

ABC Transporter Membranes を用いた ATPase アッセイ

本プロトコールは、以下の ABC Transporter Membranes を用いた ATPase アッセイのプロトコールです。

Human MDR1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0015)
Mouse Mdr1a Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0004)
Mouse Mdr1b Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0016)
Human MRP1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0010)
Rat Mrp1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0011)
Dog Mrp1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0017)
Human MRP2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0001)
Rat Mrp2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0002)
Dog Mrp2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0014)
Monkey Mrp2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0018)

目次

1. ABC Transporter Membranes	3
2. ATPase アッセイの概要	3
2.1. ATPase アッセイの原理	3
2.2. ATPase アッセイ操作手順概略	3
2.3. アッセイに影響を及ぼす要因	3
2.4. コントロール	4
2.5. 試験化合物溶媒	4
3. ABC Transporter Membranes 製品内容	5
4. 使用機器および消耗品	5
4.1. 機器	5
4.2. 消耗品	5
5. ATPase アッセイ手順	6
5.1. プレートレイアウト	6
5.2. 溶液の調製	6
5.2.1. stock 溶液	6
5.2.2. リアクションバッファー	8
5.2.3. リン酸標準液の希釈系列	9
5.2.4. 3 mM オルトバナジン酸溶液	9
5.2.5. 12 mM MgATP 溶液	9
5.2.6. 試験化合物溶液	9
5.2.7. DMSO 溶液	9
5.2.8. ABC Transporter Membranes 希釈液	9
5.3. アッセイ操作	9
6. データ解析	10
6.1. データ解析方法	10
6.2. データ解析例	11
6.2.1. リン酸標準直線	11
6.2.2. 無機リン酸量 (nmol)	11
6.2.3. 無機リン酸量 平均値 (nmol)	12
6.2.4. 無機リン酸生成量 (nmol)	12
6.2.5. オルトバナジン酸感受性 ATPase 活性 (nmol Pi /min/mg protein)	12

1. ABC Transporter Membranes

ATPase アッセイ用 ABC Transporter Membranes (GenoMembrane) は、ABC transporter をバキュロウイルス発現系により昆虫細胞 Sf9 で発現させ、同細胞より調製した細胞膜画分です。

以下のプロトコールは、以下の製品を対象としたプロトコールです。

Human MDR1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0015)
Mouse Mdr1a Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0004)
Mouse Mdr1b Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0016)
Human MRP1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0010)
Rat Mrp1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0011)
Dog Mrp1 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0017)
Human MRP2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0001)
Rat Mrp2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0002)
Dog Mrp2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0014)
Monkey Mrp2 Membranes	(GenoMembrane, Cat. No. GM0018)

2. ATPase アッセイの概要

2.1. ATPase アッセイの原理

ABC transporter は、ATP 加水分解エネルギーを駆動力として、基質となる物質を細胞内から細胞外へと排出します。ABC transporter は、基質化合物と相互作用することにより ATPase 活性の上昇を示すことから、ATP の加水分解の結果生じた無機リン酸量 (Pi) を定量することにより、ABC transporter と化合物の相互作用を評価することができます。

なお、本方法は、Sarkadi et al., *J. Biol. Chem.* 267:4854 (1992) の方法を改変したものです。

2.2. ATPase アッセイ操作手順概略

ABC Transporter Membranes および試験化合物を含むアッセイ用混合液に、MgATP を加え、一定時間反応させます。SDS で反応停止後、無機リン酸発色検出試薬を加え、発色反応をおこないます。吸光度から無機リン酸量を算出し、ABC transporter 由来の ATPase 活性を求めます。

2.3. アッセイに影響を及ぼす要因

ATPase アッセイで求めた無機リン酸量が、全て ABC transporter による ATP の加水分解に由来するものではありません。ABC transporter 以外の無機リン酸供給源として以下の項目が挙げられます。

・ 反応溶液そのものに由来するもの

無機リン酸が MgATP や ABC Transporter Membranes に、わずかに含まれている可能性が考えられます。

・ オルトバナジン酸非感受性 ATPase 活性に由来するもの

ABC transporter の ATPase 活性は、オルトバナジン酸により阻害されることが知られています。ABC Transporter Membranes は、オルトバナジン酸により阻害されない ATPase 活性 (= オルトバナジン酸非感受性 ATPase 活性; orthovanadate-insensitive ATPase activity) を有しています。ABC transporter に由来する ATPase 活性は、ABC Transporter Membranes の全 ATPase 活性から、オルトバナジン酸非感受性 ATPase 活性を差し引いたオルトバナジン酸感受性 ATPase 活性 (orthovanadate-sensitive ATPase activity) として求めることができます。

・ 内因性のオルトバナジン酸感受性 ATPase 活性に由来するもの

ABC Transporter Membranes は、目的とする ABC transporter 以外に昆虫細胞 Sf9 細胞膜に由来する内因性のオルトバナジン酸感受性 ATPase 活性 (orthovanadate-sensitive ATPase activity) を微量に有しています。詳細な検討をおこなう場合には、Control Membranes (GenoMembrane, Cat. No. GM0003) を用いた比較測定を推奨します。

2.4. コントロール

本アッセイにおいては、適切なコントロールアッセイを並行しておこなうことが重要です。アッセイに際しては、まず以下のコントロールを推奨します。

1. no compound control

試験化合物を加えない ABC transporter 非活性化状態での ATPase 活性を求めるためのコントロールアッセイです。

2. positive control

ABC transporter の ATPase 活性をはっきり上昇させることが知られている化合物を添加した状態でのコントロールアッセイです。human MDR1、mouse Mdr1a および mouse Mdr1b の場合には 50 μ M verapamil、human MRP1、rat Mrp1 および dog Mrp1 の場合には 10 mM NEM-GS、human MRP2、rat Mrp2、dog Mrp2 および monkey Mrp2 の場合には 1 mM probenecid、を推奨します。

3. background control

ABC transporter の ATPase 反応開始前に (MgATP 添加前に) 停止液を加え、酵素活性を失活させた状態で反応をおこなうコントロールアッセイです。反応液に由来する無機リン酸量を求めるためにおこないます。

また、コントロールアッセイも含めた各測定について、オルトバナジン酸感受性 ATPase 活性を求めるために、オルトバナジン酸添加・未添加両方で測定をおこないます。

2.5. 試験化合物溶媒

本プロトコールでは、試験化合物の溶媒として DMSO を用い、最終濃度を 2% とした場合について記載しております。反応条件を揃えるため、全ての反応ウェルに 2% DMSO を添加した状態でアッセイをおこないます。DMSO については 2% まで、エタノール、メタノール、アセトニトリルについては 1% まで ATPase 活性に有意な影響を及ぼさないこと

を確認しています。

3. ABC Transporter Membranes 製品内容

- ABC Transporter Membranes 凍結品 (5 mg/ml × 500 µl)
- 製品データシート

4. 使用機器および消耗品

4.1. 機器

- 37 ウォーターバスまたは、インキュベーター
- マイクロピペッター (20, 200, 1000 µl)、マルチチャンネルピペッター (20 ~ 200µl)
- マイクロプレートリーダー (630 ~ 850 nm での吸光度測定が可能なもの)

4.2. 消耗品

- ピペット、チップ
- 希釈、調製用の容器 (チューブなど)
- 96-well マイクロタイタープレート
ポリスチレンプレート F96 (#269620, Nunc) 蓋別売り (#269620, Nunc)

*本試験における最終液量は 290 µl

となりますので、96-well マイクロタイタープレートはウェル容量 400 µl のものをお使いいただくことを推奨しております。

5. ATPase アッセイ手順

以下の手順は、試験化合物濃度依存性を検討する場合の標準的な手順です。

5.1. プレートレイアウト

リン酸標準液		試験化合物濃度 (μM)							no compound control	positive control	background control	
		1	3	10	30	100	300	1000				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 nmol	0 nmol										
B	3 nmol	3 nmol										
C	6 nmol	6 nmol								no compound control	positive control	background control
D	15 nmol	15 nmol										
E	30 nmol	30 nmol								no compound control	positive control	background control
F	60 nmol	60 nmol										
G	90 nmol	90 nmol										
H	120 nmol	120 nmol										

0 μM vanadate

500 μM vanadate

5.2. 溶液の調製

5.2.1. stock 溶液

溶液	調製	保存
1.7M Tris	20.594 g Tris をミリ Q 水に溶解し 100 ml とする。	4
100 mM MOPS-Tris	2.09 g MOPS をミリ Q 水 90 ml に溶解後、1.7 M Tris で pH 7.0 に調製する。ミリ Q 水で最終量 100 ml とする。	4
1 M KCl	7.46 g KCl をミリ Q 水に溶解し 100 ml とする。	4
2 M Sodium azide	13.0 g Sodium azide をミリ Q 水に溶解し 100 ml とする。	少量分注後、 -20
1 M DTT	3.085 g DTT をミリ Q 水に溶解し 20 ml とする。	少量分注後、 -20
10 % SDS	10 g SDS をミリ Q 水に溶解し 100 ml とする。	室温
1 M NaH₂PO₄	1.56 g NaH ₂ PO ₄ をミリ Q 水に溶解し 10 ml とする。	少量分注後、 -20
10 mM NaH₂PO₄ (10 mM リン酸標準液)	1 M NaH ₂ PO ₄ 溶液 20 μl にミリ Q 水 1,980 μl を加え、10 mM NaH ₂ PO ₄ 溶液とする。	-20

100 mM Sodium orthovanadate (100mM オルトバナジン酸) ()内は、20ml 調製の場合。	120 mM 程度の Sodium orthovanadate を調製する。 (Sodium orthovanadate 0.3678g をミリ Q 水に溶解し、16 ml とする。) 1 N HCl を加えて、pH 10 にする。 100 で 10 分間ボイルする。 室温になるまで静置する。 pH を確認する。 *pH 10 以上または以下であれば、1 N HCl または 1N NaOH で、pH 10 にする。 100 mM になるようにミリ Q 水でメスアップする。 (最終量 20 ml になるようにメスアップする。) 少量ずつ分注後、-20 保存。	少量分注後、 -20
400 mM MgCl₂	MgCl ₂ 4.066 g をミリ Q 水 50 ml に溶解する。	室温
200 mM MgATP	Na ₂ ATP として 2.21 g を 400 mM MgCl ₂ 10 ml に溶解し、1.7 M Tris で pH 7.0 に調製後、ミリ Q 水で最終量 20 ml にする。	少量分注後、 -20
15 mM Zinc acetate	Zinc acetate 0.165 g をミリ Q 水 50 ml に溶解する。	4 , 2 週間以内の使用を推奨 (長期保存の場合は -20)
35 mM Ammonium molybdate/15 mM Zinc acetate	Ammonium molybdate 0.865 g を 15 mM Zinc acetate 20 ml に溶解する。	4 (暗所), 1 週間以内の使用を推奨
10% Ascorbic acid (pH 5.0)	Ascorbic acid 2 g をミリ Q 水 15 ml に溶解し、10 N NaOH を加えて (約 1 ml 程度) pH 5.0 に調製後、ミリ Q 水で最終量 20 ml にする。	用時調製
10 mM Verapamil hydrochloride	10 mM となるように Verapamil hydrochloride を DMSO に溶解する。	少量分注後、 -20
50 mM Probenecid	50 mM となるように Probenecid を DMSO に溶解する。	少量分注後、 -20
300 mM Glutathione	Glutathione 0.922 g をミリ Q 水 8 ml に溶解し、10 N NaOH を加えて pH 6.8 に調製後、ミリ Q 水で最終量 10 ml にする。	少量分注後、 -20
300 mM N-Ethylmaleimide (NEM)	NEM 0.375 g を 100 mM MOPS-Tris 10 ml に溶解する。	少量分注後、 -20
150 mM NEM-GS	300 mM NEM と 300 mM Glutathione を等量混合する。	用時調製

5.2.2. リアクシヨソバツファア

溶液	添加量	最終濃度
100 mM MOPS-Tris	25 ml	50 mM
100 mM EGTA	0.050 ml	0.1 mM
1 M KCl	2.5 ml	50 mM
2 M Sodium azide	0.125 ml	5 mM
1 M DTT	0.1 ml	2 mM
Ouabain	29.2 mg	1 mM
ミリ Q 水		
最終量	50 ml	

5.2.3. リン酸標準液の希釈系列

10 mM リン酸標準液をリアクションバッファーで 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM に希釈する。

	混合量							
	0	5	10	25	50	100	150	200
10 mM NaH ₂ PO ₄ (μl)	0	5	10	25	50	100	150	200
リアクションバッファー量 (μl)	1000	995	990	975	950	900	850	800
リン酸終濃度 (mM)	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0
60 μl 中のリン酸量 (nmol)	0	3	6	15	30	60	90	120

5.2.4. 3 mM オルトバナジン酸溶液

リアクションバッファー 3880 μl に、100 mM オルトバナジン酸 120 μl を加え、3 mM オルトバナジン酸溶液を調製し、氷上に置く。

5.2.5. 12 mM MgATP 溶液

リアクションバッファー 4700 μl に、200 mM MgATP 300 μl を加え、12 mM MgATP 溶液を調製し、氷上に置く。

5.2.6. 試験化合物溶液

まず、終濃度の 50 倍濃度の試験化合物 DMSO 溶液を調製する。例えば上記 5.1 に示したプレートアウトのように試験化合物の最終濃度 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 μM で測定する場合、0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 mM の DMSO 溶液を調製することになる。次に、この各濃度に調製された試験化合物 DMSO 溶液 12 μl をリアクションバッファー 188 μl に加えよく混ぜ、氷上に置く。最終濃度の 3 倍濃度 (DMSO は 6%) の試験化合物溶液ができたことになる。

Positive Control 用化合物 (2.4.に記載) も同様に調製する。

5.2.7. DMSO 溶液

no compound control と back ground control 用に、DMSO 24 μl をリアクションバッファー 376 μl に加え、6% DMSO 溶液を調製する。

5.2.8. ABC Transporter Membranes 希釈液

ABC Transporter Membranes (5 mg /ml) 350 μl をリアクションバッファー 525 μl に加え、2 mg/ml の ABC Transporter 希釈液を調製し氷上に置く。攪拌については、ピペティングあるいは転倒攪拌とし、ボルテックス使用は避ける。

5.3. アッセイ操作

本試験における反応液量: 60 μL/well (発色液等を加えた全液量 : 290 μL/well)

1. 測定に用いる 96 ウェルプレートを氷上に置く。
2. 5.2.3 で調製した 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM の各リン酸標準液を、プレートの第 1, 2 列目の行 A ~ H にプレートレイアウトに従って 60 μ l ずつ加える (以下同様に、各溶液を加える位置については、上記 5.1. プレートレイアウトを参照のこと)。
3. 5.2.8 で調製した ABC Transporter Membranes を第 3 ~ 12 列目の行 A ~ H に 10 μ l ずつ加える。
4. 5.2.6 で調製した 3 倍濃度の試験化合物溶液を第 3 ~ 9 列目の行 A ~ H に 20 μ l ずつ加える。
5. 5.2.7 で調製した 6 % DMSO 溶液を第 10 列目と第 12 列目の行 A ~ H に 20 μ l ずつ加える。
6. 5.2.6 で調製した 3 倍濃度の positive control 化合物溶液を第 11 列目の行 A ~ H に 20 μ l ずつ加える。
7. 10% SDS を第 12 列目の行 A ~ H に 30 μ l ずつ加える。
8. リアクションバッファーを第 3 ~ 12 列目の行 A ~ D に 10 μ l ずつ加える。
9. 5.2.4 で調製した 3 mM オルトバナジン酸溶液を第 3 ~ 12 列目の行 E ~ H に 10 μ l ずつ加える。
10. プレートを軽く振とうし、ウェル内の溶液を混合する。
11. プレートに蓋をして 37 °C で 3 分間、プレインキュベートする。
12. マルチチャンネルピペッターを用い、5.2.5 で調製した 12 mM MgATP 溶液を、第 3 ~ 12 列目の行 A ~ H に 20 μ l ずつ加えて、プレートを振とうして混合し、反応を開始する。この時の反応液量は 60 μ l/well となる。
13. プレートに蓋をして 37 °C で 60 分間 (Human MRP1 Membranes, Rat Mrp1 Membranes, Dog Mrp1 Membranes, Human MRP2 Membranes, Rat Mrp2 Membranes, Dog Mrp2 Membranes, Mouse Mdr1b Membranes, Monkey Mrp2 Membranes) または 30 分間 (Human MDR1 Membranes, Mouse Mdr1a Membranes) 保温する。
14. マルチチャンネルピペッターを用い、10% SDS を background control を除く全てのウェル (第 1 ~ 11 列目の行 A ~ H) に 30 μ l ずつ加え、反応を停止させる。
15. 5.2.1 で調製した 10% Ascorbic acid 20 ml に、同じく 5.2.1 で調製した 35 mM Ammonium molybdate / 15 mM Zinc Acetate 5 ml を加えて混合し、マルチチャンネルピペッターを用い、全てのウェル (第 1 ~ 12 列目の行 A ~ H) に 200 μ l ずつ加える。この時の全液量は 290 μ l/well となる。
16. プレートに蓋をして、37 °C で 20 分間発色反応させた後、630 ~ 850 nm で吸光度を測定する。

6. データ解析

6.1. データ解析方法

1. リン酸標準液の吸光度測定値から、リン酸標準直線を作成し、リン酸量と吸光度の相関式を得る。

- 得られたリン酸量と吸光度の相関式より、他のウェルにおける無機リン酸量を求める。
- 各測定ポイントの無機リン酸量の平均値を求める。
- オルトバナジン酸未添加ウェルの平均値から、オルトバナジン酸添加ウェルの平均値を引き、オルトバナジン酸感受性ATPase活性による無機リン酸生成量を求める。
- 算出された無機リン酸生成量から次式によりオルトバナジン酸感受性 ATPase 活性 (nmol Pi/min/mg protein) を求める。

オルトバナジン酸感受性 ATPase 活性 (nmol Pi /min/mg protein)

$$= \text{無機リン酸生成量 (nmol)} \div \text{反応時間 (min)} \div \text{タンパク量 (mg)}$$

(例) 使用したタンパク量が 2 mg/ml⁽¹⁾ × 10 μl⁽²⁾ = 20 μg (= 0.02 mg)、反応時間が 60 min、無機リン酸生成量が 15 nmol だった場合、15 ÷ 60 ÷ 0.02 = 12.5 nmol Pi/min/mg protein となる。

⁽¹⁾ATPase アッセイ手順 5.2.8 で調製した ABC Transporter Membranes 希釈液のタンパク質濃度

⁽²⁾ABC Transporter Membranes 希釈液の添加量

6.2. データ解析例

- 吸光度測定データ

リン酸標準液	試験化合物濃度(μM)								no compound control	positive control	background control	
	1	3	10	30	100	300	1000					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.060	0.065	0.525	0.688	0.820	0.868	0.857	0.926	0.928	0.370	0.773	0.163
B	0.113	0.109	0.521	0.716	0.858	0.895	0.886	0.924	0.909	0.373	0.800	0.163
C	0.155	0.156	0.558	0.734	0.843	0.896	0.844	0.942	0.915	0.378	0.848	0.155
D	0.305	0.302	0.563	0.744	0.898	0.889	0.865	0.950	0.900	0.357	0.769	0.160
E	0.557	0.551	0.307	0.311	0.323	0.305	0.309	0.328	0.318	0.312	0.298	0.163
F	1.040	1.023	0.301	0.309	0.317	0.309	0.306	0.319	0.320	0.322	0.299	0.156
G	1.487	1.462	0.307	0.315	0.296	0.312	0.308	0.315	0.317	0.315	0.305	0.158
H	1.932	1.869	0.308	0.320	0.325	0.313	0.308	0.310	0.324	0.305	0.307	0.155

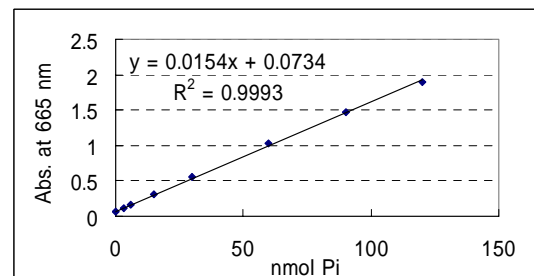
0 μM vanadate
500 μM vanadate

6.2.1. リン酸標準直線

- リン酸標準直線の作成

nmol Pi(x)	Abs.(y)
0	0.063
3	0.111
6	0.156
15	0.304
30	0.554
60	1.032
90	1.475
120	1.901

リン酸標準直線
 $y = 0.0154x + 0.0734$
 $R^2 = 0.9993$
 (Abs. at 665 nm)



6.2.2. 無機リン酸量 (nmol)

上記無機リン酸標準直線から無機リン酸量を算出。

	試験化合物濃度(μM)								no compound control	positive control	background control
	1	3	10	30	100	300	1000				
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	29.325	39.909	48.481	51.597	50.883	55.364	55.494	19.260	45.429	5.818	
B	29.065	41.727	50.948	53.351	52.766	55.234	54.260	19.455	47.182	5.818	
C	31.468	42.896	49.974	53.416	50.039	56.403	54.649	19.779	50.299	5.299	
D	31.792	43.545	53.545	52.961	51.403	56.922	53.675	18.416	45.169	5.623	
E	15.169	15.429	16.208	15.039	15.299	16.532	15.883	15.494	14.584	5.818	
F	14.779	15.299	15.818	15.299	15.104	15.948	16.013	16.143	14.649	5.364	
G	15.169	15.688	14.455	15.494	15.234	15.688	15.818	15.688	15.039	5.494	
H	15.234	16.013	16.338	15.558	15.234	15.364	16.273	15.039	15.169	5.299	

0 μM vanadate
500 μM vanadate

6.2.3. 無機リン酸量 平均値 (nmol)

試験化合物濃度 (μM)							no compound control	positive control	background control
1	3	10	30	100	300	1000			
30.412	42.019	50.737	52.831	51.273	55.981	54.519	19.227	47.019	5.640
15.088	15.607	15.705	15.347	15.218	15.883	15.997	15.591	14.860	5.494

6.2.4. 無機リン酸生成量 (nmol)

試験化合物濃度 (μM)							no compound control	positive control	background control
1	3	10	30	100	300	1000			
15.325	26.412	35.032	37.484	36.055	40.097	38.523	3.636	32.159	0.146

6.2.5. オルトバナジン酸感受性 ATPase 活性 (nmol Pi /min/mg protein)

試験化合物濃度 (μM)							no compound control	positive control	background control
1	3	10	30	100	300	1000			
12.771	22.010	29.194	31.236	30.046	33.415	32.102	3.030	26.799	0.122