

氏名	ヤジマ コウダイ 矢島 広大
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	令和6年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	トランスポーター単分子輸送活性の新規評価法の開発
論文審査委員	(主査) 教授 大谷 壽一 (博士(薬学)) (副査) 教授 三澤日出巳 (博士(薬学)) 教授 米澤 淳 (博士(薬学))
慶應義塾大学学位規程第11条に基づく審査委員会実施日：令和6年2月6日	

## 論文内容の要旨

### 【序論】

トランスポーターは薬物の体内動態をつかさどる重要な機能性タンパク質であるが、その輸送活性はさまざまな機構により変動することが知られている。例えば、代表的なトランスポーターの一つである **organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1** は、小腸や肝臓に発現し、临床上重要な薬物の消化管吸収を担っているが、その活性は、遺伝的変異や糖鎖付加による翻訳後修飾によって変動することが報告されている。一方で、機能性タンパク質の活性は、その“単分子の輸送活性”と“発現量”によって決定される。しかし、トランスポーター発現細胞を用いた基質取込み実験においては、輸送活性の変動に対する“単分子の輸送活性”と“発現量”の寄与をそれぞれ分離して評価することは困難であった。

近年開発された **Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP)** 法は試料中の目的タンパク質の絶対量を精度良く定量できる手法である。しかし、QTAP 法を用いても、基質取込み実験において実際に取込みに寄与したトランスポーターの分子の量を測定することは困難である。なぜなら、**whole-cell lysate** を試料とした場合、試料中には基質輸送に寄与しなかった未成熟な分子や細胞膜から脱落した分子を含む可能性がある。一方で、細胞膜画分を精製して試料とした場合、その回収率は数パーセントにとどまる上に、正確な回収率の見積もりも困難である。加えて、QTAP 法による定量の際にも、試料は、可溶化やトリプシン消化などのサンプル調製過程において損失を受ける。

他方、細胞膜上に発現する機能性タンパク質のうち、イオンチャネルは、**single channel patch clamp** 法を用いることで **single channel** 電流が、**whole-cell patch clamp** 法により

whole-cell membrane 電流がそれぞれ評価可能である。このため、後者を前者で除すことで、細胞膜上に発現するイオンチャネルの絶対数が推算できる。

本研究では、イオンチャネルを内部標準として用いることで、細胞膜上に発現するトランスポーターの絶対量を正確に評価し、トランスポーターの単分子固有輸送活性を算出するための方法論を確立することを目的とした。具体的には、(1) OATP2B1 発現細胞に large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  (BK) channel を共発現させ、(2-1) 当該共発現細胞における BK channel の whole-cell 電流量から計算した細胞膜上の BK channel 分子の数 ( $Q_i$ ) と、(2-2) QTAP 法により測定した精製細胞膜画分中の OATP2B1 と BK channel の量比 ( $\rho$ ) から、細胞膜上の OATP2B1 の分子の数 ( $Q_T$ ) を求めた。これにより、(2-3) OATP2B1 を介した取込みクリアランスを、 $Q_T$  で除すことで、OATP2B1 の単分子 (固有) 輸送活性 ( $V_{int}$ ) を算出した。

## 第一章 BK channel-OATP2B1 共発現細胞株の樹立と BK channel whole-cell 電流記録条件の探索

### 【背景・目的】

対象として、代表的な薬物トランスポーターである OATP2B1 を、チャネルとして BK channel を選択した。BK channel は、高い開口確率のもとで steady-state whole-cell 電流を測定でき、既報において unitary conductance が明らかになっている。本章では、BK channel-OATP2B1 共発現細胞株を樹立し、BK channel whole-cell 電流測定時に当該 channel の開口確率を 95% 以上に維持できる測定条件を確立することを目的とした。

### 【方法】

#### BK-2B1-HEK293 細胞株の樹立

これまでに私が樹立し、その基質輸送機能を確認している OATP2B1 発現 HEK293 細胞株に対して、BK channel  $\alpha$  subunit および mCherry 配列、または空ベクターを含むレトロウィルスを形質導入することで、それぞれ BK channel-OATP2B1-HEK293 (BK-2B1-HEK293), BK channel-pMEI\_mock-HEK293 (BK-mock-HEK293) の細胞株を樹立した。

#### mCherry 融合タンパク質の蛍光観察

BK-2B1-HEK293 および BK-mock-HEK293 細胞を 35 mm dish に播種して 3 日間培養した。その後 60-70% confluence となった時点で、共焦点レーザー顕微鏡を用いて励起光 594 nm レーザー、検出波長 610-710 nm、室温下で細胞を観察した。

#### BK channel 特異的電流の記録

Whole-cell 電流の記録は、オートパッチクランプ装置 (Port-a-Patch system, Nanion Technologies) と 2.0 – 3.5 M $\Omega$  NPC-1 chips にて行った。細胞内液の組成は、90 mM KF, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 30 mM K-gluconate, 10 mM HEDTA, 4 mM CaCl<sub>2</sub> (遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度 2.58  $\mu$ M) とした。BK channel の特異的電流は、特異的開口薬 30  $\mu$ M NS11021 を含んだ細胞外液 (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM D-glucose, pH 7.4) 灌流下にて記録した。BK-2B1-HEK293 細胞に保持電位 -80 mV から、コマンド電位 (v) -60 ~ +200 mV の範囲内で 20 mV 間隔の矩形波刺激を 100 ms 与え、付加中の最大電流 I(v) を記録した。I(v) を、v と K<sup>+</sup> の平衡電位 (-90.3 mV) の差で除することで膜コンダクタンス G(v) を求めた。各電位における G(v) を G(v) の最大値 G<sub>max</sub> (=G(200 mV)) で規格化した。G(v)/G<sub>max</sub> と v との関係にボルツマンの式 (式 1) を、非線形最小二乗法を用いて当てはめ、最大活性の半分の活性化を与える電圧 (V<sub>1/2</sub>)、および slope factor ( $\gamma$ ) を算出した。

$$G(v) / G_{\max} = \{1 + \exp(-(v-V_{1/2})/\gamma)\}^{-1} \dots \text{式 1}$$

## 【結果・考察】

### mCherry 融合タンパク質の蛍光観察

BK-2B1-HEK293 細胞株において、細胞の形状に沿って mCherry タンパク質特異的な蛍光が観察され、BK channel タンパク質の細胞膜発現が確認された。また BK-mock-HEK293 細胞においても同等に蛍光が観察された。

### BK channel 特異的電流の記録

G/G<sub>max</sub> 値は、付加電圧依存的に増加した。NS11021 非存在下 (control) および 30  $\mu$ M NS11021 存在下における V<sub>1/2</sub> 値と  $\gamma$  値は、それぞれ 89.7 および 48.3 mV、33.3 および 33.7 と算出された。NS11021 処置により V<sub>1/2</sub> 値が低電位にシフトしたことから、観測された電流は BK channel 電流であると確認された。さらにボルツマンの式より、NS11021 存在下では付加電位 140 mV 以上で開口確率が 95% 以上となると考えられた。

## 第二章 OATP2B1 分子の絶対数の算出とその単分子輸送活性の算出

### 【背景・目的】

前章で樹立した BK-2B1-HEK293 細胞株を培養後、3 分割して、前述の (2-1~3) の実験を実施し、最終的に OATP2B1 固有輸送活性 (V<sub>int</sub>) を得ることを目的とした。

## 【方法】

### (2-1) BK channel whole-cell 電流の記録と BK チャネル数 ( $Q_I$ )の算出

$K^+$  symmetry (外液; 140 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM D-glucose, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , pH 7.4 with KOH) 条件下にて 30  $\mu$ M NS11021 を灌流し、保持電位 -80 mV から、+160 mV への 2,400-ms の ramp pulse に対する whole-cell 電流 ( $I_{NS}$ ) を記録した。続いて、BK channel 遮断薬 paxilline (1  $\mu$ M; DMSO 最終濃度 0.1%) を灌流し、BK channel 非介在性電流 ( $I_{Pax}$ ) を記録した。40~140 mV 付加時の  $I_{NS}$  と  $I_{Pax}$  の差を BK channel 電流 ( $I_{BK}$ ) とし、 $I_{BK}$  の傾き ( $G_{membrane}$ ) を unitary conductance で除することで細胞あたりのチャネル数 ( $Q_I$ ) を算出した。

### (2-2) 細胞膜画分試料中の BK channel と OATP2B1 タンパク質の定量

各細胞株の細胞膜画分を sucrose cushion 法を用いて精製し、精製細胞膜画分中の標的タンパク質濃度を QTAP 法により測定した。すなわち、PTS (phase transfer surfactant) を用いた可溶化に続く還元アルキル化、2 種類の酵素による消化を経てペプチド試料を得た。試料に、対応する安定同位体標識ペプチドを内部標準として添加後 LC-MS/MS にアプライし、内部標準法にて OATP2B1 と BK channel を定量した。得られた定量値より BK channel に対する OATP2B1 タンパク質の化学量比 ( $\rho$ ) を算出した。

### (2-3) OATP2B1 介在性基質輸送の評価

BK-2B1-HEK293 および BK-mock HEK293 細胞を用いて、pH 6.3 条件下で 0.3 - 1,000  $\mu$ M estrone 3-sulfate (E3S) ( $[^3H]E3S$ ; 54.0 Ci/mmol) の 2 分間の取込みを plate 法を用いて評価した。BK-2B1-HEK293 細胞の細胞タンパク質あたりの E3S 取込み量から、同条件での BK-mock-HEK293 細胞の E3S 取込み量を引くことで OATP2B1 介在性 E3S 取込みを求め、これを基質濃度 [S] で除すことで OATP 介在性取込みクリアランス CL ( $\mu$ L/2 min/mg protein) とした。得られた CL と [S] の関係に、式 2 および式 3 を非線形最小二乗法 (MLAB program) を用いて同時にあてはめ、ミカエリス定数 ( $K_m$ )、最大取込み速度 ( $V_{max}$ ) およびトランスポーター非介在性のクリアランス ( $K_d$ ) を算出した。

$$CL_{OATP} = V_{max} / (K_m + [S]) + K_d \quad \dots\text{式 2}$$

$$CL_{mock} = K_d \quad \dots\text{式 3}$$

さらに、 $10^6$  細胞あたりのタンパク質量 (mg/ $10^6$  cells) を測定し、これで補正することで単位細胞あたりの取込みクリアランス ( $=V_{max}/K_m$ ;  $\mu$ L/min/ $10^6$  cells) を算出した。

OATP2B1 単分子あたりの活性評価 方法 (2-1) から算出した  $Q_I$  値に、方法 (2-2) よ

り得た  $\rho$  値を乗じて細胞あたりの OATP2B1 分子数 ( $Q_T$ ) を算出した。この値と CL から OATP2B1 単分子あたり輸送活性 ( $V_{int}$ ) を得た。

### 【結果・考察】

#### BK channel whole-cell 電流の記録

Ramp pulse 刺激に応じて BK channel に特徴的な電圧-電流関係が観察された。 $G_{\text{membrane}}$  値は  $138 \pm 14.6$  nS (mean $\pm$ SE, n=3) であり、 $Q_T$  は  $916 \pm 98.6$  molecules/cell (mean $\pm$ SE) と算出された。この値は既報において本研究と同様に HEK293 細胞へ BK channel を遺伝子導入し、観測した macroscopic current から発現量を算出した結果 (平均 500 channels, range: 200-800) と良好に合致した。

#### 細胞膜画分中の BK channel および OATP2B1 タンパク質の絶対定量

BK-2B1-HEK293 細胞より精製した plasma membrane 画分における各標的タンパク質の発現量は、BK channel  $\alpha$  subunit と OATP2B1 でそれぞれ  $6.88 \pm 0.69$ 、 $3.72 \pm 0.43$  fmol/ $\mu$ g protein (arithmetic mean  $\pm$  S.D., triplicate)であった。同時に定量した plasma membrane 画分のマーカータンパク質である  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 発現量は既報と同等であったことから、本研究において当該報告と同程度に細胞膜画分が精製されていると考えられた。また、 $\rho$  は 2.16 と算出され、これより  $Q_T$  は  $1.98 \pm 0.21 \times 10^3$  molecules/cell と算出された。また、plasma membrane のマーカータンパク質である  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の発現量は、本研究と同様の手法で膜画分を精製した既報の結果と同等であり、膜画分は良好に精製できたと考えられた。

#### OATP2B1 介在性基質輸送と OATP2B1 単分子活性の評価

BK-2B1-HEK293 細胞において E3S の濃度依存的な取込みが観察され、得られたキネティクスパラメータは、 $K_m$  9.02 (7.84-10.4)  $\mu$ M、CL 10.4  $\mu$ L/min/ $10^6$  cells でありいずれも既報と同等であった。最終的に算出された  $V_{int}$  は、5.23 fL/min/molecule であった。 $V_{int}$  をアボガドロ定数を用いて変換し OATP2B1 の E3S 輸送における turnover rate を算出すると、 $474 \text{ sec}^{-1}$  となり、過去に報告されたデータ ( $7.1$ - $1890 \text{ sec}^{-1}$ ) の範囲内であった。また、各実験結果から求めたパラメータは既報と同等であり、得られた単分子活性は妥当であると判断した。

### 【結論】

本研究では、OATP2B1 を例にとり、トランスポーター単分子あたりの基質輸送を評価するために、細胞膜上で機能するトランスポーター分子数を算出する新規手法を開発した。本手法を用いることで、トランスポーターの機能変動が、トランスポーター単分子の活性と発現量のどちらに起因しているかを評価可能になると考えられる。さらに *in vitro* において算出したトランスポーターの単分子活性を、*in vivo* における当該トランスポーター介在性輸送の寄与率に外挿することで、トランスポーター活性変動が及ぼす臨床的意義を定量的に評価できるようになると期待される。

## 論文審査結果の要旨

申請者は、薬物の体内動態を決定する重要な機能蛋白質であるトランスポーターの単分子あたりの基質輸送を評価するための新規手法の開発に取り組んだ。まず申請者は、トランスポーターと同様に細胞膜上に発現するイオンチャネルに着目した。イオンチャネルは、whole-cell patch clamp 法より得られる 1 細胞当たりの電流量を、single channel patch clamp 法より得られるチャネル 1 分子あたりの電流量で除すことで理論上細胞膜上に発現する絶対数を算出可能である。そこで申請者は、large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  (BK) channel を内標準として OATP2B1 発現 HEK293 細胞株へ共発現させ、その開口確率を 95% 以上とする実験条件を確立した。次に、申請者は、この共発現細胞を用いて電気生理学的手法による BK channel 数の算出および LC-MS/MS を用いた BK channel と OATP2B1 タンパク質発現量比の算出に基づき、細胞膜上で薬物輸送に寄与した OATP2B1 分子の絶対数の算出に成功した。さらに、これを薬物動態学における輸送活性評価法から得られた輸送活性に当てはめることで、初めてトランスポーター単分子活性の定量法の開発に成功した。

この成果は、細胞膜試料の回収、生成率に影響されることなく、薬物トランスポーターの活性変動を規定する単分子活性を正確に捉える画期的な方法であるとともに、基質薬の体内動態変動を理解する新たな解析手法であり、独創的で、科学的に重要な知見と判断できる。

審査委員会においては、申請者がまず、上記の学位論文にかかる研究内容を発表し、その後、試問が実施された。

三澤日出巳教授からは、方法論としての研究の新規性やコンセプト、応用性、将来展望などについて、よりわかりやすく説明することの必要性が示され、発表スライド等の修正が求められた。また、本手法の *in vivo* への応用可能性などについて問われ、申請者は創薬や臨床への応用に言及して、適切に回答した。加えて、mCherry の融合についてのより正確な説明、内在化と、修飾や脱修飾による脱落との区別可能性、BK channel sensitive current をアゴニスト処置とアンタゴニスト処置との差分で決定することの正当性、などについて問われ、申請者はいずれも適切に回答した。

米澤 淳教授からは、QTAP 定量、電気生理学的測定、細胞内取込みという 3 種の実験系について、それぞれの対象試料たる細胞の同一性についての説明が求められ、申請者はその限界も含めて適切に回答した。また、細胞膜画分の精製度についての質問があ

り、申請者は細胞内膜の混入の可能性は否定できないが、計算にはタンパク量の比を用いており、結果に大きな影響を与えていたとは考えにくい旨を、限界も含めて適切に回答した。さらに、得られた結果の応用可能性や、過去に速度定数  $k_{cat}$  が報告されていることを踏まえた新規性の明確化について、論文や発表資料の補足修正の必要性が指導され、修正を行うこととした。また、刊行された学術論文と比較して学位論文の背景などの構成がやや不適切との指摘があり、この点についても修正を行うこととした。

以上の審査委員会における指摘事項を踏まえて、申請者は論文及び口頭発表資料の修正を行なった。

さらに申請者は、令和6年2月19日に実施された学位論文公聴会において、論文の内容を発表した。発表後、研究科委員より、申請者が示したトランスポーターの固有活性の定義と現状のトランスポーター基質薬の体内動態予測法の課題解決に対する本法の意義、各実験から得られた定量値の妥当性、BK channel の選定理由などに関する質疑があり、申請者はいずれの質疑に対しても的確に回答した。

以上の過程を通して、学位論文には科学的に新規かつ独創的な内容を含んでいること、申請者は専門領域および関連領域における十分な知識を有していることが確認されたことから、申請者は、博士(薬学)の学位を授与されるにふさわしいと判断する。



## 論文目録

Kodai Yajima, Takeshi Akiyoshi, Kazuho Sakamoto, Yoshiaki Suzuki, Takayuki Oka, Ayuko Imaoka, Hisao Yamamura, Junko Kurokawa, Hisakazu Ohtani. Determination of single-molecule transport activity of OATP2B1 by measuring the number of transporter molecules using electrophysiological approach. *J Pharmacol Sci*, **153**(3): 153-160, 2023  
(doi: 10.1016/j.jphs.2023.08.008)