

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460055

研究課題名(和文) 高効率・高感度な薬物代謝マルチアッセイシステムの開発

研究課題名(英文) Highly efficient and sensitive analysis of multiplex drug metabolism reactions

研究代表者

三重 安弘 (Mie, Yasuhiro)

国立研究開発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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬物代謝酵素を用いて、薬物および薬物候補化合物の代謝率を計測することは、薬物投与設計や医薬品開発において重要であり、より効率的な計測法の開発が望まれている。これまでに当該酵素の薬物代謝反応が電極上で進行する現象を見出し、電気化学検出法による高効率な新規アッセイ法の可能性が示されている。本研究では、この現象を解明することを目的とし、当該計測に有用な電極界面の化学的および物理的性質を明らかにした。また、得られた知見を基にして計測システムを構築し、薬物代謝反応の迅速な計測が可能であること示した。

研究成果の概要(英文)：Highly efficient assay of drug metabolism reaction with drug metabolism enzyme such as cytochrome P450 is very important to develop drug discovery and well-personalized drug administration. However, the current assay system is time-consuming and low sensitive. Hence, the rapid and sensitive technique is desired to achieve more efficient assay systems for drug metabolism reactions, and an electrochemical method to drive and detect the enzyme reaction simultaneously is promising. In the present study, we found the effective electrode surface in terms of both chemical and physical senses to immobilize and drive the corresponding enzymes, and to detect the drug metabolism reaction.

研究分野：電気化学

キーワード：電気化学分析 薬物代謝 ナノ構造

1. 研究開始当初の背景

(1) シトクロム P450(CYP)による薬物代謝反応は副作用に大きく関与することから、膨大な薬候補化合物の CYP 代謝計測が行われている。また、CYP には基質特異性の異なる複数の分子種が存在し、それぞれの一塩基多型による活性の相違や、異なる薬物或いは薬物と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 の活性計測には大きな需要がある。しかしながら、現在の CYP 代謝反応の評価法は光学的に検出する手法であり、貴重な CYP 試料を多量に要する、酵素を活性化するための電子供給系試薬が高価である、生成物を蓄積して検出するため評価に時間を要する、といった課題を有している。

(2) そこで、より迅速で低コストな CYP 活性計測法として、該酵素分子を電極上に固定し、電圧を印加することで電極から CYP に電子を注入して、酵素反応をアッセイ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、得られる電流から迅速に代謝活性を評価でき、必要な酵素量も少ないという利点を有する。電極から CYP 酵素に直接電子を供給することは、通常困難であるが、これまでにナノ凹凸金属界面を有機分子でコーティングした電極を用いると、該酵素分子に電極から電子を供給でき、電極上で同酵素反応が進行することを見出している。しかしながら、どのような界面構造がどのような理由により有効であるかの詳細は未解明のままとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景に鑑みて下記2点を明らかにすることを目的とした。

(1) CYP の電気化学アッセイに、どのような電極界面が有用であるかを明確にする。

(2) (1)にて明確にした電極を用いて、CYP による薬物代謝反応を迅速に計測可能であることを実証する。

3. 研究の方法

(1) 電極界面のコーティング分子の影響：これまでに芳香族系分子をコーティング剤として用いると、CYP-電極間の直接電子移動に有効であることを見出している。そこで、種々の置換基を導入した様々な芳香族分子や、これらおよび他の有機分子との混合薄膜を電極界面上に作製し、CYP-電極間の電子移動反応を調査した。清浄化した電極界面をコーティング剤の溶液に浸漬することで有機薄膜を被覆した。コンタクトアングル法、高感度反射赤外分光法等により得られた界面の性質を評価した。P450 酵素の固定化は、水晶振動子マイクロバランス法(QCM 法)により見積もった。電気化学計測は主にサイクリックボルタメトリー法を用いた。

(2) 電極界面のナノ構造の影響：これまで

にスパッタリング法、酸化還元サイクル法や金属鑄型法により調製したナノ凹凸を有する界面が有用であることが明らかになっている。そこで、ナノ凹凸の大きさの異なる界面や他のナノ構造体を作製し、それらを用いて電極界面の構造と CYP-電極間の電子移動反応効率の関係を調べた。ナノ構造体の評価は走査型プローブ顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いて評価した。

(3) 電気化学流路システムでの CYP 触媒反応の実証：高効率なアッセイを指向して、チップ電極を用いた電気化学流路システムを構築し、前記で得られた知見を基に CYP 触媒反応を迅速に計測可能かどうか検証した。

4. 研究成果

前記方法により研究を進行させ、主に以下の成果を得ることができた。

(1) 電極界面のコーティング分子の効果

様々な有機分子を電極界面のコーティング(修飾)剤として用い、各修飾電極の界面特性や酵素固定特性等と電気化学酵素反応特性とを比較しながら、コーティング剤の役割を調査し、以下の知見を得た。芳香族環に親水性を有する官能基を付与したコーティング剤を用いることで酵素反応の持続性が向上したことから、親水的な修飾電極界面が安定性に寄与することが示唆された。更に、酵素活性がより安定に発現される界面と酵素活性の失活が早い界面を比較すると、後者においては、溶存酸素の還元で生じる活性酸素種が比較的安定に存在することが示され、同活性種が酵素失活の要因であると推察できた。この結果は、活性酸素種が疎水的な界面で安定であることに起因していると考えられた。また、電極-酵素間の電子移動速度は、アミノ基を有する芳香族分子を用いた場合に他の官能基と比べて大きく、同官能基と酵素分子との相互作用が重要であることが示唆された。親水的なアミノ基と疎水的な芳香環による界面の性質が酵素の電極界面上での配向に大きく影響していると考えられた。以上から、電極界面上での CYP 触媒反応の進行に有用な該界面の化学的性質・コーティング法を明らかにすることができた。

(2) 電極界面のナノ構造の効果

これまでのスパッタリング法や酸化還元サイクル法により作製されるナノ凹凸/くぼみ構造とは異なる、ナノポーラス構造に着目しその調製を試みた。種々条件下でのアノード溶解法による検討を行ったところ、35 mM 塩酸中での 1.218 V の電圧印加により、ピラーサイズが 20 nm 程度の明瞭なナノポーラス構造を得ることができた(図1)。塩化物イオン濃度により得られるナノ構造(ピラーサイズ等)が異なることも明らかになり、ナノ構造制御に重要な因子であることが示唆された。また、電圧印加時間を長くすると、

得られる電極の表面積が増大し、より多くのナノ構造体が構築されることがわかった(図2)

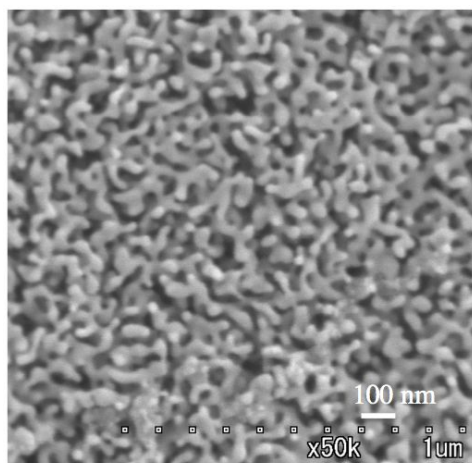


図1 アノード溶解により得られたナノ構造電極

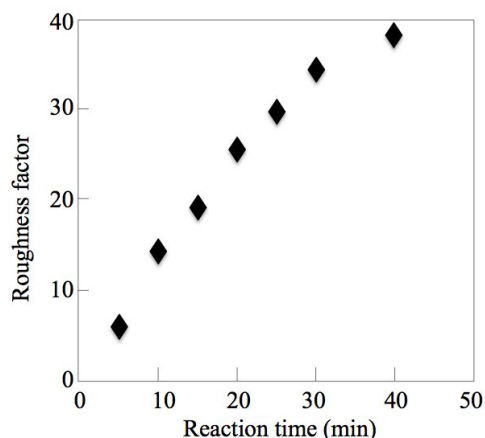


図2 電圧印加(溶解)時間と得られる電極面積(ラフネスファクター)の関係

上記方法により得られたナノ構造界面を用いて、上記(1)で見出したコーティングを行い、ヒトシトクロム P450 酵素を該電極上に固定して電気化学計測を行ったところ、明瞭な該酵素分子-電極間の電子移動が観測された(図3, 実線)。得られた電位-電流曲線から適切な電位(P450の酸化還元電位に近い電位)で電子移動が生じていることがわかった。また、基質である薬物を添加すると該電位がポジティブ方向にシフトし(図3, 点線) P450による基質変換反応機構に合致する結果がえられた。更に、大変興味深いことに、該機能電極上に固定化した P450 酵素分子の約7割が電極と電子授受可能な状態にあることがわかった。これは従来のナノ凹凸構造を用いた場合の7倍大きな値であり、本研究にて作製したナノ構造の有用性が示唆された。

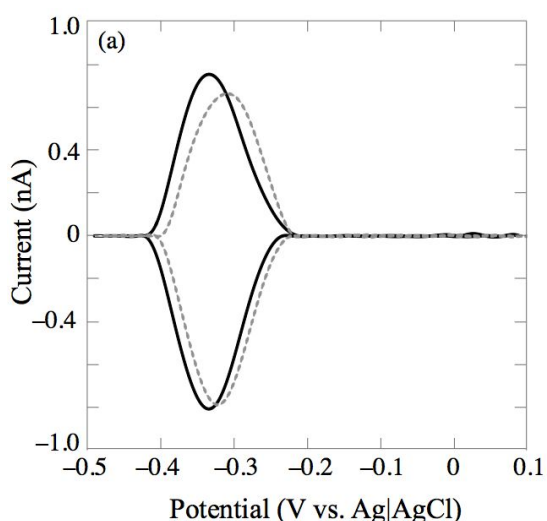


図3 アノード溶解により得られたナノ構造上にヒト P450 を固定した電極の電気化学応答(実線:薬物添加なし, 点線:薬物添加あり)

(3) 流路システムでの実証

上記より得られた知見を基に、有用な機能電極界面を有する流路システムを構築し、電気化学 P450 薬物代謝反応を検討したところ、薬物濃度に依存した電流応答を計測することができた。しかしながら、反応生成物の確認には至っておらず今後の課題となった。また、薬物は一般に水への溶解度が低いいため、薬物を適切に電極反応部へ送達する方法や流路システムの素材の開発も今後の重要な課題と考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

池上真志樹、平野悠、三重安弘、小松康雄、
Fabrication and characterization of nanoporous gold on microelectrode, J. Electroanal. Chem., 査読有、783 巻、2016、188-191

DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.11.023

三重安弘、池上真志樹、小松康雄、
Nanoporous structure of gold electrode fabricated by anodization and its efficacy for direct electrochemistry of human cytochrome P450, Chem. Lett., 査読有、45 巻、2016、640-642

DOI: 10.1246/cl.160164

三重安弘、館山絵美、小松康雄、
p-Aminothiophenol modification on gold surface improves stability for electrochemically driven cytochrome P450 microsome activity, Electrochimica Acta, 査読有、115 巻、2014、364-369

DOI: 10.1016/j.electacta.2013.10.170

池上真志樹、三重安弘、平野悠、小松康雄、
Direct Electrochemistry of Microsomal Human Flavin-containing Monooxygenases

1 and 3 on Naphthalenethiol Thin Films,
ECS Electrochem. Lett., 査読有、2 巻、
2013、G5-G7
DOI: 10.1149/2.003312eel

〔学会発表〕(計 13 件)

佐々木ひかり、三重安弘、医薬品生産および物質検出を指向したビタミン D 水酸化酵素の電気化学反応系の構築、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

池上真志樹、平野悠、三重安弘、アノード溶解によるナノポーラスゴールド形成の電極サイズ依存性、第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

池上真志樹、平野悠、三重安弘、ナノ構造の導入による電気化学顕微鏡用マイクロ電極の高感度化、第 63 回応用物理学会春季学術講演会、2016 年 3 月 20 日、東京工業大学(東京都目黒区)

三重安弘、Electrochemical Analysis of P450s in Microfluidic Channel、第 15 回 LS-BT 合同研究発表会、2016 年 2 月 2 日、産業技術総合研究所(茨城県つくば市)

三重安弘、Electrochemical Analysis of P450s in Microfluidic Channel、日本生物物理学会第 53 回年会、2015 年 9 月 16 日、金沢大学(石川県金沢市)

三重安弘、ナノ構造電極上でのシトクロム P450 153A13a の電気化学触媒反応、日本生物物理学会第 52 回年会、2014 年 9 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

三重安弘、P450 電気化学触媒の基盤技術、北大-産総研合同シンポジウム、2014 年 8 月 29 日、北海道大学(北海道札幌市)

三重安弘、有機薄膜電極からの電子供給によるヒト CYP 発現系ミクロソームの薬物代謝反応、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本大学(熊本県熊本市)

池上真志樹、三重安弘、フラビン含有モノオキシゲナーゼを用いた酵素固定化電極、応用物理学会春季学術講演会、2014 年 3 月 17 日、青山学院大学(神奈川県相模原市)

三重安弘、レドックス DNA の電子移動反応に及ぼす二本鎖内架橋の影響、日本生物物理学会第 51 回年会、2013 年 10 月 29 日、京都国際会館(京都府京都市)

三重安弘、分子内架橋によるナイルブルー修飾 DNA の電子移動反応制御、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013 年 9 月 27 日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

三重安弘、薬物代謝酵素 P450 を電気を使って効率よく制御する技術の開発、HiNT セミナー、2013 年 9 月 25 日、R & B パーク札幌大通サテライト(北海道札幌市)

三重安弘、スパッタ金電極上での電気化学 P450 反応の評価、第 23 回金属の関与する

生体関連反応シンポジウム、2013 年 6 月 21 日、武蔵野大学(東京都西東京市)

〔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)

国立研究開発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