

論文の内容の要旨

論文題目 触媒抗体の活性および基質特異性に関する研究

氏名 栗原 伸和

1986年に触媒抗体の第一号が報告されて以来、プロドラッグの活性化反応や選択的有機合成反応等、種々の化学反応を触媒する抗体が作製され、化学、生物学、医学をはじめとした多岐にわたる分野でその実用化が期待されている。しかしながら、現在の触媒抗体技術は天然酵素の持つ複雑な触媒メカニズムや高い触媒活性を抗体内に実現するには至っておらず、今なお種々のアプローチによる実用化に向けた研究が必要な段階にある。一般に天然酵素は、「オキシアニオンホール」のみならず「一般酸/塩基触媒」、「求核触媒」等の複数の触媒因子を協奏的に利用することにより高い触媒活性を獲得している。一方、従来の触媒抗体の多くは、「オキシアニオンホール」あるいは「一般酸/塩基触媒」といった単一の触媒因子のみを使って機能するように設計されているため概してその触媒活性は低い。このことから、天然酵素と同様、複数の触媒因子が機能する抗原結合部位を構築することが実用化に向けて不可欠と考えられる。また、有機合成試薬としての触媒抗体を考えた場合、幅広い化合物を基質として受け入れられる汎用性も要求されることから、基質特異性の広い触媒抗体の作製も一つの重要な課題である。

以上の背景から著者は、「複数の触媒因子が機能する触媒抗体の創製および触媒抗体の基質特異性の改良」を目的に本研究を実施した。

1) 多官能性ハプテンを用いた触媒抗体の作製

「オキシアニオンホール」に加え第2の触媒因子が機能する抗原結合部位を構築することを目的に、新規な多官能性 Bis-phosphonate 型ハプテン **1** を設計・合成した(Figure 1a)。ハプテン構造中、基質の加水分解位置に相当するホスホン酸エステル部分は、加水分解反応の遷移状態における四面体中間体を模倣しており、その負電荷はオキシアニオンを安定化するアミノ酸残基を誘導すると考えられる。一方、C-末端部分に導入したホスホン酸構造の負電荷により、「一般酸/塩基触媒」として機能するアミノ酸残基がさらに誘導されてくるものと考えた。そこで、マウスへの免疫によってモノクローナル抗体を作製した結果、立体選択的に化合物 **2a** のみを加水分解する新規な触媒抗体 12F12 が得られた(Figure 1b)。

C-末端にカルボン酸を有する基質 **4** に対する抗体 12F12 触媒反応は、アミド構造を有する基質 **3** と比

較し反応速度に約 5 倍の低下が見られた(Figure 2)。この現象は、基質 4 を用いた場合、その C-末端カルボキシレートの負電荷が、ハプテンの C-末端ホスホン酸によって誘導されたアミノ酸残基 (Y 基) と相互作用し、Y 基の触媒残基としての機能を阻害したために生じたものと推定された(Figure 2c)。また、基質 4 に対してもなお残存している触媒活性は、内部ホスホン酸エステルによって誘導された「オキシアニオンホール」として働く X 基に由来するものと考えられ、複数の触媒残基の存在が示唆された。一方、触媒活性の pH 依存性から、His 残基の触媒機能への関与が示唆された(Figure 3)。また本抗体の 3 次元モデルからも、抗原結合部位における His 残基および塩基性アミノ酸残基 (Arg, Lys) の存在が支持された。

Figure 1 Bis-phosphonate型ハプテンの設計

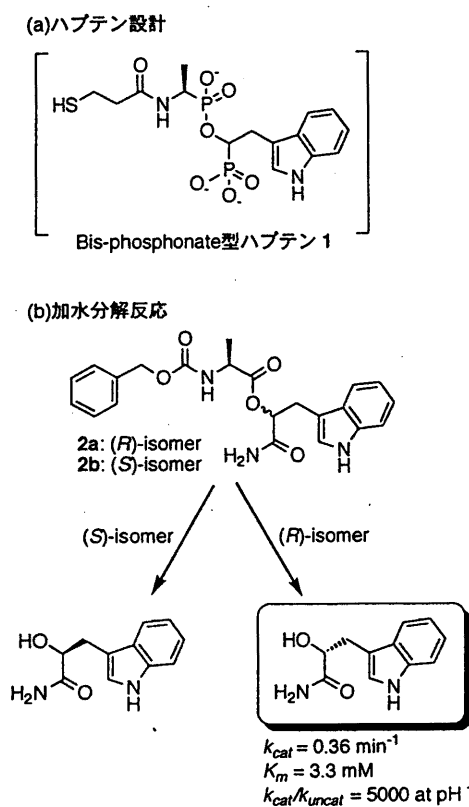


Figure 2 ハプテン-抗体および基質-抗体相互作用

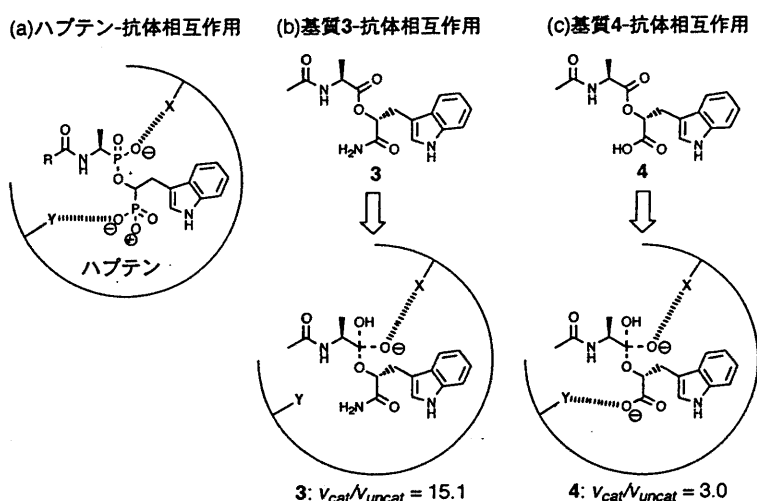
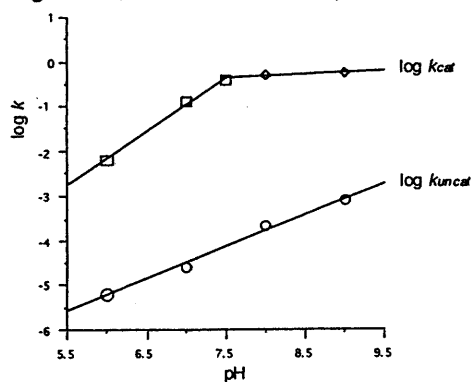


Figure 3 抗体12F12触媒活性のpH依存性



以上の結果から、抗体 12F12 の触媒活性は His 残基を含む複数の触媒残基に由来しているものと考えられ、多官能性ハプテンを用いる手法の有用性が示唆された。

2) Heterologous immunization 法を用いた触媒抗体の作製

触媒抗体 6D9 は、ハプテン 9 の免疫(Homologous immunization)によって作製され、クロラムフェニコールのプロドラッグ 5 をクロラムフェニコール(7)に変換する加水分解抗体である(Figure 4)。本章では、抗体 6D9 に第 2 の触媒残基を導入することでその高活性化が可能と考え、新たにハプテン 10 を設計・合成し 9 および 10 を用いた Heterologous immunization を行った(Figure 5)。ハプテン 9 が遷移状態における四面体中間体を模倣した構造を有し、「オキシアニオンホール」を誘導することを目的としているのに対し、ハプテン 10 によって第 2 の触媒残基が抗原結合部位に誘導されるものと考えた。その結果、

抗体 6D9 の触媒活性 (k_{cat}/k_{uncat}) を約 3 倍上回り、かつハプテン 10 に対しても強い結合能を有する新規な触媒抗体 4G5 が得られた(Table 1)。

Figure 4 触媒抗体6D9による
クロラムフェニコールモノエステルの加水分解反応

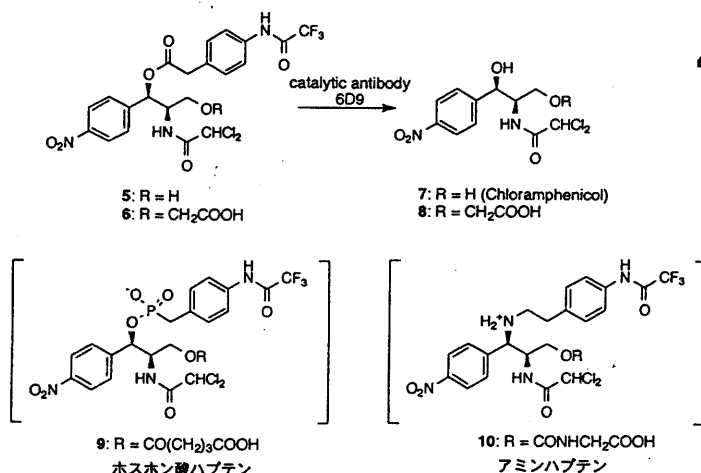
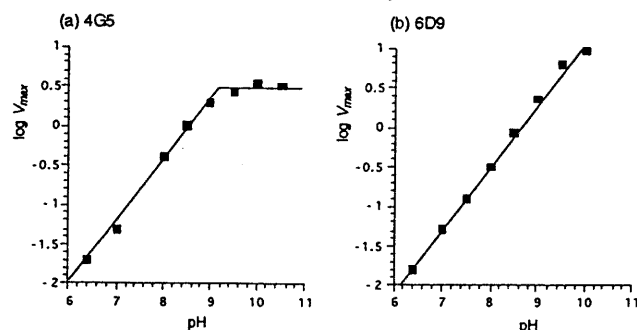


Table 1 抗体4G5および6D9の速度論定数

Antibodies	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ min ⁻¹)	k_{cat}/k_{uncat}	K_d for 9 (M)	K_d for 10 (M)
6D9	0.145	50	2.9×10^3	900	2.8×10^{-8}	$> 1.0 \times 10^{-5}$
4G5	0.455	17.7	2.5×10^4	2800	2.4×10^{-8}	1.8×10^{-7}

Figure 6 抗体4G5および6D9触媒活性のpH依存性



4G5、6D9 両抗体のアミノ酸配列は高い相同性を有し、抗体 6D9 と同様、抗体 4G5 においても His (L27d) 残基が「オキシアニオンホール」として機能していることが示唆された。また、抗体 4G5 触媒活性の pH 依存性から、Tyr 残基の触媒機能への関与が示唆された(Figure 6)。さらに、抗体 4G5-ハプテン 10 複合体の 3 次元モデルを構築した結果、His (L27d) および Tyr (H58) 残基の触媒メカニズムへの関与が推定された。

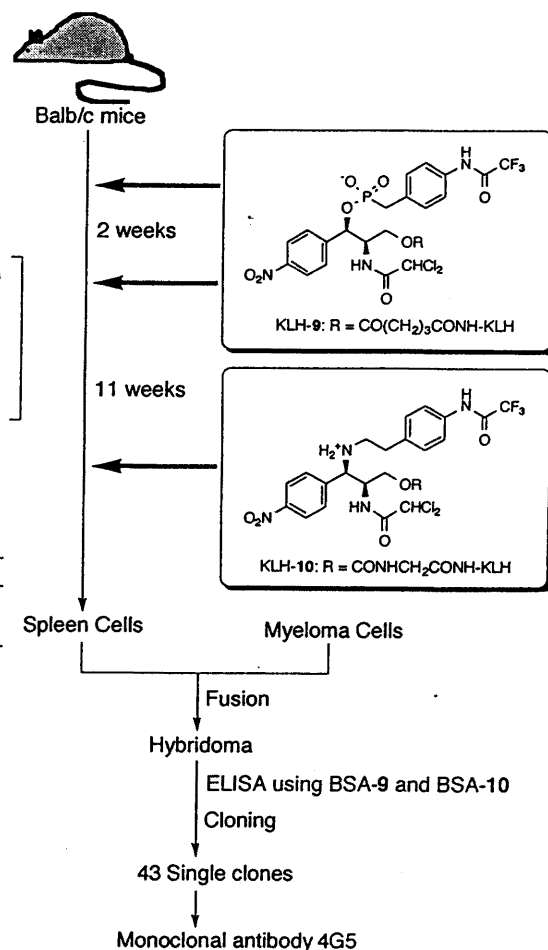
以上の結果から、今回 Heterologous immunization 法によって得られた抗体 4G5 は、その抗原結合部位において、複数の触媒残基が機能することによって抗体 6D9 を上回る高い触媒活性を獲得したものと考えられ、本免疫法の有用性が示唆された。

3) 幅広い基質特異性を有する触媒抗体の作製

本章では、*p*-ニトロベンジルエステルの脱保護反応を例に、広い基質特異性を有する触媒抗体の作製を行った。

広い基質特異性を誘導することを目的に、ハプテン 11 を設計・合成した(Figure 7)。ハプテン 11 は、

Figure 5 Heterologous immunization



高い抗原性を持つ *p*-nitrobenzyl phosphonate 部分と、免疫原性の低いアルキル鎖リンカー部分の2成分より構成されている。従って本ハプテンを免疫した場合、*p*-nitrobenzyl phosphonate 部分のみを特異的に認識する抗体の産生が期待される。そこで、マウスへの免疫によってモノクローナル抗体を作製した結果、 β -位あるいは γ -位にメチル置換基を有する化合物 **13**、**14**、さらには α -位に種々の置換基を有するアミノ酸エステル両光学異性体 Leu (L-**15a**, D-**15a**), Norleu (L-**15b**, D-**15b**), Phe (L-**15c**, D-**15c**) に対しても加水分解能を有する新規な触媒抗体 7B9 が得られた (Table 2, 3)。基質の *p*-nitrobenzyl 部位のみを認識し、かつその他の部位については非特異性を示す抗体が得られたことは、触媒抗体試薬を実用化していく上で重要な知見であり、本研究におけるハプテン設計が有効に機能したことが示唆された。

触媒抗体 D2.3 は、ハプテン **11** と構造的に類似した化合物 **16** の免疫によって得られてきた抗体であり、その X 線構造が明らかとなっている (Figure 8)。そこで、抗体 7B9-ハプテン複合体の3次元モデルを構築し、抗体 D2.3 の X 線構造と比較した。その結果、抗体 D2.3 の深い抗原結合部位に対し抗体 7B9 の抗原結合部位は比較的浅く、基質が結合する際、その α -、 β -および γ -位側鎖置換基が抗原結合部位の外側に位置し、抗体による認識を受けていないために広い基質特異性が生じたものと推定された。また、ハプテン **11** および **16** の構造的差異がリンカー部分のみであったことから、ハプテン設計において、リンカー部分の構造が抗体の基質特異性をコントロールする上で重要な役割を担っていることが示唆された (Figure 8)。

Figure 7 ハプテン設計

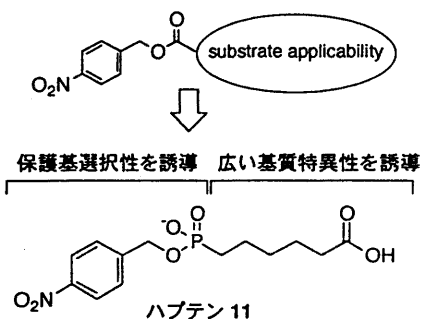
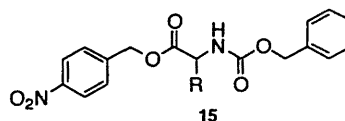


Table 2 抗体7B9の基質特異性 (1)

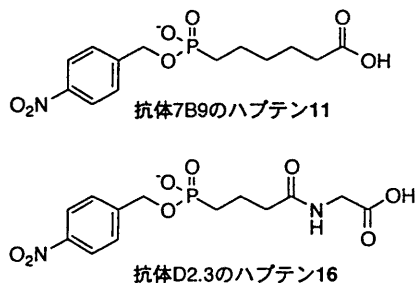
substrate	R ₁ -	R ₂ -	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} / K _m (M ⁻¹ min ⁻¹)	k _{cat} / k _{uncat}
12	H-	H-	346	2.01 × 10 ⁻²	58.1	1020
13	CH ₃ -	H-	456	5.08 × 10 ⁻³	11.1	758
(<i>R</i>)- 14	H-	(<i>R</i>)-CH ₃ -	223	4.54 × 10 ⁻²	204	1820
(<i>S</i>)- 14	H-	(<i>S</i>)-CH ₃ -	712	2.01 × 10 ⁻²	28.2	804

Table 3 抗体7B9の基質特異性 (2)



substrate	R-	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} / K _m (M ⁻¹ min ⁻¹)
L- 15a	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	22.4	1.67 × 10 ⁻³	74.6
D- 15a	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	10.6	4.68 × 10 ⁻⁴	44.2
L- 15b	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	13.0	2.15 × 10 ⁻³	165
D- 15b	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	8.5	5.32 × 10 ⁻⁴	62.5
L- 15c	PhCH ₂ -	4.7	1.83 × 10 ⁻³	389
D- 15c	PhCH ₂ -	1.9	4.00 × 10 ⁻⁴	211

Figure 8 抗体7B9およびD2.3のハプテン構造



以上本研究において、(1) 既存の触媒抗体の活性を上回る新規な触媒抗体を獲得すると共に、触媒抗体の高活性化のための方法論に関する知見を得た。また、(2) 広い基質特異性を有する触媒抗体を作製すると共に、基質特異性の改良に関する知見を得た。今後さらにハプテン設計の検討を重ねることで、実用に耐え得る高活性、高汎用性な触媒抗体の獲得が期待される。