



発光アッセイ法を用いたシトクロムP450活性のスクリーニング

By James Cali, Ph.D., Mary Sobol, M.S., Dongping MA, M.S., Promega Corporation, And David Liu, Ph.D., Promega Biosciences

イントロダクション

シトクロムP450酵素は広範な疎水性の化学物質を酸化的に代謝する主要な触媒です (1)。P450基質のいくつかは生物に内在し、その他は生体異物として知られる外因性の化合物です。低分子治療薬は生体異物に含まれる重要なクラスの1つです。P450酵素の薬物代謝は薬物クリアランス、毒性、活性化に関わり、薬物間の有害な相互作用にも影響を及ぼすことがあります (2)。P450酵素により急速に変化するものや、毒性を持つような化合物は薬剤候補として不適切です。さらにP450ベースの薬物間相互作用は、P450酵素に対するある薬物の影響が、同時に投与された他方の薬物の体内動態を変化させる場合に起こります。例えば、P450酵素を阻害する第2の薬物を同時に投与すれば、P450酵素による第1の薬物の崩壊が遅くなってしまいます。これにより第1の薬物が毒性レベルにまで蓄積する要因となりえます。その他の例として、第2の薬物のクリアランスに対して関与するP450酵素をコードする遺伝子の発現を誘導する薬物があれば、第2の薬物の排除を加速し、その効能を低下させてしまいます。P450酵素の中心的な役割は薬物の体内動態に関連するため、P450と薬物の相互作用は精査されます。

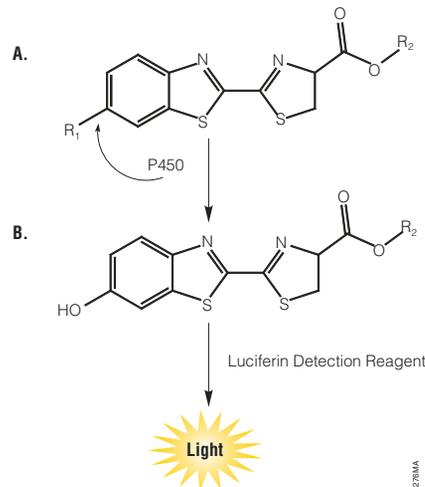


図1. P450-Glo™ の反応スキーム

AはP450-Glo™ Substrate、BはP450-Glo™ Luciferin Detection Reagentによる発光反応に利用される基質。P450-Glo™ SubstrateのP450酵素選択性はR₁およびR₂に依存する。CYP1A2 substrate: R₁ = CH₃O, R₂ = H; CYP2C9 substrate: R₁ = H, R₂ = H; CYP2C19 substrate: R₁ = H, R₂ = C₂H₄OH; CYP2D6 substrate: R₁ = CH₃O, R₂ = C₂H₄OH; CYP3A4 substrate: R₁ = O-benzyl, R₂ = H。

P450-Glo™ Assayを用いれば従来法が持つ多くの制限を回避することができます。

ヒトゲノムには推定57種類の機能的シトクロムP450遺伝子がありますが(3)、P450依存的な薬物代謝の多くはたった5種類のP450酵素が主に機能しています(4)。肝臓は薬物代謝が行われる中心的な場所であり、CYP3A4は肝臓P450酵素の主要なもので、薬物の生体内変換の約半分を行っています。また、CYP2D6は薬物の体内変換においてCYP3A4に次ぐ活性を有しており、CYP2C9、CYP1A2、CYP2C19も多くの薬物を酸化します。その他のP450酵素も薬物を代謝しますが、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP1A2、CYP2C19酵素が薬物代謝のほとんどを担っています。

低分子薬の開発では初期の薬物標的に対する膨大な化合物ライブラリースクリーニングがとれない、P450酵素に対するスクリーニングはヒット化合物の優先順位を付ける上で必須な作業です。P450酵素相互作用に関する情報を事前に各化合物へ付与することや、1次スクリーニングで得られたヒット化合物からP450酵素に対する2次スクリーニングを行うこともできます。両方のアプローチとも迅速で高いスループットを可能とする方法が求められます。汎用されるアプローチの1つとして、P450酵素による代謝後に蛍光産物を生成する基質を用いる方法があります。P450活性を変調させるテスト化合物は、蛍光産物の蓄積量への影響によって同定されます。このアプローチにはいくつかの不都合な点があり、我々は生物発光P450-Glo™ Assayをデザインする上でこれらの問題点に対処しました。

発光アッセイによるP450活性の測定

P450-Glo™ Assayでは、ホタルルシフェラーゼとその基質であるルシフェリンによる発光反応を利用しています。P450酵素の基質となるルシフェリン誘導体 (ルシフェラーゼの基質ではない) が供給されます。最初の反応ではP450酵素がこの誘導体をルシフェリンに変換し、発光を生成させるルシフェリン検出試薬による第2の反応でこれを測定します (図1)。ルシフェリン産物量とルシフェラーゼ反応により生じた発光量は比例するため、この発光はP450酵素活性の測定に利用されます。P450酵素活性を変調させるテスト化合物はルシフェリン産物の量を変化させ、これが発光反応より生じる光量として反映されます。P450酵素活性に影響を及ぼすテスト化合物の多くは阻害効果を示し、活性剤として認められるものは少数です。

最低レベルのバックグラウンドと優れた感度

P450-Glo™ Assayの発光法によるアプローチには蛍光法を凌ぐ根拠的な利点があります。例えば、蛍光法に必要な励起光はバックグラウンドシグナルを発生させ、これがアッセイ感度に限界を与えてしまいます。発光法は励起光を必要としないため、バックグラウンドが低く抑えられ、アッセイ感度が高くなります。また、蛍光法で用いられるプローブ基質と蛍光を有する被験物質やその他の反応構成物質 (例: NADPH) の蛍光波長がオーバーラップするため起こるミスリーディングが発光法によるアプローチでは排除されます。その他の利点としてP450-Glo™ 発光基質の水溶性が標準的な蛍光基質に比べて高いことなどが挙げられます。テスト化合物の特性によっては反応液へ有機溶

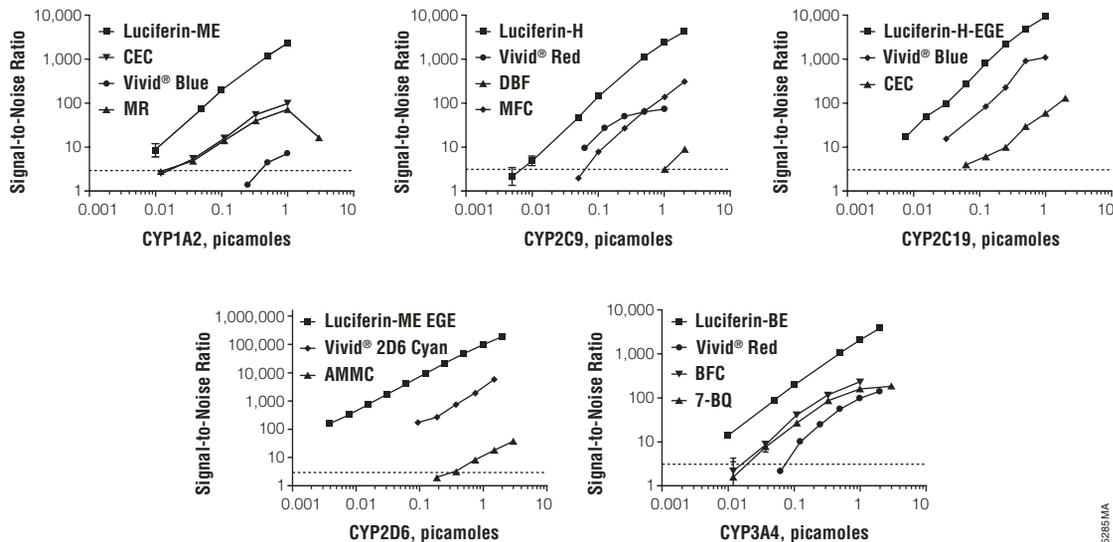


図2. P450のアッセイ感度

P450アッセイは、昆虫細胞発現システム (Supersomes™ System) の組換えP450マイクロゾーム画分を用いて37°Cで実施した。P450-Glo™ AssayはTechnical Bulletin #TB325およびTB340に従い実施した。また、蛍光アッセイについては供給元 Invitrogen Life Technologies (Vivid® substrates) および BD/Gentest (MR=methoxy-resorufin, DBF=dibenzylfluorescein, CEC=3-Cyano-7-ethoxycoumarin, AMMC=3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin, 7-BQ=7-benzyloxyquinoline, BFC=7-Benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin, MFC = 7-methoxy-4-fluoromethylcoumarin) に従った。サンプル +P450および-P450コントロール (バックグラウンド) についてプレート測定用ルミノメーターまたはフルオロメーターを用いて相対発光または相対蛍光を測定し、シグナル/ノイズ比を算出した。平均バックグラウンド値を +P450値から差引いた値をシグナルとし、これをノイズ (ノイズ=バックグラウンドの標準偏差) で割った値をシグナル/ノイズ比として表した(6)。

剤の添加が必要な場合がありますが、P450-Glo™ 基質の添加で有機溶剤が加えられることはほとんどありません。発光アッセイは酵素濃度に対して優れた直線性を示しますが、この特性も発光基質の水溶性の高さが一因であると考えられます (図2)。

P450-Glo™ CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 Assayと蛍光アッセイ法との感度比較を同じ酵素について実施しました (図2)。これらの実験では、昆虫細胞発現システムからの組換えヒトP450を用い、特定の濃度幅で測定を行いました。比較し易いようにP450-Glo™ Assayおよび相当する蛍光アッセイからのシグナル/ノイズ比を同一グラフにプロットしました。テストを行った酵素濃度の全域についてのデータを示しました (Vivid® 2D6 Cyan, Vivid® 2C9 Red, Vivid® 2C19 Blueについては、表示した最低濃度以下では酵素依存的なシグナルの変化が観察されなかった。)。どのケースにおいてもP450-Glo™ Assayは蛍光法よりも高い感度が得られ、P450-Glo™ Assayでは必要な酵素量を抑えられることが示された。これは酵素調製物への被験物質および基質の非特異的な結合が抑えられることを意味しています(5)。この非特異的結合は、有効濃度の低下、阻害剤 Kiの過大評価やin vivoでの相互作用の過小評価を導く原因になります。

P450-Glo™ Assayの高いシグナル/ノイズ比は頑健で質の高いアッセイを実現できます (図2)。Z'-factorは、アッセイの質を数値的に評価する上で広く受け入れられています。完全なアッセイのZ'-factorは1.0に等しくなり、Z'-factor値 0.5以上のアッセイならば通常HTSで許容できるとみなされます(6)。P450-Glo™ AssayのZ'-factor値は通常0.8以上です。

正確なIC₅₀値の取得

P450-Glo™ Assay のテクノロジーは、化合物ライブラリーのスクリーニングに理想的なツールを提供します。多くの化合物は1つの濃度 (通常 10μM) で1種類または複数のP450酵素に対するスクリーニングが行われ、効果の用量依存性を決定する場合には特定の濃度幅でスクリーニングを行います。P450-Glo™ Assay により求められたIC₅₀値は、蛍光法や非光学的なアッセイ法により得られた公表値と非常に良く一致しています(7, 8)。スクリーニングを行う場合、化合物はP450反応液 (試薬や適切な発光P450基質など) を含む96または384ウェルプレートに分注されます。P450反応のインキュベーションが完了した後、ルシフェリン検出試薬を等量添加します。この試薬はP450反応を停止させると同時に2時間以上の半減期を持つ“グロー”スタイルの発光反応を開始させます。発光シグナルの高さはP450反応で生成した産物の量に依存します。

まとめ

P450-Glo™ テクノロジーは、この重要な酵素ファミリーの研究を飛躍させる最先端技術です。生物発光の有する根幹的な利点を適応させることにより、従来法を持つ数多くの制限を解消することができます。このシンプルで頑健なアッセイは高感度であり、しかも自動化も可能です。これらの特長と化合物の干渉による擬陽性の低減効果が組み合わされたP450-Glo™ Assayは、シトクロムP450酵素のHTSに最適な方法です。

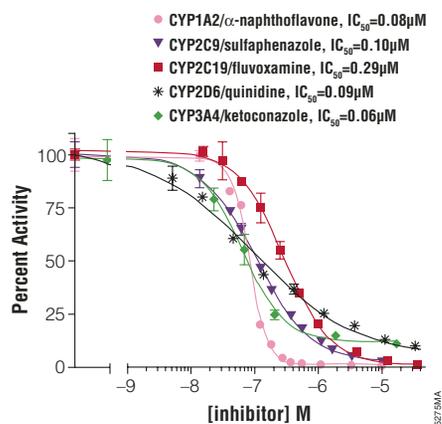


図3. P450-Glo™ Assay によるP450阻害効果の測定

各基質はそれぞれの K_m 濃度、阻害剤は表示した濃度で使用し、組換えP450 (Supersomes™ System) をアッセイした。アッセイはTechnical Bulletin #TB325 およびTB340に記載されたプロトコルに従った。曲線へのフィッティング、 IC_{50} 算出はGraphPad Prism® プログラムを用いて実施した。

参考文献

1. Guengerich, F.P. (2001) *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–50.
2. Parkinson, A. (2001) Biotransformation of Xenobiotics in *Casarett & Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons*, 6th Edition, Klaassen, C.D., editor, McGraw Hill.
3. Nelson, D.R. (2005) Cytochrome P450 home page, <http://drnelson.utmem.edu> (accessed July 17, 2005).
4. Bjornsson, T.D. *et al.* (2003) *Drug Metab. Disp.* **31**, 815–32.
5. Umeda, S. *et al.* (2005) *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 212–6.
6. Zhang, J-H. *et al.* (1999) *J. Biomol. Scr.* **4**, 67–73.
7. Sai, Y. *et al.* (2000) *Xenobiotica* **30**, 327–43.
8. Bennett, M.A. *et al.* (2000) *Drug Metab. Disp.* **28**, 125–30.

プロトコル

- ◆ P450-Glo™ Assay Systems Technical Bulletin #TB325, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb325/tb325.html
- ◆ P450-Glo™ Screening Systems Technical Bulletin #TB340, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb340/tb340.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
P450-Glo™ CYP1A1 Assay	50ml	V8752	50,000
P450-Glo™ CYP1B1 Assay	50ml	V8762	50,000
P450-Glo™ CYP1A2 Assay	50ml	V8772	50,000
P450-Glo™ CYP2C8 Assay	50ml	V8782	50,000
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	50ml	V8892	50,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay	50ml	V8802	50,000
P450-Glo™ CYP3A7 Assay	50ml	V8812	50,000
P450-Glo™ CYP2C19 Assay	50ml	V8882	50,000
P450-Glo™ CYP2D6 Assay	50ml	V8892	50,000
P450-Glo™ CYP1A2 Screening System	1,000 assays	V9770	130,000
P450-Glo™ CYP2C9 Screening System	1,000 assays	V9790	130,000
P450-Glo™ CYP3A4 Screening System	1,000 assays	V9800	130,000
P450-Glo™ CYP2C19 Screening System	1,000 assays	V9880	130,000
P450-Glo™ CYP2D6 Screening System	1,000 assays	V9890	130,000