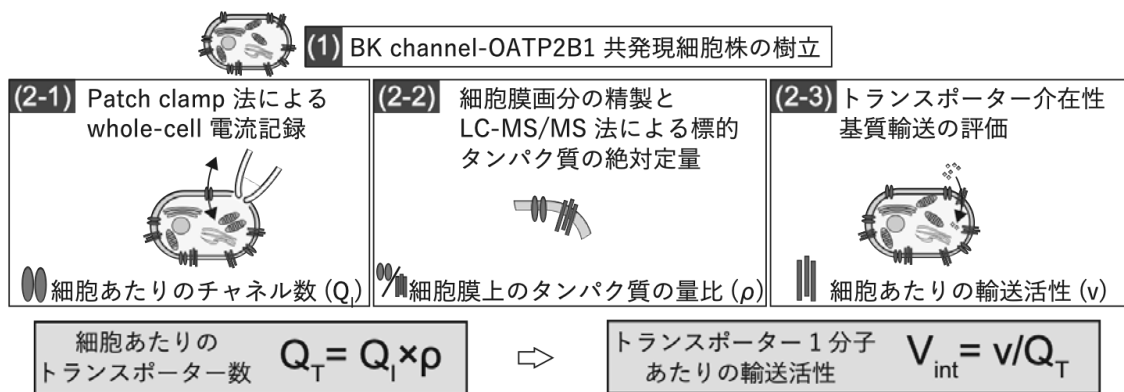


主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	矢島 広大
主 論 文 題 名： トランスポーター単分子輸送活性の新規評価法の開発			
<p>(内容の要旨)</p> <p>薬物の体内動態をつかさどる機能性タンパク質として、cytochrome P450 (CYP) に代表される代謝酵素と並んで重要なのは、P 糖タンパク質 (P-gp) や有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) 2B1 等に代表されるトランスポーターである。これら機能性タンパク質には、活性変動を引き起こす遺伝的変異型が存在し、基質薬の体内動態変動を引き起こす。そのため、遺伝的変異を有する被験者を対象とした臨床研究が実施されているが、ヒトを対象とした臨床試験は経済的・倫理的観点から実施のハードルが高い。よって、機能性タンパク質活性変動の影響の評価には、<i>in vitro</i> 実験などの結果から得られたパラメーターを積み上げて <i>in vivo</i> に外挿する方法、すなわち、<i>in vitro-to-in vivo extrapolation (IVIVE)</i> が有用である。一方で、機能性タンパク質の活性は、その“単分子の活性”と“発現量”によって決定される。CYPs は試料中に存在するモル含有量を測定する簡便な手法により、1 分子あたりの代謝活性が算出できるが、トランスポーターにはこうした方法がない。一般的に行われてきたトランスポーター発現細胞を用いた基質取り込み実験においては、輸送活性の変動に対する“単分子の活性”と“発現量”の寄与をそれぞれ分離して評価することはできなかった。</p> <p>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り、本手法を用いて組織や細胞における様々なトランスポーターの発現が評価されている。しかし、現行の QTAP 法を用いても、<i>in vitro</i> 取り込み実験において基質輸送に寄与したトランスポーターの分子数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、未成熟なものや細胞膜から脱落したものを含む可能性がある。一方で、細胞膜画分を精製する場合、その回収率は数パーセントにとどまる上に、正確な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工程において損失を受ける。</p> <p>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。</p>			

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、下図に示すように、(1) OATP2B1 発現細胞に large-conductance Ca²⁺-activated 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 (ρ) 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トランスポーターである OATP2B1 を、channel として BK channel を選択した。BK channel は、高い開口確率が確保された条件下で 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 細胞株を用いて、BK channel α subunit および mCherry 配列をレトロウィルスを用いて形質導入することで、BK channel-OATP2B1-HEK293 (BK-2B1-HEK293), BK channel-pMEI_mock-HEK293 (BK-mock-HEK293) の細胞株を樹立した。

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 MΩ 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 CaCl₂ (遊離 Ca²⁺ イオンは 2.58 μM) とした。BK channel 特異的電流は、BK channel 特異的開口薬 30 μM NS11021 を含んだ細胞外液 (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, 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 -60~+200 mV の範囲内で 20 mV 間隔のステップパルスを 100 ms 間与え、各コマンド電位 v におけるステップパルス付加中の最大電流量 $I(v)$ を記録した。 $I(v)$ を、 v と K^+ 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_{max} ; コマンド電位 +200 mV における $G(v)$) で規格化した。 $G(v)/G_{max}$ を各コマンド電位に対してプロットして、ここにボルツマンの式 (式 1) を、非線形最小二乗法を用いて当てはめることで、最大活性の半分の活性化を与える電圧 ($V_{1/2}$)、および slope factor (γ) を算出した。さらにボルツマンの式より $G(v)/G_{max}$ 値が 0.95 を上回った電圧範囲を推定した。

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

【結果・考察】

BK channel 特異的電流の記録

$G(v)/G_{max}$ 値は、付加電圧依存的に増加し、NS11021 非存在下および 30 μ M NS11021 存在下における $V_{1/2}$ 値と γ 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。30 μ M NS11021 処置により $V_{1/2}$ 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 特異的であると確認された。さらに式 1 に各パラメータを代入すると、30 μ M NS11021 存在下において付加電位 140 mV 以上では開口確率が 95% 以上となると考えられた。よって本検討により細胞膜上のすべての BK channel が開口した条件下で whole-cell 電流を記録できる実験条件を確立できた。

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、下記の 1)~3) の実験を実施し、最終的に OATP2B1 固有輸送活性 (V_{int}) 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 adjusted 7.4 with KOH)) 条件下にて 30 μ M NS11021 を灌流し、保持電位 -80 mV から、-80~+160 mV の範囲内で 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 特異的阻害薬の 1 μ M paxilline を灌流し、BK channel 非介在性の電流成分 (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、生成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 および Na^+/K^+ -ATPase 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 (ρ) 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 μM 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 ($\mu\text{L} / 2 \text{ min} / \text{mg protein}$) 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。

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

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

さらに、 10^6 細胞あたりのタンパク質量 ($\text{mg}/10^6 \text{ cells}$) 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 ($=V_{\text{max}}/K_m$; $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$) を算出した。

OATP2B1 単分子あたりの活性評価 (2-1) から算出した Q_I 値に、方法 (2-2) より得た ρ 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_{membrane} 値は $138 \pm 14.6 \text{ nS}$ (mean \pm SE, $n=3$) であり、 Q_I は $916 \pm 98.6 \text{ molecules/cell}$ (mean \pm SE) と算出された。得られた Q_I 値は既報と同等であった。

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 細胞の精製 plasma membrane 画分中 BK channel α subunit と OATP2B1 の含量はそれぞれ 6.88 ± 0.69 , $3.72 \pm 0.43 \text{ fmol} / \mu\text{g protein}$ (values are arithmetic mean \pm S.D., $n = 3$ (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 Na^+/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、BK channel が 4 量体であることを考慮すると ρ は 2.16 と算出され、 Q_T は $1.98 \pm 0.21 \times 10^3 \text{ molecules} / \text{cells}$ と算出された。

OATP2B1 介在性基質輸送と OATP2B1 単分子活性の評価

BK-2B1-HEK293 細胞における E3S 取込みの K_m 値は $9.02 \mu\text{M}$ と既報と同等であり、測定した細胞のタンパク質含量 ($0.15 \text{ mg}/10^6 \text{ cells}$) より CL は $10.4 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ と算出された。最終的に、 V_{int} は、 $5.23 \text{ fL} / \text{min} / \text{molecule}$ と算出された。 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、 $4.74 \times 10^2 \text{ sec}^{-1}$ となり、過去に報告された値の範囲内であった。また、素過程で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。