

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 5 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790065

研究課題名（和文） 高効率薬物代謝アッセイのためのミクロソーム電極の創製

研究課題名（英文） Development of microsome electrode for efficient drug Metabolism assay

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・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：00415746

研究成果の概要（和文）：薬物代謝酵素を含有するミクロソーム試料を用いて薬物の代謝率を計測することは、医薬品開発や薬物投与設計において極めて重要である。しかしながら、現在のアッセイ法は低感度で時間を要するといった問題を有している。本研究では、高感度で迅速な計測が可能な新しいアッセイ法の開発を目指し、ミクロソームの電極界面上への適切な固定化および電圧を掛けることによる薬物代謝酵素反応の駆動と活性評価を可能にするミクロソーム固定化電極の開発を行った。電極界面を核酸分子で適切にコーティングすると、比較的安定に該薬物代謝酵素反応を電気化学駆動できることを見出し、前記目的のための要素技術の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：Microsome containing 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 microsome CYPs can cause drug-drug/drug-food interactions that result in toxicities and so on. Hence, evaluating the drug metabolism activity for microsome is important for drug researches and personalized therapeutics. However, the current method to assay the activity is low-sensitive and time-consuming. Electrochemical technique is a promising approach to accomplish highly-sensitive and rapid assays. In the present study, many kinds of modified electrodes with biomolecules such as nucleic acids and so on were prepared and applied for immobilization and electrochemical investigation of microsome. We found that nucleic acid molecules can be the effective coating-materials on the electrode surface for the electrochemical microsome reaction.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：電気化学アッセイ、ミクロソームアッセイ

1. 研究開始当初の背景

ヒトシトクロム P450(CYP)は、脂質膜に結合したミクロソーム体として生体内に存在し、非常に多くの薬物の代謝に関与する薬物代謝酵素であり、基質特異性の異なる多数の分子種が知られている。各 CYP 分子種の一

塩基多型による活性の相違や、薬物と薬物(又は食品)の飲み合わせによる代謝活性阻害(副作用)に関する情報は、医薬品開発や薬物投与設計において極めて重要であり、CYP の薬物及び薬物候補化合物に対する代謝活性を計測することには大きな需要がある。しかしな

がら、現在の CYP 代謝反応の評価法(還元系試薬群を用いて酵素反応を駆動し反応物を光学的に検出する手法)は、以下の3つの問題点を有する。1)低感度であるため貴重な CYP 試料を計測に多量に要する。2)酵素を活性化するための還元系試薬(NADPH やその再生酵素等)が高価である。3)酵素反応生成物を蓄積して検出・分析するため活性評価に時間を要する。これら問題点が薬物代謝研究の弊害となっている。

2. 研究の目的

上記問題を解決する方法として、マイクロソームを電極上に固定し電圧印加により電極からマイクロソームに電子を注入して、薬物代謝酵素反応を駆動する方法が注目されている。この方法では、高価な酵素活性化試薬が不要で、流れた電流からリアルタイムに代謝活性を評価できる。また、フェムトモルの酵素分子の反応を容易に捉えられることから、従来法に比べて高感度に計測できる利点も有している。しかしながら、電極からマイクロソーム酵素に電子を供給することは、通常困難である。これは電極界面が酵素本来の基質の性質と異なるため、電極-酵素活性中心間に適切な電子移動経路が形成されにくいことや、金属電極界面上での酵素の変性によると考えられている。

そこで、本研究では、マイクロソームの電極界面上への適切な固定化、電圧を掛ける(印加すること)による薬物代謝反応の駆動、および反応の駆動により流れる電流から薬物代謝率を評価、の3つを可能にするマイクロソーム固定化電極を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに、ナノ凹凸構造を有する電極界面を用いると、酸化還元酵素の電気化学駆動に有用であることを見出している。そこで、該ナノ構造を作製し、同界面上に導電性高分子材料を用いた修飾機能化(コーティング)を試み、マイクロソーム試料の固定化および電気化学計測を行い、安定に薬物代謝反応を駆動・計測可能なマイクロソーム電極を構築することを目指した(図1)。

ナノ凹凸構造を有する(金)電極は、イオンスパッタリング法や酸化還元サイクル法により作製した。作製した電極界面のコーティングは、種々のコーティング剤を単独および混合した溶液を用いて、主に電極界面を該溶液に浸漬することで行った。コーティング剤として、高い生体親和性が期待される核酸分子や有機系導電性高分子を検討した。作製した界面の状態は、高感度反射赤外分光法や走査型プローブ顕微鏡を用いた観察により評価した。マイクロソーム試料の電極界面上への固定化は、ナノ凹凸修飾機能化金電極界面

上に滴下・静置することで行い、洗浄後使用した。マイクロソームの該界面上への固定量を、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法により確認した。作製したマイクロソーム電極の電気化学計測を、主にサイクリックボルタメトリー法および電気化学インピーダンス法により評価し、電気化学薬物代謝反応を解析した。

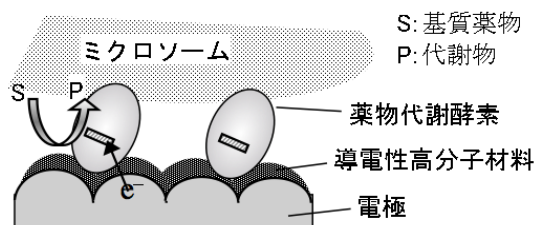


図1 本研究で開発するマイクロソーム電極

4. 研究成果

前記手法により研究開発を進行させ、主に以下の成果を得ることができた。

(1) ポリアニリン等の有機系導電性高分子を、種々の条件にて電極界面上へ構築(コーティング)しマイクロソームの固定化および電気化学計測を調査したところ、マイクロソーム中の薬剤代謝酵素の駆動・計測には至らず、該目的に有用と期待されるナノ構造の構築、マイクロソーム電極の創製は困難であった。有機系導電性高分子とマイクロソーム中の薬物代謝酵素(CYP)との電気的な接触が小さかったことおよび同界面上での酵素分子の失活が主要因として考察された。そこで、より生体親和性が高いと考えられる導電性材料の二本鎖核酸分子を用いた系の検討を行った。

(2) 市販の長鎖DNA分子およびマスキング剤として水酸基を有する有機分子等を用いて、電極界面にコーティングを施すことで、マイクロソーム中の薬剤代謝酵素の駆動・計測に有用と期待される界面構造の構築が示唆された。そこで、マイクロソーム試料の固定化および電気化学計測を種々の条件下で行ったところ、特定条件において薬物代謝反応を計測することができた。しかしながら、応答が不安定であることも明らかとなった。原因として電極界面からのマイクロソーム試料およびDNA分子の剥離が示唆された。

(3) そこで、末端修飾を施した二本鎖DNA分子を用い、より強固に電極界面上へ該分子をコーティングすることを試みた。この場合、前記(2)と同様にマスキング剤と組み合わせることで、マイクロソームの薬物代謝反応駆

動に好ましいと考えられる界面構造を構築できた。また、得られた界面の導電性特性を詳細に検討したところ、DNA 末端化学構造のフレキシビリティが、作製したコーティング電極界面の界面電子移動特性に大きく影響することを発見し、国際学会及び論文発表を行った。電極界面とマイクロソーム中の酵素分子を電気的に繋ぐための重要な知見を得ることができた。

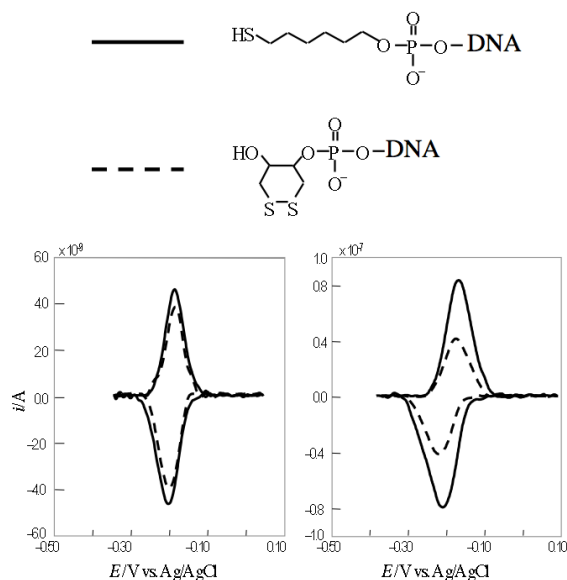


図2 2種のDNA末端修飾構造(上)とそれらDNA分子をコーティングした電極界面の電子移動応答(サイクリックボルタモグラム、下左:電位掃引速度が遅い場合、下右:電位掃引速度が速い場合)。修飾構造により、電位掃引速度に対する電流応答が大きくなる事がわかる。

(4) 前記(3)の知見を基に、2本鎖DNAコーティングを種々の条件下で行い、得られる界面上へのマイクロソーム試料の固定化および薬物代謝反応の電気化学応答を調べた。電極界面のマスキング剤、印加電圧や固定化時間等により、得られる電気化学応答が異なることが明らかとなった。特定の条件下においては、比較的安定に電気化学薬物代謝反応を計測することができた。薬物として糖尿病治療薬を用いた系に適用し、野生型およびallelic変異体薬物代謝酵素による代謝反応を詳細に解析したところ、得られた薬物親和性や代謝速度などの酵素反応パラメータの相関性は、従来の溶液系で評価されたものと一致した。

以上より、電気化学的にマイクロソーム薬物代謝反応を計測することに成功した。

本研究で得られた成果は、創薬開発の早期段階における医薬品候補化合物のマイクロソーム代謝試験や薬の飲み合わせ・食べ合わせ検査等を高感度かつ迅速に計測する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。しかしながら、

現状として電極間による誤差が大きく、定量性に課題を有する。今後は、これを解決する技術開発が重要と考えられる。

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)

① 三重安弘、小綿恵子、小島直、小松康雄、Electrochemical Properties of Interstrand Cross-linked DNA Duplexes Labeled with Nile Blue, Langmuir, 査読有、28巻、2012、17211-17216
DOI: 10.1021/la3036538

② 三重安弘、小島直、小綿恵子、小松康雄、End-tether structure of DNA alters electron-transfer pathway of redox-labeled oligo-DNA duplex at electrode surface, Chem. Lett., 査読有、41巻、2012、62-64
DOI:10.1246/cl.2012.62

[学会発表] (計7件)

① 三重安弘、CYP薬剤代謝アッセイ及びCYP反応による医薬品代謝物生産の効率化技術の開発、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、バンフィコ横浜(神奈川県)

② 三重安弘、Electrochemically-driven P450 Reactions toward Efficient Drug Metabolism Analysis and Bioproduction, 50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450, 2012年12月2日、九州大学(福岡県)

③ 三重安弘、Electrochemistry of Interstrand Cross-linked Redox-DNAs, The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2012年11月16日、名古屋大学(愛知県)

④ 三重安弘、有機薄膜電極上でのP450反応の電気化学制御と応用、第50回日本生物物理学会、2012年9月23日、名古屋大学(愛知県)

⑤ 三重安弘、レドックスDNAの電極上での配向及び電子移動に及ぼすDNA末端テザー構造の影響、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学(北海道)

- ⑥ 三重安弘、Development of Electrode Surface for Cost-effective Assay of CYP Microsomes、日本薬学会第132年会、2012年3月31日、北海道大学（北海道）
- ⑦ 三重安弘、Effect of End-tether Structure of Redox-DNA on its Electron Transfer Pathway at Electrode Surface、第38回国際核酸化学シンポジウム、2011年11月10日、北海道大学（北海道）

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/research2.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・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：00415746