

# Identify P-glycoprotein Substrates and Inhibitors with the Rapid, HTS Pgp-Glo™ Assay System

## Pgp-Glo™ Assay Systemを用いた迅速なHTSによるP-糖タンパク質基質および阻害剤の同定

By Dongping Ma, M.S., and James J. Cali, Ph.D., Promega Corporation

### アブストラクト

Pgp-Glo™ Assay Systemは、発光法によるP-糖タンパク質 (Pgp) ATPaseをアッセイするシステムです。Pgp-Glo™ Assayは、細胞膜画分内の組換えヒトPgpに対する化合物の影響を検出します。アッセイの原理は、ホタルルシフェラーゼ発光反応のATP依存性を利用してPgpのATPase活性を検出するというものです。PgpによるATP消費速度は、ルシフェラーゼ反応による発光シグナルと負の相関関係を示します。Pgp-Glo™ Assayは、ハイスループットスクリーニングに応用しやすく、セルベースのPgp研究を補完することができます。

### はじめに

P-糖タンパク質 (Pgp、別名MDR1またはABCB1) は、薬物などの広範な疎水性化合物や、その他の生体異物のATP依存的な排出ポンプとして機能します(1, 2)。Pgpトランスポーターは、主として小腸、肝、腎や血液脳関門の毛細血管の上皮細胞頂端側に認められます。Pgpは、受動拡散や能動輸送により細胞膜を通過して細胞内に進入する多くの化合物を細胞外に排出します。このPgpの機能は、Pgpを過剰発現する腫瘍が多剤耐性を示す理由でもあります。Pgpの輸送活性は非特異的であるため、多くの抗腫瘍薬は、細胞毒性を示す濃度まで蓄積する前に排出されてしまいます。また、頂端膜側に発現するPgpの輸送活性は、消化管や脳における薬物の吸収量を制限し、腎や肝における薬物のクリアランスに影響を及ぼします。さらに、基質、阻害剤または誘導剤としてPgpと相互作用する薬物を併用投与すると、有害な薬物間相互作用をまねくおそれがあります(3)。以上のような理由から、薬物や薬物の候補化合物とPgpの相互作用機序を解明することが重要です。

薬物とPgpの相互作用機序は、PgpによるATP加水分解速度に対する薬物の作用を測定することにより直接確認することができます(1, 4)。Pgpの基底レベルのATPase活性に対する被験化合物の影響としては、次の4種類が考えられます。1) Pgpと相互作用しない化合物は、基底レベルのATPase活性に影響を及ぼしません。2) Pgpによる輸送基質として作用する化合物は、基底レベルのATPase活性を刺激します。3) ゆっくり輸送される化合物は、他の輸送基質により刺激されたATPase活性を阻害します。4) 輸送を非競合的に阻害するポンプ阻害剤は、基底レベルのATPase活性と刺激されたATPase活性の両方を阻害します。したがって、Pgp ATPaseアッセイは、Pgpと相互作用する化合物を同定し、相互作用の種類を識別することができます。

一般的なPgp ATPaseアッセイでは、細胞膜画分内の組換えPgpを用いて、ATP加水分解により生成する無機リン酸を比色法により検出します(5, 6)。しかし、比色法は、試薬と比色シグナルが不安定であるため、自動化やハイスループット形式でのアッセイが難しいという短所を有します。Pgp-Glo™ Assay System (カタログ番号 V3591) は、従来法のような限界を克服した、Pgp 基質と変調物質の同定および特性検討を発光法により行うためのPgp ATPaseアッセイです。Pgp-Glo™ Assayを用いれば、Pgp基質と阻害剤の同定を目的としたハイスループットアッセイを容易に実施することができます。

### Pgp-Glo™ Assayの原理

Pgp-Glo™ Assayは、ホタルルシフェラーゼ発光反応のATP依存性を利用してPgpのATPase活性を検出します(図1)。PgpによるATP消費速度は、ルシフェラーゼ反応による発光シグナルと負の相関関係を示します。

Pgp-Glo™ Assayに使用する組換えヒトPgpは、バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞に発現させ、細胞膜画分として調製しています。Pgpを発現する細胞膜サンプルに対し、ATPaseの反応速度がVmaxとなるよう、ATPを無制限な濃度で添加し、インキュベーションします。インキュベーション中、ATPの一部がPgpにより消費されます。続いて、ルシフェラーゼベースのATP Detection Reagentを添加すると、Pgp反応が停止するとともに、ルシフェラーゼ反応が開始され、長時間発光タイプの発光が生じます。ATPの初期濃度は、ルシフェラーゼ-ATP曲線の直線範囲内にあるため、Pgpにより消費されたATP量は、発光シグナルの低下(不活性対照との比較)として観察されます。Pgp ATPase活性を刺激する薬物やその他の被験化合物で処理したサンプルの発光シグナルは、未処理の対照サンプルに比べ低値を示します。このように、Pgpによる輸送基質は、ATPase活性の促進剤として同定されます。一方、ATPase活性の阻害剤は、ATPase活性が基底レベル、あるいは薬物により刺激された条件で測定した発光シグナルの低下量を低減する化合物として同定されます。

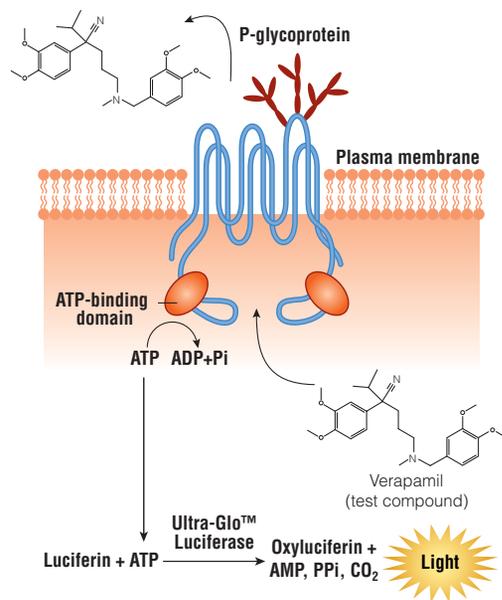


図1. Pgp-Glo™ Assay System

Pgp-Glo™ Assayは、ホタルルシフェラーゼ発光反応のATP依存性を利用している。Pgp ATPaseにATP プールを添加する第1の反応により消費されたATP量は、安定化した組換えホタルルシフェラーゼ (Ultra-Glo™ Luciferase) を用いた第2の反応により生じる発光シグナルの低下として検出される。

## Pgp-Glo™ Assayの結果と公表されている文献値との高い相関性

図2に、心疾患治療薬ベラパミルのPgp ATPase活性に対する影響を検討したPgp-Glo™の実験データを示します。ベラパミルは、Pgpによる輸送基質として、また、Pgp ATPase活性の活性化剤として知られています(2)。図2のパネルAでは、未処理 (NT)、オルトバナジン酸ナトリウム (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 処理およびベラパミル処理の3種類の条件を検討しました。Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>はPgp ATPaseの阻害剤であるため、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>処理サンプルはPgp依存性のATP消費が発生しない条件を示す対照です。未処理サンプルでは、Pgpは基底レベルの速度でATPを消費します。この速度をNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>処理サンプルおよびベラパミル処理サンプルの消費速度と比較します。未処理サンプルは、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>処理サンプルと比較して低い発光シグナルを示し、その差 ( $\Delta RLU_{\text{basal}}$ ) は基底レベルのPgp ATPase活性を示します。被験化合物 (TC) ベラパミルは、発光シグナルを基底レベルより大幅に低下させます。ベラパミル処理したサンプルにおける発光シグナルの低下量 ( $\Delta RLU_{\text{TC}}$ ) は、ベラパミル処理により刺激されたATPase活性を示します。図2のパネルBに、図2のパネルAから得られた $\Delta RLU$ の絶対値をプロットしました。この図から、ベラパミル処理によりATP消費量が4.6倍増加したことがわかります。この実験で Pgp-Glo™ により測定されたベラパミル処理によるATP消費量の増加比は、従来の比色法を用いたATPaseアッセイによる文献値ときわめて良く相関します(5)。

ベラパミルが示す刺激作用の用量依存性も、Pgp-Glo™ Assayを用いて測定しました (図3)。Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 処理対照と比較した発光シグナルの変化量 ( $\Delta RLU$ ) は、ベラパミル濃度の上昇に伴って飽和点まで増加し続けました。最大刺激作用の50%に相当する作用を示したベラパミル濃

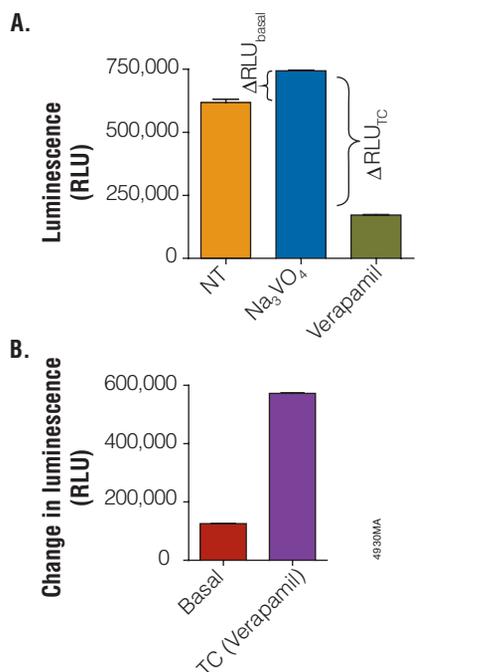


図2. ベラパミルによるPgp ATPase活性への刺激

組換えPgp細胞膜画分に、5mM ATPのみ (NT)、ATP+100 $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、あるいはATP+200 $\mu$ M 被験化合物ベラパミル (TC) を添加し、37°Cで40分間インキュベーションした。続いて、発光試薬Ultra-Glo™ Luciferase-based ATP Detection Reagentを添加し、BMG LABTECH Polarstar Optima ルミノメーターで発光シグナルを相対発光量 (RLU) として記録した (パネルA)。パネルBには、パネルAに示したNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>処理サンプルとNTの発光シグナルの差 ( $\Delta RLU_{\text{basal}}$ )、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>処理サンプルとベラパミル処理サンプルの発光シグナルの差 ( $\Delta RLU_{\text{TC}}$ ) を示す。

度 (EC<sub>50</sub>) は12 $\mu$ Mでした。この濃度は、過去に発表されている文献値ときわめて良く相関しています(5)。

Pgp-Glo™ Assay を用いて刺激比 (図2) およびEC<sub>50</sub> (図3、パネルA) を測定することが目的の場合には、発光シグナルデータを相対発光量 (RLU) で示すだけでも十分でした。データを ATPase 比活性 (消費されたATPモル数/Pgp単位量/単位時間) で示すことを目的として、既知量のATPをPgp-Glo™ Assay ATP Detection Reagentと混合した条件で、ATPによる発光シグナルの標準曲線を作成し (図3、パネルB)、この標準曲線からサンプルのATP濃度を導き出しました。図3のパネルCに、ベラパミル濃度依存性の刺激曲線を ATPase 活性で示します。基底レベルにおけるATPase活性はATP消費量35pmol/ $\mu$ g Pgp/分であり、刺激条件における最高速度はATP消費量160pmol/ $\mu$ g Pgp/分でした。

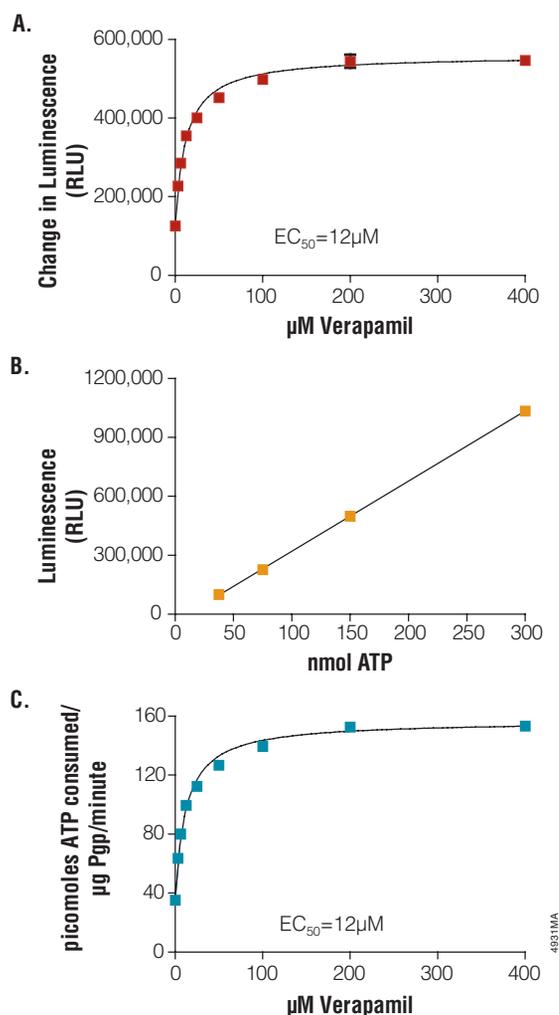


図3. 発光シグナルからATPase 活性への変換

ベラパミルのPgp ATPase活性に対する用量依存的な活性化作用を、図2の説明に示した方法で検討した。パネルA. 発光シグナルの変化 (縦軸) には、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>処理サンプルと各濃度 (0~400 $\mu$ M) のベラパミルで処理したサンプルの間に認められたRLUの差を示す。EC<sub>50</sub>は、最大作用の50%に相当する作用を示したベラパミル濃度を意味する。パネルB. Pgp-Glo™ ATP Detection Reagentを用いて作成した発光-ATP標準曲線。パネルC. パネルAに示したデータをATPase活性として表示した。ATPase活性は、発光-ATP標準曲線からATP濃度へ変換した後に算出した。

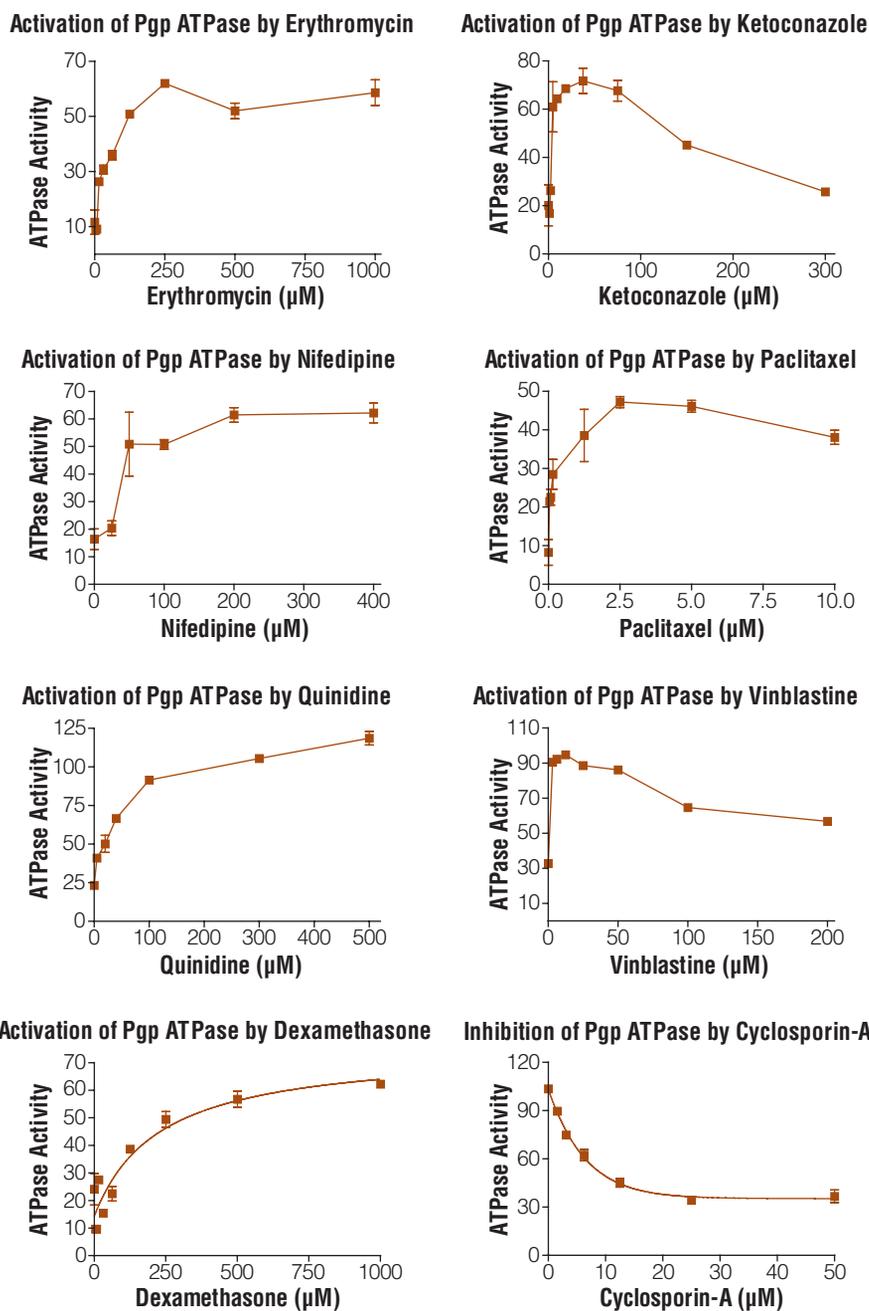


図4. 各種薬物によるPgp ATPase活性の用量依存的な変動

アッセイは、図3の説明に示した方法で、図に示した薬物濃度で実施した。シクロスポリンAの阻害作用は、ベラパミル (200μM) によりPgp ATPase活性を刺激した条件で測定した。

Pgp基質として知られているその他の薬物のATPase活性に対する影響も、Pgp-Glo™ Assay を用いて検討しました (図4)。ATPase活性に対して用量依存的な作用を示す Pgp 基質の作用曲線には2種類のプロファイルがあり、それぞれクラスIおよびクラスIIのPgp基質と名づけられています(1, 2)。ケトコナゾール、パクリタキセル、ビンブラスチンおよびシクロスポリンAの作用曲線は、ATPase活性を低濃度域で用量依存的に活性化し、高濃度域で阻害するというクラスIのPgp基質のプロファイルに一致します。一方、エリスロマイシン、ニフェジピン、キニジンおよびデキサメタゾンの作用曲線は、ATPase活性を用量依

的に活性化し、作用の飽和が認められるというクラスIIのPgp基質のプロファイルに一致します。シクロスポリンAはPgp阻害剤として知られており、その阻害作用はベラパミルによる刺激下のPgpに添加した条件で認められました(1, 7)。

Pgp-Glo™ ATPase アッセイは、組換えPgp細胞膜画分ベースの従来のATPaseアッセイのプロトコルを簡易化した改良版で、自動化フォーマットに適用できます。Pgp-Glo™ Assay は、一般的なセルベースの手法の代替または補完的手法としても使用できます。組換えPgp 細胞膜

画分ベースの Pgp-Glo™ アプローチは、多大な労力を要する細胞培養が不要な手法であるのみならず、セルベースのデータセットから導き出すことが難しい、あるいは導き出すことができない化合物の相互作用に関する情報を得ることもできます。例えば、セルベースの間接的アプローチでは、Pgp輸送基質でありトレース可能な蛍光プローブに対する被験化合物の影響を測定します(8)。プローブ残存量を増加させる化合物は、マーカーの細胞外排出を阻害するため、Pgpリガンドと判定されます。このアプローチは簡単で、処理能力に優れますが、間接的アッセイであり、Pgp-Glo™ Assayとは異なり、非競合阻害剤と、それ自体が輸送基質として機能する競合阻害剤を識別することができません。Pgp-Glo™ Assayを使用した場合、輸送基質として機能する競合阻害剤はATPase活性の活性化剤と判定される一方、非競合阻害剤はATPase活性を低下させます。

セルベースのペクトル輸送アッセイは、基底膜側と頂端膜側に培地を加え、透過性のある培養基材上でコンフルエントになるまで培養した極性細胞 (Caco-2 細胞など) 単層を通過する被験化合物の挙動を直接追跡する手法です(9)。このアプローチは直接的手法であり、輸送速度に関する重要な情報を得ることができます。多大な労力を要し、処理能力が比較的低いほか、高透過性で拡散速度が速い化合物の追跡が難しいという短所もあります。拡散速度が速い化合物は、他の化合物の輸送に対する阻害剤と判定される場合があります。拡散速度が速い化合物が Pgp による輸送基質であっても、Pgpにより排出されると直ぐに受動拡散により細胞内に戻ることから、正味の変化が観察できず、輸送を検出することができません(10)。拡散速度が速い化合物が輸送基質である場合、Pgp-Glo™ Assayを使用すれば、ATPase 活性に対する刺激作用を検出することによりそのような化合物を同定することができます。一方、Pgp-Glo™ Assayは、能動的な取り込み機構を持たない細胞からは除かれると考えられる低透過性化合物や、細胞膜内側のPgp結合部位や輸送部位へのアクセスを制限してしまう閉じた状態の膜小胞にも適用することができます。これは、組換えPgp細胞膜画分が、開いた状態のフラグメントと反転膜小胞を相当量含有するためです。

どのPgpアッセイを選択するかは、研究の最終目標によっても異なります。細胞培養を必要とせず、Pgp輸送基質と阻害剤の両方を迅速にハイスループットスクリーニングしたい場合には、Pgp-Glo™ Assay は最適な選択肢です。このアッセイは、単独で使用することもできますし、すべてのPgpリガンドを確実に検出するため、あるいはリガンドの作用機序をより詳細に検討するために、セルベースのアッセイと併用することもできます。

## 参考文献

1. Ambudkar, S.V. *et al.* (1999) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 361–98.
2. Litman, T., Druley, T.E. and Bates, S.E. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 931–59.
3. Glavinas, H. *et al.* (2004) *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42.
4. Scarborough, G.A. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 37–41.
5. Sarkadi, B. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4854–8.
6. Saheki, S., Takeda, A. and Shimazu, T. (1985) *Anal. Biochem.* **148**, 277–81.
7. Schmitt, A. *et al.* (2006) *J. Neural Transm.* **113**, 787–801.
8. Wang, E. *et al.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **289**, 580–5.
9. Feng, R.L. *et al.* (2002) *Drug Metab. Dispos.* **30**, 763–70.
10. Eytan, G.D. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12897–902.

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Pgp-Glo™ Assay System with P-glycoprotein	10 ml	V3601	96,000
Pgp-Glo™ Assay System	10 ml	V3591	58,000