

## 発光法によるシトクロムP450アッセイ

By James Cali, Ph.D., Promega Corporation

### アブストラクト

新しいP450-Glo™ CYP450 Assayは、発光法を採用したホモジニアスタイプのシトクロムP450活性測定システムです。本製品は、マルチウェルフォーマットでのリコンビナントあるいは天然型P450の活性測定や、薬剤や新しい化学物質などによるP450活性への影響をテストするためにデザインされています。

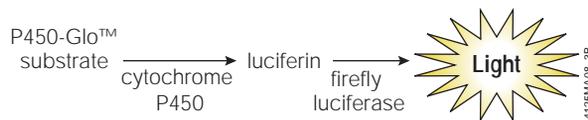


図1. P450-Glo™ アッセイの反応の概要

CYP450酵素は、P450-Glo™ 発光性基質をホタルルシフェラーゼの基質であるルシフェリンに変換。ルシフェラーゼは、ルシフェリンを利用して発光。

P450-Glo™ 発光アッセイは、優れた感度、低いバックグラウンド、広いダイナミックレンジを示します。

### はじめに

シトクロムP450 (CYP450) は、治療薬の多くが該当する多様な疎水性化学物質の酸化的代謝を触媒する酵素で、スーパーファミリーを形成しています(1)。CYP450を介する代謝は、薬剤のクリアランス、毒性、および同時に投与される薬剤との相互作用に影響を与えます。薬剤開発の現場において、研究者は新しい薬剤がどのようにCYP450によって代謝されるか、どの程度CYP450活性に変化を与えるかを見極める必要があります。この判定法の中には、既知のP450基質をプローブとして使用する方法があります(2)。有用なプローブ基質とは、CYP450酵素と反応する際に、計測可能な形で変化する化合物です。もしプローブの反応性が特定の薬剤の存在下で変化する場合、研究者はその薬剤が実際にCYP450活性に影響を与えると結論付けることができます。例えば、CYP450とプローブ基質の反応性が減衰すれば、CYP450阻害剤を容易に同定することができます。

### アッセイ原理

P450-Glo™ Assaysはルシフェラーゼ酵素の基質であるビートルルシフェリンの誘導体である、発光性のCYP450プローブ基質を使用しています。この誘導体はルシフェラーゼの基質ではありませんが、P450によってルシフェリンに変換され、ルシフェラーゼと反応してP450の活性を直接的に比例する光量を生じます(図1)。発光供与性の基質を調製した活性型CYP450とインキュベーションします(図2)。CYP450活性を停止させ、ルシフェリン検出試薬を添加することにより、ルシフェリンが検出されます。P450-Glo™ CYP450 Assaysは、特殊なバッファースystemに含まれる安定なりコンビナント型ルシフェラーゼ“Ultra-Glo™ Luciferase”を使用しており、“グロー型”の発光シグナルを発生させます。発光の半減期は2時間を超え、インジェクター付きのルミノメーターを不要とし、プレートのバッチ処理を可能にしています。また、その構成により、分析対象物質によるルシフェラーゼ阻害に起因する偽陽性の発生も最小限に抑えられます。

P450-Glo™ 発光アッセイは、広く使用されている蛍光法をベースにしたものや非光学系のCYP450アッセイに認められる多くの問題を解決します。このアッセイシステムには、下記の長所があります。

**蛍光干渉なし**：アッセイは発光法なので、蛍光法のようにテスト化合物やNADPH、シトクロムP450基質の間で励起や蛍光が交錯して分析を混乱させることはありません。

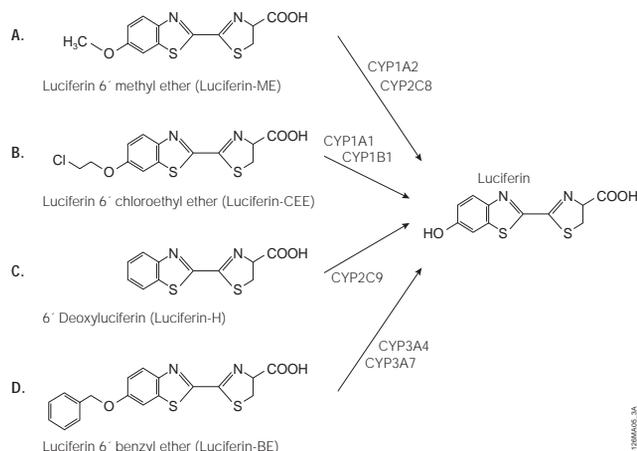


図2. CYP450酵素によるP450-Glo™ 発光性基質からルシフェリンへの変換

反応A：CYP1A2とCYP2C8の基質、ルシフェリン-ME。反応B：CYP1A1とCYP1B1の基質、ルシフェリン-CEE。反応C：CYP2C9の基質、ルシフェリン-H。反応D：CYP3A4とCYP3A7の基質、ルシフェリン-BE。

**迅速**：発光法はHPLCのような長い分析時間は不要。

**簡易性**：ホモジニアスアッセイは、マニュアル法、自動化法によるマルチウェルプレートフォーマットのハイスループットスクリーニングに最適。

**高感度**：低いバックグラウンドレベルと広いダイナミックレンジにより、典型的なHPLCや、蛍光法に比べて少量のCYP450で感度の高いアッセイが可能。

**可溶性の基質**：他の多くのCYP450プローブ基質と異なり、P450-Glo™ 基質は水溶液に対して高い溶解性を有します。

**単一計測**：1種類の測定法（発光）を用いることにより、複数の基質を用いた多種類のCYP450アイソフォームを1つの測定機材/セッティング（ルミノメーター）だけでアッセイ可能

**低偽陽性率**：特殊な安定化ホタルルシフェラーゼとルシフェラーゼアッセイ用成分を用いることで、CYP450阻害剤をスクリーニングする場合の分析対象物質によるルシフェラーゼ阻害が原因となる偽陽性の発生を最小限に抑えています。

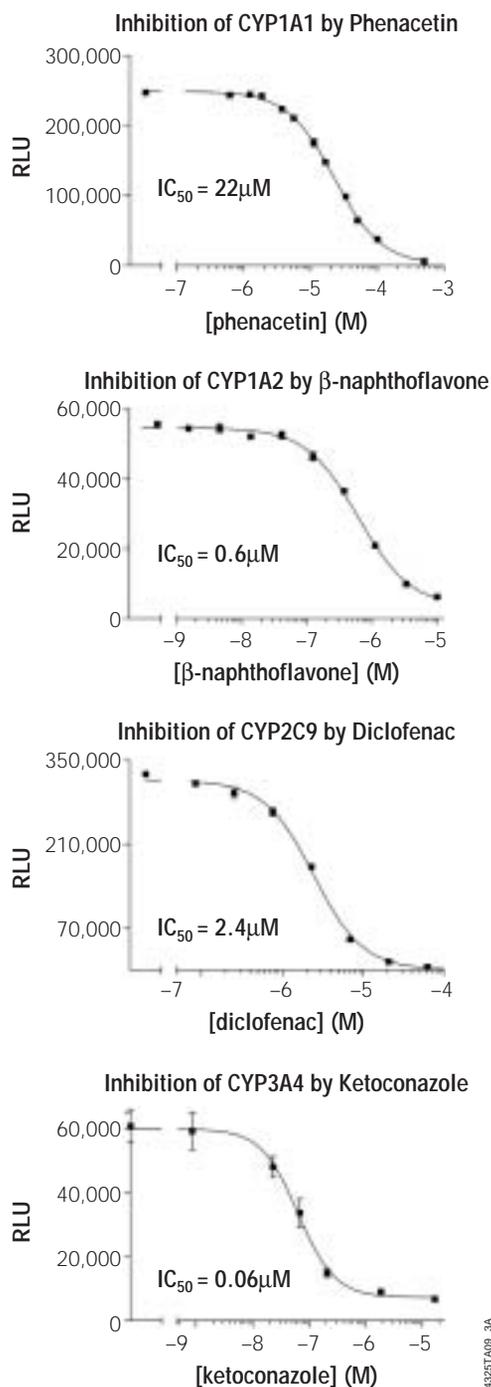


図3. P450-Glo™ アッセイを使用したCYP450阻害の測定

昆虫細胞でリコンビナント型のCYP450とCYP450還元酵素、またはCYP450還元酵素 + シトクロムb5を共発現させた。(Supersomes™ BD/Gentest, Woburn, MA) CYP450反応は、オペークホワイト、平底の96ウェルプレート (Costar®) を用い、50μlのKPO<sub>4</sub>バッファー (pH7.4) 中 37 °Cで行った。反応混合液を各ウェルに分注し、NADPH再生溶液 (BD/Gentest, Woburn, MA) を添加して反応を開始した。Luciferin Detection Reagentを添加するとCYP450活性が停止し、発光が開始された。発光はFLUOstar Optimaプレート用ルミノメーター (BMG, Inc. Durham, NC) で直接測定した。値は平均 ± 標準偏差 (n=3) で表示 (アッセイの詳細については、Technical Bulletin TB325参照)。

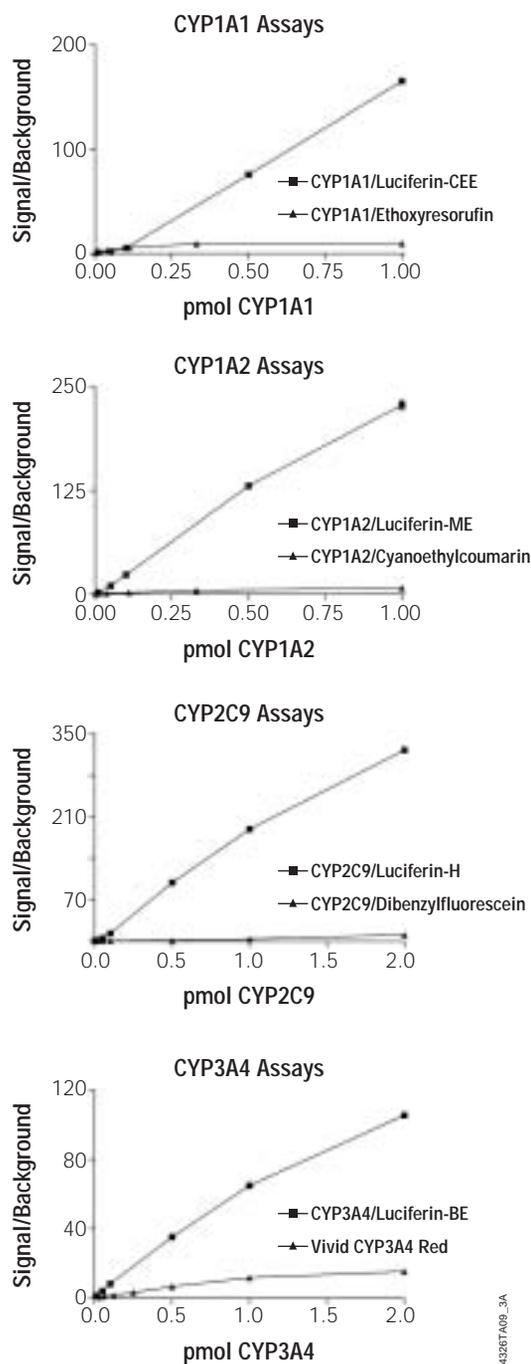


図4. P450-Glo™ 発光アッセイと蛍光アッセイとの比較

リコンビナントCYP450膜分画 (Supersomes™ BD/Gentest, Woburn, MA) を用い、蛍光基質ではK<sub>m</sub>、発光基質に対してはK<sub>m</sub>またはK<sub>m</sub>未満に最適化した条件下でCYPアッセイを行った。バックグラウンドを計測するためにCYP450活性を持たない膜分画を使用した。37 °Cで10-30分、CYP450を基質とともにインキュベーションした。値は平均 ± 標準偏差 (n=3) で表示。

P450-Glo™ Assaysは、CYP1A1、1A2、2C8、2C9、3A4、3A7、1B1など、いくつかの重要なヒトCYP450アイソフォームに使用できます。P450-Glo™ CYP1A1および1A2アッセイは、ラットCYP1A1と1A2に対しても使用可能で、CYP2C9アッセイは、ラットCYP2C6と2C11、CYP3A4アッセイはラットCYP3A1に対しても使用可能です。本製品はリコンビナントCYP450（図3）と肝ミクロゾーム中のCYP450で良好に反応します（データ未掲載）。

CYP450の重要な使用法に、CYP450阻害剤の検出が挙げられます。P450-Glo™ Assaysは、既知のCYP450阻害剤を使用することで、リコンビナントCYP450の濃度依存的阻害を検出します。図3に例示するように、P450-Glo™ 発光性基質をプローブとして使用し、CYP1A1、1A2、2C9、3A4の各阻害剤であるフェナセチン、*m*-ナフトフラボン、ジクロフェナク、ケトコナゾールによる阻害を検出します。P450-Glo™ Assaysを使用して決定されたIC<sub>50</sub>値は、通常用いられるプローブ基質を使用して得られる値（3）と近似しています。化学物質ライブラリーをスクリーニングする際には、多数のテスト化合物を1つの濃度で測定する方法を用い、特定の化合物のIC<sub>50</sub>値を測定する際には、いくらかの濃度幅で測定する方法を用いることができます。

P450-Glo™ Assaysのダイナミックレンジと感度は、通常の蛍光法より優れています。図4にP450-Glo™ Assaysと蛍光法との比較を示します。蛍光法に比べ、P450-Glo™ Assaysは高い感度と優れたシグナル：バックグラウンド比を示しました。

P450-Glo™ CYP450 Assay Systemには、水溶液バッファーの形で提供される発光性のCYP450基質、および凍結乾燥されたルシフェリン検出試薬とその再構成バッファーが含まれています。使用者は、調製したCYP450と必要な補助因子を用意する必要があります。キットは10mlと50mlのものがあります。10mlのシステムには、96ウェルプレートで1アッセイあたり50μlを使用して200アッセイ分、384ウェルプレートで1アッセイあたり25μlを使用して400アッセイ分の試薬が含まれています。一方、50mlシステムには、96ウェルプレートで1アッセイあたり50μlを使用して1000アッセイ分、384ウェルプレートで1アッセイあたり25μlを使用して2000アッセイ分の試薬が含まれています。

### おわりに

P450-Glo™ Assaysにより、迅速、高感度で優れた再現性を持つCYP450スクリーニングが可能です。このシステムは、従来行われてきた自動化、マニュアル方式のマルチウェルプレートフォーマットによるCYP450アッセイプロトコールと同様で、シングルチューブによる使用にも容易に対応できます。P450-Glo™ Assaysは、P450の研究に発光技術の一般的な長所を応用して、蛍光または非光学系のアッセイ法にとまなう多くの問題を解決します。

### 参考文献

1. Guengerich, F.P. (2001) *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–50.
2. Wienkers, L.C. and Hutzler, J.M. (2002) *Curr. Drug Disc.* 23–6.
3. Sai, Y. *et al.* (2000) *Xenobiotica* **30**, 327–43.

### プロトコル

- ◆ P450-Glo™ CYP450 Assays Technical Bulletin #TB325 ([www.promega.com/tbs/tb325/tb325.html](http://www.promega.com/tbs/tb325/tb325.html))

### 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格( ¥ )
P450-Glo™ CYP1A1 Assay	10ml	V8751	17,000
	50ml	V8752	50,000
P450-Glo™ CYP1B1 Assay	10ml	V8761	17,000
	50ml	V8762	50,000
P450-Glo™ CYP1A2 Assay	10ml	V8771	17,000
	50ml	V8772	50,000
P450-Glo™ CYP2C8 Assay	10ml	V8781	17,000
	50ml	V8782	50,000
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	10ml	V8791	17,000
	50ml	V8792	50,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay	10ml	V8801	17,000
	50ml	V8802	50,000
P450-Glo™ CYP3A7 Assay	10ml	V8811	17,000
	50ml	V8812	50,000