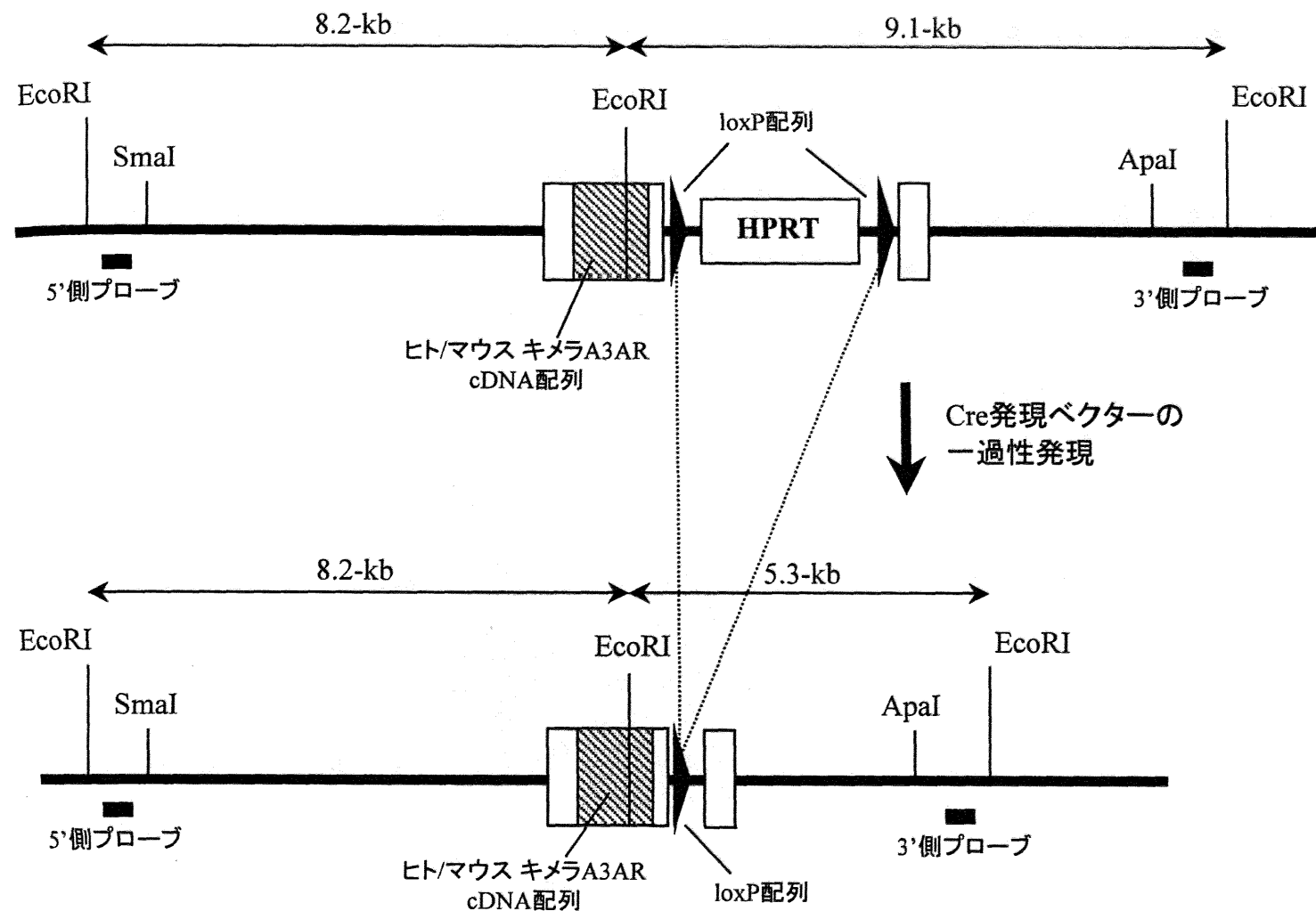


図2-11 Cre発現によるloxP配列間に存在するHPRT発現ユニットの除去

Creの一過的発現による組換え体のゲノム構造の変化を模式図で示す。

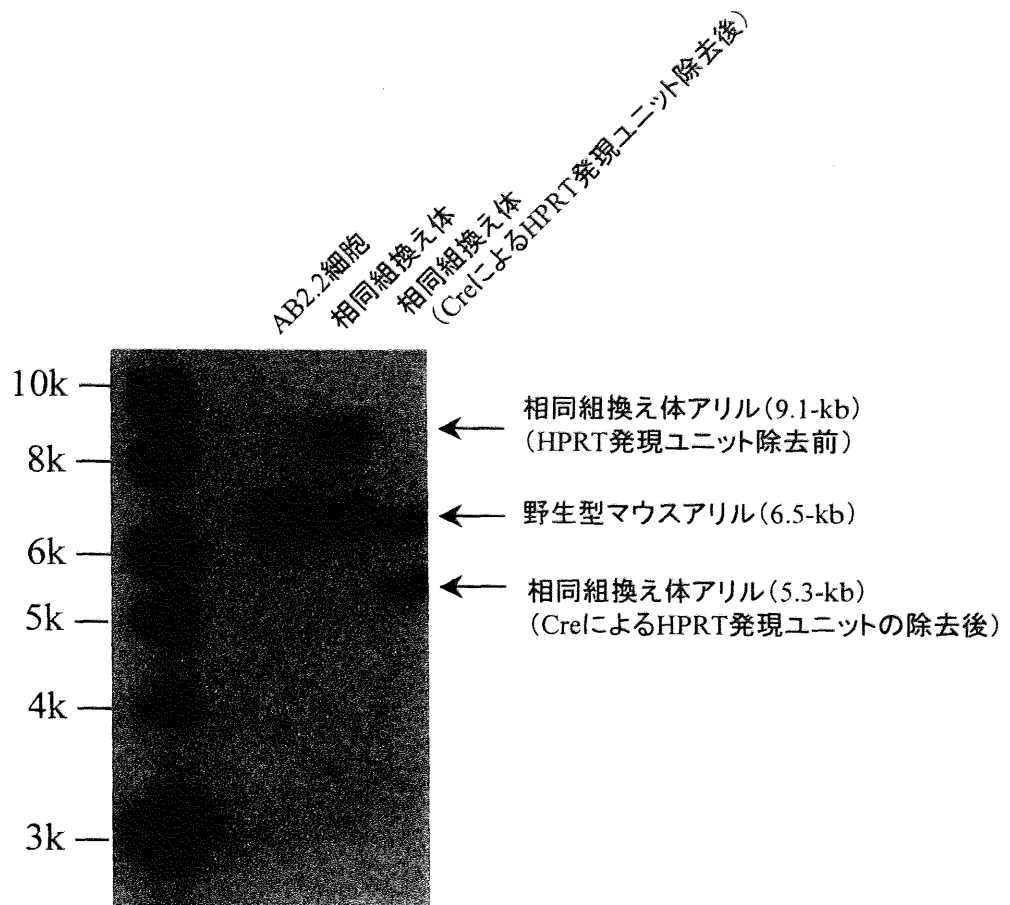
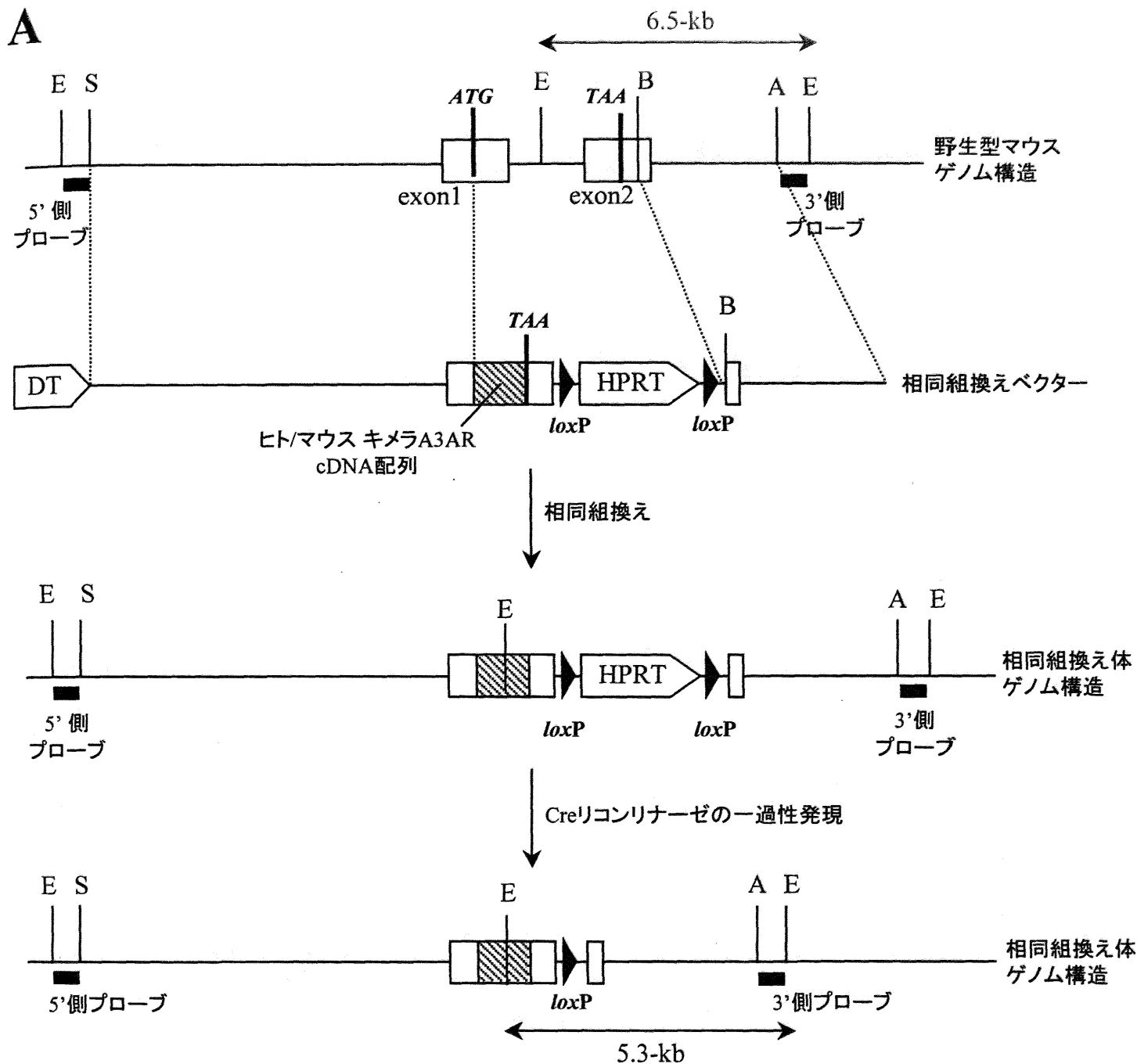


図2-12 Creの一過性発現によるHPRT発現ユニットの除去(サザンブロット解析)

相同組換え体およびCre発現ベクターを一過的に発現させた相同組換え体のゲノムDNAをEcoRIで切断したのち、3'側プローブを用いてサザンブロット解析を行った。レーン1にはCre発現前の相同組換え体由来ゲノムDNAを、レーン2にはCre発現ベクターを一過性発現させた相同組換え体由来ゲノムDNAを泳動した。



B

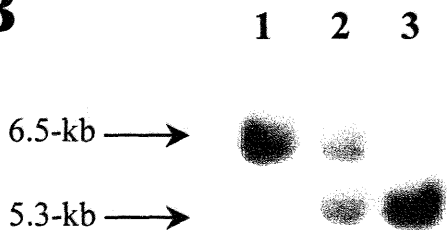


図2-13 キメラA3AR置換マウスの同定

(A) 相同組換え法による、キメラA3AR置換マウスの作製方法を模式図で示す。

(B) マウス尾由来ゲノムDNAをEcoRIで切断したのち、3'側プローブを用いてサザンブロット解析を行った。レーン1には野生型マウス、レーン2には片方のアレルがキメラA3ARに置換されたヘテロ体、レーン3には両方のアレルがキメラA3ARに置換されたホモ体由来のゲノムDNAを泳動した。

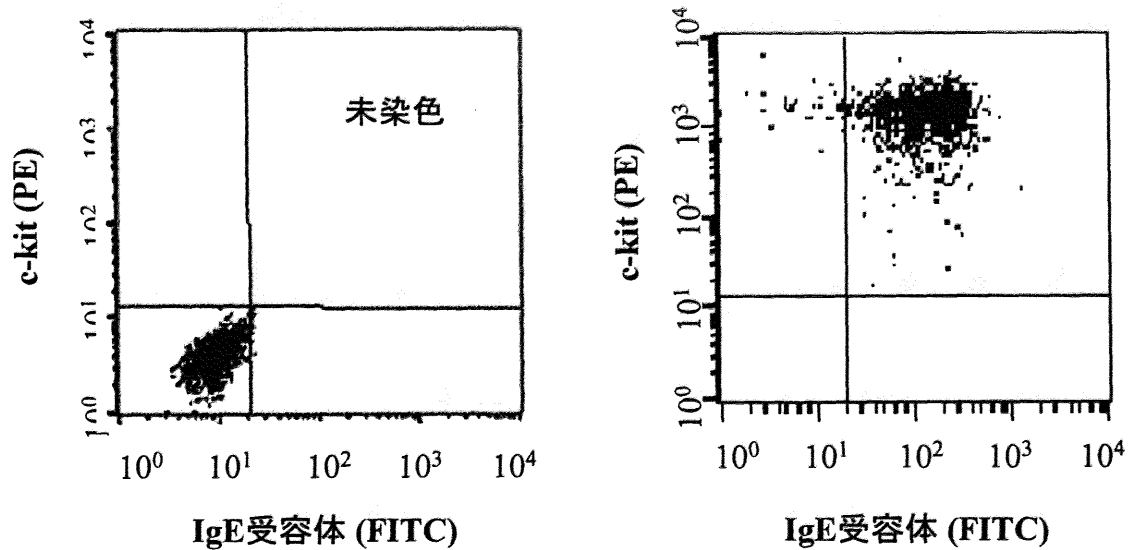
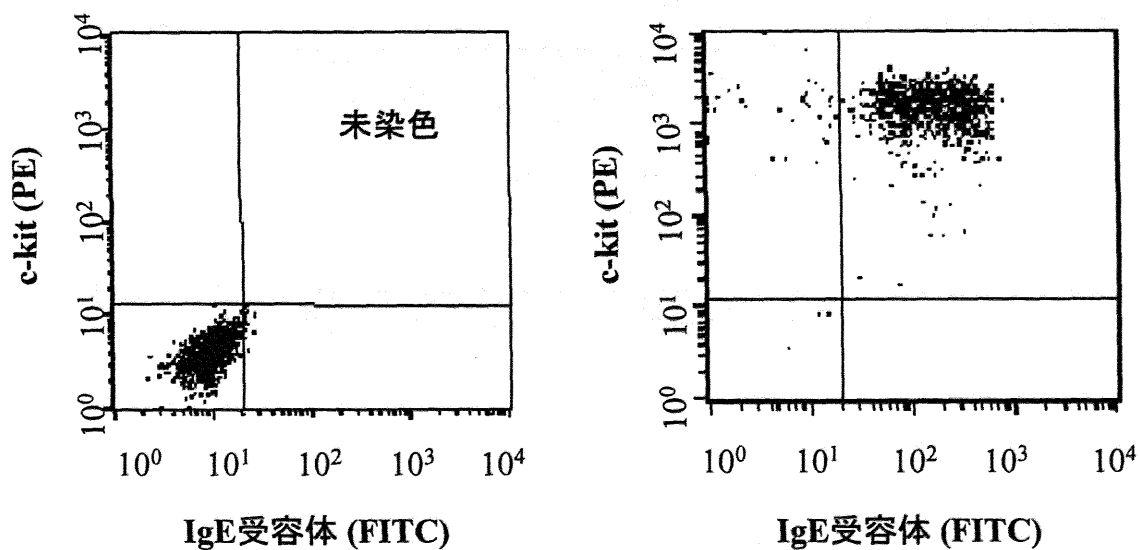
A**B**

図2-14 フローサイトメーターを用いたマスト細胞特異的マーカーの検出

FACSを用いて、野生型マウス(A) およびキメラA3AR置換マウス(B)由来BMDCにおける、IgE受容体(X軸: FITC標識IgE抗体を用いて染色)とc-kit(Y軸: PE標識抗c-kit抗体を用いて染色)の発現量を測定した。

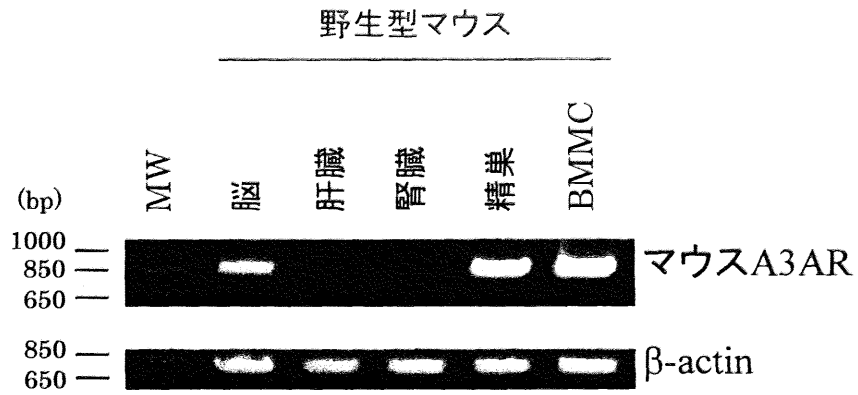
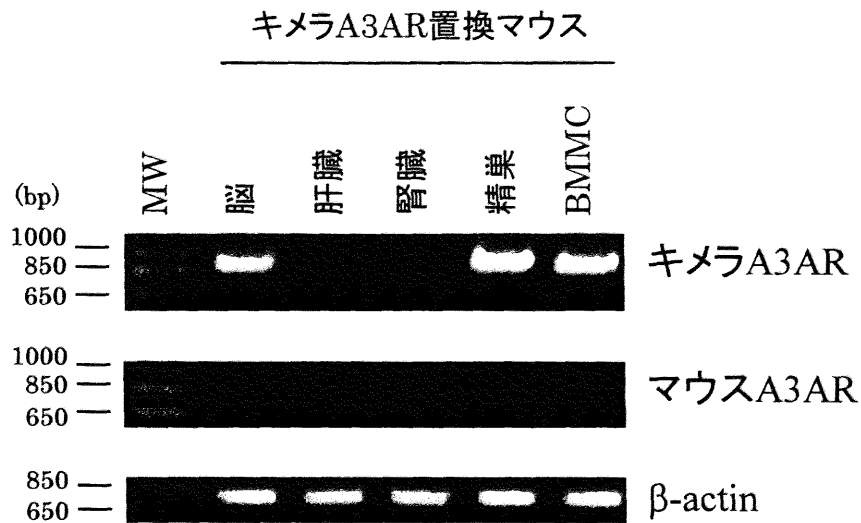
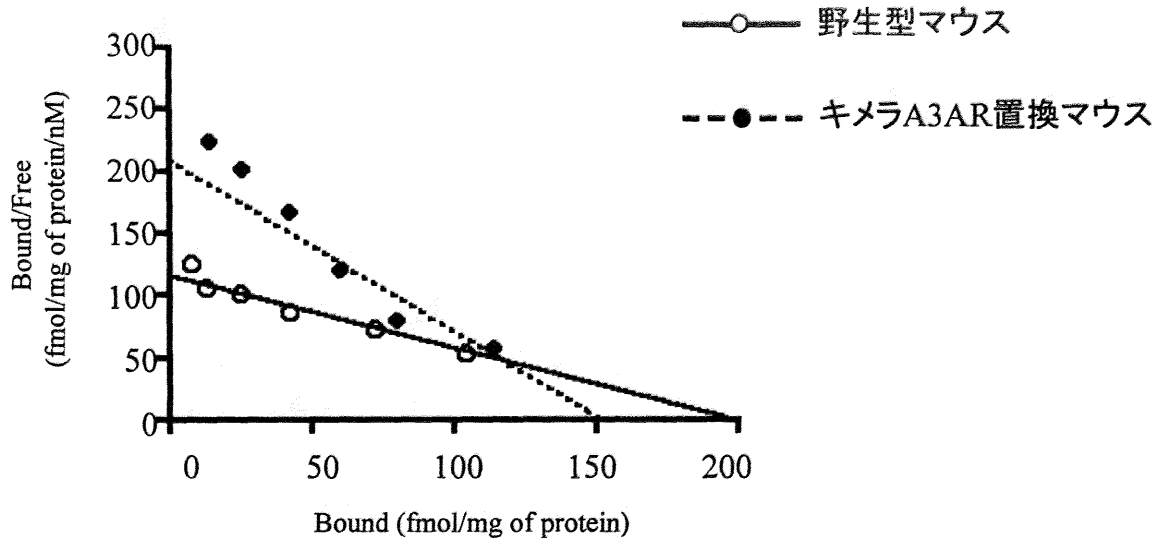
A**B**

図2-15 RT-PCR法によるA3AR遺伝子の発現解析

RT-PCR法を用いて、野生型マウス(A) およびキメラA3AR置換マウス(B) における、各臓器およびBMMCでのA3AR遺伝子の発現を検出した。PCRには、キメラA3AR、マウスA3ARおよび β アクトチンを特異的に増幅するプライマーセットを用いた。

A



B

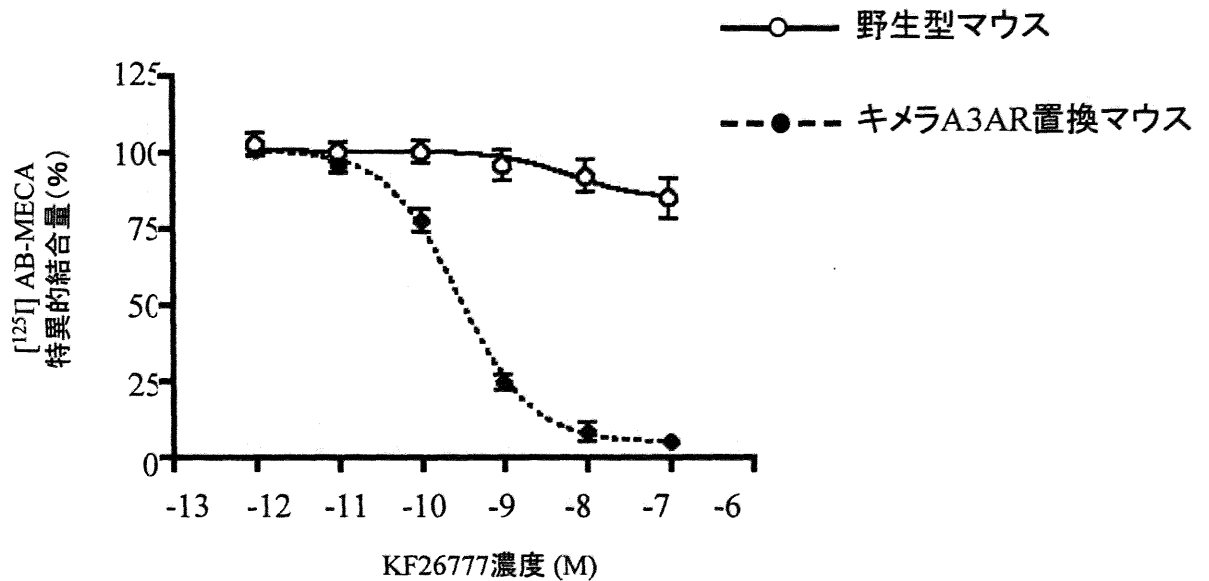


図2-16 A3ARアゴニスト $[^{125}\text{I}]\text{AB-MECA}$ を用いた細胞膜結合実験

(A) 野生型(○)およびキメラA3AR置換マウス(●)由来BMMCの細胞膜に対する $[^{125}\text{I}]\text{AB-MECA}$ 結合量のScatchard plot解析結果を示した。

野生型マウス由来BMMC上のマウスA3ARの K_d 値は 1.71 ± 0.09 nM、 B_{max} 値は 194.9 ± 5.6 fmol/mgであった。一方、キメラA3AR置換マウス由来BMMC上のキメラA3ARの K_d 値は 0.73 ± 0.14 nM、 B_{max} 値は 150.3 ± 12.1 fmol/mgであった。

(B) 野生型(○)およびキメラA3AR置換マウス(●)由来BMMCの細胞膜に対する、KF26777による $[^{125}\text{I}]\text{AB-MECA}$ の結合阻害率を示した。

野生型マウス由来BMMC上のマウスA3ARの K_i 値は10,000 nM以上であり、キメラA3AR置換マウス由来BMMC上のキメラA3ARの K_i 値は 0.15 ± 0.11 nMであった。全ての値は3回の実験の平均値で示し、エラーバーはその標準偏差(S.D.)値を示した。

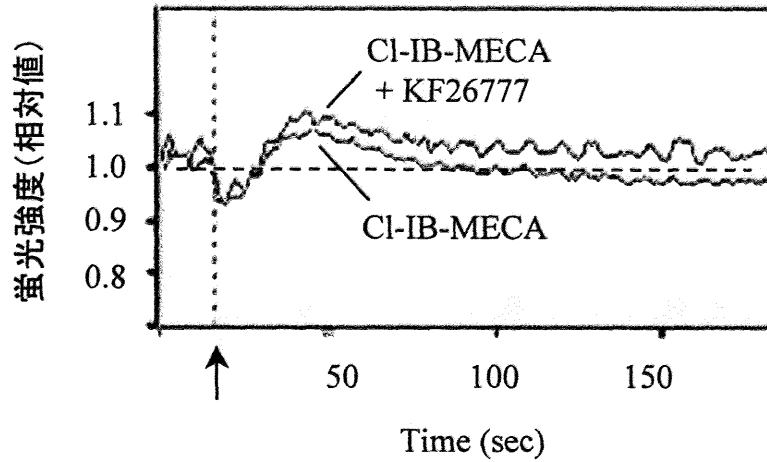
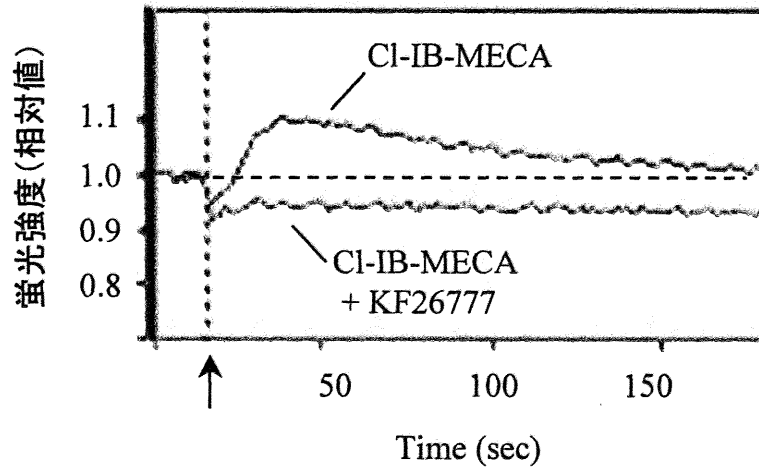
A**B**

図2-17 A3ARアゴニスト添加によるBMMCの細胞内Ca²⁺濃度の上昇(Fluo-3)

野生型マウス(A)およびキメラA3AR置換マウス(B)由来BMMCに、100 nMのCl-IB-MECAを添加した時と、100 nMのCl-IB-MECAを添加する前に100 nMのKF26777を添加した時の細胞内Ca²⁺量の変化をFluo-3を用いて検出した。

Fluo-3の蛍光強度は、リガンド非添加時の蛍光量を1とした相対値で示す。

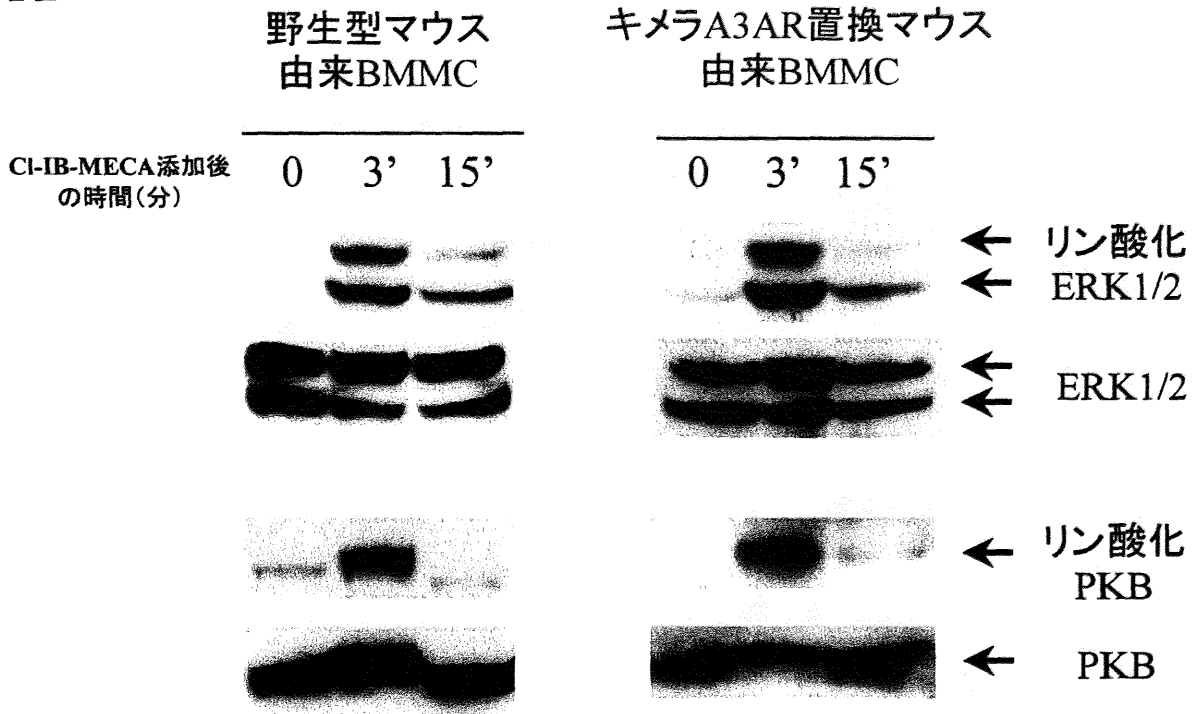
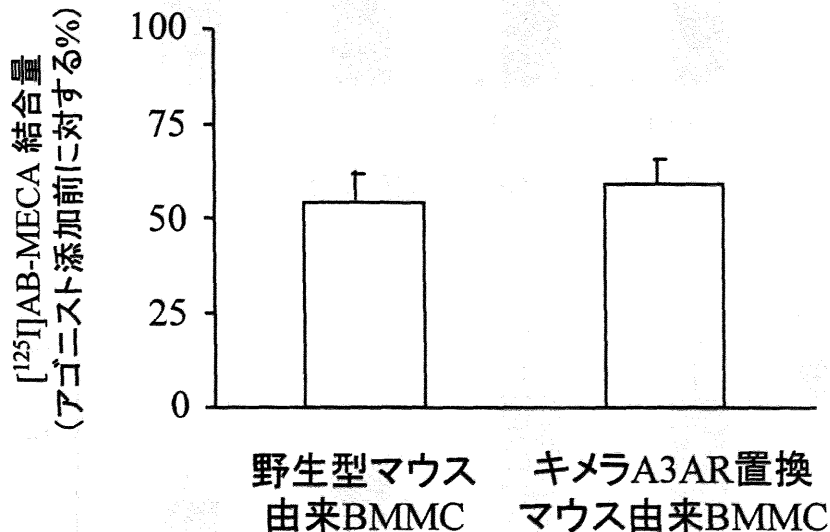
A**B**

図2-18 マウス体内においてキメラA3ARはPI3K γ を活性化出来る

(A) CI-IB-MECA添加によるERK1/2およびPKBのリン酸化

野生型マウスおよびキメラA3AR置換マウス由来BMMCに1 μ MのCI-IB-MECAを添加し、0、3、15分後におけるERK1/2(A)およびPKB(B)のリン酸化をウエスタンブロット法を用いて検出した。

(B) BMMC細胞膜上からのA3ARの細胞内移行

野生型マウスおよびキメラA3AR置換マウス由来BMMCを1 μ MのCI-IB-MECAで15分間刺激した後、細胞膜上のA3AR量を[¹²⁵I]AB-MECAの結合量として測定した。データは、CI-IB-MECAを添加しない時の[¹²⁵I]AB-MECAの結合量を100%とした場合の%表記で示した。全ての値は独立した3回の実験群の平均値を示し、エラーバーはその平均値の標準偏差(SEM)値を示す。

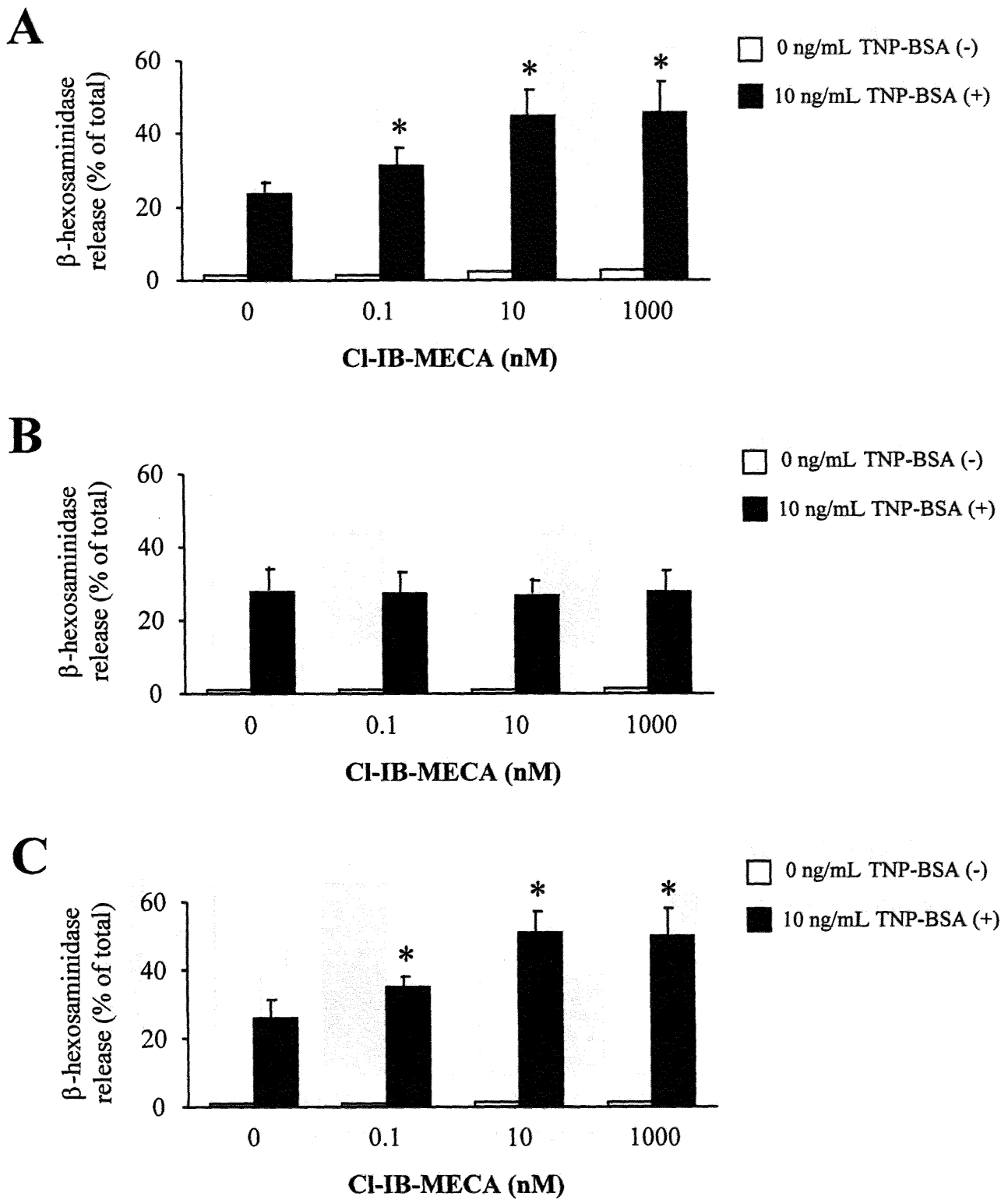


図2-19 リガンド添加によるIgEおよび抗原刺激BMMCでの脱顆粒の増強

IgEで刺激した野生型マウス(A)、ヒトA3AR置換マウス(B)およびキメラA3AR置換マウス(C)由来BMMCの抗原非添加時(□)もしくは抗原としてTNP-BSA添加時(■)における、CI-IB-MECA添加による脱顆粒量の増強を、 β ヘキソサミニダーゼ放出量として測定した。 β ヘキソサミニダーゼ放出量は、全 β ヘキソサミニダーゼ量を100%とした場合の%表記で示した。全ての値は3回の独立した実験群の平均値で示し、エラーバーはその平均値の標準誤差(SEM)を示す。
*, $P < 0.05$, CI-IB-MECA非添加時との比較(Student's *t* testによる)

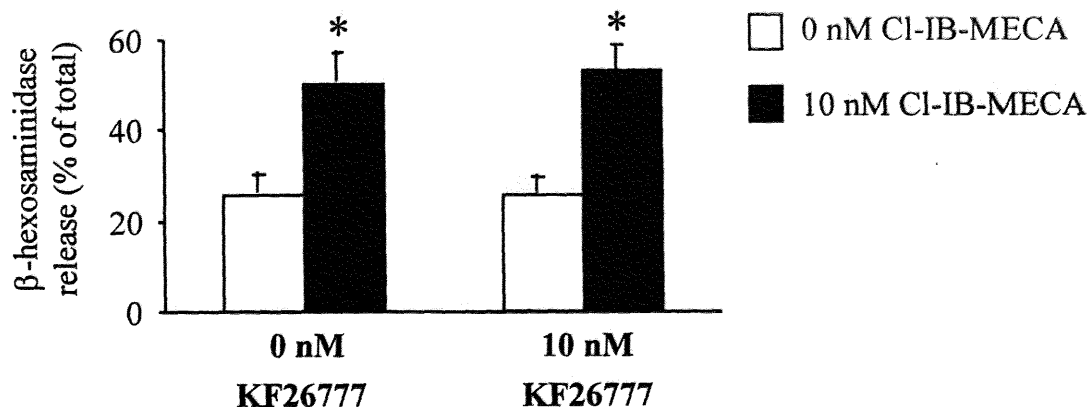
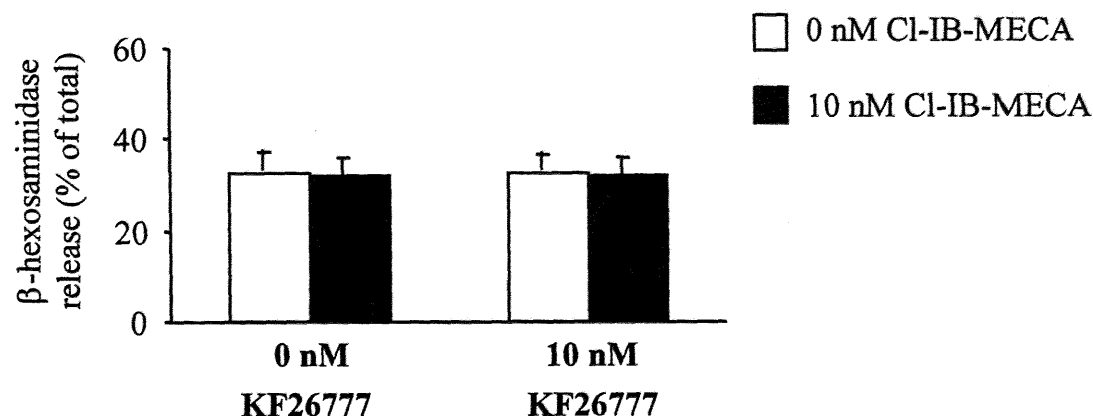
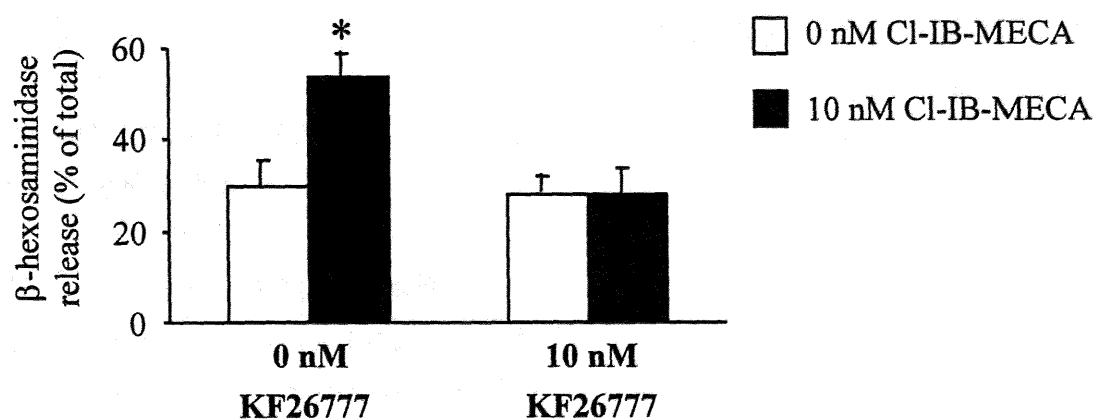
A**B****C**

図2-20 キメラA3ARによるBMMCの脱顆粒増強はKF26777によって抑制される

IgEと抗原で刺激した野生型マウス(A)、ヒトA3AR置換マウス(B)およびキメラA3AR置換マウス(C)由来BMMCにおける、0 nM(□)および(■)10 nMのCl-IB-MECA添加による脱顆粒量の増強をβヘキソサミニダーゼ放出量として測定した。KF26777は、Cl-IB-MECAを加える1分前に添加した。βヘキソサミニダーゼ放出量は、全βヘキソサミニダーゼ量を100%とした場合の%表記で示した。全ての値は3回の独立した実験群の平均値で示し、エラーバーはその平均値の標準誤差(SEM)を示す。
*, $P < 0.05$, Cl-IB-MECA非添加時との比較(Student's t testによる)

第3章 膵臓における A3AR の機能的発現

3-1. はじめに

A3AR は脳や精巣、腎臓、血管、心臓、マスト細胞や顆粒球などに発現していることが知られている^{6,7)}。しかしながら、他の臓器における A3AR の発現およびその機能については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、全身にアポエクオリンを発現するトランスジェニックマウスを作製し、A3AR の機能している臓器を網羅的に解析することとした。エクオリンは、発光オワンクラゲから単離された生物発光タンパク質であり、Ca²⁺と結合すると青色の発光を生じる。エクオリンは、アポエクオリン (タンパク質部分) とセレンテラジン (発光種) から構成され、その発光原理は Ca²⁺によってタンパク質の高次構造に変化が起こると、セレンテラジンが酸化的分解され、その時に発生する励起カルボキシル基がエネルギーを蛍光として放出すると考えられている⁵⁹⁻⁶¹⁾ (図 3-1)。また、アポエクオリン発現マウスを用いて、A3AR アゴニスト添加により細胞内 Ca²⁺量が上昇しエクオリンの発光が観察された臓器に関しては、第2章で作製したキメラ A3AR 置換マウスを用いてさらに詳細な解析を行うこととした。

3-2. 実験材料および方法

1) 主な試薬、材料

・A3AR 特異的アゴニスト

2-chloro-*N*⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-*N*-methyl-uronamide (Cl-IB-MECA)⁷⁾

協和発酵工業 (株) 医薬研究センターにて合成した

・ヒト A3AR 特異的アンタゴニスト

KF26777 (2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo [2,1-*I*] purin-5 (4H)-one dihydrochloride)^{7,34)}

協和発酵工業 (株) 医薬研究センターにて合成した

・キメラ A3AR 置換マウス

第2章にて作製

・ラット膵臓腺房細胞由来 AR42J 細胞株

ATCC (ATCC 番号 CRL-1492) より入手

・G₁₀ タンパク質阻害剤 Pertussis toxin (PTX)

シグマより入手

2) エクオリン発現ベクター pCAG-AEQ-pHPRTp の作製

プラスミド pMAQ2 (モレキュラプローブ) に含まれるアポエクオリン cDNA 配列の末端にそれぞれ EcoR I と Xba I の認識配列が付加されるように PCR を用いて増幅した後、増幅断片を EcoR I と Xba I で切断した。続いて、プラスミド pRL-TK (プロメガ) より Xba I および BamH I を用いて SV40 由来ポリ A 付加配列を含む DNA 断片を切り出し、回収した。アポエクオリン cDNA 配列を含む DNA 断片と SV40 由来ポリ A 付加配列を含む DNA 断片は、EcoR I と BamH I で切断したプラスミド pBluescript II SK(-) (ストラタジーン) に Ligation High (東洋紡) を用いて導入し、プラスミド AEQ-pA を作製した (図 3-2)。

次に、プラスミド pAxCAwt⁶²) に含まれる CAG プロモーター配列の末端にそれぞれ Sal I と Cla I の認識配列が付加されるように PCR を用いて増幅した後、増幅断片を Sal I と Cla I で切断したプラスミド pBluescript II KS(+) (ストラタジーン) に Ligation High (東洋紡) を用いて導入し、プラスミド pBluescript II KS(+)CAG を作製した (図 3-2)。

続いて、プラスミド pBluescript II KS(+)CAG を Sal I と EcoR I で切断して得られる CAG プロモーター配列を含む DNA 断片を、Sal I と EcoR I で切断したプラスミド AEQ-pA に Ligation High (東洋紡) を用いて導入し、プラスミド pCAG-AEQ を作製した (図 3-3)。

最後に、プラスミド pKO select HPRT (レキシコン) を Kpn I と Sal I で切断して得られる、両端に loxP 配列が付加されたポジティブセレクションマーカーとしてのヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 発現ユニットを含む DNA 断片を、Kpn I と Sal I で切断したプラスミド pCAG-AEQ に Ligation High を用いて導入し、プラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp を作製した (図 3-3)。

上記の全工程において、DNA 断片の回収には QIAquick Gel Extraction kit (キアゲン) を用いた。プラスミドは、それぞれのプラスミドで形質転換させた大腸菌 DH5 α (東洋紡) より QIAprep Spin Miniprep Kit もしくは QIAfilter Midi Kit (キアゲン) を用いて回収した。連結反応を行った制限酵素の認識配列周辺の塩基配列ならびに PCR 増幅断片の全塩基配列は、各工程において DNA シークエンサーABI PRISM 377 および Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver.2 (アプライドバイオシステム) を使用して決定し、塩基配列の確認を行った。

3) エクオリン発現マウスの作製

プラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp を制限酵素 Pvu I および Sac I で切断し線状化した後、この線状化プラスミド 20~200 ng を BDF1 交雑マウス (日本エスエルシー) より取得した受精卵の前核に顕微注射した。線状化プラスミドを注射した計 215 個の受精卵は、仮親である ICR マウス (日本エスエルシー) の卵管へと移植した。得られた産仔は、以下に示すゲノム PCR 法により、アポエクオリン cDNA 配列の検出を行った。

各マウスの尾を 10 mM のトリス (pH7.5)、10 mM の EDTA、10 mM の NaCl、0.5% のサルコシル (インビトロジェン)、1 mg/mL の Proteinase K (インビトロジェン) を含む細胞溶解液 500 μ l に加えたのち、60°C で一晩放置することにより尾を溶解した。この溶解液に 10 μ l の 5 M NaCl と 1 ml のエタノールを加えて 15,000 rpm で 15 分間遠心することによりゲノム DNA を沈殿させた。沈殿したゲノム DNA は 70%エタノールで洗浄した後、100 μ l の TE に溶解した。このゲノム DNA を 200 ng 含む 20 μ l の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase (タカラバイオ)、アポエクオリン cDNA の 5'および 3'末端配列より設計した各 0.5 μ M のプライマー (5'-ggg AAT TCC ggC AAC Agg CCA ACA Tg-3'および 5'-ggT CAT gAA gTT TCT TAg ggg ACA gC-3' : ファスマックにて合成)) を調整し、94°C で 5 分間熱した後、94°C で 1 分間、64°C で 2 分間、72°C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 30 サイクルからなる PCR 反応を行った。PCR 反応後、10 μ l を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、0.65-kb からなる特異的増幅断片を検出した。

プラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp が染色体に導入されていた個体は、C57BL/6J (日本クレア) と交配させ、F1 マウスを取得した。プラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp が染色体に導入されていることが確認された F1 マウスは C57BL/6J を掛け合わせて、得られた産仔はそ

それぞれ上記に示すゲノム PCR 法によりアポエクオリン cDNA 配列の検出を行い、染色体に導入されたプラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp の有無を評価した。

4) エクオリンによる発光測定

エクオリン発現マウスより取り出した各臓器を 1~2 mm 片に切り刻んだ後、最終濃度 10 μ M のセレンテラジンを含む 200 μ l の RPMI1640 培地 (インビトロジェン) の中で 37°C、5 時間インキュベーションすることにより、アポエクオリンとセレンテラジンよりエクオリンを再構成させた。上記反応液に 100 μ l の RPMI1640 培地を加えて 20 秒間エクオリンの発光量を測定したのち、さらに 4 μ M の Ca^{2+} イオノフォア A23187 (Research Biomedical International)、0.28%の Triton X-100、もしくは 20 μ M の Cl-IB-MECA を含む 100 μ l の RPMI1640 培地を加えて 125 秒間エクオリンの発光量を測定した。エクオリンの発光量は、マイクロルミノメーター LB953 (EG&G ベルトールド) を用いて毎秒測定した。

5) 膵臓由来細胞の単離

キメラ A3AR 置換マウスより膵臓を摘出した後、ハサミにて細かく切り刻み、さらに 2 枚のスライドガラスの間ですり潰すことにより膵臓由来細胞を単離した。膵臓由来細胞は RPMI1640 培地で 2 回リンスした後、さらに RPMI1640 培地中で 37°C、5% CO_2 条件下で 6 時間インキュベートした。

6) AR42J 細胞の培養

ラット膵臓腺房細胞由来細胞株 AR42J は、10%のウシ胎児血清 (インビトロジェン) と 50 μ g/mL のゲンタマイシン (ナカライテスク) を含む DMEM 培地 (インビトロジェン) にて、37°C、5% CO_2 条件下で培養した。

7) RT-PCR

エクオリン発現マウスの各臓器および AR42J 細胞より、QIAshredder (キアゲン) および RNeasy Protect Mini Kit (キアゲン) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA 各 5 μ g より、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェン) を用いて逆転写反応を行い、一本鎖 cDNA を合成した。

A3AR の cDNA を増幅させる PCR は、以下の条件で行った。一本鎖 cDNA を適当量含む 20 μ l の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase、各 0.5 μ M のプライマー (5'-gTC ATC TgC gTg gTC AAg CTg AAC CCC-3'および 5'-ggC ATA gAC AAT Agg gTT CAT CAT ggA g-3' : ファスマックにて合成)) を調整し、まず 1st PCR を行なった。94°C で 5 分間熱した後、94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 20 サイクル行なった。さらに 1st PCR の反応後溶液を 1 μ l 含む 20 μ l の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase、各 0.5 μ M のプライマー (5'-CAT gCC TCC ATC ATg TCC TTg CTg gCC-3'および 5'-gTC TTg AAC TCC CgT CCA TAA AAT gCA C-3' : ファスマックにて合成)) を調整し、2nd PCR を行なった。94°C で 5 分間熱した後、94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 20 サイクル行なった。2nd PCR の反応後、10 μ l を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、約 0.4-kb の特異的増幅断片を検出

した。

β アクチンの cDNA を増幅させる PCR は、以下の条件で行った。一本鎖 cDNA を適当量含む 20 μ l の反応液 (ExTaq buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 単位の ExTaq polymerase、各 0.5 μ M のプライマー (5'-gAT ATC gCT gCg CTC gTC gTC gAC-3' および 5'-CAg gAA ggA Agg CTg gAA gAg AgC-3' : ファスマックにて合成)) を調整し、PCR を行った。94°C で 5 分間熱した後、94°C で 1 分間、68°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして計 22 サイクル行った。PCR 反応後、10 μ l を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供し、約 0.79-kb の特異的増幅断片を検出した。

8) Fluo-3 AM を用いた細胞内 Ca^{2+} 量の測定

膵臓由来細胞および AR42J 細胞をカルシウム測定緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.4)、115 mM NaCl、5.4 mM KCl、0.8 mM $MgCl_2$ 、1.8 mM $CaCl_2$ 、13.8 mM グルコース (以上、ナカライテスク)、0.2% (w/v) ウシ血清アルブミン (シグマ)、2.5 mM Probenecid (シグマ)) で 2 回洗浄したのち、最終濃度 5 μ M の Fluo-3 AM (モリキュラプローブ) と最終濃度 0.5% の Pluronic F-127 (シグマ) を添加したカルシウム測定緩衝液に懸濁して 5% CO_2 、37°C 条件下で 1 時間培養した。1 時間培養後、各細胞をカルシウム測定緩衝液で 2 回洗浄した後、カルシウム測定緩衝液にて 5.0×10^5 細胞/ml になるよう懸濁し 100 μ l ずつ 96 穴プレートに分注した。96 穴プレートは 5% CO_2 、37°C 条件下で 30 分間培養した後、指示された濃度の A3AR 特異的アゴニスト Cl-IB-MECA を添加し、FDSS 6000 (浜松ホトニクス) を用いて 480 nm の励起波長によって生じる 530 nm の蛍光波長を、ブルーダイクロイックミラーに透過させたのち、吸光 520~560 nm のフィルターで 1 分間測定した。530 nm の蛍光波長は、Cl-IB-MECA や TNP-BSA の無添加時を 1.0 とした場合の相対値として表記した。A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 は、Cl-IB-MECA を添加する 10 分前に、最終濃度 100 nM で添加した。PTX は細胞の培地中に 200 ng/ml の濃度で加えて 24 時間培養した後、細胞内 Ca^{2+} 量を測定した。

9) ウェスタンブロット法によるリン酸化蛋白質の検出方法

A3AR によって誘導される PKB および ERK 1/2 のリン酸化は、以下の方法で検出した。膵臓由来細胞もしくは AR42J 細胞に指示された濃度の Cl-IB-MECA を添加して 37°C で 0、2、10、30 分間インキュベートした後、冷 PBS にて 2 回洗浄し、細胞溶解液 (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% (w/v) SDS、10% glycerol、50 mM dithiothreitol (インビトロジェン)、0.1% (w/v) bromphenol blue (シグマ)) に溶解した。細胞溶解液を 95°C で 5 分間熱した後、遠心により沈殿物を除き、5-20% グラジエント e-PAGEL (アトー) による SDS-PAGE に供した。分離した蛋白質バンドは電気泳動転写装置ホライズブロット AE-6677 型 (アトー) を用いて Immobilon Transfer Membranes (ミリポア) に転写し、5% (w/v) スキムミルクを含む TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20 (シグマ)) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行なった。

一次抗体には、抗リン酸化 PKB (Ser473) 抗体 (セルシグナルテクノロジー) もしくは抗リン酸化 ERK1/2 (Thr202/tyr204) 抗体 (セルシグナルテクノロジー) を 5% (w/v) BSA 入り TBST で 1000 倍希釈したものを用いた。メンブレンに対して 1 次抗体を 4°C で 1 晩反

応させたのち、3回 TBST で洗浄した。続いて、Horseradish Peroxidase 標識抗ラビット2次抗体（セルシグナルテクノロジー）を5%（w/v）スキムミルク入り TBST で2000倍希釈した2次抗体を室温で1時間反応させた後、メンブレンを3回 TBST で洗浄し、Phototope HRP Western Blot Detection Kit（セルシグナルテクノロジー）を用いて特異的バンドを検出した。

また、同じサンプルを泳動したメンブレンを作製し、1次抗体として抗PKB抗体（セルシグナルテクノロジー）もしくは抗ERK1/2抗体（セルシグナルテクノロジー）を用いることにより、非リン酸化PKBおよびERK 1/2の検出を行なった。

3-3. 結果

1) エクオリン発現マウスの作製

プラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp を 215 個の BDF1 交雑マウスの受精卵前核に顕微注入し、仮親マウスの卵管へと移植した結果、21 匹の産仔を得た。産仔の尾より回収したゲノム DNA を鋳型としてアポエクオリン cDNA 配列を増幅する PCR を行った結果、5 匹の染色体にプラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp が導入されていた (図 3-4)。この 5 匹を C57BL/6J マウスと交配させて F1 マウスを取得した結果、染色体にプラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp が導入された F1 マウスを計 3 匹得ることが出来た。この F1 マウスは C57BL/6J と交配させ、得られた産仔より染色体にプラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp が導入されている個体を選択していくことにより、本トランスジェニックマウスの系統を維持した。作出したトランスジェニックマウスの各系統のついて各臓器におけるエクオリンの発現量を比較した結果、マウス系統 98075-04-6 の胸線、筋肉、脳、肝臓、精巣、肺、耳、頭蓋骨、尾、水晶体、脂肪組織、食道、脾臓、腎臓、皮膚、血管、膵臓の各組織においてカルシウムイオノフォア A23187 添加によるエクオリンの発光応答が観察された (図 3-5)。同様のエクオリンの発光応答は、TritonX-100 の添加によっても観察された (データ示さず)。一方、毛においては A23187 添加によるエクオリンの発光は観察されなかった (図 3-5)。

2) A3AR アゴニスト添加による各臓器での細胞内 Ca^{2+} 量の上昇

プラスミド pCAG-AEQ-pHPRTp が染色体に導入されたトランスジェニックマウスのうち、エクオリンの発光応答が観察されたマウス系統 98075-04-6 の脳、精巣、膵臓、肝臓、腎臓に A3AR 特異的アゴニスト Cl-IB-MECA を添加して、エクオリンの発光量を測定した。その結果、A3AR の発現が報告されている脳、精巣に加え、膵臓においても Cl-IB-MECA 添加によるエクオリンの発光上昇が観察された (図 3-6)。また、エクオリンの発光上昇の観察された脳、精巣、膵臓において A3AR の mRNA が発現していることを RT-PCR 法を用いて確認した (図 3-7)。

3) 膵臓由来細胞における A3AR の機能的発現

次に、キメラ A3AR 置換マウス (第 2 章参照) の膵臓由来細胞における A3AR の機能的発現を調べるために、Cl-IB-MECA 添加による細胞内 Ca^{2+} 量の上昇を Fluo-3 を用いて調べた。その結果、キメラ A3AR 置換マウス由来膵臓由来細胞に Cl-IB-MECA を添加することにより、細胞内 Ca^{2+} 量の上昇が観察され、その上昇はヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 を添加することにより完全に抑制された (図 3-8A)。

続いて、膵臓由来細胞において A3AR による ERK1/2 および PKB のリン酸化の誘導が観察されるどうか検討した。その結果、キメラ A3AR 置換マウス由来膵臓由来細胞に Cl-IB-MECA を添加することによって ERK1/2 および PKB のリン酸化が検出され、そのリン酸化は KF26777 を添加することにより完全に抑制された (図 3-8B)。

4) 膵臓腺房細胞由来 AR42J 細胞における A3AR の機能的発現

続いて我々は、ラット膵臓の腺房細胞由来細胞株 AR42J における A3AR の発現およびそ

の機能を調べた。まず初めに、AR42J細胞におけるA3ARのmRNAの発現をRT-PCR法を用いて確認した(図3-9)。次に、AR42J細胞におけるA3ARの機能的発現を調べるために、Cl-IB-MECA添加による細胞内Ca²⁺量の上昇をFluo-3を用いて調べた。その結果、AR42J細胞にCl-IB-MECAを添加することにより、細胞内Ca²⁺量の上昇が観察され、その上昇はG_{i/o}タンパク質阻害剤であるPTXの添加により抑制された(図3-10A)。また、AR42J細胞にCl-IB-MECAを添加することにより細胞内のERK1/2およびPKBがリン酸化され、そのリン酸化はPTX処理により抑制されることを確認した(図3-10B)。AR42J細胞におけるCl-IB-MECA添加によるERK1/2およびPKBのリン酸化は、刺激後2分でピークを迎え(図3-11A)、またそのリン酸化はCl-IB-MECAの濃度依存的に引き起こされることを確認した(図3-11B)。

3-4. 考察

本研究において我々は、細胞内 Ca^{2+} 量の変動を Ca^{2+} インディケータを用いずに簡便にモニタリング出来る動物モデルとして、アポエクオリンを全身で発現するマウスの作製を試みた。アポエクオリン cDNA 発現ベクターのプロモーターとしては、マウス全身で機能することが知られている CAG プロモーター⁶³⁾を用いた。その結果、毛を除くほぼ全身の臓器で細胞内 Ca^{2+} 量の上昇に伴うエクオリンの発光を観察することが出来る、アポエクオリン発現マウスの作製に成功することが出来た (図 3-5)。

次に我々は、アポエクオリン発現マウスの各臓器に A3AR アゴニスト Cl-IB-MECA を添加することにより、A3AR による細胞内 Ca^{2+} 量の上昇が観察される臓器の探索を行った結果、脳、精巣、膵臓において A3AR 特異的アゴニスト Cl-IB-MECA 添加によるエクオリンの発光上昇が観察された (図 3-6)。また、これらの臓器では、A3AR の mRNA が発現していることを RT-PCR 法を用いて確認した (図 3-7)。脳と精巣における A3AR の mRNA 発現は以前より報告されているが⁷⁻¹⁰⁾、膵臓における発現を示した例は本研究が初めてである。また、脳における A3AR の機能的発現はすでに報告されているが⁶⁴⁾、精巣および膵臓における A3AR の機能的発現を示した例は本研究が初めてである。

現在、細胞内 Ca^{2+} 量の測定は主に蛍光化合物である Fura-2 や Fluo-3 などの Ca^{2+} インディケータを用いた方法によって広く行われている。しかしながら、動物の臓器や組織などの切片を用いて細胞内 Ca^{2+} 量の変動を直接測定するためには、 Ca^{2+} インディケータを臓器や組織内に効率よく導入しなければならず (そのための条件検討は非常に難しい)、また臓器や組織中に含まれる血清成分による自家蛍光がバックグラウンドとして現れることも考慮せねばならず、操作が非常に複雑となってしまう。そのため、本研究にて作製したアポエクオリン発現マウスは、非常に簡便な操作で生体組織における細胞内 Ca^{2+} 量の変動を測定することが出来る Ca^{2+} モニタリングマウスとして非常に有用なツールであると考えられる。

続いて我々は、膵臓における Cl-IB-MECA 添加によるエクオリンの発光が A3AR を介しているか確認するために、第 2 章で作製したキメラ A3AR 置換マウスの膵臓由来細胞を用いてその評価を行った。その結果、膵臓由来細胞における Cl-IB-MECA 添加による細胞内 Ca^{2+} 量の上昇および ERK1/2 と PKB のリン酸化は、ヒト A3AR 特異的アンタゴニスト KF26777 の添加により完全に抑制され (図 3-8)、膵臓において A3AR は機能的に発現していることが確認された。

膵臓は、外分泌機能として消化酵素の産生を担う腺房細胞と内分泌機能としてホルモンの産生を担うランゲルハンス島、および膵管より構成される。我々は、A3AR が膵臓のどの組織で発現しているかを調べるために、今回はラット膵臓の腺房細胞由来株 AR42J における A3AR の発現およびその機能を調べた (図 3-9 および 3-10)。AR42J 細胞では A3AR の mRNA 発現が観察され、AR42J 細胞内の Ca^{2+} 量上昇および ERK1/2 と PKB のリン酸化は Cl-IB-MECA の添加により誘導された。また、これらの活性は、 $G_{i/o}$ タンパク質阻害剤である PTX を添加することにより抑制された。以上より、A3AR は少なくとも膵臓の腺房細胞に機能的に発現していることが示唆された。AR42J 細胞において、ERK1/2 および PKB を介したシグナル伝達経路はその細胞増殖や抗アポトーシス作用に関与することが報告されており⁶⁵⁻⁶⁷⁾、膵臓腺房細胞において A3AR はこれらの生理機能に関与している可能性が考えられ

る。

膵臓において、アデノシンは膵炎の病態進行に深く関わっていることが報告されている⁶⁸⁾。膵炎を引き起こしている膵臓の周辺では過度の ATP 代謝による細胞外のアデノシン濃度の上昇が観察され、膵臓で発現するアデノシン受容体からのシグナル伝達が膵炎の増悪を招いている可能性が示唆されている^{69,70)}。実際、アデノシン A1 や A2A 受容体に対するアゴニストは膵炎症状を増悪させ、また逆にこれら受容体に対するアンタゴニストは膵炎症状を改善させることが知られている^{69,71)}。しかしながら、膵臓における A3AR の発現およびその機能については未だ報告がない。本研究において我々は初めて、膵臓の少なくとも腺房細胞において A3AR が機能的に発現していることを示した。A3AR は、他のアデノシン受容体と同様に膵炎の増悪に関与していることが推察され、A3AR に対するアンタゴニストは膵炎の新しい治療薬となる可能性が示唆される。また、膵炎に対する A3AR アンタゴニストの薬理学的評価を行う上で、第 2 章で作製したキメラ A3AR 置換マウスは有力なモデル動物となり得る可能性がある。

さらに、膵臓における ERK1/2 を介したシグナル伝達経路は、ランゲルハンス島 β 細胞の抗アポトーシス機能⁷²⁾や膵ガン周辺のストローマ内の星状細胞の細胞増殖⁷³⁾に関与することが知られている。また、PKB を介したシグナル伝達経路は、膵臓の再生⁷⁴⁾やランゲルハンス島 β 細胞での生理機能を担う⁷⁵⁻⁷⁷⁾ほか、膵ガンや膵管腫瘍の活性化にも関与する⁷⁸⁻⁸⁰⁾ことが知られている。本研究の結果は、腺房細胞以外の膵臓組織におけるこれらの生理現象にも A3AR が関わっている可能性を示唆しており、非常に興味深い。

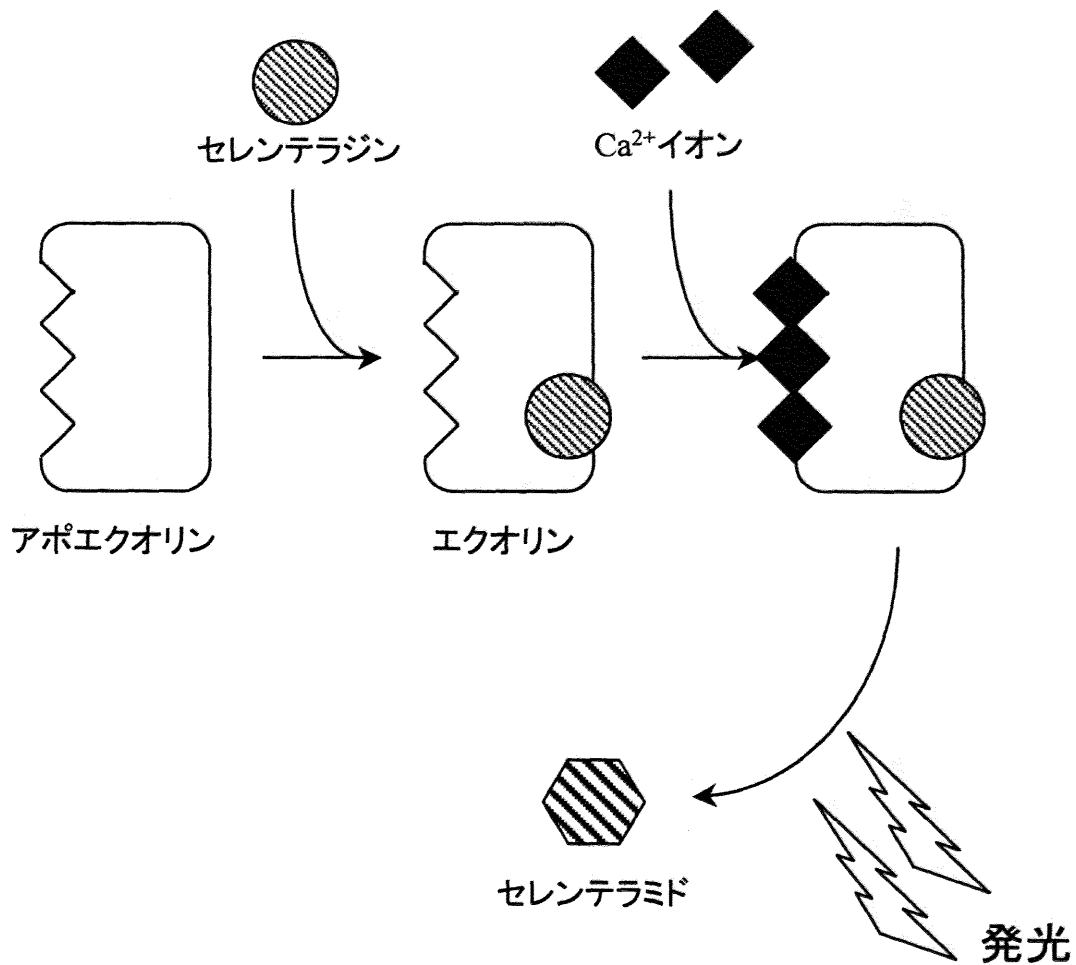
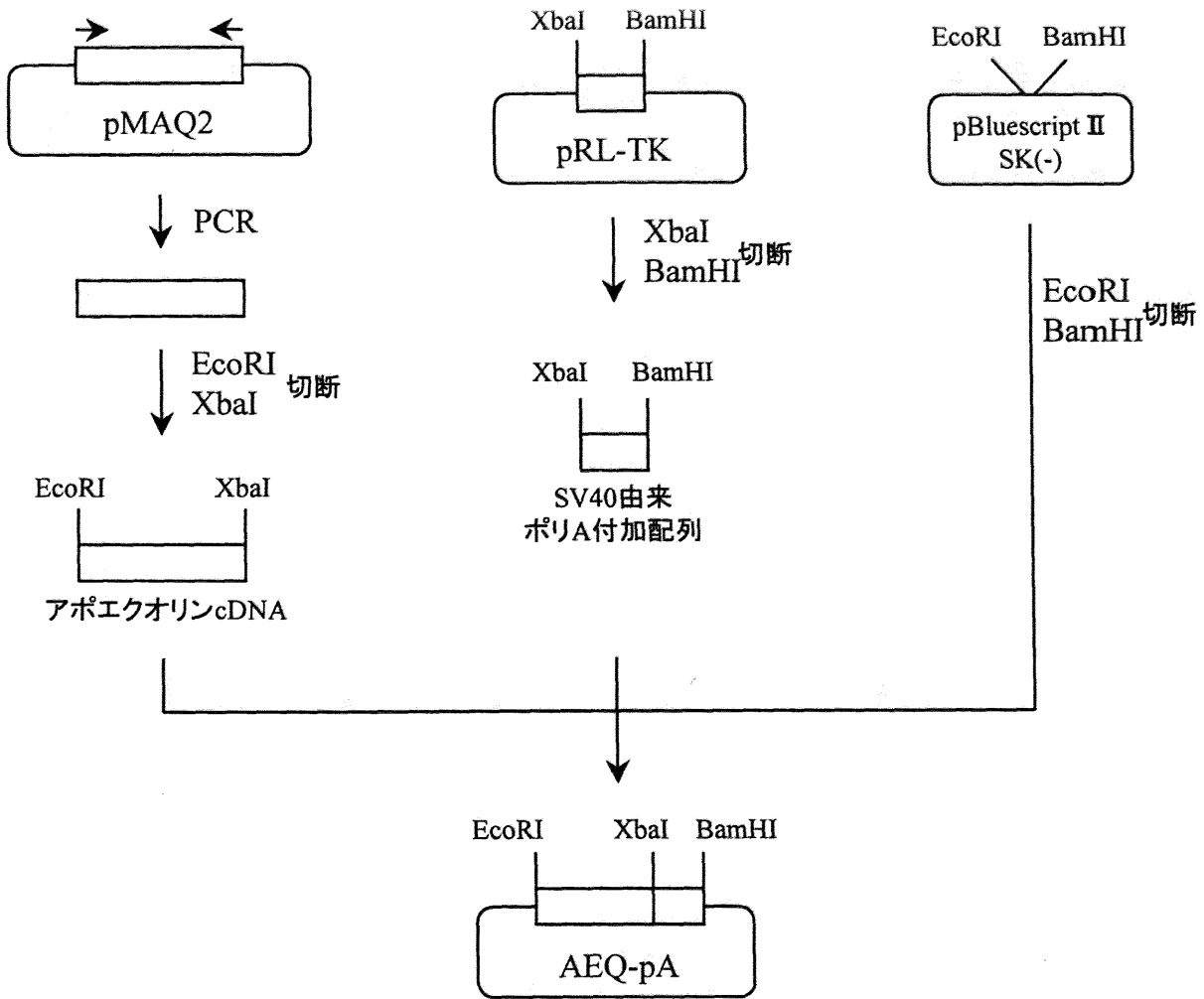


図3-1 エクオリンの発光機構

エクオリンの発光機構を模式的に示す。

前駆体であるアポエクオリンは、基質であるセレンテラジン存在下においてエクオリンへと再構成される。エクオリンのカルシウム結合領域に Ca^{2+} イオンが結合すると、セレンテラジンをセレンテラミドに酸化することによって発光が生じる。

工程1



工程2

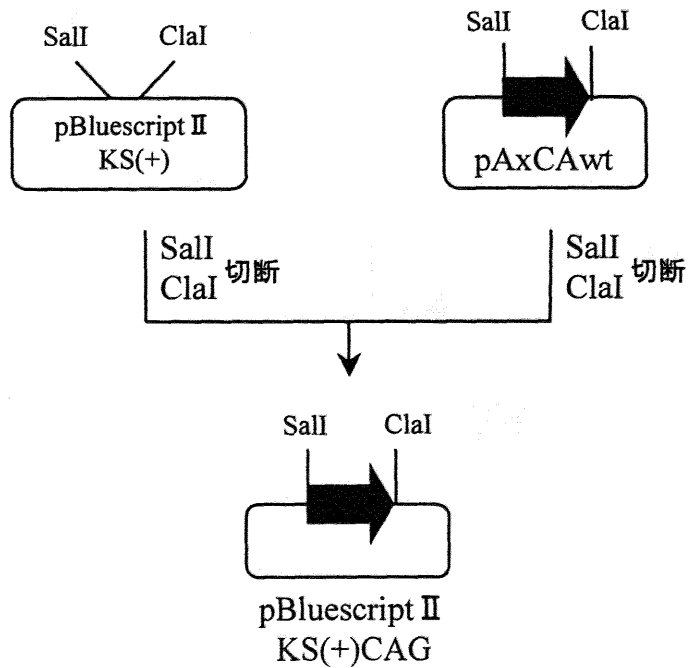
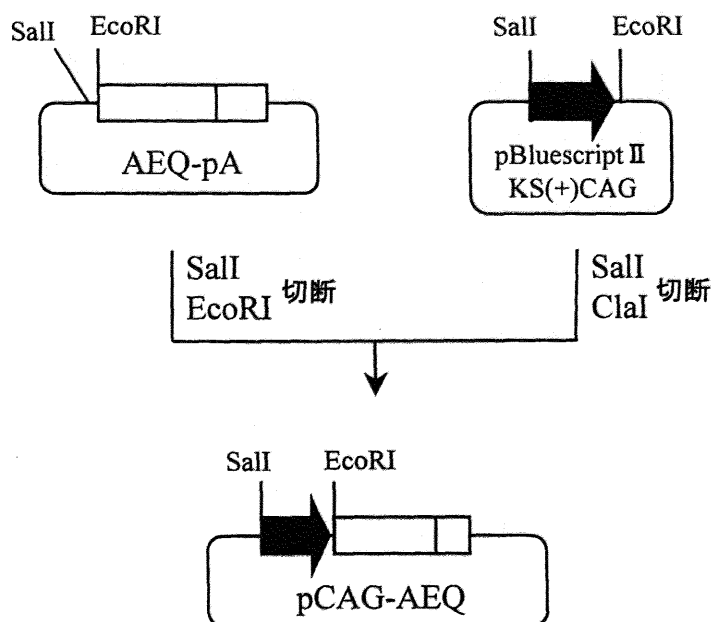


図3-2 アポエクオリン発現ベクターの構築①

アポエクオリン発現ベクター-pCAG-AEQ-pHPRTp構築のための工程1、2を示す

工程3



工程4

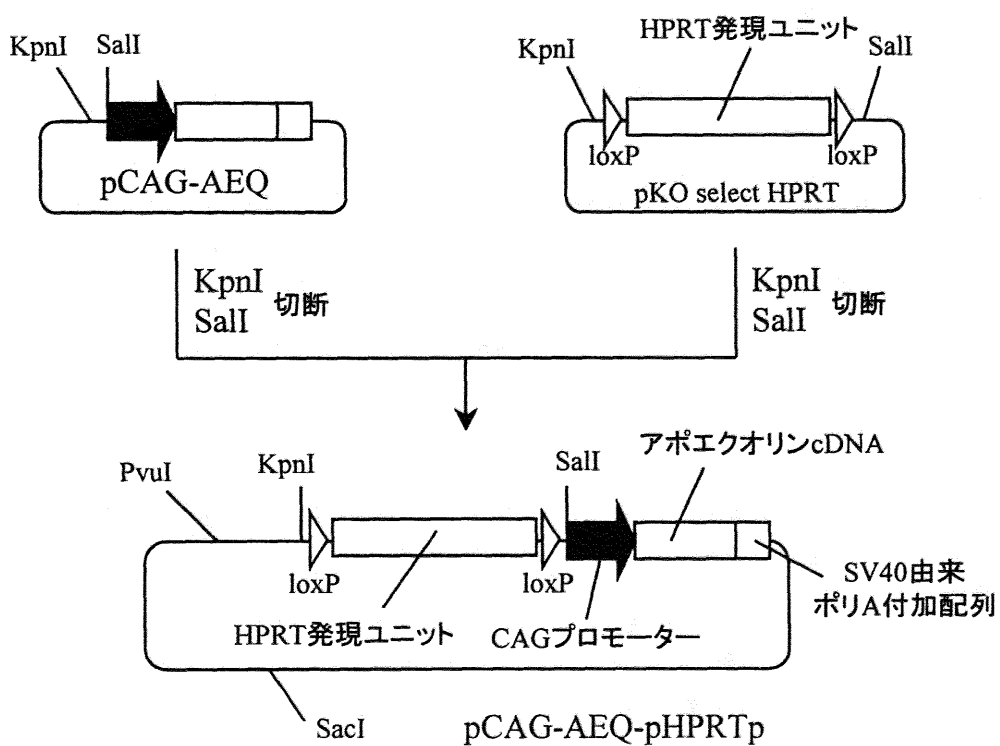


図3-3 アポエクオリン発現ベクターの構築②

アポエクオリン発現ベクターpCAG-AEQ-pHPRTp構築のための工程3、4を示す

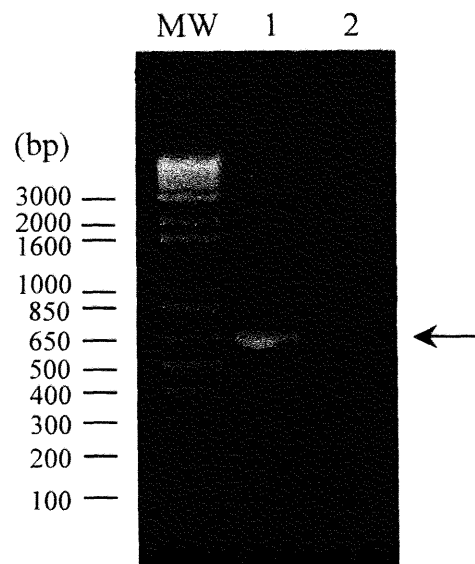


図3-4 アポエクオリン発現マウスの同定

マウス尾より抽出したゲノムDNAを鋳型として、アポエクオリンcDNA全長(0.65-kb)を増幅させるプライマーを用いたPCRを行った。レーン1にはアポエクオリン発現マウスのゲノムDNA、レーン2には野生型マウスのゲノムDNAを鋳型とした、PCR反応後溶液を泳動した。MWのレーンには分子量マーカーを泳動した。

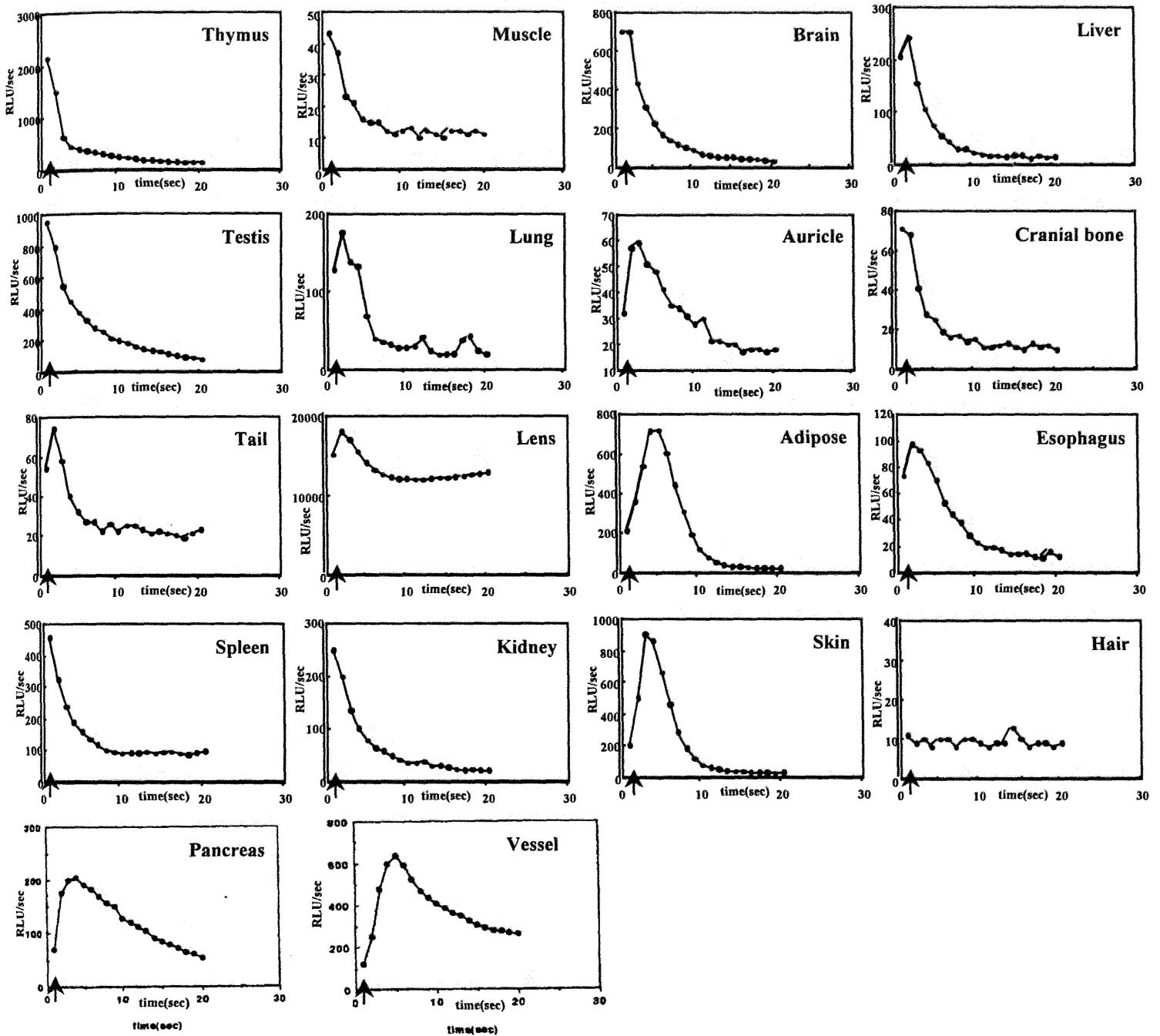


図3-5 アポエクオリン発現マウスの各臓器におけるエクオリンの反応

セレンテラジンでインキュベートしたアポエクオリン発現マウス系統98075-04-6の胸線、筋肉、脳、肝臓、精巣、肺、耳、頭蓋骨、尾、水晶体、脂肪組織、食道、脾臓、腎臓、皮膚、毛、膵臓、および血管に $1 \mu\text{M}$ のカルシウムイオノフォアA23187を添加した時のエクオリンの発光量 (Relative Luminescence Unit/秒)を測定した。

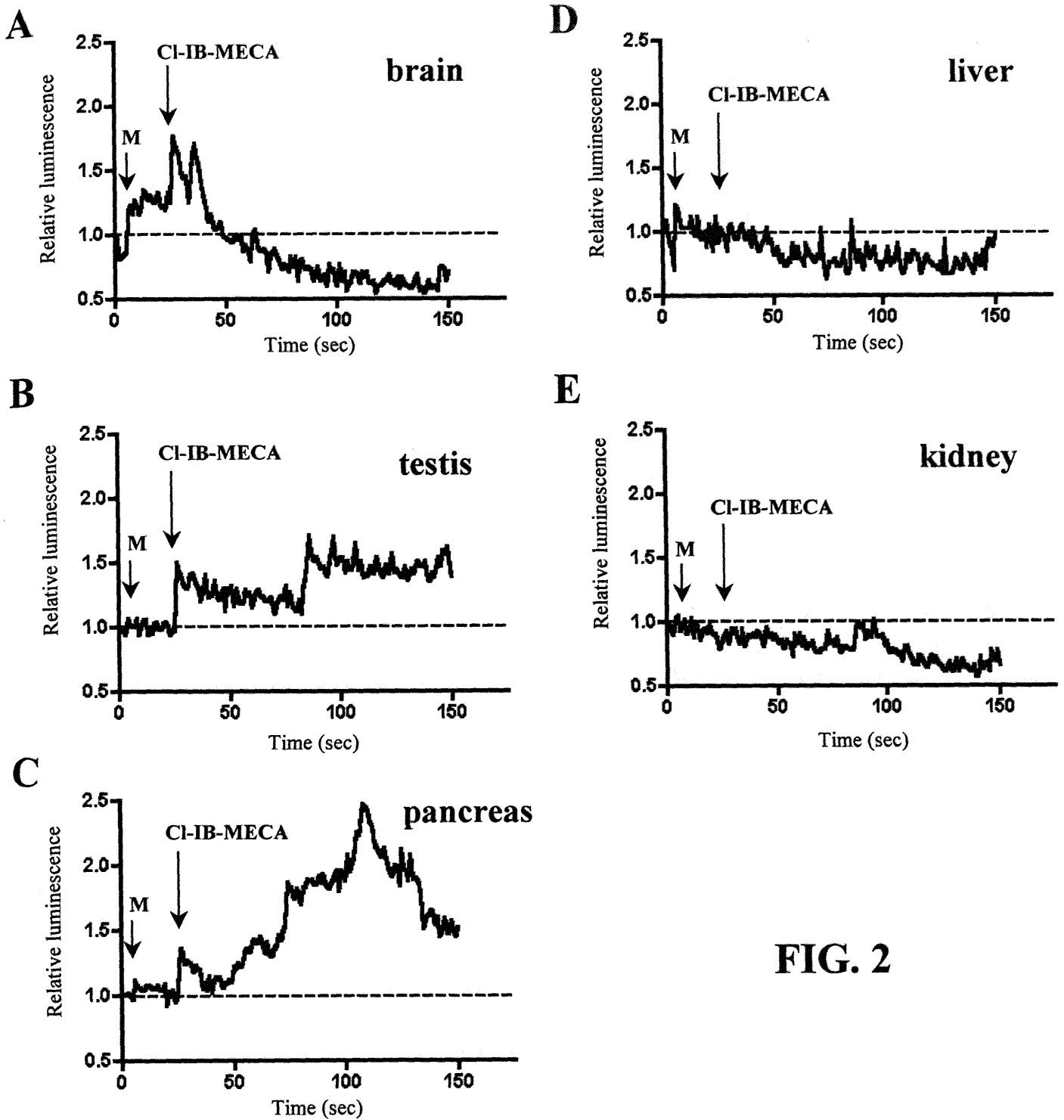


FIG. 2

図3-6 アポエクオリン発現マウスの各臓器におけるCI-IB-MECA添加による細胞内Ca²⁺量上昇

アポエクオリン発現マウスの脳(A)、精巣(B)、膵臓(C)、肝臓(D)、腎臓(E)の各スライス断片に、RPMI1640培地(M)および最終濃度5 μ MのA3AR特異的アゴニストCI-IB-MECAを添加することにより生じる発光量を、ルミノメーターを用いて検出した。発光量は、各臓器に何も添加していない時の発光量を1とした相対値で示す。



図3-7 RT-PCR法によるA3AR遺伝子の発現解析

RT-PCR法を用いて、アポエクオリン発現マウスの各臓器におけるA3AR遺伝子の発現を検出した。PCRには、A3ARおよびβアクチンを特異的に増幅するプライマーセットを用いた。

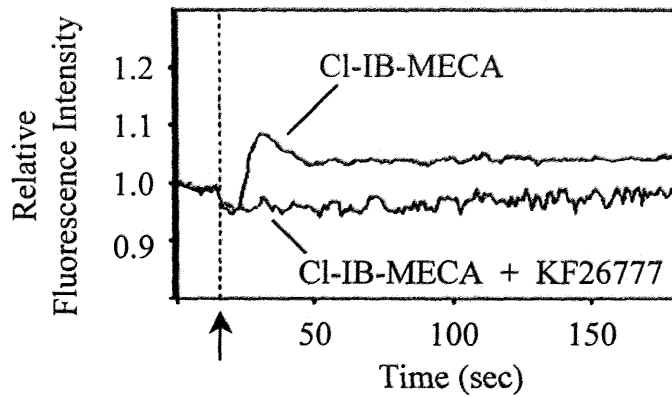
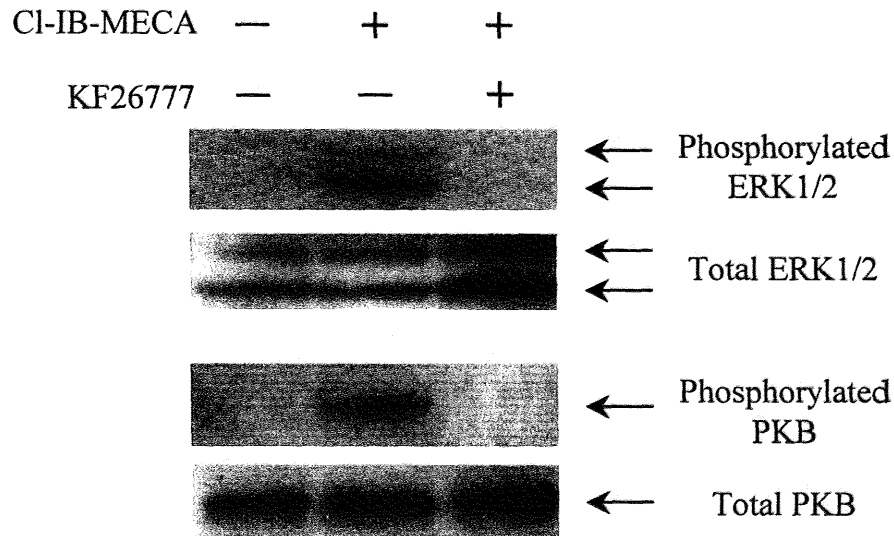
A**B**

図3-8 膵臓由来細胞でのA3ARアゴニスト添加による細胞内Ca²⁺量上昇およびERK1/2とPKBのリン酸化

(A) 膵臓由来細胞でのCI-IB-MECA添加による細胞内Ca²⁺量の上昇

キメラA3AR置換マウスの膵臓由来細胞に5 μ MのCI-IB-MECAを添加した時と、5 μ MのCI-IB-MECA添加5分前に5 μ MのKF26777を添加した時の細胞内Ca²⁺量の変化をFluo-3を用いて検出した。

Fluo-3の蛍光強度は、リガンド非添加時の蛍光量を1とした相対値で示す。

(B) 膵臓由来細胞でのCI-IB-MECA添加によるERK1/2およびPKBのリン酸化

キメラA3AR置換マウスの膵臓由来細胞に5 μ MのCI-IB-MECAを添加し、2分後でのERK1/2およびPKBのリン酸化をウエスタンブロット法を用いて検出した。

5 μ MのヒトA3AR特異的アンタゴニストKF26777は、CI-IB-MECAを添加する1分前に添加した。

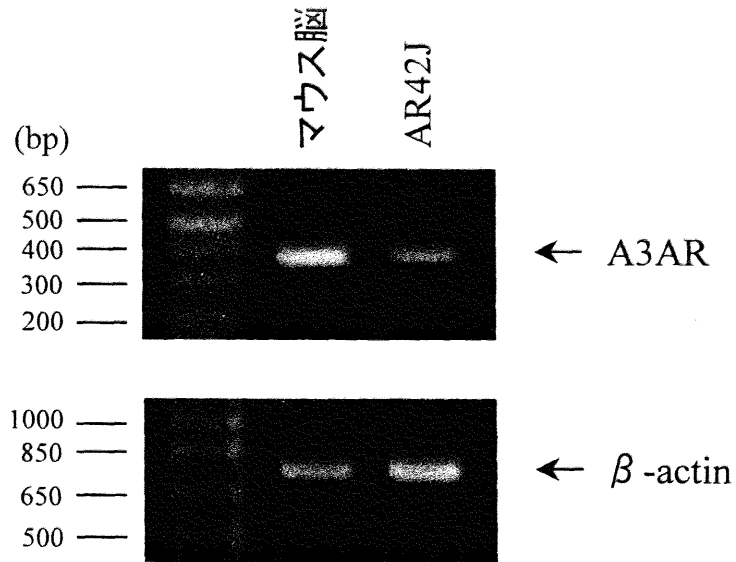
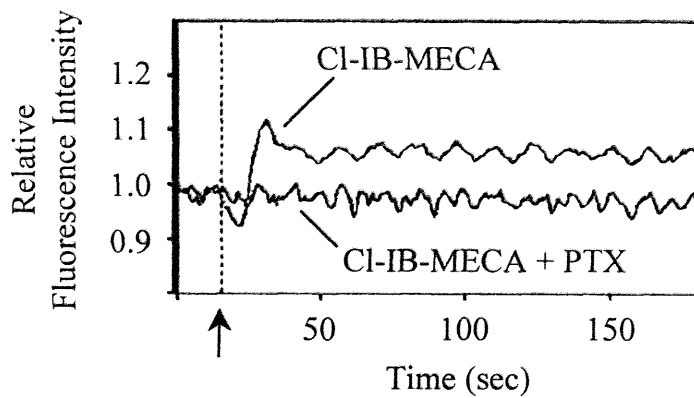


図3-9 AR42J細胞におけるA3AR遺伝子の発現

RT-PCR法を用いて、アポエクオリンマウスの脳およびAR42J細胞株におけるA3AR遺伝子の発現を検出した。

PCRには、A3ARおよび β アクトチンを特異的に増幅するプライマーセットを用いた。

A**B**

CI-IB-MECA	—	+	+
PTX	—	—	+

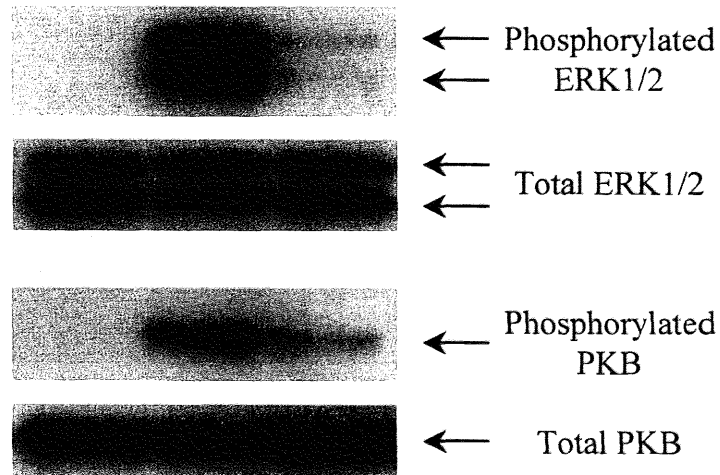


図3-10 AR42J細胞でのA3ARアゴニスト添加による細胞内Ca²⁺量上昇およびERK1/2とPKBのリン酸化

(A) AR42J細胞でのCI-IB-MECA添加による細胞内Ca²⁺量の上昇

AR42J細胞に1 μ MのCI-IB-MECAを添加した時の細胞内Ca²⁺量の変化をFluo-3を用いて検出した。G_{v/o}タンパク質阻害剤PTXは、CI-IB-MECAを添加する24時間前より200 ng/mlの濃度で培地に添加した。

Fluo-3の蛍光強度は、リガンド非添加時の蛍光量を1とした相対値で示す。

(B) AR42J細胞でのCI-IB-MECA添加によるERK1/2およびPKBのリン酸化

キメラA3AR置換マウス由来BMMCに1 μ MのCI-IB-MECAを添加し、2分後でのERK1/2およびPKBのリン酸化をウエスタンブロット法を用いて検出した。

PTXは、CI-IB-MECAを添加する24時間前より200 ng/mlの濃度で培地に添加した。

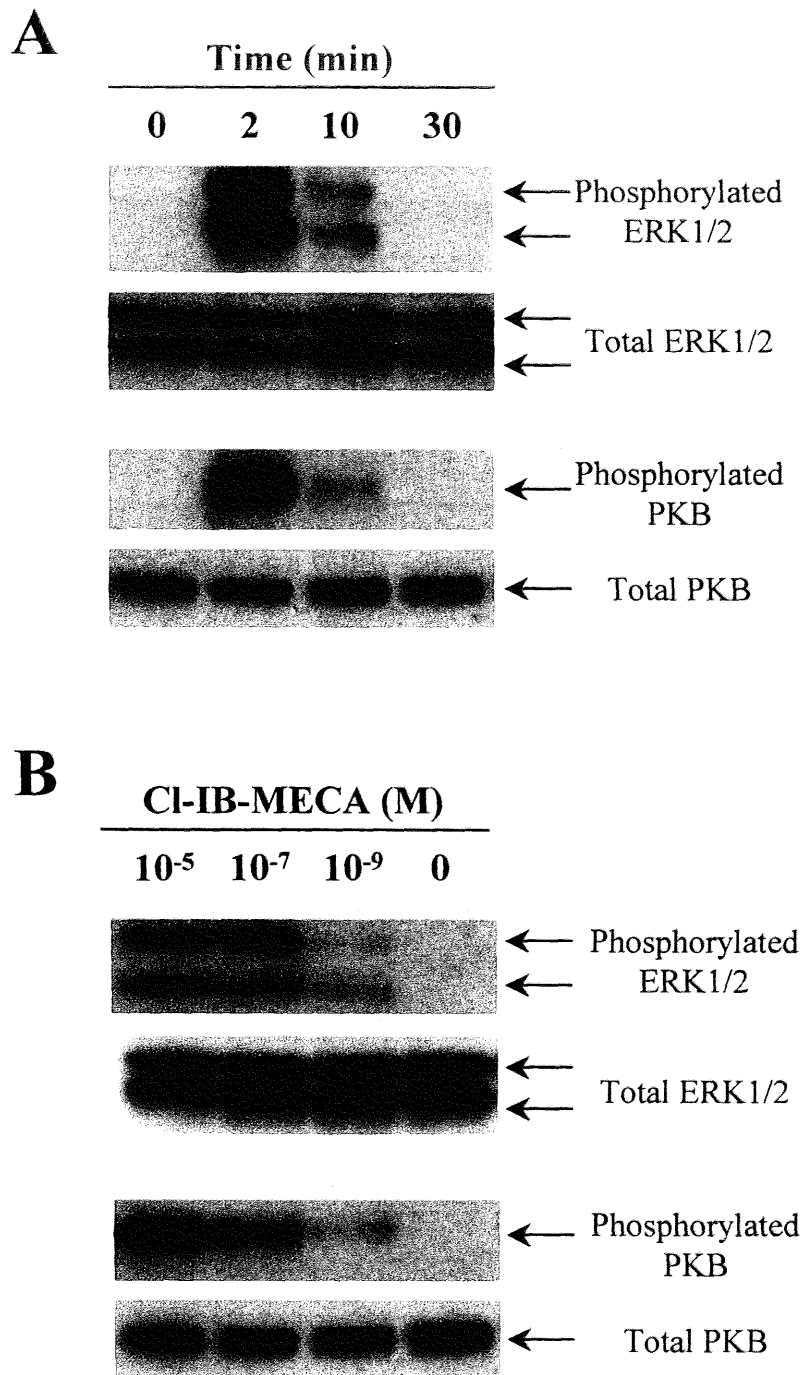


図3-11 AR42J細胞でのCI-IB-MECA添加によるERK1/2とPKBのリン酸化の経時変化および濃度依存性

- (A) CI-IB-MECA添加によるERK1/2およびPKBのリン酸化の経時変化
AR42J細胞に $1 \mu\text{M}$ のCI-IB-MECAを添加し、0、2、10、30分後におけるERK1/2およびPKBのリン酸化を検出した。
- (B) CI-IB-MECA添加で誘導されるERK1/2およびPKBのリン酸化の濃度依存性
AR42J細胞に0、1、100、10,000 nMのCI-IB-MECAを添加し、2分後でのERK1/2およびPKBのリン酸化を検出した。

結語

A3ARアンタゴニストは喘息やCOPDなどの炎症に対する新規治療薬として注目されている。しかしながら、げっ歯類 A3AR に対する効果的なアンタゴニストが存在しないことは、医薬品の初期開発ステージにおいて重要であるげっ歯類を用いた *in vivo* での前臨床試験を不可能なものとしている。その結果、世界中において A3AR アンタゴニストの医薬品としての開発は未だ進展していない。

第1章において我々は、ヒト A3AR アンタゴニストの *in vivo* 評価が可能なモデル動物として、マウス A3AR 遺伝子をヒト A3AR 配列に置換したヒト A3AR 置換マウスを作製した。しかしながら、ヒト A3AR はマウス体内において、PI3K γ を介したシグナル伝達を活性化することが出来なかった。この結果は、PI3K γ の活性化に関与するマウス G タンパク質はヒト A3AR とカップリング出来ないことを示唆しており、A3AR と G タンパク質のカップリングにおける種差の存在について考察を行うことが出来た。

第2章において我々は、A3AR と G タンパク質のカップリングにおける種差の問題を克服するために、ヒト/マウスのキメラ A3AR (細胞内領域はマウス A3AR 配列から成り、細胞外領域および細胞膜領域はヒト A3AR 配列から成る) を設計し、マウス A3AR 遺伝子をそのキメラ A3AR 配列に置換した、キメラ A3AR 置換マウスを作製した。本マウスを用いた解析より、マウス体内においてキメラ A3AR はマウス G タンパク質とカップリングし、PI3K γ を介したシグナル伝達を正常に活性化出来ることが明らかとなった。また、本マウスを用いることにより、A3AR によって誘導される細胞内 Ca²⁺量の上昇やマスト細胞の脱顆粒の増強は、ヒト A3AR 特異的アンタゴニストによって完全に抑制されることを確認した。以上より、キメラ A3AR 置換マウスはヒト A3AR アンタゴニストの評価が可能である“A3AR ヒト化マウス”であることが示された。

第3章において我々は、アポエクオリン発現マウスおよびキメラ A3AR 置換マウスを用いることにより、初めて膵臓における A3AR の機能的発現を発見した。本結果は、今まで知られていなかった膵臓における A3AR の生理機能について示唆を与えるとともに、膵炎や糖尿病、膵ガンなどの疾患に対する A3AR アゴニストの治療薬としての可能性も示している。

本研究で開発に成功した“A3AR ヒト化マウス”は、喘息や COPD などの炎症に対する治療薬としての A3AR アンタゴニストの薬理的評価を行うための非常に強力なモデル動物となる。今後は、本マウスを用いて A3AR アンタゴニストの医薬品としての開発を進展させていきたい。また、膵臓における A3AR の機能解析や膵臓に関する疾患の治療ターゲットとしての A3AR の可能性についてもさらに研究を続行していきたい。加えて、本研究で作製したアポエクオリン発現マウスと“A3AR ヒト化マウス”を用いることにより、さらに様々な臓器や組織における A3AR の新たな機能を明らかとし、未だ不明な点の多い A3AR の生理学的機能の解明に貢献していくことが出来れば幸いである。

引用文献

- 1) Stadel JM, Wilson S, Bergsma DJ. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:430-7.
- 2) Rohrer DK, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* 1998;78:35-52.
- 3) Flower DR. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1999;1422:207-34.
- 4) Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:368-76.
- 5) Watson S, Arkininstall S. *The G-protein linked receptor FactsBook*. London: Academic Press, 1994.
- 6) Baraldi PG., Cacciari B, Romagnoli R, Merighi S, Varani K, Borea PA, Spalluto G. A₃ adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med Res Rev* 2000;20:103-28.
- 7) Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine A₃ receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 2003;3:445-62.
- 8) Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:581-606.
- 9) Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.
- 10) Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;14:99-108.
- 11) Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:581-606.
- 12) Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.
- 13) Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;14:99-108.
- 14) Schulte G, Fredholm BB. Signaling pathway from the human adenosine A₃ receptor expressed in Chinese hamster ovary cells to the extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 2002;62:1137-46.
- 15) Englert M, Quitterer U, Klotz KN. Effector coupling of stably transfected human A₃ adenosine receptors in CHO cells. *Biochem Pharmacol* 2002;64:61-65.
- 16) Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 2003;15:813-27.
- 17) Wymann MP, Bjorklof K, Calvez R, Finan P, Thomast M, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase γ : a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem Soc Trans* 2003;31:275-80.

- 18) Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT. The G $\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 1997;89:105–14.
- 19) Hammarberg C, Fredholm BB, Schulte G. Adenosine A₃ receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2 via phosphatidylinositol-3'-kinase. *Biochem Pharmacol* 2004;67:129–34.
- 20) Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Wymann MP. Phosphoinositide 3-kinase γ is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 2002;16:441–51.
- 21) Brambilla R, Cattabeni F, Ceruti S, Barbieri D, Franceschi C, Kim YC, Jacobson KA, Klotz KN, Lohse MJ, Abbracchio MP. Activation of the A₃ adenosine receptor affects cell cycle progression and cell growth. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361:225–34.
- 22) Gao Z, Li BS, Day YJ, Linden J. A₃ adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol Pharmacol* 2001;59:76–82.
- 23) Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Borea PA. A₃ adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 2005;280:19516–26.
- 24) Trincavelli ML, Tuscano D, Marroni M, Klotz KN, Lucacchini A, Martini C. Involvement of mitogen protein kinase cascade in agonist-mediated human A₃ adenosine receptor regulation. *Biochim Biophys Acta* 2002;1591:55–62.
- 25) Fishman P, Bar-Yehuda S. Pharmacology and therapeutic applications of A₃ receptor subtype. *Curr Top Med Chem* 2003;3:463–9.
- 26) Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Erlanger A, Ohana G, Harish A, Merimski O, Barer F, Fishman P. The A₃ adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition. *Clin Cancer Res* 2004;10:4472–9.
- 27) van Troostenburg AR, Clark EV, Carey WD, Warrington SJ, Kerns WD, Cohn I, Silverman MH, Bar-Yehuda S, Fong KL, Fishman P. Tolerability, pharmacokinetics and concentration-dependent hemodynamic effects of oral CF101, an A₃ adenosine receptor agonist, in healthy young men. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42:534–42.
- 28) Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 1993;268:16887–90.
- 29) Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A₃ adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* 2000;275:4429–34.
- 30) Tilley SL, Tsai M, Williams CM, Wang ZS, Erikson CJ, Galli SJ, Koller BH.

- Identification of A₃ receptor- and mast cell-dependent and -independent components of adenosine-mediated airway responsiveness in mice. *J Immunol* 2003;171:331–7.
- 31) Zhong H, Shlykov SG, Molina JG, Sanborn BM, Jacobson MA, Tilley SL, Blackburn MR. Activation of murine lung mast cells by the adenosine A₃ receptor. *J Immunol* 2003;171:338–45.
- 32) Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A_{2B} and A₃ adenosine receptors. *Circ Res* 2003;92:485–92.
- 33) Young HW, Molina JG, Dimina D, Zhong H, Jacobson M, Chan LN, Chan TS, Lee JJ, Blackburn MR. A₃ adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 2004;173:1380–9.
- 34) Saki M, Tsumuki H, Nonaka H, Shimada J, Ichimura M. KF26777 (2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo[2,1-i]purin-5(4H)-one dihydrochloride), a new potent and selective adenosine A₃ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2002;444:133–41.
- 35) Zhao Z, Francis C, Ravid K. Characterization of the mouse A₃ adenosine receptor gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics* 1999;57:152–5.
- 36) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167:2250–6.
- 37) Nakahata T, Spicer SS, Cantey JR, Ogawa M. Clonal assay of mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. *Blood* 1982;60:352–61.
- 38) Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099–108.
- 39) Li AH, Moro S, Forsyth N, Melman N, Ji XD, Jacobson KA. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacyl-2, 4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* 1999;42:706–21.
- 40) Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of β -hexosaminidase and β -glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol* 1979;123:1445–50.
- 41) Stacey A, Schnieke A, Kerr M, Scott A, McKee C, Cottingham I, Binas B, Wilde C, Colman A. Lactation is disrupted by α -lactalbumin deficiency and can be restored by human α -lactalbumin gene replacement in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2835–9.
- 42) Kitamoto T, Nakamura K, Nakao K, Shibuya S, Shin RW, Gondo Y, Katsuki M, Tateishi J. Humanized prion protein knock-in by Cre-induced site-specific recombination in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:742–7.
- 43) Divoky V, Liu Z, Ryan TM, Prchal JF, Townes TM, Prchal JT. Mouse model of

- congenital polycythemia: Homologous replacement of murine gene by mutant human erythropoietin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:986–91.
- 44) Kenakin T. Efficacy in drug receptor theory: outdated concept or under-valued tool? *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:400–5.
- 45) Strange PG. Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:89–95.
- 46) Christopoulos A, Kenakin T. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 2002;54:323–74.
- 47) Auchampach JA, Jin X, Wan TC, Caughey GH, Linden J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A₃ receptor and evidence that degranulation is mediated by the A_{2B} receptor. *Mol Pharmacol* 1997;52:846–60.
- 48) Black RG Jr, Guo Y, Ge ZD, Murphree SS, Prabhu SD, Jones WK, Bolli R, Auchampach JA. Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A₃ adenosine receptor. *Circ Res* 2002;91:165–72.
- 49) Jacobson KA, Gao ZG, Chen A, Barak D, Kim SA, Lee K, Link A, Rompaey PV, van Calenbergh S, Liang BT. Neoreceptor concept based on molecular complementarity in GPCRs: a mutant adenosine A₃ receptor with selectively enhanced affinity for amine-modified nucleosides. *J Med Chem* 2001;44:4125–36.
- 50) Gao ZG, Chen A, Barak D, Kim SK, Müller CE, Jacobson KA. Identification by site-directed mutagenesis of residues involved in ligand recognition and activation of the human A₃ adenosine receptor. *J Biol Chem* 2002;277:19056–63.
- 51) Gao ZG, Kim SK, Biadatti T, Chen W, Lee K, Barak D, Kim SG, Johnson CR, Jacobson KA. Structural determinants of A₃ adenosine receptor activation: nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. *J Med Chem* 2002;45:4471–84.
- 52) Gao ZG, Kim SK, Gross AS, Chen A, Blaustein JB, Jacobson KA. Identification of essential residues involved in the allosteric modulation of the human A₃ adenosine receptor. *Mol Pharmacol* 2003;63:1021–31.
- 53) Yeagle PL, Albert AD. A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry* 2003;42:1365–8.
- 54) Oksenberg D, Marsters SA, O'Dowd BF, Jin H, Havlik S, Peroutka SJ, Ashkenazi A. A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT_{1B} receptors. *Nature* 1992;360:161–3.
- 55) Fong TM, Yu H, Strader CD. Molecular basis for the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and RP67580. *J Biol Chem* 1992;267:25668–71.
- 56) Sachais BS, Snider RM, Lowe JA 3rd, Krause JE. Molecular basis for the species selectivity of the substance P antagonist CP-96,345. *J Biol Chem* 1993;268:2319–23.
- 57) Link R, Daunt D, Barsh G, Chruscinski A, Kobilka B. Cloning of two mouse genes encoding α 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse α 2-C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist

- binding. *Mol Pharmacol* 1992;42:16–27.
- 58) Quirion R, Regoli D, Rioux F, St-Pierre S. Structure-activity studies with neurotensin: analysis of positions 9, 10 and 11. *Br J Pharmacol* 1980;69:689–92.
- 59) Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962;59:223–39.
- 60) Shimomura O, Johnson FH. Regeneration of the photoprotein aequorin. *Nature* 1975;256:236–8.
- 61) Shimomura O. Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:359–63.
- 62) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, Sugano S, Saito I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 1995;23:3816–21.
- 63) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997;407:313–9.
- 64) Laudadio MA, Psarropoulou C. The A₃ adenosine receptor agonist 2-Cl-IB-MECA facilitates epileptiform discharges in the CA3 area of immature rat hippocampal slices. *Epilepsy Res* 2004;59:83–94.
- 65) Todisco A, Ramamoorthy S, Witham T, Pausawasdi N, Srinivasan S, Dickinson CJ, Askari FK, Krametter D. Molecular mechanisms for the antiapoptotic action of gastrin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:298–307.
- 66) Williams JA, Sans MD, Tashiro M, Schafer C, Bragado MJ, Dabrowski A. Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. *Pharmacol Toxicol* 2002;91:297–303.
- 67) Dabrowski A. Exocrine pancreas; molecular basis for intracellular signaling, damage and protection - Polish experience. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:167–81.
- 68) Noji T, Nan-ya K, Katagiri C, Mizutani M, Sano J, Nishikawa S, Karasawa A, Kusaka H. Adenosine uptake inhibition ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 200;25:387–92.
- 69) Satoh A, Shimosegawa T, Satoh K, Ito H, Kohno Y, Masamune A, Fujita M, Toyota T. Activation of adenosine A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* 2000;119:829–36.
- 70) Luthen R, Niederau C, Grendell JH. Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1995;268:592–604.
- 71) Satoh A, Satoh K, Masamune A, Yamagiwa T, Shimosegawa T. Activation of adenosine A2a receptor pathway reduces leukocyte infiltration but enhances edema formation in rat caerulein pancreatitis. *Pancreas* 2002;24:75–82.
- 72) Pavlovic D, Andersen NA, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 contributes to cytokine-induced

- apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:267–74.
- 73) Yoshida S, Yokota T, Ujiki M, Ding XZ, Pelham C, Adrian TE, Talamonti MS, Bell RH Jr, Denham W. Pancreatic cancer stimulates pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1241–5.
- 74) Watanabe H, Saito H, Rychahou PG, Uchida T, Evers BM. Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation. *Gastroenterology* 2005;128:1391–404.
- 75) Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 2004;145:2653–9.
- 76) Dickson LM, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:192–8.
- 77) Kowluru A. Novel regulatory roles for protein phosphatase-2A in the islet beta cell. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1681–91.
- 78) Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 2003;89:2110–5.
- 79) McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1215–25.
- 80) Semba S, Moriya T, Kimura W, Yamakawa M. Phosphorylated Akt/PKB controls cell growth and apoptosis in intraductal papillary-mucinous tumor and invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2003;26:250–7.

謝辞

学生時代、常に厳しくも暖かな御指導を通して研究者としての基礎を築いて下さり、また本研究をまとめるにあたり多大な御指導ならびに御助力を賜りました、千葉大学大学院自然科学研究科 田村隆明教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行を通して、終始御指導を頂きました協和発酵工業（株）医薬研究センター抗体部門主任研究員 佐藤光男博士に感謝致します。本研究を行うにあたり、素晴らしい技術で実験を進めて下さった井上美保氏、楠万知氏、的確な御助言ならびに御指導を頂きました政木茂浩氏、佐木真由美氏、佐伯智氏、森勝弘氏、市村通朗博士、佐々木克敏博士、倉田和美博士、松下武史博士、丹羽倫平博士、細井伸二博士、小池正道博士、真部治彦博士をはじめとする協和発酵工業（株）の皆様にも心より感謝致します。また、いつも様々な御支援を頂きました協和発酵工業（株）医薬研究センター抗体部門 細胞工学グループの折井玲子氏、今田輝義氏、見坂博文氏、飯田茂氏、木下聡子氏、神田豊氏、榊原敏弘氏、國麗子氏、山根尚子氏、橋詰由美子氏、北島和子氏、中野了輔氏、小林有己氏、今井春江氏、山田剛士氏、柴田真美氏、大嶋理恵子氏に深く感謝致します。

本研究を行う機会を与えて下さった協和発酵工業（株）医薬研究センター抗体部門 部門長 設楽研也博士ならびにバイオフィロンティア研究所所長 中西聡博士をはじめとする協和発酵工業（株）の幹部の皆様にも感謝致します。

最後に、どんな時も絶えず支え続けてくれた妻 順子と愛娘 真央に心より感謝致します。

公表論文

1. K. Yamano, M. Inoue, S. Masaki, M. Saki, M. Ichimura, and M. Satoh
Human adenosine A₃ receptor leads to intracellular Ca²⁺ mobilization but is insufficient to activate the signaling pathway via phosphoinositide 3-kinase γ in mice
Biochem. Pharmacol. 70(10), 1487–1496 (2005)
2. K. Yamano, M. Inoue, S. Masaki, M. Saki, M. Ichimura, and M. Satoh
Generation of adenosine A₃ receptor functionally humanized mice for the evaluation of the human antagonists
Biochem. Pharmacol. 71(3), 294–306 (2006)



Human adenosine A₃ receptor leads to intracellular Ca²⁺ mobilization but is insufficient to activate the signaling pathway via phosphoinositide 3-kinase γ in mice

Kazuya Yamano^a, Miho Inoue^a, Shigehiro Masaki^b, Mayumi Saki^b,
Michio Ichimura^a, Mitsuo Satoh^{a,*}

^a Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 3-6-6 Asahi-machi, Machida-shi, Tokyo 194-8533, Japan

^b Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 1188 Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731, Japan

Received 27 June 2005; accepted 10 August 2005

Abstract

Selective antagonists for the adenosine A₃ receptor (A₃AR), a member of the G protein-coupled receptors, have been indicated as potential drugs for anti-asthma or anti-inflammation. However, potent antagonists for the rodent A₃AR have not been identified. To evaluate the pharmacological effects of human A₃AR antagonists in mice, we here generated A₃AR-humanized mice, in which the mouse A₃AR gene was replaced by its human counterpart. The expression levels of human A₃AR in the A₃AR-humanized mice were equivalent to those of mouse A₃AR in wild-type mice. Elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration induced by an A₃AR agonist was observed in bone marrow-derived mast cells from the A₃AR-humanized mice and this Ca²⁺ mobilization was completely antagonized by a human A₃AR antagonist. However, antigen-dependent degranulation was not potentiated by the A₃AR agonist in the mast cells from A₃AR-humanized mice. The agonist-stimulated human A₃AR did not lead to the phosphorylation of either extracellular signal-regulated kinase 1/2 or protein kinase B in A₃AR-humanized mice. The rate of human A₃AR internalization in the mast cells was also markedly decreased compared with that of mouse A₃AR in the mast cells. These results demonstrate that the human A₃AR is insufficient to activate phosphoinositide 3-kinase γ -dependent signaling pathways in mice, probably due to the uncoupling of member(s) of the G proteins, which are capable of activating phosphoinositide 3-kinase γ , to the human A₃AR, despite the mouse G protein(s) responsible for the Ca²⁺ elevation are coupled with the human A₃AR.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Adenosine A₃ receptor; Phosphoinositide 3-kinase γ ; G_{i/o} protein; G protein-coupled receptor; Humanized mice; Species difference

Abbreviations: A₃AR, adenosine A₃ receptor; A₃AR^{h/h} mice, A₃AR-humanized mice; BMMCs, bone marrow-derived mast cells; [Ca²⁺]_i, intracellular Ca²⁺ concentration; Cl-IB-MECA, 2-chloro-N⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide; DT-A, diphtheria toxin A fragment; EPO, erythropoietin; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; ES cells, embryonic stem cells; GPCR, G protein-coupled receptor; HAT, hypoxanthine/aminopterin/thymidine; HEK293 cells, human embryonic kidney 293 cells; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; [¹²⁵I]AB-MECA, N⁶-(4-amino-3-[¹²⁵I]iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide; KF26777, 2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo[2,1-i]purin-5(4H)-one dihydrochloride; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 α ; PCR, polymerase chain reaction; PI3K γ , phosphoinositide 3-kinase γ ; PKB, protein kinase B; PLC β , phospholipase C β ; (R)-PIA, (R)-N⁶-phenylisopropyladenosine; RANTES, regulated on activation of T cell expressed and secreted; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TNP, 2,4,6-trinitrophenyl; anti-TNP IgE, monoclonal IgE antibody against 2,4,6-trinitrophenyl

* Corresponding author. Tel.: +81 42 725 2555; fax: +81 42 726 8330.

E-mail address: msatoh@kyowa.co.jp (M. Satoh).

1. Introduction

Adenosine physiologically acts through four G protein-coupled receptors (GPCRs), the A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ receptors [1–3]. The adenosine A₃ receptor (A₃AR) is known to couple to some G proteins of the pertussis toxin-sensitive G_{i/o} family [4,5]. The adenosine-bound A₃AR induces $\beta\gamma$ subunits release from the heterotrimeric G_{i/o} proteins, and the α and $\beta\gamma$ subunits regulate diverse cellular signaling pathways [6]. Some of the released $\beta\gamma$ subunits lead to the mobilization of intracellular Ca²⁺ via the signal transducers, such as phospholipase C (PLC) β [6,7], and some others activate phosphoinositide 3-kinase (PI3K) γ , a class IB PI3K isoform [8]. PI3K γ leads to the phosphorylation of protein kinase B (PKB), also referred to as Akt [4,9], and to the phosphorylation of members of the

mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, including extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 [4] and stress-activated protein kinase p38 [10]. These phosphorylated proteins play important roles in cellular phenomena, such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis [11–15]. In mast cells, PI3K γ plays a key role in the potentiation of antigen/IgE-dependent mast cell degranulation by the A3AR [9].

Recently, the A3AR has attracted considerable interest as a novel drug target against cerebral/cardiac ischemia, cancer, and inflammation [16–18]. A number of studies using A3AR-deficient mice have suggested that the A3AR antagonists possess potential as drugs for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease [19–21]. Thus, potent and selective antagonists for the human A3AR are screened and identified, whereas all of the human A3AR antagonists show extremely low binding affinity for the rodent A3AR (the K_i values of A3AR antagonists for the rodent A3AR are 1000 times lower than that for the human A3AR) and potent antagonists for the rodent A3AR has not been identified [16,17]. In general, animal studies using rodent models are essential for the evaluation of pharmacological effects of new therapeutic agents through the early preclinical stages of drug development. However, the large species differences between rodent and human A3AR and the lack of highly potent antagonists for the rodent A3AR are currently serious drawbacks in the further pharmacological evaluation of A3AR antagonists, yielding only a poor understanding of physiological function of the human A3AR [16,17].

In this study, we generated mice in which the A3AR gene was replaced by its human counterpart, A3AR-humanized (A3AR^{h/h}) mice, in order to evaluate the pharmacological effects of human A3AR antagonists in mouse models. The intracellular Ca²⁺ mobilization evoked by an A3AR agonist was antagonized by the human A3AR antagonist; however, unexpectedly, the activation of the PI3K γ -dependent signaling pathway by the agonist-mediated A3AR was abolished in bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from the A3AR^{h/h} mice. Our findings suggest that the replacement of the A3AR gene with its human counterpart may be functionally insufficient to generate A3AR-humanized mice, probably due to the uncoupling between human A3AR and mouse G protein.

2. Materials and methods

2.1. Materials

*N*⁶-(4-Amino-3-[¹²⁵I]iodobenzyl)adenosine-5'-*N*-methyluronamide ([¹²⁵I]AB-MECA, specific activity, 74 TBq/mmol) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). (*R*)-*N*⁶-Phenylisopropyladenosine ((*R*)-PIA), adeno-

sine deaminase, macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), and regulated on activation of T cell expressed and secreted (RANTES) were obtained from SIGMA (St. Louis, MO). Rabbit anti-ERK1/2 antibody, rabbit anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) antibody, rabbit anti-PKB antibody, rabbit anti-phospho PKB (Ser473) antibody, and the Phototope HRP Western Blot Detection Kit were purchased from Cell Signals Technology (Beverly, MA). Fluo-3 AM was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). 2-Chloro-*N*⁶-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-*N*-methyluronamide (Cl-IB-MECA) and 2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-5(4*H*)-one dihydrochloride (KF26777) were synthesized in our laboratories. 2,4,6-Trinitrophenyl bovine serum albumin (TNP-BSA) was from LSL (Tokyo, Japan). Mouse monoclonal IgE antibody against 2,4,6-trinitrophenyl (anti-TNP IgE) was purified from the culture supernatants of a TNP-immunized mouse B lymphocyte cell line (American Type Culture Collection Number; TIB-142).

2.2. Construction of a targeting vector

Mouse genomic DNA including the A3AR gene was cloned by polymerase chain reaction (PCR) screening from bacterial artificial chromosome clones of a 129 mouse embryonic stem (ES) cells library (Genome Systems, St. Louis, MO). Human A3AR cDNA was cloned by PCR from a human liver cDNA library (Invitrogen, Carlsbad, CA). A targeting vector designed to replace the sequence coding for the mouse A3AR gene by the human A3AR cDNA sequence was generated containing the following six DNA fragments: the diphtheria toxin A fragment (DT-A) expression cassette from the pKO select DT vector (Lexicon, The Woodlands, TX) as a negative selectable marker, a 6-kb mouse genomic DNA region (from the *Sma*I site in the 5' external sequence to immediately upstream of the ATG initiation codon in exon 1 of the A3AR gene), a 0.96-kb region in the human A3AR cDNA (from the ATG initiation codon to the TAG stop codon), a 0.45-kb mouse genomic DNA region (from immediately downstream of the TAG stop codon to the polyadenylation site in exon 2 of the A3AR gene), the *loxP* site-flanked hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) expression cassette from the pKO select HPRT vector (Lexicon) as a positive selectable marker, and a 2.8-kb mouse genomic DNA region (from the *Bam*HI site in exon 2 to the *Apa*I site in the 3' external sequence) (Fig. 1A).

2.3. Homologous recombination in ES cells

The targeting vector was linearized with *Sal*I and introduced into mouse ES cell line AB2.2 from the 129/SvEv strain (Lexicon) by electroporation. After selection in hypoxanthine/aminopterin/thymidine (HAT) selection medium (Lexicon), single colonies were isolated and

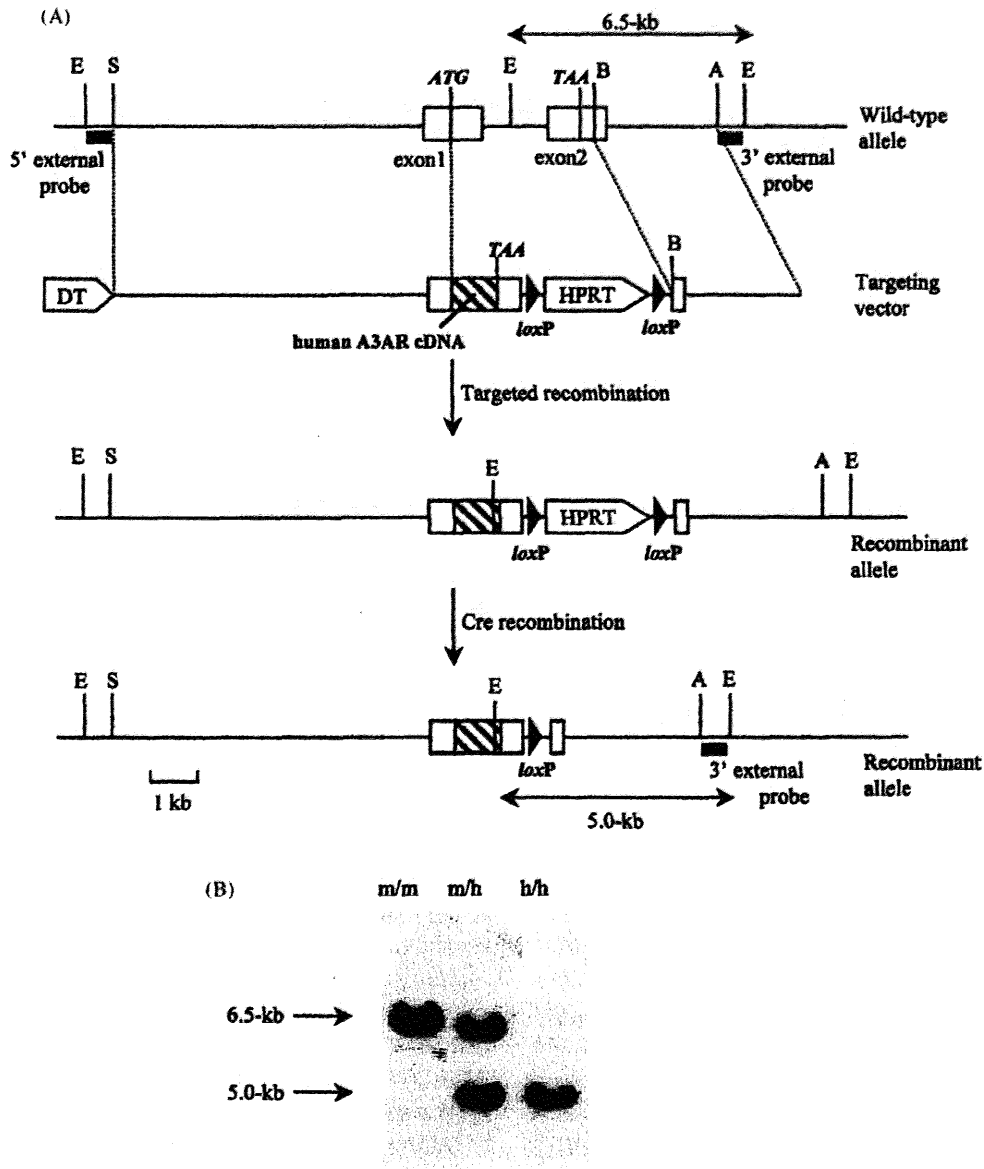


Fig. 1. Targeted replacement of mouse A3AR gene by the human gene. (A) Schematic drawing of the targeting vector and the recombinant alleles. Restriction sites *ApaI* (A), *EcoRI* (E), *BamHI* (B), *SmaI* (S), and the location of the probe used for ES cell screening (two external probes derived from the 5' external sequence from the *EcoRI* site to the *SmaI* site, and the 3' external sequence from the *ApaI* site to the *EcoRI* site) and genotyping are indicated. The two exons are represented by open rectangles. The targeting vector contained a DT-A expression cassette as a negative selectable marker and an HPRT expression cassette as a positive selectable marker, and this vector replaced the region (from the ATG initiation codon to the TAA stop codon in the mouse A3AR gene) with the human A3AR cDNA sequence (from the ATG initiation codon to the TAG stop codon; striped box) by homologous recombination. The HPRT expression cassette was removed from the genomic DNA by a Cre/*loxP* recombination system. (B) Genomic Southern analysis of A3AR-humanized mice. After *EcoRI* digestion of genomic DNA purified from wild-type mice (m/m), A3AR^{h/h} mice (h/h), and heterozygotes (m/h), the 3' external probe detected a 6.5-kb band in the wild-type allele and a 5.0-kb band in the targeted allele.

verified by Southern blot analysis using two external probes derived from the 5' external sequence from the *EcoRI* site to the *SmaI* site, and from the 3' external sequence from the *ApaI* site to the *EcoRI* site (Fig. 1A). Identified homologous recombinant clones were transiently transfected with Cre recombinase expression vector pBS185 (Invitrogen) in order to remove the HPRT expression cassette from the recombinant allele. Clones were screened in 6-thioguanine (SIGMA) and deletion of the HPRT expression cassette was verified by Southern blot analysis using the external probes.

2.4. Generation of A3AR-humanized mice

The ES cell clones were injected into 3.5-day-old blastocysts from C57BL/6J mice (CLEA Japan, Tokyo, Japan) and were then transferred into the oviducts of pseudopregnant ICR females (CLEA Japan). The chimeric males were backcrossed to C57/BL6J mice and germ-line transmission of the mutant allele was detected by Southern blot analysis of tail-biopsy DNA from agouti offspring. Heterozygotes were intercrossed to produce homozygotes. The mice were maintained under specific pathogen-free conditions. This study

was conducted according to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., in compliance with national laws and policies.

2.5. Generation of BMBCs

BMBCs were generated from femoral bone marrow cells of 8- to 10-week-old mice according to a previously described method [22]. Briefly, the cells were grown in BMBC medium, which consist of RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen), 10 mg/L gentamicin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 100 μ M non-essential amino acid, 100 μ M sodium pyruvate, and 10% (v/v) pokeweed mitogen-stimulated spleen-conditioned medium as a source of mast cell growth factors [23], at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After 5 weeks, more than 95% of the non-adherent cells were identifiable as BMBCs, as determined by FACS analysis of the cell surface expression of c-kit and high-affinity IgE receptor.

2.6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNAs were isolated from mouse tissues and BMBCs using the RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and single-stranded cDNAs were synthesized from 3 μ g of each total RNA using the Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR primers were synthesized for the human A3AR (sense primer 5'-AACAGCA CTG CTCTGTCATTGGCC-3' and antisense primer 5'-TCAGA GGGATGGCAGACCACACAG-3', which amplify a 911-bp fragment), the mouse A3AR (sense primer 5'-AACACC ACGGAGACGGACTGGCTG-3' and antisense primer 5'-AATCTGAGGTCTGACAGAGCCTGAG-3', which amplify a 913-bp fragment), and β -actin (sense primer 5'-GATATCGCTGCGCTCGTCTCGAC-3' and antisense primer 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3', which amplify a 793-bp fragment). These primers were synthesized in Proligo (Boulder, CO). PCR was carried out using TaKaRa ExTaq polymerase (TaKaRa BIO, Shiga, Japan) in GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The following PCR conditions were used for the A3AR cDNA: heating at 94 °C for 5 min and 30 subsequent cycles at 94 °C for 1 min and 68 °C for 2 min. The following PCR conditions were used for β -actin cDNA: heating at 94 °C for 5 min and 22 subsequent cycles at 94 °C for 1 min and 68 °C for 2 min. The PCR products were subjected to electrophoresis in 1.2% agarose gel for analysis.

2.7. Receptor binding assay

A saturation binding assay with the A3AR agonist [¹²⁵I]AB-MECA was carried out according to the method

of Saki et al. [24]. Briefly, membranes of the BMBCs (100 μ g) were incubated for 120 min at 25 °C with 2 U/ml adenosine deaminase and 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, or 2.0 nM [¹²⁵I]AB-MECA in binding assay buffer (Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂). The assays were performed in the presence of 1% of the final concentration of dimethyl sulfoxide, and non-specific binding was determined in the presence of 100 μ M (R)-PIA. Binding reactions were terminated by filtration of the membranes through a MultiScreen GF/B filter (MILLIPORE, Bedford, MA). After three washes with ice-cold binding assay buffer, the radioactivity of the samples was determined using a COBRA γ -counter (Packard, Downers Grove, IL). The competitive binding assay was carried out according to the method described above (with the addition of 0.8 nM [¹²⁵I]AB-MECA and 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10, or 100 nM KF26777).

2.8. Measurement of intracellular Ca²⁺ concentration

BMBCs were incubated in BMBC medium with saturating concentrations of anti-TNP IgE (100 ng/ml per 10⁶ cells) overnight. After washing the cells twice in Ca²⁺ assay buffer (115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 13.8 mM glucose, 2.5 mM Probenecid, and 20 mM HEPES, pH 7.4, with 0.2%, w/v, BSA), they were incubated for 60 min at 37 °C with 5 μ M Fluo-3 AM and 0.5% pluronic F-127 in the Ca²⁺ assay buffer in the dark. After the cells were washed twice in Ca²⁺ assay buffer, 2.5 \times 10⁴ cells were transferred to each well of 96-well plates and were suspended in the Ca²⁺ assay buffer at 2.5 \times 10⁵ cells/ml. After incubation for 20 min, the fluorescence intensity of Fluo-3 in each well was quantified using FDSS 6000 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) [25]. For measurement of the antagonist activity, the BMBCs were incubated with 100 nM KF26777 for 5 min prior to the addition of 100 nM Cl-IB-MECA. The Fluo-3 intensities were monitored every second and were plotted as a ratio against the Fluo-3 intensity at the resting calcium level. Presented data are representative of five independent experiments.

2.9. β -Hexosaminidase release assay

β -Hexosaminidase release from the BMBCs was measured according to modified versions of previously described methods [22,26]. After the anti-TNP IgE-saturated BMBCs (see above) were washed twice in phosphate buffered saline (PBS), the cells were suspended in Tyrode buffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM KH₂PO₄, 0.6 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1%, w/v, glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4), and 0.1%, w/v, BSA) and 5 \times 10⁵ cells were transferred to 96-well plates. The cells were pre-incubated in the presence and absence of 10 nM KF26777 for 1 min prior to incubation with the indicated concentration of Cl-IB-MECA or chemokine (MIP-1 α or RANTES) for 1 min at 37 °C. The cells were

stimulated with 10 ng/ml TNP-BSA for 30 min at 37 °C. The reactions were terminated by centrifugation at 2000 × *g* for 5 min at 4 °C, and the activity of β-hexosaminidase release from the BMDCs in the supernatant was assessed with *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (SIGMA). The results were expressed as a percentage of the total Triton X-100-releasable β-hexosaminidase in whole cells.

2.10. Western blot analysis

BMDCs were stimulated by 1 μM CI-IB-MECA at 37 °C for 0, 3, or 15 min. After two washes in ice-cold PBS, the cells were lysed in lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2%, w/v, SDS, 10%, v/v, glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.1%, w/v, bromophenol blue) and boiled for 2 min. The cellular debris was removed by centrifugation, and the samples were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using e-PAGEL 5–20% (w/v) polyacrylamide gels (ATTO, Tokyo, Japan). After transfer of the proteins onto polyvinylidene difluoride membranes, protein phosphorylation was detected with rabbit phospho-specific ERK1/2, phospho-specific PKB, goat anti-rabbit horseradish peroxidase-coupled secondary antibody, and the Phototope HRP Western Blot Detection Kit. To confirm equal loading in each lane, parallel immunoblots were run in order to detect the unphosphorylated ERK1/2 and PKB using the ERK1/2 and PKB antibodies.

2.11. Internalization assay

A3AR internalization was quantified by evaluating changes in the receptor surface density after treatment of the BMDCs with 1 μM CI-IB-MECA at 37 °C for 15 min. At the end of the incubation period, the cells were rapidly washed twice with ice-cold PBS in order to remove the CI-IB-MECA. The amount of A3AR on the cell surface was evaluated as described above by *receptor binding assay* (with the addition of 2 nM [¹²⁵I]AB-MECA). The A3AR density was expressed as the percentage of total binding versus control CI-IB-MECA-untreated cells (100%).

2.12. Data analysis

The binding parameters were calculated using Prism software (GraphPAD, San Diego, CA). The IC₅₀ values obtained from the competition curves were converted to K_i values by using the Cheng and Prusoff equation [27].

3. Results

3.1. Targeted replacement of the mouse A3AR gene by its human counterpart in mice

The replacement of the mouse A3AR gene by the human A3AR cDNA was accomplished in mouse ES cells using a

homologous recombination system according to the strategy shown in Fig. 1A. After electroporation of the linearized targeting vector into the mouse ES cells, HAT-resistant clones were screened by Southern blot analysis. Sixteen of the 400 clones gave bands of the expected size for the targeted allele. Four of these clones transiently expressed Cre recombinase, and removal of the HPRT expression cassette from the recombinant allele through the Cre/loxP recombination system in 6-thioguanine-resistant clones was ascertained by Southern blot analysis. Injection of the clones into C57BL/6J blastocysts produced 20 chimeric males exhibiting contributions from the ES cells ranging from 60 to 100%, as based on the amount of agouti coloring in the animal's coat. Four of these mice transmitted the recombinant allele through the germ line. The male chimeras were bred to C57BL/6J mice, and heterozygous offspring (A3AR^{m/h} mice) were born. Homozygous mice (A3AR^{h/h} mice) were obtained in crosses between A3AR^{m/h} mice with the expected Mendelian inheritance. The phenotypes were detected by Southern blot analysis of tail-biopsy DNA (Fig. 1B).

3.2. Normal expression of human A3AR mRNA in A3AR^{h/h} mice

Next, we measured the mRNA expression levels of human A3AR in A3AR^{h/h} mice using RT-PCR analysis. The expression levels and distribution of the human A3AR mRNA in A3AR^{h/h} mice were the same as those of the mouse A3AR mRNA in wild-type mice (Fig. 2). In addition, no expression of the mouse A3AR mRNA in A3AR^{h/h} mice was detected (Fig. 2B).

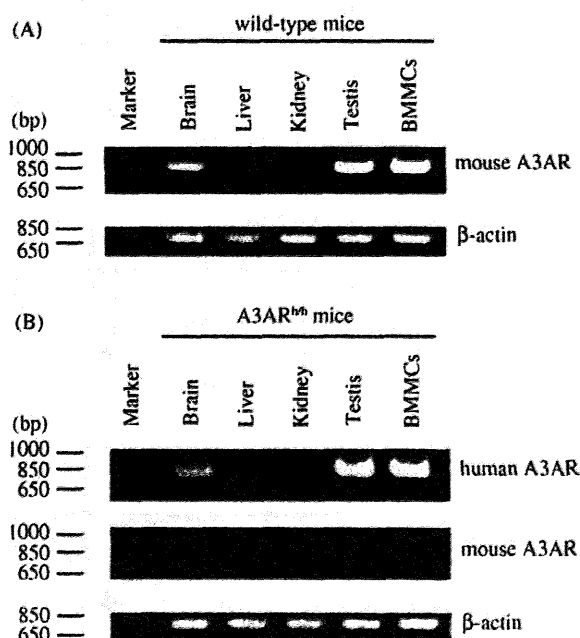


Fig. 2. Expression of human A3AR mRNA in A3AR^{h/h} mice. The expression levels of mouse or human A3AR mRNA in wild-type (A) and A3AR^{h/h} mice (B) were assayed using RT-PCR. The expression of β-actin mRNA was detected as a control.

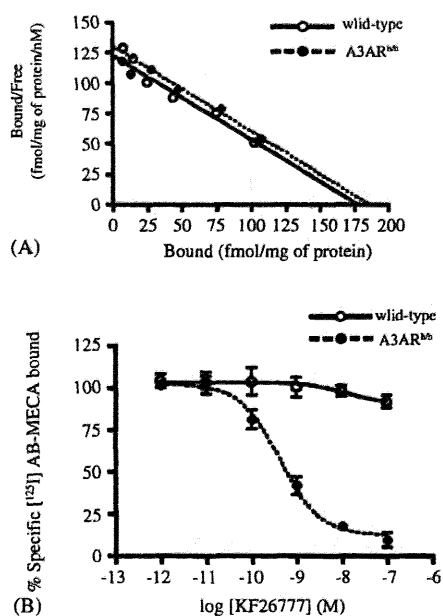


Fig. 3. Functional expression of human A3AR in BMMCs from A3AR^{h/h} mice. (A) Scatchard plot for the binding of [¹²⁵I]AB-MECA. The K_d values were 1.45 ± 0.17 nM (wild-type mice, open circles) and 1.42 ± 0.27 nM (A3AR^{h/h} mice, closed circles). The B_{max} values were 178.8 ± 11.5 and 186.2 ± 18.9 fmol/mg of protein (wild-type and A3AR^{h/h} mice, respectively). (B) Competition by KF26777 for the binding of [¹²⁵I]AB-MECA (0.8 nM). The K_i values were $>10,000$ nM (wild-type mice, open circles) and 0.27 ± 0.11 nM (A3AR^{h/h} mice, closed circles). Values are means \pm S.D. of three experiments.

3.3. Characteristics of [¹²⁵I]AB-MECA binding in BMMC membranes from A3AR^{h/h} mice

In order to evaluate whether or not the human A3AR was functionally expressed on mouse BMMCs, the specific and saturable binding of the A3AR agonist [¹²⁵I]AB-MECA was measured on membranes obtained from BMMCs (Fig. 3A). No differences were observed in terms of the A3AR density on BMMCs from A3AR^{h/h} and wild-type mice (B_{max} values for BMMCs from A3AR^{h/h} and wild-type mice were 186.2 ± 18.9 and 178.8 ± 11.5 fmol/mg of protein, respectively). The dissociation constant of [¹²⁵I]AB-MECA for the mouse A3AR on BMMCs from wild-type mice (K_d value, 1.45 ± 0.17 nM; Fig. 3A) was comparable to that for rat A3AR (K_d value, 1.46 nM [28]). The K_i value of KF26777, a human A3AR-selective antagonist, for the mouse A3AR was $>10,000$ nM (Fig. 3B), which is also equal to that for the rat A3AR [24]. However, the K_d value for the human A3AR on BMMCs from A3AR^{h/h} mice was 1.42 ± 0.27 nM (Fig. 3A), which was two-fold lower than that in human A3AR-expressing human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, as measured previously according to the same methods used here (0.67 ± 0.03 nM [24]). The K_i value of KF26777 for the human A3AR on BMMCs from A3AR^{h/h} mice was 0.27 ± 0.11 nM (Fig. 3B), which was equivalent to that on the A3AR-expressing HEK293 cells (0.20 ± 0.038 nM [24]).

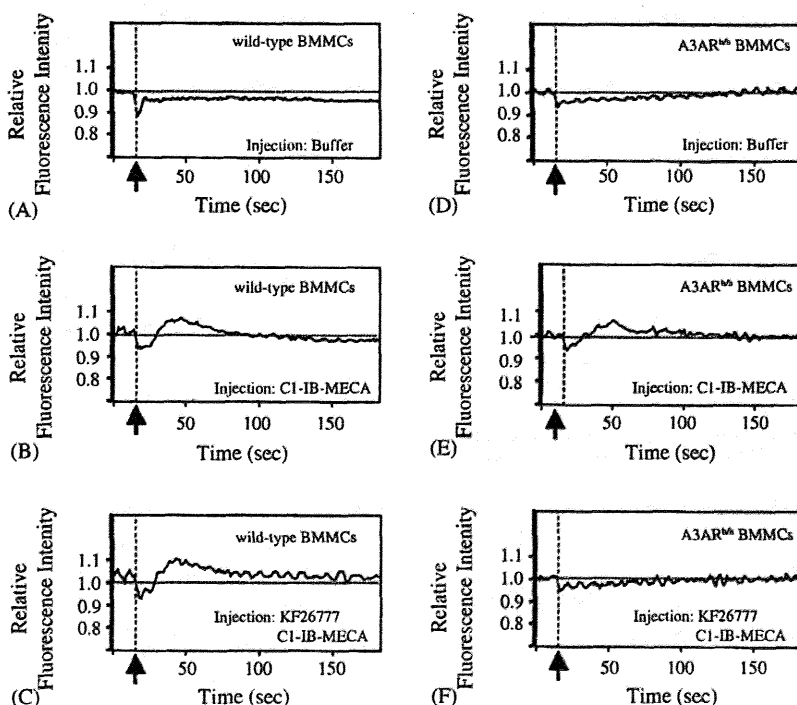


Fig. 4. The A3AR agonist induces a $[Ca^{2+}]_i$ increase in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice. BMMCs derived from wild-type (A–C) and A3AR^{h/h} mice (D–F) were preloaded with Fluo-3/AM and then were stimulated with Ca^{2+} assay buffer (A and D) or 100 nM CI-IB-MECA (B, C, E, and F). The BMMCs were preincubated with 100 nM KF26777 prior to the addition of CI-IB-MECA (C and F). Fluo-3 fluorescence images were registered using FDSS 6000 system, and the relative fluorescence intensities were plotted.

3.4. The intracellular Ca^{2+} response induced by human A3AR in BMMCs from A3AR^{h/h} mice

The A3AR elicits a Ca^{2+} response via heterotrimeric G proteins of the $G_{i/o}$ family [4–6]. To determine whether or not the stimulation of the human A3AR could lead to an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in mice, the alteration of $[Ca^{2+}]_i$ in BMMCs from A3AR^{h/h} mice by a selective A3AR agonist, CI-IB-MECA, was measured using the fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-3. CI-IB-MECA was able to rapidly induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the BMMCs from wild-type and A3AR^{h/h} mice (Fig. 4B and E). These $[Ca^{2+}]_i$ increases, inducing in a dose-dependent manner with saturated response of 100 nM CI-IB-MECA, were inhibited by the pre-treatment of 200 ng/ml pertussis toxin, a inhibitor of $G_{i/o}$ proteins (data

not shown). In addition, the mobilization of $[Ca^{2+}]_i$ in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice (Fig. 4F), but not in those from wild-type mice (Fig. 4C), was antagonized by KF26777. Similar results were also observed with the fluorescence indicator Fura-2 (data not shown).

3.5. No potentiation of IgE/antigen-dependent degranulation by human A3AR in BMMCs from A3AR^{h/h} mice

IgE/antigen-induced mast cell degranulation is strongly potentiated by A3AR via PI3K γ [9,26]. To investigate whether or not the human A3AR mediates this response in mouse mast cells, the amount of β -hexosaminidase release [29] enhanced by CI-IB-MECA was evaluated using IgE/antigen-stimulated BMMCs from A3AR^{h/h} mice. No differences in amounts of total hexosaminidase in BMMCs from wild-type and A3AR^{h/h} mice were observed (data not shown). The BMMCs from wild-type mice demonstrated a dose-dependent increase in β -hexosaminidase, as previously reported [26] (Fig. 5A). However, the BMMCs from A3AR^{h/h} mice showed no such change, in comparison to stimulation with IgE/antigen alone (Fig. 5B). In mouse BMMCs, MIP-1 α and RANTES, both of which are chemokine, are also known to activate PI3K γ via chemokine receptors, and they also enhance antigen/IgE-dependent mast cell degranulation [9]. To determine whether or not PI3K γ functions normally in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice, we investigated the changes in β -hexosaminidase release mediated by MIP-1 α or RANTES via those chemokine receptors, and not via the A3AR (Fig. 5C). No significant differences in the potentiation of the IgE/antigen-dependent β -hexosaminidase release by MIP-1 α or RANTES were observed between A3AR^{h/h} mice and the wild-type mice.

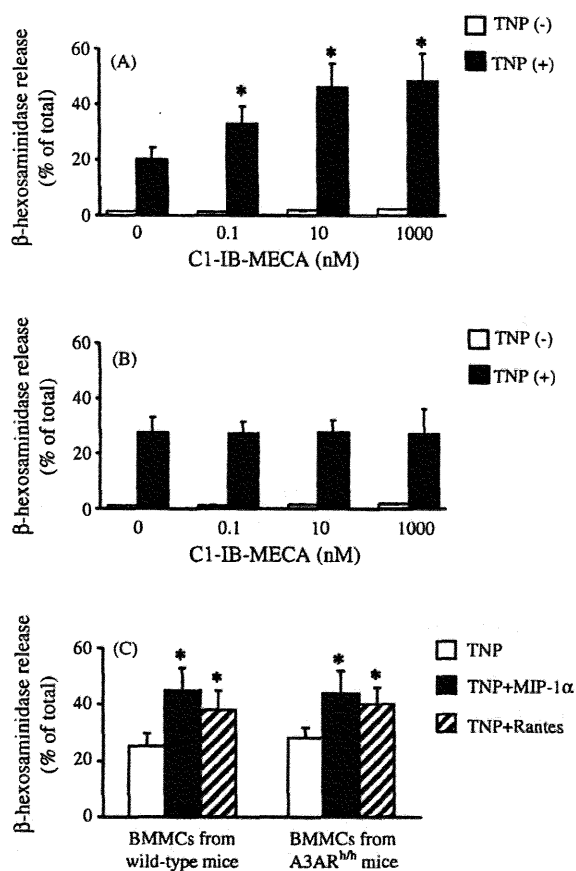


Fig. 5. No potentiation of antigen-dependent mast cell degranulation is elicited by the A3AR agonist in BMMCs from A3AR^{h/h} mice. BMMCs derived from wild-type (A) and A3AR^{h/h} mice (B) were pre-incubated overnight with anti-TNP IgE and then were incubated in the absence (open bars) and presence (closed bars) of antigen, 10 ng/ml TNP-BSA, for 20 min. The cells were incubated with CI-IB-MECA (0, 0.1, 10, and 1000 nM) for 1 min prior to stimulation with the antigen. β -Hexosaminidase released in the supernatant was measured using *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -glucosaminide. (C) β -Hexosaminidase release in IgE-sensitized BMMCs from wild-type and A3AR^{h/h} mice stimulated with TNP-BSA for 1 min, followed by stimulation with MIP-1 α (10 nM, closed bars) or RANTES (10 nM, striped bars), is shown. Values are means \pm S.E.M. from three determinations in triplicate. * p < 0.05 compared with the values in the absence of CI-IB-MECA (A) or MIP-1 α and RANTES (C).

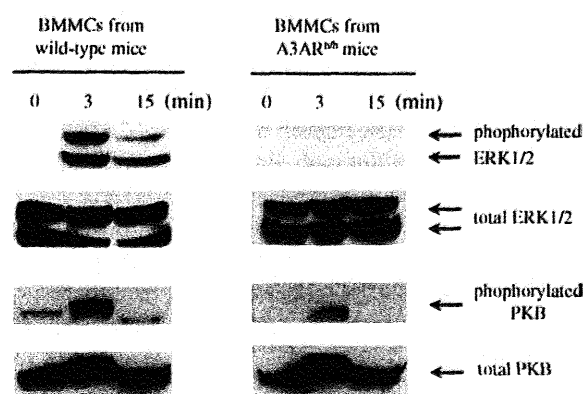


Fig. 6. No phosphorylation of ERK1/2 or PKB is induced by the A3AR agonist in BMMCs from A3AR^{h/h} mice. BMMCs from wild-type (left panels) and A3AR^{h/h} mice (right panels) were stimulated by 1 μ M CI-IB-MECA for 0, 3, and 15 min. The cells were washed and lysed, and then the phosphorylation of ERK1/2 and PKB was detected by Western blot analysis with anti-phosphorylated ERK1/2 or PKB antibodies. Total ERK1/2 and PKB levels were detected with anti-ERK1/2 and anti-PKB antibodies.

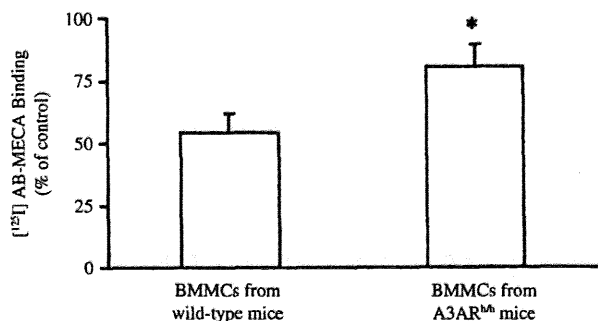


Fig. 7. The A3AR internalization induced by the A3AR agonist in BMMCs from wild-type or A3AR^{h/h} mice. BMMCs were incubated with 1 μ M Cl-IB-MECA at 37 °C for 15 min. After incubation, the cells were washed to remove the agonist, and the A3AR density on the cell surface was evaluated by measuring the extent of [¹²⁵I]AB-MECA binding for 120 min. Data are expressed as a percentage of total binding vs. control Cl-IB-MECA-untreated cells (100%). Values are mean \pm S.E.M. from three determinations in triplicate. * p < 0.05 compared with wild-type mice.

3.6. The human A3AR does not lead to the phosphorylation of either PKB or ERK1/2 in BMMCs from A3AR^{h/h} mice

The A3AR is known to phosphorylate PKB and ERK1/2 in a PI3K γ -dependent manner [4,9]. In order to evaluate whether the activation of the human A3AR leads to the phosphorylation of PKB and ERK1/2 via PI3K γ in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice, the BMMCs stimulated by Cl-IB-MECA were subjected to immunoblotting with anti-phospho PKB and ERK1/2 antibodies. Consistent with the results of the investigation of β -hexosaminidase release, the human A3AR, when stimulated by Cl-IB-MECA, did not induce the phosphorylation of either PKB or ERK1/2 in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice, unlike in the wild-type mice (Fig. 6).

3.7. The internalization of human A3AR induced by an A3AR agonist on BMMCs from A3AR^{h/h} mice

It has been reported that the phosphorylation of MAPKs, such as ERK1/2, is necessary for A3AR desensitization and internalization [30]. We therefore examined the A3AR internalization induced by Cl-IB-MECA in these BMMCs (Fig. 7). The internalization of the human A3AR in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice was significantly lower than that in the BMMCs from wild-type mice.

4. Discussion

Animal studies using rodents are essential in the field of pharmacology, especially for the early preclinical stages of drug development. However, previous studies have shown that a large number of selective agonists and antagonists for the human GPCR have reduced affinity for the rodent counterpart [31]; it has therefore remained impossible to

evaluate the pharmacological effect of the targeted GPCR in rodents. In particular, the A3AR, which shows only 74% homology between human and rodent (other GPCRs usually show homology sequence ranging from 85–95%), is strongly faced with this problem [16,17]. A number of studies regarding the A3AR have demonstrated that the A3AR plays important roles in a variety of physiological process and the A3AR antagonists may be therapeutically useful for the treatment of asthma and inflammation [16–21,26]. However, the evaluation of highly potent and selective antagonists for the human A3AR using rodent animals has been hampered by the unique species specificity between the rodent and human A3AR in terms of their respective antagonist-binding affinities [17]. To overcome this problem, we generated the A3AR-humanized mice, A3AR^{h/h} mice, in which the mouse A3AR gene was replaced by its human counterpart by a homologous recombination technique according to the strategy shown Fig. 1A.

To date, there have been no reports of GPCR-humanized mice, although a few generations of gene-humanized mice have been reported [32–34]. In a previous study of erythropoietin (EPO) receptor-humanized mice, it was shown that the mRNA expression of the human EPO receptor was silenced by the insertion of the expression cassette of a neomycin-resistant gene, used as a positive selection marker, in the recombinant allele [34]. For this reason, we excluded the HPRT expression cassette as a positive selection marker from the recombinant allele in ES cells using a Cre/loxP system. As a result, the expression levels of the human A3AR in A3AR^{h/h} mice were equal to those of the mouse A3AR in wild-type mice (Figs. 2 and 3).

Next, we examined the physiological functions of the human A3AR in A3AR^{h/h} mice. The agonist-mediated human A3AR elevated the [Ca^{2+}]_i in BMMCs derived from A3AR^{h/h} mice (Fig. 4); this elevation was completely antagonized by a highly potent and selective antagonist for the human A3AR, KF26777. However, the agonist-mediated human A3AR was unexpectedly unable to elicit the potentiation of IgE/antigen-dependent mast cell degranulation in the humanized BMMCs (Fig. 5B). To address the reason for which the human A3AR did not lead to the potentiation of mast cell degranulation, we investigated PI3K γ activation by the human A3AR in A3AR^{h/h} mice. Recent studies have demonstrated that PI3K γ is essential for the potentiation of mast cell degranulation by the A3AR [9]. It is known that PI3K γ is activated by the $\beta\gamma$ subunits of some members of the G_{i/o} family coupled to the A3AR, which then leads the PI3K γ -induced phosphorylation of PKB, as well as that of members of the MAPK family, such as ERK1/2 and p38 [6,10]. Here, no human A3AR-induced phosphorylation of ERK1/2 and PKB was observed in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice (Fig. 6). Moreover, the rate of human A3AR internalization, which is known to be caused by MAPK activation [30], in the BMMCs was lower than that observed in the BMMCs from

wild-type mice (Fig. 7). However, normal PI3K γ activity was stimulated by the chemokine MIP-1 α or RANTES in the BMMCs from A3AR^{h/h} mice (Fig. 5C). Taken together, these results indicated that the reduced efficacy of A3AR signaling via PI3K γ is likely to be caused by the decreased coupling affinity between the human A3AR and the mouse G_{i/o} protein(s), which activates PI3K γ , despite the mouse G protein(s) responsible for the [Ca²⁺]_i elevation are coupled with the human A3AR. Our results therefore suggested that the A3AR uses different G proteins for the activation of PI3K γ and for the mobilization of [Ca²⁺]_i, and the [Ca²⁺]_i elevation induced by the A3AR makes no contribution to the potentiation of mast cell degranulation. The reason why the human A3AR was slightly internalized by the A3AR agonist despite no phosphorylation of ERK1/2 remains to be solved. The more detailed analysis of the human A3AR in BMMCs and/or other A3AR highly expressing tissues, such as brain and testis, will provide a new insight into the mechanism of A3AR signaling.

It is generally thought that an uncoupling of G protein from the GPCR leads to a relative reduction in the binding affinity of the ligand to the GPCR [35–37]. Our findings revealed that the binding affinity of [¹²⁵I]AB-MECA to the human A3AR in A3AR^{h/h} mice was approximately two-fold lower than that in a human cell line (Fig. 3A); these findings thus suggest the existence of the uncoupling form of the human A3AR in A3AR^{h/h} mice. It was also of note that the binding affinity of KF26777 to A3AR was unaffected by the uncoupling form (Fig. 3B) of the human A3AR, thus suggesting that the tertiary structure required for the binding of KF26777 might differ from that required for the binding of [¹²⁵I]AB-MECA.

It appears that the uncoupling of the mouse G_{i/o} protein(s), which activates PI3K γ , to the human A3AR is due to the low intracellular region homology between the human and mouse A3AR (only 78%). Auchampach et al. have also reported that the canine A3AR, when expressed in the African green monkey kidney cell line COS-7 or in transgenic mice, also exhibits a low-affinity state for the A3AR agonist, probably due to the decreased coupling affinity between the canine A3AR and the G protein(s) of other species [38,39]. In the case of EPO receptor-humanized mice, a reduction in the efficiency of EPO receptor signaling has been observed [34]. In order to elucidate the signaling pathways downstream of the human A3AR, most studies have taken advantage of cell lines from different species (e.g., Chinese hamster ovary cell lines). Numerous studies have shown that the human A3AR on Chinese hamster ovary cells activates the MAPK cascade via PI3K γ , despite our hypothesis that the coupling of rodent G proteins to the human A3AR would be insufficient to activate PI3K γ . Conceivably, this coupling may be the result of the non-physiological over-expression of the human A3AR on Chinese hamster ovary cells. Actually, lack of A3AR-induced signaling in the engineered rodent cells with low expression of human A3AR is

often rescued by co-expression of human G_{i/o} proteins. To settle this issue, the human/mouse chimeric A3AR, in which G protein-coupled regions of the human A3AR are exchanged with the corresponding regions of the mouse A3AR, will be analyzed.

In conclusion, we reported here for the first time the generation of mice with a replaced GPCR, i.e., the A3AR, by its human counterpart. The human A3AR led to the [Ca²⁺]_i elevation via the mouse G protein(s). However, the human A3AR did not activate the PI3K γ signaling pathway involving the potentiation of mast cell degranulation, which was most likely due to the uncoupling of the other mouse G_{i/o} protein(s) to the human A3AR. The results of the present study suggested that the replacement of the mouse A3AR with the human A3AR is insufficient to generate the A3AR-humanized mice for the functional evaluation of the human A3AR. In this context, it appears necessary to generate mice with affinities for both the human ligand and the mouse G_{i/o} protein, such as those with the human/mouse chimeric A3AR; the generation of these mice is now in progress in our laboratory.

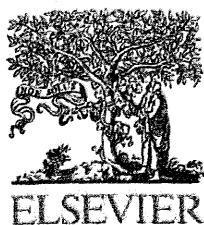
Acknowledgements

We thank Drs. Katsutoshi Sasaki, Kazumi Kurata-Miura, and Satoshi Saeki for helpful discussion.

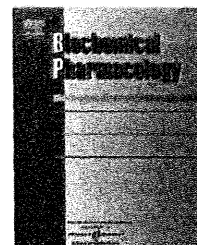
References

- [1] Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35: 581–606.
- [2] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53: 527–52.
- [3] Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;14:99–108.
- [4] Schulte G, Fredholm BB. Signaling pathway from the human adenosine A₃ receptor expressed in Chinese hamster ovary cells to the extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 2002;62: 1137–46.
- [5] Englert M, Quitterer U, Klotz KN. Effector coupling of stably transfected human A₃ adenosine receptors in CHO cells. *Biochem Pharmacol* 2002;64:61–5.
- [6] Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 2003;15:813–27.
- [7] Ghosh M, Smrcka AV. Assay for G protein-dependent activation of phospholipase C β using purified protein components. *Methods Mol Biol* 2004;237:67–75.
- [8] Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, et al. The G $\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 1997;89:105–14.
- [9] Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, et al. Phosphoinositide 3-kinase γ is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 2002;16:441–51.
- [10] Hammarberg C, Fredholm BB, Schulte G. Adenosine A₃ receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2

- via phosphatidylinositol-3'-kinase. *Biochem Pharmacol* 2004;67:129–34.
- [11] Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999;79:143–80.
- [12] Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 1999;68:965–1014.
- [13] Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12:9–18.
- [14] Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003;22:8983–98.
- [15] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:320–44.
- [16] Baraldi PG, Cacciari B, Romagnoli R, Merighi S, Varani K, Borea PA, et al. A₃ adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med Res Rev* 2000;20:103–28.
- [17] Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine A₃ receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 2003;3:445–62.
- [18] Fishman P, Bar-Yehuda S. Pharmacology and therapeutic applications of A₃ receptor subtype. *Curr Top Med Chem* 2003;3:463–9.
- [19] Tilley SL, Tsai M, Williams CM, Wang ZS, Erikson CJ, Galli SJ, et al. Identification of A₃ receptor- and mast cell-dependent and -independent components of adenosine-mediated airway responsiveness in mice. *J Immunol* 2003;171:331–7.
- [20] Zhong H, Shlykov SG, Molina JG, Sanborn BM, Jacobson MA, Tilley SL, et al. Activation of murine lung mast cells by the adenosine A₃ receptor. *J Immunol* 2003;171:338–45.
- [21] Young HW, Molina JG, Dimina D, Zhong H, Jacobson M, Chan LN, et al. A₃ adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 2004;173:1380–9.
- [22] Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167:2250–6.
- [23] Nakahata T, Spicer SS, Cantey JR, Ogawa M. Clonal assay of mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. *Blood* 1982;60:352–61.
- [24] Saki M, Tsumuki H, Nonaka H, Shimada J, Ichimura M. KF26777 (2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-5(4*H*)-one dihydrochloride), a new potent and selective adenosine A₃ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2002;444:133–41.
- [25] Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 1989;264:8179–84.
- [26] Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A₃ adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* 2000;275:4429–34.
- [27] Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099–108.
- [28] Li AH, Moro S, Forsyth N, Melman N, Ji XD, Jacobson KA. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacyl-2,4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* 1999;42:706–21.
- [29] Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of β-hexosaminidase and β-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol* 1979;123:1445–50.
- [30] Trincavelli ML, Tuscano D, Marroni M, Klotz KN, Lucacchini A, Martini C. Involvement of mitogen protein kinase cascade in agonist-mediated human A₃ adenosine receptor regulation. *Biochim Biophys Acta* 2002;1591:55–62.
- [31] Watson S, Arkininstall S. The G-protein linked receptor FactsBook. London: Academic Press, 1994.
- [32] Stacey A, Schnieke A, Kerr M, Scott A, McKee C, Cottingham I, et al. Lactation is disrupted by α-lactalbumin deficiency and can be restored by human α-lactalbumin gene replacement in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2835–9.
- [33] Kitamoto T, Nakamura K, Nakao K, Shibuya S, Shin RW, Gondo Y, et al. Humanized prion protein knock-in by Cre-induced site-specific recombination in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:742–7.
- [34] Divoky V, Liu Z, Ryan TM, Prchal JF, Townes TM, Prchal JT. Mouse model of congenital polycythemia: homologous replacement of murine gene by mutant human erythropoietin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:986–91.
- [35] Kenakin T. Efficacy in drug receptor theory: outdated concept or under-valued tool? *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:400–5.
- [36] Strange PG. Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:89–95.
- [37] Christopoulos A, Kenakin T. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 2002;54:323–74.
- [38] Auchampach JA, Jin X, Wan TC, Caughey GH, Linden J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A₃ receptor and evidence that degranulation is mediated by the A_{2B} receptor. *Mol Pharmacol* 1997;52:846–60.
- [39] Black Jr RG, Guo Y, Ge ZD, Murphree SS, Prabhu SD, Jones WK, et al. Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A₃ adenosine receptor. *Circ Res* 2002;91:165–72.

available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Generation of adenosine A₃ receptor functionally humanized mice for the evaluation of the human antagonists

Kazuya Yamano^a, Miho Inoue^a, Shigehiro Masaki^b, Mayumi Saki^b,
Michio Ichimura^a, Mitsuo Satoh^{a,*}

^aTokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 3-6-6 Asahi-machi, Machida-shi, Tokyo 194-8533, Japan

^bPharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 1188 Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2005

Accepted 17 October 2005

Keywords:

Adenosine A₃ receptor
G protein-coupled receptor
Chimeric receptor
Uncoupling
A₃AR functionally humanized mice
Species difference

Abbreviations:

A₃AR, adenosine A₃ receptor
A₃AR^{c/c} mice,
A₃AR-chimeric mice
A₃AR^{h/h} mice,
A₃AR-humanized mice
BMDCs, bone marrow-derived
mast cells
[Ca²⁺]_i, intracellular Ca²⁺
concentration
Cl-IB-MECA, 2-chloro-N⁶-
(3-iodobenzyl)adenosine-
5'-N-methyluronamide
DT-A, diphtheria toxin
A fragment

ABSTRACT

Although the adenosine A₃ receptor (A₃AR), which is a G_{i/o} protein-coupled receptor, has attracted considerable interest as a potential target for drugs against asthma or inflammation, the *in vivo* evaluation of the antagonists using rodents in the first step of drug development has been hampered by the lack of highly potent antagonists for the rodent A₃AR. To evaluate the pharmacological effects of human A₃AR antagonists in mice, we previously generated A₃AR-humanized mice, in which the mouse A₃AR gene was replaced by its human counterpart. However, the human A₃AR did not lead to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) γ -signaling pathway such as IgE/antigen-dependent mast cell degranulation, probably due to the uncoupling of the mouse G_{i/o} protein(s). To overcome the uncoupling, we here generated A₃AR functionally humanized mice by replacing the mouse A₃AR gene with a human/mouse chimeric A₃AR sequence in which whole intracellular regions of the human A₃AR were substituted for the corresponding regions of the mouse A₃AR. The chimeric A₃AR led to intracellular Ca²⁺ elevation and activation of the PI3K γ -signaling pathway, which are equivalent to the actions induced by A₃AR in wild-type mice. The human A₃AR antagonist had the same binding affinities for the chimeric A₃AR as the human A₃AR and completely antagonized this potentiation. This is the first direct evidence that the uncoupling of mouse G protein(s) to the human A₃AR is due to a sequence difference in the intracellular regions of A₃AR. The A₃AR functionally humanized mice can be widely employed for pharmacological evaluations of the human A₃AR antagonists.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +81 42 725 2555; fax: +81 42 726 8330.

E-mail address: msatoh@kyowa.co.jp (M. Satoh).

0006-2952/\$ – see front matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2005.10.028

ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2
 ES cells, embryonic stem cells
 GPCR, G protein-coupled receptor
 HAT, hypoxanthine/aminopterin/thymidine
 HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase
 [¹²⁵I]AB-MECA, N⁶-(4-amino-3-[¹²⁵I]iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide
 KF26777, 2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo[2,1-i]purin-5(4H)-one dihydrochloride
 MAPK, mitogen-activated protein kinase
 PCR, polymerase chain reaction
 PI3K γ , phosphoinositide 3-kinase γ
 PKB, protein kinase B
 (R)-PIA, (R)-N⁶-phenylisopropyladenosine
 RT-PCR, reverse transcription-PCR
 TNP, 2,4,6-trinitrophenyl
 anti-TNP IgE, monoclonal IgE antibody against 2,4,6-trinitrophenyl

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) play key roles in diverse cellular processes, and these receptors are also known as attractive targets of therapeutic agents against various human diseases [1–4]. The GPCRs are the target of over 50% of the modern therapeutic agents on the market, and large numbers of novel compounds for GPCRs are continuously being identified and developed [3]. In this process of drug discovery and development, animal studies using rodents are important steps for understanding the *in vivo* physiological roles of the target GPCRs and evaluating the pharmacological effects of the agents against the target diseases. However, the *in vivo* studies for the human-selective agents are often hampered severely by the low affinities for the rodent GPCRs, due to the low homology between the human and rodent GPCRs [5]. This is particularly true for adenosine A₃ receptor (A3AR), which shows only 74% homology between humans and rodents (other GPCRs usually show sequence homologies ranging from 85 to 95% between different species) [6,7].

The A3AR is one of the four GPCRs for adenosine; it is expressed in a broad spectrum of tissues and couples to G_{i/o} proteins [8–10]. The ligand-stimulated A3AR leads to the elevation of intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and the activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) γ [11,12]. The activated PI3K γ leads to the phosphorylation of protein kinase B (PKB) and members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, including extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and p38 [11,13]. This A3AR-stimulated PI3K γ -

dependent signaling pathway is essential for the potentiation of IgE/antigen-dependent mast cell degranulation [14] and the A3AR internalization [15].

Many studies have reported that the A3AR plays a role in a diverse range of diseases [7,16] by regulating apoptotic cell death and the cell cycle [17–19] and by activating mast cells [14,20–24], eosinophils [25,26], neutrophils [27], and natural killer cells [28]. These reports suggest that the A3AR-selective agents might be therapeutically useful for treatment of human diseases. Indeed, recent studies using mast cell lines and A3AR-deficient mice have shown that the A3AR antagonists have potential as anti-asthmatic and anti-inflammatory drugs [6,7,16,21–23,26]. Highly potent and selective antagonists for the human A3AR have been screened and identified (K_i values in the 0.1 nM range) [6,7]. However, all of the A3AR antagonists have 1000 times lower affinities for the rodent A3AR (K_i values in the 0.1 μ M range) than for the human A3AR, because of the low interspecies homology between the human and rodent A3AR [6,7]. The lack of highly potent antagonists for the rodent A3AR makes it very difficult to evaluate the pharmacological potency of the A3AR antagonists in treatment for these diseases in rodent models.

In our previous study, we generated A3AR-humanized mice (A3AR^{h/h} mice), in which the A3AR gene was replaced by its human counterpart, in order to evaluate pharmacological effects of the human A3AR antagonists in mice [29]. The human A3AR normally led to the mobilization of [Ca²⁺]_i in A3AR^{h/h} mice. However, unexpectedly, the human A3AR did not lead to the phosphorylation of PKB and ERK1/2, the

potentiation of IgE/antigen-dependent mast cell degranulation, or the A3AR internalization in A3AR^{h/h} mice, probably due to the uncoupling of member(s) of the mouse G proteins for the activation of PI3K γ . Although KF26777, a highly potent and selective antagonist for the human A3AR [30], bound to the human A3AR (K_i value, 0.2 nM) and completely antagonized the $[Ca^{2+}]_i$ elevation in A3AR^{h/h} mice, the pharmacological effects of KF26777 as an anti-inflammatory agent could not be evaluated because the mast cell degranulation was not potentiated.

To overcome the uncoupling, we here generated A3AR functionally humanized mice (A3AR^{hc} mice) by replacing the mouse A3AR gene with a human/mouse chimeric A3AR sequence in which whole intracellular regions of the human A3AR were substituted for the corresponding regions of the mouse A3AR. In A3AR^{hc} mice, the chimeric A3AR led to intracellular Ca^{2+} elevation and activation of the PI3K γ -signaling pathway, including such actions as the phosphorylation of ERK1/2 and PKB, the potentiation of IgE/antigen-dependent mast cell degranulation, and the A3AR internalization, all of which are equivalent to those induced by A3AR in wild-type mice. The human A3AR antagonist had the same binding affinities for the chimeric A3AR as the human A3AR and completely antagonized this potentiation. These results demonstrate that A3AR functionally humanized mice can be widely employed for pharmacological evaluations of the human A3AR antagonists. This is the first direct evidence that the uncoupling of mouse G protein(s) to the human GPCR A3AR is due to the sequence difference in intracellular regions of the receptor, and should provide new insight into the mechanism of G protein/GPCR coupling and its differences among species.

2. Materials and methods

2.1. Animals

C57BL/6J mice, which were used as wild-type control, were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan). The human A3AR-humanized mice (A3AR^{h/h} mice) were generated and genotyped as previously described [29]. All animals were maintained under a specific pathogen-free condition. This study was conducted according to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., in compliance with national laws and policies.

2.2. Materials

N^6 -(4-Amino-3-[¹²⁵I]iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide ([¹²⁵I]AB-MECA, specific activity, 74 TBq/mmol) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). Adenosine deaminase and (R)- N^6 -phenylisopropyladenosine ((R)-PIA) were from Sigma (St. Louis, MO). Rabbit anti-ERK1/2 antibody, rabbit anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) antibody, rabbit anti-PKB antibody, rabbit anti-phospho PKB (Ser473) antibody, and the Phototope-HRP Western Blot Detection Kit were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Fluo-3 AM and Fura-2 AM was from Molecular Probes (Eugene, OR). 2-Chloro- N^6 -(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide (Cl-IB-MECA)

and 2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo[2,1-*i*]purin-5(4H)-one dihydrochloride (KF26777) were synthesized in our laboratories. 2,4,6-Trinitrophenyl bovine serum albumin (TNP-BSA) was from LSL (Tokyo, Japan). Mouse monoclonal IgE antibody against 2,4,6-trinitrophenyl (anti-TNP IgE) was purified from the culture supernatants of a TNP-immunized mouse B lymphocyte cell line (American Type Culture Collection number; TIB-142).

2.3. Construction of a targeting vector for chimeric A3AR mice

The chimeric A3AR sequence (shown in Fig. 2B) was synthesized by polymerase chain reaction (PCR) with overlapping oligonucleotides according to the method described previously [31]. The targeting vector designed to replace the open reading frame of the mouse A3AR gene by the chimeric A3AR sequence was constructed by replacing the human A3AR cDNA sequence with the chimeric A3AR sequence in the targeting vector for A3AR^{h/h} mice [29]. Briefly, the targeting vector consists of the diphtheria toxin A fragment (DT-A) expression cassette as a negative selectable marker, a 6-kb mouse genomic DNA region (from the *Sma* I site in the 5' external sequence to immediately upstream of the ATG initiation codon in exon 1 of the A3AR gene), the chimeric A3AR sequence, a 0.45-kb mouse genomic DNA region (from immediately downstream of the TAG stop codon to the polyadenylation site in exon 2 of the A3AR gene), the loxP site-flanked hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) expression cassette as a positive selectable marker, and a 2.8-kb mouse genomic DNA region (from the *Bam*H I site in exon 2 to the *Apa* I site in the 3' external sequence) (Fig. 3A).

2.4. Homologous recombination in ES cells

The *Sal* I-linearized targeting vector was electroporated into mouse embryonic stem (ES) cell line AB2.2 from the 129/SvEv strain (Lexicon, The Woodlands, TX). Selected clones for resistance to hypoxanthine/aminopterin/thymidine (HAT) selection medium (Lexicon) were verified by Southern blot analysis using two external probes derived from the 5' external sequence from the *Eco*R I site to the *Sma* I site and the 3' external sequence from the *Apa* I site to the *Eco*R I site (Fig. 3A). Identified homologous recombinant clones were transiently transfected with Cre recombinase expression vector pBS185 (Invitrogen, Carlsbad, CA) for the removal of the HPRT expression cassette from the recombinant allele. Clones were screened in 6-thioguanine (Sigma) and the deletion of the HPRT cassette was verified by Southern blot analysis using the external probes.

2.5. Generation of A3AR^{hc} mice

The ES cell clones were injected into 3.5-day-old blastocysts from C57BL/6J mice (CLEA, Japan) and were transferred into the oviducts of pseudopregnant ICR females (CLEA, Japan). The chimeric males were backcrossed to C57/BL6J mice and germ-line transmission of the recombinant allele was detected by Southern blot analysis of tail-biopsy DNA from agouti offspring using the 5' or 3' external probes. Heterozygotes were intercrossed to produce homozygotes and their

offspring were genotyped by Southern blot analysis using the 3' external probe (Fig. 3B).

2.6. Generation of BMMCs

Bone marrow-derived mast cells (BMMCs) were generated from the femoral bone marrow cells of 8- to 10-week-old wild-type, A3AR^{h/h}, and A3AR^{c/c} mice according to the method described previously [29]. Briefly, the cells were grown in BMMC medium consisting of RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen), 10 mg/L gentamicin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 100 μ M non-essential amino acids (Invitrogen), 100 μ M sodium pyruvate (Invitrogen), and 10% (v/v) pokeweed mitogen-stimulated spleen-conditioned medium at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After 5 weeks, more than 95% of the nonadherent cells were identifiable as BMMCs, as determined by FACS analysis of the cell surface expression of c-kit and high-affinity IgE receptor.

2.7. Reverse transcription (RT)-PCR analysis

Total RNAs were isolated from mouse tissues and BMMCs using an RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and incubated for 1 h at 37 °C with 20 units of RNase-free DNase (Promega, Madison, WI) to degrade genomic DNA. After DNA digestion, the total RNAs were purified again using an RNeasy kit. The single-strand cDNAs were synthesized from 3 μ g of each total RNA using a Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). The two-fold diluted reaction mixtures were used as templates for the following PCR. The PCR was carried out by heating at 94 °C for 5 min, followed by 22 cycles (for β -actin) or 30 cycles (for A3ARs) of 94 °C for 1 min and 68 °C for 2 min in 20 μ l of reaction mixture containing 1 μ l of the two-fold diluted single-strand cDNA, 10 pmol of primers, 4 nmol of dNTP mixture, and ExTaq polymerase (TaKaRa BIO, Shiga, Japan) using a GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). A 913-bp fragment of chimeric A3AR cDNA was amplified using primers 5'-AACAGCACTGCTCTGTCCATTGGCC-3' (designed as a sense primer to specifically anneal to the 1st extracellular region of human A3AR cDNA) and 5'-AATCTGAGGTCTGACAGAGCCTGAG-3' (designed as an antisense primer to specifically anneal to the 4th intracellular region of mouse A3AR cDNA), a 913-bp fragment of mouse A3AR cDNA was amplified using primers 5'-AACACCACGGAGACGGACTGGCTG-3' (designed as a sense primer to specifically anneal to the 1st extracellular region of mouse A3AR cDNA) and 5'-AATCTGAGGTCTGACAGAGCCTGAG-3' (designed as an antisense primer to specifically anneal to the 4th intracellular region of mouse A3AR cDNA), and a 793-bp fragment of β -actin cDNA was amplified using primers 5'-GATATCGCTGCGCTCGTCTCGAC-3' and 5'-CAGGAAGGAA-GGCTGGAAGAGAGC-3'. The PCR products were subjected to electrophoresis in 1.2% agarose gel for analysis.

2.8. Receptor binding assay

The saturation binding assay with the A3AR agonist [¹²⁵I]AB-MECA was carried out according to a previous study [29]. Briefly, membranes of BMMCs (100 μ g) were incubated for

120 min at 25 °C with 2 U/ml adenosine deaminase and 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, or 2.0 nM [¹²⁵I]AB-MECA in a binding-assay buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM MgCl₂). The assays were performed in the presence of 1% of the final concentration of dimethyl sulfoxide and non-specific binding was determined in the presence of 100 μ M (R)-PIA. After incubation, the binding reactions were terminated by filtration of the membranes through MultiScreen GF/B filter (Millipore, Bedford, MA). The filters were washed with ice-cold binding assay buffer, and the radioactivity was determined by COBRA γ -counter (Packard, Downers Grove, IL). The competitive binding assays were carried out according to the method described above (with the addition of 0.8 nM [¹²⁵I]AB-MECA and 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10, or 100 nM KF26777).

2.9. Measurement of intracellular Ca²⁺ concentration

The measurement of [Ca²⁺]_i was carried out according to a previous study [29]. Briefly, BMMCs were incubated in BMMC medium with saturating concentrations of anti-TNP IgE (100 ng/ml/10⁶ cells) overnight and were incubated for 60 min at 37 °C with 5 μ M Fluo-3 AM or Fura-2 AM and 0.5% pluronic F-127 in the Ca²⁺ assay buffer (115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 13.8 mM glucose, 2.5 mM Probenecid, and 20 mM HEPES, pH 7.4, and 0.2% (w/v) BSA). After washing twice in Ca²⁺ assay buffer, the 2.5 \times 10⁴ cells were transferred to each well of 96-well plates and incubated for 20 min. The fluorescence intensity of Fluo-3 by the addition of 100 nM Cl-IB-MECA was quantified using FDSS 6000 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan). The Fluo-3 intensities were monitored every second and were plotted as a ratio against the Fluo-3 intensity at the resting calcium level. The measurement of [Ca²⁺]_i mobilization using Fura-2 was carried out as follows. The 5.0 \times 10⁵ cells loaded with Fura-2 were transferred to each tube and incubated for 30 min. The fluorescence intensity of Fura-2 by the addition of 100 nM Cl-IB-MECA was quantified using CAF-110 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The Fura-2 intensities were monitored every second and were plotted as the fluorescence ratio at 340 and 380 nm. The data presented are representative of five independent experiments. For measurements of the antagonist activity, the BMMCs were pre-incubated with 100 nM KF26777 for 5 min (Fluo-3) or 2 min (Fura-2) prior to addition of 100 nM Cl-IB-MECA.

2.10. Western blot analysis

The phosphorylation of PKB and ERK1/2 induced by the A3AR was detected by the methods described previously [29]. Briefly, BMMCs stimulated by 1 μ M Cl-IB-MECA at 37 °C for 0, 3, or 15 min were lysed in ice-cold lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.1% (w/v) bromophenol blue) and boiled for 2 min. The boiled samples were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using e-PAGE 5–20% (w/v) polyacrylamide gels (ATTO, Tokyo, Japan). After transfer of the proteins onto polyvinylidene difluoride membranes, the protein phosphorylation was detected with rabbit phospho-specific ERK1/2 and phospho-specific PKB antibody using goat anti-rabbit horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and a Phototope HRP Western Blot Detection Kit. To confirm equal loading

in each lane, parallel immunoblots were run in order to detect the unphosphorylated ERK1/2 and PKB.

2.11. Internalization assay

A3AR internalization was quantified by the changing rate of the receptor surface density after treatment of Cl-IB-MECA according to the methods described previously [29]. Briefly, after the stimulation of 1 μ M Cl-IB-MECA for 15 min at 37 °C, the cells were washed twice with ice-cold PBS and the amounts of A3AR on the cell surface were evaluated as described above by Receptor binding assay (with the addition of 2 nM [¹²⁵I]AB-MECA. The A3AR density was expressed as the percentage of total binding versus control Cl-IB-MECA-untreated cells (100%).

2.12. β -Hexosaminidase release assay

β -Hexosaminidase release from BMMCs was measured by the methods described previously [29]. Briefly, 5×10^5 cells of anti-TNP IgE-saturated BMMCs were pre-incubated in the presence or absence of 10 nM KF26777 for 1 min prior to incubation with the indicated concentration of Cl-IB-MECA for 1 min at 37 °C in Tyrode buffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM KH₂PO₄, 0.6 mM

MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4, and 0.1% (w/v) BSA). The cells were stimulated with 10 ng/ml TNP-BSA for 30 min at 37 °C, and the amount of β -hexosaminidase released from BMMCs in the supernatant was measured as the β -hexosaminidase activity using *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminide. The results were expressed as a percentage of the total TritonX-100-releasable β -hexosaminidase in whole cells.

2.13. Data analysis

The binding parameters were calculated using Prism software (GraphPAD, San Diego, CA). The IC₅₀ values obtained from the competition curves were converted to K_i values by using the Cheng and Prusoff equation [32].

3. Results

3.1. Targeted replacement of the mouse A3AR gene by the chimeric A3AR cDNA in mice

We previously reported that the human A3AR can normally lead to the mobilization of [Ca²⁺]_i but is unable to potentiate

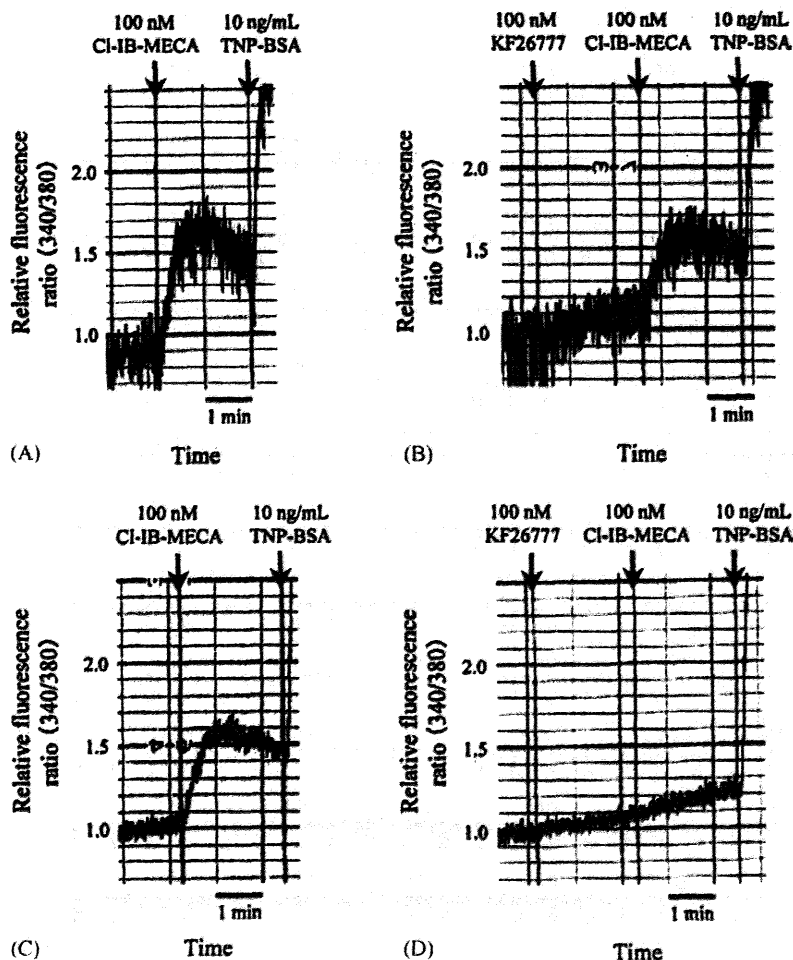
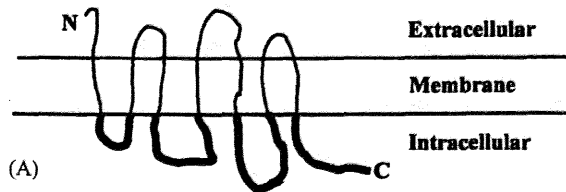


Fig. 1 - The human A3AR leads to the mobilization of [Ca²⁺]_i in mice. BMMCs derived from wild-type (A and B) and A3AR^{h/h} mice (C and D) were preloaded with Fura-2 AM and then were stimulated with 100 nM Cl-IB-MECA in the absence (A and C) or presence (B and D) of 100 nM KF26777. The [Ca²⁺]_i mobilization by the addition of TNP-BSA via IgE receptor were measured as positive control. The Fura-2 intensities were plotted as the fluorescence ratio at 340 and 380 nm.

the mast cell degranulation in mice, probably due to the uncoupling of some mouse $G_{i/o}$ protein(s) to the human A3AR [29]. In this study, we first confirmed the human A3AR-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization (Fig. 1) without potentiation of the mast cell degranulation by the human A3AR (as described below) in A3AR^{h/h} mice. To overcome the uncoupling and evaluate highly potent and selective antagonists

for the human A3AR in rodent models, we designed the human/mouse chimeric A3AR sequence, in which whole intracellular loop regions of the human A3AR were substituted for the equivalent regions of the mouse A3AR (Fig. 2). The replacement of the mouse A3AR gene by the chimeric A3AR sequence was carried out in mouse ES cells using a homologous recombination system according to the strategy



(A)

```

10      20      30      40      50      60
atgccaaacacagcactgctctgtcattggccaatggttacctacatcaccatggaatt
M P N N S T A L S L A N V T Y I T M E I

70      80      90      100     110     120
ttcattggactctgcgcatagtgggcaacgtgctggctcatctgcgtggtcaaactgaaac
F I G L C A I V G N V L V I C V V K L N

130     140     150     160     170     180
ccactctgactgacgacacacttctatttcattgtctctctagccctggctgacattgct
P T L R T T T F Y F I V S L A L A D I A

190     200     210     220     230     240
gttggggtgctggctcatgctttggccattgtgtcagcctgggcatcacatccacttc
V G V L V M P L A I V V S L G I T I H F

250     260     270     280     290     300
tacagctgctttttatgacttgcctactgcttatctttacccacgctccatcatgctcc
Y S C L F M T C L L L I F T H A S I M S

310     320     330     340     350     360
ttgctggccatcgctgtgaccgataacttcagggtcaaggttaacgtcagatacagaagc
L L A I A V D R Y L R V K L T V R Y R T

370     380     390     400     410     420
gtcaccactcaacgaagcatctggctggccctgggctttgctggctgggtgcattctgtg
V T T Q R R I W L A L G L C W L V S F L

430     440     450     460     470     480
gtgggattgacccccatgtttggctggaacatgaaactgacctcagagtaccacagaaat
V G L T P M F G W N M K L T S E Y H R N

490     500     510     520     530     540
gtcaccttcctttcatgccaattgtttccgtcatgagaatggactacatggtatacttc
V T F L S C Q F V S V M R M D Y M V Y F

550     560     570     580     590     600
agcttctcacctggattttcatccctctagttgtcatgtgtgccatctacctagacatc
S F L T W I F I P L V V M C A I Y L D I

610     620     630     640     650     660
ttctacatcaccgaaataaactcagctcaaaaactatgtggttcagagagacgggtgca
F Y I I R N K L S Q N L S G F R E T R A

670     680     690     700     710     720
ttttatggacgggaattcaagacggctaagctctgtttctggttctttctgtttgtt
F Y G R E F K T A K S L F L V L F L F A

730     740     750     760     770     780
ctgtcatggctgcctttatctatcatcaactgcatcatctactttaatggtgaggtacca
L S W L P L S I I N C I I Y F N G E V P

790     800     810     820     830     840
cagcttggctgtacatgggcatcctgctgtcccacgccaactccatgatgaacctatc
Q L V L Y M G I L L S H A N S M M N P I

850     860     870     880     890     900
gtctacgctataaaataaaaaactcaaaagacactactttotgatcactcagaactc
V Y A Y K I K K F K E T Y F L I L R A L

910     920     930     940     950     960
aggctctcagacctcagattctttggaactcaaacatggaacagactactgagtas
R L C Q T S D S L D S N M E Q T T E stop
    
```

(B)

Fig. 2 - The design of human/mouse chimeric A3AR. (A) Schematic drawing of the putative secondary structure of the chimeric A3AR. The intracellular regions of the human A3AR were substituted for the corresponding regions of the mouse A3AR (thick lines). (B) The nucleotide and amino acid sequences of the chimeric A3AR. The sequences derived from the mouse A3AR are indicated by lines.

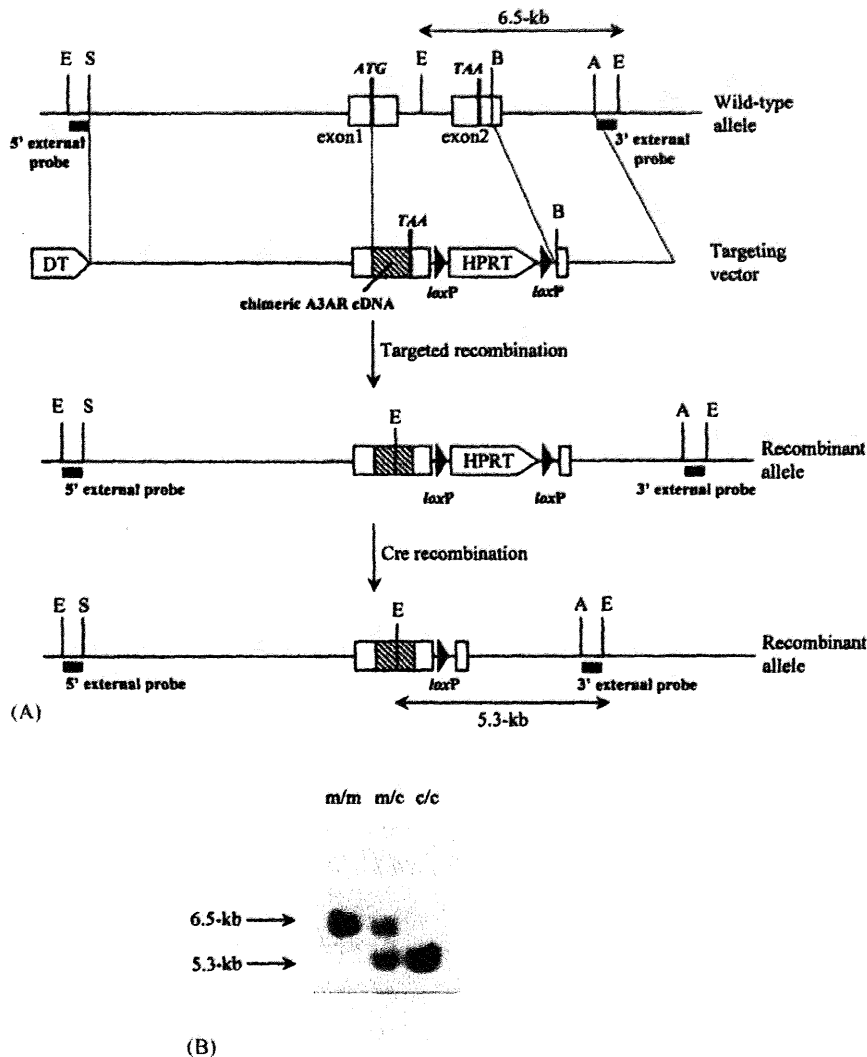


Fig. 3 – Targeted replacement of the mouse A3AR gene by the chimeric A3AR sequence. (A) Schematic drawing of the targeting vector and the recombinant alleles. Restriction sites *Apa* I (A), *Eco* R I (E), *Bam* H I (B), *Sma* I (S), and the location of the probe used for ES cell screening (two external probes derived from the 5' external sequence from the *Eco* R I site to the *Sma* I site, and the 3' external sequence from the *Apa* I site to the *Eco* R I site) and genotyping are indicated. The two exons are represented by open rectangles. The targeting vector contained a DT-A expression cassette as a negative selectable marker and an HPRT expression cassette as a positive selectable marker, and this vector replaced the region (from the ATG initiation codon to the TAA stop codon in the mouse A3AR gene) with the chimeric A3AR sequence (striped box) by homologous recombination. The HPRT expression cassette was removed from the genomic DNA by a Cre/*loxP* recombination system. (B) Genomic Southern analysis of A3AR^{c/c} mice. After *Eco* R I digestion of genomic DNA purified from wild-type mice (m/m), A3AR^{c/c} mice (c/c), and heterozygotes (m/c), the 3' external-probe detected a 6.5-kb band in the wild-type allele and a 5.3-kb band in the targeted allele.

shown in Fig. 3A. After electroporation of the linearized targeting vector into the mouse ES cells, HAT-resistant clones were screened by Southern blot analysis. Eighteen of the 288 HAT-resistant clones had bands of the expected size for the targeted allele. Four of the 18 clones having the recombinant allele transiently expressed Cre recombinase, and removal of the HPRT expression cassette from the recombinant allele by the Cre/*loxP* recombination system in 6-thioguanine-resistant clones was confirmed by Southern blot analysis. Injection of the HPRT expression cassette-

deleted clones into C57BL/6J blastocysts produced 15 chimeric males exhibiting contributions from the ES cells ranging from 50–100% as based on the amount of agouti coloring in the animal's coat. Six of these mice transmitted the recombinant allele through the germ line. The male chimeras were bred to C57BL/6J mice and heterozygous offspring (A3AR^{m/c} mice) were born. Homozygous mice (A3AR^{c/c} mice) were obtained in crosses between A3AR^{m/c} mice. The phenotypes were detected by Southern blot analysis of DNA obtained by tail biopsy (Fig. 3B).

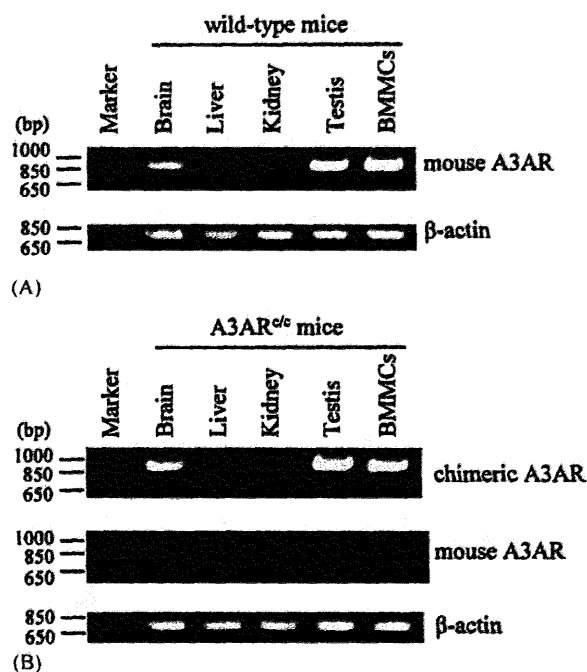


Fig. 4 – Expression of chimeric A3AR mRNA in A3AR^{c/c} mice. The expression levels of mouse or chimeric A3AR mRNA in wild-type (A) and A3AR^{c/c} mice (B) were assayed using RT-PCR. The expression of β -actin mRNA was detected as a control.

3.2. Normal expression of chimeric A3AR mRNA in A3AR^{c/c} mice

We measured the mRNA expression levels of chimeric A3AR in A3AR^{c/c} mice by RT-PCR analysis. The expression levels and distribution of the chimeric A3AR mRNA in A3AR^{c/c} mice were the same as those of the mouse A3AR mRNA in wild-type mice, and expression of the mouse A3AR mRNA in A3AR^{c/c} mice was not detected (Fig. 4).

3.3. Characteristics of [¹²⁵I]AB-MECA binding in BMMC membranes from A3AR^{c/c} mice

In order to evaluate whether or not the chimeric A3AR was functionally expressed on mouse BMMCs, the specific binding of the A3AR agonist [¹²⁵I]AB-MECA was measured using the BMMC membranes (Fig. 5A). The chimeric A3AR on BMMCs from A3AR^{c/c} mice was expressed at the same level as the mouse A3AR on BMMCs from wild-type mice (the B_{max} values for BMMCs from wild-type and A3AR^{c/c} mice were 194.9 ± 5.6 and 150.3 ± 12.1 fmol/mg of protein, respectively). On BMMCs from wild-type mice, the K_d value of [¹²⁵I]AB-MECA and the K_i value of KF26777, a highly potent and selective antagonist for the human A3AR, were 1.71 ± 0.09 nM and over 10,000 nM, respectively. These values are at the same level as those for the rat A3AR [30,33]. Compared with the low affinity of [¹²⁵I]AB-MECA for the human A3AR on BMMCs from A3AR^{h/h} mice, in which some of the mouse $G_{i/o}$ proteins were probably uncoupled with the human A3AR [29], the K_d value of [¹²⁵I]AB-MECA for the chimeric A3AR on BMMCs from A3AR^{c/c} mice was a much higher

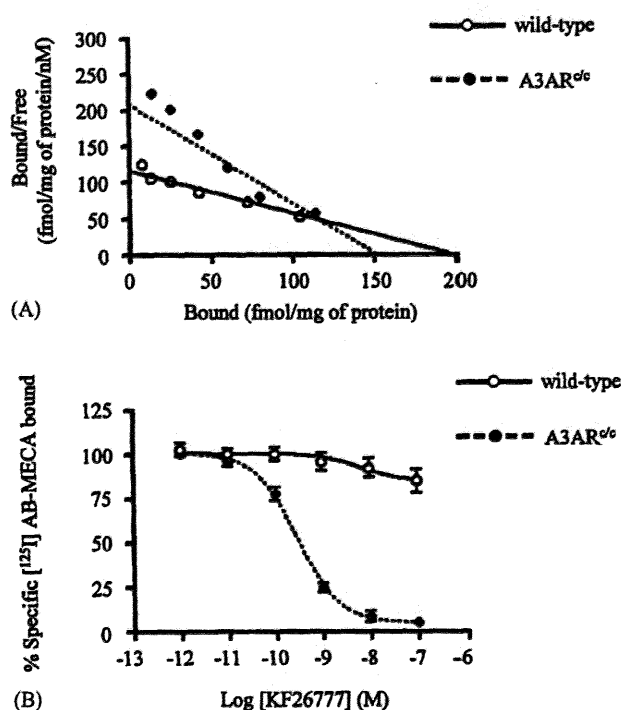


Fig. 5 – Functional expression of chimeric A3AR in BMMCs from A3AR^{c/c} mice. (A) Scatchard plot for the binding of [¹²⁵I]AB-MECA. The K_d values were 1.71 ± 0.09 nM (wild-type mice, open circles) and 0.73 ± 0.14 nM (A3AR^{c/c} mice, closed circles). The B_{max} values were 194.9 ± 5.6 and 150.3 ± 12.1 fmol/mg of protein (wild-type and A3AR^{c/c} mice, respectively). (B) Competition by KF26777 for the binding of [¹²⁵I]AB-MECA (0.8 nM). The K_i values were $>10,000$ nM (wild-type mice, open circles) and 0.15 ± 0.11 nM (A3AR^{c/c} mice, closed circles). Values are the means \pm S.D. of three experiments.

0.73 ± 0.14 nM (Fig. 5A), which was equivalent to that for the human A3AR on human cells (0.67 nM [30]). Moreover, the K_i value of KF26777 for the chimeric A3AR on the BMMCs was 0.15 ± 0.11 nM (Fig. 5B), which was also equivalent to that for the human A3AR on human cells (0.20 nM [30]).

3.4. The chimeric A3AR leads to the mobilization of [Ca^{2+}]_i in BMMCs from A3AR^{c/c} mice

In order to evaluate whether or not the chimeric A3AR functions normally in mice, we measured the mobilization of [Ca^{2+}]_i induced by the A3AR agonist Cl-IB-MECA in BMMCs from A3AR^{c/c} mice using the fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-3 AM. The increase of [Ca^{2+}]_i in BMMCs from both wild-type and A3AR^{c/c} mice was rapidly induced by Cl-IB-MECA, and the mobilization of [Ca^{2+}]_i in the BMMCs from A3AR^{c/c} mice, but not in those from wild-type mice, was completely antagonized by KF26777 (Fig. 6). These [Ca^{2+}]_i increases, which were induced in a dose-dependent manner with a saturated response of at 100 nM Cl-IB-MECA, were inhibited by the pre-treatment of 200 ng/ml pertussis toxin, an inhibitor of $G_{i/o}$ proteins (data not shown). Similar results were also observed with the fluorescence indicator Fura-2.

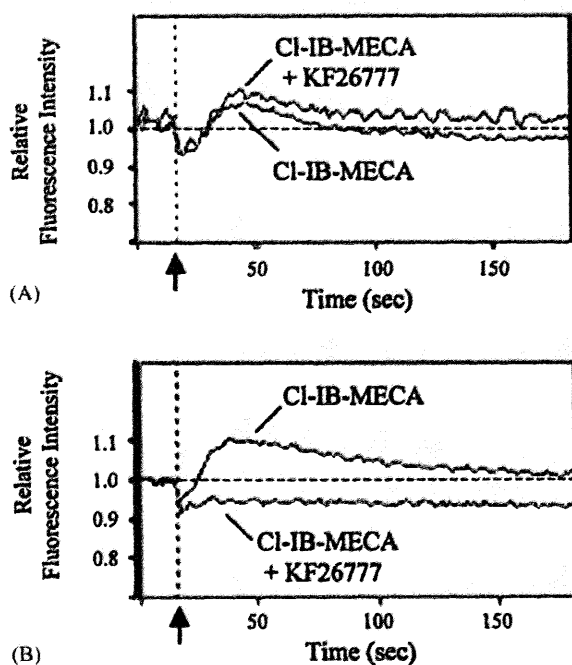


Fig. 6 – The A3AR agonist induces a $[Ca^{2+}]_i$ increase in the BMMCs from A3AR^{c/c} mice. BMMCs derived from wild-type (A) and A3AR^{c/c} mice (B) were preloaded with Fluo-3 AM and then were stimulated with 100 nM Cl-IB-MECA in the absence or presence of 100 nM KF26777. Fluo-3 fluorescence images were registered using an FDSS 6000 system, and the relative fluorescence intensities were plotted.

3.5. The chimeric A3AR leads to the activation of the PI3K γ -signaling pathway in BMMCs from A3AR^{c/c} mice

We previously reported that the human A3AR did not lead to the phosphorylation of ERK1/2 and PKB or the A3AR internalization via PI3K γ in A3AR^{h/h} mice [29]. To determine whether or not the chimeric A3AR can activate the PI3K γ -dependent signaling pathway in A3AR^{c/c} mice, we first measured the phosphorylation of ERK1/2 and PKB induced by the chimeric A3AR. The Cl-IB-MECA-stimulated chimeric A3AR led to the phosphorylation of ERK1/2 and PKB in A3AR^{c/c} mice, as it did in wild-type mice (Fig. 7A). Cl-IB-MECA (1, 10, and 100 nM) thus induced the phosphorylation of ERK1/2 and PKB in BMMCs from wild-type and A3AR^{c/c} mice in a dose-dependent manner (Fig. 7B). Next, we examined the rate of chimeric A3AR internalization on the BMMCs induced by Cl-IB-MECA. The changing rate of the chimeric A3AR surface density after treatment of the BMMCs from A3AR^{c/c} mice with Cl-IB-MECA was also equivalent to that from wild-type mice (Fig. 7C).

3.6. The IgE/antigen-dependent degranulation in BMMCs from A3AR^{c/c} mice is potentiated by the A3AR agonist and completely inhibited by the human A3AR antagonist

To investigate whether or not the chimeric A3AR can potentiate the mast cell degranulation, the amounts of β -hexosaminidase released from the IgE/antigen-stimulated BMMCs from wild-type, A3AR^{h/h}, or A3AR^{c/c} mice potentiated

by Cl-IB-MECA were measured as the β -hexosaminidase activity in the supernatants. No differences in the amounts of total β -hexosaminidase in BMMCs from all mice were observed (data not shown). In contrast to BMMCs from A3AR^{h/h} mice (Fig. 8B), Cl-IB-MECA caused a dose-dependent increase in β -hexosaminidase release from BMMCs from both wild-type (Fig. 8A) and A3AR^{c/c} mice (Fig. 8C). The Cl-IB-MECA-induced enhancement of the potentiation of mast cell degranulation in BMMCs from A3AR^{c/c} mice was perfectly antagonized by KF26777 (Fig. 9C), whereas those in BMMCs from wild-type and A3AR^{h/h} mice were unaffected by KF26777 (Fig. 9A and B).

4. Discussion

Previously, we generated A3AR-humanized mice in which the mouse A3AR gene was replaced by the human A3AR cDNA sequence in order to evaluate in vivo pharmacological effects of the highly potent and selective antagonists for the human A3AR [29]. However, the human A3AR was unable to lead to the potentiation of IgE/antigen-dependent mast cell degranulation, even though the human A3AR-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization was normal. This was thought to be due to the uncoupling of mouse G protein(s) of the $G_{i/o}$ family for the activation of PI3K γ -dependent signal pathway, but not for the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization, to the human A3AR, suggesting that different G proteins of $G_{i/o}$ family stimulate these pathways downstream of A3AR. Therefore, we generated A3AR functionally humanized mice, in which the A3AR gene was replaced with a human/mouse chimeric A3AR sequence consisting of the intracellular loop regions from the mouse A3AR as G protein-coupled regions and the extracellular loop and intramembrane regions from the human A3AR as agonist- and antagonist-binding regions (Fig. 2). The homologous recombination method was employed according to the strategy shown in Fig. 3A.

Many GPCRs, such as 5-hydroxytryptamine 1B (5HT_{1B}) receptor, neurokinin-1 (NK-1) receptor, muscarinic M2 receptor, α 2-adrenergic receptor, β 2-adrenergic receptor, cholecystokinin-B receptor, neurotensin receptor, and prostaglandin D2 receptor, are known to have different binding affinities for agonists and/or antagonists for the human and non-human receptors due to the low interspecies homologies [5]. Some human/non-human chimeric studies have been carried out to investigate the mechanism of these interspecies differences. Human/rodent chimeric studies of GPCRs 5HT_{1B} and NK-1 receptors have made it clear that species differences in the antagonist-binding affinities between humans and rodents are due to the amino acid residue in the 7th intramembrane region of these receptors [34–36]. In the α 2-adrenergic receptor, the species difference in antagonist-binding affinity between humans and rodents is shown to be due to the amino acid residue in the 5th intramembrane region [37]. Studies of the human/frog or mouse chimeric gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) show that the 2nd extracellular loop region of the GnRHR is essential for ligand binding [38,39]. Although there have been no previous studies on chimeric A3AR of humans and other species, site-directed mutagenesis analyses of amino acid residues within the human A3AR have

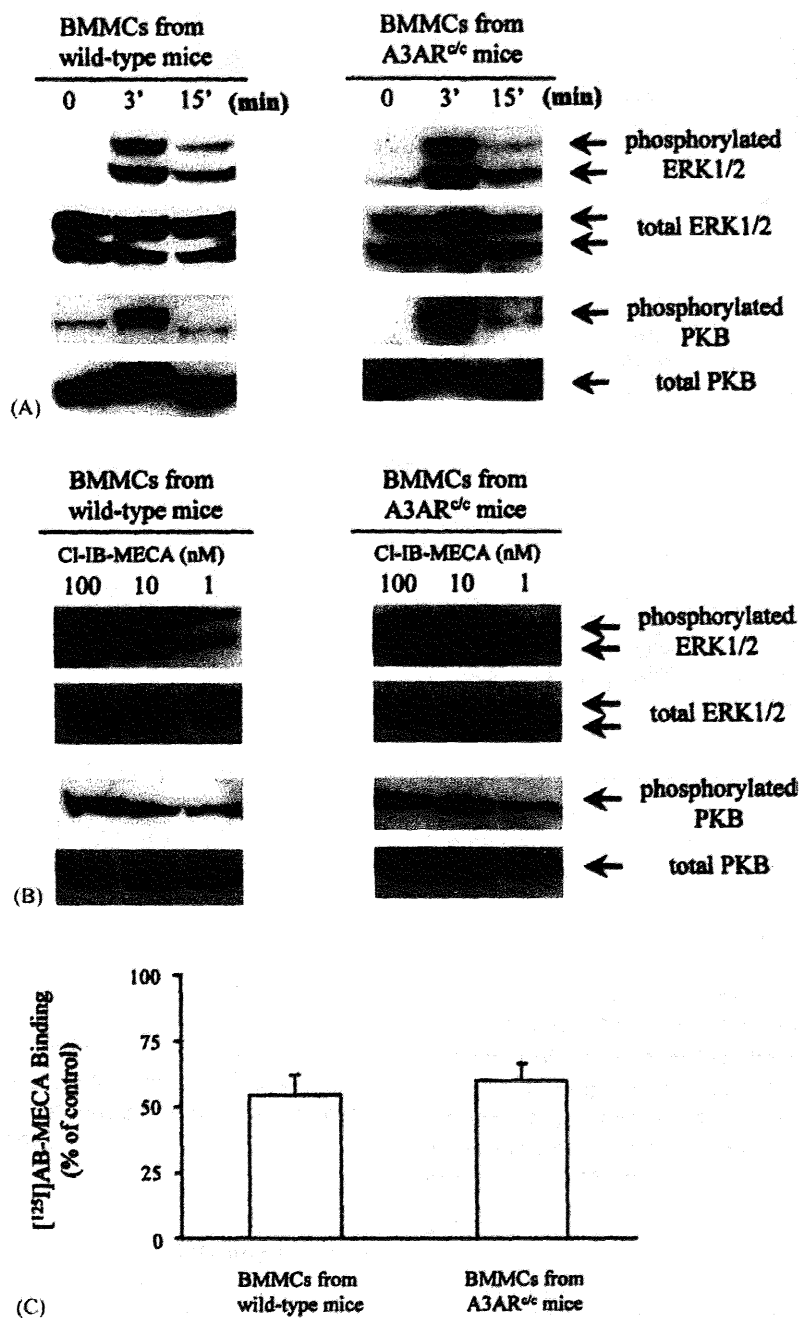


Fig. 7 – The A3AR agonist leads to the phosphorylation of ERK1/2 and PKB and the A3AR internalization in BMMCs from A3AR^{Δc} mice. (A) The phosphorylation of ERK1/2 and PKB by Cl-IB-MECA. BMMCs from wild-type (left panels) and A3AR^{Δc} mice (right panels) were stimulated by 1 μM Cl-IB-MECA for 0, 3, and 15 min. The phosphorylation of ERK1/2 and PKB was detected by Western blot analysis with anti-phosphorylated ERK1/2 and PKB antibodies. Total ERK1/2 and PKB levels were detected with anti-ERK1/2 and anti-PKB antibodies. (B) The concentration-dependent phosphorylation of ERK1/2 and PKB by Cl-IB-MECA in BMMCs from wild-type (left panels) and A3AR^{Δc} mice (right panels) treated with the indicated concentration of Cl-IB-MECA for 3 min. (C) The A3AR internalization induced by Cl-IB-MECA. BMMCs were incubated with 1 μM Cl-IB-MECA at 37 °C for 15 min. After incubation, the A3AR density on the cell surface was evaluated by measuring the extent of [¹²⁵I]AB-MECA binding for 120 min. Data were expressed as a percentage of total binding versus control Cl-IB-MECA-untreated cells (100%). Values are the means ± S.E.M. of five different experiments.

demonstrated that several amino acid residues in the extracellular and intramembrane regions are critical for the antagonist-binding affinity [40–43]. All of these studies were focused on either the extracellular or intramembrane regions,

despite the fact that the intracellular regions of GPCRs are well known to be critical for intracellular signaling. Thus, we decided to substitute whole intracellular loop sequences in the human A3AR for the corresponding sequences of the mouse

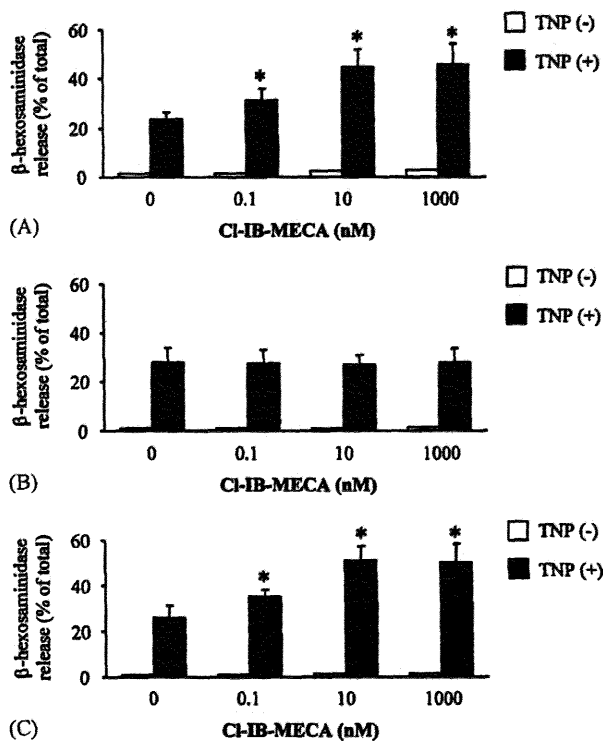


Fig. 8 – The A3AR agonist potentiates IgE/antigen-dependent mast cell degranulation in BMMCs from A3AR^{c/c} mice. BMMCs derived from wild-type (A), A3AR^{h/h} (B), and A3AR^{c/c} mice (C) were pre-incubated overnight with anti-TNP IgE and then were incubated in the absence (open bars) or presence (closed bars) of antigen, 10 ng/ml TNP-BSA, for 20 min. The cells were incubated with Cl-IB-MECA (0, 0.1, 10, and 1000 nM) for 1 min prior to stimulation with the antigen. β -Hexosaminidase released in the supernatant was measured using *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -glucosaminide. Values are the means \pm S.E.M. of five different experiments. * $p < 0.05$ compared with the values in the absence of Cl-IB-MECA.

A3AR to determine whether interspecies differences exist in the mechanism of G protein/GPCR coupling.

We first examined the expression of the human/mouse chimeric A3AR in A3AR^{c/c} mice we generated. The expression levels of the chimeric A3AR in A3AR^{c/c} mice were equal to those of the mouse A3AR in wild-type mice (Figs. 4 and 5). Next, we evaluated whether or not the chimeric A3AR would lead to the physiological responses in A3AR^{c/c} mice. The agonist-mediated chimeric A3AR elevated the $[Ca^{2+}]_i$ in BMMCs from A3AR^{c/c} mice, and this elevation was completely antagonized by KF26777, the human A3AR-specific antagonist (Fig. 6). Moreover, as expected, like the human A3AR in human cells, the agonist-stimulated chimeric A3AR led to the phosphorylation of ERK1/2 and PKB (Fig. 7A and B), followed by the potentiation of IgE/antigen-dependent mast cell degranulation (Fig. 8) and the A3AR internalization (Fig. 7C) in BMMCs from A3AR^{c/c} mice, all of which activities are lacking in the A3AR^{h/h} mice. These results clearly demonstrate that the human/mouse chimeric A3AR is able to activate PI3K γ through some of the mouse G protein couplings that are

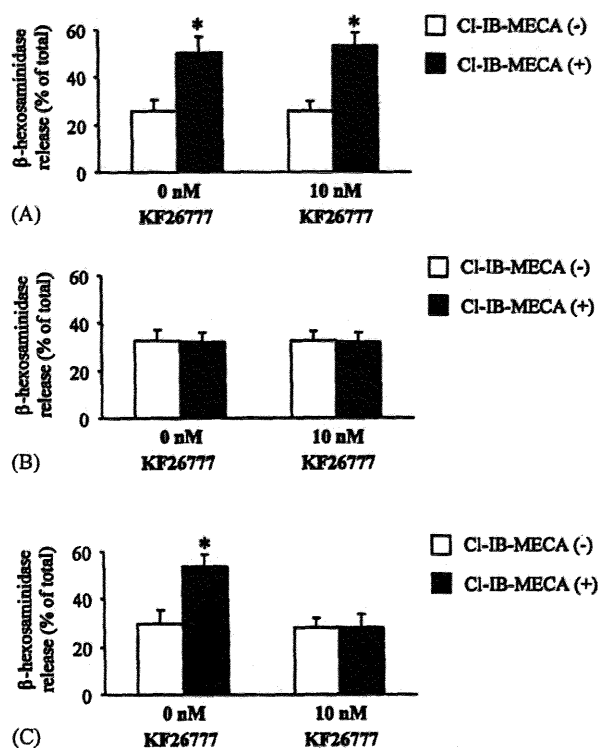


Fig. 9 – The potentiation of mast cell degranulation in BMMCs from A3AR^{c/c} mice was completely antagonized by the human A3AR antagonist KF26777. BMMCs from wild-type (A), A3AR^{h/h} (B), and A3AR^{c/c} mice (C) were pre-incubated overnight with anti-TNP IgE and were incubated with 0 or 10 nM KF26777 for 1 min. The cells were incubated in absence (open bars) or presence (closed bars) of 10 nM Cl-IB-MECA for 1 min prior to stimulation with 10 ng/ml TNP-BSA. After stimulation for 20 min, β -hexosaminidase released in the supernatant was measured using *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -glucosaminide. Values are the means \pm S.E.M. of five different experiments. * $p < 0.05$ compared with the values in the absence of Cl-IB-MECA.

involved in the potentiation of mast cell degranulation in mice. In addition, the potentiation was completely antagonized by KF26777, which is never observed in wild-type mice (Fig. 9). These results demonstrate that the A3AR^{c/c} mice have potential as A3AR functionally humanized mice, which is the first rodent model for the pharmacological evaluation of human A3AR antagonists. More detailed analysis of the chimeric A3AR using the human A3AR antagonist in BMMCs and other A3AR highly expressing tissues such as brain and testis will help to further clarify the physiological function of A3AR.

It is commonly assumed that the uncoupling of a G protein form GPCR leads to a relative reduction in the binding affinity of the ligand to the GPCR [44]. Actually, low binding affinities of the A3AR agonist to the human and canine A3AR in the transgenic mice have been observed [29,45]. The binding affinity of A3AR agonist [¹²⁵I]AB-MECA to the human A3AR on BMMCs from A3AR^{h/h} mice was 1.42 nM, which is two-fold lower than that on human cell lines (the K_d value for the

human A3AR on the human cell line is 0.67 ± 0.03 nM [30]) [29]. In A3AR^{c/c} mice, the K_d value of [¹²⁵I]AB-MECA to the human/mouse chimeric A3AR on the BMMCs was 0.73 ± 0.14 nM, equivalent to the human A3AR in human cells (Fig. 5A). Taken together, the findings that chimeric A3AR activated the PI3K- γ -dependent signaling pathway, and that the A3AR agonist in A3AR^{c/c} mice has the same binding affinity as the human A3AR suggest that some of the mouse G proteins that can not be coupled to the human A3AR can be coupled to the chimeric A3AR. Our findings provide the first direct evidence that the uncoupling of mouse G protein(s) to the human A3AR is due to the sequence difference in the intracellular regions of A3AR between humans and mice.

In general, signaling pathways of many human GPCRs, including A3AR, are investigated using human receptor-over-expressing cells derived from different species, such as Chinese hamster ovary cell line. The results of these studies may reflect interspecies differences, and if so, then these differences must be taken into consideration to understand the native physiological response in vivo. Studies on bovine rhodopsin, for which the three-dimensional structure has been reported, indicate that the contact surfaces for G protein-binding to GPCR include all intracellular regions of the GPCR [46]. On the other hand, each intracellular region of A3AR has different interspecies homology between humans and rodents, and the homology of the 4th intracellular region is much lower than that of other intracellular regions (the 1st, 2nd, 3rd, and 4th intracellular region homologies are 80, 85, 84, and 62%, respectively). Identification of the intracellular region(s) for the coupling of G protein(s) is an interesting issue and still remains to be solved.

In summary, we here succeeded in generating A3AR functionally humanized mice by replacing the mouse A3AR gene with the human/mouse chimeric A3AR, in which whole intracellular regions of the human A3AR were substituted for the corresponding regions of the mouse A3AR. The A3AR functionally humanized mice can be widely employed for the pharmacological evaluation of human A3AR antagonists and further elucidation of the in vivo physiological roles of A3AR. Our finding is the first direct evidence of the uncoupling of mouse G protein(s) to the human GPCR A3AR, which should provide new insight into the mechanism of G protein/GPCR coupling and its differences among species.

Acknowledgements

We thank Drs. Katsutoshi Sasaki, Kazumi Kurata-Miura, and Satoshi Saeki for helpful discussion.

REFERENCES

- [1] Stadel JM, Wilson S, Bergsma DJ, Orphan G. protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:430–7.
- [2] Rohrer DK, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* 1998;78:35–52.
- [3] Flower DR. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1999;1422:207–34.
- [4] Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:368–76.
- [5] Watson S, Arkininstall S. The G-protein linked receptor FactsBook. London: Academic Press, 1994.
- [6] Baraldi PG, Cacciari B, Romagnoli R, Merighi S, Varani K, Borea PA, et al. A₃ adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med Res Rev* 2000;20:103–28.
- [7] Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine A₃ receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 2003;3:445–62.
- [8] Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:581–606.
- [9] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527–52.
- [10] Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signaling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;14:99–108.
- [11] Schulte G, Fredholm BB. Signaling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 2003;15:813–27.
- [12] Wymann MP, Bjorklof K, Calvez R, Finan P, Thomast M, Trifilieff A, et al. Phosphoinositide 3-kinase γ : a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem Soc Trans* 2003;31:275–80.
- [13] Hammarberg C, Fredholm BB, Schulte G. Adenosine A₃ receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2 via phosphatidylinositol-3'-kinase. *Biochem Pharmacol* 2004;67:129–34.
- [14] Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, et al. Phosphoinositide 3-kinase γ is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 2002;16:441–51.
- [15] Trincavelli ML, Tuscano D, Marroni M, Klotz KN, Lucacchini A, Martini C. Involvement of mitogen protein kinase cascade in agonist-mediated human A₃ adenosine receptor regulation. *Biochim Biophys Acta* 2002;1591:55–62.
- [16] Fishman P, Bar-Yehuda S. Pharmacology and therapeutic applications of A₃ receptor subtype. *Curr Top Med Chem* 2003;3:463–9.
- [17] Brambilla R, Cattabeni F, Ceruti S, Barbieri D, Franceschi C, Kim YC, et al. Activation of the A₃ adenosine receptor affects cell cycle progression and cell growth. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000;361:225–34.
- [18] Gao Z, Li BS, Day YJ, Linden J. A₃ adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol Pharmacol* 2001;59:76–82.
- [19] Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, et al. A₃ adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 2005;280:19516–2.
- [20] Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor, which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 1993;268:16887–90.
- [21] Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A₃ adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* 2000;275:4429–34.
- [22] Tilley SL, Tsai M, Williams CM, Wang ZS, Erikson CJ, Galli SJ, et al. Identification of A₃ receptor and mast cell-dependent and -independent components of adenosine-mediated airway responsiveness in mice. *J Immunol* 2003;171:331–7.

- [23] Zhong H, Shlykov SG, Molina JG, Sanborn BM, Jacobson MA, Tilley SL, et al. Activation of murine lung mast cells by the adenosine A₃ receptor. *J Immunol* 2003;171:338-45.
- [24] Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A_{2B} and A₃ adenosine receptors. *Circ Res* 2003;92:485-92.
- [25] Kohno Y, Ji X, Mawhorter SD, Koshiba M, Jacobson KA. Activation of A₃ adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood* 1996;88:3569-74.
- [26] Young HW, Molina JG, Dimina D, Zhong H, Jacobson M, Chan LN, et al. A₃ adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 2004;173:1380-9.
- [27] Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Iannotta V, Leung E, et al. A₃ adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Mol Pharmacol* 2002;61:415-24.
- [28] Harish A, Hohana G, Fishman P, Arnon O, Bar-Yehuda S. A₃ adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int J Oncol* 2003;23:1245-9.
- [29] Yamano K, Inoue M, Masaki S, Saki M, Ichimura M, Satoh M. Human adenosine A₃ receptor leads to intracellular Ca²⁺ mobilization but is insufficient to activate the signaling pathway via phosphoinositide 3-kinase γ in mice. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1487-96.
- [30] Saki M, Tsumuki H, Nonaka H, Shimada J, Ichimura M. KF26777 (2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo[2,1-i]purin-5(4H)-one dihydrochloride), a new potent and selective adenosine A₃ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2002;444:133-41.
- [31] Nakamura K, Tanaka Y, Fujino I, Hirayama N, Shitara K, Hanai N. Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Mol Immunol* 2002;37:1035-46.
- [32] Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor, which causes 50% inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099-108.
- [33] Li AH, Moro S, Forsyth N, Melman N, Ji XD, Jacobson KA. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacetyl-2,4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* 1999;42:706-21.
- [34] Oksenberg D, Marsters SA, O'Dowd BF, Jin H, Havlik S, Peroutka SJ, et al. A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT_{1B} receptors. *Nature* 1992;360:161-3.
- [35] Fong TM, Yu H, Strader CD. Molecular basis for the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and RP67580. *J Biol Chem* 1992;267:25668-71.
- [36] Sachais BS, Snider RM, Lowe III JA, Krause JE. Molecular basis for the species selectivity of the substance P antagonist CP-96,345. *J Biol Chem* 1993;268:2319-23.
- [37] Link R, Daunt D, Barsh G, Chruscinski A, Kobilka B. Cloning of two mouse genes encoding α 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse α 2-C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. *Mol Pharmacol* 1992;42:16-27.
- [38] Arora KK, Chung HO, Catt KJ. Influence of a species-specific extracellular amino acid on expression and function of the human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 1999;13:890-6.
- [39] Ott TR, Troskie BE, Roeske RW, Illing N, Flanagan CA, Millar RP. Two mutations in extracellular loop 2 of the human GnRH receptor convert an antagonist to an agonist. *Mol Endocrinol* 2002;16:1079-88.
- [40] Jacobson KA, Gao ZG, Chen A, Barak D, Kim SA, Lee K, et al. Neoreceptor concept based on molecular complementarity in GPCRs: a mutant adenosine A₃ receptor with selectively enhanced affinity for amine-modified nucleosides. *J Med Chem* 2001;44:4125-36.
- [41] Gao ZG, Chen A, Barak D, Kim SK, Müller CE, Jacobson KA. Identification by site-directed mutagenesis of residues involved in ligand recognition and activation of the human A₃ adenosine receptor. *J Biol Chem* 2002;277:19056-63.
- [42] Gao ZG, Kim SK, Biadatti T, Chen W, Lee K, Barak D, et al. Structural determinants of A₃ adenosine receptor activation: nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. *J Med Chem* 2002;45:4471-84.
- [43] Gao ZG, Kim SK, Gross AS, Chen A, Blaustein JB, Jacobson KA. Identification of essential residues involved in the allosteric modulation of the human A₃ adenosine receptor. *Mol Pharmacol* 2003;63:1021-31.
- [44] Christopoulos A, Kenakin T. G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol Rev* 2002;54:323-74.
- [45] Black Jr RG, Guo Y, Ge ZD, Murphree SS, Prabhu SD, Jones WK, et al. Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A₃ adenosine receptor. *Circ Res* 2002;91:165-72.
- [46] Yeagle PL, Albert AD. A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry* 2003;42:1365-8.

参考論文

- 1) Y. Makino, S. Yogosawa, M. Kanemaki, T. Yoshida, K. Yamano, T. Kishimoto, V. Moncollin, J-M. Egly, M. Muramatsu, and T. Tamura
Structures of the rat proteasomal ATPases: determination of highly conserved structural motifs and rules for their spacing
Biochem. Biophys. Res. Commun. 220(3), 1049–1054 (1996)
- 2) Y. Makino, K. Yamano, M. Kanemaki, K. Morikawa, T. Kishimoto, N. Shimbara, K. Tanaka, and T. Tamura
SUG1, a component of the 26 S proteasome, is an ATPase stimulated by specific RNAs
J. Biol. Chem. 272(37), 23201–23205 (1997)
- 3) Y. Kato, E. Arakawa, S. Kinoshita, A. Shirai, A. Furuya, K. Yamano, K. Nakamura, A. Iida, H. Anazawa, N. Koh, A. Iwano, A. Imura, T. Fujimori, M. Kuro-o, N. Hanai, K. Takeshige, and Y. Nabeshima
Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys
Biochem. Biophys. Res. Commun. 267(2), 597–602 (2000)
- 4) K. Mori, R. Kuni-Kamochi, N. Yamane-Ohnuki, M. Wakitani, K. Yamano, H. Imai, Y. Kanda, R. Niwa, S. Iida, K. Uchida, K. Shitara, and M. Satoh
Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA
Biotechnol. Bioeng. 88(7), 901–908 (2004)

Structures of the Rat Proteasomal ATPases: Determination of Highly Conserved Structural Motifs and Rules for Their Spacing

Yasutaka Makino,* Shingo Yogosawa,* Masato Kanemaki,* Tatsushi Yoshida,*
Kazuya Yamano,* Toshihiko Kishimoto,*† Vincent Moncollin,‡ Jean-Marc Egly,‡
Masami Muramatsu,§ and Taka-aki Tamura*¹

*Department of Biology, Faculty of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263, Japan;

†Biomedical R&D Department, Sumitomo Electric Industries, 1 Taya-cho, Sakae-ku, Yokohama 244, Japan; ‡Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cédex, Strasbourg, France; and

§Department of Biochemistry, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350, Japan

Received February 19, 1996

We have isolated rat cDNAs for all of the five known proteasomal ATPases. The protein sequences of rat TBP1, TBP7, MSS1, S4, and SUG1 predicted from the open reading frames consist of 439, 418, 433, 440, and 406 amino acid residues, respectively, and exhibit striking similarities to each human counterpart with only several amino acid substitutions. These five rat ATPases are also highly homologous with each other. The N-terminal region in rat TBP1, TBP7, and SUG1 contains a heptad repeat of hydrophobic amino acids reminiscent of a leucine zipper. Also, in the central region of each rat ATPase, we found four conserved motifs, Gx4GKT, DEID, SAT, and H/QRxGRx2R, that are characteristic of a large family of ATP-dependent RNA/DNA helicases. The spacing between individual motifs was strictly conserved in the rat ATPases. These findings suggest a common function of the rat proteasomal ATPases in ATP-dependent RNA/DNA unwinding. © 1996

Academic Press, Inc.

The 26s proteasome is a eukaryotic ATP-dependent protease complex that is responsible for selective degradation of abnormal proteins and naturally short-lived proteins related to metabolic regulation and cell-cycle progression, such as cyclin, p53, c-Myc, c-Fos, and c-Jun (1, 2). The 26S proteasome is composed of the 20S proteasome as a catalytic core and an ATPase-containing 22S (or 19S) regulatory complex. The human 22S complex is assumed to contain five distinct, but highly related putative ATPases, i.e., TBP1, TBP7, S4, MSS1, and p45 (a human homolog of the yeast SUG1), which are the members of a novel ATPase family (3). Recently, proteasomal ATPases were suggested to belong to an expanding ATPase family, named the AAA family (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) (4). The family members have a highly conserved ATPase module of 200 amino acids and fulfill a large diversity of functions. The human TBP1, TBP7, and MSS1 are suggested to be involved in transcription as well as in proteolysis (5-7). However, the idea of dual functions for proteasomal ATPases is still controversial, since the molecular properties of these proteins have not been well characterized. In an attempt to further investigate the structure-function relationship in the mammalian proteasomal ATPases, we have cloned rat cDNAs encoding proteins homologous to all of the known human proteasomal ATPases and analyzed their structures.

MATERIALS AND METHODS

cDNA cloning and sequencing. Five probes corresponding to the divergent N-terminal sequence in each human proteasomal ATPase, i.e., 67QAMKDKIKEN76 for TBP1 (5), 55EVQEEYIKDEQKN67 for TBP7 (6), 81NQEQMKPLEEK91 for S4 (7), 44QIKQVEDDIQQ54 for MSS1 (8), and 98DVKNDINDV108 for p45 (9) were synthesized. Two cDNA libraries in λ gt11 were made from rat liver poly(A)⁺ RNA by priming with oligo(dT) and with a random hexamer. To isolate

¹ Corresponding author. Fax: (81)43-290-2824.

cDNA clones for rat proteasomal ATPases, we screened 1×10^6 plaques with each probe by hybridization at 42 °C for 14 h. Nucleotide sequences were determined by the dideoxy chain termination method.

Protein sequencing. The 26S proteasome was purified from rat liver as previously reported (10), and rat TBP7 was isolated by two-dimensional electrophoresis. The purified TBP7 was digested with trypsin, and several peptides were subjected to microsequencing.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Rat cDNAs Encoding the Proteasomal ATPases

On the basis of the reported sequences for the human proteasomal ATPases, we designed probes to obtain rat cDNAs encoding proteasomal ATPases. The probes A, B, C, D, and E, corresponding to the human TBP1, S4, MSS1, TBP7, and p45, respectively, were synthesized (see MATERIALS AND METHODS). We screened rat liver cDNA libraries prepared with λ gt11 vector by hybridization using those probes. Five clones, RAP-A2, RAP-B3, RAP-C5, RAP-D1, and RAP-E5 were obtained by use of probes A, B, C, D, and E, respectively.

RAP-A2, -B3, and -C5 (rat TBP1, S4, and MSS1). The cDNA insert of clone RAP-A2 contained the entire coding region of 439 amino acids with a predicted molecular mass of 49.2 kD (Fig. 1). The deduced amino acid sequence exhibited 99.1% overall similarity to that of human TBP1 (5) with only four amino acid substitutions, suggesting that RAP-A2 is a homolog of human TBP1 (designated hereafter as rat TBP1). Thr6, Pro7, Val42, and Arg409 in rat TBP1 are replaced by their respective Asn, Ile, Ile, and Ala in the human protein.

RAP-B3 and -C5 had an open reading frame composed of 440 and 433 amino acids with calculated molecular masses of 49.2 and 48.6 kD, respectively (Fig. 1). We observed striking similarities between RAP-B3 and human S4 (7) (Lys19 and Thr40 in RAP-B3 are substituted by Glu and Arg, respectively, in human S4) and between RAP-C5 and human MSS1 (8) (Pro239 in RAP-C5 is substituted by Arg in human MSS1). We concluded that RAP-B3 and -C5 are rat homologs of human S4 and MSS1, respectively.

RAP-D1 (rat TBP7). Determination of the nucleotide sequence of RAP-D1 revealed an open reading frame with 418 amino acids (Fig. 1). Comparison of the deduced protein sequence of RAP-D1 with that of the human TBP7 (6) showed striking identity in the region from the N-terminus to the 401st residue (Ile11 and Thr118 in RAP-D1 are substituted by Ala in human TBP7) (Fig. 2A). However, the sequence downstream from the 402nd residue in human TBP7 did not match the corresponding region of RAP-D1.

To further examine these differences in sequences between human TBP7 and RAP-D1, we determined several peptide sequences of rat TBP7 (see MATERIALS AND METHODS). In these, we found one peptide sequence, 410DEQEHEFYK418, that completely matched the C-terminal region of RAP-D1, but not that of human TBP7 (Fig. 2A). The C-terminal region of RAP-D1 agreed much better with that of the other proteasomal ATPases than with that of human TBP7 reported by Ohana *et al.* (6). For example, Val406 in rat TBP7 is conserved in all ATPases examined except in human TBP7 (Fig. 2A). These results, taken together, suggest that the previously published sequence for human TBP7 (6) has cloning/sequencing errors and that RAP-D1 is a true rat homolog of human TBP7.

RAP-E5 (rat SUG1). The RAP-E5 cDNA encoded a protein of 406 amino acids with a predicted size of 45.6 kD (Fig. 1). The predicted protein sequence of RAP-E5 is completely identical to that of the recently reported human p45 and exhibits 99.3% similarity to that of human Trip1. Both of these proteins have been reported to be a human homolog of the yeast SUG1 (9, 11, 12). Thus, RAP-E5 was denoted as rat SUG1. The overall structure of p45 is closely related, but not identical to that of Trip1 (9). The rat SUG1/p45 and Trip1 sequences differ at only three positions (residues 266, 272, and 300) (Fig. 2B). These differences in human p45 and Trip1 may result from allelic substitutions at a single gene locus or from sequencing/cloning errors (9). The amino acids at these three positions in human p45 and rat SUG1 are also conserved in yeast SUG1 (Fig. 2B).

(rat TBP1)

1 MNLLPTPESPVTRQEKMXTVWDEAEQDGI GEEVLK MSTE EIVQRTRLLDSEIKIMKSEVL RVTHELQAMK 70
 71 DKIKENSEKIKVNKTL PYLVSNVIELLDVDPNDQEEDGANIDLDSQRKGKCAVIKTSTRQTYFLPVIGLV 140
 141 DAELKPGDVLGVNKS YLILETLPT EYDSRVKAMEVDERPTEQYS DIGGLDKQIQELVEAIVLPMNHKE 210
 211 KFENLGIQPPKGVLMY GPPGTGKTL LARACAAQTATFLKLAGPQLVQMFIDGAKLV RDAFALAKEKAP 280
 281 SIIFIDELDAIGTKRF DSEKAGDREVQR TMLLELNQLDGFQPN TQVKVIAATNRVDILDPALLRSGRLDR 350
 351 KIEFPMPNEEARARIMQIHSRKMNVSPDV NYEELARCTDDFNGAQCKAVCVEAGMIALRRGATELTHEDY 420
 421 MEGILEVQAKKANLQYYA 433

(rat S4)

1 MGQSQSGHGPGGGGKDDKDKKKKY EPPVTRV GKKKKTKGPD AASKLPLVTPHTQCRLKLLKLERIKD 70
 71 YLLMEEEFIRNQE QMKPLEEKQEEERSKVD LRGTPMSVGTLEEIIDNHAI VSTSVGSEHYVSILSFVD 140
 141 KDLEPGCSVLLNHKVH AVIGVLMDDT DPLVTVMKVEKAPQ EYADIGGLDNQIQEIKESVELPLTHPEY 210
 211 YEEMGIKPPKGVILY GPPGTGKTL LAKAVANQTSATFLRVV GSELIQKYLGDGPKLVRELFRVAEEHAPS 280
 281 IVFIDEIDAIGTKRYDS NSGGEREIQR TMLLELNQLDGFDSR GDVKVIMATNRIETLDPALIRPGRIDRK 350
 351 IEFPLPDEKTKKRI FQIHTSRMTLADDV TLDLIMAKDDL SGADIKAICTEAGLMALRERRMKVTNEDFK 420
 421 KSKENVLYKKQEGTPEGLY 440

(rat MSS1)

1 MPDYLGADQRKTKED EKKDKPIRALDEGD IALLKTYGQSTYSRQIKQVEDDIQQLKKINELTGIKESDT 70
 71 GLAPPALWDLAADKQ TLQSEQPLQVARCTKI INADSEDPKYI INVKQFAKFVVDLSQVAPTDIEEGMRV 140
 141 GVDNRKYQIHIPLPPKIDPTVM MQVEEKPDV TYSDVGGCKEQIEKLEVVETPLLHPERFVN LGIEPPK 210
 211 GVLLFGPPGTGKTL CARAVANRTD ACFIPVIGSELV QKYVGE GARMVREL FEMARTKKA CLIFFDEIDAI 280
 281 GGARFDDGAGGDNEVQR TMLLELNQLDGF DPRGNIKVLMATNRPDTLDPALMRPGR LDRKIEFSLPDL EG 350
 351 RTHIFKIHARSMSVERDIR FELLARLCPN S TGAEIRSVCTEAGMFAIRARRKIATEKDFLEAVNKVIKSY 420
 421 AKFSATPRYMTYN 433

(rat TBP7)

1 MEEIGILVEKIQDEI PALSVSRPQTGLS FLGPEPEDLED LYSRYKKLQEQELFLEVQEEYIKDEQKNLKK 70
 71 EFLHAQEEVKRIQS IPLVIGQFLEAVDQNTA IVGSTTGSNYYVRILSTIDRELLKPNASVALHKHSNALV 140
 141 DVLPPAADSSIMMLTSD QKPDVYADIGGMDIQKQEVREAVELPLTHFELYKQIGIDPPRGVLMY GPPGC 210
 211 GKTMLAKAVAHHTTA AFIRVVGSEFVQKYL GEGPRMVRDVFRLAKENAPAIIFIDEIDAIATKRFDAQTG 280
 281 ADREVQRILLELNQMDGFDQNVNVK VIMATNRAD TLDPALLRPGR LDRKIEFPLPDRRQKRLIFSTITS 350
 351 KMNLSEEVDLEDYVARPDKISGADINSICQESGMLAVRENRYIVLAKDFEKAYKTVIKKDEQEHEFYK 418

(rat SUG1)

1 MALDGPEQMELEEGKAGSGLRQY YLSKIEELQLIVNDK SQNLRR LQAQRNELNAKVRLLREELQLLQEQG 70
 71 SYVGEVVRAMDKKVLKVHPEGK FVVDVDKNIDINDVTPNCRVALR NDSYTLHKILPNKVDPLVSLMMV 140
 141 EKVPDSTYEMIGGLDKQI KEIKEVIELPVKHP ELFEALGIAQPKGVLLY GPPGTGKTLARAVAHHTDCT 210
 211 FIRVSGSELVQKFI GEGARMVREL FVMAREHAPS IIFMDEIDSI GSSRLEGGSGGDSEVQR TMLLELNQL 280
 281 DGFEATKNIKVIMATNR IDILDSALLRPGRIDRKIEF PPPNEEARLDILKIHSRKMNLTRGINLRKIAEL 350
 351 MPGASGAEVKGVCTEAGMYALRERRVHVTQEDFEMAVAKVMQK DSEKNMSIKKLWK 406

FIG. 1. Structures of the rat proteasomal ATPases. Amino acid sequences of rat TBP1, S4, MSS1, TBP7, and SUG1 were deduced from the nucleotide sequences of RAP-A2, -B3, -C5, -D1, and -E5 cDNAs, respectively.

Structural Features and Possible Functions of Rat Proteasomal ATPases

Comparison of protein sequences among the rat ATPases demonstrated that the central regions of the five proteins were highly homologous to each other, with more than 60% identity; whereas their N- and C-terminal regions were divergent (Fig. 3A). Furthermore, several characteristic sequences were conserved in the five rat proteins. The N-terminal regions of rat TBP1, TBP7, and SUG1 had similar heptad repeats of five hydrophobic amino acid residues, predominantly leucine (Fig. 3B). Ohana *et al.* reported that human TBP1 and TBP7 are able to interact with each other through this region (6). The leucine zipper-like structure in rat SUG1 may also participate in homo-dimerization or hetero-dimerization. The rat ATPases were also found to share a highly

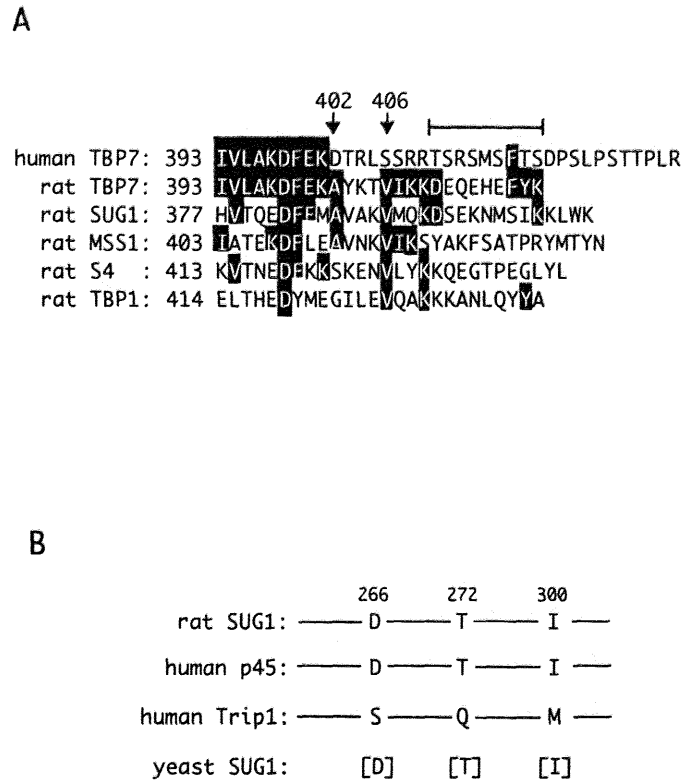


FIG. 2. Sequence alignment of various proteasomal ATPases. (A) Comparison of amino acid sequence for human TBP7 with those sequences of the rat ATPases. The C-terminal regions of the five rat ATPases and sequence between the 393rd and 429th residue in human TBP7 (458 residues) are shown. Black boxes indicate identical amino acid residues. Arrows represent positions of amino acid residues in rat TBP7. A bar above the sequences indicates amino acid sequence determined by protein microsequencing of rat TBP7. (B) Sequence alignment of rat SUG1, human p45, Trip1, and yeast SUG1. Lines indicate stretches of conserved amino acid residues among corresponding regions. Brackets indicate amino acids at the corresponding positions in the yeast SUG1.

conserved domain designated the ATPase module. This domain contains a putative ATP-binding motif "Gx4GKT" (13) and ATP hydrolysis motif "DEID" for RNA unwinding (14, 15). Two sequences related to the "SAT" and "H/QRxGRxxR" motifs, which are characteristic of RNA/DNA helicases (16), were also observed in the five rat ATPases: M/AAT and RP/SGRL/IDR (Fig. 3C). Most strikingly, we found the distance between individual motifs to be conserved in all rat proteasomal ATPases, i.e., 51 residues between Gx4GKT and DEID, 40 residues between DEID and SAT, and 10 residues between SAT and H/QRxGRxxR (Fig. 3C). These results suggest that these conserved four motifs are functionally important.

In this study, we isolated five rat proteasomal ATPases and demonstrated striking sequence similarities between them and human proteasomal ATPases. Comparison of protein sequences between proteasomal ATPases of these two species revealed only several amino acid substitutions (more than 99% identical) in their overall structures, implying that these ATPases perform essential functions in mammalian cells.

The proteasomal ATPases are members of the AAA family. Proteins in this family are associated with a variety of cellular functions, including vesicle-mediated transport, cell-cycle control, transcription, peroxisome biogenesis, and proteolysis (1, 2). The five human proteasomal ATPases are thought to be constituents of the 26S proteasome (3). Moreover, these ATPases including MSS1, TBP1, and TBP7 have been reported to work as transcription factors (5-7). However, we cannot rule out the possibility that the 26S proteasome is responsible for the turnover of transcription factors. At present, it still remains to be clarified whether these ATPases serve dual functions as components of transcriptional machineries as well as those of the proteolytic complex. We demonstrated herein that the five rat proteasomal ATPases have four motifs characterizing ATP-

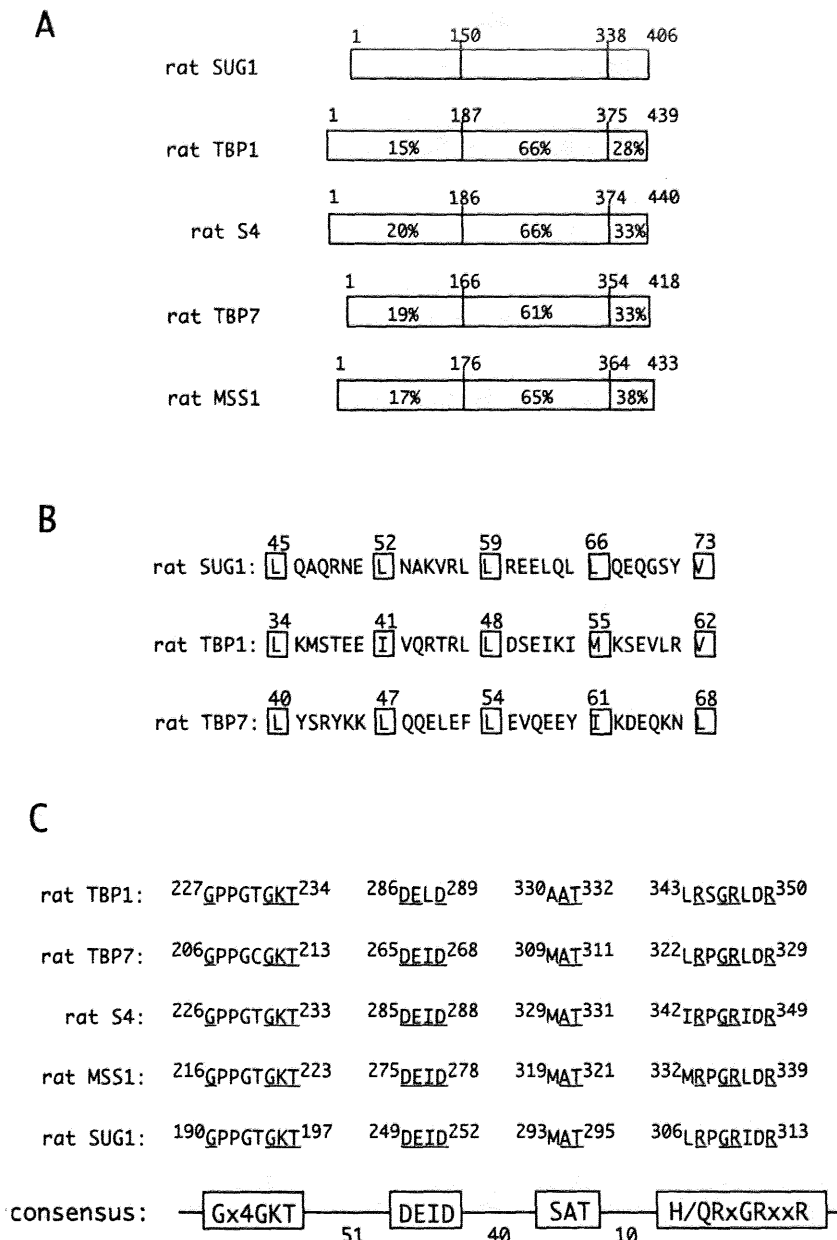


FIG. 3. Structural features of the rat proteasomal ATPases. (A) Schematic alignment of the five rat proteasomal ATPases. Amino acid identity was calculated on the basis of the sequence of rat SUG1 in each domain. (B) A putative leucine zipper-like structure in rat SUG1, TBP1, and TBP7. Boxes indicate hydrophobic amino acids forming the heptad repeats. Methionine, isoleucine, and valine are suitable alternatives for leucine (17). (C) Positions of four motifs conserved in the five rat ATPases. The superscript numbers at the left and right of each sequence show the amino acid positions for the motifs in the five rat ATPases. Underlines indicate conserved amino acids in individual motifs. Proposed consensus sequences in the ATP-dependent DNA/RNA helicase family are boxed. The numbers between the boxes indicate the distance in amino acid residues between individual motifs, which is strictly conserved in the five rat ATPases.

dependent RNA/DNA helicases, and that the spacing between the individual motifs is conserved in all these rat proteins, and as is the case for the five human proteasomal ATPases. These structural features suggest a function for the proteasomal ATPases in RNA/DNA unwinding as well as in ATP hydrolysis. Thus, we suspect that the proteasomal ATPases may be involved in RNA metabolism or processing including transcriptional or post-transcriptional regulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr K. Tanaka for helpful discussions. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas and for Encouragement of Young Scientists from The Japanese Ministry of Education, Science, Sports,

and Culture, and by grants from The Asahi Glass Foundation, The Naito Foundation, and The Ciba-Geigy Foundation (Japan) for The Promotion of Science.

REFERENCES

1. Ciechanover, A. (1994) *Cell* **79**, 13–21.
2. Peters, J. M. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 377–382.
3. Tanaka, K. (1995) *Mol. Biol. Rep.* **21**, 21–26.
4. Confalonieri, F., and Duguet, M. (1995) *BioEssays* **17**, 639–650.
5. Nelbock, P., Dillon, P. J., Perkins, A., and Rosen, C. A. (1990) *Science* **248**, 1650–1653.
6. Ohana, B., Moore, P. A., Ruben, S. M., Southgate, C. D., Green, M. R., and Rosen, C. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 138–142.
7. Dubiel, W., Ferrell, K., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22699–22702.
8. Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., Goebel, M., Taniguchi, T., and Matsumoto, K. (1992) *Nature* **357**, 700–702.
9. Akiyama, K., Yokota, K., Kagawa, S., Shimbara, N., Cemartino, G. N., Slaughter, C. A., Noda, C., and Tanaka, K. (1995) *FEBS Lett.* **363**, 151–156.
10. Ugai, S., Tamura, T., Takai, S., Komi, N., Chung, C. H., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994) *J. Biochem.* **113**, 754–768.
11. Lee, J. W., Ryan, F., Swaffield, J. C., Johnston, S. A., and Moore, D. D. (1995) *Nature* **374**, 91–94.
12. Swaffield, J. C., Bromberg, J. F., and Johnston, S. A. (1992) *Nature* **357**, 698–700.
13. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gray, N. J. (1982) *EMBO J.* **1**, 945–951.
14. Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. (1989) *Nucleic. Acids Res.* **17**, 4713–4730.
15. Schmid, S. R., and Linder, P. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 283–292.
16. Pause, A., and Sonenberg, N. (1992) *EMBO J.* **11**, 2643–2654.
17. Fu, X. Y. (1992) *Cell* **70**, 323–335.

SUG1, a Component of the 26 S Proteasome, Is an ATPase Stimulated by Specific RNAs

(Received for publication, May 2, 1997)

Yasutaka Makino, Kazuya Yamano, Masato Kanemaki, Kiyoshi Morikawa, Toshihiko Kishimoto, Naoki Shimbara†, Keiji Tanaka§, and Taka-aki Tamura¶

From the Department of Biology, Faculty of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-263, Japan, †Biomedical R&D Department, Sumitomo Electric Industries, 1 Taya-cho, Sakae-ku, Yokohama-244, Japan, and §Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Hon-komagome, Bunkyo-ku, Tokyo-113, Japan

SUG1 is an integral component of the 26 S proteasome. Belonging to a novel putative ATPase family, it shares four conserved motifs characteristic of ATP-dependent DNA/RNA helicases. Recombinant rat SUG1 (rSUG1) produced in *Escherichia coli* was highly purified and characterized in terms of its biochemical properties. The rSUG1 exhibited a Mg²⁺-dependent ATPase activity. The K_m for ATP and V_{max} of rSUG1 were 35 μ M and 7 pmol of ATP/min/ μ g of protein, respectively. Both ATPase activity to release [³²P]monophosphate and [³²P]ATP-labeling activity were coordinately affected by cold ATP severely, GTP and UTP moderately, and CTP little. Interestingly, the rSUG1 ATPase activity was stimulated by poly(U) and poly(C), but not by poly(A), poly(G), or by any forms of DNAs tested. A UV cross-linking assay also indicated poly(U)- and poly(C)-stimulated labeling of rSUG1 with [α -³²P]ATP. Moreover, the ATPase activity was facilitated by cellular poly(A)⁺ RNA, but not by poly(A)⁻ RNA. RNA transcribed *in vitro* from cDNA encoding a b-Zip protein could stimulate the ATPase activity. This is the first report to demonstrate a specific RNA requirement for ATPase with respect to the proteasomal ATPases. Our present work suggests that SUG1 can specifically interact with protein-coding RNA (mRNA) and play some roles in mRNA metabolism.

The 26 S proteasome is a huge protease complex that degrades short-lived proteins related to metabolic regulation and cell cycle progression (1, 2). It is composed of the 20 S catalytic core and an ATPase-containing 22 S regulatory complex (3, 4). The human 22 S complex contains at least five highly related putative ATPases, *i.e.* TBP1, TBP7, S4, MSS1, and p45 (a homolog of yeast SUG1), which are members of a novel ATPase family named the AAA family (ATPases associated with a variety of cellular activities) (5). The family members have a highly conserved ATPase module with 200 amino acids and fulfill a large diversity of functions. It was demonstrated that the five ATPases contain four conserved motifs characteristic of putative ATP-dependent RNA/DNA helicases (6–8). We previously reported constant distances between each motif among proteasomal ATPases, suggesting the functional importance of these motifs (6).

* This work was supported by grants-in-aid for scientific research on priority areas from The Japanese Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, and by a grant from CREST Japan Science and Technology. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-43-290-2823; Fax: 81-43-290-2824; E-mail: btamura@nature.s.chiba-u.ac.jp.

Of the above ATPases, SUG1 (11) has been shown by various studies to be involved in transcriptional regulation in addition to proteolytic function. The yeast SUG1 was reported to be a component of the RNA polymerase II (pol II) holoenzyme (12, 13), and Trip1, a human homolog of the SUG1, interacts with the thyroid hormone receptor (14). Baur *et al.* (15) also reported that mouse SUG1 interacts with various nuclear receptors. However, it is still controversial as to whether or not SUG1 acts as an intrinsic transcription factor because one cannot eliminate the possibility that those ATPases are involved in degradation of transcription factors mediated by the 26 S proteasome. Actually, some transcription factors are regulated by proteasome-dependent proteolysis (1). Biochemical study is required to resolve issues such as how the ATPases are involved in RNA metabolism such as transcriptional regulation. In this study, we report the purification and characterization of rat SUG1. We found that rSUG1¹ exhibited ATPase activity that was specifically stimulated by particular RNA molecules.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Purification of Rat SUG1—SUG1 cDNA was cloned from a rat liver cDNA library as described previously (6). Histidine-tagged rSUG1 was overexpressed in *Escherichia coli* by use of the pET vector system (16). Insoluble recombinant rSUG1 was purified by Ni²⁺-agarose under denaturing conditions according to the instructions supplied by Qiagen. The resulting proteins were further subjected to a preparative SDS-PAGE and recovered from the excised gels. The protein was redissolved in a urea-containing buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Nonidet P-40, 10% glycerol, and 8 M urea), and the urea was gradually removed by dialysis. These proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue.

Assay for ATP Hydrolysis—In the case of Fig. 3A, the ATPase activity was assayed by thin layer chromatography as described (32). Reactions (20 μ l) contained 0.5 μ g of purified rSUG1 in buffer A (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 70 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM dithiothreitol, 500 μ M ATP, and 1.25 μ Ci of [γ -³²P]ATP). ATP hydrolysis reactions were allowed to proceed at 37 °C for 30 min. Radioactive phosphate released from [γ -³²P]ATP was separated on a polyethyleneimine plate (Macherey-Nagel) using 1 M formic acid and 0.5 M lithium chloride. The released phosphates were visualized by autoradiography.

In other cases, the ATPase activity was assayed using activated charcoal (Sigma) as described by Armon *et al.* (17). The purified recombinant SUG1 (0.5 μ g) was incubated at 37 °C for 30 min in buffer A. On the basis of ϵ_{max} , amounts of RNA homopolymers were precisely determined from their A_{260} . Control reactions without rSUG1 were carried out in parallel tubes, and the control value (radioactivity) was subtracted from each experimental one. Each assay was done in triplicate, and the results were presented as a simple arithmetic average.

ATP Cross-linking Assay—ATP cross-linking assays were performed as described by Pause and Sonenberg (18). Reaction mixture (20 μ l) containing 0.5 μ g of rSUG1 in a buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 70 mM

¹ The abbreviations used are: rSUG1, rat SUG1; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

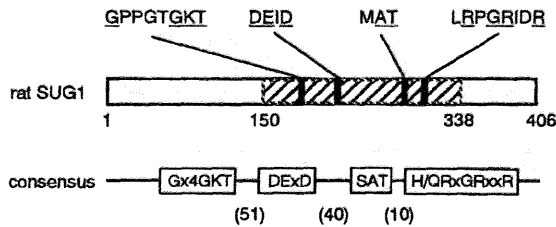


FIG. 1. Schematic representation of rat SUG1. Upper figure, sequences of the four motifs conserved among proteasomal ATPases and their positions. The striped box indicates the ATPase module. Lower figure, proposed consensus sequences for the ATPase family and their distance (numbers in parentheses). X, unspecified amino acid.

KCl, 5 mM magnesium acetate, 1.5 mM dithiothreitol, 10% glycerol, and 5 μ Ci of [α - 32 P]ATP) was irradiated by UV cross-linker LS1500 (Funakoshi) from a distance of 2 cm at 4 $^{\circ}$ C for 20 min. The samples were subjected to 10% SDS-PAGE, and then the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and subjected to autoradiography. Radioactivities were measured by a BAS 1500 phosphorimager (Fuji Film).

Preparation of Cellular RNAs—Cellular total RNA was prepared from rat liver by use of cesium trifluoroacetate as described (19). The total RNA was fractionated into poly(A)⁺ and poly(A)⁻ RNAs by oligo(dT)-Latex (Takara Shuzo) (20).

cDNA Clones and in Vitro Transcription—The cDNAs encoding rat HTF, TIP120, SUG1, and MSS1 were cloned in pBluescript, and *in vitro* RNA synthesis was conducted with T7 or T3 polymerase according to the instructions supplied by Promega. Quality of the synthesized RNAs was checked by agarose gel electrophoresis. HTF is a rat b-Zip transcription factor closely related to the human X-box-binding protein/Tax-response element-binding protein 5 and is activated in hepatocellular carcinoma as well as during normal hepatic cell growth in rats (30). TIP120, having partial homology to *Drosophila* TAF80, is a novel rat TBP-binding protein (31). MSS1 is a rat homolog of the human MSS1 and is a part of the 26 S proteasome (6).

RESULTS

Expression and Purification of Recombinant Rat SUG1—We cloned rat SUG1 (rSUG1) cDNA and found it to encode a protein of 406 amino acids (6) (Fig. 1) and to have exactly the same structure as human p45 (21), the human homolog of yeast SUG1. The central regions of rSUG1 and the other four proteasomal ATPases share greater than 60% identity and are designated as the ATPase module (Fig. 1). This domain contains a putative ATP-binding motif, GX₄GKT, and ATP hydrolysis motif, DEID, which is analogous to the DEXD box proteins including many ATP-dependent RNA/DNA helicases (22–25). Two additional sequences in rSUG1, SAT and (H/Q)RXGRXXR, are also characteristic motifs for RNA/DNA helicases (Fig. 1). Strikingly, we found the distance between individual motifs to be conserved in the five proteasomal ATPases, *i.e.* 51 residues between GX₄GKT and DEID, 40 residues between DEID and SAT, and 10 residues between SAT and (H/Q)RXGRXXR (Fig. 1) (6). The above findings suggest that these four motifs have some essential roles in the functioning of those ATPases.

To investigate the enzymatic nature of rSUG1, we subcloned its cDNA into the pET3a vector and expressed rSUG1 as a fusion protein with a histidine-tag appended to its N terminus in *E. coli*. Although rSUG1 protein was able to be overexpressed in *E. coli* (Fig. 2, lane 2), most of the protein was obtained in an insoluble fraction. We attempted to dissolve the insoluble protein in a urea-containing buffer and to purify it under denaturing conditions. Purification by Ni²⁺-agarose resulted in >40% pure protein as judged by inspection of the Coomassie Brilliant Blue-stained SDS-acrylamide gel (Fig. 2, lane 3). To further remove contaminating *E. coli* proteins, we subjected the protein sample to a preparative SDS-PAGE and subsequently excised the rSUG1 and extracted it from the gel. The recovered proteins were dissolved in a urea-containing buffer and then refolded by dialysis to gradually remove urea

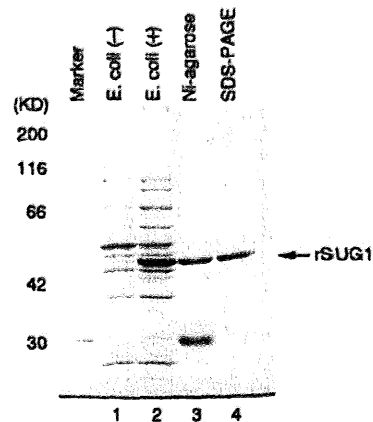


FIG. 2. Expression and purification of rSUG1. Histidine-tagged rSUG1 was overproduced and purified from *E. coli*. Lane 1, *E. coli* extract; lane 2, *E. coli* extract (induction by isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside); lane 3, purification by Ni²⁺-agarose under denaturing conditions; lane 4, rSUG1 recovered from preparative SDS-PAGE. Each sample was analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue.

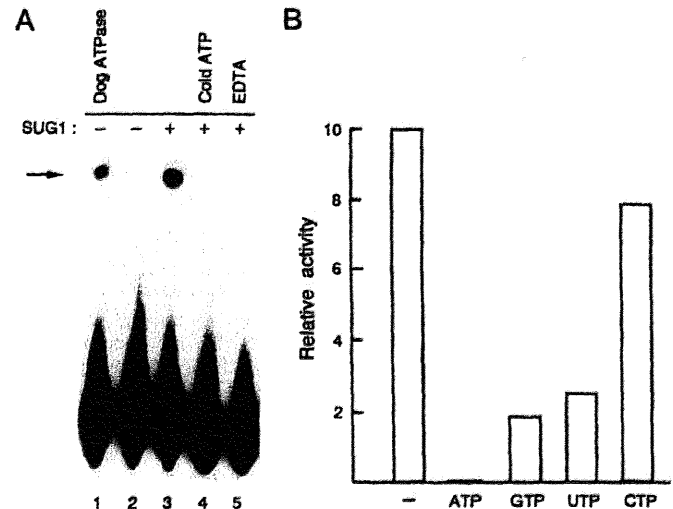


FIG. 3. ATPase activity of rSUG1. A, assay for rSUG1 ATPase. The ATPase activity was measured by thin layer chromatography as described under "Experimental Procedures." Reactions were carried out in the presence (+) or absence (-) of rSUG1. Cold ATP (lane 4) and EDTA (lane 5) were added for a final concentration of 5 mM and 25 mM, respectively. Dog kidney ATPase (Sigma) was used as a positive control (lane 1). B, nucleoside triphosphate specificity of rSUG1. The ATPase activity was assayed by the charcoal method described under "Experimental Procedures." Cold nucleoside triphosphates were added to the mixture at a final concentration of 5 mM. Relative ATPase activities are shown.

(see "Experimental Procedures"). As expected, the final preparation was apparently pure as judged by SDS-PAGE (Fig. 2, lane 4).

rSUG1 Protein Exhibits ATPase Activity—The ATPase activity of the purified rSUG1 was tested by its ability to release radioactive phosphate from [γ - 32 P]ATP as described under "Experimental Procedures." A commercial ATPase from dog kidney was used as a positive control (Fig. 3A, lane 1). We found that rSUG1 hydrolyzed ATP to release monophosphate (Fig. 3A, lane 3) but that the enzyme activity could not be detected in a parallel sample prepared from control *E. coli* (data not shown). It is thus evident that rSUG1 was able to hydrolyze ATP. Release of labeled monophosphates was inhibited by cold ATP and EDTA (Fig. 3A, lanes 4 and 5), suggesting that the rSUG1 is a Mg²⁺-dependent ATPase. Kinetic analyses of the rSUG1

TABLE I
Kinetic parameters of ATP hydrolysis

ATPase activity was measured using activated charcoal for 10 min as described under "Experimental Procedures" with ATP concentrations ranging from 5 to 500 μ M. Experiments were carried out in duplicate, and kinetic constants were calculated from a Lineweaver-Burk plot.

	K_m	V_{max}
	μ M	pmol/min/ μ g protein
rSUG1	35	7
rSUG1 + 0.25 μ g poly(U)	33	16
rSUG1 + 0.5 μ g poly(U)	30	23
rSUG1 + 1.0 μ g poly(U)	30	28

determined the K_m for ATP to be 35 μ M and the V_{max} to be 7 pmol of ATP/min/ μ g of protein (Table I).

To examine the nucleotide specificity for the SUG1-catalyzed hydrolysis, we employed unlabeled nucleotides as competitors. Expectedly, we found ATP was the most potent competitor; however, CTP competed little with ATP for hydrolysis. GTP and UTP significantly competed with ATP for hydrolysis by rSUG1 to some extent (Fig. 3B). Thus, rSUG1 is suggested to interact efficiently with all nucleotides except for CTP. This specificity of rSUG1 is similar to that of Yhs4p, a yeast homolog of the human S4 (26).

UV-mediated Labeling of rSUG1 with [α - 32 P]ATP—Using a photolabeling technique, we next studied whether polyribopyrimidines affect the interaction of rSUG1 with ATP. This technique, in which ATP is photolyzed by UV light in the presence of ATP-binding protein, yields a covalent adduct between ATP and proteins. By use of [α - 32 P]ATP, specific radioactive proteins can be visualized by SDS-PAGE and autoradiography. As shown in Fig. 4A, illumination with UV light resulted in the labeling of the rSUG1 protein (lane 1), and the labeling was efficiently inhibited by cold ATP (lane 2). Incubation of [α - 32 P]ATP for 20 min did not cross-link the ATP to the protein in the absence of UV light (Fig. 4A, lane 3).

To further confirm the labeling specificity, we carried out the UV-labeling reaction in the presence of cold nucleotides and then estimated the radioactive protein by a phosphoimager. Addition of CTP to the reaction had little effect on the UV labeling of rSUG1 with [α - 32 P]ATP, whereas GTP and UTP significantly reduced the labeling (Fig. 4B). Taken together, the effects of nucleotides on the UV labeling of rSUG1 were consistent with those on the ATP hydrolysis (Fig. 3B), suggesting that the labeled rSUG1 is attributed to the specific interaction with ATP.

Effects of Polyribopyrimidines on the rSUG1 Functions—Because SUG1 contains a DEAD motif, the protein is considered to belong to a subfamily of the DEAD-box proteins. This family carrying a putative DEAD-box helicase motif includes more than 100 proteins with diverse functions, and some of these proteins have an RNA-stimulated ATPase activity (27, 28). So we investigated whether or not nucleic acids would affect the ATPase activity of rSUG1. The enzyme activity was not affected by single-stranded or double-stranded DNA, whereas the rSUG1 ATPase activity was stimulated 6-fold by poly(U) (Fig. 5A). When the other RNA homopolymers were tested, we observed significant enhancement of the ATPase activity by polyribopyrimidines: poly(U) and poly(C). It is noteworthy that the homoribopolymer stimulation of the rSUG1 ATPase activity is different from that of Yhs4p, whose activity is enhanced by single stranded-DNA, double-stranded DNA, and RNA (26). Moreover, we analyzed the effect of RNA homopolymers on the UV labeling of rSUG1. Fig. 5B shows that the cross-linking was also highly stimulated by poly(U) and poly(C), but not by poly(G) and poly(A). On the basis of these results, we demonstrated that polyribopyrimidines specifically facilitate the pho-

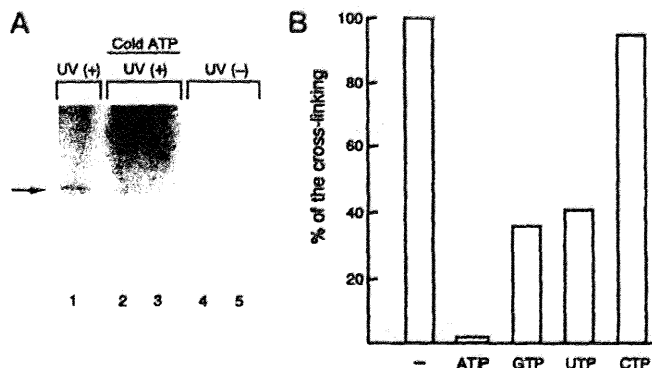


FIG. 4. UV cross-linking assay for rSUG1. A, labeling of rSUG1 with [α - 32 P]ATP. Reaction mixtures were subjected to UV irradiation (+). In lanes 2–5, each reaction was done in duplicate. Lanes 2 and 3 contain 5 mM cold ATP. Arrow indicates the position of labeled rSUG1. Lanes 4 and 5, without UV irradiation. B, effects of nucleotides on the labeling of rSUG1. The labeling reactions were performed in the absence (-) or presence of 50 μ M cold ATP, GTP, UTP, or CTP. The level of 32 P labeling of rSUG1 in the absence of cold NTPs is shown as 100%.

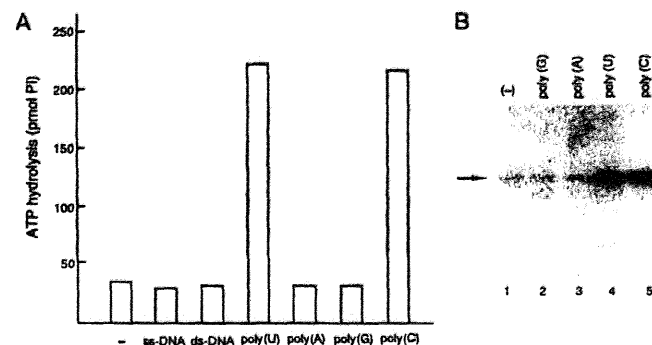


FIG. 5. Effects of nucleic acids on the rSUG1 functions. A, stimulation of the ATPase activity by RNA homopolymers. The ATPase activity was assayed without (-) or with (+) nucleic acids as indicated. One microgram of M13 single-stranded DNA (ss-DNA), pBluescript double-stranded DNA (ds-DNA), or various RNA homopolymers was added to the reaction mixture. Released phosphate (ATP hydrolysis) was measured as described under "Experimental Procedures." B, stimulation of the labeling of rSUG1 with [32 P]ATP by RNA homopolymers. UV cross-linking assay was performed in the absence (-) or presence of 1 μ g of RNA homopolymers as indicated. Arrow indicates the position of labeled rSUG1.

tolabeling of rSUG1 as well as its ATPase activity.

We also determined the kinetic parameters of the rSUG1 ATPase in the presence of poly(U). The K_m and V_{max} values showed similar affinity (K_m) for ATP in the hydrolysis reaction with or without poly(U) (Table I). In contrast, addition of 1 μ g of poly(U) increased the V_{max} 4-fold (Table I). When poly(C) was used, similar results were obtained (data not shown). The increased ATP cross-linking of rSUG1 by poly(U) and poly(C) correlated with their higher rate of ATP hydrolysis, but not with their ATP binding ability, since the K_m values of rSUG1 were similar in the presence or absence of the polyribopyrimidines. We suppose that the cross-linking assay used here detects two molecular species, i.e. ATP-bound rSUG1 and ADP-bound rSUG1. The ATP cross-linking of rSUG1 is suggested to reflect the abilities to both bind and hydrolyze ATP.

Stimulation of rSUG1 ATPase Activity by Particular Types of RNA—On the basis of the above results, it was important to examine whether natural RNA can stimulate the ATP hydrolysis reaction of rSUG1. Cellular total RNA, poly(A)⁺ RNAs, and poly(A)⁻ RNAs were added to the ATPase reaction. As shown in Fig. 6A, total RNA slightly stimulated the ATPase activity (1.5-fold). It was most striking that the ATPase activity was highly enhanced (6-fold) by poly(A)⁺ RNA, whereas

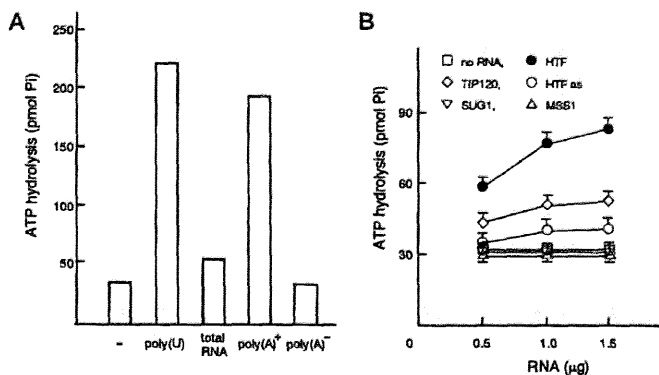


FIG. 6. Effect of native RNAs on the ATPase activity of rSUG1. A, stimulation of the rSUG1 ATPase activity by cellular poly(A)⁺ RNA. The enzyme activity was measured in the absence (-) or presence of various cellular RNAs (1 µg) as indicated. Released phosphate (ATP hydrolysis) was measured as described under "Experimental Procedures." B, stimulation of the ATPase activity by *in vitro* transcribed RNA. Four sense RNAs (SUG1, MSS1, TIP120, and HTF) and one antisense RNA (antisense HTF, *HTF^{as}*) were synthesized *in vitro* and added to the reaction mixture as indicated. Each point represents mean ± S.E. of five experiments.

poly(A)⁻ RNA exhibited apparently no effect (Fig. 6A). This finding suggests that the rSUG1 activity is specifically stimulated by mRNA.

We therefore examined the effect of various kinds of mRNA-type RNAs on the ATP hydrolysis. Four kinds of cDNAs encoding rat SUG1, MSS1 (6), HTF (30), and TIP120 (31) in pBluescript were transcribed by T7 or T3 RNA polymerase *in vitro* to produce sense and antisense RNAs as described under "Experimental Procedures." Each kind of RNA was then added to the reaction mixture for ATP hydrolysis by rSUG1. In these experiments, sense HTF RNA apparently stimulated ATP hydrolysis in a dose-dependent manner, and TIP120 sense RNA had a weak but significant effect (Fig. 6B). However, sense SUG1 and MSS1 RNAs, and antisense HTF RNA enhanced the ATPase activity little (Fig. 6B). These results suggest that, in a physiological environment, the ATPase activity of rSUG1 can be specifically stimulated by particular species of protein-encoding RNAs.

DISCUSSION

In this paper, we have provided evidence that rat SUG1 exhibits ATPase activity. Our rSUG1 preparation was apparently pure, and Sf9 cell-expressed soluble rSUG1 protein also showed the same enzyme properties (data not shown) as obtained with the renatured bacterially expressed protein. This agreement suggests that the nature of rSUG1 presented in this study reflects intrinsic enzyme activities. Importantly, biochemical characterization of the recombinant rSUG1 yielded the following significant findings. (i) The rSUG1 ATPase activity is specifically stimulated by particular types of RNAs including poly(C) and poly(U), but not by single-stranded and double-stranded DNAs. (ii) Polyribopyrimidines also enhance the labeling of rSUG1 with [α -³²P]ATP. (iii) Cellular poly(A)⁺ RNAs and *in vitro* transcribed specific RNAs enhance ATP hydrolysis.

Although several DEAD-box family proteins show ATPase activity facilitated by RNA, the observation that rSUG1 exhibits a specific RNA requirement is particularly interesting. rSUG1 is the first example of a proteasomal ATPase having such a requirement. Yhs4p, a yeast homolog of human S4, is activated by unspecified RNAs and DNAs commonly (26). It is of interest to investigate the effect of nucleic acids on the ATPase activity of human S4 and to compare the results between the human and yeast ATPases. Other mammalian pro-

teasomal ATPases might also exhibit such a nucleic acid requirement, since members of the ATPase family are highly homologous to each other. The DEAD-box proteins such as eIF-4A and p68 exhibit an RNA-unwinding activity as well as RNA-stimulated ATPase activity (27, 28). Therefore, we speculate that rSUG1 also could have an RNA-dependent helicase activity; however we unable to detect it in our rSUG1 preparation. A particular RNA substrate or some co-factor(s) might be required for nucleic acid unwinding.

We have reported here that rSUG1 activity is efficiently stimulated by synthetic RNAs and mRNA-type RNAs. How does HTF cDNA-derived RNA specifically activate the ATPase activity of rSUG1? We found that HTF cDNA contained clustered TC-rich stretches, whereas other cDNAs tested here did not (data not shown). Thus it is reasonable to assume that these stretches are important in such activation (30), since polyribopyrimidines highly stimulated ATP hydrolysis by rSUG1 (Fig. 3B). Additionally, it may be possible that the RNA requirement for rSUG1 is determined by unknown secondary/tertiary structure in mRNA-type RNAs. We suspect that more suitable substrates for SUG1 than RNA encoding HTF may be present among cellular mRNAs.

The observation that some mRNAs are specifically required to stimulate ATPase activity by rSUG1 raises an interesting question. SUG1 is one of the regulatory subunits of the 26 S proteasome (21, 29). Moreover, the protein has been reported to be an integral component of the RNA polymerase II complex and to bind to TATA-binding protein, as well as to several nuclear hormone receptors (12, 14, 15). However, it is still unclear that SUG1 functions as a factor responsible for transcription. Our data that ATPase activity of rSUG1 is facilitated by particular mRNAs suggest that rSUG1 interacts with mRNA and can play a role in mRNA metabolism in addition to one in proteolysis. This assumption may be supported by the fact that the ATPase activity of the rat 26 S proteasome (9) was not stimulated by poly(C) or poly(U) (data not shown). Most recently, McCracken *et al.* (10) demonstrated that the C-terminal domain of the RNA polymerase II large subunit associates with 3'-processing factors and splicing factors. These findings suggest that transcription, splicing, and processing (cleavage, polyadenylation, etc.) of mRNA are intimately coupled *in vivo*. Other investigations employing staining with antibodies against nuclear factors also support our idea (33). The RNA pol II holoenzyme is likely to contain all the general transcription factors and mRNA-processing factors. If SUG1 is, in fact, associated with RNA pol II holoenzyme, our findings might have profound implications for the role of SUG1 in mRNA processing, *i.e.* transcription or post-transcriptional events. However, we cannot exclude an alternative possibility that SUG1 in the 26 S proteasome is responsible for the degradation of some mRNA-binding proteins. Antizyme, a noncompetitive inhibitory protein, is responsible for degradation of ornithine decarboxylase by the 26 S proteasome (34, 35). The binding of antizyme induces a conformational change in ODC that promotes recognition of ornithine decarboxylase by the 26 S proteasome to stimulate its proteolysis (36, 37). Similarly, it is possible that some mRNA-binding proteins that undergo conformational changes induced by interaction with mRNAs may be targets of SUG1 for proteasome-mediated proteolysis.

Acknowledgments—We thank Drs. T. Yoshida and K. Kokura for valuable discussions.

REFERENCES

1. Ciechanover, A. (1994) *Cell* 79, 13–21
2. Peters, J. M. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 377–382
3. Tanahashi, N., Tsurumi, C., Tamura, T., and Tanaka, K. (1993) *Enzyme Protein* 47, 241–251
4. Chu-Ping, M., Vu, J. H., Proske, R. J., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N.

- (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3539–3547
5. Confalonieri, F., and Duguet, M. (1995) *BioEssays* **17**, 639–650
6. Makino, Y., Yogosawa, S., Kanemaki, M., Yoshida, T., Yamano, K., Kishimoto, T., Moncollin, V., Egly, J.-M., Muramatsu, M., and Tamura, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 1049–1054
7. Goyer, C., Lee, H. S., Malo, D., and Sonenberg, N. (1992) *DNA Cell Biol.* **11**, 579–585
8. Hirtzlin, J., Faber, P. M., and Franklin, R. M. (1994) *Eur. J. Biochem.* **226**, 673–680
9. Ugai, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Takai, S., Komi, N., Chung, C. H., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1993) *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 754–768
10. McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. (1997) *Nature* **385**, 357–361
11. Swaffield, J. C., Bromberg, J. F., and Johnston, S. A. (1992) *Nature* **357**, 698–700
12. Thompson, C. M., Koleske, A. J., Chao, D. M., and Young, R. A. (1993) *Cell* **73**, 1361–1375
13. Koleske, A. J., and Young, R. A. (1994) *Nature* **368**, 466–469
14. Lee, J. W., Ryan, F., Swaffield, J. C., Johnston, S. A., and Moore, D. D. (1995) *Nature* **374**, 91–94
15. Baur, E. V., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J. S., Garnier, J. M., Vivat, V., Douarin, B. L., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1996) *EMBO J.* **15**, 110–124
16. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 60–89
17. Armon, T., Ganoth, D., and Hershko, A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20723–20726
18. Pause, A., and Sonenberg, N. (1992) *EMBO J.* **11**, 2643–2654
19. Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, T., and Arai, K. (1987) *Methods Enzymol.* **154**, 3–28
20. Kuribayashi, K., Hikata, M., Hiraoka, O., Miyamoto, C., and Furuichi, Y. (1988) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **10**, 61–64
21. Akiyama, K., Yokota, K., Kagawa, S., Shimbara, N., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Noda, C., and Tanaka, K. (1995) *FEBS Lett.* **363**, 151–156
22. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gray, N. J. (1982) *EMBO J.* **1**, 945–951
23. Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4713–4730
24. Schmid, S. R., and Linder, P. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 283–292
25. Koonin, E. V. (1991) *Nature* **352**, 290
26. Lucero, H. A., Chojnicki, E. W. T., Mandiyan, S., Nelson, H., and Nelson, N. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 9178–9184
27. Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T., and Stahl, H. (1989) *Nature* **339**, 562–564
28. Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**, 1134–1144
29. Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Hengartner, C., Young, R. A., Goldberg, A. L., and Finley, D. (1996) *Nature* **379**, 655–657
30. Kishimoto, T., Kokura, K., Kumagai, Y., Makino, Y., and Tamura, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 746–751
31. Yogosawa, S., Makino, Y., Yoshida, T., Kishimoto, T., Muramatsu, M., and Tamura, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 612–617
32. Fuller-Pace, F. V., Nicol, S. M., Reid, A. D., and Lane, D. P. (1993) *EMBO J.* **12**, 3619–3626
33. Zeng, C., Kim, E., Warren, S. L., and Begget, S. (1997) *EMBO J.* **16**, 1401–1412
34. Li, X., and Coffino, P. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 3556–3562
35. Murakami, Y., and Hayashi, S. (1985) *Biochem. J.* **226**, 893–896
36. Murakami, Y., Matsufuji, S., Kemeji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1992) *Nature* **360**, 597–599
37. Bercovich, Z., Rosenberg-Hasson, Y., Ciechanover, A., and Kahana, C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15949–15952

Establishment of the Anti-Klotho Monoclonal Antibodies and Detection of Klotho Protein in Kidneys

Yukinari Kato,* Emi Arakawa,*† Satoko Kinoshita,* § Akio Shirai,* Akiko Furuya,* Kazuya Yamano,* Kazuyasu Nakamura,* Akihiro Iida,* Hideharu Anazawa,* Noritoshi Koh,§ Akiko Iwano,§ Akihiro Imura,§ Toshihiko Fujimori,§ Makoto Kuro-o,†‡ Nobuo Hanai,* Kazuhiko Takeshige,* and Yo-ichi Nabeshima†§¹

*Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 3-6-6, Asahi-machi, Machida-shi, Tokyo 194-8533, Japan;

†Division of Molecular Genetics, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira,

Tokyo 187-0031, Japan; ‡Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center

at Dallas, Dallas, Texas 75235-9072; and §Department of Pathology and Tumor Biology

Graduate School of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Received December 2, 1999

A novel gene, *klotho* (*kl*), which is involved in the development of a syndrome resembling human aging in mice, was recently identified. The *kl* gene encodes a single-pass membrane protein whose extracellular domain carries homology to β -glucosidases. There also exists a splice variant of *kl* mRNA which encodes a putative secreted protein in both human and mouse. In this study, to characterize the physiological roles of Klotho protein, we established three monoclonal antibodies (mAbs) against the recombinant human Klotho protein. The mAbs are named KM2076 (rat IgG_{2a}), KM2119 (rat IgG_{2b}), and KM2365 (mouse IgG₁). In Western blots, KM2076 and KM2119 specifically recognized a 130 kDa Klotho protein in the mouse and human kidney membrane fractions. To detect the human Klotho protein, the sandwich-type ELISA system with KM2076 and KM2365 was established. Using the ELISA system, we detected the human Klotho protein as low as 20 ng/ml in the supernatant of Chinese hamster ovary cells (CHO cells), introduced the human *klotho* gene. KM2076 and KM2119 specifically gave a positive staining by immunohistochemical staining in paraffin or frozen sections of the kidneys from wild-type mice but not in those from *kl* mice. Strong staining was observed especially in cortical renal tubules of the mouse kidney, where expression of *klotho* transcripts overlaps. KM2076 also showed a similar reaction pattern in the paraffin sections of rat and human kidneys.

Abbreviations used: mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RT-PCR, polymerase chain reaction with reverse transcription; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

¹To whom correspondence should be addressed. Fax: 81-75-753-4683. E-mail: nabemr@mlms.med.kyoto-u.ac.jp.

The mAbs established in this paper will serve as useful analytical, pathological, and diagnostic tools to disclose the role of Klotho protein in the suppression of a syndrome resembling human aging. © 2000

Academic Press

A novel mouse model for human aging was recently established and the gene responsible for it was identified (1). A decrease in the expression of a novel gene *klotho* (*kl*) in mice, leads to a syndrome resembling human aging. These mice, *klotho* mice, exhibited multiple disorders, such as arteriosclerosis, osteoporosis, skin atrophy, pulmonary emphysema, short life-span and infertility. The *kl* gene encodes a novel single pass-membrane protein (1,014 a.a.) consists of an N-terminal signal sequence, a putative extracellular domain with two internal repeats (hKL1 and hKL2), a single membrane-spanning region, and a short intracellular domain. These internal repeats share the sequence similarity to the β -glucosidase enzymes (2, 3). The human homologue of the *kl* gene encoding a membrane protein (1,012 a.a.) was also isolated (4). From the cDNA analysis, it was found that there exists a splice variant of *kl* mRNA which encodes a putative secreted protein (human: 549 a.a., mouse: 550 a.a.) lacking the second internal repeat of the extracellular domain (hKL2), the transmembrane domain and the intracellular domain (4, 5). Expression of the mouse *kl* gene was detected only in kidney and brain by Northern blot analysis. But the lower expression was observed in the pituitary gland, placenta, skeletal muscle, urinary bladder, aorta, pancreas, testis, ovary, colon and thyroid gland by RT-PCR (1). On the other



hand, the human *kl* gene transcript was expressed predominantly in the kidney, placenta, prostate and small intestine (4).

Recent studies showed that the pathophysiological significance of the Klotho protein in some rat models for human diseases such as (a) spontaneously hypertensive rat, (b) deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rat, (c) 5/6 nephrectomized rat, (d) non-insulin-dependent diabetes mellitus rat models (6). The expression levels of *kl* mRNA in the kidney in these rat models were significantly lower than controls, indicating that the expression of the *kl* gene in the kidney is regulated under sustained circulatory stress such as a long-term hypertension, diabetes mellitus, and chronic failure.

In this study, we immunized rats and mice with the human recombinant Klotho protein and established mAbs to detect Klotho protein in the western blots, ELISA system and immunohistochemical staining. These mAbs will serve as useful analytical, pathological and diagnostic tools to disclose the role of Klotho protein in the suppression of a syndrome resembling human aging.

MATERIALS AND METHODS

Specimens. Paraffin-embedded blocks of human tissues were kindly provided by Dr. T. Kamei of Yamaguchi Prefectural Central Hospital (Yamaguchi, Japan). Freshly isolated tissues from mice and rats were immediately fixed in 10% buffered formalin.

Expression of human recombinant Klotho protein. A SacII cDNA fragment which encodes a part of hKL1 (amino acids 55–261) and a cDNA fragment (KpnI-ApaI) which encodes a part of hKL2 (amino acids 801–954) were subcloned into a vector derived from pGHA2 (7). The recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* in inclusion bodies and was purified from SDS-polyacrylamide gel.

Hybridoma production and purification of mAbs. Rat monoclonal antibody (mAb), KM2076, was established by immunizing rats with a part of hKL1 (amino acids 55–261), and that of KM2119 was established by immunizing rats with a part of hKL2 (amino acids 801–954). KM2365 was established by immunizing mice with a synthesized amino peptide (DDAKYMYLKKFIMETLKAIKLDGV), which is a part of the human Klotho protein (8). The spleen cells were fused with mouse myeloma P3U1 cells, and the culture supernatants of the hybridomas were screened by ELISA for their ability to recognize the human recombinant Klotho protein. Hybridoma cells were cultured in RPMI growth medium, harvested by a brief centrifugation, and suspended in PBS. Four-week-old female BALB/c nude mice (CLEA Co., Tokyo, Japan) were given i.p. injections of the hybridoma cells. The mice were sacrificed 7 days later, and ascites fluid was collected. The mAbs were purified using protein G-Sepharose 4B gel beads (Zymed, San Francisco, CA).

Western blot analysis. Kidneys obtained either from human or from mice of 5-week-old wild-type or *klotho* mice were homogenized in the homogenize buffer (20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 0.25 M Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM 2-mercaptoethanol) by 6 passes in a Tefronglass homogenizer. Each homogenate was centrifuged at $100,000 \times g$ at 4°C for 10 min. The supernatant was centrifuged again at $100,000 \times g$ at 4°C for 1 h. After the pellet was resuspended in homogenize buffer, membrane proteins were extracted with 1% Triton X-100. Samples from mice kidneys (20 µg) or from human kidneys (100 µg) were boiled for 5 min, with 1:4 dilution of the sample buffer containing 200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 100

mM DTT, 40% glycerol, and 0.04% bromophenol blue. Proteins in the samples were separated on SDS-PAGE gel (7.5–15% gradient) and transferred onto PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% skim milk in PBS and were incubated with the culture supernatant at 37°C for 1 h. They were washed and were incubated with peroxidase-conjugated anti-rat IgG antibody (Amersham) at 37°C for 1 h. For visualizing bands, the ECL Western blotting detection system (Amersham) was used.

Biotinylation of antibodies. Biotinylation of KM2365 was performed with Antibody Biotinylation Kit (American Qualex, San Clemente, CA). Briefly, a purified KM2365 mAb (5 mg) was dissolved in 0.6 ml of carbonate buffer concentrate. Six hundred microliters of biotin solution (1 mg/ml) was added into the antibody solution and gently shook for 1 h at room temperature. Unreacted biotin was removed by passing through G25 column. The biotinylated KM2365 was stabilized by adding BSA to a final concentration of 1% (w/v) and stored at 4°C until use.

Sandwich ELISA for the detection of Klotho protein. Klotho protein level in the supernatant was determined with the sandwich ELISA as follows. Fifty microliters of KM2076 (10 µg/ml) in PBS was added into each well of the 96-well ELISA plate and incubated overnight at 4°C, and the wells were washed with PBS for 3 times and flooded with 1% BSA-PBS for 1 h at room temperature. The secreted isoform of human Klotho protein was constitutively expressed using CHO cells (unpublished data) and the supernatant (40 µl) was diluted and applied into each well and incubated overnight at 4°C. The supernatants were then aspirated and the wells were washed with 0.05% Tween 20 in PBS for 5 times. Fifty microliters of biotinylated KM2365 (10 µg/ml) in 1% BSA-PBS were added and incubated for 2 h at room temperature. After the wells were thoroughly washed with 0.05% Tween 20-PBS for 5 times, 50 µl of avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain DAB kit: Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) were added and incubated for 1 h at room temperature. After washed with 0.05% Tween 20-PBS for 5 times, 100 µl of ABTS solution with 0.1% H₂O₂ were applied for 10 min at room temperature, and the absorbance at 415 nm and 490 nm was measured.

In situ hybridization. ³⁵S-Labeled riboprobes were prepared from the full-length cDNA for mouse *klotho* (1). Antisense and sense [³⁵S]cRNAs were synthesized from linearized plasmids in the presence of [³⁵S]UTP (1289 Ci/mmol; New England Nuclear Corp; Boston, MA). *In situ* hybridization was performed as described previously (9). In brief, sections were postfixed with 4% PFA-PBS for 15 min. After washing with PBS, sections were digested with 1 µg/ml proteinase K (37°C for 15 min) in PBS and again treated with 4% PFA-PBS (10 min). Sections were then sequentially washed with PBS, incubated with 0.2 N HCl (10 min), again washed with PBS, acetylated with 0.25% acetic anhydride in the presence of triethanolamine (0.1 M, 10 min), dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and air dried. Hybridization with ³⁵S-labeled complementary RNAs (cRNAs; ca. 5×10^7 cpm/ml) were performed in a humidified chamber in a solution containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1× Denhardt's solution, 600 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 50 mM dithiothreitol, 0.25% sodium dodecyl sulfate, and 200 µg/ml transfer RNA (18 h; 55°C).

After hybridization, sections were washed briefly with 5× SSC (20× SSC: 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) at 50°C, 50% formamide–2× SSC (50°C for 30 min), and 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)–500 mM-1 mM EDTA (TNE; 37°C; 10 min). Sections were then treated with 10 µg/ml ribonuclease-A in TNE (37°C; 30 min). After being washed with TNE, sections were incubated once with 2× SSC (50°C; 20 min) and twice with 0.2× SSC (50°C; 20 min), dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and air-dried. Slides were then placed on X-ray films (Fujifilm, Tokyo, Japan) and film autoradiographs were obtained after overnight exposure. Slides were dipped into NTB-2 (Eastman Kodak, New Haven, CT) and stored at 4°C for specific times estimated from the intensity of the expression

on the X-ray film. After development, sections were counterstained with hematoxylin and eosin and mounted.

Immunoperoxidase staining (paraffin sections). Paraffin sections were dewaxed in xylene, hydrated through graded alcohol solutions and washed with PBS. Endogenous peroxidase was blocked by immersion in 0.3% (wt/vol) hydrogen peroxide in absolute methanol for 30 min at room temperature. The following steps were carried out using a Vectastain ABC kit. Briefly, after washed with PBS for 5 times, nonspecific binding was blocked with VECTASTAIN RABBIT Normal Serum for 20 min at room temperature. Then KM2076 (10 $\mu\text{g/ml}$) were applied on sections and incubated for 1 h at room temperature. Then sections were washed with PBS (5 times) and were incubated with anti RAT IgG. DAB substrate was diluted to the half and applied. Sections were incubated 2 to 4 min according to the time predetermined and the reaction was terminated by immersing sections into deionized water for 5 min. Sections were counterstained either with hematoxylin or with methyl-green, and dehydrated with increase concentration of ethanol solution and then with xylene and mounted.

Immunoperoxidase staining (frozen sections). Mice were either anesthetized with ether or killed by rapid cervical dislocation. Kidneys were removed, cut into slices in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS and further fixed in the same solution overnight at 4°C. They were rinsed sequentially with PBS containing 5 and 10% sucrose for 4 h and then with the same buffer containing 15% sucrose overnight at 4°C. Tissues were placed in O.C.T. compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and frozen with liquid nitrogen. Frozen sections (6 μm thickness) were prepared and mounted on silane-coated glass slides. To block the endogenous peroxidase, sections were first washed 3 times in cold 10% sucrose/PBS solution (5 min each) and then incubated in 0.3% H_2O_2 in methanol for 15 min at room temperature and rinsed off with PBS. Nonspecific binding was blocked by incubating sections with 10% nonimmune goat serum (Zymed Laboratories, Inc., CA) for 10 min at room temperature. KM2076 (2 $\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA/PBS) was applied on sections and they were incubated overnight at 4°C. After rinsed with cold 10% sucrose/PBS three times, sections were incubated with peroxidase-conjugated anti body (goat anti-rat IgG(H + L) HRP, Chemicon International Inc.) for 4 h at room temperature. After washed with cold 10% sucrose/PBS three times, DAB solution was diluted to the half and was applied for 1 min at room temperature as described in the Vectastain DAB kit protocol. Sections were washed and stained with hematoxylin.

Fluorescence staining (frozen sections). Sections were prepared as described in immunoperoxidase staining (frozen sections) except

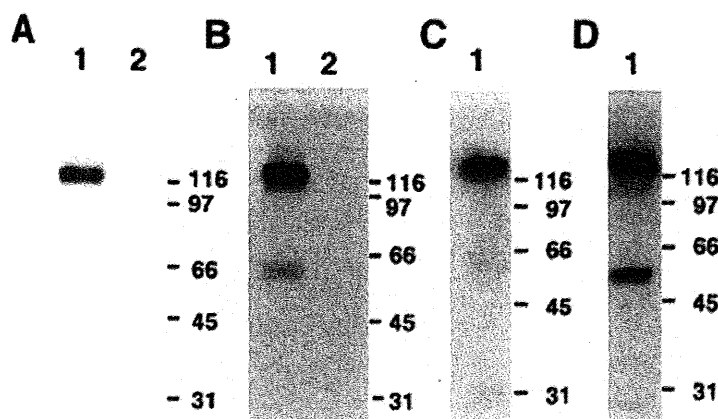


FIG. 1. Immunoblot analysis of the Klotho protein in the kidneys. Immunoblot analysis of the Klotho protein in the kidneys of wild (lane 1) and *kl* mice (lane 2) with (A) KM2076 and (B) KM2119. Immunoblot analysis of the Klotho protein in the human kidneys (lane 1) with (C) KM2076 and (D) KM2119.

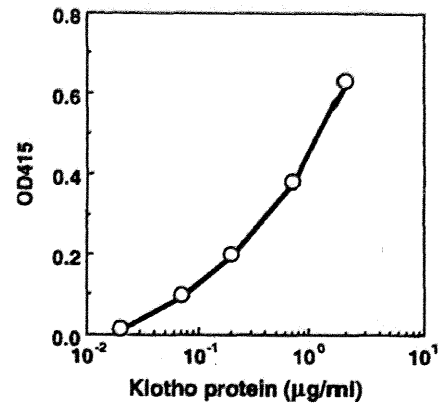


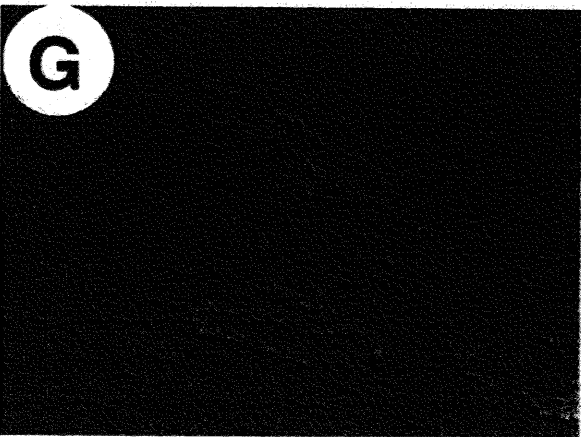
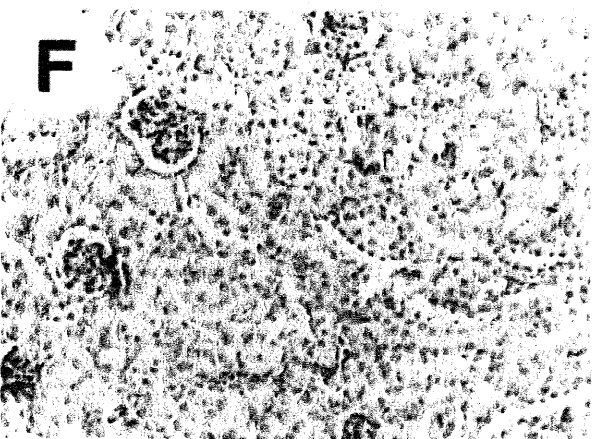
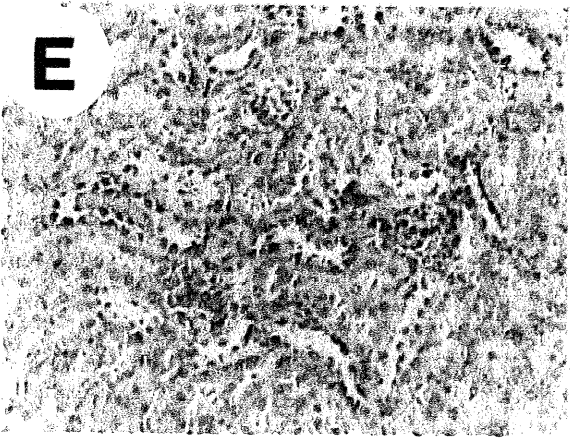
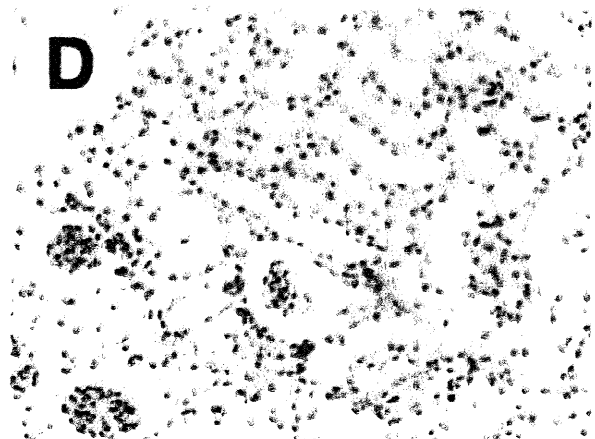
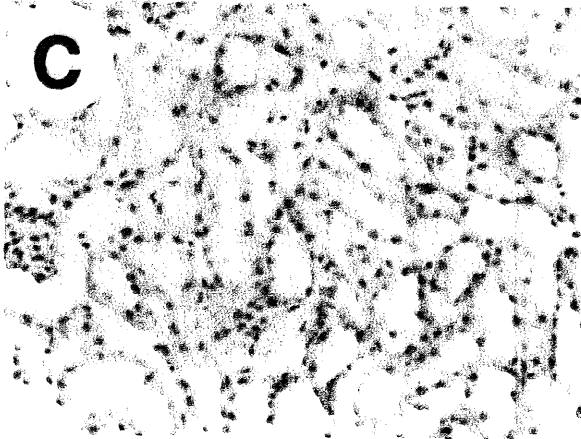
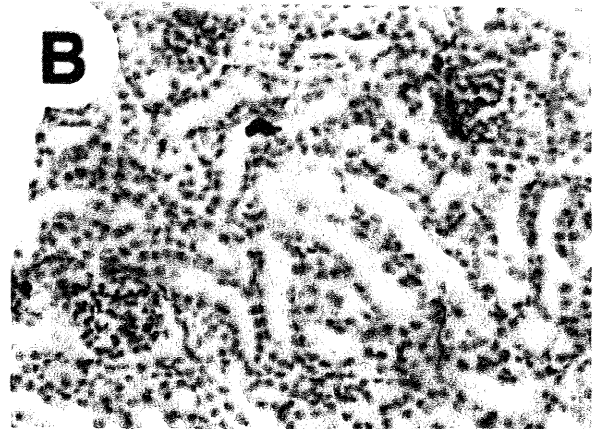
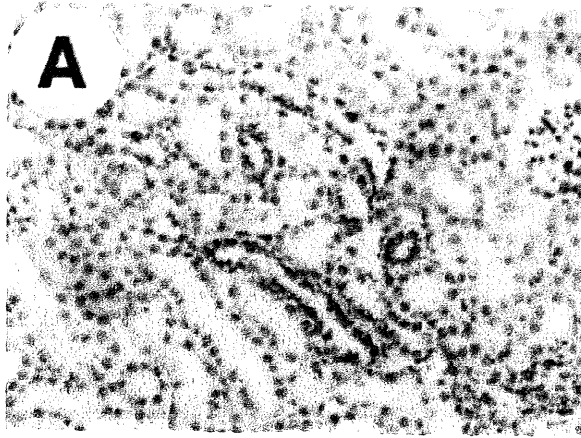
FIG. 2. Standard curve of sandwich ELISA for the detection of the Klotho protein.

for using avertin (0.8 ml/head) as anesthetic. After washing out O.C.T. compound with PBS, nonspecific binding was blocked with 10% goat serum for 15 min. KM2119 (ascites, 100 \times dilution with 3% FCS-PBS) incubation were done for 1 h followed by washing with PBS. Sections were incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG(H + L) conjugate (200 \times dilution with 3% FCS-PBS, Molecular Probes, Inc., OR) for 30 min (dark) and washed with PBS. Samples were observed with a Leica TCS SP confocal laser scanning microscope (absorbance 488 nm and emission 520 nm).

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of anti-human Klotho mAbs. Here, we presented the establishment of a mAbs against Klotho protein. We immunized rats and mice with the recombinant human Klotho protein or a synthesized amino peptide and obtained three mAbs (KM2076, KM2119 and KM2365) as described in Materials and Methods (8). Matsumura *et al.* (4) reported that there are two transcripts which apparently arise from alternative splicing of *kl* mRNA. One transcript encodes a single-pass membrane protein with internal repeats (hKL1, hKL2). The other transcript encodes only hKL1 domain corresponding to a secreted-form of Klotho protein. As the immunized antigen for KM2119 was a part of hKL2 domain, this antibody does not recognize the secreted form. On the other hand, the immunized antigen for KM2076 and KM2365 was a part of hKL1, these mAbs could react with both the membrane and the secreted form of Klotho protein.

Typical results of western blots were shown in Fig. 1. KM2076 specifically recognized a 130 kDa Klotho protein exists in the membrane fraction from the wild-type mouse kidney, but not that from the *kl* mice (Fig. 1A). KM2076 also recognized specifically a 130 kDa Klotho protein in the membrane fraction of human kidney (Fig. 1C). KM2119 also recognized the 130 kDa Klotho protein in the membrane fraction from the wild-type mouse kidney (Fig. 1B) and the human kidney (Fig. 1D), but not that from the *kl* mice (Fig. 1B). Interestingly, KM2119 additionally recognized a 60 kDa protein as well as a 130 kDa one in the wild-type mouse



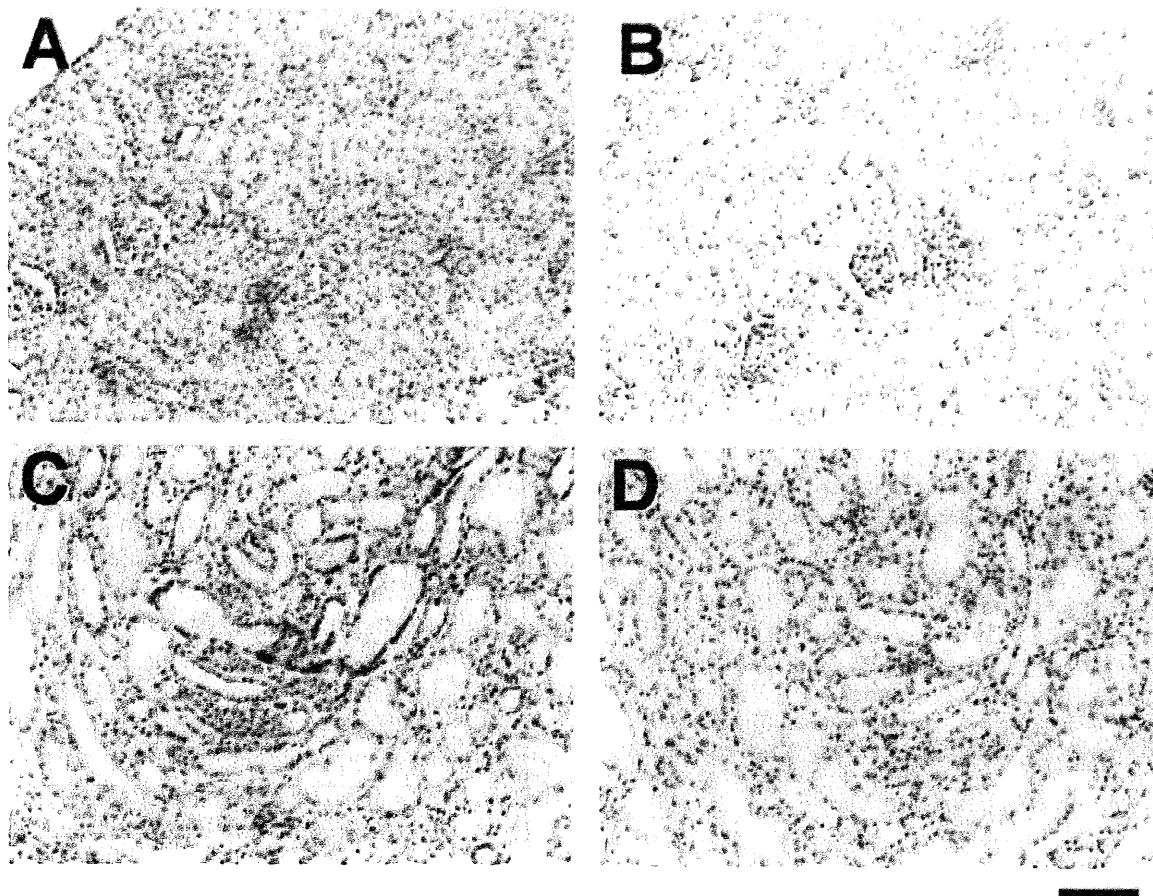


FIG. 4. Immunoperoxidase staining of kidneys with KM2076. Paraffin sections of (A and B) rat or (C and D) human kidneys. (A and C) KM2076 and the secondary mAb were sequentially applied as described under Materials and Methods. (B and D) The secondary antibody but not KM2076 was applied. Sections were counterstained with hematoxylin. Bar represents 100 μm .

(Fig. 1B) and the human (Fig. 1D) kidneys. It might be possible that a part of extracellular domain of Klotho protein was cleaved and the rest of Klotho protein near KL2 domain was recognized as 60 kDa protein.

Sandwich ELISA for the detection of Klotho. The supernatant of CHO cells expressing human *klotho* cDNA was serially diluted, and the level of Klotho protein was determined with the sandwich ELISA. As shown in Fig. 2, the value of A415 corresponded well to the concentration of Klotho protein. Using the ELISA, we concluded that the Klotho protein as low as the concentration of 10 to 20 ng/ml could be detected.

Localization of the *klotho* transcript and Klotho protein. Strong signals of *klotho* transcripts were observed on the cortical renal tubules of the wild-type

mouse kidney, but not those of the *kl* mouse (Fig. 3A, B). The interesting point is that not all the cells in the cortical renal tubules express the mRNA. These signals are specific for *kl* transcripts, because we did not detect any signals with the *kl* sense probes (data not shown). The pattern of localization of *kl* transcripts was similar to that reported earlier (1).

To select mAbs available for the immunohistochemical detection of Klotho protein, we first stained kidneys from wild-type and *kl* mice. Among mAbs tested, KM2076 specifically stained the cortical renal tubules of wild-type mice kidney in both frozen (Fig. 3C) and paraffin sections (Fig. 3E) by immunoperoxidase staining. We concluded that the staining was specific for Klotho protein, because we did not detect any staining

FIG. 3. Expression of *klotho* mRNA and Klotho protein in the mouse kidneys. (A and B) Expression of mRNA for *kl* in the kidney of 7-week-old mouse. *In situ* hybridization was performed on sections with ^{35}S -labeled cRNA probes that was specific for mRNA for *kl*. (A) Bright-field image with the kidney from the wild-type mouse. Expression of *kl* mRNA was detected as the dense localization of black grains on the renal tubules. (B) Bright-field image with the kidney from *kl* mice. (C and D) Immunoperoxidase staining of kidneys with KM2076. Frozen sections of kidneys isolated from (C) wild-type or (D) *kl* mice were stained with KM2076. Sections were counterstained with hematoxylin. (E and F) Immunoperoxidase staining of kidneys with KM2076. Paraffin sections of kidneys isolated from (E) wild-type or (F) *kl* mice were stained with KM2076. Sections were counterstained with methyl-green. (G) Fluorescence staining of the wild-type mouse kidney with KM2119. Green signals represent signals from Klotho staining. The bars under B, F, and G represent 100 μm for A, B, E, F, and G, and the bar under D represents 50 μm for C and D.

on the cortical renal tubules of *kl* mice kidney (Figs. 3D and 3F). KM2119 also specifically stained the cortical renal tubules of wild-type mice kidney on frozen sections by fluorescence staining (Fig. 3G). The localization of Klotho protein in the mouse kidney was similar to that of *kl* transcripts. Using KM2076, we further stained the paraffin sections of the rat (Figs. 4A and 4B) and the human (Figs. 4C and 4D) kidneys. KM2076 also gave specific staining on the cortical renal tubules of rat (Fig. 4A) and human (Fig. 4C) kidneys.

In conclusion, among the monoclonal antibodies established, KM2076 can be used to detect human Klotho protein for the Western blot analyses. Also KM2076 can be used to monitor the secreted form of human Klotho in ELISA system with the combination with KM2365. KM2119, which detects the KL2 part of Klotho, gave an additional 60 kDa band as well as 130 kDa band in the samples from human and mouse kidneys in Western blot. For immunohistochemical analysis, KM2076 gave a specific staining of Klotho in mouse, rat, and human kidney sections. KM2119 also gave a similar result in mouse kidney sections by using fluorescence staining. Besides the characterization above, we also have a preliminary data of the availability of KM2076 and KM2119 for the immunoprecipitation of Klotho protein.

These antibodies will be powerful tools for understanding the function of Klotho.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hiroe Sato, Yukiko Shimizu, Yumiko Teramoto, and Hayumi Tsunoda for their technical assistance.

REFERENCES

1. Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Iida, A., Iida, S., T., Nishikawa, S., Nagai, R., and Nabeshima, Y. (1997) *Nature* **390**, 45–51.
2. Grabnitz, F., Seiss, M., Rucknagel, K. P., and Staudenbauer, W. L. (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 301–309.
3. Mantel, N., Villa, M., Enzler, T., Wacker, H., Boll, W., James, P., Hunziker, W., and Semenza, G. (1988) *EMBO J.* **7**, 2705–2713.
4. Matsumura, Y., Aizawa, H., Iida, S., T., Nagai, R., Kuro-o, M., and Nabeshima, Y. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 626–630.
5. Iida, S., T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagai, R., Kuro-o, M., and Nabeshima, Y. (1998) *FEBS Lett.* **424**, 6–10.
6. Aizawa, H., Saito, Y., Nakamura, T., Inoue, M., Imanari, T., Ohyama, Y., Matsumura, Y., Masuda, H., Oba, S., Mise, N., Kimura, K., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., and Nagai, R. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 865–871.
7. Nishi, T., and Itoh, S. (1986) *Gene* **44**, 29–36.
8. Hanai, N., Shitara, K., and Yoshida, H. (1986) *Cancer Res.* **46**, 5206–5210.
9. Lee, K., Deeds, J. D., and Segre, G. V. (1995) *Endocrinology* **136**, 453–463.

Engineering Chinese Hamster Ovary Cells to Maximize Effector Function of Produced Antibodies Using FUT8 siRNA

Katsuhiko Mori, Reiko Kuni-Kamochi, Naoko Yamane-Ohnuki, Masako Wakitani, Kazuya Yamano, Harue Imai, Yutaka Kanda, Rinpei Niwa, Shigeru Iida, Kazuhisa Uchida, Kenya Shitara, Mitsuo Satoh

Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,
3-6-6 Asahi-machi, Machida-shi, Tokyo 194-8533, Japan;
telephone: + 81-42-725-2555; fax: + 81-42-726-8330;
e-mail: msatoh@kyowa.co.jp

Received 15 March 2004; accepted 26 August 2004

Published online 28 October 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20326

Abstract: We explored the possibility of converting established antibody-producing cells to cells producing high antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) antibodies. The conversion was made by constitutive expression of small interfering RNA (siRNA) against α 1,6 fucosyltransferase (FUT8). We found two effective siRNAs, which reduce FUT8 mRNA expression to 20% when introduced into Chinese hamster ovary (CHO)/DG44 cells. Selection for *Lens culinaris agglutinin* (LCA)-resistant clones after introduction of the FUT8 siRNA expression plasmids yields clones producing highly defucosylated (\approx 60%) antibody with over 100-fold higher ADCC compared to antibody produced by the parental cells (\approx 10% defucosylated). Moreover, the selected clones remain stable, producing defucosylated antibody even in serum-free fed-batch culture. Our results demonstrate that constitutive FUT8 siRNA expression can control the oligosaccharide structure of recombinant antibody produced by CHO cells to yield antibodies with dramatically enhanced ADCC. © 2004 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: recombinant antibody production; antibody-dependent cellular cytotoxicity; siRNA; α 1,6 fucosyltransferase; fed-batch culture; CHO cells

INTRODUCTION

Monoclonal recombinant antibodies IgG, containing two complex-type N-linked oligosaccharides in the Fc, are commonly used therapeutically. Clinical studies have shown that antibody effector functions, especially antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), are very important for clinical efficacy (Cartron et al., 2002; Clynes et al., 2000; Lewis et al., 1993). ADCC is triggered upon binding of lymphocyte receptors (Fc γ Rs) to the antibody constant region (Fc), and is largely dependent on the Fc oligosaccharide structure (Davies et al., 2001; Jefferis et al., 1998; Kumpel et al., 1994, 1995; Ripka et al., 1986; Umana et al.,

1999; Wright and Morrison, 1997). Previous attempts to enhance recombinant antibody ADCC focused on the effect of oligosaccharide sialic acid (Ripka et al., 1986), galactose (Kumpel et al., 1994, 1995), or bisecting GlcNAc (Davies et al., 2001; Umana et al., 1999) on antibody binding to Fc γ R. However, it has been recently shown that the oligosaccharide fucose residue plays the critical role in ADCC. Defucosylated anti-CD20 IgG1 (Rituxan[®]) shows over 50-fold greater ADCC compared to fucosylated Rituxan[®] and defucosylated anti-Her2 IgG1 (Herceptin[®]) shows enhanced ADCC with improved Fc γ RIIIa binding (Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003).

Recombinant protein expression technology in mammalian cell culture is the principal means of commercial production of therapeutic antibodies; indeed, all approved therapeutic recombinant antibodies are produced using mammalian cells such as Chinese hamster ovary (CHO) and mouse myeloma host cell lines. Robust antibody production processes using these host cell lines have been developed. These processes are proven to produce safe and effective antibody molecules with serum half-lives equivalent to those observed for naturally occurring antibodies. However, it still remains to be solved to control the oligosaccharide structure of the products to maintain product consistency with desired efficacy because the majority of the recombinant antibody generated by mammalian cells is known to be fucosylated (Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003). A strategy for consistently regulating recombinant product oligosaccharide structure in mammalian cell culture would be a considerable advantage for the manufacture of glycoprotein therapeutics, particularly antibodies. We explored whether RNA interference (RNAi) against α 1,6 fucosyltransferase (FUT8) would result in production of more homogeneous antibodies with a greater proportion of fully defucosylated oligosaccharides.

RNAi-mediated gene silencing was initially shown by introducing 21 or 22-nucleotide (nt) double-stranded RNAs

Correspondence to: Mitsuo Satoh

with 2-nt 3' overhangs, small interfering RNA (siRNA), into mammalian cell lines including NIH3T3, COS-7, HeLaS3, and 293 to inhibit target gene expression in a sequence-dependent fashion (Elbashir et al., 2001). Since this pioneering work, use of RNAi in mammalian cells has become newsworthy because it is more potent than the conventional approaches for loss of function, such as antisense RNA (Bennett and Cowser, 1999) and ribozyme technology (Amarzguioui and Prydz, 1998).

Here we report that constitutive expression of siRNA against FUT8 makes it possible to convert normal antibody-producing CHO cell lines to more desirable cell lines that produce therapeutic antibody with enhanced ADCC.

MATERIALS AND METHODS

siRNA Expression Plasmid Construction

For siRNA sense strand expression, the U6 promoter (Kunkel and Pederson, 1988; Miyagishi and Taira, 2002) from -265 to +1 was amplified by PCR from human genomic DNA (Clontech) using the following primers: 5'-GCTCTAGAGA ATTCAAGGTC GGGCAGGAAG AGG-CCTATT TC-3' and 5'-CGGGATCCTT CACGTGTTTC

GTCCTTTCCA CAAGATATAT AAAGCC-3' and cloned into pBluescriptII[®] SK(-) (Stratagene) using XbaI and BamHI sites (underlined). Synthetic DNA encoding the siRNA sense sequence with transcriptional termination (T5) was then introduced immediately downstream of the U6 promoter using PmaCI and BamHI sites (in italics). The PmaCI site allowed siRNA sequence insertion so as to retain the first nucleotide G of the U6 promoter. The resultant plasmid was designated U6_sense_B (or R). For the siRNA antisense strand expression, the U6 promoter was amplified with the following primers: 5'-CGGGATCCAA GGTCGG-GCAG GAAGAGGGCC TATTTCC-3' and 5'-CGGAA-TTCTT CACGTGTTTC GTCCTTTCCA CAAGATATAT AAAGCC-3' and cloned into pBluescriptII[®] SK(-) using BamHI and EcoRI sites (underlined). This siRNA antisense sequence and transcriptional termination (T5) was introduced between the PmaCI and EcoRI sites (in italics). The resultant antisense strand expression unit was inserted into U6_sense_B (or R) using BamHI and SalI sites. The constructed siRNA expression unit was excised at the PvuII sites and inserted into the PvuII site of the pPUR vector (Clontech) encoding a puromycin resistance gene as a selection marker. Two siRNA plasmids, designated as U6_FUT8_B_puro and U6_FUT8_R_puro, were constructed (Fig. 1).

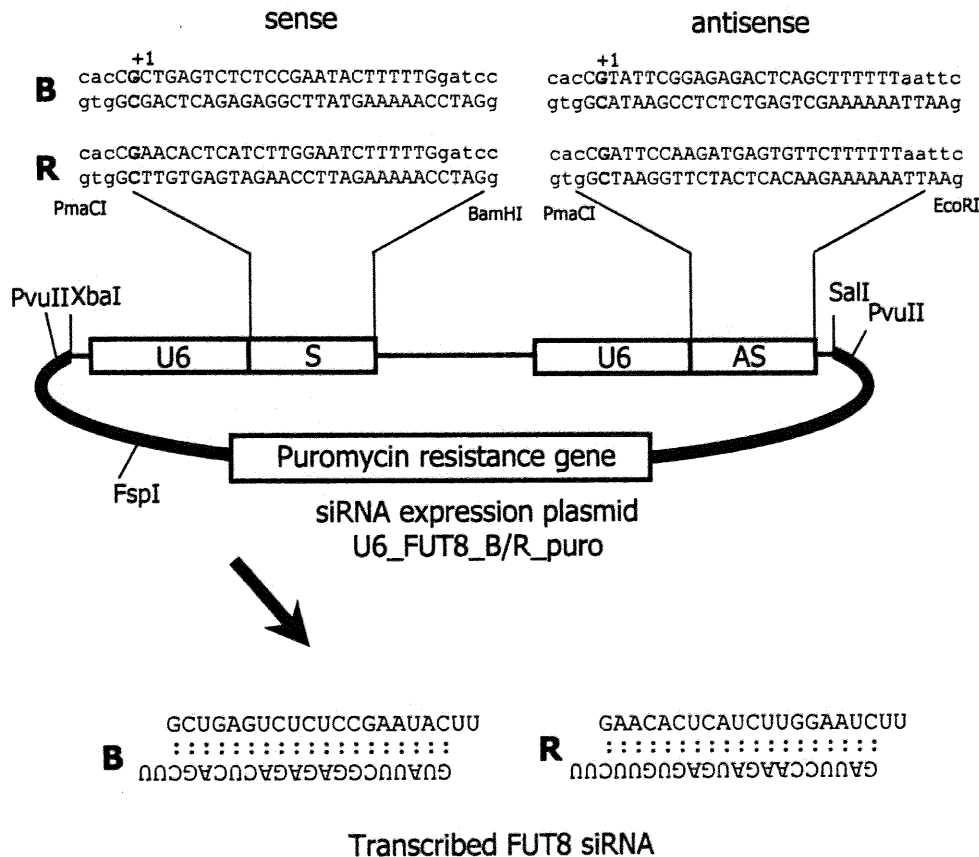


Figure 1. Structure of FUT8 siRNA expression plasmids and the transcripts. Synthesized DNA encoding sense and antisense strands of FUT8 siRNA are shown in capital letters. The transcribed sense and antisense RNAs, which have 2 ≈ 4 uridine overhangs at the 3' end, are annealed to form FUT8 siRNAs. S, Sense strand; AS, Antisense strand; U6, U6 promoter.

Establishment of Anti-CCR4 Antibody KM3060 Producing Cell Lines

The CHO/DG44 cell line (Urlaub et al., 1986) was kindly provided by Dr. Lawrence Chasin (Columbia University, NY). The variable region cDNAs were cloned from hybridoma cells producing anti-CCR4 antibody KM2160 (Niwa et al., 2004), and inserted into the chimeric antibody expression vector pKANTEX93 (Nakamura et al., 2000). This vector was transfected into CHO/DG44 cells and the transfectants were selected on the basis of antibody production with stepwise gene amplification in medium containing methotrexate (MTX) up to 500 nM. After two rounds of single cell isolation, two producers with high specific production rate (SPR), designated 32-05-09 and 32-05-12, were selected.

Introduction of FUT8 siRNA Expression Plasmids

1.6×10^6 32-05-09 or 32-05-12 cells were transfected by electroporation with 10 μ g FUT8 siRNA expression plasmid (or mock pPUR) linearized at the *FspI* site. Transfectants were selected in 12 μ g/mL puromycin (Sigma) for 6 days and several colonies were randomly isolated to analyze FUT8 expression levels. The remaining transfectants were subjected to one-week selection with 0.5 mg/mL *Lens culinaris agglutinin* (LCA), which lyses cells via cell surface fucose residues. Each of the resultant LCA-resistant colonies was isolated and expanded for further analysis.

Flask Cell Culture

Two LCA-resistant KM3060-producing clones (designated 9R-3 and 12B-5) and the parental cells (35-05-09 or 35-05-12) were grown to confluence in T75 flasks (Greiner) with IMDM containing 10% FCS. The culture medium was then replaced with serum-free medium EX-CELL[®] 301 (JRH Bioscience). After culturing for 7 days, antibody was purified from the culture media using MabSelect[®] (Amersham) and stored in 10 mM citrate / 0.15M NaCl (pH 6.0).

Serum-Free Fed-Batch Culture

Clones 9R-3, 12B-5, 35-05-09 and 35-05-12 were directly adapted to serum-free medium EX-CELL[®] 302 (JRH Biosciences) supplemented with 6 mM L-glutamine and 500 nM MTX. Fed-batch cultures were carried out at 35°C, 5% CO₂ (v/v) in 250 mL Erlenmeyer Flasks (Corning) at 100 rpm for 13 days without pH control. The EX-CELL[®] 302-adapted cells were inoculated at 3.0×10^5 cell/mL, and serum-free IMDM-based feeding medium was added at days 3, 6, 9, and 11 after inoculation to maintain a glucose content of approximately 3.5 g/L. Viable cell density was determined by visual inspection using trypan blue exclusion. The antibody concentration in culture supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) specific for human IgG as previously described (Nakamura et al., 2000). Antibody was purified as described above.

Competitive FUT8 RT-PCR Analysis

Total RNA was isolated from 1×10^7 cells using RNeasy minikit (Qiagen) and incubated for 1 h at 37°C with 20 units of RQI DNase (Promega) to degrade genomic DNA. Single-strand cDNA was synthesized from 3 μ g total RNA using the Superscript[™] first strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). The 50-fold diluted reaction mixture was used as a template for FUT8 and β -actin mRNA quantification by competitive PCR as previously described (Shinkawa et al., 2003).

Northern Blot Analysis of siRNA

Thirty micrograms of total RNA, isolated using ISOGEN (Wako, Tokyo, Japan) was separated by electrophoresis on a 12% (w/v) polyacrylamide gel containing 8M urea and transferred to Hybond-N⁺ membrane (Amersham). The hybridization was performed as described (Lagos-Quintana et al., 2001) with the following ³²P-labeled oligonucleotide probes (B_sense, 5'-GCTGAGTCTCTCCGAATAC-3'; B_antisense, 5'-GTATTCGGAGAGACTCAGC-3'; R_sense, 5'-GAACACTCATCTTGGGAATC-3'; R_antisense, 5'-GATTCCAAGATGAGTGTTTC-3'; let7-a (internal control for small RNA molecule), 5'-TACTATAACAACC-TACTACCTCAATTTGCC-3'). The membranes were analyzed with a Fujix Bio-Image Analyzer BAS2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan).

Monosaccharide Composition Analysis

The monosaccharide composition of purified antibodies was analyzed by modified high-performance anion exchange chromatography (HPAEC) as previously described (Shinkawa et al., 2003).

Antigen-Binding ELISA

BSA-conjugated CCR4 peptide (DESIYSNYYLYESIP-KPC) (1.0 μ g/well) generated by Succinimidyl-transe-4(*N*-

Table I. Frequency of colony conversion to LCA resistance by introduction of the FUT8 siRNA plasmids.

Plasmid	Parent; 32-05-12		
	Puro ^r colonies	LCA ^r colonies	% LCA ^r / Puro ^r
pPUR	960	0	0
U6_FUT8_B_puro	1152	24	2.1
U6_FUT8_R_puro	1128	14	1.2

Note. Puro^r; puromycin resistance, LCA^r; LCA resistance.

Table II. Monosaccharide composition of N-linked oligosaccharide core structure of KM3060 produced from the siRNA-introduced clones and the parental cells.

Clone	Relative composition of monosaccharides			
	^a Fucose	GlcNAc	Mannose	^b Fucose (-)%
32-05-09 (Parental)	0.92	4.00	2.27	8
9R-3 (siRNA Introduced)	0.44	4.00	2.56	56
32-05-12 (Parental)	0.94	4.00	2.18	6
12B-5 (siRNA Introduced)	0.35	4.00	2.63	65

^aMolar ratios calculated vs. 4 GlcNAc.

^bTotal percentage of non-fucosylated of oligosaccharides calculated by the formula $(1-a) \times 100$.

maleimidylmethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) reagent (Sigma) was coated onto 96-well immunoplates (Gleiner), and the plates were blocked with 1% BSA in PBS. Various antibody concentrations were added to the wells and incubated for 2 h at room temperature. Antibody binding to the CCR4 peptide was detected by 1/2000 dilution of goat anti-human IgG1 (H&L) peroxidase-conjugated polyclonal antibody (American Qualex) and developed with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-diammonium salt (ABTS).

ADCC Assay

ADCC assays were performed by the lactate dehydrogenase (LDH) release assay using as effector cells human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) prepared from healthy donors by Lymphoprep (AXIS SHIELD, Dundee,

UK). Aliquots (50 μ L) of target tumor cells, murine T cell lymphoma CCR4/EL4 cells expressing human CCR4 (Niwa et al., 2004), were distributed into 96-well U-bottomed plates ($1 \times 10^4/50 \mu$ L) and incubated with serial dilutions of antibodies (50 μ L) in the presence of the PBMC (100 μ L) at an E/T ratio of 20/1. After incubation for 4 h at 37°C, the supernatant LDH activity was measured using a Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, Madison, WI). The percent specific cytolysis was calculated from the sample activities according to the formula:

$$\% \text{ specific lysis} = 100 \times (E - S_E - S_T) / (M - S_T)$$

where E is the experimental release (activity in the supernatant from target cells incubated with antibody and effector cells), S_E is the spontaneous release in the presence of effector cells (activity in the supernatant from effector cells with medium alone), S_T is the spontaneous release of target cells (activity in the supernatant from target cells incubated with medium alone), and M is the maximum release of target cells (activity released from target cells lysed with 9% Triton X-100).

RESULTS

Conversion of Antibody Producing CHO Cell Lines to High-ADCC Producers

To evaluate the effects of constitutive siRNA expression against the FUT8 gene on antibody-producing CHO cells, we constructed two siRNA expression plasmids U6_FUT8_B puro and U6_FUT8_R puro in which the U6

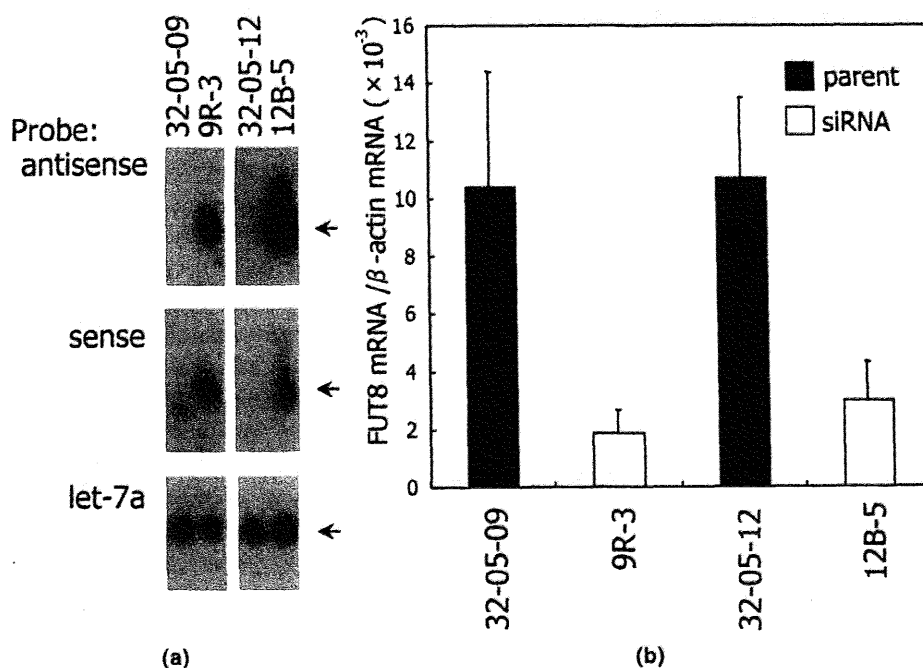


Figure 2. Depression of FUT8 expression by the FUT8 siRNA. (a) Northern blot analysis of the siRNAs. Arrows show the expressed siRNAs with the expected size. let-7a microRNA serves as a loading control for the small RNA (b) Quantification of FUT8 transcripts using competitive RT-PCR analysis was performed 3 times independently. FUT8 transcripts compared to β -actin transcripts are shown.

promoter strongly drives transcription of short RNA (Fig. 1). Two parental CHO/DG44 cell lines producing anti-CCR4 chimeric monoclonal antibody KM3060, 32-05-09 and 32-05-12, were prepared and transformed with the siRNA expression plasmids. Puromycin-resistant clones appeared 6 days after transfection with a transformation efficiency of approximately 1000 per 1.6×10^6 electroporated cells. There was no significant difference in transformation efficiency among the plasmids. No reduction of FUT8 expression in the pooled puromycin resistant clones was observed using quantitative RT-PCR analysis (data not shown). Subsequent selection of LCA-resistant clones yielded clear differences between siRNA-introduced and mock transformants. A low percentage of the transformed puromycin resistant-clones survived culture in LCA-containing medium, although none of the mock transformants survived (Table I) indicating that siRNA activity was sufficient to yield cells lacking cell surface fucose. The oligosaccharide structure of the antibodies produced and the FUT8 expression level in these clones were determined. The results showed that the oligosaccharide fucose content was inversely proportional to the reduction rate of FUT8 expression (data not shown). The clones expressing the most defucosylated antibody were selected independently from each siRNA-introduced transformant and designated 9R-3 (from U6_FUT8_R puro-introduced clones) and 12B-5 (from U6_FUT8 B_puro-introduced clones), respectively. Confirmation of parental-type complex-type N-linked oligosaccharides was done by previously described methods (Shinkawa et al., 2003) on purified antibodies produced by 9R-3 and 12B-5 in flask culture. Oligosaccharide profile of the two clone's products was equivalent to that of the parental cells previously reported (Niwa et al, 2004) except for the content of fucose-attached oligosaccharides (data not shown). Monosaccharide composition analysis of the purified products also showed that, except for fucose content, there were no significant differences between the N-linked oligosaccharide core structures of the siRNA-introduced clones and the parental cells (Table II). The ratios of defucosylated oligosaccharides of the 9R-3 and 12B-5 antibodies were dramatically increased compared with those of parental cells up to 56% and 65%, respectively. Using PBMC as effector cells, ADCC assays with varying purified antibody concentrations showed that the defucosylated antibodies exhibit over 100-fold higher ADCC than the parental cell antibodies without any change in antigen binding (Fig. 3a, 3b). In 9R-3 and 12B-5 transcripts expressed from the siRNA-plasmids were identified by Northern blot analysis (Fig. 2a), and FUT8 gene expression levels were decreased to roughly one fifth parental expression levels (Fig. 2b).

Fed-Batch Culture of siRNA-Introduced CHO Cells

Fed-batch culture of 12B-5 and 32-05-12 adapted to serum-free medium EX-CELL[®] 302 were performed while

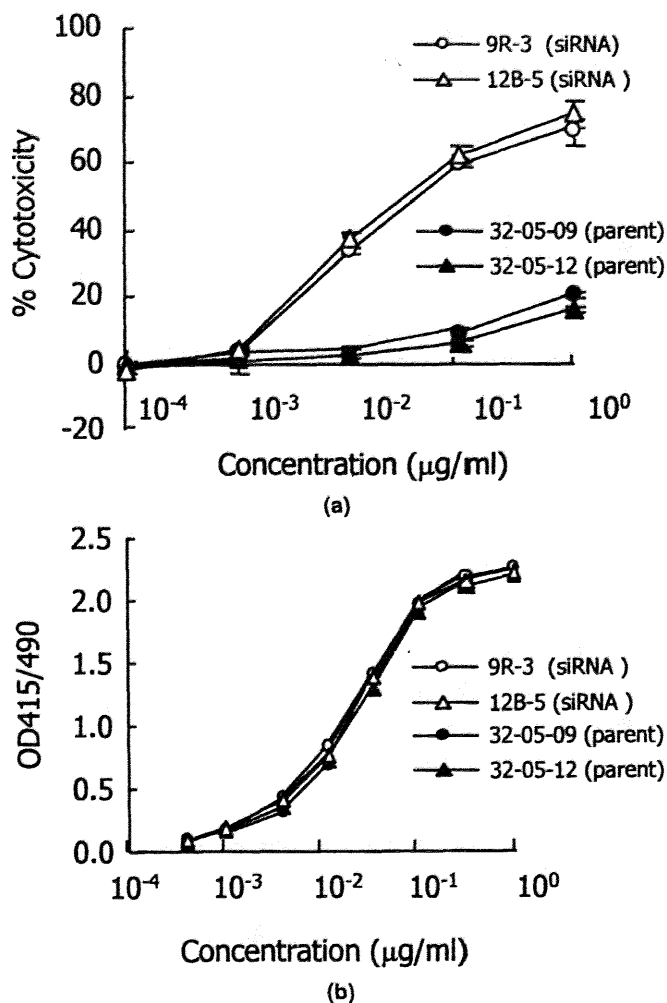


Figure 3. In vitro activity of antibody produced by siRNA-introduced cells. (a) Lysis of CCR4/EL4 cells by human PBMC at a target:effector ratio of 1:20 in the presence of different antibody concentrations was quantified by detecting lactate dehydrogenase activity. (b) Antigen-binding activity of KM3060 was measured by ELISA. Antibodies produced by siRNA-introduced clones 9R-3 (open circles) and 12B-5 (open triangles), their parental clones 32-05-09 (filled circles) and 32-05-12 (filled triangles) are shown.

monitoring FUT8 mRNA expression level. The cultures were finished 13 days after inoculation and viabilities of 12B-5 and 32-05-12 were 69.8% and 58.0%, respectively. Cell growth and productivity of 12B-5 were comparable to those of the clones randomly isolated during puromycin selection at a SPR of 12 pg/cell/d. Parental 32-05-12 showed slightly better growth than the puromycin-resistant descendants; however, 12B-5 productivity reached the parental level when the fed-batch culture was continued until cell viability decreased to the parental level of 58%. Culture aliquots were drawn at days 3, 6, 9, and 11 just before adding the feeding medium. The antibodies and the cells were then separated for analyzing the ratio of antibody defucosylated oligosaccharides and the levels of cellular FUT8 and β -actin mRNAs (Fig. 4). FUT8 expression was reduced to approximately 20% of the parental level in the seeding cells (day 0). During the culture course, 12B-5

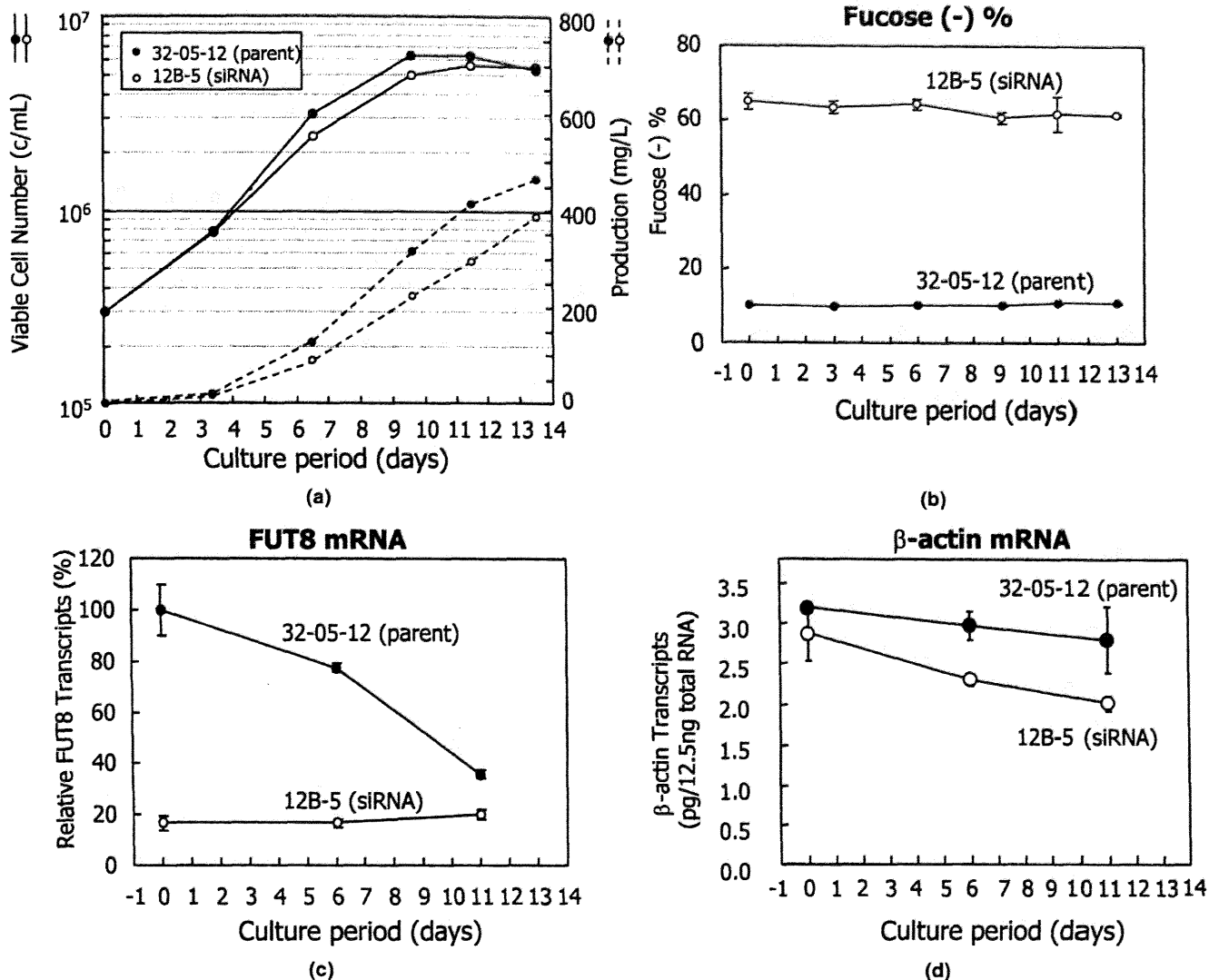


Figure 4. Serum-free fed-batch culture of FUT8 siRNA-introduced cell lines. (a) Productivities and growth rates of clone 12B-5 (open circle) and its parental clone 32-05-12 (filled circle). Number of viable cells and amount of the antibody in the cell culture fluid were measured at day 3, 6, 9, and 11 after inoculation. (b) Product oligosaccharide compositions were measured by monosaccharide composition analysis. Transcript amounts were measured 3 times independently by competitive RT-PCR using total RNA extracted from the cultured cells. (c) Amount of FUT8 transcripts normalized to the β -actin transcripts are shown in relative % to the FUT8 expression of the parental clone as 100%. (d) Amount of β -actin transcripts in 12.5 ng of total RNA are shown.

FUT8 gene expression levels were stable, although 32-05-12 FUT8 expression levels decreased with cultivation. The decrease of FUT8 mRNA was observed when culturing another parental clone 32-05-09 as well (data not shown). 12B-5 antibody oligosaccharide fucosylation was checked at least every 3 days during culture, and dramatic differences in fucosylation were not observed, resulting in the production of antibody populations over 60% defucosylated. There was no significant difference in oligosaccharide profile among 12B-5 antibodies in fed-batch culture (data not shown).

DISCUSSION

In considering a suitable method for antibody manufacture, a variety of factors must be considered. These include an-

tibody structure, glycosylation and expression, which affect productivity, purification, and cost of goods. The most important carbohydrate structures contributing to antibody activity are the fucose residues attached via α 1,6 linkage to the innermost *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues of the Fc region *N*-linked oligosaccharides (Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003). Removal of fucose from these oligosaccharides results in enhanced ADCC of antibodies including Rituxan[®] and Herceptin[®] (Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003). However, controlling carbohydrate structure is difficult and not readily standardized. As a model system of mammalian cell culture systems we chose CHO cells requiring methotrexate amplification to produce recombinant antibody IgG1. Since antibody effector function strictly depends on the Fc region carbohydrate structure (Clynes et al., 2000; Lewis et al., 1993), we ap-

plied the techniques for loss of function specifically against FUT8 gene expression in antibody-producing cells. FUT8 encodes α 1,6 fucosyltransferase, the enzyme that catalyzes the transfer of fucose from GDP-fucose to GlcNAc in an α 1,6 linkage (Yanagidani et al., 1997).

In the current studies, we focused on a new technique "RNAi," which has recently been discovered to be more potent than other techniques such as antisense RNA and ribozyme (Miyagishi et al., 2003). As it is well known that siRNA inhibitory efficiency varies between sequences chosen for the target gene (Harborth et al., 2001; Holen et al., 2002), seven target sequences were randomly chosen from the entire FUT8 cDNA and tested for their inhibitory effect by using a transient expression system with a FUT8-GFP fusion reporter construct (data not shown). Among these sequences, we employed the two, which greatly repress the expression of a co-transfected reporter gene. We did not detect any significant reduction of FUT8 expression in puromycin-resistant transformants after introducing the siRNA expression plasmids despite the fact that U6 promoter-driven siRNA expression was effective in suppressing co-transfected reporter expression. This discrepancy is thought to be due to the positional effect of siRNA expression vector due to random integration into genomic DNA (Wilson et al., 1990). It is reported that more than 50% of puromycin-resistant transfectants obtained with the siRNA expression vector carrying the H1-RNA promoter strongly suppressed the target p53 gene (Brummelkamp et al., 2002). Application of a stronger siRNA expression system, such as H1 promoter and/or tRNA promoter-driven short-hairpin type RNA expression vector (Kawasaki and Taira, 2003), could improve the efficacy of RNAi-induced transformation.

To enrich the transformants with measurable suppression of FUT8 expression we applied a phenotypic selection strategy. Lectin-resistant selection using LCA, which recognizes the α 1,6 fucosylated trimannose-core structure of N-linked oligosaccharides, was employed since mutants with different protein glycosylation patterns show strict differences in lectin resistance (Ripka and Stanley, 1986). Two clones whose FUT8 expression levels were only 20–30% of parental were successfully isolated, though only a few % of the puromycin-resistant transformants showed an LCA-resistant phenotype. These two clones produced antibody having approximately 60% defucosylated N-linked oligosaccharide and enhanced ADCC activity: ADCC of anti-CCR4 antibody produced by the siRNA-introduced clones was improved by more than two-orders of magnitude compared to parental antibody without change in antigen-binding activity. Oligosaccharide analysis showed that the product of the siRNA-introduced clones had the oligosaccharide structure equivalent to the parental one except for the fucose content. These results suggest that it is possible to convert parental antibody producing cells to high-ADCC antibody producers.

From an industrial application standpoint, manufacture processes must guarantee fixed product properties. During

fed-batch culture, siRNA-introduced clones stably produce high-ADCC antibody within a narrow fucose content range. The FUT8 mRNA expression level stably lasted to be persisted at 20% of the parental clone until the end of the culture, suggesting that the consistent low-level expression of FUT8 is critical to keep the defucosylation. We should note that the parental clone also stably produced fucosylated antibody despite the FUT8 mRNA expression level decreased with the culture, which indicates that the rate-limiting step in fucosylation of the product is not related to FUT8 expression level in the parental CHO cells. FUT8 expression, however, is thought to become the key-step in the fucosylation in the LCA-resistant siRNA-introduced clones, since the oligosaccharides fucose content of the product was inversely proportional to the reduction rate of FUT8 expression. The reasons why the effect of FUT8 siRNA in fed-batch culture late-phase was not as effective as observed in early-phase remain to be solved. siRNA-introduced clone growth rate was marginally slower than the parental growth rate, however, this seemed to be unrelated to the effect of FUT8 siRNAs because the transformants randomly picked from mock transfection also showed the same growth rate reduction. Thus, the growth rate reduction is likely caused by the stress of puromycin selection. The siRNAs selected in our approach did not induce significant phenotypic change of cell growth and productivity, though siRNA is reported to cause unexpected off-target gene regulation (Jackson et al., 2003; Scacheri et al., 2004). We also confirmed that reduction of FUT8 expression does not affect cell growth and productivity using FUT8 knock-out CHO cells we recently developed (Yamane et al., 2004). Although the complex-coordination among glycosyltransferase existing in medial Golgi is reported (Opat et al., 2000), loss of FUT8 did not influence the function of other glycosyltransferases. FUT8 seems to be located independently and acts on the modification of N-linked oligosaccharide core structure, since FUT8 is reported to be isolated in relatively low salt solution from medial Golgi independent from the complex (Yanagidani et al., 1997). At the end of the fed-batch culture, at equivalent cell viability, the culture medium of both parental and siRNA-induced clones contained equivalent amounts of antibody. The only difference was fucose content. It is very important to manufacture a recombinant antibody with structure-desired and consistent carbohydrates on controlling biological activity of the ingredients. These results suggest a mechanism of developing manufacture-scale production.

In conclusion, we succeeded in converting already-established antibody-producing CHO cells to high-ADCC antibody producers by reengineering them to constitutively express siRNA against the FUT8 gene and applying phenotypic selection with LCA. In addition, we showed that the converted cells produce highly defucosylated antibody with fixed properties even in serum-free fed-batch culture. These results suggest that the application of FUT8 siRNA is advantageous for converting conventional

antibodies to defucosylated antibodies and affords the ability to evaluate the efficacy of defucosylation. Our findings provide new strategies for controlling the glycosylation profile of therapeutic recombinant proteins and applying sets of siRNAs against glycosylation-modified genes, such as glycosyltransferase and glycosidase.

We thank Drs. Lawrence Chasin and Gail Urlaub Chasin for their generous gift of cell lines, Dr. Susan Lehnhardt for helpful suggestions and critical reading, and Ms. Kazuko Kitajima and Ms. Miho Inoue-Urakubo for technical support.

References

- Amarzguioi M, Prydz H. 1998. Hammerhead ribozyme design and application. *Cell Mol Life Sci* 54:175–1202.
- Bennett CF, Cowsert LM. 1999. Antisense oligonucleotides as a tool for gene functionalization and target validation. *Biochim Biophys Acta* 1489:9–30.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550–553.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood* 99:754–758.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443–446.
- Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. 2001. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng* 74:288–294.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:94–98.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114:4557–4565.
- Holen T, Amarzguioi M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucl Acids Res* 30:1757–1766.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnol* 21:635–637.
- Jefferis R, Lund J, Pound JD. 1998. IgG-Fc-mediated effector functions: Molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* 163:59–76.
- Kawasaki H, Taira K. 2003. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucl Acids Res* 31:700–707.
- Kumpel BM, Rademacher TW, Rook GA, Williams PJ, Wilson IB. 1994. Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity. *Hum Antib Hybrid* 5:143–151.
- Kumpel BM, Wang Y, Griffiths HL, Hadley AG, Rook GA. 1995. The biological activity of human monoclonal IgG anti-D is reduced by beta-galactosidase treatment. *Hum Antib Hybrid* 6:82–88.
- Kunkel GR, Pederson T. 1988. Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes Dev* 2:196–204.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853–858.
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM. 1993. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37:255–263.
- Miyagishi M, Taira K. 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 19:497–499.
- Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. 2003. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13:1–7.
- Nakamura K, Tanaka Y, Fujino I, Hirayama N, Shitara K, Hanai N. 2000. Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Mol Immunol* 37:1035–1046.
- Niwa R, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Shinkawa T, Uchida K, Nakamura K, Matsushima K, Ueda R, Hanai N, Shitara K. 2004. Defucosylated chimeric anti-CCR4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 64:2127–2133.
- Opat AS, Houghton F, Gleeson PA. 2000. Medial golgi but not late golgi glycosyltransferases exist as high molecular weight complexes. *J Biol Chem* 275:11836–11845.
- Ripka J, Adamany A, Stanley P. 1986. Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose. *Biochem Biophys Arch* 249:533–545.
- Ripka J, Stanley P. 1986. Lectin-resistant CHO cells: Selection of four new pea lectin-resistant phenotypes. *Somat Cell Mol Genet* 12:51–62.
- Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1892–1897.
- Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG. 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277:26733–26740.
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. 2003. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278:3466–3473.
- Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. 1999. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* 17:76–180.
- Urlaub G, Mitchell PJ, Kas E, Chasin LA, Funanage VL, Myoda TT, Hamlin J. 1986. Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: Deletions and inversions. *Somatic Cell Mol Genet* 12:555–556.
- Wilson C, Bellen HJ, Gehring WJ. 1990. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol* 6:679–714.
- Wright A, Morrison SL. 1997. Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* 15:26–32.
- Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, Wakitani M, Niwa R, Sakurada M, Uchida K, Shitara K, Satoh M. 2004. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells; an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng* 87:614–622.
- Yanagidani S, Uozumi N, Ihara Y, Miyoshi E, Yamaguchi N, Taniguchi N. 1997. Purification and cDNA cloning of GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide:alpha1-6 fucosyltransferase (alpha1-6 FucT) from human gastric cancer MKN45 cells. *J Biochem* 121:626–632.