

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659023

研究課題名（和文）CYP on a Chip

～銀チップ電極によるCYPの薬物代謝迅速評価～

研究課題名（英文）CYP on a Chip ~Rapid Evaluation of CYP Drug Metabolism with Silver Chip Electrode~

研究代表者

宇野 公之（UNO TADAYUKI）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00183020

研究成果の概要（和文）：シトクロム P450（CYP）はヒト薬物代謝の中心的役割を演じる重要な酵素であるが、いくつかのアイソフォームがある上に基質特異性がきわめて低いため、CYP による薬物代謝の理解がきわめて困難である。そこで本研究では、電気化学を利用した CYP の薬物代謝活性評価系の構築を目指した。CYP の還元に必要な電位において銀電極は酸化銀を生じたため、より安定な金電極を用いて実験を行った。種々のコーティング剤を試した結果、メルカプトウンデカン酸とメルカプトウンデカノールの混合溶液を用いたときに CYP2C9 の酸化還元波を測定できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Cytochrome P450 (CYP) is a group of enzymes that play key roles in the drug metabolism in human, but comprehensive studies of CYP have been very difficult, because CYP enzymes contain various isoforms and their drug specificities are quite low. In this study, I aimed at construction of evaluating system for CYP drug metabolism electrochemically. Charging an electric potential for CYP reduction, silver electrode was found to produce silver oxide, and hence I used gold electrode which is more stable than silver. Applying various coating reagents, I found that a mixed solution containing mercaptoundecanoic acid and mercaptoundecanol could result in measurement of redox wave of CYP2C9.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：シトクロム P450、薬物代謝、一塩基多型、電気化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究動向と位置づけ（CYP と薬物の対応関係）シトクロム P450（CYP）はヒト薬物代謝の中心的役割を演じる重要な酵素であり、5種のヒト肝 CYP（1A2、2C9、2C19、2D6、3A4）によって市販薬物の90%以上が代謝される。現在我が国の市販薬物は約2,800種類あるが、このことはひとつのCYPが数百種類の薬物の代謝に関わることを示している。その一方、逆にひとつの薬物が複数のCYPで代

謝を受ける場合も数多く存在する（たとえば抗うつ薬アミトリプチリンはCYP1A2、2C19、2D6でも代謝される）。このように、CYPとその基質となる薬物とは多対多の関係にあり、CYPによる薬物代謝の理解をきわめて困難にしている。さらに、ヒトゲノムの一塩基多型（SNP）は薬効の個人差を引き起こすが、その現れ方はCYPと薬物との組み合わせ毎に異なるため、両者の対応関係を解明することが急務となっている。

(2) 研究成果と着想の経緯 (ハイスループット化の必要性) 以上のような背景のもと、研究代表者は可溶性 CYP の大量発現系を構築し、微量平衡透析法によって野生型及び SNP 変異をもつ CYP の薬物特異性をスクリーニングする手法を開発した。この手法で得られた薬物解離定数 K_d は、薬物代謝活性の測定から得られたミカエリス定数 K_m とよく相関したことから、薬物に対する CYP の基質特異性を微量平衡透析法によって K_d から簡便に判定できることが明らかとなった。しかしながら、臨床の場で使用されている薬物は数多く存在するため、さらなるハイスループット化の必要性を強く感じた。そこで、電気化学を利用した CYP の構造と活性に関する高感度迅速分析法の構築を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、大量調製法を確立した CYP を用いて電極への CYP 固定化法を最適化し、CYP の薬物代謝反応にともなう電極上での電子のやりとりを測定することにより、代謝活性を迅速かつ簡便に評価する手法を構築することを目的とした。この手法を5種の CYP や SNP 変異体へと適用することにより、CYP の構造と活性に関するハイスループット測定系の確立を目指した。

本研究により、上記1. (1)で述べた CYP と薬物との対応関係を容易に解明することができ、SNP による副作用の発現を予知して最小限に抑制可能になる。そのため、薬の副作用に苦しむ多くの人々を救うのみでなく、副作用の治療に必要な出費を抑え、ひいては我が国の医療費削減をもたらすことが期待される。また、薬の安全性を担保するため、製薬企業では無数とも言える薬物候補の代謝が調べられているが、この過程は時間と費用の面で医薬品開発のボトルネックとなっている。本研究成果を適用すれば医薬品開発を大幅に効率化できるため、広く人類の健康に貢献できる。

3. 研究の方法

(1) 可溶性 CYP の調製 ヒトの CYP は膜タンパク質であるがゆえに精製が難しく、界面活性剤を用いた可溶化では変性しがちであるが、研究代表者はアミノ末端の膜貫通領域を欠失させて CYP を可溶性とすることによりこの問題を解決した。本標品は可溶性の性質を保ちつつ、膜断片標品と同等の薬物代謝活性を持つことを確認済みである。また、研究代表者は5種の CYP すべてについて大量発現系を構築し、すでに各 CYP あたり10種類程度の SNP 変異体を作製済みである。本研究ではこれら調製済みの CYP のうち、主として一番

安定な CYP2C9 を用いて検討を行った。また、CYP と同様に塩基性残基を含むシトクロム c を用い、条件検討を行った。

(2) 銀電極の表面加工 まず、市販の銀電極を作用電極として酸化還元サイクル処理を行った。アルミナ研磨紙を使用して電極表面を鏡面仕上げし、脱気した 0.1 M HCl 溶液中で -1000 mV を5分間印加した後、+1200 mV (酸化) を30秒、-280 mV (還元) を30秒印加し、この酸化還元サイクルを20回繰り返した (参照電極: Ag/AgCl、対極: Pt)。酸化により電極表面の銀は Ag^+ となり、溶液中の Cl^- と反応して電極表面に AgCl が堆積するが、還元により Ag が再生して銀電極へと戻る。このサイクルにより銀電極に凹凸を生じさせ、100 nm 程度の粗面を形成させた。この電極をエタノールに溶解した種々のメルカプトカルボン酸に浸し、一晚放置した。メルカプトカルボン酸はチオール基で銀に配位するため、電極表面に固定される。これをエタノールですすいだ後、CYP を含む溶液に浸して CYP を電極表面に吸着させた。また、メルカプトカルボン酸としてはメルカプト酢酸、3-メルカプトプロピオン酸、*p*-メルカプト安息香酸、メルカプトコハク酸、メルカプトウンデカン酸 (すべて Aldrich から購入) 等を用い、鎖長の効果を検討して最適なものを選別した。

4. 研究成果

(1) cyt. c の電位測定 最初に、何も処理をしておらず、表面が平らな電極を用いて 0.1 mM cyt. c 溶液のサイクリックボルタンメトリー (CV) を測定した。参照電極として Ag/AgCl ($E_0 = 199$ mV vs NHE at 25°C) を使用し、電位は +200 mV ~ -200 mV の範囲で掃引した (測定は3サイクル連続で行った)。まず、作用電極に銀電極を用いた場合、還元波も酸化波も検出することができなかった。そこで同様の測定を金電極で行ったところ、還元波、酸化波を検出することに成功した。この時の還元電位 E_{pc} 及び酸化電位 E_{pa} はそれぞれおよそ 20 mV と 80 mV であり、酸化還元電位 E_0 は 50 mV (vs Ag/AgCl) と計算された。この値は既報の cyt. c の酸化還元電位と近い値になった。そこで、以降はこの CV の結果を参考にして銀電極への cyt. c の固定化の確認を行った。

(2) コーティング剤による固定化 実際に銀電極表面にタンパク質を固定化するに当たり、酸化還元サイクルをほどこした (ORC 処理)。ORC 処理とは、0.1 M HCl 溶液中で電極に一定電圧下で一定時間電流を流し続け

ることで、電極表面にナノサイズの凹凸をつける方法である。同処理をまず施した後コーティングを行うことで、電極表面に自己集合単分子層 (SAM) を形成させ、cyt. *c* の効率的な表面吸着を目指した。まず、11-メルカプトウンデカン酸 (11-MUA) を用いてコーティングを行ったが、cyt. *c* を加えて測定した CV では cyt. *c* の酸化波や還元波を観測できなかった。そこで、11-MUA と炭素鎖数は等しいが末端が水酸基となっている 11-メルカプトウンデカノール (11-MUAL) に着目した。コーティングを行う際、カルボン酸にアルコールを混合すると炭素鎖の配向性が改善され、その結果タンパク質との吸着性が向上するとともに、タンパク質と電極との間で電子の授受速度が向上することが報告されている。また、アルキル鎖が長い方が SAM の安定性が高く、短いと分子集積構造が乱れることが知られているため、鎖長が長い 11-MUA と 11-MUAL を選択した。改めて ORC 処理の条件も含め、コーティング剤として用いる 11-MUA と 11-MUAL との比率等を検討した結果、以下の手順を用いた場合に最良の結果が得られた。

- ORC 処理 : 0.1 M HCl 溶液中で 0.28 V で 30 秒間通電した後、1.22 V で再度 30 秒通電した。これを 1 サイクルとし、連続で 20 サイクル行った。その後電極を Milli-Q そしてアセトンの順で洗浄した。
- コーティング : 1 mM 11-MUA、3 mM 11-MUAL を含む 50% エタノール溶液を用時調製し、上記の ORC 処理を施した電極を浸して 48 時間室温で放置した。その後電極を 50% エタノールで洗浄した。
- cyt. *c* の吸着 : コーティング後の電極を 0.1 mM cyt. *c* 溶液に浸して 4 時間、4°C で放置した。

以上の手順で cyt. *c* の固定化を行った結果、還元波と酸化波を確認することができた。このときの E_0 もおよそ 50 mV (vs Ag/AgCl) となり、金電極を用いた際の結果とほぼ一致したため、銀電極を用いた場合でも上記の手法を用いることで cyt. *c* の酸化還元電位を測定出来ることがわかった。しかし、金電極を用いた場合とは異なり、電極を用いて測定を連続して行っていくと、3 回目の測定でピークはほぼ消失した。これは、最初の時点では電極表面と cyt. *c* が静電的相互作用により吸着していたものの、この結合が弱いため数回の測定によって電極表面から外れてしまったと考えた。

(3) 共有結合による固定化 そこで次に、カルボン酸との縮合反応による cyt. *c* の固定化について検討した。用いた縮合試薬は、1-エ

チル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) と *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) であり、11-MUA のカルボン酸を反応性の NHS エステルとした後、タンパク質のアミノ基とアミド結合で固定化することができる。コーティング剤に浸す工程までは前述の手順にしたがい、cyt. *c* を吸着させる前の段階に、用時調製した 10 mM EDC、25 mM NHS を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液に電極を浸して 2 時間、4°C で放置した。その後、cyt. *c* を吸着させた後、100 mM リン酸カリウム緩衝液で電極表面を洗浄し、過剰に付着した cyt. *c* を洗浄した。

以上の工程を経て、電極を 100 mM リン酸カリウム緩衝液中に入れて CV 測定を行った。その結果、還元波及び酸化波をはっきりと観察することができた。連続して測定を行ううちに電流値はやや減少したが、ピークの形はほぼ変化しなかった。そこで次に、cyt. *c* が緩衝液中に流れ出てしまっていないかを確認するために、電極を浸していたセル中の 100 mM リン酸カリウム緩衝液を交換した。その後同様に測定を行った結果、ピークの形も電流値も緩衝液交換前とほとんど変わらず、さらに連続して測定を行っても変化はなかった。以上の結果より、cyt. *c* については銀電極の表面に固定化することに成功し、さらに同じ電極を用いて何度も測定を行うに耐え得ることが明らかとなった。

(4) CYP の固定化

cyt. *c* を用いた以上の結果を踏まえ、CYP 2C9 を用いた検討を進めた。CYP ではヘム鉄の軸配位子が Cys 残基由来のチオレートとなっているため、酸化型ヘムが安定化され、酸化還元電位がより負に傾く。そこで、(2) で得られた条件で電極をコーティング処理し、-500 mV ~ +500 mV の電位を印加したところ、銀電極の表面が黒化した。これは、電極の銀が溶存酸素と反応して酸化銀が生成したためだと考えられた。溶液を窒素ガスでパージして同様に検討したが、改善されなかった。そこで、銀より安定な金電極に変えて以後の検討を行った。(2) での条件で金電極をコーティング処理し、CV 測定を行った。電位を掃引する過程で還元波は観測されたものの酸化波は観測されなかった。これは、電気的に還元された CYP が溶存酸素によりすみやかに酸化されたためだと考えられた。そこで、還元波の観測を中心に検討を続けた。種々のメルカプト酸を試した結果、cyt. *c* と同様に 1 mM 11-MUA、3 mM 11-MUAL の混合溶液を用いたときに、CYP2C9 の還元波を測定できることがわかった。しかしながら、ピーク電流が小さかったため、CYP2C9 の結合量を増やすべく、上記 (3) の手法

で電極に共有結合でCYPを固定することを試みたところ、わずかながら改善が見られた。

(5) 総括 以上のように、本研究ではまず cyt. *c* を用いて電極のコーティング、及び縮合反応によるタンパク質の固定化条件を検討した。確立された方法を用いて CYP2C9 の CV 測定を行った結果、還元波の観測に成功した。11-MUA と 11-MUAL という 2 種のコーティング剤を一緒に用いた結果、おそらく電極表面での配向性や集積性が改善され、SAM の形成がうまくいったものと思われる。また、縮合反応により CV 測定の改善が見られたのは、静電的引力による電極表面への CYP の結合があまり強くなかったためであると考えられる。一方、電流値が低かったのは、おそらく用いたコーティング剤が長いため、電極表面からタンパク質が遠ざかったことに由来すると思われる。ただし、炭素鎖が短いと SAM の形成度が悪くなるため、タンパク質の固定化量を増やす工夫が必要であると考えられる。CYP2C9 の場合、酸化波の観測はできなかったが、これは新たに本研究室に設置されたグローブボックスを活用し、溶存酸素を除去することで対応できると思われる。いずれにしても、CYP による基質代謝反応を観測するためには酸素分子が必要であるため、還元波が観測されたのは一定の成果であると考えている。

薬物との競合によって化学発光性基質の代謝反応が阻害されることを指標とし、各 CYP に対する薬物特異性を調べるキットが市販されている。しかしながらこの手法では、酵素反応を追跡するのに時間と手間がかかる上、基質と阻害剤を区別できない難点がある。これに対し、電極反応を利用する本研究の手法では、酵素反応の経時変化を追うことなく定電流から反応速度を解析できるという利点がある。さらなる改善の余地はあるものの、本研究で構築した測定系は、安価な装置のみを用いる点で汎用性に優れており、医薬品の適正使用や創薬の領域における薬物代謝の問題点を解決するのに大きく貢献できると考えられる。

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 1 件)

- (1) Tamer Zekry Attia, Taku Yamashita, Masayoshi Miyamoto, Atsushi Koizumi, Yuki Yasuhara, Jun-ichi Node, Yumi Erikawa, Yumi Komiyama, Chiaki Horii, Mayu Yamada, Mahmoud Ahmad Omar, Osama

Hassan Abdelmageed, Sayed Mohamed Derayea, and Tadayuki Uno
Comparison of Cytochrome P450 Mediated Metabolism of Three CNS Acting Drugs
Chem. Pharm. Bull. **60**, 1544-1549 (2012)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/60/12/60_c12-00719/_article

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Takashi NAKAMURA, Yumi KOMIYAMA, Hirofumi TSUJINO, Taku YAMASHITA, and Tadavuki UNO

Construction of novel sensitive system to evaluate drug affinities for CYPs with Ag/Au nanoparticles

第23回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 西東京 2013. 6. 21

- (2) Taku Yamashita, Tamer Zekry Attia, Masayoshi Miyamoto, Atsushi Koizumi, Yuki Yasuhara, Jun-ichi Node, Yumi Erikawa, Yumi Komiyama, Chiaki Horii, Mayu Yamada, Mahmoud Ahmad Omar, Osama Hassan Abdelmageed, Sayed Mohamed Derayea, and Tadayuki Uno

Comparison of Cytochrome P450 Mediated Metabolism of Three CNS Acting Drugs

50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450 in Fukuoka
Fukuoka 2012. 12. 3

- (3) 宇野公之、小宮山祐美、金森美果、山下沢、青山浩

Construction of Ag nanoparticle system sensitive to the active site structure in heme proteins

第21回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 千葉 2011. 5. 30

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b006/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 公之 (UNO TADAYUKI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00183020

(2) 研究協力者

(大阪大学・薬学研究科・博士前期課程)

宮本 正芳、野出 純一、小泉 温史

(大阪大学・薬学部・薬学科)

山田 麻由、小宮山 祐美