

博士学位論文 2023 年度

トランスポーター単分子輸送活性の新規評価法の開発

慶應義塾大学大学院薬学研究科

矢島 広大

目次

| | |
|---|----|
| 略語表 | iv |
| 要旨 | 1 |
| 序論 | 3 |
| 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 | 7 |
| 第一節 諸言 | 7 |
| 第二節 方法 | 8 |
| 第一項 実験材料 | 8 |
| 第二項 BK channel-OATP2B1 安定発現 HEK293 細胞株の樹立 | 8 |
| 第三項 mCherry 融合タンパク質の蛍光観察 | 9 |
| 第四項 BK channel 電流の記録 | 10 |
| 第五項 ステップパルス応答性電流を用いた BK channel 活性評価 | 10 |
| 第三節 結果 | 11 |
| 第一項 mCherry 融合タンパク質の蛍光観察 | 11 |
| 第二項 ステップパルス応答性電流を用いた BK channel 活性評価 | 12 |
| 第四節 考察 | 13 |
| 第五節 小括 | 14 |

| | | |
|-----|---|----|
| 第二章 | 細胞膜上に発現するトランスポーター分子数の算出とその値を使用した固有活性の算出 | 15 |
| 第一節 | 諸言 | 15 |
| 第二節 | 方法 | 16 |
| 第一項 | 実験材料 | 16 |
| 第二項 | 細胞培養と実験における分割 | 16 |
| 第三項 | Port-a-Patch システムを用いた電流測定 | 16 |
| 第四項 | BK-2B1-HEK293 細胞における BK channel 特異的 whole-cell 電流記録 | 17 |
| 第五項 | BK channel 介在性電流を用いたチャネル発現量の算出 | 17 |
| 第六項 | Plasma membrane 画分の調製とペプチド試料の調製 | 18 |
| 第七項 | LC-MS/MS 法を用いた細胞膜画分中の BK channel, OATP2B1 および Na ⁺ /K ⁺ -ATPase の定量 | 19 |
| 第八項 | OATP2B1 介在性取り込み活性評価 | 22 |
| 第九項 | OATP2B1 介在性 E3S 取り込みクリアランスの算出 | 22 |
| 第十項 | OATP2B1 の単分子固有活性の算出 | 23 |
| 第三節 | 結果 | 23 |
| 第一項 | BK-2B1-HEK293 細胞における whole-cell 電流記録 | 23 |
| 第二項 | BK-2B1-HEK293 細胞から精製した PM 画分における標的ペプチドの絶対定量 | 24 |
| 第三項 | OATP2B1 介在性取り込み活性評価 | 24 |

| | |
|--------------|----|
| 第四節 考察 | 26 |
| 第五節 小括 | 28 |
| 總括 | 29 |
| 参考文献 | 30 |
| 謝辭 | 39 |

略語表

| | |
|-----------------------|---|
| BK channel | large-conductance calcium-activated potassium channel |
| BSA | bovine serum albumin |
| CL | OATP2B1-mediated uptake clearance |
| CL _{int} | single-molecule clearance |
| E3S | estrone 3-sulfate |
| G(v) | membrane conductance |
| G _{max} | maximum value of G(v) |
| G _{membrane} | membrane conductance |
| G _{single} | unitary conductance |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| I _{BK} | BK channel-dependent current |
| I _{NS} | whole-cell current in the presence of NS11021 |
| I _{Pax} | whole-cell current in the presence of paxilline |
| I _{single} | single channel current |
| I(v) | maximum current |
| K _m | Michaelis constant |
| LC-MS/MS | liquid chromatography-tandem mass spectrometer |

| | |
|-----------------------|--|
| OATP | organic anion transporting polypeptide |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PM | plasma membrane |
| PTS | phase transfer surfactant |
| QTAP | quantitative targeted absolute proteomics |
| SRM | selective multiple reaction ion monitoring |
| $V_{1/2}$ | the voltage that resulted in half-maximal activation |
| V_{\max} | maximum uptake velocity |
| $V_{\max,\text{int}}$ | maximum single-molecule uptake velocity |
| γ | slope factor |

要旨

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。機能性タンパク質の活性は、その“単分子の活性”と“発現量”の積として観測されるが、従来の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、細胞膜画分を調製する際の回収率が不明であるため、基質取り込み実験において実際に取り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った。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。HEK293 細胞に large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel と有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) 2B1 を共発現させ、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、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) を乗じて、細胞膜上の OATP2B1 の分子の数を求めた。これにより、OATP2B1 を介した輸送活性を、 $Q_i \times \rho$ で除すことで、OATP2B1 の単分子 (固有) 輸送活性 (V_{int}) を算出した。 Q_i と ρ はそれぞれ、918 molecules/cell、2.16 と

推定され、 V_{int} は 5.23 fL/min/molecule と算出された。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。

序論

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) に代表される薬物代謝酵素や、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などがある。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が存在し、基質薬の体内動態変動を引き起こす。そのため、新薬開発の安全性評価や医療現場における個別化医療の実現に向け、それらの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。一方で、ある組織や試料における機能性タンパク質の活性は、その“単分子の活性”と“当該タンパク質分子の量”の積として観測される。このとき、CYPs であれば、試料中に存在する分子のモル含量を CO 差スペクトル法を用いて測定できるため、1 分子あたりの機能を評価できる^[1]。たとえば、種々の CYP 分子種において遺伝子多型が報告されているが^[2]、この多型間における活性の差異に関して発現量を測定してその値で規格化することで、単分子あたりの活性として定量的な評価が行われてきた。

トランスポーターは細胞膜上に発現し、さまざまな薬物や内因性化合物を輸送することで基質の体内動態を決定する重要な機能タンパク質であり、その活性は、遺伝的変異や翻訳後修飾により影響を受けることが知られている^[3,4]。消化管や肝臓に発現する OATP2B1^[5,6]に関して、これまでに、基質輸送活性の変動を引き起こすアミノ酸置換を伴う遺伝的 variants が報告されている。実際、Arg111Gln および Ser486Pro 変異型発現 HEK293 細胞を用いた *in vitro* 取り込み実験において、典型的基質 estrone 3-sulfate (E3S) の取り込みクリアランスがそれぞれ野生型の 1.60%、2.43% まで低下することが確認されている^[7,8]。また翻訳後修飾としては、OATP2B1 発現 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞において、N-グリコシル化を受ける細胞外領域の Cys 残基を Ala に置換すると細胞への基質の取り込み活性が最大で

野生型の 20% にまで低下すること^[9]が報告されている。このように、トランスポーターの輸送活性は遺伝的変異や翻訳後修飾によって影響を受けるため、その輸送活性を *in vitro* 実験系を用いて定量的に捉えることは重要である。しかし、前述したように、観測されるトランスポーターの輸送活性は、二つの要素、すなわち“細胞膜上の発現量”と、“トランスポーターの固有 (1 分子あたりの) 輸送活性”の積であるため、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両要素の寄与をそれぞれ分離して評価することはできない。

トランスポーターの遺伝的変異や機能修飾の影響を調査する目的による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臨床的な影響の評価には、*in vitro* 実験系などの結果から得られたパラメーターを積み上げて *in vivo* に外挿する方法、すなわち、*in vitro*-to-*in vivo* extrapolation (IVIVE) が有用である。その際、トランスポーターの固有輸送活性は、先に述べたようなトランスポーターの機能変動機構を理解するだけでなく、*in vivo* におけるトランスポーターを介した取り込みクリアランスを *in vitro* から補外 (IVIVE) するためにも不可欠である。さらに、複数のトランスポーターにより媒介される輸送のクリアランスを予測する際も、固有輸送活性に基づく比較が必要となる。しかし、トランスポーターの固有輸送活性を直接評価する信頼性のある方法は確立されていない。これまでに、脂質異常症治療薬であるスタチン類のヒト肝細胞への取り込みを担う OATP1B1 および 1B3 の寄与を定量的に明らかにすることを目的に、OATP1B1 または 1B3 発現 HEK293 細胞株における各取り込みクリアランスをヒト肝細胞における取り込みクリアランスへ外挿する検討が行われている^[10,11]。彼らは、reference compounds として E3S と cholecystokininoctapeptide (CCK-8) の取り込みをスタチン類と同時に評価することで OATP1B1 と OATP1B3 の相対的な寄与を推定す

ることには成功した。しかし、それぞれの OATPs 分子の絶対的な輸送活性を算出して比較するには至っていない。この理由として、従来のトランスポーター発現細胞株などを用いた基質取り込み実験におけるトランスポーター輸送活性が、取り込み実験に用いた細胞株の総タンパク質当たり (*i.e.*, nmol/min/10⁶ cells) として評価されており、細胞膜上のトランスポーターの固有輸送活性 (nmol/min/fmol transporters) としては評価されていないことが挙げられる。換言すれば、トランスポーターの発現細胞において基質の取り込み活性を評価しても、当該細胞の細胞膜上に発現するトランスポーターの絶対量を測定し、これを用いて輸送活性を規格化することができていなかった。

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^[12-14]、組織や培養細胞に発現するトランスポーターを含むさまざまな機能性タンパク質の発現量の評価に用いられている^[15, 16]。さらに、*in vitro* および *in vivo* 由来の試料における標的トランスポーターの発現量を QTAP 法を用いて同時に定量して、*in vitro* での細胞当たりの取り込みクリアランスから臓器クリアランスを予測 (IVIVE) する試みが始まっている^[17, 18]。しかし、QTAP 法を用いても、*in vitro* 取り込み実験に用いた細胞の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捉えているとは言い難い。まず、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い、すなわち、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^[19]。一方で、細胞膜面分を精製する場合、その正確な回収率は不明であり、既報によれば数パーセントにとどまる^[20]。さらに QTAP 法による定量の際にも、試料の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試料は損失を受ける^[21]。したがって、現行の QTAP 法を用いて測定された、精製した細胞膜面分中のトランスポーターの絶対量が、輸送に寄与したトランスポーター量を正確に捉えているとは言えない。

他方、細胞膜上に発現するタンパク質の中でも、イオンチャネルについては、パッチクランプ法などにより unitary conductance に代表される単分子チャネル特性が決定されている^[22]。また、whole-cell patch clamp 法を用いれば、whole-cell 電流を評価可能である。したがって、細胞膜上におけるあるイオンチャネルの whole-cell 電流を当該イオンチャネルの single channel 電流で除すことで、細胞膜上に発現するイオンチャネルの絶対数を計算することができる。

本研究では OATP2B1 を例に、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、OATP2B1 発現細胞に large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel を共発現させ、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、QTAP 法により測定した精製細胞膜面分中の OATP2B1 と BK channel の量比 (ρ) から、細胞膜上の OATP2B1 の分子の数 (Q_T) を求めることとした。これにより、OATP2B1 を介した取り込みクリアランスを、細胞膜上の OATP2B1 の分子の数で規格化することで、OATP2B1 の単分子 (固有) 輸送活性 (V_{int}) を算出した (Figure 1)。

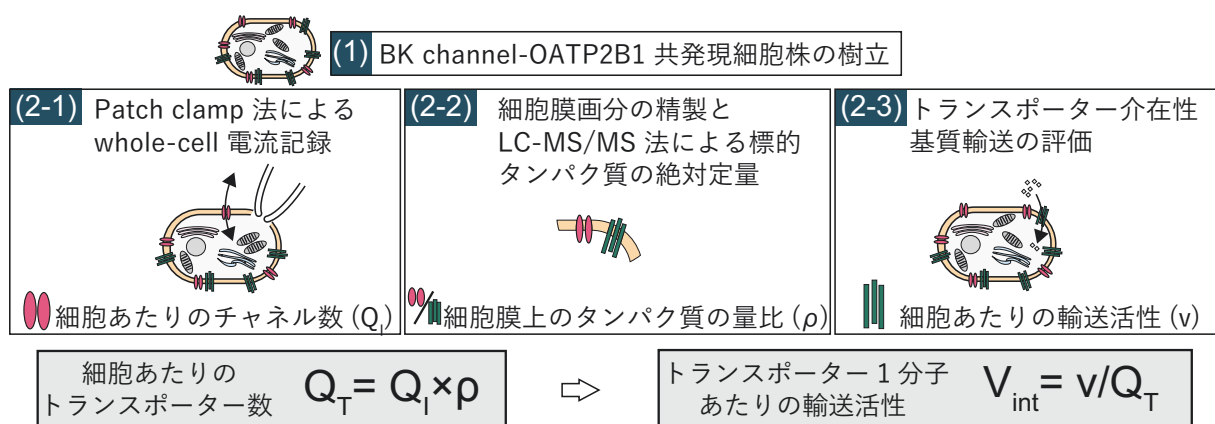


Figure 1 本研究のスキーム図
 Q_i : 細胞あたりのチャネル数、 Q_T : 細胞あたりのトランスポーター数、 ρ : OATP2B1 と BK channel の量比、 v : OATP2B1 介在性基質輸送活性、 V_{int} : OATP2B1 単分子あたりの輸送活性

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

第一節 諸言

本研究においては、plasma membrane (PM) 上の分子数を算出するために必要な特性を有する BK channel に着目した。Whole-cell 電流を規定する因子は 2 つに大別できる。1 つ目は whole-cell 電流を構成するイオンチャネルの種類であり、2 つ目はそれぞれのチャネル電流 (I)、すなわちシングルチャネル電流 (I_{single}) にチャネルの総数 (N) と channel availability (P_o) を乗じたもの ($I = I_{\text{single}} \times N \times P_o$) である。したがって、あるチャネルの I_{single} 値と whole-cell 電流量から当該チャネルの細胞膜上の個数 (Q_i) を算出するためには、目的チャネル以外による電流を除外し、かつ channel availability が 100% の条件で whole-cell 電流を評価する必要がある。BK channel は、channel availability が膜電位と細胞内カルシウム濃度依存的に変動し^[23]、低電位であっても膜上の availability が 100% となる条件を達成しやすい。また極めて大きな unitary conductance を持つ (151~280 pS) ため、比較的電流の記録がしやすい。巨視的なチャネル電流の時定数も小さく (~ 1 ms)^[24]、脱分極を維持しても不活性化しないことから、矩形波パルスにより steady state 電流が観測しやすい。さらに特異的開口薬^[25]および遮断薬^[26]が知られており、その他チャネルの特性やシングルチャネル活性も報告されている^[27, 28]。以上を踏まえると、高い channel availability が確保された条件下で steady-state whole-cell 電流を測定できると期待されたため、本研究では BK channel を内標準に選択した。

続いて、標的トランスポーターとしては OATP2B1 を選択した。OATP2B1 は脂質異常症に用いられるスタチン類や抗アレルギー薬の fexofenadine など多くの医薬品を基質とすることが知られている。当研究室ではこれまでに野生型および変異型 OATP2B1 発現 HEK293 細胞株を樹立して^[29]E3S 輸送に対す

る変異の影響を定量的に評価してきた^[30]。すなわち、OATP2B1 の基質輸送を評価できる手法を確立済みであり、さらに活性変動をもたらす変異型についても樹立および機能評価が完了していたため、トランスポーター単分子あたりの輸送を評価するに当たって OATP2B1 を選択した。

以上より、本章では BK channel と OATP2B1 を共発現させた細胞株を樹立して、当該細胞株を用いて電位依存的な channel availability の変動を解析することで、 Q_i を算出できる実験条件を探索した。

第二節 方法

第一項 実験材料

HEK293 細胞は RIKEN Bioresource Research Center Cell Bank (Tsukuba, Japan) より入手した。2.0-3.5 M Ω NPC-1 Tip は Nanion Technologies (GmbH, Germany) より購入した。NS11021 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) より購入した。電流記録に用いた試薬 (NaCl, KCl, HEPES, D-glucose, KF, K-gluconate, HEDTA, CaCl₂, MgCl₂) は Sigma Aldrich (Burlington, MA) より購入した。mCherry 配列を C 末端側に含む BK channel α subunit (*KCNMA1*; NM_002247.3) 配列は、名古屋市立大学薬学部 鈴木良明講師よりプラスミド DNA を供与いただいた。そのほかの試薬に関しては特記なき限り、市販の特級品を購入して使用した。

第二項 BK channel-OATP2B1 安定発現 HEK293 細胞株の樹立

OATP2B1 発現 HEK293 細胞株は既報^[31]の方法を基に一部を修正して樹立した。簡潔に示すと発現ベクターを pMEI-5 neo (TaKaRa, Shiga, Japan) に改編し OATP2B1 (*SLCO2B1*; NM_007256.5) 遺伝子を HEK293 細胞へトランスダクションして樹立した。同様に受動拡散の影響を評価するため pMEI-5 neo 空

ベクターを導入して、pMEI_mock-HEK293 細胞株を樹立した。mCherry 配列を C 末端側に含む BK channel α subunit 配列は PCR 法によりプラスミド DNA よりクローニングして、TA クローニングで pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に搭載した。制限酵素 (*Not I*) で消化して目的配列のみを切り出して、pQCXIP ベクター (Clontech, Mountain View, CA) にライゲーションした。得られた pQCXIP_BK mCherry ベクターおよび pQCXIP 空ベクターを、OATP2B1-HEK293 細胞および pMEI_Mock-HEK293 細胞にそれぞれ導入して、BK channel-OATP2B1-HEK293 (BK-2B1-HEK293), pQCXIP_Mock-OATP2B1-HEK293 (Mock-2B1-HEK293), BK channel-pMEI_mock-HEK293 (BK-mock-HEK293) および pQCXIP_Mock-pMEI_mock-HEK293 (Mock-mock-HEK293) の 4 種の細胞株を樹立した。各安定発現細胞は 1 μ g/mL puromycin 存在下で 2 週間培養することにより選択した。すべての細胞株は Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with glucose (4.5 g/L, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、10% heat-inactivated fetal bovine serum (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany)、1% penicillin-streptomycin mixed solution (Nacalai Tesque) 存在下、37°C、5% CO₂、95% relative humidity 条件下で培養した。

第三項 mCherry 融合タンパク質の蛍光観察

遺伝子導入した mCherry 融合 BK channel のタンパク質発現を確認するために mCherry の発現を蛍光観察した。BK-2B1-HEK293 および BK-mock-HEK293 細胞を 35 mm ガラスベース dish (IWAKI, Shizuoka, Japan) 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 (FV-3000, OLYMPUS, Tokyo, Japan) (対物レンズ UPLXAPO 60 \times Oil NA:1.42) を用いて、室温下に位相差観察と蛍光観察 (励起光 594 nm、検出波長 610-710 nm) で細胞を観察した後、撮影した。

第四項 BK channel 電流の記録

BK-2B1-HEK293 細胞を 100 mm dish に播種して 3 日間培養した後、60-70% confluent になった時点で実験に供した。細胞を PBS (-) で 1 回洗浄した後に 10% TrypLE Express (Gibco, Carlsbad, CA) 2 mL を 37°C, 3 分間 incubate して剥離させた。ここに 2 mL の培地を添加し細胞懸濁液を回収し、20°C, 100 × g, 5 分遠心して上清を除いた。2 価の陽イオンを含まない細胞外液 (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM D-glucose, pH adjusted 7.4 with NaOH) で 2×10^6 cells/mL となるように細胞を再懸濁し、穏やかに攪拌後、実験までは氷上で静置した。BK channel 電流の記録は、2.0–3.5 MΩ NPC-1 chips とオートパッチクランプ装置 (Port-a-Patch system, Nanion Technologies) を使用して、製品のプロトコルに従い、再懸濁後 2 時間以内に測定した。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 2.58 μM (<https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/webmaxc/webmaxcE.htm> で算出した)とした。シール抵抗は built-in protocol を用いて測定し、十分なシール抵抗 (約 300 MΩ) を有する whole-cell clamp の形成を確認後、細胞の静電容量を記録した。Pulse 生成とデータ記録には Patch-Control V4.16 software (HEKA Elektronik, Reutlingen, Germany) を用いた。

第五項 ステップパルス応答性電流を用いた BK channel 活性評価

BK channel 電流は、最終濃度 30 μM に調製した NS11021 (最終 DMSO 濃度 0.1%) を含んだ normal extracellular solution (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, 5 mM D-glucose, pH

adjusted 7.4 with NaOH) の灌流下に測定した。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 (MLAB program, Civilized Software Inc., Bethesda, MD) 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。

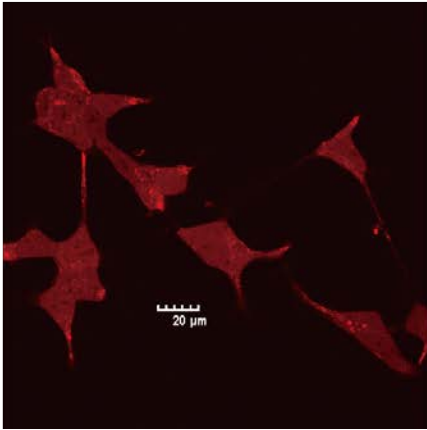
$$G(v)/G_{\max} = \left\{ 1 + \exp\left(-\frac{v-V_{1/2}}{\gamma}\right) \right\}^{-1} \quad (1)$$

第三節 結果

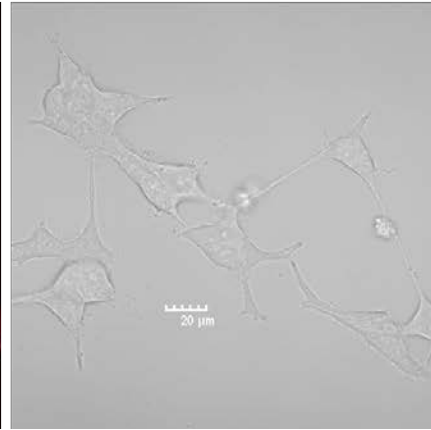
第一項 mCherry 融合タンパク質の蛍光観察

BK-2B1-HEK293 細胞株において共焦点レーザー顕微鏡下で目的の mCherry 融合タンパク質を検出した。蛍光観察と位相差観察で得られた画像を重ね合わせたところ、細胞の形状に沿って励起光に惹起された mCherry タンパク質の蛍光が確認された (Figure 2)。また、BK-mock-HEK293 細胞においても同様に mCherry 融合タンパク質が検出された (Data not shown)。

A) Fluorescence



B) Phase contrast



C) Merged

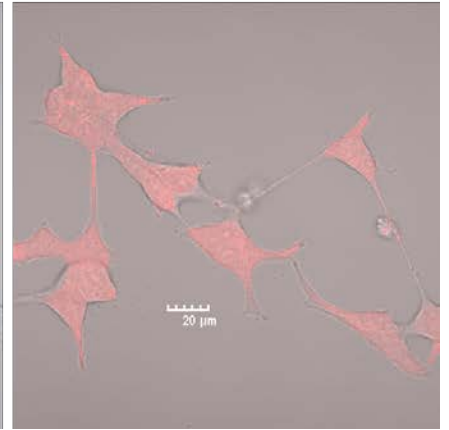


Figure 2 BK-2B1-HEK293 細胞を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した画像

A) Fluorescence、B) Phase contrast、C) Merged、拡大倍率; 対物 60 倍、励起光; 594 nm レーザー、検出波長; 610-710 nm、室温下

第二項 ステップパルス応答性電流を用いた BK channel 活性評価

Figure 3 に $-60 \sim +200$ mV の範囲内で 20 mV 間隔のステップパルスを 100 ms 間与えた際の電圧と規格化コンダクタンス (G/G_{\max}) の関係を示す。 G/G_{\max} 値は、付加電圧依存的に増加した。また、ボルツマンの式 (式 1) より、NS11021 非存在下 (control) および $30 \mu\text{M}$ 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。

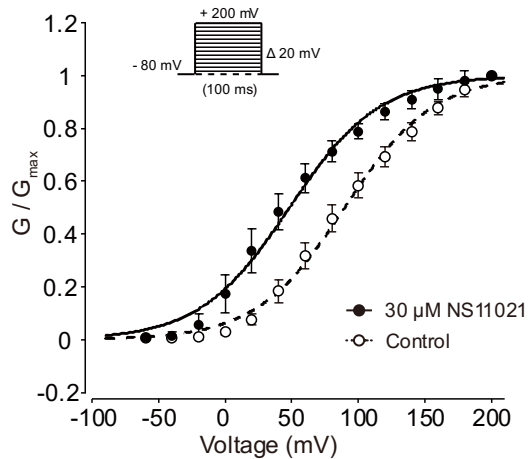


Figure 3 BK-2B1-HEK293 細胞における電圧に対する規格化した膜コンダクタンス変動に与える 30 μ M NS11021 の影響

Open symbol と破線は NS11021 非存在下 (Control)、closed symbol と実線は 30 μ M NS11021 存在下での結果を表し、破線および実線はフィッティングライン、インセットは与えた電圧刺激を示す。Data are mean \pm S.D., n = 10-11

第四節 考察

本検討により BK-2B1 および BK-mock-HEK293 細胞株において mCherry タンパク質の発現が確認されたことから、BK channel タンパク質は当該細胞株上に、概ね一様に発現していると推測されたが (Figure 2)、細胞膜画分に局在していることは確認できなかった。実際、スライドガラス上に BK-2B1-HEK293 細胞を播種し 10% ホルムアルデヒド溶液で固定して蛍光観察したが、明確に細胞膜画分にタンパク質が発現していると確認できなかったため (Data not shown)、この点は本検討の限界である。しかしながら、細胞内カルシウム濃度および特異的開口薬 NS11021 添加によりチャネル活性化が確認されたことから、本検討で観察された whole-cell 電流は細胞膜上に発現した BK channel に特異的であると判断した。

BK channel は細胞内カルシウム濃度依存的に channel availability が高くなる特性を持つことから、可能な限り低電位で膜上の全てのチャネルを活性化させるために、細胞内液の遊離カルシウム濃度を生理学的に想定されうる最大遊離濃度の $2.58\ \mu\text{M}$ として、細胞外液には特異的開口薬 NS11021 ($30\ \mu\text{M}$) を添加した。細胞内カルシウム濃度の設定と $30\ \mu\text{M}$ NS11021 の添加により $V_{1/2}$ 値が $89.7\ \text{mV}$ から $48.3\ \text{mV}$ へと低電位側にシフトしたが、このシフト幅は既報^[32]とおおよそ同等であったことから、本検討で観測された電流は BK channel 特異的であると判断した。さらに得られたパラメータより、この条件下においては付加電位 $140\ \text{mV}$ 以上では開口確率が 95% 以上となると考えられた。

本章で BK channel 導入の宿主として選択した OATP2B1 発現 HEK293 細胞は、他の実験者によりその機能評価が完了していた^[33]。遺伝子導入後に $1\ \mu\text{M}$ estrone 3-sulfate (K_m 値より十分に低濃度の基質) を用いて preliminary な機能評価を実施したところ、BK channel 導入前とほぼ同等の取り込み活性が確認された (Data not shown)。

第五節 小括

本章では、OATP2B1 と BK channel を安定発現した HEK293 細胞株を樹立することができた。また当該細胞を用いて BK channel 特異的電流の記録に成功した。さらに BK channel 特異的開口薬 NS11021 存在下で、開口確率が 95% 以上となる条件を決定した。

第二章 細胞膜上に発現するトランスポーター分子数の算出とその値を使用した固有活性の算出

第一節 諸言

本章では、前章で樹立した BK-2B1-HEK293 細胞株を培養後、3 分割して、BK channel whole-cell 電流の記録、PM 画分中の BK channel および OATP2B1 タンパク質の絶対定量、OATP2B1 介在性基質輸送の評価、のそれぞれの実験を同時に実施し、細胞膜上に発現する OATP2B1 分子の絶対数を算出することにより、OATP2B1 単分子あたりの輸送活性を得ることを目的とした。具体的には、BK-2B1-HEK293 細胞株において whole-cell patch clamp 法を用いて whole-cell 電流を測定し、それに基づいて細胞膜上の BK channel の分子の数 (Q_I) を推算した。続いて当該細胞プールより調製した PM 試料における BK channel に対する OATP2B1 の化学量論比 (ρ) を特異的ペプチドを用いた QTAP 法により算出して、式 2 を用いて細胞膜上の OATP2B1 分子数 (Q_T) を算出した。

$$Q_T = Q_I \cdot \rho \quad (2)$$

得られた Q_T 値で OATP2B1 介在性輸送を規格化することにより、OATP2B1 単分子あたりの輸送活性 ($V_{\max, \text{int}}, CL_{\text{int}}$) を評価した。

第二節 方法

第一項 実験材料

[³H]Estrone 3-sulfate (E3S) (54.0 Ci/mmol) は PerkinElmer Japan (Yokohama, Japan) より購入した。E3S は Nacalai Tesque より購入した。Paxilline は Cayman chemical より購入した。その他の試薬については、特記なき限り、第一章第二節と同じものを使用した。

第二項 細胞培養と実験における分割

細胞株は第一章で樹立した 2 種 (BK-2B1, BK-mock-HEK293) を使用し、培養条件は第一章第二節と同様に行なった。それぞれの細胞株は poly-D-lysine-coated 96-well microplates (Corning; New York, NY)、および 150 mm dish (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA) 上に同時に $2.0\text{-}3.1 \times 10^5$ cells/cm² で播種し、同一条件下にて 3 日間培養後、80-90% confluent となった時点で後述の通り、それぞれ OATP2B1 取り込み活性の評価および BK channel 電流の測定、または QTAP 解析に供した。

第三項 Port-a-Patch システムを用いた電流測定

96-Well microplate 上に培養した BK-2B1-HEK293 細胞を PBS (-) で 1 回洗浄した後に 10% TrypLE Express (Gibco) 100 μ L を 37°C, 3 分間 incubate して剥離させた。ここに 100 μ L の培地を添加し細胞懸濁液を回収した。100 \times g, 5 分, 室温にて遠心し上清を除いた後、2 価の陽イオンを含まない K⁺ rich 細胞外液 (140 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM D-glucose, pH adjusted 7.4 with KOH) を用いて細胞を懸濁し、シールエンハンサー溶液 (140 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM D-glucose, 1 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, pH

adjusted 7.4 with KOH) を灌流流下にてギガオームシールを形成させた。Ramp pulse 応答性電流は、後述する外液を灌流しながら観測し、電流データは 2.5 kHz でデジタル化して記録した。特記なき限り、前章と同様に BK channel 電流を記録した。

第四項 BK-2B1-HEK293 細胞における BK channel 特異的 whole-cell 電流記録

K⁺ symmetry 外液 (140 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM D-glucose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH adjusted 7.4 with KOH) を灌流下にて、保持電位 -80 mV から、+160 mV への 2,400-ms の ramp pulse 刺激を与えて (ramp rate: 0.1 mV/ms)、whole-cell 電流を記録した。NS11021 非存在下 (control) で測定後、次に外液を BK channel 開口薬 30 μM NS11021 を含む灌流液に置換し、再度 whole-cell 電流を記録した。最後に、BK channel 特異的遮断薬 の paxilline (1 μM; DMSO 最終濃度 0.1%) を含む外液を灌流下にて、BK channel 非介在性の電流成分を記録した。

第五項 BK channel 介在性電流を用いたチャネル発現量の算出

Ramp pulse により +40 ~ +140 mV を付加した時点の開口薬 30 μM NS11021 存在下の電流 (I_{NS}) と遮断薬 1 μM paxilline 存在下の BK channel 非介在性の電流 (I_{Pax}) の差分を BK channel 成分電流 (I_{BK}) とした (式 3)。

$$I_{BK} = I_{NS} - I_{Pax} \quad (3)$$

I_{BK} の傾きを BK channel 介在性 conductance (G_{membrane}) とし、既報の K^+ symmetry 条件下での unitary conductance 値 ($G_{\text{single}}, 151 \text{ pS}$)^[34]で除することで、細胞膜上に発現する BK channel の分子数 (Q_I) を算出した (式 4)。

$$Q_I = G_{\text{membrane}} / G_{\text{single}} \quad (4)$$

第六項 Plasma membrane 画分の調製とペプチド試料の調製

各細胞株の PM 画分は既報^[12]をわずかに変更したスクロースクッション法にて調製した。具体的には、150 mm dish 2 枚よりセルスクレイパーを用いて回収した細胞を 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 250 mM sucrose を含む buffer 中に再懸濁し、窒素キャビテーション (750 psi, 15 分) で細胞を破碎し、遠心分離 (4°C, 10,000 × g, 10 分) 後、上清を回収した。上清を 38% (w/v) sucrose 溶液の top layer として加え、再度遠心分離 (4°C, 100,000 × g, 40 分) した。界面の濁った layer を回収し、10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 250 mM sucrose を含む buffer で希釈して、遠心分離 (4°C, 100,000 × g, 40 分) した。沈殿物を PM 画分として回収し、12 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), 12 mM sodium lauroyl sarcosinate (SLS) を含む phase transfer surfactant (PTS) reagent で再懸濁して、95°C、5 分の条件で熱変性した。タンパク質濃度は Protein Assay BCA Kit (Nacalai Tesque) の製品プロトコルに従って測定した。得られた PM 画分は -80°C で保管した。QTAP 法による標的タンパク質の絶対定量に用いるペプチド試料の調製法は既報^[35, 36]の方法に従った。簡潔に記すと PTS に溶解した PM タンパク質 (50 μg, triplicate) を室温下 30 分間の dithiothreitol 処理に続く、遮光下、室温下 30 分間の iodoacetamide 処理によって還元アルキル化した。続いて SDS および SLS の最終濃度が 2.4 mM となるよう 50 mM

ammonium bicarbonate を添加して、ProteaseMax (Promega, Madison, WI) は最終濃度 0.05% に、lysyl endopeptidase (Lys-C, Wako Pure Chemical industries, Osaka, Japan) はタンパク質の 1/100 量になるよう添加して、30°C、3 時間振盪させながら incubate した後、TPCK-treated trypsin (Promega) をタンパク質の 1/100 量になるよう添加して、37°C、16 時間振盪させながら incubate してペプチド試料を得た。

第七項 LC-MS/MS 法を用いた細胞膜画分中の BK channel, OATP2B1 および Na⁺/K⁺-ATPase の定量

検量線の作成およびサンプルの前処理は既報^[16]に従った。検量線は 0.3-100 nM の standard peptide mixture と、内部標準 (IS)として 10 nM の安定同位体標識ペプチドで作成した。BK channel, OATP2B1 および Na⁺/K⁺-ATPase の定量に使用したペプチド配列は Table 1 に示した。未知試料では、試料中の PTS を取り除くため trifluoroacetic acid (TFA) による酸性化に続く酢酸エチルを用いた液液抽出を 2 回実施した。すべてのペプチド試料は GL-tip GC および SDB (GL Science, Tokyo, Japan) を用いて、製品プロトコルに従って脱塩し精製した。精製後の残渣は 0.1% ギ酸水溶液で再溶解した後に、4°C、15,000 × g、10 分間遠心し、その上清 11 μL (10 μg protein 相当) を LC-MS/MS に打ち込んで測定した。LC-MS/MS 装置は HPLC (Nexera XS inert, Shimadzu, Kyoto, Japan) とエレクトロスプレーイオン化型三連四重極型マススペクトル (LCMS-8050, Shimadzu) で構成された。LC による分離は XBridge BEH130 C18 column (3.5 mm, 1 mm I.D. ×100 mm, Waters, Milford, MA) を用いた。カラムオーブンは 40°C に設定した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A 相) と 0.1% ギ酸アセトニトリル (B 相) を用いてグラジエント分離を行なった。流速 0.1 mL/min として、B 相を以下の線形グラジエント条件とした : 5% for 0-3 min, 5%-20% for 3-18 min, 50% for 18-23 min, 5% for 23-35 min。溶出したペプチドは選択的反応モニタリング (multiplexed

selected reaction monitoring ; SRM) モードでポジティブイオンを検出した。ピークのデータは一つのペプチドにつき 3 組の親イオン (Q1) と娘イオン (Q3) の質量電荷比 (m/z) および開裂エネルギー (collision energy; CE) の組み合わせ (SRM transition, Table 1) を用いて決定した。標的タンパク質の絶対発現量についても既報^[16]と同様に算出した。未知試料の定量において、IS ペプチドから決定される保持時間に明瞭なピークが確認できなかった場合、対応する IS のピーク高さあたりのエリア値にノイズ高さを乗じた値を検出下限値として設定した。最後に BK channel の発現量に対する OATP2B1 の発現量の比 (ρ) を求めた。なお、BK channel 分子は α subunit のホモ四量体により構成されることから、得られたペプチド断片の定量値の比を 4 倍し、これを ρ とした。

Table 1 標的タンパク質の定量に用いたペプチド配列とトランジション

| protein/gene | Uniprot number | IS or ST | sequence [†] | Q1 (m/z) | Q3 (m/z) |
|-----------------------------|----------------|----------|-------------------------|----------|------------------------|
| Na/K-ATPase / <i>ATP1A1</i> | P05023 | ST | AAVPDAVGK | 414.20 | 685.40, 586.30, 72.50 |
| | | IS | AAVPDAVG K * | 418.25 | 693.40, 594.30, 72.50 |
| BK channel / <i>KCNMA1</i> | Q12791 | ST | IEEDTWQK | 524.75 | 935.40, 806.35, 677.35 |
| | | IS | IEEDTWQ K * | 528.75 | 943.40, 814.40, 685.35 |
| OATP2B1 / <i>SLCO2B1</i> | O94956 | ST | IGPAGEVPQVPDK | 653.90 | 683.40, 359.20, 968.50 |
| | | IS | IGPAGEVPQVP D K* | 657.90 | 691.40, 367.20, 976.50 |

†; 安定同位体標識したアミノ酸残基は太字と * で示した。IS; internal standard, ST; standard

第八項 OATP2B1 介在性取り込み活性評価

OATP2B1 介在性 E3S 取り込みは既報^[33,37]と同様に、plate 法により評価した。簡潔に記載すると、96-well microplate 上に培養した BK-2B1-HEK293 および BK-mock-HEK293 細胞を用いて、pH 6.3 に調整した Hank's balanced salt solution (HBSS: 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid; MES) で調製した E3S 溶液 (最終 E3S 濃度 0.3 - 1,000 μM, [³H]E3S; 54.0 Ci/mmol) の 2 分間の cellular uptake を評価した。細胞内に取り込まれた E3S の放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-7200; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) で評価した。各 well あたりのタンパク質量は、BCA 法により測定した。

第九項 OATP2B1 介在性 E3S 取り込みクリアランスの算出

BK-2B1-HEK293 細胞の細胞タンパク質あたりの E3S 取り込み量から、同条件での BK-mock-HEK293 細胞の E3S 取り込み量を引くことで OATP2B1 介在性 E3S 取り込み速度を求め、これを基質濃度 [S] で除すことで OATP 介在性取り込みクリアランス CL (μL /2 min/mg protein) とした。得られた CL と [S] の関係に、式 5 および 6 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)、最大取り込み速度 (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。非線形最小二乗法における重みづけ残差の算出にあたっては、測定値の 1/2 乗で重みづけを行った。

$$CL_{OATP} = V_{max} / (K_m + [S]) + K_d \quad (5)$$

$$CL_{mock} = K_d \quad (6)$$

さらに、PM 画分の調製に供した BK-2B1-HEK293 細胞懸濁液を用いて、細胞タンパク質あたりの細胞数を実測した。すなわち、セルカウンター (Vi-cell XR, Beckman Coulter, CA) を用いて当該細胞懸濁液の単位容積あたりの細胞数 (10^6 cells/mL) を測定するとともに、BCA 法を用いて当該細胞懸濁液のタンパク質濃度 (mg/mL) を測定し、両者から細胞タンパク質あたりの細胞数を計算した。

第十項 OATP2B1 の単分子固有活性の算出

BK-2B1-HEK293 細胞の単位細胞数あたりの、細胞膜上の OATP2B1 の発現量 Q_T (molecules/cell) は、式 2 を用いて算出した。続いて、取り込み実験により得られた、BK-2B1-HEK293 細胞における単位細胞あたりの E3S の CL ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells) および V_{\max} (nmol/min/ 10^6 cells) を $Q_T \times 10^6$ で除すことで、OATP2B1 介在性 E3S 取り込みの単分子あたりのクリアランス (CL_{int} ; L/min/molecule) および最大取り込み速度 ($V_{\max, \text{int}}$; mol/min/molecule) を算出した。

第三節 結果

第一項 BK-2B1-HEK293 細胞における whole-cell 電流記録

Ramp pulse 刺激条件下において、 $30 \mu\text{M}$ NS11021 処置により、BK channel に特徴的な電流-電圧関係が観察された。さらに $1 \mu\text{M}$ paxilline 処置により、その電流は遮断された (Figure 4)。得られた G_{membrane} 値は 138 ± 14.6 nS (mean \pm SE, $n=3$) であり、ここから Q_I は 916 ± 98.6 molecules/cell (mean \pm SE, $n=3$) と算出された。

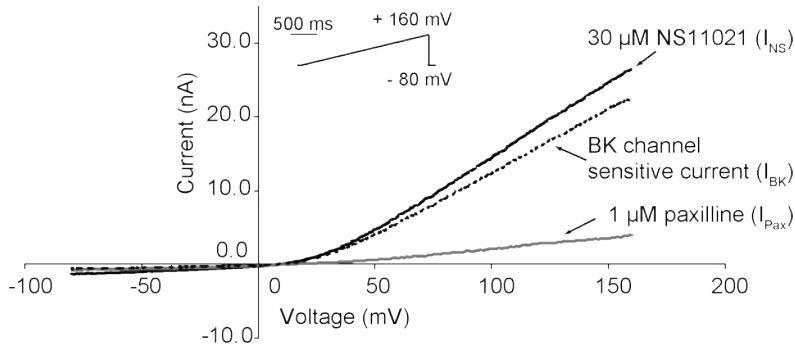


Figure 4 付加電位に対する 30 μ M NS11021 および 1 μ M paxilline 添加時の whole-cell 電流とその差から算出した BK channel 感受性電流 (インセットは与えたコマンドパルスを表す)

第二項 BK-2B1-HEK293 細胞から精製した PM 画分における標的ペプチドの絶対定量

各細胞株から精製した PM 画分における標的タンパク質の発現量を Table 2 に示す。ここから、BK-2B1-HEK293 細胞の細胞膜上における BK channel に対する OATP2B1 の発現量比 (ρ) は 2.16 と算出され、式 2 から Q_T は $1.98 \pm 0.21 \times 10^3$ molecules/cell と算出された。

Table 2 各細胞株より精製した plasma membrane 画分における標的タンパク質の発現量

| | BK channel α subunit | OATP2B1 | ρ | Na ⁺ /K ⁺ -ATPase |
|---------|-----------------------------|-----------------|--------|---|
| BK-2B1 | 6.88 \pm 0.69 | 3.72 \pm 0.43 | 2.16 | 32.3 \pm 4.28 |
| BK-mock | 10.3 \pm 2.48 | not detected | | 25.8 \pm 0.69 |

Unit; fmol/ μ g protein, values are arithmetic mean \pm S.D., n = 3 (triplicate)

第三項 OATP2B1 介在性取り込み活性評価

取り込み実験に用いた BK-2B1-HEK293 細胞のタンパク質含量は、0.150 mg/ 10^6 cells であった。BK-2B1-HEK293 細胞における濃度依存的な E3S 取り込みの結果は Figure 5 に示す。また、取り込み実験

により得られたキネティクスパラメータを Table 3 に示す。以上より、 $V_{\max, \text{int}}$ は 4.72×10^{-20}

mol/min/molecule、 CL_{int} は 5.23 fL/min/molecule と算出された。

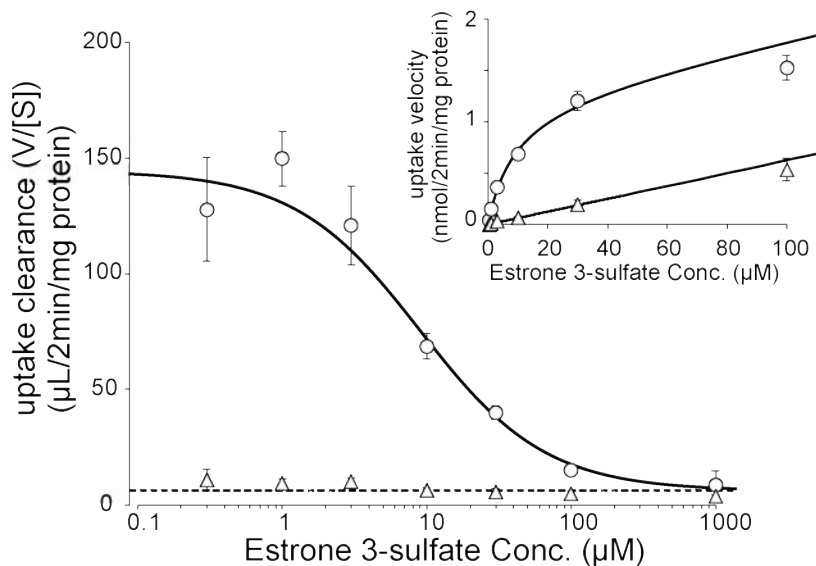


Figure 5 OATP2B1 による濃度依存的な E3S 取り込み

Open circle と open triangle はそれぞれ、BK-2B1 および BK-mock-HEK293 細胞への基質取り込みのクリアランスを示す。実線および破線はフィッティングラインを示す (MLAB software)。インセットは濃度-取り込み速度プロット (100 μM まで)。Data are mean \pm S.D., n=4.

Table 3 OATP2B1 介在性 E3S 輸送キネティクスパラメータ

| | | 1 分子あたりの活性 |
|------------|---|---|
| V_{\max} | 93.6 (10.9) [pmol/min/ 10^6 cells] | $4.72 [\times 10^{-20} \text{ mol/min/molecule}]$ |
| K_m | 9.02 (7.84-10.4) [μM] | |
| CL | 10.4 [$\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells] | 5.23 [fL/min/molecule] |

K_m (-estimation errors ~ +estimation errors) と V_{\max} (estimation errors) 値は全てのデータを MLAB software を用いて式 5 および 6 に同時に当てはめて算出した (n=4)。

第四節 考察

本研究では、観測した BK channel whole-cell 電流より BK channel 介在性 conductance (G_{membrane}) を求め、これを unitary conductance (G_{single}) で除することで Q_I 値を算出した。その値は G_{single} 値のみによって規定されるが、 G_{single} は細胞内外の溶液組成によって変動する。本研究においては、HEK293 細胞を宿主として BK channel α subunits を導入した細胞株より算出された G_{single} として Ma ら^[34]の値 (151 pS) を用いた。この値を適用するために、彼らと同じ K^+ 濃度 (140 mM) の K^+ symmetry 条件下で whole-cell 電流を測定して、 Q_I を算出した。しかし、他の研究者により異なる K^+ 濃度における K^+ symmetry 条件下で測定された G_{single} 値が報告されており、その値は 230~280 pS^[27, 28, 38]と今回採用した値の 2 倍以内であった。したがって、 K^+ 濃度は G_{single} 値に大きな影響を与えるとは考えらず、 Q_I 値の算出にも大きな影響を与えないと考えられる。事実、Ahring らは HEK293 細胞に BK channel を発現させて、シングルチャンネル電流および macroscopic current を観測し、 Q_I として平均 500 channels (range 200-800) という値を報告^[39]しており、本研究の結果と極めて良好に合致している。

QTAP 法を用いた絶対定量において、PM 画分のマーカータンパク質である Na^+/K^+ -ATPase の定量値 (25.8-32.3 fmol/ μ g protein) は、HEK293 細胞から今回と同様の方法で PM 画分を精製した過去の報告 (16-26 fmol/ μ g protein)^[40]と同等であった。したがって、PM 画分の精製過程は既報と同様、適切であったと推定できる。また、BK channel および OATP2B1 の PM 画分中の定量値 (3.72-10.3 fmol/ μ g protein) は、本研究と同様に HEK293 細胞を宿主として遺伝子導入により樹立した過剰発現細胞株を用いた既報^[11, 41]における QTAP 法を用いた OATP1B1, OATP1B3 および ABCB8 発現量 (1.44 -71 fmol/ μ g protein) の範囲に入っていた。前述の通り、同様の手法を用いてサンプルを精製したとしても、最終的な定量値は測

定にかかるさまざまな過程で損失を受けるため、単純に大小関係を論じることはできないが、今回の測定結果は過去の類似の研究と著しく異なるものではなかった。

本研究は細胞膜上のトランスポーター分子の数を算出するために、内標準としてイオンチャンネルに着目してその数を電気生理学的手法により正確に算出した初めての報告である。これまでは、トランスポーターのタンパク質発現量の算出にあたって、細胞膜上の分子数を半定量的な手法で求めることが一般的であった。既報では、whole-cell suspension を NHS-SS-ビオチン (Biotin disulfide *N*-hydroxysuccinimide ester) で標識した後に溶解し、ストレプトアビジンビーズに結合した細胞膜上の organic cation transporter 2 (OCT2; *SLC22A2*) と multidrug and toxin extruder 1 (MATE1; *SLC47A1*) を回収した後、それぞれの分子数について western blotting 法を用いてタグタンパク質のバンド強度から定量した^[42]。回収された細胞膜面分中トランスポーターのビオチン標識率が不明であることは、この既報における限界になりうる。また LC-MS/MS 法を用いた定量的プロテオミクス解析により細胞膜面分中の OCT2 分子数を定量して turnover rate を算出した報告^[43]があるものの、精製した膜面分の回収率を補正できていないため、細胞膜上で機能する標的タンパク質の分子数を過小評価している可能性が高い。本研究において参照した whole-cell 電流量から求めたチャンネル分子数は、従来法と比較して細胞膜上の機能性タンパク質の分子数を極めて良好に推定できていると考えられる。

OATP2B1 介在性 E3S 輸送キネティクスパラメータに関して、今回得られた K_m 値 (9.02 μM) は過去の当研究室における plate 法を用いた濃度依存的な E3S 取り込みの結果 (21.5 μM)^[44]と概ね同等であった。このことから、BK channel を外来的に導入したことは、発現している OATP2B1 の基質輸送特性に対してほとんど影響を与えなかったと推測された。

本研究で算出した OATP2B1 単分子活性と直接比較できるデータはこれまでに報告されていない。そこで、算出した OATP2B1 固有 V_{\max} 値 (4.72×10^{-20} mol/min/molecule) から、アボガドロ定数を用いた変換によって 1 秒間に OATP2B1 単分子が輸送する E3S の分子数、すなわち turnover rate (k_{cat} ; sec^{-1}) を計算すると、 474 sec^{-1} となった。これまでに OATPs の k_{cat} は報告されていないが、同じ SLC スーパーファミリーに属する OCT2 介在性の atenolol, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP), metformin 輸送と、MATE1 介在性の atenolol, MPP, metformin 輸送の k_{cat} として 2.76-1,890 (sec^{-1}) という値が報告されており^[42, 43]、本検討の結果はその範囲内であった。これらの結果は、本研究とはトランスポーターの種類および基質のどちらも異なっているため、値が必ずしも一致する必要はないが、両者の値が著しく乖離していなかったことは、本研究結果の妥当性を補強するものと考えられる。これまで、トランスポーターの turnover rate に関する研究は限られており^[45]、本手法を他のトランスポーター分子にも応用していくことで、トランスポーターの特性解明が進むと期待される。さらに各実験結果から算出したパラメータ (Q_1 , K_m , V_{\max} , 標的タンパク質絶対発現量, k_{cat}) は既報と同等であったことから、最終的に得られた固有活性は妥当であると判断した。

第五節 小括

本章では BK-2B1-HEK293 細胞を用いて BK channel 介在性 whole-cell 電流の記録、PM 画分中の標的タンパク質の絶対定量、OATP2B1 介在性基質輸送の評価を同時に実施し、細胞膜上に発現する OATP2B1 分子の絶対数を算出して OATP2B1 固有輸送活性を評価することができた。

総括

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。

第一章では、細胞膜上の OATP2B1 分子数を算出するための内標準として BK channel を選定し、両タンパク質を共発現させた細胞株を樹立した。また同細胞株を用いて、細胞膜上の全ての BK channel が活性化する電流記録条件を決定した。

第二章では、第一章で樹立した細胞株を用いて、BK channel 介在性 whole-cell 電流の記録、PM 画分中の標的タンパク質の絶対定量、OATP2B1 介在性基質輸送の評価を実施した。それぞれの実験結果は過去の報告と概ね同等であり、算出されたパラメータを統合して計算した OATP2B1 単分子あたりの基質輸送活性は妥当な値であったと考えられた。

本研究で樹立した新規評価法は、任意の評価対象へ応用可能であり、遺伝的変異や様々な翻訳後修飾によってトランスポーター機能が変動した際に、その固有活性を定量的に評価することが可能である。また本手法を用いて算出したトランスポーターの *in vitro* パラメータを、*in vivo* における当該トランスポーター介在性輸送の結果に適用させることで、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考えられる。さらに得られたトランスポーターの固有活性を *in silico* simulation に応用することで、各種トランスポーターの生体内における寄与を予測する研究の一助になると期待される。

参考文献

- [1] J. B. Schenkman and J. Ingela, "Spectral Analyses of Cytochromes P450," *Cytochrome P450 protocols*, pp. 11–18, 2006.
- [2] "The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database." <https://www.pharmvar.org/genes> (accessed Jan. 02, 2023).
- [3] K. Kurose, E. Sugiyama, and Y. Saito, "Review Population Differences in Major Functional Polymorphisms of Pharmacokinetics/pharmacodynamics-related Genes in Eastern Asians and Europeans: Implications in the Clinical Trials for Novel Drug Development," 2012, doi: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RV-111.
- [4] L. C. Czuba, K. M. Hillgren, and P. W. Swaan, "Post-translational modifications of transporters," 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.013.
- [5] B. Hagenbuch and P. J. Meier, "Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties," *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, vol. 447, pp. 653–665, 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1168-y.
- [6] Y. Shitara, K. Maeda, K. Ikejiri, K. Yoshida, T. Horie, and Y. Sugiyama, "Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption," 2012, doi: 10.1002/bdd.1823.
- [7] W. Lee, J. M. Ha, and Y. Sugiyama, "Post-translational regulation of the major drug transporters in the families of organic anion transporters and organic anion-transporting polypeptides," *Journal of Biological Chemistry*,

- vol. 295, no. 50. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., pp. 17349–17364, Dec. 11, 2020. doi: 10.1074/jbc.REV120.009132.
- [8] S. Medwid, H. R. Price, D. P. Taylor, J. Mailloux, U. I. Schwarz, R. B. Kim, and R. G. Tirona, “Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1 (OATP2B1) Genetic Variants: In Vitro Functional Characterization and Association With Circulating Concentrations of Endogenous Substrates,” *Front Pharmacol*, vol. 12, Sep. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.713567.
- [9] E. Hänggi, A. F. Grundschober, S. Leuthold, P. J. Meier, and M. v. St.-Pierre, “Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1,” *Mol Pharmacol*, vol. 70, no. 3, pp. 806–817, 2006, doi: 10.1124/mol.105.019547.
- [10] M. Hirano, K. Maeda, Y. Shitara, and Y. Sugiyama, “Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 311, no. 1, pp. 139–146, Oct. 2004, doi: 10.1124/jpet.104.068056.
- [11] A. Kunze, J. Huwyler, G. Camenisch, and B. Poller, “Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3- mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 42, no. 9, pp. 1514–1521, 2014, doi: 10.1124/dmd.114.058412.
- [12] J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, and T. Terasaki, “Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria,” *Pharm Res*, vol. 25, no. 6, pp. 1469–1483, 2008, doi: 10.1007/s11095-008-9532-4.

- [13] S. Ohtsuki, Y. Uchida, Y. Kubo, and T. Terasaki, “Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: Methodology, advantages, strategy, and prospects,” *J Pharm Sci*, vol. 100, no. 9, pp. 3547–3559, 2011, doi: 10.1002/jps.22612.
- [14] Y. Uchida, M. Tachikawa, W. Obuchi, Y. Hoshi, Y. Tomioka, S. Ohtsuki, and T. Terasaki, “A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: Application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 10, no. 1, p. 21, Jun. 2013, doi: 10.1186/2045-8118-10-21.
- [15] Y. Uchida, S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C. Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie, and T. Terasaki, “Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors,” *J Neurochem*, vol. 117, no. 2, pp. 333–345, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07208.x.
- [16] Y. Uchida, Z. Zhang, M. Tachikawa, and T. Terasaki, “Quantitative targeted absolute proteomics of rat blood-cerebrospinal fluid barrier transporters: comparison with a human specimen,” *J Neurochem*, vol. 134, no. 6, pp. 1104–1115, Sep. 2015, doi: 10.1111/jnc.13147.
- [17] K. Ishida, M. Ullah, B. Tóth, V. Juhasz, and J. D. Unadkat, “Successful prediction of in vivo hepatobiliary clearances and hepatic concentrations of rosuvastatin using sandwich-cultured rat hepatocytes, transporter-expressing cell lines, and quantitative proteomics,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 46, no. 1, pp. 66–74, Jan. 2018, doi: 10.1124/dmd.117.076539.
- [18] T. Nishimura, Y. Sano, Y. Takahashi, S. Noguchi, Y. Uchida, A. Takagi, T. Tanaka, S. Katakura, E. Nakashima, M. Tachikawa, T. Maruyama, T. Terasaki, and T. Tomi, “Quantification of ENT1 and ENT2 Proteins at the

- Placental Barrier and Contribution of These Transporters to Ribavirin Uptake,” *J Pharm Sci*, vol. 108, no. 12, pp. 3917–3922, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2019.09.005.
- [19] C. Wegler, Z. F. Gaugaz, B. T. Andersson, R. J. Wiśniewski, D. Busch, C. Gröer, S. Oswald, A. Norén, F. Weiss, S. H. Hammer, O. T. Joos, O. Poetz, B. Achour, A. Rostami-Hodjegan, E. Van De Steeg, M. H. Wortelboer, and P. Artursson, “Variability in Mass Spectrometry-based Quantification of Clinically Relevant Drug Transporters and Drug Metabolizing Enzymes,” *Mol Pharm*, vol. 14, no. 9, pp. 3142–3151, Sep. 2017, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00364.
- [20] R. Kikuchi, L. W. Chiou, R. K. Durbin, P. J. Savaryn, J. Ma, A. Riedmaier, S. M. de Moraes, G. J. Jenkins, and D. A. J. Bow, “Quantitation of plasma membrane drug transporters in kidney tissue and cell lines using a novel proteomic approach enabled a prospective prediction of metformin disposition,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 49, no. 10, pp. 938–946, Oct. 2021, doi: 10.1124/dmd.121.000487.
- [21] M. D. Harwood, M. R. Russell, S. Neuhoff, G. Warhurst, and A. Rostami-Hodjegan, “Lost in centrifugation: Accounting for transporter protein losses in quantitative targeted absolute proteomics,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 42, no. 10, pp. 1766–1772, Oct. 2014, doi: 10.1124/dmd.114.058446.
- [22] L. Y. Jan and Y. N. Jan, “Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling,” *Journal of Physiology*, vol. 590, no. 11, pp. 2591–2599, Jun. 2012. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224212.
- [23] R. Latorre, K. Castillo, W. Carrasquel-Ursulaez, V. R. Sepulveda, F. Gonzalez-Nilo, C. Gonzalez, and O. Alvarez, “Molecular determinants of BK channel functional diversity and functioning,” *Physiol Rev*, vol. 97, no. 1, pp. 39–87, 2017, doi: 10.1152/physrev.00001.2016.

- [24] G. F. Contreras, A. Neely, O. Alvarez, C. Gonzalez, and R. Latorre, “Modulation of BK channel voltage gating by different auxiliary β subunits,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 46, pp. 18991–18996, Nov. 2012, doi: 10.1073/pnas.1216953109.
- [25] B. H. Bentzen, A. Nardi, K. Calloe, L. S. Madsen, S. P. Olesen, and M. Grunnet, “The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca^{2+} -activated big-conductance K^+ channels,” *Mol Pharmacol*, vol. 72, no. 4, pp. 1033–1044, 2007, doi: 10.1124/mol.107.038331.
- [26] M. Sanchez and O. B. McManus, “Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel,” *Neuropharmacology*, vol. 35, no. 7, pp. 963–968, 1996, doi: 10.1016/0028-3908(96)00137-2.
- [27] Y. Suzuki, S. Ohya, H. Yamamura, W. R. Giles, and Y. Imaizumi, “A New Splice Variant of Large Conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) Channel α Subunit Alters Human Chondrocyte Function,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 46, pp. 24247–24260, Nov. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.743302.
- [28] Y. Imaizumi, K. Sakamoto, A. Yamada, A. Hotta, S. Ohya, K. Muraki, M. Uchiyama, and T. Ohwada, “Molecular basis of pimarane compounds as novel activators of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel α -subunit,” *Mol Pharmacol*, vol. 62, no. 4, pp. 836–846, 2002, doi: 10.1124/mol.62.4.836.
- [29] 矢島広大, “OATP1A2 および 2B1 分子種の機能評価のための発現細胞の樹立,” 慶應義塾大学薬学部卒業論文, 2018.
- [30] 片岡寛樹, “定量的標的プロテオミクスを用いた変異型 OATP1A2・OATP2B1 の輸送活性および pH 依存性の評価,” 慶應義塾大学大学院薬学研究科修士論文, 2020.

- [31] T. Morita, T. Akiyoshi, R. Sato, K. Katayama, K. Yajima, H. Kataoka, A. Imaoka, Y. Sugimoto, and H. Ohtani, “pH-dependent transport kinetics of the human organic anion-transporting polypeptide 1A2,” *Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 35, no. 2, pp. 220–227, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.dmpk.2019.12.002.
- [32] M. E. Rockman, A. G. Vouga, and B. S. Rothberg, “Molecular mechanism of BK channel activation by the smooth muscle relaxant NS11021,” *Journal of General Physiology*, vol. 152, no. 6, 2020, doi: 10.1085/jgp.201912506.
- [33] T. Morita, T. Akiyoshi, T. Tsuchitani, H. Kataoka, N. Araki, K. Yajima, K. Katayama, A. Imaoka, and H. Ohtani, “Inhibitory Effects of Cranberry Juice and Its Components on Intestinal OATP1A2 and OATP2B1: Identification of Avicularin as a Novel Inhibitor,” *J Agric Food Chem*, vol. 70, no. 10, pp. 3310–3320, Mar. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c00065.
- [34] Y. G. Ma, L. Dong, X. L. Ye, C. L. Deng, J. H. Cheng, W. C. Liu, J. Ma, Y. M. Chang, M. J. Xie, “Activation of cloned BKCa channels in nitric oxide-induced apoptosis of HEK293 cells,” *Apoptosis*, vol. 15, no. 4, pp. 426–438, Apr. 2010, doi: 10.1007/s10495-009-0423-x.
- [35] Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, K. Ohmine, R. Iwase, and T. Terasaki, “Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks,” *Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 30, no. 2, pp. 205–208, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.dmpk.2014.11.002.
- [36] T. Masuda, M. Tomita, and Y. Ishihama, “Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis,” *J Proteome Res*, vol. 7, no. 2, pp. 731–740, Feb. 2008, doi: 10.1021/pr700658q.

- [37] N. Araki, T. Morita, T. Akiyoshi, H. Kataoka, K. Yajima, K. Katayama, A. Imaoka, and H. Ohtani, “Comparison of the inhibitory properties of the fruit component naringenin and its glycosides against OATP1A2 genetic variants,” *Drug Metab Pharmacokinet*, p. 100464, May 2022, doi: 10.1016/j.dmpk.2022.100464.
- [38] L. L. Scott, E. J. Brecht, A. Philpo, S. Iyer, N. S. Wu, S. J. Mihic, R. W. Aldrich, J. Pierce, and J. P. Walton, “A novel BK channel-targeted peptide suppresses sound evoked activity in the mouse inferior colliculus,” *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Feb. 2017, doi: 10.1038/srep42433.
- [39] P. K. Ahring, D. Strøbæk, P. Christophersen, S. P. Olesen, and T. E. Johansen, “Stable expression of the human large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel α - and β -subunits in HEK293 cells,” *FEBS Lett*, vol. 415, no. 1, pp. 67–70, Sep. 1997, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01096-X.
- [40] Y. Sano, T. Mizuno, T. Mochizuki, Y. Uchida, M. Umetsu, T. Terasaki, and H. Kusuhara, “Evaluation of organic anion transporter 1A2-knock-in mice as a model of human blood-brain barrier,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 46, no. 11, pp. 1767–1775, Nov. 2018, doi: 10.1124/dmd.118.081877.
- [41] K. Sasaki, M. Tachikawa, Y. Uchida, S. Hirano, F. Kadowaki, M. Watanabe, S. Ohtsuki, and T. Terasaki, “ATP-Binding Cassette Transporter A Subfamily 8 Is a Sinusoidal Efflux Transporter for Cholesterol and Taurocholate in Mouse and Human Liver,” *Mol Pharm*, vol. 15, no. 2, pp. 343–355, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00679.
- [42] X. Zhang and S. H. Wright, “Transport Turnover Rates for Human OCT2 and MATE1 Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23031472.

- [43] J. Yin, H. Duan, Y. Shirasaka, B. Prasad, and J. Wang, “Atenolol renal secretion is mediated by human organic cation transporter 2 and multidrug and toxin extrusion proteins,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 43, no. 12, pp. 1872–1881, Dec. 2015, doi: 10.1124/dmd.115.066175.
- [44] 木村早百合, “OATP2B1 genetic variants 間における阻害剤感受性の差異,” 慶應義塾大学大学院薬学研究科修士論文, 2021.
- [45] P. Matsson, L. A. Fenu, P. Lundquist, J. R. Winiewski, M. Kansy, and P. Artursson, “Quantifying the impact of transporters on cellular drug permeability,” *Trends Pharmacol Sci*, vol. 36, no. 5, pp. 255–262, May 2015, doi: 10.1016/J.TIPS.2015.02.009.

本博士論文の内容の一部は、以下の学術論文として報告した。

Kodai Yajima, Takeshi Akiyoshi, Kazuho Sakamoto, Yoshiaki Suzuki, Takayuki Oka, Ayuko Imaoka, Hisao Yamamura, Junko Kurokawa, and Hisakazu Ohtani. “Determination of single-molecule transport activity of OATP2B1 by measuring the number of transporter molecules using electrophysiological approach” *Journal of Pharmacological Sciences*, 153 (3): 153-160, 2023.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました、恩師大谷壽一教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の副査をしていただきました、三澤日出巳教授、鈴木岳之教授、米澤淳教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご助言をいただきました、秋好健志講師、今岡鮎子助教に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、BK channel 介在性電流の観測に際してご指導、ご助言を賜りました、静岡県立大学薬学部の黒川洵子教授、坂本多穂准教授、また Nanion Technologies Japan の岡貴之社長に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、BK channel プラスミドの供与を賜りました、名古屋市立大学薬学部の山村寿男教授、鈴木良明講師に深く感謝いたします。

本研究の遂行に協力を頂きました、博士課程三年の片岡寛樹さん、博士課程二年の辻井一成さんに厚く御礼申し上げます。

そして、平素の研究生活において、あらゆる面でお世話になった臨床薬物動態学講座・病院薬剤学教室の皆様、卒業生の土谷聡耀博士、森田時生博士、佐藤稜さんに心より御礼申し上げます。

最後に、これまで支えていただいた両親と、私生活を支えてくれた藤原桃子さんに深く感謝いたします。