

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670012

研究課題名(和文) 金表面へのCYP固定化による薬物代謝高効率評価法の構築

研究課題名(英文) Construction of a High-throughput Evaluating System for Drug Metabolism of CYP with Gold Electrode

研究代表者

宇野 公之(UNO, TADAYUKI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00183020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

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。表面を粗面化した金電極を2-メルカプトナフタレンでコーティングし、疎水性結合によりCYPを固定化後、ポリアクリルアミドゲルで物理的にCYPの脱離を抑えることによりCYPの還元波を観測することに成功した。また、電流値の変化を観測することにより薬物の結合親和性を評価することができた。

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 hampered, 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. By coating a roughened gold electrode with 2-mercaptanaphthalene and fixing CYP by hydrophobic interaction and physically protecting with polyacrylamide gel, I succeeded in observing reduction wave of CYP. I could also evaluate drug binding affinity of CYP by tracing current change of the electrode.

研究分野：医歯薬学

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。反対に、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、申請者は可溶性 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、金電極を利用した CYP の薬物特異性/薬物代謝活性に関する高感度迅速分析法を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、大量調製法を確立した CYP を用いて金電極への 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。この手法を用いることにより、CYP の薬物代謝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できるため、SNP による副作用の発現を予知して最小限に抑制可能となることから、薬の副作用に苦しむ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と期待できる。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。本研究により医薬品開発の大幅な効率化が期待できるため、広く人類の健康に貢献できるであろう。

## 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、一番安定な CYP2C9 を用いて検討を行った。

(2) 金電極の表面加工 まず、市販の金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 +280 mV (還元) を 30 秒、+1220 mV (酸化) を 30 秒印加し、この酸化還元サイクル (ORC) 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金は  $Au^+$  となり遊離するが、還元により Au が再生して金電極へと戻る。このサイクルにより金電極に凹凸を形成させ、表面積を増やした。この電極をエタノールに溶解した種々のメルカプト化合物に浸し、一晚放置した。メルカプト化合物はチオール基で金に配位し、自己組織化単分子層 (self-assembled monolayer; SAM) を形成する。これをエタノールですすぎ、乾燥させた後、CYP を含む溶液に浸して CYP を電極表面に吸着させた。メルカプト化合物としては 11-メルカプトウンデカン酸 (11-MUA) や 11-メルカプトウンデカノール (11-MUA1) 等を試したが、CYP では最終的に 2-メルカプトナフタレンが最良の結果を与えた。また、この場合、CYP が電極表面から脱離する現象が認められたため、これを物理的に押さえる目的で、ポリアクリルアミドゲル (Atto 社 C15L) の切片を CYP 固定化電極にのせた後、さらに透析用半透膜で覆った。

## 4. 研究成果

(1) cyt. c の電位測定 CYP は CYP 還元酵素との結合に必要な塩基性アミノ酸残基に富んだ領域があり、この部分を利用して電極への固定化が可能と考えられる。しかしながら CYP は不安定であるため、CYP と同様に塩基性の Lys 残基を豊富に含む領域を持つシトクロム c (cyt. c) を用いた検討を行った。まず ORC 処理した金電極を用いて 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)。その結果、還元電位  $E_{pc}$  (20 mV) 及び酸化電位  $E_{pa}$  (80 mV) が測定でき、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

還元電位と近く、測定に成功したことがわかった。しかしながら、緩衝液で電極表面をすすぐと電極応答が消失したことから、cyt. *c* は電極表面から脱離していることがわかった。そこで、脱離を抑えるべく、電極表面をコーティングする手法について検討した。

(2) コーティング剤による固定化 CYP や cyt. *c* の塩基性残基と相互作用し、これらタンパク質の固定化が可能なコーティング剤として 11-MUA を選択した。11-MUA は長い炭化水素鎖を持ち、末端のチオール基で金電極に配位結合しつつ、SAM を形成する性質を持つ。11-MUA 処理した金電極により、cyt. *c* の酸化還元波が観測されたものの、その電流変化は小さかった。この原因として、11-MUA 末端のカルボン酸部分が電氣的に反発し、SAM 形成を妨げている可能性が考えられた。そこで、11-MUA と同じ炭化水素鎖をもち、末端が水酸基となっている 11-MUA1 を用いた。11-MUA/11-MUA1 の混合比を種々検討した結果、モル比 1:1 の時に電極応答が最大となった。しかしながら、繰り返し測定により応答が減少したことから、cyt. *c* の脱離を完全に抑制できていないと考えられた。

(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。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* を吸着させてから 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* を除いた。

以上の工程を経て、電極を 100 mM リン酸カリウム緩衝液の中に入れて 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* については金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た繰り返し測定にも耐え得ることが明らかとなった。

(4) CYP の固定化 1 cyt. *c* を用いた以上の結果を踏まえ、CYP2C9 を用いた検討を進めた。CYP2C9 の等電点 pI は約 8 であり、pH 7.4 の

緩衝液中では正電荷を帯びていることから、cyt. *c* と同様の条件で金電極に固定化できると考えられた。また、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。このことを踏まえ、まず上記(2)で得られた条件(11-MUA/11-MUA1 = 1/1)で電極をコーティング処理し、-600 mV ~ 0 mV の範囲で CV 測定を行ったが、電極応答が認められなかった。そこで、上記(3)の方法により CYP を共有結合により固定化し、測定を行った。その結果、約 -350 mV に還元波が観測されたものの、酸化波は認められなかった。これは、溶存酸素により CYP がすみやかに酸化されたためだと考えられた。しかしながら、CV 測定を繰り返すと電極応答が減少したことから、CYP が電極から脱離しているものと考えられた。

(4) CYP の固定化 2 そこで次に、疎水的相互作用による CYP の固定化について検討した。CYP は膜タンパク質であり、疎水性の N 末端領域を持つ。本研究で使用している CYP はこの膜結合領域を欠失し、可溶性となっているが、脂質膜との相互作用が可能な領域を含んでいる。この部分を利用して電極に固定化することを考えた。また、電極からの電子授受が容易なコーティング剤としてチオフェノール、2-ナフタレンチオール、*p*-アミノチオフェノール、*p*-メルカプト安息香酸について検討した。その結果、*p*-メルカプト安息香酸以外では還元波が認められたことから、CYP の固定化には芳香族系の化合物による疎水的結合が有効であると考えられた。しかしながら、繰り返し測定により電極応答が減少したことから、CYP の脱離を抑える方策についてさらに検討した。

(5) CYP の固定化 3 CYP は分子量約 5 万のタンパク質であるため、ポリアクリルアミドゲルによる物理的な脱離抑制が可能ではないかと考えられた。そこで、上記(4)で最大の電極応答が観測された 2-ナフタレンチオールを用いてコーティングした電極に CYP を結合させた後、電気泳動用ポリアクリルアミドゲル (Atto 社 C15L) の小片をのせ、ゲルを固定化させるために透析用半透膜で電極を覆った。その結果、繰り返し測定によっても電極応答がほとんど変化しないことが明らかとなった。

(6) CYP と薬物との結合評価 上記(5)の電極を用い、薬物が存在したときの電極応答を観測した。CYP は薬物がタンパク質内の基質結合ポケットに結合すると、ヘムの配位子となっている水分子が脱離し、5 配位型へと変化する。これにともない、ヘム鉄の酸化還元電位が上昇することが報告されている。したがって、電極応答により薬物の結合性が測定できると考えられる。CYP2C9 の代表的な基質

であるフルルビプロフェンを用い、-400 mVの固定電位で滴定を行った結果、電流値の上昇から解離定数  $K_d = 15.3 \mu\text{M}$  が得られた。この値は紫外可視吸収滴定により求められた  $K_d$  値 ( $14.1 \mu\text{M}$ ) とほぼ同じであったことから、電極応答により CYP と薬物との結合親和性を評価できることが明らかとなった。

(7) 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、疎水的相互作用に加えて、ゲルを用いた物理的な手法により CYP の脱離を抑え、電極応答を観測することに成功した。また、この電極を用いて薬物の解離定数を算出することができた。さらに、定電位の印加による薬物代謝についても検討したが、代謝産物を検出するに至らなかった。これは、代謝産物の生成量が少ないためだと考えられ、さらに CYP の結合量を増加させる工夫が必要であると思われた。

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という難点がある。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電流値から薬物結合性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2件)

- (1) Masayoshi Miyamoto, Taku Yamashita, Yuki Yasuhara, Akinori Hayasaki, Yukari Hosokawa, Hirofumi Tsujino, and Tadayuki Uno

Membrane anchor of cytochrome P450 reductase suppresses the uncoupling of cytochrome P450

*Chem. Pharm. Bull.* **63**, 286-294 (2015)  
<http://doi.org/10.1248/cpb.c15-00034>

- (2) Tamer Zekry Attia, Taku Yamashita, Mohamed Abdelkhalik Hammad, Akinori Hayasaki, Takumi Sato, Masayoshi Miyamoto, Yuki Yasuhara, Takashi Nakamura, Yusuke Kagawa, Hirofumi Tsujino, Mahmoud Ahmed Omar, Osama Hassan Abdelmageed, Sayed Mohamed Derayea, and Tadayuki Uno

Effect of Cytochrome P450 2C19 and 2C9 Amino Acid Residues 72 and 241 on Metabolism of Tricyclic Antidepressant Drugs

*Chem. Pharm. Bull.* **62**, 176-181 (2014)  
<http://doi.org/10.1248/cpb.c13-00800>

[学会発表] (計4件)

- (1) 宇野公之  
CYP 薬物代謝の分析科学  
日本薬学会第135年会 神戸 2015. 3. 26
- (2) 早崎瑛紀、佐藤匠、宮本正芳、安原由樹、Tamer Z. Attia, Mohamed A. Hammad、辻野博文、山下沢、宇野公之  
CYP2C9 と 2C19 の薬物識別に関わる 72 位及び 241 位残基の役割  
第24回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 京都 2014. 6. 14
- (3) 志村明人、川崎崇弘、福永彩乃、山下沢、辻野博文、宇野公之  
化合物ライブラリースクリーニングによるインドールアミン 2, 3-ジオキシゲナーゼ新規阻害剤の発見  
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
- (4) 中村隆志、小宮山祐美、山下沢、宇野公之  
銀/金ナノ粒子を用いた CYP-薬物親和性に対する新規高感度評価系の構築  
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

[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・博士後期課程)  
宮本 正芳  
(大阪大学・薬学研究科・博士前期課程)  
佐藤 匠、志村 明人、中村 隆志、川口 亮太、早崎 瑛紀、安原 由樹、長尾 龍  
(大阪大学・薬学部・薬学科)  
成清 由梨、奥野 真未、細川 由香里、堀井 千明