

ABC トランスポーター膜製品を用いた
ATPase アッセイプロトコール

本プロトコールは、以下の ABC トランスポーター膜製品と対応試薬キットを用いた ATPase アッセイ のプロトコールです。

• ABC トランスポーター膜製品

Human MDR1	(GenoMembrane, Cat. No. GM0015)
Mouse Mdr1a	(GenoMembrane, Cat. No. GM0004)
Mouse Mdr1b	(GenoMembrane, Cat. No. GM0016)
Human MRP1	(GenoMembrane, Cat. No. GM0010)
Rat Mrp1	(GenoMembrane, Cat. No. GM0011)
Dog Mrp1	(GenoMembrane, Cat. No. GM0017)
Human MRP2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0001)
Rat Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0002)
Mouse Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0022)
Dog Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0014)
Monkey Mrp2	(GenoMembrane, Cat. No. GM0018)

• 陰性対照としての ABC トランスポーター膜製品

Control	(GenoMembrane, Cat. No. GM0003)
---------	---------------------------------

ATPase アッセイ試薬の調製方法は、以下のホームページ「Buffer Preparation Protocol」をご参照下さい。

<https://www.genomembrane.com/protocol>

目次

1. ATPase アッセイ	3
1.1. 原理.....	3
1.2. ATPase アッセイ操作手順概略.....	3
1.3. アッセイに影響を及ぼす要因.....	3
1.4. コントロール.....	4
1.5. 試験化合物溶媒.....	4
2. キット内容.....	4
2.1. ABCトランスポーター膜製品.....	4
2.2. 使用試薬の準備.....	5
3. 使用機器および消耗品.....	5
3.1. 機器.....	5
3.2. 消耗品.....	5
4. ATPase アッセイの準備.....	5
4.1. プレートレイアウト.....	6
4.2. リン酸標準液の希釈系列.....	6
4.3. 3 mM オルトバナジン酸溶液.....	6
4.4. 12 mM MgATP 溶液.....	6
4.5. 試験化合物溶液.....	7
4.6. 6% DMSO 溶液.....	7
4.7. 2 mg/mL ABC トランスポーター膜製品 溶液.....	7
4.8. 検出溶液 1.....	7
4.9. 検出溶液 2.....	7
5. ATPase アッセイ手順.....	7
5.1. アッセイ操作.....	7
5.2. 陽性対照基質.....	8
6. データ解析.....	9
6.1. データ解析例.....	9
7. よくあるご質問.....	11

1. ATPase アッセイ

ABC トランスポーター膜製品を用いた ATPase アッセイは評価化合物と各トランスポーターとの相互作用を評価することが出来ます。ABC トランスポーター膜製品は、ABC トランスポーター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。

1.1. 原理

ABC トランスポーターは、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。その際に 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 トランスポーター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。

1.2. ATPase アッセイ操作手順概略

ABC トランスポーター膜製品と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溶液を加え、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 トランスポーター由来の ATPase 活性を求めます。

1.3. 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 トランスポーターによる ATP の加水分解に由来するものではありません。ABC トランスポーター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 トランスポーター膜製品に、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 トランスポーターの 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 トランスポーター膜製品は、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) も有しています。ABC トランスポーターに由来する ATPase 活性は、ABC トランスポーター膜製品の全 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 トランスポーター膜製品は、目的とする ABC トランスポーター以外に昆虫細胞 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 (GenoMembrane, Cat. No. GM0003) を用いた比較測定を推奨します。

1.4. 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. 非添加コントロール

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

2. 陽性対照

ABC トランスポーターの ATPase 活性をはっきり上昇させることが知られている典型的な基質を添加した状態でのコントロールアッセイです。**基質の種類と最終濃度については 5.2 項をご参照下さい。**

3. バックグラウンドコントロール

MgATP との ATPase 反応開始前に停止液を加え、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。

4. オルトバナジン酸コントロール

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。

1.5. 試験化合物溶媒

本プロトコルでは、試験化合物の溶媒として DMSO を使い、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。

2. キット内容

2.1. ABC トランスポーター膜製品

◆ ABC トランスポーター膜製品凍結品 (5 mg/mL、500 μ L)

1 バイアルに 2.5 mg のタンパクを含みます。 ATPase アッセイには 1 アッセイに 20 μ g のタンパクを使用します。 従って 1 バイアルで 125 アッセイが可能です。

- 保管温度 -80°C
- 有効期間は製品に添付されるデータシートに記載されています。
- 各ロットの ATPase 活性はデータシートに記載されています。

凍結融解*による影響を避けるため、繰り返し使うのであれば、必要量を小分注

することをお勧めします。

*5回までの凍結融解で ATPase 活性に差は認められておりません。

2.2. 使用試薬の準備

◆Reaction Buffer

[成分] 50 mM MOPS-Tris, 0.1 mM EGTA, 50 mM KCl, 5 mM NaN_3 ,
2 mM DTT, 1 mM ouabain

◆Orthovanadate Solution (100 mM) オルトバナジン酸ナトリウム溶液

◆MgATP Solution (200 mM)

[成分] ATP·2Na, Magnesium Chloride

◆10 mM-Phosphate Standard Solution リン酸二水素ナトリウム溶液

◆Stop Solution 10 w/v % SDS

◆Reducing Agent アスコルビン酸

◆pH-adjusting solution 10N NaOH

◆Coloring Solution 35 mM セモリブデン酸六アンモニウム四水和物溶液/15 mM 酢酸亜鉛溶液

- ・保管温度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

3. 使用機器および消耗品

3.1. 機器

- ・ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 (20~200 μL)
- ・ 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)

3.2. 消耗品

- ・ ピペット、チップ
- ・ 希釈、調製用のチューブ
- ・ 96-well マイクロタイタープレート

4. ATPase アッセイの準備

以下の手順は、試験化合物の濃度依存反応を検討する場合の標準的な手順です。

4.1. 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

4.2. リン酸標準液の希釈系列

10 mM Phosphate Standard Solution を Reaction Buffer 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
Reaction Buffer (μL)	1000	995	990	975	950	900	850	800
最終リン酸濃度 (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

4.3. 3 mM オルトバナジン酸溶液

Reaction Buffer 3880 μL に、100 mM Orthovanadate Solution 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。

4.4. 12 mM MgATP 溶液

Reaction Buffer 4700 μL に、200 mM MgATP Solution 300 μL を加え、12 mM MgATP 溶液を調製し、氷上に置く。

4.5. 試験化合物溶液

まず、最終濃度の 50 倍濃度の試験化合物 DMSO 溶液を調製する。例えば上記 4.1 に示したプレートレイアウトの場合、50 倍濃度の 0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 mM の DMSO 溶液を調製する。次に、この各濃度に調製された試験化合物 DMSO 溶液 12 μ L を Reaction Buffer 188 μ L に加え最終濃度の 3 倍濃度 (DMSO 濃度は 6%) の試験化合物溶液を調製する。この 3 倍濃度の溶液はアッセイの過程で希釈され最終濃度 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 μ M となる (最終の DMSO 濃度は 2%)。調製は良く攪拌し、氷上に置く。

陽性対照用化合物も同様に調製する。

4.6. 6% DMSO 溶液

非添加コントロールとバックグラウンドコントロール用に、DMSO 24 μ L を Reaction Buffer 376 μ L に加え、6% DMSO 溶液を調製する。

4.7. 2 mg/mL ABC トランスポーター膜製品 溶液

ABC トランスポーター膜製品 (5 mg/mL) 350 μ L を Reaction Buffer 525 μ L に加え、2 mg/mL の ABC トランスポーター膜製品溶液を調製し氷上に置く。攪拌については、ピペッティングあるいは転倒混和とする。ボルテックスミキサーは使用しない。

4.8. 検出溶液 1

アスコルビン酸 2 g に超純水 15 mL 程度加え混合する。pH-adjusting Agent を用いて pH 5.0 に調整し (約 1 mL 加える事で pH 5.0 になります) 全量が 20 mL となるように超純水を添加する。

注意：用時調製してください。

4.9. 検出溶液 2

35 mM セモリブデン酸六アンモニウム四水和物溶液/15 mM 酢酸亜鉛溶液を調製する。

注意：用時調製してください。

5. ATPase アッセイ手順

5.1. アッセイ操作

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

1. 測定に用いる 96 ウェルプレート を氷上に置く。
2. 4.2. 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 4.1. プレートレイアウトを参照のこと)。
3. 4.7. で調製した ABC トランスポーター膜製品溶液を第 3~12 列目の行 A~H に 10 μ L

ずつ加える。

4. **4.5.** 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. **4.6.** 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. **4.5.** で調製した 3 倍濃度の陽性対照化合物溶液を第 11 列目の行 A~H に 20 μ L ずつ加える。
7. Stop Solution を第 12 列目の行 A~H に 30 μ L ずつ加える。
8. Reaction Buffer を第 3~12 列目の行 A~D に 10 μ L ずつ加える。
9. **4.3.** 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. プレートを手軽く振とうし、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、**4.4.** 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 で適切な時間反応させる。各陽性対照の反応時間については **5.2.** の表を参照。
14. マルチチャンネルピペッターを用い、Stop Solution をバックグラウンドコントロール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. 検出溶液 1 (20 mL、**4.8.** で調製) に、検出溶液 2 (5 mL、**4.9.** で調製) 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。

5.2. 陽性対照基質

		陽性対照	反応時間
MDR1	Human MDR1	50 μ M Verapamil	30 分
	Mouse Mdr1a		30 分
	Mouse Mdr1b		60 分
MRP1	Human MRP1	10 mM NEM-GS	60 分
	Rat Mrp1		
	Dog Mrp1		
MRP2	Human MRP2	1 mM Probenecid	60 分
	Rat Mrp2		
	Mouse Mrp2		
	Monkey Mrp2		

6. データ解析

- リン酸標準液の吸光度測定値から検量線を作成し、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、各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 $2 \text{ mg/mL}^{(1)} \times 10 \text{ }\mu\text{L}^{(2)} = 20 \text{ }\mu\text{g} (= 0.02 \text{ mg})$ 、反応時間が 60 min、無機リン酸生成量が 15 nmol だった場合、 $15 \div 60 \div 0.02 = 12.5 \text{ nmol Pi/min/mg protein}$ となる。

⁽¹⁾ATPase アッセイ手順 4.7. で調製した ABC トランスポーター膜製品希釈液のタンパク質濃度

⁽²⁾ABC トランスポーター膜製品希釈液の添加量

6.1. データ解析例

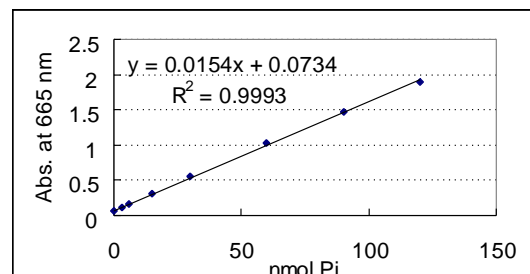
- 吸光度測定データ

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

- 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)



- 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

vanadate 0 μM
vanadate 500 μM

- 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

- 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

- 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

7. よくあるご質問

- Q1) ABC トランスポーター膜製品の保管温度は -80°C だが、凍結融解は何回程度まで ATPase 活性に影響が無いか？
- A1) 5回の凍結融解で明らかな ATPase 活性の低下は認められておりませんが凍結融解を繰り返さないために初めに必要量を小分けして -80°C に保管されることをお勧めします。
- Q2) 感度を向上させる方法がありますか？
- A2) ABC トランスポーター膜製品の量を増やすまたは反応時間を延ばすことをお勧めします。
- Q3) オルトバナジン酸感受性 ATPase 活性は ABC トランスポーターの ATPase 活性と一致するか？
- A3) ABC トランスポーター膜製品は、目的とする ABC トランスポーターの ATPase 活性以外のオルトバナジン酸感受性 ATPase 活性を微量に有しています。また試験化合物も活性に影響する可能性が有ります。そのため詳細な検討をおこなう場合には、Control Vesicle (GenoMembrane, Cat. No. GM0003) を用いた比較測定をお勧めします。
- Q4) ATPase アッセイ用に適した 96-well プレートは？
- A4) Nunc の Polystyrene plate F96; #269620 をお勧めします。

以上



GenoMembrane

〒230-0046 神奈川県横浜市鶴見区小野町 75 番地 1

TEL: 045-508-2326 FAX: 045-716-8884

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

E-mail: info@genomembrane.com