

| | | | |
|------|------------|-------|------|
| 整理番号 | 2019-J-132 | 報告者氏名 | 芝 駿介 |
|------|------------|-------|------|

連続ナノ多孔性金薄膜を利用した高感度かつ安定な薬剤代謝センサの開発

<代表研究者> 機関名：愛媛大学 大学院理工学研究科 職名：助教 氏名：芝駿介

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本研究は、①ナノメートルオーダーの細孔を有する連続ナノ多孔性金薄膜電極の新規ボトムアップ構築法を開発、および、②薬剤代謝に関わるシトクロム P450 (CYP)の酵素活性を電気化学的にリアルタイム計測する直接電子移動(DET)型薬剤代謝センサの応用の二段階にわけて目標を設定した。

①は、水相と有機相がマイクロに混在した両連続相マイクロエマルジョン(BME)を電解メッキ反応場とした新規ナノ多孔性金膜の形成法を提案し、その作製法の確立にむけて研究を行った。BMEは100 nm以下の水相と油相が三次元網目状に絡み合った溶液構造を呈することから、水相のみで成長する金も同様に三次元網目状に成長し、最終的には連続多孔性金膜が形成されると予想していた。実際には、メッキ反応の進行と溶液構造の変化が同時に進むことで、ナノサイズの金が垂直方向に伸びたような金ナノピラーが支持基板上に成長することがわかった。申請者は、この手法を動的ソフトテンプレート法と名付け、その成果の一部を論文発表した (Shiba et al., *ACS Appl. Nano Mater.* 2020, 3, 7750-7760)。この金ナノピラーは、BME溶液中の水相と有機相の体積比率や、BMEを構成する界面活性剤の濃度により制御することが容易であり、そのピラー直径を30-200 nmに制御できることがわかった。ピラー高さはメッキ時間を伸ばせば簡単に制御できるが、500 nm以上になるとピラー同士の高さのばらつきが大きくなることがわかった。面白いことに、界面活性剤を多量に含んだ一相系BMEより形成される金ナノピラーアレイは、その金ナノピラー同士の間隔を金濃度により簡単に制御できることも明らかにした。

作製した様々なナノスケールオーダーのサイズの違いを有するナノ多孔質金膜を用いて、②のCYP酵素活性の電気化学的なリアルタイムモニタリングに応用した。その際、ナノピラーアレイが作り出すピラー間の空間にCYPがはまり込むことで、高効率なDETが生じると仮定し、その間隙を制御した。種々の有機分子修飾膜を検討した結果、比較的ピラー間隔の幅が広い(100 nm程度)のナノピラーアレイと2-ナフトレンチオール分子修飾膜、あるいは負電荷を有する4-メルカプト安息香酸の組み合わせで良好な薬剤代謝と阻害反応を検出することに成功した。一方で、2-ナフトレンチオール分子修飾金ナノピラー電極で連続測定を行ったところ、5回の測定で25%までシグナルが低下してしまったことから、測定安定性には課題があることがわかった。今後は、上述のチオール分子を混合し、電荷と親疎水性を最適化することで安定性向上に取り組む。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

【口頭発表】

1. 芝駿介、”ナノ多孔質金属薄膜電極を利用した直接電子移動型薬剤代謝センサの開発”，日本分析化学会中国四国支部 第24回徳島地区分析技術セミナー、2020/01/10 (依頼講演)
2. 芝駿介、平林捷永、丹羽修、加藤大、國武雅史、松口正信、”動的ソフトテンプレート法によるナノ多孔質金薄膜のメッキ形成および電気化学分析への応用”，日本分析化学会第69年会、2020/09/16

【論文（査読付）】

Shunsuke Shiba, Shoei Hirabayashi, Osamu Niwa, Dai Kato, Masashi Kunitake, Masanobu Matsuguchi, Monolithic Au Nanoscale Films with Tunable Nanoporosity Prepared via Dynamic Soft Templating for Electrocatalytic Oxidation of Methanol, *ACS Applied Nano Materials* 2020, 3(8), 7750-7760.

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

【研究背景・研究目的】

DET 型薬剤代謝センサとは、薬剤代謝酵素である CYP を固体電極上に吸着させ、電位印加により薬剤代謝反応を直接駆動することで、流れる電流値から酵素活性を直接評価する手法である。しかし、当該手法による CYP 活性評価には二つの課題が存在する。まず一つ目の課題だが、電極と酵素の電子受容部位（活性中心）の距離が遠い等の理由から電極-CYP 間の DET は極めて困難である。二つ目は、電極表面に吸着させた CYP が極めて不安定である。これは、電位印加に伴う CYP の失活もしくは脱着によるものである。

本研究では、安定かつ高感度な DET 型薬剤代謝センサの実現にむけ、ナノ構造界面の大規模な構造制御が可能なナノ多孔質金薄膜のボトムアップ構築法の開発を目的とした。具体的には、BME と電解メッキ法を組み合わせたナノ多孔質金膜形成法を開発している。水相と有機相が両連続状態でナノレベルに混在した BME を金属メッキ反応場とし、水相にのみ分配した金属塩をメッキすることで、金薄膜電極上に連続多孔性金属薄膜を三次元成長させる。BME の溶液構造はその組成制御を通じて大幅に変化させることができ、熱力学的に安定なエマルジョンであるため再現性高く調製可能である。本研究により、BME 溶液構造の変化と、結果として形成される連続多孔性金膜の構造との関係性を明らかにし、その細孔径、リガメントサイズおよび膜厚の広範囲制御法（nm-サブ μm オーダー）を確立する。さらに、チオール金の間に自発的に形成される共有結合を利用して金上に自己組織化単分子膜を形成し、その上に CYP を吸着させて高効率な DET および薬剤代謝・阻害反応の高感度かつ安定な検出を目的とした。

【現時点での研究経過】

動的ソフトテンプレート法により形成した金ナノピラーアレイ電極の金ナノピラー間隔を制御し、さらに適切な有機分子膜を修飾することで、電気化学的な CYP 活性評価に成功した。具体的には、2-ナフタレンチオールあるいは 4-メルカプト安息香酸による単分子膜修飾をした電極に、マイクロソーム CYP3A4（CYP が脂質膜に埋め込まれた、安定性に優れるが DET が困難な状態の CYP）を修飾したところ、薬剤（テストステロン）および阻害剤（ケトコナゾール）の添加に伴う電流値の増加および消失を確認することに成功した。しかし、2-ナフタレンチオール修飾膜電極上の CYP は、5 回連続測定によりシグナル電流値が 80%低下し、測定安定性に課題が残る結果となった。今後、上述の有望な二つの有機分子膜を混合した膜を形成し、CYP の安定性に対して混合比率を最適化する。

【実験方法】

BME は、5 テトラクロロ金酸(HAuCl_4)が溶解した 1 M 塩酸を水相、シクロヘキサンを有機相、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および 2-メチル-2-ブタノール(2m2b)を界面活性剤として混合することで形成した。この際、BME に添加する 2m2b の量を変えることで、SDS の親水性親油性バランス (HLB) を制御し、BME 中の有機相含有率を制御した。調製した BME を金メッキ液として三電極系を構築し、作用電極をシリコン基板上にスパッタ成膜した金薄膜電極、参照電極を銀塩化銀 ($\text{Ag}/\text{AgCl} \mid 3 \text{ M NaCl}$) 電極、カウンターを白金巻き線として、金薄膜上に多孔質金をメッキ形成した。BME 溶液構造を乱さないために、メッキ中に溶液攪拌はしなかった。作製した電極の表面および断面構造は電界放出形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) により観察した。

Microsome-CYP を用いた薬剤代謝の阻害反応を行うにあたり、電極をチオール化合物溶液 (0.1 M, in ethanol) に一晚浸漬することで自己組織化膜を形成したのち、電極表面を乾燥させ、2 mm の穴のあいた絶縁テープで面積規定した。20 w/v %のグリセロールを含むトリス塩酸バッファで 3 倍希釈した microsome CYP3A4 (Cypex Inc., CYP002) 溶液を、電極上に 6 μL 垂らし、10 min 待つことで microsome-CYP を吸着させた。20 w/v %グリセロールを含むリン酸バッファ (0.1 M, pH7.4) を溶媒として testosterone および ketoconazole による CYP 活性の変化をサイクリックボルタメトリ (CV) 測定により確認した

【結果および考察】

異なる有機相含有率の BME を金メッキ液とすることで形成したナノ多孔質金薄膜の電界放出形電子顕微鏡 (FE-SEM) 像を **図1** に示す。油を多く含む oil-rich BME では、約 50-100 nm の金ナノ多孔が形成された。一方、水相と有機相を均等に含む Well-balanced BME では約 100-200 nm, 水相を多く含む water-rich BME では 200-300 nm のナノ構造となり、BME の有機相含有率が減るほど粗大なナノ構造ができることが明らかとなった。この結果より、BME の有機相含有率、つまり SDS の HLB を制御することで、金ナノ構造を制御可能であることがわかった。得られた空孔サイズはリコンビナント CYP の分子サイズ (10 nm) への DET 実現には過剰に大きいと予想されるが、それよりもサイズが大きい microsome CYP (複合体であるためサイズ不明) との相性は不明である。

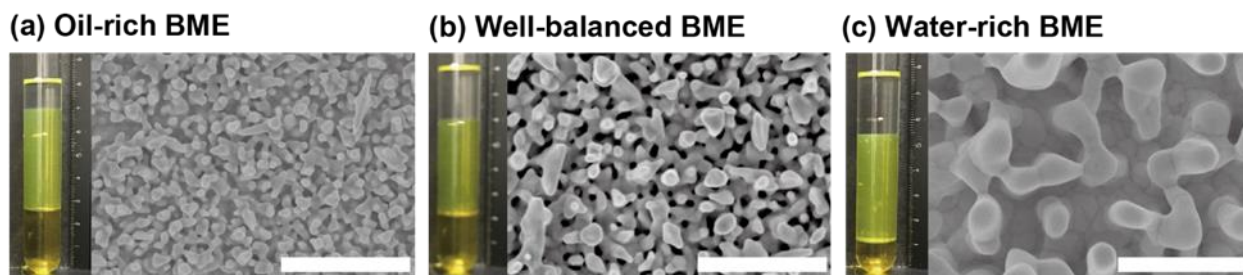


図1. 異なる有機相含有率の BME 中でメッキ形成した金ナノ多孔質の電子顕微鏡像。

50 mM HAuCl₄ in 1 M HCl aq 5 mL, Cyclohexane 5 mL, SDS 0.4 g, 2m2b (a)470 μ L, (b) 540 μ L, (c) 620 μ L により調製。(a) 有機相含有率 70%, -0.35 V で 400 s メッキ、(b)46%, -0.35 V で 300s メッキ、(c)33%, -0.30 V で 300 s メッキ。Scale bar: 1 μ m

さらなる小さな金ナノ空孔を調製するため、SDS を大量 (三相系の 4 倍程度) に溶かし込んだ一相系 BME を調製した。この場合、溶液は三相に別れることなく溶液全体が BME となり、三相系に比べ微細な BME 溶液構造が形成される。金の幹の太さ (リガメントサイズ) は予想通りに微細化 (30 nm 程度) したが、予想外なことに、網目形状ではなく電極面に垂直に成長した金ナノピラーアレイが形成された (**図2**)。おそらく、金メッキ成長と溶液構造の変化が協奏的に作用して生じた独特の構造と考えられるが、詳しいメカニズムはわかっていない。さらに面白いことに、水相中の金濃度を 10, 20, 30 mM と増加させるだけで、ピラー間隔を約 50-200 nm, 50-100 nm, 10-50 nm と制御することができ、さらにメッキ時間制御により膜厚を同程度 (~200 nm) にそろえることも可能であった。おそらく、金濃度の増加に伴いメッキ電位印加時の核形成密度が増加したためと考えられる。三相系の多孔構造に比べ、ピラー間隔を CYP 酵素サイズのレベルまで落としこむことが可能となり、高効率 DET の実現に有利な構造制御法を確立したと考えている。

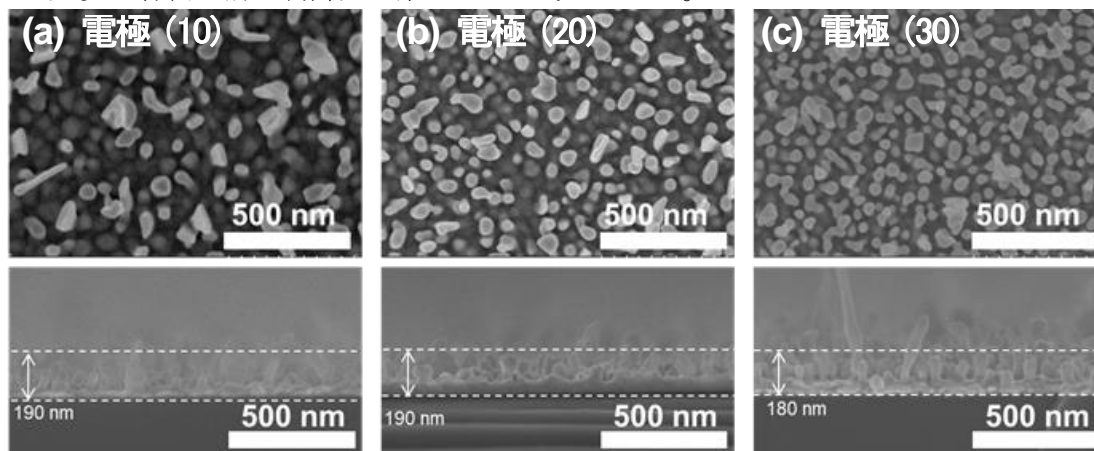


図2. 一相系 BME よりメッキ形成されたナノピラー金アレイ薄膜電極の上面 (上) および断面 (下) FE-SEM 像。10-30 mM HAuCl₄ in 1 M HCl aq 5 mL, Cyclohexane 5 mL, SDS 1.5 g, 2m2b 1050 μ L により調製。(a) HAuCl₄ 濃度 10 mM, メッキ時間 600 s, (b) 20 mM, 300 s, (c) 30 mM, 150 s; メッキ電位はすべて -0.35 V とした。

続いて、開発した電極を用いて薬剤・阻害剤に対するマイクロソーム CYP3A4 の活性変化の電気化学検出を試みた。シリコン基板上にスパッタ成膜された平坦な金電極や、図 1 (b) に示した構造の比較的大きなナノ多孔質金電極上では、microsome-CYP3A4 の活性変化を検出できないことを確認した (データ未記載)。図 3 は、2-ナフトレンチオールを修飾した電極 1、2、3 (図 2) を用いて、サイクリックボルタメトリ (CV) 測定により microsome-CYP3A4 活性変化を検出したものである。比較的低密度な金ナノピラーアレイ電極 (電極 1 & 2) では、薬剤 (100 μM テストステロン) 添加による還元電流の増加、および続く阻害剤の添加によるテストステロン代謝電流の消失が確認された。以上より、電気化学法による microsome-CYP3A4 の活性評価には、50-100 nm 程度の空隙が確保されたナノピラー電極が好適であることがわかった。一方、さらなる高密度なナノピラー電極 (電極 3) では、その表面が極めて疎水性であるために水がしみこまず、修飾した CYP が金ナノピラー間に埋め込まれなかったことが原因で活性評価ができなかったと考えられる。図 3 (d) は、電極 1 を用いて、薬剤代謝反応を 5 回連続で検出した結果であるが、5 回連続測定により初期電流値を基準として 80% の電流低下が確認された。2-ナフトレンチオール修飾膜上のマイクロソーム CYP3A4 は、電極上に強く吸着するとの報告があることから、低い測定安定性の原因は失活に由来すると考えられる。

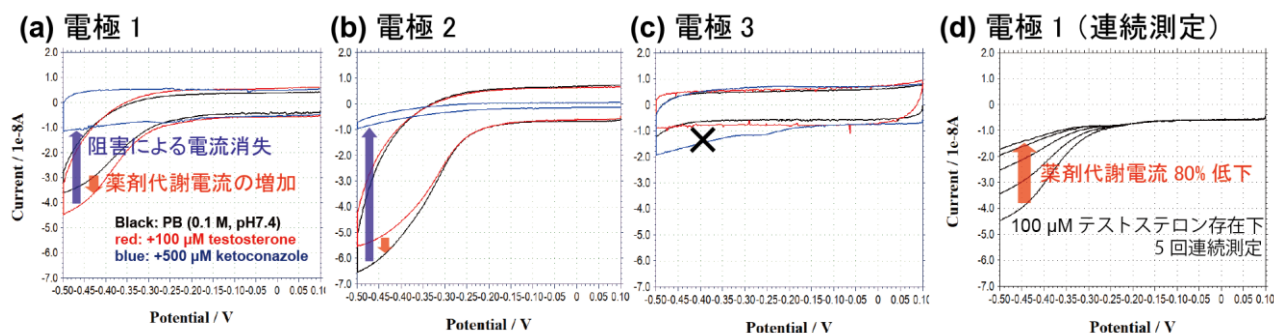


図 3. 2-ナフトレンチオール修飾ナノピラー並列電極 (a), 電極 (b), および電極 (c) のサイクリックボルタメトリグラム。黒線: バックグラウンド測定; 赤線: 薬剤添加 (100 μM テストステロン); 青線: 阻害剤添加 (500 μM ケトコナゾール)。 (d) 電極 1 を用いた 100 μM テストステロンに対する CYP 活性変化の 5 回連続検出。

測定安定性の向上にむけ、2-ナフトレンチオール以外の有機分子修飾膜を検討した。結果を表 1 にまとめる (購入しているが未記載の分子膜は今後検討)。2-ナフトレンチオール以外の修飾膜で CYP 活性を検出可能であるのは、4-メルカプト安息香酸、3 および 4-フルオロベンゼンチオールであることがわかった。面白いことに、CYP 活性の検出と表面の親疎水性には必ずしも相関がなく、芳香環を有する負に帯電した分子が CYP 活性検出に有利であることがわかった。現在、4-メルカプト安息香酸と 2-ナフトレンチオールの混合分子膜を形成することで、表面の親疎水性と帯電状態を CYP 活性の測定安定性に最適化に取り組んでいる最中である。

表 1. 各種有機分子膜によるマイクロソーム CYP3A4 活性のセンシング界面の接触角およびセンシング結果のまとめ

| | 4-メルカプト安息香酸 | 4-メルカプトプロピオン酸 | 4-アミノチオフェノール | 4-メルカプトプロピオン酸メチル | 3-フルオロベンゼンチオール | 4-フルオロベンゼンチオール | ペンタフルオロベンゼンチオール | 2-ナフトレンチオール |
|------|-------------|---------------|--------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|-------------|
| 化学構造 | | | | | | | | |
| 接触角 | 5.1° | 10.4° | 26.0° | 63.9° | 74.3° | 86.6° | 88.5° | 107° |
| 薬剤代謝 | ○ | × | × | × | △ | △ | × | ◎ |
| 阻害 | ◎ | × | × | × | ◎ | ◎ | × | ◎ |