

BCRP、MRP4 及び MRP8 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 製品を用いた膜小胞輸送アッセイのプロトコールです。

Rat Bcrp Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0007V)
Human BCRP Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0008V)
Human MRP4 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0012V)
Rat Mrp4 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0020V)
Human MRP8 Vesicles	(GenoMembrane, Cat. No. GM0013V)

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.....	4
5.1.1. Stock 溶液調製.....	4
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.....	5
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.....	7
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 BCRP Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0008V)、Rat Bcrp Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0007V)、Human MRP4 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0012V)、Rat Mrp4 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0020V)及び Human MRP8 Vesicles (GenoMembrane, Cat. No. GM0013V) 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 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、BCRPの代表的な輸送基質である Methotrexate (MTX)、及びMRP4・MRP8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、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基質 (MTX, E_2 17 β G) は、フィルターろ過により反応液中に残った基質 (MTX, E_2 17 β G) と分離した後、放射活性を測定することにより定量します。

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

- BCRP Vesicles 凍結品 (5 mg/ml, Cat.No. GM0007V, GM0008V)、MRP4 Vesicles 凍結品 (5 mg/ml, Cat.No. GM0012V, GM0020V)、あるいは MRP8 Vesicles 凍結品 (5 mg/ml, Cat.No. GM0013V)
* 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、調製及び反應用の容器（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

BCRP 用 : 1 mCi/ml [³H]Methotrexate (Moravek Biochemicals, #MT-701 など)

MRP4・MRP8 用 : 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 (MTX あるいは E₂17βG) を用いて、ABC Transporter Vesicles (BCRP、MRP4 及び MRP8) 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おりますが、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。

【基質及び最終濃度】 BCRP Vesicles を用いる試験：**MTX, 100 μM**
 MRP4 Vesicles を用いる試験：**E₂17βG, 10 μM**
 MRP8 Vesicles を用いる試験：**E₂17βG, 10 μM**

5.1. 溶液調製

5.1.1. Stock 溶液調製

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
【BCRP 用】 10 mM MTX DMSO 溶液	10 mM となるように MTX を DMSO に溶解する。	少量分注 -20
【MRP4・MRP8 用】 1 mM E₂17βG DMSO 溶液	1 mM となるように E ₂ 17βG Sodium Salt 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 μl の 250 mM Na₂AMP と 20 μl の 1 M MgCl₂ を混合し、200 mM MgAMP とする（用時

調製のこと)。200 mM MgAMP を反応用バッファーで 10 mM に希釈する。

5.1.6. RI 標識基質溶液の調製

【BCRP 用】 100 μ Ci/ml [3 H] MTX 溶液の調製

1 mCi/ml の [3 H]MTX をバッファーA で 10 倍に希釈する。

* 反応溶液中の [3 H]MTX の最終放射活性濃度は 20 μ Ci/ml となる。

【MRP4・MRP8 用】 20 μ Ci/ml [3 H]E₂17 β G 溶液の調製

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

* 反応溶液中の [3 H] 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

【BCRP 用】 5 mM MTX (Cold) 溶液の調製

10 mM MTX DMSO 溶液 と反応用バッファーを 1 : 1 で混和する。

【MRP4・MRP8 用】 0.5 mM E₂17 β G 溶液 (Cold) の調製

1 mM E₂17 β G DMSO 溶液 と反応用バッファーを 1 : 1 で混和する。

5.2. アッセイ手順

- (1) 5 mg/ml ABC Transporter Vesicles (BCRP、MRP4 あるいは MRP8) を以下の通りに混合し、氷上で反応用チューブに 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
反応用バッファー	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) の反応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)	1 μ l	4 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 μ l の ベシクル溶液 が入った反応用チューブに、各アッセイミックスを 31 μ l 加

えて混合し、反応を開始する。

- (5) 反作用チューブを 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 μ l 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 μ l 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、基質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、フィルター上に保持された RI 標識基質の放射活性値 (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 μ l/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 μ l/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 μ l 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、基質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。
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、フィルター上に保持された RI 標識基質の放射活性値 (cpm) を測定する。

5.3. アッセイレイアウト

反作用 チューブ 1	反作用 チューブ 2	反作用 チューブ 3	反作用 チューブ 4	反作用 チューブ 5	反作用 チューブ 6	反作用 チューブ 7	反作用 チューブ 8
ベシクル溶液 (BCRP、MRP4 あるいは MRP8) 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基質量を以下の式から計算する。

* 各フィルターに存在する基質量は、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。

* 総放射活性は、反応液中に存在する全 RI 標識基質の放射活性に相当。

$$\text{各フィルターに存在する基質量 (pmol)} = \frac{\text{各フィルターの放射活性 (cpm)}}{\text{総放射活性 (cpm)}} \times \text{1 反応液中の基質存在量 (pmol)}$$

《1 反応液中の基質存在量》

BCRP Vesicles を用いた試験：MTX 5000 pmol (= 100 μM × 50 μl)

MRP4 Vesicles を用いた試験：E₂17βG 500 pmol (= 10 μM × 50 μl)

MRP8 Vesicles を用いた試験：E₂17βG 500 pmol (= 10 μM × 50 μl)

(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 依存的な基質輸送量 (pmol) を求める。

(3) 算出された ATP 依存的基質輸送量 (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 依存的基質輸送量 (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