

MRP1、MRP2 及び MRP3 Vesicles を用いた膜小胞輸送アッセイ

本プロトコールは、以下の ABC Transporter Vesicles を用いた膜小胞輸送アッセイのプロトコールです。

Human MRP1 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0010V)
Rat Mrp1 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0011V)
Dog Mrp1 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0017V)
Human MRP2 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0001V)
Rat Mrp2 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0002V)
Dog Mrp2 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0014V)
Monkey Mrp2 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0018V)
Human MRP3 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0021V)

目次

1. イントロダクション.....	3
2. 膜小胞輸送アッセイ.....	3
3. ABC Transporter Vesicles 製品内容.....	3
4. 使用機器および消耗品.....	4
4.1. 機器.....	4
4.2. 消耗品.....	4
4.3. ラジオアイソトープ (RI) 標識基質化合物.....	4
5. 膜小胞輸送アッセイ手順.....	4
5.1. 溶液調製.....	5
5.1.1. Stock 溶液の調製.....	5
5.1.2. 反応用バッファー.....	5
5.1.3. 反応停止及び洗浄用バッファー.....	5
5.1.4. 10 mM MgATP 溶液.....	5
5.1.5. 10 mM MgAMP 溶液.....	6
5.1.6. RI 標識基質溶液の調製.....	6
5.1.7. 基質溶液 (Cold) の調製.....	6
5.2. アッセイ手順.....	6
5.3. アッセイレイアウト.....	8
6. データ解析方法.....	8

1. イントロダクション

ABC Transporter Vesicles は、膜小胞輸送アッセイ (vesicular transport assay) 用に調製された細胞膜画分です。

以下のプロトコールは、Human MRP1 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0010V)、Rat Mrp1 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0011V)、Dog Mrp1 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0017V)、Human MRP2 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0001V)、Rat Mrp2 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0002V)、Dog Mrp2 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0014V)、Monkey Mrp2 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0018V) および Human MRP3 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0021V) 製品を対象としています。

2. 膜小胞輸送アッセイ

ABC Transporter Vesicles は、バキュロウィルスを用いてABC transporter を昆虫由来 Sf9 細胞に発現させ、同細胞より分離した細胞膜画分を、膜小胞輸送実験 (vesicular transport assay) 用に調製した製品です。ABC Transporter Vesicles では、膜画分の一部が反転膜小胞 (inside-out vesicles) の構造をとっています。ABC transporter は、ATP 加水分解エネルギーを駆動力として、基質となる化合物を細胞内から細胞外へと輸送することから、反転膜小胞では反応溶液中の基質を小胞内へと輸送します。HPLC や LC/MS/MS 等を用いた定量法、あるいはラジオアイソトープや蛍光標識された化合物を用いることにより、小胞内に輸送された化合物を検出することで、ABC transporter の輸送活性を直接、評価することが可能です。

本プロトコールでは、MRP1、MRP2 及び MRP3 の代表的な輸送基質である Estradiol-17- β -D-glucuronide (E_2 17 β G) を例にした、ラジオアイソトープ標識化合物を用いた膜小胞輸送アッセイをご紹介します。膜小胞内に輸送された E_2 17 β G は、フィルター過により反応液中に残った E_2 17 β G と分離後、放射活性を測定することにより定量します。

また、Glutathione が基質化合物とともに MRP1、MRP2 あるいは MRP3 により共輸送される場合があることが知られておりますので、本プロトコールでは、反応液中に Glutathione を 2 mM 添加してあります。

ご使用になる基質化合物によっては、Sf9 細胞膜内因性の輸送活性や標識化合物の非特異的な吸着などにより、バックグラウンドの測定値が高くなる場合がありますので、より詳細な検討では Control Vesicles (Cat.No. GM0003V) との比較測定を行うことを推奨いたします。

3. ABC Transporter Vesicles 製品内容

- MRP1 Vesicles 凍結品 (5 mg/ml, Cat.No. GM0010V, GM0011V, GM0017V)、MRP2 Vesicles 凍結品 (5 mg/ml, Cat.No. GM0001V, GM0002V, GM0014V, GM0018V) あるいは

は MRP3 Vesicles 凍結品 (5 mg/ml, Cat.No. GM0021V)

* 各 1 製品あたり約 **50 反応分**ご利用いただけます。

- 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
- マイクロピペット
- 吸引ろ過装置一式
- 液体シンチレーションカウンター
- 乾燥器

4.2. 消耗品

- ピペット、チップ
- 希釈、調製及び反応用の容器 (チューブなど)
- ガラス繊維フィルター (Whatman #1825-025, Millipore #APFF02500 など) あるいは 96 ウェルガラス繊維フィルタープレート (Whatman #7700-4303, Millipore #MAFBN0B など)
- 液体シンチレーションカクテルおよび測定用バイアル

4.3. ラジオアイソトープ (RI) 標識基質化合物

1 mCi/ml [³H]E₂17βG (PerkinElmer #NET-1106, America Radiolabeled Chemicals #ART1320 など)

5. 膜小胞輸送アッセイ手順

以下の手順は、代表的な基質である E₂17βG を用いて、MRP1、MRP2 及び MRP3 の ATP 依存的な輸送活性を確認する場合の標準的な手順です。

アッセイレイアウト 5.3. のように ATP 依存的輸送活性を N=4 で測定する場合を例にしてありますが、容量等は、ご使用の際の実験内容にあわせて、適宜調整してください。

【E₂17βG 最終濃度】 MRP1 Vesicles を用いる試験 : **10 μM**
MRP2 Vesicles を用いる試験 : **50 μM**
MRP3 Vesicles を用いる試験 : **1 μM**

5.1. 溶液調製

5.1.1. Stock 溶液の調製

溶液	調製	保存
1.7 M Tris	20.594 g の Tris をミリ Q 水に溶解し 100 ml とする。	4
100 mM MOPS-Tris	2.09 g の 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 の KCl をミリ Q 水に溶解し 100 ml とする。	4
1 M MgCl₂	10.165 g の MgCl ₂ をミリ Q 水に溶解し 50 ml とする。	室温
200 mM MgATP	Na ₂ ATP として 2.21 g をミリ Q 水 10 ml に溶解し、1 M MgCl ₂ を 4 ml 加える。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 -20
250 mM Na₂AMP	Na ₂ AMP として 1.97 g をミリ Q 水 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 -20
200 mM Glutathione (GSH)	0.615 g の Glutathione をミリ Q 水 8 ml に溶解し、10 N NaOH で pH を 6.8 に調製後、ミリ Q 水で最終量 10 ml とする。	少量分注 -20
10 mM E₂17βG DMSO 溶液	10 mM となるように E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.5) を DMSO に溶解する。	少量分注 -20

5.1.2. 反应用バッファー

溶液	添加量	最終濃度
100 mM MOPS-Tris	5 ml	50 mM
1 M KCl	0.7 ml	70 mM
1 M MgCl₂	75 μl	7.5 mM
ミリ Q 水		
最終量	10 ml	

5.1.3. 反応停止及び洗浄用バッファー

溶液	添加量	最終濃度
100 mM MOPS-Tris	400 ml	40 mM
1 M KCl	70 ml	70 mM
ミリ Q 水		
最終量	1000 ml	

5.1.4. 10 mM MgATP 溶液

200 mM MgATP を反应用バッファーで 10 mM に希釈する。

5.1.5. 10 mM MgAMP 溶液

80 μ l の 250 mM Na₂AMP と 20 μ l の 1 M MgCl₂ を混合し、200 mM MgAMP とする（用時調製のこと）。200 mM MgAMP を反作用バッファーで 10 mM に希釈する。

5.1.6. RI 標識基質溶液の調製

【MRP1 用】40 μ Ci/ml E₂17 β G 溶液の調製

1 mCi/ml の [³H]E₂17 β G を反作用バッファーで 25 倍に希釈する。

* 反応溶液中の [³H] E₂17 β G の最終放射活性濃度は 8 μ Ci/mL となる。

【MRP2・MRP3 用】20 μ Ci/ml E₂17 β G 溶液の調製

1 mCi/ml の [³H]E₂17 β G を反作用バッファーで 50 倍に希釈する。

* 反応溶液中の [³H] E₂17 β G の最終放射活性濃度は 4 μ Ci/mL となる。

5.1.7. 基質溶液 (Cold) の調製

MRP2 用	5 mM E ₂ 17 β G DMSO 溶液	5 mM となるように 10 mM E ₂ 17 β G DMSO 溶液を DMSO で希釈する。
MRP1 用	1 mM E ₂ 17 β G DMSO 溶液	1 mM となるように 10 mM E ₂ 17 β G DMSO 溶液を DMSO で希釈する。
MRP3 用	0.1 mM E ₂ 17 β G DMSO 溶液	0.1 mM となるように 10 mM E ₂ 17 β G DMSO 溶液を DMSO で希釈する。

5.2. アッセイ手順

(1) 5 mg/ml ABC Transporter Vesicles (MRP1、MRP2 あるいは MRP3) を以下の通りに混合し、氷上で反作用チューブに 19 μ l ずつ分注する。

<ベシクル溶液>	(1 反応あたり)	(8 反応分として)
5 mg/ml ABC Transporter Vesicles	10 μ l	80 μ l
反作用バッファー	9 μ l	72 μ l
(Total	19 μ l/tube)	(Total 152 μ l)

* 阻害試験を行う場合は (2) の操作で被験化合物 (阻害剤) 溶液を添加する。(1) の反作用バッファーの添加量を調整し、1 反応あたりの反応液量を 50 μ l に合わせる。

(2) アッセイミックスを以下のとおり混合し、氷上に保存する。アッセイレイアウト 5.3. のように各 4 反応 (ATP 及び AMP 添加条件) 行う場合を例に示す。

<アッセイミックス>	(1 反応あたり)	(4 反応分として)
10 mM MgATP	20 μ l	80 μ l
あるいは 10 mM MgAMP (陰性対照)		
RI 標識基質 溶液	10 μ l	40 μ l
基質溶液 (Cold)	0.5 μ l	2 μ l
200 mM Glutathione	0.5 μ l	2 μ l
(Total	31 μ l/tube)	(Total 124 μ l)

- (3) ベシクル溶液 及び ATP あるいは AMP 含有各 アッセイミックス を、それぞれ 37 で 5 分間プレインキュベートする。
- (4) 19 μl の ベシクル溶液 が入った反应用チューブに、各 アッセイミックス を 31 μl 加えて混合し、反応を開始する。
- (5) 反应用チューブを 37 でインキュベートする。反応時間は ABC Transporter Vesicles 製品の各製品データシート上に記載。
- (6) 氷冷した反応停止用バッファーを 200 μl 加え、反応を停止させた後、吸引ろ過を行うまで氷上に置く。
- (7) 吸引ろ過 ~ 測定
 - a. ガラス繊維フィルターを使用する場合
 - i. 反応液をガラス繊維フィルターで吸引ろ過する。
 - ii. 氷冷した洗浄用バッファーでフィルターを十分洗浄する。直径 25 mm 円形フィルターの場合、10 ml \times 2 回の洗浄が適当である。
 - iii. 5.1.6. で調製した RI 標識基質溶液を、未使用のフィルターに 10 μl アプライする。このフィルターの放射活性を総放射活性とし、 $E_217\beta\text{G}$ 輸送量の計算に用いる。
 - iv. 乾燥器等でフィルターを乾燥させる。
 - v. 乾燥させたフィルターをバイアルに移し、液体シンチレーションカクテルを加える。
 - vi. 液体シンチレーションカウンターで、各フィルター上に保持された $[^3\text{H}]E_217\beta\text{G}$ の放射活性値 (cpm) を測定する。
 - b. 96 ウェルガラス繊維フィルタープレートを使用する場合
 - i. 96 ウェルガラス繊維フィルタープレートの全ウェル(使用しないウェルも含む)に 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ の洗浄用バッファーを加え、吸引ろ過する (pre-wet) 吸引効率を上げる操作として推奨している。
 - ii. マルチチャンネルピペットを用い、反応液をガラス繊維フィルタープレートに移し、吸引ろ過する。
 - iii. フィルターを氷冷した洗浄用バッファーで 200 $\mu\text{l}/\text{well} \times 5$ 回洗浄する。
 - iv. 5.1.6. で調製した RI 標識基質溶液を、未使用ウェルのフィルターに 10 μl アプライする。このフィルターの放射活性を総放射活性とし、 $E_217\beta\text{G}$ 輸送量の計算に用いる。
 - v. 乾燥器等でフィルタープレートを乾燥させる。
 - vi. 液体シンチレーションカクテルを加え、Top Count (PerkinElmer) などのマイクロプレートシンチレーションカウンターで、各フィルター上に保持された $[^3\text{H}]E_217\beta\text{G}$ の放射活性値 (cpm) を測定する。

5.3. アッセイレイアウト

反应用 チューブ 1	反应用 チューブ 2	反应用 チューブ 3	反应用 チューブ 4	反应用 チューブ 5	反应用 チューブ 6	反应用 チューブ 7	反应用 チューブ 8
ベシクル溶液 (MRP1、MRP2 あるいは MRP3) 各 19 μ l							
アッセイミックス (ATP) 各 31 μ l				アッセイミックス (AMP) 各 31 μ l			

* 各反応チューブは 96 ウェルプレートにおける 1 well に対応

6. データ解析方法

(1) 各フィルターに存在する E₂17 β G 量を以下の式から計算する。

* 各フィルターに存在する E₂17 β G 量は、反転膜小胞内に取り込まれた基質の他、反転膜及びフィルターに吸着された基質も含む。

* 総放射活性 (cpm) は、反応液中に存在する全 [³H]E₂17 β G の放射活性に相当。

$$\text{各フィルターの E}_2\text{17}\beta\text{G 量 (pmol)} = \frac{\text{各フィルターの放射活性 (cpm)}}{\text{総放射活性 (cpm)}} \times \text{1 反応液中の E}_2\text{17}\beta\text{G 存在量 (pmol)}$$

《1 反応液中の E₂17 β G 存在量》

MRP1 Vesicles を用いた試験 : 500 pmol (= 10 μ M \times 50 μ l)

MRP2 Vesicles を用いた試験 : 2500 pmol (= 50 μ M \times 50 μ l)

MRP3 Vesicles を用いた試験 : 50 pmol (= 1 μ M \times 50 μ l)

(2) MgATP を添加した反応での測定値から、MgAMP を添加した反応での測定値を差し引き、ATP 依存的な E₂17 β G 輸送量 (pmol) を求める。

(3) 算出された ATP 依存的 E₂17 β G 輸送量 (pmol) を、使用したタンパク量 (mg) および反応時間 (min) で割り、単位タンパク量および単位時間当たりの ATP 依存的 E₂17 β G 輸送量 (pmol/min/mg protein) を得る。

株式会社ジェノメンブレン

〒230-0046 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75-1

TEL: 045-508-2326

FAX: 045-504-4201

URL: <http://www.genomembrane.com>

E-mail: gm-order@genomembrane.com