

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5161219号

(P5161219)

(45) 発行日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)

(24) 登録日 平成24年12月21日 (2012. 12. 21)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 21/78 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E
請求項の数 14 (全 18 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2009-525026 (P2009-525026)	(73) 特許権者	503385923
(86) (22) 出願日	平成19年8月15日 (2007. 8. 15)		ベーリンガー インゲルハイム インター
(65) 公表番号	特表2010-501837 (P2010-501837A)		ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ
(43) 公表日	平成22年1月21日 (2010. 1. 21)		シュレンクテル ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/058473		ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル
(87) 国際公開番号	W02008/022956		ハイム アム ライン ビンガー シュト
(87) 国際公開日	平成20年2月28日 (2008. 2. 28)		ラーセ 1 7 3
審査請求日	平成22年8月13日 (2010. 8. 13)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	06119511.1		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成18年8月25日 (2006. 8. 25)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 輸送タンパク質の輸送活性を決定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ABC輸送タンパク質の輸送活性を測定するための方法であって、以下を含むことを特徴とする前記方法：

(i) 輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠すインサイドアウトの小胞と、

(ii) 輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したシンチレーション近接アッセイ (SPA) ビーズと、

(iii) 輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの間接的な結合の場合にのみ、輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの結合を媒介することができる少なくとも1つの分子と

10

(iv) 放射活性物質で標識した基質であって、基質の輸送を可能にする条件下で輸送タンパク質によって輸送できる基質とを混合し、

SPAビーズとの小胞の直接的又は間接的な結合を可能にし、かつ、小胞内への基質の輸送を可能にするのに30秒以上混合物をインキュベートし、及びビーズの発光剤によって放射される光を測定する。

【請求項 2】

輸送タンパク質がMRP1 (ABCC1)、MRP2 (ABCC2)、MRP3 (ABCC3)、MRP4 (ABCC4)、MRP5 (ABCC5)、MRP6 (ABCC6)、MRP7 (ABCC10)、MRP8 (ABCC11)、SUR1 (ABCC8)、SUR2 (ABCC9)、CFTR (ABCC7)、ABCA1、ABCA3、ABCA4、ABCG5、ABCG8、MDR1 (ABCB1)、MDR3 (ABCB4)、BS

20

EP (ABCB11)、BCRP (ABCG2)、TAP1 (ABCB2)及びTAP2 (ABCB3)からなる群より選ばれる、請求項1記載の方法。

【請求項3】

基質がADP、BQ-123、コレステロール、シメチジン、コルヒチン、環状AMP、環状GMP、デヒドロエピアンドロステロンサルファート、ダウノマイシン、ジゴキシン、エストラジオールグルクロニド、エストロン3-サルファート、エトポシド、葉酸、グルコシルセラミド、グリコケノデオキシコラート、グリココラート、ロイコトリエンC4、ロイコトリエンD4、ロイコトリエンE4、メトトレキサート、ミトキサントン、スルホプロモフタレイン、パクリタクセル、血小板活性化因子、プロスタグランジンE1、プロスタグランジンE2、プロスタグランジンF2アルファ、リトナビル、サキナビルトロンボキサランB2、ベラパミール、シトステロール、タウロケノデオキシコラート、タウロコラート、タウロウルソデオキシコラート、プラゾシン、ビンクリスチン及びビンブラスチンからなる群より選ばれる、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

輸送タンパク質及び基質として、以下の組合せの1つを使用する、請求項1又は2記載の方法。

輸送タンパク質/	:	基質	
遺伝子記号			
MRP1/ABCC1	:	ロイコトリエンC4、ロイコトリエンD4、ロイコトリエンE4、エストラジオールグルクロニド、葉酸又はメトトレキサート;	
MRP2/ABCC2	:	ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、葉酸、メトトレキサート又はスルホブプロモフタレイン;	
MRP3/ABCC3	:	ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、葉酸、メトトレキサート又はグリココラート;	
MRP4/ABCC4	:	ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、エストロン3-スルファート、デヒドロエピアンドロステロンスルファート、葉酸、cGMP、cAMP、ADP、メトトレキサート、プロスタグランジンE1、プロスタグランジンE2、プロスタグランジンF2アルファ又はトロンボキサンB2;	10
MRP5/ABCC5	:	葉酸、cGMP、cAMP、メトトレキサート、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-モノホスファート、5-フルオロ-ウリジン5'-モノホスファート又は2'-デオキシウリジン5'-モノホスファート;	
MRP6/ABCC6	:	ロイコトリエンC4又はBQ-123;	
CFTR/ABCC7	:	塩化物;	
MRP7/ABCC10	:	ロイコトリエンC4又はエストラジオールグルクロニド;	
MRP8/ABCC11	:	cAMP、cGMP、ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、エストロン3-スルファート、デヒドロエピアンドロステロンスルファート、タウロコラート又はグリココラート;	20
MDR1/ABCB1	:	グルコシルセラミド、血小板活性化因子、ダウノマイシン、ジゴキシン、コルヒチン、エトポシド、パクリタキセル、ベラパミール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、リトナビル又はサキナビル;	
BSEP/ABCB11	:	タウロコラート、グリココラート、タウロケノデオキシコラート、グリコケノデオキシコラート又はタウロウルソデオキシコラート;	
ABCA4	:	レチナール;	
BCRP/ABCG2	:	エストロン3-スルファート、エストラジオールグルクロニド、葉酸、メトトレキサート、ミトキサントン、トポテカン又はシメチジン;	30
ABCG5	:	コレステロール又はシトステロール;	
ABCG8	:	コレステロール又はシトステロール。	

【請求項 5】

インキュベーション期間が30秒以上30時間以下持続する、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法を実施することを特徴とするハイスループット (HTS) 形式で輸送タンパク質の輸送活性を測定する方法。

【請求項 7】

輸送タンパク質としてMRP4を使用する請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載の方法の (iii) において配列が配列番号 1 又は配列番号 2 で表されるペプチドに結合することができる抗体を使用する請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載の方法の (ii) においてプロテイン A でコートされたSPAビーズを使用する請求項 7 又は 8 記載の方法。

【請求項 10】

請求項1記載の方法の(ii)において請求項8の抗体に結合することができる別の抗体でコートされたSPAビーズを使用する請求項7又は8記載の方法。

【請求項 11】

輸送タンパク質として、ヒスチジン標識がC末端で融合されたMRP4を使用する請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項 12】

輸送タンパク質として、6個以上のヒスチジン残基からなるヒスチジン標識のMRP4を使用する請求項11記載の方法。

【請求項 13】

請求項1記載の方法の(ii)において銅キレートでコートされたSPAビーズを使用する請求項11又は12記載の方法。

【請求項 14】

化合物が輸送タンパク質の輸送活性のモジュレーターであるかどうかを決定するための方法であって、以下を含むことを特徴とする前記方法：

(A) (i) 輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠すインサイドアウトの小胞と、

(ii) 輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したシンチレーション近接アッセイ (SPA) ビーズと、

(iii) 輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの間接的な結合の場合にのみ、輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの結合を媒介することができる少なくとも1つの分子と、

(iv) 放射活性物質で標識した基質であって、基質の輸送を可能にする条件下で輸送タンパク質によって輸送できる基質と

(v) 試験化合物とを混合し、

(B) (i) 輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠すインサイドアウトの小胞と、

(ii) 輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したSPAビーズと、

(iii) 輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの間接的な結合の場合にのみ、輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの結合を媒介することができる少なくとも1つの分子と、

(iv) 放射活性物質で標識した基質であって、基質の輸送を可能にする条件下で輸送タンパク質によって輸送できる基質とを混合し、

SPAビーズとの小胞の直接的又は間接的な結合を可能にし、かつ、小胞内への基質の輸送を可能にする30秒以上の同じ時間混合物 (A) 及び (B) をインキュベートし、及びビーズの発光剤によって放射される光を測定し、ここで (B) と比較したときに (A) で得られた値が大きいことは、試験した輸送タンパク質のアクチベーターである化合物と同定され、(B) と比較したときに (A) で得られた値が小さいことは、試験した輸送タンパク質のインヒビターである化合物と同定される。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(緒言)

輸送タンパク質は膜タンパク質であり、細胞膜又はオルガネラ膜のような生体膜の選択的透過性を調節する。輸送タンパク質は、膜の反対側に電気化学的勾配を下って溶質が受動運動することを可能にするか (受動トランスポーター)、又はATPの加水分解によって与えられるエネルギーを直接的又は間接的に消費することによって濃度勾配に逆らって溶質が蓄積することを媒介する (能動トランスポーター)。能動トランスポーターの最も大きなファミリーの1つはATP結合カセットトランスポーター (ABCトランスポーター) であ

10

20

30

40

50

る (Higgins, 1992; Holland and Holland, 2005)。ヒトにおいて、ABCトランスポーターは多種多様の生理学的及び病態生理学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。ABCトランスポーターをコードする遺伝子における変異は嚢胞性線維症 (Riordan et al., 1989)、タンジアー病 (Bodzioch et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999; Young and Fielding, 1999)、デュービン・ジョンソン症候群 (Kartenbeck et al., 1996; Mayer et al., 1995)、弾性線維性仮性黄色腫 (Ringpfeil et al., 2000) 及びスタルガルト病 (Allikmets, 1997) などの種々の遺伝的疾患を生じる。生理学的機能以外に、ABCトランスポーターは、薬剤の吸収、処分及び排出のプロセスにおいても重要な役割を果たす (Ayrton and Morgan, 2001; Borst and Elferink, 2002)。腫瘍細胞におけるABCトランスポーターの過剰発現は化学療法剤に対する抵抗性の主なメカニズムである (Gottesman et al., 2002)。したがって、薬剤とABCトランスポーターとの間の相互作用の研究は薬剤候補の開発の成功に必須である。

10

【背景技術】

【0002】

輸送タンパク質の重要な機能のために、輸送タンパク質の活性を調節できる物質が必要とされている。前記物質を同定するために、例えばある物質が輸送タンパク質の活性を調節できるかどうかを決定するのに十分な感度を有するハイスループット又は超ハイスループットの適合性のあるアッセイが必要とされている。

現在、コスト及び時間がかかる複数の工程を含む方法のみが、輸送タンパク質の輸送活性を決定するために技術的に知られている (ある物質が輸送タンパク質の活性を調節できるかどうかを決定するための基礎となる方法)。

20

技術的に知られている輸送タンパク質の活性を決定するための前記方法は、例えば輸送タンパク質の輸送活性が以下のようにして測定される急速な方法である：

－組織、培養細胞又は組換え輸送タンパク質を発現する細胞から調製された膜小胞を用意し、

－前記小胞を所定時間放射標識物質とともにその物質の輸送を可能にする条件下でインキュベートし、

－膜小胞を小胞外 (extra-vesicular) 物質から、例えばニトロセルロース又は繊維ガラス膜によるろ過によって分離し、そして

－例えば、放射能の量が輸送タンパク質の輸送活性と直接相関する分離した小胞の放射能の増加を測定する (Keppler et al., 1998)。

30

前記方法の時間のかかる分離工程以外に、前記方法の別の欠点はハイスループットスクリーニング (HTS) 対策 (campaign)、特に超ハイスループットスクリーニング (uHTS) 対策に適していないことである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上記で概略されたように、医薬用原料の開発における物質探索 (profiling) のための輸送タンパク質の使用はますます重要となってきた。したがって、HTS対策における使用にも適した輸送タンパク質の輸送活性を決定するための新しい迅速な方法を提供することが強く求められている。

40

【課題を解決するための手段】

【0004】

(発明の説明)

輸送タンパク質及び目的 (putative) 物質を探索するためのその応用並びにそれを用いてそれぞれの輸送タンパク質の活性を決定するための方法の必要性は長年知られていたが、今まで輸送タンパク質の輸送活性を決定するための方法として知られていたのは、それぞれの読出し情報を評価する前に標識された物質を反応混合物から分離しなければならない反応チューブの外側でのろ過工程を含む複数の工程を必要とする手間のかかる方法のみである。

50

しかしながら、本発明は、HTS及びuHTS対策にも適した輸送タンパク質の輸送活性を決定するための迅速で無駄のない方法を可能にする「インワンチューブ方法」を初めて提供する。

本発明の基礎は、輸送タンパク質の最（very）C末端、すなわち1～25個のアミノ酸が、例えばヒスチジン標識で標識でき（Hagmann et al., 1999）及び/又は例えば抗体又は抗体断片でその輸送活性を与えることなく標識できることを発見したことである。それらによって最C末端は、前記輸送タンパク質の活性を決定するためのアッセイにおけるアンカーとして使用できる。

別の基礎は、例えば1979年（Hart及びGreenwald, 1979 Mol. Immunology. Vol. 16, 265-267）までさかのぼるシンチレーション近接アッセイ（SPA）技術と呼ばれる、よく知られた均一な一般的なアッセイ技術である。SPAを使用すると、放射能が標準シンチレーションカウンタで検出できる光を放出するように誘導された発光剤（scintillant）に近づくことによって放射能を測定できる。放射性原子が崩壊したときに、それは電子のような原子より小さい粒子を放出する。これらの粒子が水を通る距離は限られており、粒子のエネルギーに依存する（SPAはこの制限に基づいている）。例えば、トリチウム[³H]原子が崩壊したときには、それはβ-粒子を放出する。[³H]原子は適した発光剤分子の1.5μmの範囲内である場合には、β-粒子のエネルギーは発光剤に届くのに十分であり、それを励起して光を放射する。発光剤と[³H]原子との距離が1.5μmよりも大きい場合には、β-粒子は必要な距離を移動するのに十分なエネルギーを持っていない。水溶液中で、水分子との衝突はβ-粒子のエネルギーを消費し、したがって発光剤を励起することはできない。

【0005】

好ましくは、発光剤は、技術的によく知られている小さいフルオミクロスフェア（fluorescent microsphere）（ビーズ）に組み込まれる。それらは特定の分子を結合するように構成される（例えば、免疫グロブリンと結合するプロテインAでコートされる）。放射性分子がビーズに結合されている場合、それは、TopCount（パーキンエルマー）又はLEADSeeker（GE）のような標準シンチレーションカウンタで決定できる光（350～650nmの波長）を放射する発光剤を励起することができるように十分に極めて接近させられる。

本発明は、輸送タンパク質の最C末端をSPAビーズに接近させるためのブリッジとして使用する、輸送タンパク質の活性を決定するためのSPAアッセイを初めて提供する。

【0006】

輸送タンパク質の輸送活性を決定するための本発明の方法は、以下を含むことを特徴とする：

（i）輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠す小胞、好ましくはインサイドアウトの小胞と、

（ii）輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したSPAビーズと、

（iii）輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの間接的な結合の場合にのみ、輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの結合を媒介することができる少なくとも1つの分子と、

（iv）放射活性物質で標識した基質であって、基質の輸送を可能にする条件下で輸送タンパク質によって輸送できる本発明の基質とを混合し、

SPAビーズとの小胞の直接的又は間接的な結合を可能にし、かつ、小胞内への基質の輸送を可能にするのに十分長い時間混合物をインキュベートし、及びビーズの発光剤によって放射される光を測定する。

【0007】

本発明の別の方法は、化合物が輸送タンパク質の輸送活性のモジュレーターであるかどうかを決定するための方法であって、以下を含むことを特徴とする：

（A）（i）輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠す小胞、好ましくはインサイドアウトの小胞と、

(ii) 輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したSPAビーズと、

(iii) 輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの間接的な結合の場合にのみ、輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの結合を媒介することができる少なくとも1つの分子と、

(iv) 放射活性物質で標識した基質であって、基質の輸送を可能にする条件下で輸送タンパク質によって輸送できる本発明の基質と、

(v) 試験化合物とを混合し、

(B) (i) 輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠す小胞、好ましくはインサイドアウトの小胞と、

(ii) 輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したSPAビーズと、

(iii) 輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの間接的な結合の場合にのみ、輸送タンパク質の最C末端とのSPAビーズの結合を媒介することができる少なくとも1つの分子と、

(iv) 放射活性物質で標識した基質であって、基質の輸送を可能にする条件下で輸送タンパク質によって輸送できる本発明の基質とを混合し、

SPAビーズとの小胞の直接的又は間接的な結合を可能にし、かつ、小胞内への基質の輸送を可能にするのに十分長い同じ時間混合物(A)及び(B)をインキュベートし、及びビーズの発光剤によって放射される光を測定し、ここで(B)と比較したときに(A)で得られた値が大きいことは、試験した輸送タンパク質のアクチベーターである化合物と同定され、(B)と比較したときに(A)で得られた値が小さいことは、試験した輸送タンパク質のインヒビターである化合物と同定される。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明のすべての方法はハイスループットスクリーニング(HTS)対策及び超ハイスループットスクリーニング(uHTS)対策において使用できる。前記方法は、96ウェル以上を有するプレートを使用することによって実行でき、より好ましくは384ウェルプレート又は1536ウェルプレートの使用である。さらに好ましくは、反応及び/又は読出しプラットフォームとしてのチップの使用である。

本発明は、また輸送タンパク質の輸送活性を決定するための、及び基質が本発明の輸送タンパク質のモジュレーターであるかどうか(すなわち、アクチベーター又はインヒビター)を決定するためのキットを提供する。

輸送タンパク質の輸送活性を決定するための本発明のキットは、

(a) 輸送タンパク質の最C末端が小胞の外側にあるような方法で少なくとも1つの輸送タンパク質を隠す小胞、好ましくはインサイドアウトの小胞、及び

(b) 輸送タンパク質の最C末端と直接的又は間接的に結合するのに適したSPAビーズを含む。

【0009】

本発明の方法に従って、用語「混合する」は、記載された成分の少なくとも任意の添加として理解されるべきである。しかしながら、本発明との関連で、用語「混合する」は、また前記成分の更なる分布をもたらすことができる任意の運動又は攪拌を含むことができる。

本発明の小胞、好ましくはインサイドアウトの小胞は、脂質二重膜からなる小胞である。インサイドアウトの小胞は、小胞の外側に面しているその旧細胞内の表面及び小胞の内側に面しているその旧細胞外の表面を有する小胞である。前記小胞は、細胞膜の調製の際に自然に形成される。膜小胞の側面(ライトサイドアウト又はインサイドアウト)は技術的によく知られた方法、例えばヌクレオチドピロホスファターゼ(EC3.6.1.9)のようなエクトエンザイムの活性をTriton X-100の存在下又は非存在下で測定することによって決定できる(Keppler et al., 1998; Meier and Boyer, 1990)。

【0010】

本発明の輸送タンパク質は細胞内小胞、細胞膜又は小胞膜を横切って基質を輸送することができる細胞内の細胞膜における組み換え型発現により生じる又は自然に生じる任意のタンパク質及び別の分子がC末端の与えられた部分（例えば、C末端に融合されているヒスチジン標識）に特異的に結合できる方法でC末端で与えられる任意の前記輸送タンパク質である。好ましい輸送タンパク質は、ABC輸送タンパク質である（Holland and Holland, 2005）。より好ましい輸送タンパク質は、技術的によく知られているMRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5、MRP6、MRP7、MRP8、SUR1、SUR2、CFTR、ABCA1、ABCA3、ABCA4、ABCG5、ABCG8、MDR1、MDR3、BSEP、BCRP、TAP1及びTAP2からなる群より選ばれる。しかしながら、以下に、その参考文献及び受入番号を記載する。

タンパク質ID/遺伝子記号；参考文献；受入番号

MRP1 / ABCC1; (Cole et al., 1992); NP_004987

MRP2 / ABCC2; (Buchler et al., 1996); NP_000383

MRP3 / ABCC3; (Kiuchi et al., 1998); NP_003777

MRP4 / ABCC4; (Lee et al., 1998); NP_005836

MRP5 / ABCC5; (Belinsky et al., 1998); NP_005679

MRP6 / ABCC6; (Kool et al., 1999); NP_001162

CFTR / ABCC7; (Riordan et al., 1989); NP_000483

SUR1 / ABCC8; (Aguilar-Bryan et al., 1995); NP_000343

SUR2 / ABCC9; (Inagaki et al., 1996); NP_005682; NP_064693; NP_064694

MRP7 / ABCC10; (Hopper et al., 2001); NP_258261

MRP8 / ABCC11; (Tammur et al., 2001); NP_115972; NP_149163; NP_660187

MDR1 / ABCB1; (Gros et al., 1986); NP_000918

TAP1 / ABCB2; (Trowsdale et al., 1990); NP_000584

TAP2 / ABCB3; (Trowsdale et al., 1990); NP_000535; NP_061313

MDR3 / ABCB4; (Van der Bliek et al., 1987); NP_000434; NP_061337; NP_061338

BSEP / ABCB11; (Strautnieks et al., 1998); NP_003733

ABCA1; (Luciani et al., 1994); NP_005493

ABCA3; (Klugbauer and Hofmann, 1996); NP_001080

ABCA4; (Allikmets, 1997); NP_000341

BCRP / ABCG2; (Allikmets et al., 1998); NP_004818

ABCG5; (Berge et al., 2000); NP_071881

ABCG8; (Berge et al., 2000); NP_071882

【0011】

好ましい輸送タンパク質は本発明の基質を外側から本発明の小胞に輸送することができるタンパク質である。

本発明の輸送タンパク質の最C末端は本発明の輸送タンパク質の最末端であり、好ましくは本発明の輸送タンパク質の最C末端の6個以上25個以下のアミノ酸の範囲を含む。前記範囲のアミノ酸からなる前記ペプチドは、前記ペプチドに結合でき、それによって本発明の輸送タンパク質の最C末端に結合でき、本発明の最C末端との本発明のSPAビーズの間接的な結合を媒介するために使用できる抗体又は抗体断片を生成するために本発明に従って使用できる。例として、MRP4の15～25個のアミノ酸の範囲のアミノ酸からなる2つのペプチドは、それぞれ配列番号1及び2で与えられる。

本発明の輸送タンパク質の活性は、本発明の基質の空間的な変化を生じる、好ましくは本発明の基質の本発明の小胞への移動を生じる本発明の輸送タンパク質のすべての活性である。前記活性は、本発明の方法によって決定できる。

【0012】

本発明のSPAビーズは本発明の輸送タンパク質の最C末端に直接的又は間接的に結合できるすべてのSPAビーズである。本発明の間接的な結合は、一方で本発明の輸送タンパク質の最C末端に結合でき、他方でSPAビーズに結合できる抗体（第1抗体）となることが

できる別の可溶性分子、例えばプロテインA（プロテインAは細菌スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）の多くの菌株の細胞壁から単離されるタンパク質であり、たいいていの哺乳類種のIgGに結合するその能力によって特徴付けられる。）又はSPAビーズに結合し、第1抗体に結合できる別の抗体（例えば、それぞれウサギ、ヤギ、ラット又はマウス由来の免疫グロブリンと結合できる抗ウサギ抗体、抗ヤギ抗体、抗ラット抗体又は抗マウス抗体）によって媒介される結合である。そのような場合において、SPAビーズは、好ましくはプロテインA又はそれぞれの第2抗体でコートされる。

本発明の直接的な結合は可溶性分子が必要ない結合であり、例えばそのような結合は本発明の輸送タンパク質の、最C末端又は与えられた最C末端との結合が可能である方法でコートされたSPAビーズへの結合となることができる（例えば、ヒスチジン標識が融合したC末端が銅キレートによってコートされたSPAビーズと直接的に結合する本発明の輸送タンパク質）。

SPAビーズの適した量は技術的に一般に知られた方法によって容易に決定できる。しかしながら、20～250 µg/ウエルの384ウエルプレートが好ましい。

【0013】

本発明の輸送タンパク質のC末端と結合できる抗体は、ポリクローナル血清、例えばウサギ血清の任意の抗体（Ab）、又は本発明の輸送タンパク質のC末端と結合できる任意のモノクローナル抗体（mAb）である。本発明の前記抗体は、技術的に知られている方法、すなわち本発明の輸送タンパク質の少なくともC末端の投与によってそれぞれの非ヒト動物の免疫処置によって容易に得ることができる。ポリクローナル血清の前記Ab又はmAbが本発明の方法で使用できるか否かは、mAb又はポリクローナル血清のAbが本発明の輸送タンパク質の最C末端の15～25個のアミノ酸の範囲と結合できる（好ましくは、選択的に結合できる）か否かを決定することを可能にする技術的によく知られた方法によって容易に試験することができる。本発明によれば、当然のことながら、本発明の適したAb又はmAbは、（i）小胞の膜に組み込まれる場合に小胞の外側に位置し、（ii）本発明の輸送タンパク質のC末端の前記25個のアミノ酸の上流である異なるアミノ酸の領域には結合しない。

本発明のヒスチジン標識は、ヒスチジン残基、好ましくは少なくとも6個のヒスチジン残基からなるペプチドである。それは、例えば輸送タンパク質の全長cDNAの終止コドンの前にあるヒスチジン残基をコードするDNA配列を挿入することによって本発明の輸送タンパク質の最末端に対して遺伝子操作される。前記標識を達成するための別の方法は技術的によく知られている。

【0014】

本発明の基質は、本発明の輸送タンパク質によって輸送できる任意の内在性分子又は化合物又はオリゴペプチド又は核酸又はヌクレオチド又は環状ヌクレオチドである。本発明の前記輸送は、通常脂質二重層に組み込まれる輸送タンパク質によって生じる本発明の基質の任意の特別な変化である。

好ましい基質は、ADP、BQ-123、コレステロール、シメチジン、コルヒチン、環状AMP、環状GMP、デヒドロエピアンドロステロンサルファート、ダウノマイシン、ジゴキシニン、エストラジオールグルクロニド、エストロン3-スルファート、エトポシド、葉酸、グルコシルセラミド、グリコケノデオキシコラート、グリココラート、ロイコトリエンC4、ロイコトリエンD4、ロイコトリエンE4、メトトレキサート、ミトキサントン、スルホプロモフタレイン、パクリタクセル、血小板活性化因子、プロスタグランジンE1、プロスタグランジンE2、プロスタグランジンF2アルファ、リトナビル、サキナビルトロンボキサンB2、ベラパミール、シトステロール、タウロケノデオキシコラート、タウロコラート、タウロウルソデオキシコラート、プラゾシン、ビンクリスチン及びビンブラスチンからなる群より選ばれる。輸送タンパク質及び基質のより好ましい組合せは以下の通りである。

【0015】

タンパク質ID/遺伝子記号	:	基質 (引用文献)	
MRP1/ABCC1	:	ロイコトリエンC4、ロイコトリエンD4、ロイコトリエンE4、エストラジオールグルクロニド、葉酸又はメトトレキサート (Jedlitschky et al., 1996; Keppler et al., 1998; Leier et al., 1994)	
MRP2/ABCC2	:	ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、葉酸、メトトレキサート又はスルホブプロモフタレイン (Bakos et al., 2000; Cui et al., 1999; Cui et al., 2001; Hooijberg et al., 1999; Hooijberg et al., 2003)	
MRP3/ABCC3	:	ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、葉酸、メトトレキサート又はグリココラート (Hooijberg et al., 2003; Zeng et al., 2000)	10
MRP4/ABCC4	:	ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、エストロン3-スルファート、デヒドロエピアンドロステロンスルファート、葉酸、cGMP、cAMP、ADP、メトトレキサート、プロスタグランジンE1、プロスタグランジンE2、プロスタグランジンF2アルファ又はトロンボキサンB2 (Chen et al., 2001; Chen et al., 2002; Jedlitschky et al., 2004; Reid et al., 2003; Rius et al., 2003; Rius et al., 2005; van Aubel et al., 2002; Zelcer et al., 2003)	
MRP5/ABCC5	:	葉酸、cGMP、cAMP、メトトレキサート、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-モノホスファート、5-フルオロ-ウリジン5'-モノホスファート又は2'-デオキシウリジン5'-モノホスファート (Pratt et al., 2005; Wielinga et al., 2005)	20
MRP6/ABCC6	:	ロイコトリエンC4又はBQ-123 (Ilias et al., 2002; Madon et al., 2000)	
CFTR/ABCC7	:	塩化物 (Berger et al., 1991)	
MRP7/ABCC10	:	ロイコトリエンC4又はエストラジオールグルクロニド (Chen et al., 2003a)	
MRP8/ABCC11	:	cAMP、cGMP、ロイコトリエンC4、エストラジオールグルクロニド、エストロン3-スルファート、デヒドロエピアンドロステロンスルファート、タウロコラート又はグリココラート (Bortfeld et al., 2006; Chen et al., 2005)	30

MDR1/ABCB1	:	グルコシルセラミド、血小板活性化因子、ダウノマイシン、ジゴキシン、コルヒチン、エトポシド、パクリタクセル、ベラパミール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、リトナビル又はサキナビル (Raggers et al., 1999; Raggers et al., 2001; Sarkadi et al., 1992; Takeuchi et al., 2006; Tanigawara et al., 1992)	
BSEP/ABCB11	:	タウロコラート (taurocholate)、グリココラート、タウロケノデオキシコラート、グリコケノデオキシコラート又はタウロウルソデオキシコラート (Byrne et al., 2002; Noe et al., 2002)	
ABCA4	:	レチナール (Sun et al., 1999)	
BCRP/ABCG2	:	エストロン3-スルファート、エストラジオールグルクロニド、葉酸、メトトレキサート、ミトキサントン、トポテカン又はシメチジン (Chen et al., 2003b; Imai et al., 2003; Pavsek et al., 2005; Volk and Schneider, 2003)	10
ABCG5	:	コレステロール又はシトステロール (Wang et al., 2006)	
ABCG8	:	コレステロール又はシトステロール (Wang et al., 2006)	

【0016】

本発明の基質は放射活性物質で標識される。適した同位体は H^3 、 S^{35} 、 P^{32} 又は ^{33}J 、 J^{125} である（前記リストは適した同位体を開示するのみで、限定されるものと理解されるべきではない）。放射活性物質で標識した基質の適した濃度は、技術的に一般に知られた方法によって容易に決定できる。しかしながら、 $1 \sim 1000 \mu m$ の濃度はより適切である。 20

本発明のインキュベーション時間は30秒以上である。好ましくは、インキュベーション時間は30秒以上続け、30時間を超えない。より好ましいインキュベーション時間は1時間以上続け、24時間を超えない。好ましくは、ルミネッセンスシグナルはインキュベーション時間の終了後すぐに測定され、0.5、1、2、4、6又は最大24時間後に容易に測定できる。本発明の各輸送タンパク質の適したインキュベーション時間は、異なる時点でのルミネッセンスシグナルの測定及びその後の得られたデータの比較により当業者によって容易に同定できる。好ましいインキュベーション時間は、例えば最も短い時間で重要なデータを与えるものである。 30

本発明の輸送タンパク質のモジュレーターである本発明の試験される化合物は、任意の小分子、ペプチド又は抗体である。

本発明の輸送タンパク質のモジュレーターは、本発明の輸送タンパク質の輸送活性に影響を与える。前記モジュレーターは、本発明の輸送タンパク質のインヒビターであるか、又は本発明の輸送タンパク質のアクチベーターである。前記インヒビターは本発明の輸送タンパク質の輸送活性を低下させるか、阻害する。一方、前記アクチベーターは本発明の輸送タンパク質の輸送活性を増強する。

本発明は、また本発明の方法を用いてインヒビターとして決定された本発明の輸送タンパク質のモジュレーターを開示する（例えば、MRP4/のインヒビターであるMK571又はジピリダモールのような (van Aubel et al., 2002)）。 40

以下の実施例は本発明を説明することを意図され、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。しかしながら、実施例は本発明の最も好ましい実施態様を記載する。

【実施例】

【0017】

（実施例1）

1) MRP4をコードする全長cDNAを含むバキュロウイルス構成物に感染させた昆虫細胞 (Hi5又はSf9) 由来の膜小胞をvan Aubel et al. (van Aubel et al., 2002) によって記載されるよう（いくつかの変更を加えて）に調製した：Hi5細胞を、昆虫細胞培養液を含まないInsect-Xpress血清中 1×10^6 細胞/mlの細胞密度に懸濁液中で培養し、MRP4をコードする 50

全長cDNAを含むバキュロウイルス構成物に感染させた。感染三日後、細胞を3000rpmで10分間遠心分離により回収した。細胞ペレットを、プロテアーゼインヒビター（例えば、Complete, Roche Diagnostics, 商品番号 04693132001）の混合物を含む低張緩衝液（0.1 mM EDTA, 1 mM Tris, 1 mM HEPES, pH=7.4）中に再懸濁し、氷浴上で90分間攪拌した。崩壊させた細胞を4℃及び1000000gで30分間遠心分離により沈殿させた。粗製の膜フラクションからなるペレットをTris/スクロース緩衝液（10mMのTris, 250mMのスクロース, pH=7.4）に再懸濁し、ぴったり合った乳棒を有するガラスダンス（dounce）中で30回（strike）ホモジナイズした。膜画分のタンパク質濃度を、標準的な方法（例えば、BCAタンパク質アッセイ（Pierce, 製品番号 23250））を用いて決定した。

【0018】

2) MRP4の輸送活性の決定：1) で調製された膜小胞を3.3μgタンパク質/μlの濃度までTris/スクロース緩衝液で希釈した。5μl希釈した膜小胞を384ウェルの白色の不透明なマイクロプレート（PerkinElmer, 製品番号 6007299）の各ウェルに加えた。5μlの試験化合物（Tris/スクロース緩衝液で異なる濃度に希釈）を膜小胞に加えた。Tris/スクロース緩衝液中で、12mMのATP、30mMのMgCl₂、30mMのホスホクレアチン及び22.5mMのK₂CO₃、0.375mg/mlのクレアチンキナーゼ（Leier et al., 1994）, Roche diagnostics, 商品番号 10127566001）、90μMの葉酸、0.1μCiの³H-葉酸（Movarek Biochemicals, MT783）、120μgのプロテインA SPA イメージングビーズ又はプロテインA SPA シンチレーションビーズ（Matsumura et al., 1992）及び0.075 μl 抗-MRP4ウサギ抗血清（配列番号1で与えられるMRP4のC末端の15個のアミノ酸に対して向けられる）を含む反応混合物を調製した。輸送は、5μlの反応混合物を膜小胞に加えることによって開始される。30分後、1時間後、2時間後、4時間後又は最大24時間後に、ルミネッセンスシグナルをLEADSeeker又はTopCountシステムで測定した。

【0019】

3) 試験化合物の抑制効果の計算：試験化合物の存在下で決定されたMRP4の相対的な輸送活性は、試験化合物の非存在下で決定されたルミネッセンスと比較して試験化合物の存在下で決定されたルミネッセンスの割合として計算される。MRP4のインヒビターは100%未満の値を生じるが、MRP4のアクチベーターは100%よりも大きい値を生じる。

【0020】

表1に、上述のアッセイを利用し、公知のMRP4インヒビターを試験することによって得られた結果をまとめる。

【表1】

	IC50 [μM]
ジピリダモール (van Aubel et al., 2002)	35
MK571 (van Aubel et al., 2002)	3.6

【0021】

文献

1. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P., Boyd, A.E., III, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D.A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423-426.
2. Allikmets, R. (1997). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 17, 122.
3. Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., and Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58, 5337-5339.
4. Ayrton, A., and Morgan, P. (2001). Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31, 469-497.

5. Bakos,E., Evers,R., Sinko,E., Varadi,A., Borst,P., and Sarkadi,B. (2000). Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol. Pharmacol.* 57, 760-768.
6. Belinsky,M.G., Bain,L.J., Balsara,B.B., Testa,J.R., and Kruh,G.D. (1998). Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1735-1741.
7. Berge,K.E., Tian,H., Graf,G.A., Yu,L., Grishin,N.V., Schultz,J., Kwiterovich, P., Shan,B., Barnes,R., and Hobbs,H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771-1775. 10
8. Berger,H.A., Anderson,M.P., Gregory,R.J., Thompson,S., Howard,P.W., Maurer,R.A., Mulligan,R., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1991). Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J. Clin. Invest* 88, 1422-1431.
9. Bodzioch,M., Orso,E., Klucken,J., Langmann,T., Bottcher,A., Diederich,W., Drobnik,W., Barlage,S., Buchler,C., Porsch-Ozcurumez,M., Kaminski,W.E., Hahmann,H.W., Oette,K., Rothe,G., Aslanidis,C., Lackner,K.J., and Schmitz,G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* 22, 347-351.
10. Borst,P., and Elferink,R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537-592. 20
11. Bortfeld,M., Rius,M., Konig,J., Herold-Mende,C., Nies,A.T., and Keppler,D. (2006). Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience* 137, 1247-1257.
12. Brooks-Wilson,A., Marcil,M., Clee,S.M., Zhang,L.H., Roomp,K., van Dam,M., Yu,L., Brewer,C., Collins,J.A., Molhuizen,H.O., Loubser,O., Ouelette,B.F., Fichter,K., Ashbourne-Excoffon,K.J., Sensen,C.W., Scherer,S., Mott,S., Denis,M., Martin dale,D., Frohlich,J., Morgan,K., Koop,B., Pimstone,S., Kastelein,J.J., Genest,J., Jr., and Hayden,M.R. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336-345. 30
13. Buchler,M., Konig,J., Brom,M., Kartenbeck,J., Spring,H., Horie,T., and Keppler,D. (1996). cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* 271, 15091-15098.
14. Byrne,J.A., Strautnieks,S.S., Mieli-Vergani,G., Higgins,C.F., Linton,K.J., and Thompson,R.J. (2002). The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123, 1649-1658.
15. Chen,Z.S., Guo,Y., Belinsky,M.G., Kotova,E., and Kruh,G.D. (2005). Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol. Pharmacol.* 67, 545-557. 40
16. Chen,Z.S., Hopper-Borge,E., Belinsky,M.G., Shchaveleva,I., Kotova,E., and Kruh,G.D. (2003a). Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol. Pharmacol.* 63, 351-358.
17. Chen,Z.S., Lee,K., and Kruh,G.D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol. Chem.* 276, 33747-33754.
18. Chen,Z.S., Lee,K., Walther,S., Raftogianis,R.B., Kuwano,M., Zeng,H., and Kru 50

- h,G.D. (2002). Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 62, 3144-3150.
19. Chen,Z.S., Robey,R.W., Belinsky,M.G., Shchaveleva,I., Ren,X.Q., Sugimoto,Y., Ross,D.D., Bates,S.E., and Kruh,G.D. (2003b). Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res.* 63, 4048-4054.
20. Cole,S.P., Bhardwaj,G., Gerlach,J.H., Mackie,J.E., Grant,C.E., Almquist,K.C., Stewart,A.J., Kurz,E.U., Duncan,A.M., and Deeley,R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654. 10
21. Cui,Y., Konig,J., Buchholz,J.K., Spring,H., Leier,I., and Keppler,D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* 55, 929-937.
22. Cui,Y., Konig,J., and Keppler,D. (2001). Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Mol. Pharmacol.* 60, 934-943.
23. Gottesman,M.M., Fojo,T., and Bates,S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58. 20
24. Gros,P., Ben Neriah,Y.B., Croop,J.M., and Housman,D.E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 323, 728-731.
25. Hagmann,W., Nies,A.T., Konig,J., Frey,M., Zentgraf,H., and Keppler,D. (1999). Purification of the human apical conjugate export pump MRP2 reconstitution and functional characterization as substrate-stimulated ATPase. *Eur. J. Biochem.* 265, 281-289.
26. Higgins,C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113. 30
27. Holland,K.A., and Holland,I.B. (2005). Adventures with ABC-proteins: highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 52, 309-322.
28. Hooijberg,J.H., Broxterman,H.J., Kool,M., Assaraf,Y.G., Peters,G.J., Noordhuis,P., Scheper,R.J., Borst,P., Pinedo,H.M., and Jansen,G. (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 59, 2532-2535.
29. Hooijberg,J.H., Peters,G.J., Assaraf,Y.G., Kathmann,I., Priest,D.G., Bunni,M.A., Veerman,A.J., Scheffer,G.L., Kaspers,G.J., and Jansen,G. (2003). The role of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2 and MRP3 in cellular folate homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* 65, 765-771. 40
- 【 0 0 2 2 】
30. Hopper,E., Belinsky,M.G., Zeng,H., Tosolini,A., Testa,J.R., and Kruh,G.D. (2001). Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* 162, 181-191.
31. Ilias,A., Urban,Z., Seidl,T.L., Le Saux,O., Sinko,E., Boyd,C.D., Sarkadi,B., and Varadi,A. (2002). Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J. Biol. Chem.* 277, 16860-16867.
32. Imai,Y., Asada,S., Tsukahara,S., Ishikawa,E., Tsuruo,T., and Sugimoto,Y. (20 50

- 03). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol. Pharmacol.* 64, 610-618.
33. Inagaki,N., Gonoi,T., Clement,J.P., Wang,C.Z., Aguilar-Bryan,L., Bryan,J., and Seino,S. (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16, 1011-1017.
34. Jedlitschky,G., Leier,I., Buchholz,U., Barnouin,K., Kurz,G., and Keppler,D. (1996). Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56, 988-994.
35. Jedlitschky,G., Tirschmann,K., Lubenow,L.E., Nieuwenhuis,H.K., Akkerman,J.W., Greinacher,A., and Kroemer,H.K. (2004). The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood* 104, 3603-3610. 10
36. Kartenbeck,J., Leuschner,U., Mayer,R., and Keppler,D. (1996). Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23, 1061-1066.
37. Keppler,D., Jedlitschky,G., and Leier,I. (1998). Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. *Methods Enzymol.* 292, 607-616.
38. Kiuchi,Y., Suzuki,H., Hirohashi,T., Tyson,C.A., and Sugiyama,Y. (1998). cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.* 433, 149-152. 20
39. Klugbauer,N., and Hofmann,F. (1996). Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* 391, 61-65.
40. Kool,M., van der,L.M., de Haas,M., Baas,F., and Borst,P. (1999). Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 59, 175-182.
41. Lee,K., Belinsky,M.G., Bell,D.W., Testa,J.R., and Kruh,G.D. (1998). Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res.* 58, 2741-2747. 30
42. Leier,I., Jedlitschky,G., Buchholz,U., Cole,S.P., Deeley,R.G., and Keppler,D. (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* 269, 27807-27810.
43. Luciani,M.F., Denizot,F., Savary,S., Mattei,M.G., and Chimini,G. (1994). Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21, 150-159.
44. Madon,J., Hagenbuch,B., Landmann,L., Meier,P.J., and Stieger,B. (2000). Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 57, 634-641. 40
45. Matsumura,Y., Umekawa,T., Kawamura,H., Takaoka,M., Robinson,P.S., Cook,N.D., and Morimoto,S. (1992). A simple method for measurement of phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme activity. *Life Sci.* 51, 1603-1611.
46. Mayer,R., Kartenbeck,J., Buchler,M., Jedlitschky,G., Leier,I., and Keppler,D. (1995). Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J. Cell Biol.* 131, 137-150.
47. Meier,P.J., and Boyer,J.L. (1990). Preparation of basolateral (sinusoidal) and canalicular plasma membrane vesicles for the study of hepatic transport processes. *Methods Enzymol.* 192, 534-545. 50

48. Noe, J., Stieger, B., and Meier, P.J. (2002). Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 123, 1659-1666.
49. Pavsek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J.W., and Schinkel, A.H. (2005). Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 144-152.
50. Pratt, S., Shepard, R.L., Kandasamy, R.A., Johnston, P.A., Perry, W., III, and Dantzig, A.H. (2005). The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.* 4, 855-863. 10
51. Raggers, R.J., van, H.A., Evers, R., and van, M.G. (1999). The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 3), 415-422.
52. Raggers, R.J., Vogels, I., and van, M.G. (2001). Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem. J.* 357, 859-865.
53. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van, d.H., I, Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003). The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9244-9249. 20
54. Ringpfeil, F., Lebowitz, M.G., Christiano, A.M., and Uitto, J. (2000). Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6001-6006.
55. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
56. Rius, M., Nies, A.T., Hummel-Eisenbeiss, J., Jedlitschky, G., and Keppler, D. (2003). Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38, 374-384. 30
57. Rius, M., Thon, W.F., Keppler, D., and Nies, A.T. (2005). Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. *J. Urol.* 174, 2409-2414.
58. Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A., and Scarborough, G.A. (1992). Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 4854-4858.
59. Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., and Thompson, R.J. (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* 20, 233-238. 40
60. Sun, H., Molday, R.S., and Nathans, J. (1999). Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J. Biol. Chem.* 274, 8269-8281.
61. Takeuchi, T., Yoshitomi, S., Higuchi, T., Ikemoto, K., Niwa, S., Ebihara, T., Kato, H., Yokoi, T., and Asahi, S. (2006). Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharm. Res.* 23, 1460-1472.
62. Tammur, J., Prades, C., Arnould, I., Rzhetsky, A., Hutchinson, A., Adachi, M., Sch 50

- uetz, J.D., Swoboda, K.J., Ptacek, L.J., Rosier, M., Dean, M., and Allikmets, R. (2001). Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* 273, 89-96.
63. Tanigawara, Y., Okamura, N., Hirai, M., Yasuhara, M., Ueda, K., Kioka, N., Komano, T., and Hori, R. (1992). Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 840-845.
64. Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., and Kelly, A. (1990). Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348, 741-744. 10
65. van Aubel, R.A., Smeets, P.H., Peters, J.G., Bindels, R.J., and Russel, F.G. (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 595-603.
66. Van der Bliek, A.M., Baas, F., Ten Houte, d.L., Kooiman, P.M., Van, d., V, and Borst, P. (1987). The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J.* 6, 3325-3331.
67. Volk, E.L., and Schneider, E. (2003). Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* 63, 5538-5543. 20
68. Wang, J., Sun, F., Zhang, D.W., Ma, Y., Xu, F., Belani, J.D., Cohen, J.C., Hobbs, H. H., and Xie, X.S. (2006). Sterol transfer by ABCG5 and ABCG8: In vitro assay and reconstitution. *J. Biol. Chem.*
69. Wielinga, P., Hooijberg, J.H., Gunnarsdottir, S., Kathmann, I., Reid, G., Zelcer, N., van der, B.K., de, H.M., van, d.H., I, Kaspers, G., Wijnholds, J., Jansen, G., Peters, G., and Borst, P. (2005). The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* 65, 4425-4430.
70. Young, S.G., and Fielding, C.J. (1999). The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* 22, 316-318. 30
71. Zelcer, N., Reid, G., Wielinga, P., Kuil, A., van, d.H., I, Schuetz, J.D., and Borst, P. (2003). Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem. J.* 371, 361-367.
72. Zeng, H., Liu, G., Rea, P.A., and Kruh, G.D. (2000). Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res.* 60, 4779-4784.

【配列表】

0005161219000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/78 C
C 1 2 Q 1/02 Z N A

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(72)発明者 クイ ユンハイ
ドイツ連邦共和国 8 8 4 0 0 ビベラッハ ゲオルク シンバイン シュトラーセ 6 8

審査官 三木 隆

(56)参考文献 国際公開第2005/054852 (WO, A1)
特表2004-506754 (JP, A)
特表2007-535529 (JP, A)
特開2006-197832 (JP, A)
特表2003-513611 (JP, A)
特開昭62-047555 (JP, A)
特表2000-501171 (JP, A)
特表2004-537265 (JP, A)
WILLIAMS J B, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 米国, ACADEMIC PRESS, 2003年10月 1日, V
321 N1, P31-37
HUI XIN, ACTA PHARMACOLOGICA SINICA, 2005年10月, V26 N10, P1175-1180
J Am Soc Nephrol, 2002年, Vol.13, No.3, Page.595-603

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/543
G01N 21/78
G01N 33/15
G01N 33/50
C12Q 1/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)