

膜小胞輸送アッセイプロトコール (RI 標識化合物)

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

- ABC Transporter Vesicle Products

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)
Human MRP3	(GenoMembrane, Cat. No. GM0021)
Human MRP4	(GenoMembrane, Cat. No. GM0012)
Rat Mrp4	(GenoMembrane, Cat. No. GM0020)
Human MRP8	(GenoMembrane, Cat. No. GM0013)
Human BCRP	(GenoMembrane, Cat. No. GM0008)
Rat Bcrp	(GenoMembrane, Cat. No. GM0007)
Human BSEP	(GenoMembrane, Cat. No. GM0005)
Rat Bsep	(GenoMembrane, Cat. No. GM0006)
Dog Bsep	(GenoMembrane, Cat. No. GM0019)

- ABC Transporter Vesicle Product for Negative Control

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

- Vesicular Transport Assay Reagent Kit

For MRPs and BCRP	(GenoMembrane, Cat. No. GM3010)
For BSEP	(GenoMembrane, Cat. No. GM3001)

ご自身で膜小胞輸送アッセイのための試薬を調製する場合はホームページから入手可能な「バッファーの調製方法」をご参照下さい。(<http://www.genomembrane.com/protocol.html>).

目次

1. 膜小胞輸送アッセイ	3
2. 製品内容	4
2.1. ABC Transporter Vesicle Products 凍結品 (5 mg/mL, 500 µL).....	4
2.2. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for MRPs and BCRP)	4
2.3. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for BSEP).....	4
3. 使用機器および消耗品	5
3.1. 機器	5
3.2. 消耗品	5
3.3. RI 標識基質化合物	5
3.4. 非標識基質化合物	5
4. 溶液調製	6
4.1. 非標識基質化合物溶液の調製	6
4.2. RI 標識基質化合物溶液の調製.....	6
5. アッセイ手順	7
6. データ解析	8
7. 推奨品	9
7.1. 消耗品	9
7.2. RI 標識化合物	9
8. 参考文献	10

1. 膜小胞輸送アッセイ

ABC Transporter Vesicle Products 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 Vesicle Products 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。小胞内に輸送された 1) ラジオアイソトープ (RI)、2) 蛍光標識された化合物あるいは 3) 非標識化合物の量を、目的に合わせた検出器、1) 液体シンチレーションカウンター、2) 蛍光プレートリーダーあるいは 3) LC-MS 参考文献などで測定することにより、小胞内に輸送された化合物の輸送活性を簡便に、直接評価することが可能です。

本プロトコルでは、RI 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。MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 および MRP8 には Estradiol-17- β -D-glucuronide (E₂17 β G) を、BCRP には Methotrexate (MTX) を、BSEP には Taurocholic acid (TCA) を使用する例をお示しします。

膜小胞内に輸送された基質は、フィルターろ過により反応液中に残った基質と分離後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定することにより定量します。

また、Glutathione が基質とともに MRP1, MRP2 および MRP4 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、本プロトコルでは、反応液中に Glutathione を終濃度 2 mM となるように添加してあります。

ご使用になる基質によっては 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 (Cat.No. GM0003) との比較測定を行うことを推奨いたします。

2. 製品内容

2.1. ABC Transporter Vesicle Products 凍結品 (5 mg/mL, 500 µL)

- 膜小胞輸送アッセイには 1 アッセイに 50 µg のタンパク質を使用します。したがって 1 製品で 50 アッセイが可能です。
 - * 保管温度 -80 °C
 - * 有効期間はデータシートに記載されています。
- 製品データシート

2.2. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for MRPs and BCRP)

- Buffer A2 : 反应用バッファー (6 mL ×1 本)
[組成] 50 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂
- 10× Buffer B2 : 10× 反応停止用および洗浄用バッファー (20 mL ×1 本)
[組成] 400 mM MOPS-Tris, 700 mM KCl
 - **Buffer B は超純水で 10 倍希釈し、アッセイまで冷やして保管ください。**
- Reagent C2 : 10 mM MgATP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- Reagent D2 : 10 mM MgAMP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- Reagent G : 200 mM Glutathione 溶液 (0.1 mL ×1 本)
 - 各試薬は-20 °C で保存ください。
 - 各試薬は、製品箱ラベル上に記載されている使用期限内に御利用下さい。

2.3. Vesicular Transport Assay Reagent Kit (for BSEP)

- Buffer A1 : 反应用バッファー (6 mL ×1 本)
【組成】 10 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO₃, 10 mM Mg (NO₃)₂, 50 mM Sucrose
- 10× Buffer B1 : 10× 反応停止用及び洗浄用バッファー (20 mL ×1 本)
【組成】 100 mM Hepes-Tris, 1000 mM KNO₃, 500 mM Sucrose
 - **Buffer B は超純水で 10 倍希釈し、アッセイまで冷やして保管ください。**
- Reagent C1 : 10 mM MgATP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
- Reagent D1 : 10 mM MgAMP 溶液 (1.3 mL ×2 本)
 - 各試薬は-20 °C で保存ください。
 - 各試薬は、製品箱ラベル上に記載されている使用期限内に御利用下さい。

以下に記載の弊社推奨アッセイ手順の場合、試薬キットは 1 キット 100 アッセイに十分な量を含んでおりますので ABC Transporter Vesicle Products 2 本に対して 1 キットとなります。

3. 使用機器および消耗品

3.1. 機器

- 37 °C ウォーターバス
- マルチチャンネルピペット
- マイクロピペット
- 吸引ろ過装置一式
- 96 ウェルプレート用パンチキット
- 乾燥機
- 液体シンチレーションカウンタ

3.2. 消耗品

- ピペット、チップ
- 希釈、調製および反応用の容器 (1.5 mL および 8 連チューブなど)
- 96 ウェルガラス繊維フィルタープレート
- 96 ウェルプレート用パンチチップ
- 液体シンチレーションカクテルおよび測定用バイアル

3.3. RI 標識基質化合物

MRP1, MRP2, MRP3 MRP4, MRP8	[³ H] Estradiol-17β-D-glucuronide (³ H-E ₂ 17βG)
BCRP	[³ H] Methotrexate (³ H-MTX)
BSEP	[³ H] Taurocholic acid (³ H-TCA)

3.4. 非標識基質化合物

MRP1, MRP2, MRP3 MRP4, MRP8	Estradiol-17β-D-glucuronide (E ₂ 17βG)
BCRP	Methotrexate (MTX)
BSEP	Taurocholic acid (TCA)

4. 溶液調製

4.1. 非標識基質化合物溶液の調製

	基質溶液	調製
MRP1 MRP4 MRP8	1 mM E ₂ 17βG in dimethylsulfoxide (DMSO)	E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.5) を DMSO で溶解し、1 mM 溶液にする。
MRP2	5 mM E ₂ 17βG in DMSO	E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.5) を DMSO で溶解し、5 mM 溶液にする。
MRP3	0.1 mM E ₂ 17βG in DMSO	E ₂ 17βG Sodium Salt (MW: 470.5) を DMSO で溶解し、0.1 mM 溶液にする。
BCRP	10 mM MTX in DMSO	MTX (MW : 454.44) を DMSO で溶解し、10 mM 溶液にする。

4.2. RI 標識基質化合物溶液の調製

	RI 基質溶液	調製
MRP1	40 μCi/mL [³ H] E ₂ 17βG (Final conc.: 8 μCi/mL)	1 mCi/mL [³ H] E ₂ 17βG を Buffer A2 で 25 倍希釈する。
MRP2 MRP3 MRP4 MRP8	20 μCi/mL [³ H] E ₂ 17βG (Final conc.: 4 μCi/mL)	1 mCi/mL [³ H] E ₂ 17βG を Buffer A2 で 50 倍希釈する。
BCRP	100 μCi/mL [³ H] MTX (Final conc.: 20 μCi/mL)	1 mCi/mL [³ H] MTX を Buffer A2 で 10 倍希釈する。
BSEP	10 μCi/mL [³ H] TCA (Final conc.: 2 μCi/mL)	1 mCi/mL [³ H] TCA を Buffer A1 で 100 倍希釈する。

5. アッセイ手順

以下は、基質化合物の ATP 依存的な輸送量を測定するための標準的な手順です。各基質化合物の最終濃度は **6. データ解析** に示しています。

反応液における各溶液の量は試験系に応じて適宜、調整してください。

- (1) 5 mg/mL ABC Transporter Vesicle Products を以下の通りに混合し、氷上で反应用チューブに 19 μ L ずつ分注する。

<u><ベシクル溶液></u>	(1 反応あたり)	(8 反応分として)
ABC Transporter Vesicle Products (5 mg/mL)	10 μ L	80 μ L
Buffer A	9 μ L	72 μ L
	(Total 19 μ L/assay)	(Total 320 μ L)

- (2) アッセイミックスを以下の通りに混合し、氷上に保存する。

<u><アッセイミックス></u>	(1 反応あたり)	(4 反応分として)
Reagent C あるいは D	20 μ L	80 μ L
RI 標準基質化合物溶液	10 μ L	40 μ L
非標識基質化合物溶液	0.5 μ L	2 μ L
(BSEP の時は Buffer A1 を用いる)		
Reagent G (試験によっては Buffer A)	0.5 μ L	2 μ L
	(Total 31 μ L/assay)	(Total 124 μ L)

◆ 阻害試験を行う場合は、目的に応じて被験化合物 (阻害剤) を (1) あるいは (2) の操作時に添加します。添加の際には Buffer A の添加量を調整し、1 反応あたりの反応液総量を 50 μ L に合わせます。

- (3) ベシクル溶液 および Reagent C あるいは D を含む各 アッセイミックス を、それぞれ 37 °C で 5 分間プレインキュベーションする。
- (4) 19 μ L 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 μ L 加えて混合し、反応を開始する。
- (5) 反应用チューブを 37 °C でインキュベーションする。反応時間は ABC Transporter Vesicle Products 製品の各製品データシートを参考にする。
- (6) 氷冷した Buffer B 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) 以下の手順で反応溶液を 96 ウェルガラス繊維フィルターで吸引ろ過する。
- 7-1) 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 Buffer B を加え、吸引ろ過する (pre-wet 操作)。吸引効率を上げる操作として推奨している。
- 7-2) 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。
- 7-3) フィルターを氷冷した Buffer B で 200 μ L/well $\times$ 5 回洗浄する。
- 7-4) 4.1. で調整した RI 標準基質化合物溶液を未使用ウェルのフィルターに 10 μ L 添加する。
- 7-5) 乾燥器等でフィルタープレートを乾燥させる。

7-6) 液体シンチレーションカクテルを加え、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放射活性値を測定する。

*** 良好な結果を得るために(6)から(7)の操作を素早く行ってください。**

- * 円形ガラス繊維フィルターを使用する場合、(7) は以下の手順に従って行ってください。
- 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 Buffer B でフィルターを十分洗浄する。
* 直径 25 mm 円形フィルター (Millipore #APFF02500, Whatman #1825-025, etc.) の場合、10 ml × 2 回の洗浄が適当である。
 - iii) 4.1. で調製した RI 標準基質化合物溶液を未使用のフィルターに 10 µL 添加する。
 - iv) 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。
 - v) 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放射活性値を測定する。

6. データ解析

- (1) 各フィルターに存在する基質量 (pmol) を以下の式を用いて計算します。

$$\text{各フィルターに存在する基質量 (pmol)} = \frac{\text{各フィルターの放射活性}}{\text{総放射活性}^{*1}} \times \frac{\text{反応溶液中の基質量 (pmol)}^{*2}}$$

*¹; 7-4) 参照

*²; 反応液中の基質量 (pmol) は以下の様になります。

	基質	最終濃度	反応溶液中の基質量
MRP1	E ₂ 17βG	10 µM	500 pmol (= 1000 µM × 0.5 µL)
MRP2	E ₂ 17βG	50 µM	2500 pmol (= 5000 µM × 0.5 µL)
MRP3	E ₂ 17βG	1 µM	50 pmol (= 100 µM × 0.5 µL)
MRP4	E ₂ 17βG	10 µM	500 pmol (= 1000 µM × 0.5 µL)
MRP8	E ₂ 17βG	10 µM	500 pmol (= 1000 µM × 0.5 µL)
BCRP	MTX	100 µM	5000 pmol (= 10000 µM × 0.5 µL)
BSEP	TCA	ロット毎に放射活性から計算する。	

- (2) MgATP を添加した反応での基質量 (pmol) から、MgAMP を添加した反応における値を差し引き、ATP 依存的な基質輸送量 (pmol) を求める。
- (3) 算出された ATP 依存的な基質輸送量 (pmol) を、使用したタンパク質量 (mg) および反応時間 (min) で割り、単位タンパク質量および単位時間当たりの ATP 依存的な基質輸送量 (pmol/min/mg protein) を得る。
- (4) 基質輸送量 (pmol/min/mg protein) を基質濃度 (µM) で除し、基質輸送容量 (µL/min/mg protein) を得る。

7. 推奨品

7.1. 消耗品

	メーカー名	製品名
96 ウェルガラス繊維フィルタープレート	Millipore	MultiScreenHTS+ Hi Flow FB Plate MultiScreenHTS-FB Plate
吸引ろ過装置	Millipore	MultiScreenHTS Vacuum Manifold
96 ウェルプレート用パンチキット	Millipore	Multiple Punch
96 ウェルプレート用パンチチップ	Millipore	Disposable Punch Tips
液体シンチレーションカクテル	PerkinElmer	UltimaGold

7.2. RI 標識化合物

MRP1, MRP2, MRP3 MRP4, MRP8	1 mCi/mL [³H] E₂17βG (PerkinElmer # NET-1106, American Radiolabeled Chemicals # ART1320 など)
BCRP	1 mCi/mL [³H] MTX (Moravek # MT701 など)
BSEP	1 mCi/mL [³H] TCA (PerkinElmer # NET-322 など)

8. 参考文献

- Iwanaga T, Nakakariya M, Yabuuchi H, Maeda T, and Tamai I. Involvement of bile salt export pump in flutamide-induced cholestatic hepatitis. *Biol Pharm Bull.* **30** (4): 739-44 (2007).
- Yabuuchi H, Tanaka K, Maeda M, Takemura M, Oka M, Ohashi R, and Tamai I. Cloning of the dog bile salt export pump (BSEP; ABCB11) and functional comparison with the human and rat proteins. *Biopharm Drug Dispos.* **29** (8): 441-8 (2008).
- Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, Yabuuchi H, and Tsuji A. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos.* **36** (6): 1088-96 (2008). ⇒LC-MS/MS analysis
- Yamaguchi K, Murai T, Yabuuchi H, and Kurosawa T. Measurement of the transport activities of bile salt export pump using LC-MS. *Anal Sci.* **25** (9): 1155-8 (2009). ⇒LC-MS analysis
- Yamaguchi K, Murai T, Yabuuchi H, and Kurosawa T. Measurement of transport activities of bile acids in human multidrug resistance-associated protein 3 using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Sci.*; **26** (3): 317-23 (2010). ⇒LC-MS/MS analysis
- van Staden CJ, Morgan RE, Ramachandran B, Chen Y, Lee PH, and Hamadeh HK. Membrane vesicle ABC transporter assays for drug safety assessment. *Curr Protoc Toxicol.* Chapter 23:Unit 23.5 (2012)
- Morgan RE, van Staden CJ, Chen Y, Kalyanaraman N, Kalanzi J, Dunn RT 2nd, Afshari CA, and Hamadeh HK. A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicol Sci.* **136** (1): 216-41 (2013)

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: 050-5548-3009

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

E-mail: info@genomembrane.com