

平成 22 年 06 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790048
 研究課題名（和文）ナノ構造電極界面を用いた CYP の電気化学酵素反応制御法の開発と応用
 研究課題名（英文）Electrochemically-driven CYP reactions with nanostructured electrode surfaces
 研究代表者
 三重 安弘（MIE YASUHIRO）
 独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノムファクトリー研究部門・研究員
 研究者番号：00415746

研究成果の概要（和文）：ヒト薬物代謝酵素（CYP）の薬剤代謝能力を低コストで迅速に測定可能な新しい手法を開発するために、電氣的にその能力を調べる技術開発を行った。様々な表面状態を有する電極の作製と試験を行った結果、酵素サイズのナノ凹凸を有する界面を用いると、電圧を印加して電流を計るだけの非常にシンプルな方法で CYP の薬剤代謝活性を計測できる可能性があることを発見した。本成果は安全で有効な薬物療法の実現に役立つ基盤技術になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Human cytochrome P450s (CYPs) play the most crucial role in drug metabolism. Single nucleotide polymorphisms of CYPs are partially responsible for differences in drug effects among individuals. Also, drug metabolism via the CYPs can cause drug-drug/drug-food interactions that result in toxicities and so on. Therefore, drug metabolism reaction measurements using human CYPs are very important in drug development. However, current methods to assay CYP reactions need some expensive assay components and time-consuming analyses. Electrochemical (EC) technique is a promising approach to accomplish inexpensive and rapid assays. In the present study, we prepared several kinds of electrodes with different surface conditions and found that the electrodes having nano-scale “dent” surfaces with thin hydrophobic coatings of aromatic compounds were very effective to drive CYP reactions. This can be a useful technology to develop tailored (safe and effective) therapeutics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学

1. 研究開始当初の背景

ヒトシトクロム P450 (CYP) は、薬物代謝において重要な働きを担っている酵素であり、市販薬の約 95% が CYP 酵素により代謝を受けると言われている。CYP による薬剤の代謝(分解)され具合は、CYP の一塩基多型による個人差や薬-薬および薬-食品の飲み合わせ(食べ合わせ)により大きく異なり、副作用の原因の 1 つとなっている。すなわち、個人に対応した安全で有効な薬物療法の実現において、CYP の薬物および薬物候補化合物に対する代謝活性を計測することは非常に重要である。しかしながら、現在の計測法では高価な試薬で CYP 反応を駆動して分光法で代謝物を分析する方法のためコストと時間を要することが問題となっている。

2. 研究の目的

安価な電極と電気化学装置を用いて、電圧印加により CYP 酵素反応を駆動し、電流 (= 代謝反応速度に比例) 計測により活性を測定する技術、すなわち低コストで迅速な CYP の薬物代謝活性計測法の基盤技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

通常の電極では、CYP 酵素反応を駆動すること (= 電極から CYP に電子を供給すること) は困難であるため、CYP 分子の電極への固定化や安定性、電極-CYP 間の電子移動効率等を考慮しながら、様々な状態の電極界面構造を作製・評価し、CYP の電気化学計測に適用・検討を行った(図 1)。

電極界面の機能化(コーティング)は、親水基、疎水基や酵素と結合可能な官能基等を有する有機分子を電極界面上に配列させる自己組織化法を主に用いて行った。またナノ構造電極界面の作製は、界面の酸化還元処理法、微粒子電着法、メッキ法、ポラス鑄型法やスパッタリング法を用いて行った。作製した界面の状態は、高感度反射赤外分光法や原子間力顕微鏡を用いた観察により評価した。CYP 分子の電極界面上への固定化は、高感度反射赤外分光法及び水晶振動子マイク

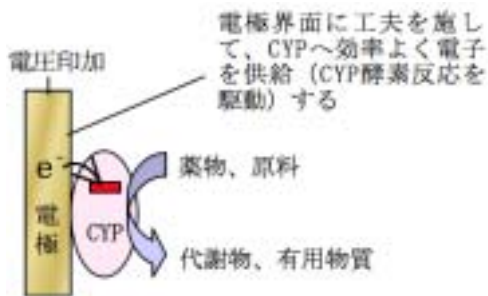


図1 電氣的に酵素反応を駆動する概念図

ロバランス法により確認した。電極界面上へ

固定化した CYP の電気化学計測(電圧印加により CYP-電極間に迅速な電子移動が起こるかかどうか)は、主にサイクリックボルタメトリー法により評価を行った。

4. 研究成果

上記方法により研究を行い、主に以下の成果を得ることができた。

(1) アミノ基、カルボキシル基やポリエチレングルコール基を有する親水性の有機分子と芳香族環やアルキル基を有する疎水性の有機分子を用いて、親水的なドメインと疎水的なドメインを有する電極界面構造を作製し、CYP 分子の固定化と電気化学応答を検討したところ、疎水性ドメインに CYP 分子が安定に固定化されることを見出した。また、電極から CYP へ電子を供給して酵素反応を駆動するためには、アルキル基よりも芳香族分子により構築された疎水性界面構造が特に有効であることも明らかにした。また、下記(3)および(5)に示すように電極で CYP 酵素を駆動し薬物代謝反応が進行することを明らかにした。一方、負電荷を有する分子をコーティングした界面や合成脂質分子を用いても CYP 分子を電極上に固定化でき、電極-CYP 間の電子移動反応を起こすことができたが、薬物代謝反応は進行せず、基質結合に適していない状態で CYP 酵素が固定化されていることが明らかになった。

(2) 酸化還元処理法、微粒子電着法や無電解メッキ法等の様々な方法を用いてナノ構造電極界面を作製し、疎水性薄膜による CYP 分子の固定化と電極応答を調べたところ、酵素サイズのナノ窪みを有する界面が CYP の電気

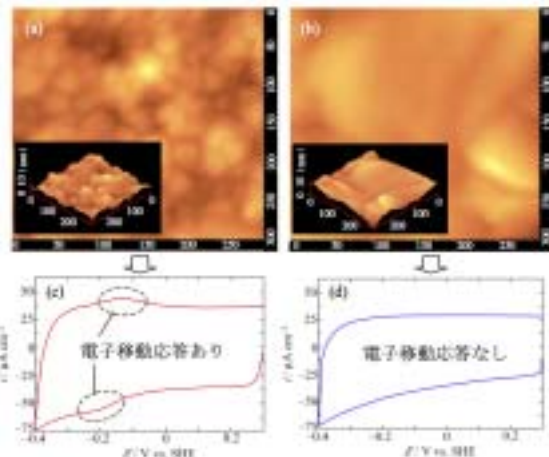


図2 CYPの電極駆動に有効な電極界面(a)と無効な電極界面(b)及びそれぞれの界面にCYPを固定化した場合の電極応答(c, d)

化学応答に非常に有用であることが明らか

になった(図2:ナノ窪みを有する電極界面上にCYP分子を固定化した場合は、サイクリックボルタンメトリー測定においてCYP-電極間の電子移動応答に由来するピーク電流が明瞭に観測された(a, c);一方、より平滑な界面を有する電極界面上に固定化した場合には、CYP-電極間の明瞭な電子移動応答は観測されなかった(b, d))。また、汎用的なスパッタリング法を用いた同界面の作製及びCYPの電気化学駆動に成功し、工業利用にも有意であることを示すことができた。

(3) (1)および(2)で得られたCYPの電極駆動に適した界面を、薬物研究現場で用いられているCYP試料(CYP分子が脂質膜に結合した状態の試料:ミクロソーム試料)に適用したところ、比較的安定に固定化されることを見出し、さらに電極駆動による薬物代謝反応を進行させることに成功した。

(4) 上記ナノ構造電極を用いて、ヒトCYPの主要な分子種であるCYP3A4およびCYP2C9の電気化学酵素反応解析を行ったところ、適切な条件下において、それぞれの基質薬物に対する K_m 値(CYP酵素と基質の親和性に関するパラメーター)を評価することができ、得られた値は既存の手法で求められている値と比較できるものであった。すなわち、電極上で(電圧印加により)CYPによる薬物代謝反応が適切に進行することが示唆された。

(5) CYP3A4を固定化したナノ構造電極を用いてテストステロンの電解反応(CYP固定化電極を基質薬物(テストステロン)を含む溶液中に浸漬して、0.3V(vs.標準水素電極)の電圧を数時間印加)を検討したところ、クロマトグラフィー分析により6-水酸化テストステロンが主要反応生成物として確認され、電極(電圧)駆動による医薬品代謝物の簡便な合成を行えることが示された。

本研究で得られた成果は、新薬開発における代謝検査や薬の飲み合わせ・食べ合わせ検査等を低コストで迅速に行うための基盤技術になり、安全で有効な薬物療法の実現に寄与できると期待される。また、CYPの物質変換能力を利用する有用物質生産技術へ応用する場合にも重要な技術になると考えられる。しかしながら、電気化学測定の繰り返しによるCYP酵素の安定性は充分ではなく、今後は電圧印加に対する酵素の安定性向上が重要な課題になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

三重安弘、池上真志樹、小松康雄、Gold sputtered electrode surfaces enhance direct electron transfer reactions of human cytochrome P450s, Electrochem. Commun., 査読有、12巻、2010、680-683

三重安弘、鈴木正昭、小松康雄、Electrochemically driven drug metabolism reaction by membrane containing human cytochrome P450, J. Am. Chem. Soc., 査読有、131巻、2009、6646-6647

[学会発表](計5件)

三重安弘、ナノ構造電極を利用したヒトCYPミクロソームの簡便・迅速アッセイの検討、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山

三重安弘、ナノ構造を有する電極を電子供給基質としたシトクロムP450反応の駆動と計測、第47回日本生物物理学会年会、2009年10月30日、徳島

三重安弘、Electrochemically-driven Drug Metabolism by Human Cytochrome P450 Immobilized on Hydrophobic Electrode Surface、16th International Conference on Cytochrome P450、2009年6月23日、名護

三重安弘、ヒトシトクロムP450ミクロソームの簡便・安価・迅速アッセイ法の開発、日本薬学会第129年会、2009年3月27日、京都

三重安弘、疎水性電極界面を用いた膜結合型シトクロムP450の電気化学分析、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月3日、福岡

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称:酸化還元タンパク質固定化ナノ構造電極

発明者:三重安弘、池上真志樹、小松康雄

権利者:独立行政法人産業技術総合研究所

種類:特許

番号:特願2009-221129

出願年月日:2009年9月25日

国内外の別:国内

名称:酸化還元タンパク質含有脂質膜が固定化された電極

発明者：三重安弘、小松康雄
権利者：独立行政法人産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2008-253720
出願年月日：2008 年 9 月 30 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/research.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三重 安弘 (MIE YASUHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノム
ファクトリー研究部門・研究員

研究者番号：00415746