

称号及び氏名	博士（理学） 石川 文洋
学位授与の日付	平成21年 3月31日
論文名	「ホロ酵素型触媒抗体の分子設計に関する研究」
論文審査委員	主査 藤井 郁雄 副査 徳富 哲 副査 多田 俊治

論文要旨

第1章 序論

化学者の大きな夢の一つは、天然酵素のような高い特異性と優れた反応効率を兼ね備えた触媒分子を自由自在に創り上げることである。今日まで、新しい触媒開発のために、さまざまな方法論が検討されてきている。1986年、人工酵素を創り出すための画期的な方法論が報告された。酵素が化学反応の遷移状態と結合し安定化することによって触媒機能を発揮しているように、化学的に安定な遷移状態アナログを抗原として得られる抗体タンパク質は、天然酵素と同様に反応の遷移状態に結合して安定化し、反応を加速するようになる。このような触媒機能を持つ抗体タンパク質を「触媒抗体」(Catalytic Antibody)と呼ぶ。ヒトやマウスの免疫システムには膨大な抗体タンパク質のレパートリーが備わっているため、適切な遷移状態アナログを設計することにより、自由自在に望む反応を触媒することができる抗体タンパク質、つまりテーラーメイドの人工酵素を創り出すことが可能となる。

これまでに遷移状態アナログを免疫することにより様々な触媒抗体の作製が行われ、アシル転移反応からペリ環状反応まで多種多様な有機化学反応が抗体により触媒されることがわかってきている。そこで本研究ではホロ酵素型触媒抗体の分子設計を目指しました。ホロ酵素は、その活性部位に補酵素をもち、協奏的に反応に関与させる方法をとることで、天然の20種のアミノ酸では触媒できない反応を触媒することを可能にしている。すなわち、抗体の抗原結合部位に種々のコファクター分子結合部位を構築するための方法論を確立し、種々の非天然の合成コファクター分子を導入して、それらを自由自在に入れ替えることによりその抗体が触媒できる反応の種類およびその触媒機構を制御可能な触媒抗体の開発を検討した。

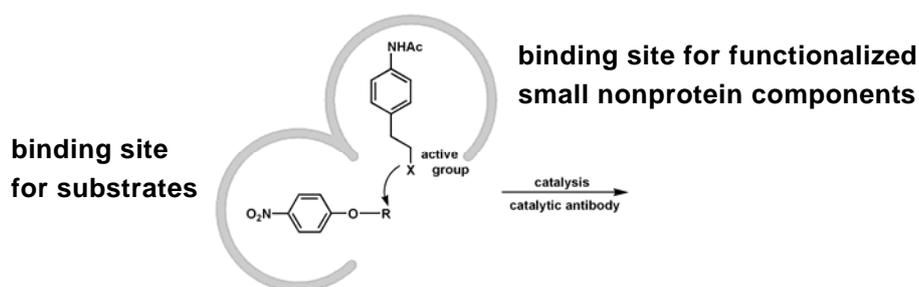


Figure 1. Holoabzyme

第2章 ハプテンの設計

基質および合成コファクターの両方に親和性をもつ抗原結合部位を作製するために遷移状態アナログ型リン酸ジエステルハプテンの設計を行った(Figure 2)。ハプテン(1)は2つの特徴を持っている。1) *p*-ニトロフェニルリン酸エステル部分は抗原結合部位に基質分子結合部位を構築する。2) *N*-アセチルフェネチル部分は種々の合成コファクター分子結合部位を抗原結合部位に構築する。ハプテン(1)の合成はトリエチルホスフィンと6-ブロモヘキサン酸エチルから9段階で合成を行った(Scheme 1)。

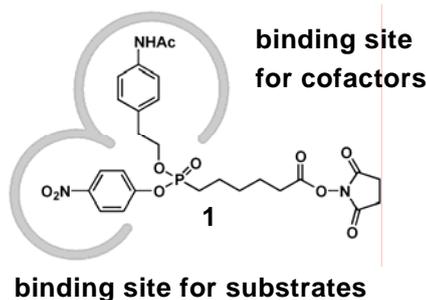
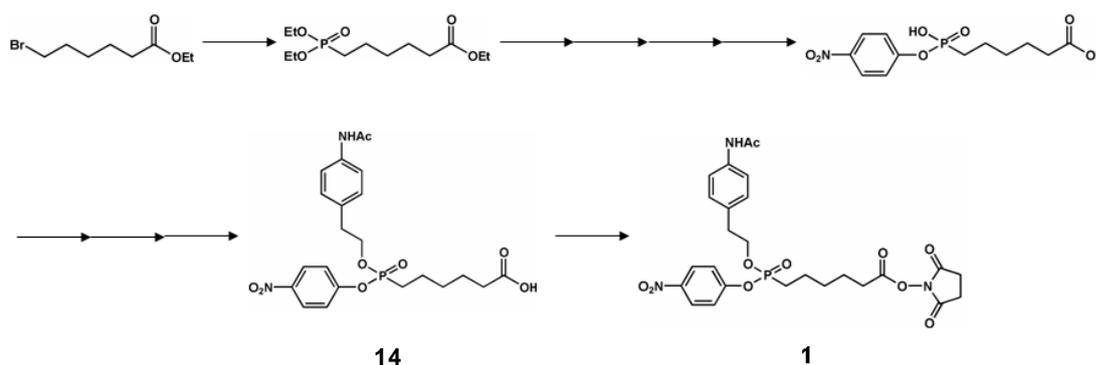


Figure 2. Hapten structure



Scheme 1.

第3章 抗原の作製、免疫およびモノクローナル抗体の作製

ハプテン(1)を担体タンパク質である KLH や BSA への縮合を行い、KLH-ハプテン縮合体(KLH-1)を用いて Balb/c マウスに免疫を行った。常法により、ハプテン(1)を特異的に認識する 50 種類のモノクローナル抗体が得られた。これらの抗体はすべて IgG であった。

第4章 アシル転移反応の検討

次に、50 種の抗体に関して活性スクリーニングを行った。ハプテン(1)の設計からまず考えられるエステル(2)と求核触媒(3)とのアシル転移反応を検討した結果、22 種の抗体に顕著な触媒活性を観測した。そこで最も活性の高かった 2 種の抗体(25E2, 27C1)について、詳細な反応速度論的解析を行った。コファクター分子としてアルコール(3)、アミン(4)、チオール(5)のどれを用いた場合にも高い触媒活性を示した(Figure 3)。アルコール(3)を用いた場合 198 倍(25E2)、109 倍(27C1)、アミン(4)を用いた場合 1.4×10^4 倍(25E2)、 5.5×10^4 倍(27C1)、チオール(5)を用いた場合 4.2×10^3 倍(25E2)、 3.0×10^3 倍(27C1)の速度加速を示した。また、両抗体は阻害剤(14)に対し非常に高い結合能を有し(25E2: $K_d = 27\text{nM}$; 27C1: $K_d = 8.7\text{nM}$)、さらに抗体の触媒するすべての触媒反応(アシル転移反応、 β -脱離反応、アルドール反応および脱炭酸反応)は阻害剤(14)の添加および各種コファクター分子を除くことによって完全に阻害された。阻害定数(25E2: $K_i = 110\text{nM}$; 27C1: $K_i = 313\text{nM}$)はアシル転移反応(エステル 2, アミン 4)を用い決定された。

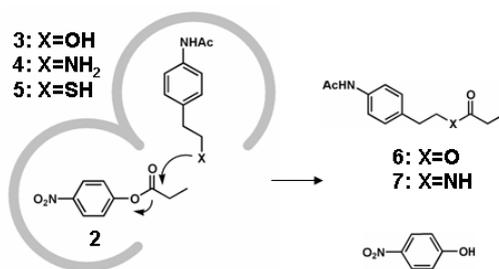


Figure 3. Antibody-catalyzed acyl transfer reaction

第5章 β -脱離反応の検討

第4章で述べたアシル転移反応の結果から、抗原結合部位に求核触媒作用を示す種々のコファクター分子を導入することができた。そして、ホロ酵素型触媒抗体の最大の特徴と利点は、コファクター分子を入れ替えることにより触媒反応の種類およびその触媒機構を制御できることである。そこで、コファクター分子としてフェニル酢酸誘導体(8)を用い、塩基触媒作用による β -脱離反応を検討した(Figure 4)。その結果、抗体 25E2 が β -ハロケトン(9)からエノン(10)への β -脱離反応を触媒することがわかった。一方、抗体 27C1 は本脱離反応を触媒しなかった。詳細な反応速度論的解析の結果から、 $K_m(8)=122\mu\text{M}$, $K_m(9)=864\mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}=0.89\text{min}^{-1}$ を決定した。また、 $k_{\text{cat}}/K_m(9)/k_{\text{uncat}}=2.4\times 10^5$ と非常に大きな速度加速を示すことがわかった。続いて、重水素化基質を用いて同位体効果の検討を行った。基質(9)および重水素化基質を用い、それぞれミカエリスメンテンプロットを作製し、 $k_{\text{catH}}/k_{\text{catD}}=3.3$ を決定した。これより、抗体 25E2 が触媒する β -脱離反応は α プロトンの引き抜きにより進行し、その過程が律速段階であることが示唆された。

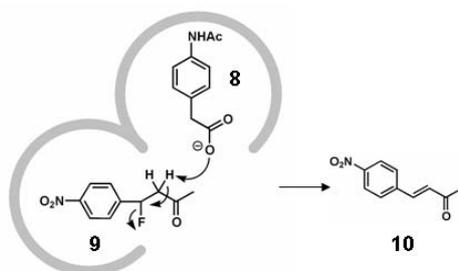


Figure 4. Antibody-catalyzed β -elimination reaction

第6章 アルドール反応の検討

アルドール反応は有機合成化学のみならず、生物学においても C-C 結合形成反応として最も重要で基本的な反応のひとつである。

天然においても、多くの酵素はアルドール反応を触媒することができる。これらアルドラーゼはその触媒機構に基づき大きく二つのクラスに分けることができる。クラスIアルドラーゼはその活性部位にリジン残基をもち、アルドール供与体である基質とのシッフ塩基の形成を経て、アルドール反応を触媒する。そこで、一級アミンコファクター(4)を用い、クラスIアルドラーゼ型のアルドール反応の検討を行った(Figure 5)。その結果、両抗体とも 4.4×10^4 倍の速度加速を示し、非常に効率的にアルドール反応を触媒することがわかった。また、エナミンの前駆体であるイミニウムイオン中間体の捕捉により、両抗体が触媒するアルドール反応はクラスIアルドラーゼと同様にエナミン機構で反応が進行することが示唆された。

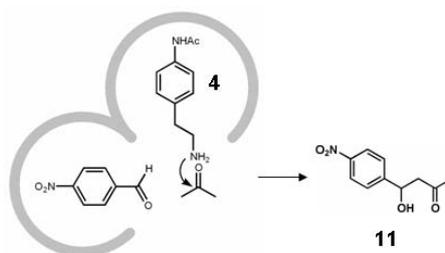


Figure 5. Antibody-catalyzed aldol reaction

第7章 脱炭酸反応の検討

クラスIアルドラーゼは先に述べたようにその活性部位にリジン残基をもち、アルドール反応のみならず脱炭酸反応もエナミン機構を経て触媒する。そこで、一級アミンコファクター(4)を用い、クラスIアルドラーゼ型の β -ケト酸(12)の脱炭酸反応を検討した(Figure 6)。その結果、両抗体とも非常に効率的に脱炭酸反応を触媒することがわかった。抗体 27C1 の詳細な反応速度論的解析の結果から、 $K_m(4)=6.2\text{mM}$, $K_m(12)=2.1\text{mM}$, $k_{\text{cat}}=1.27\text{min}^{-1}$ を決定した。また、 $k_{\text{cat}}/K_m(12)/k_{\text{uncat}}=1.3\times 10^5$ と非常に大きな速度加速を示すことがわかった。

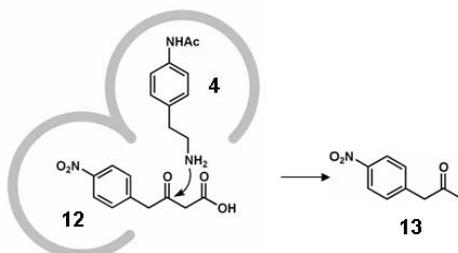
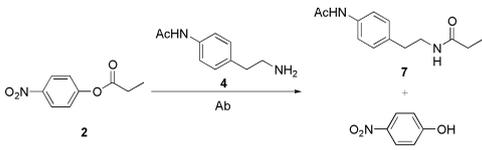
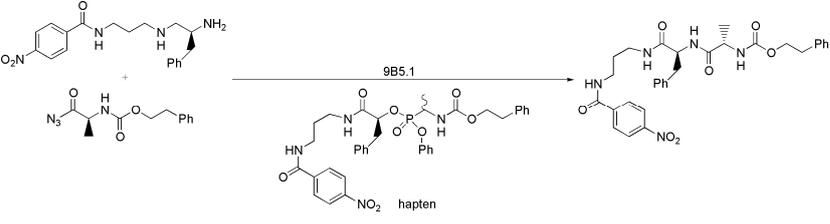
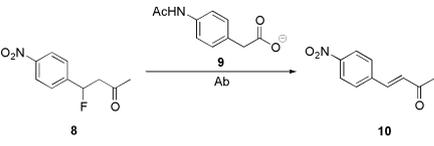
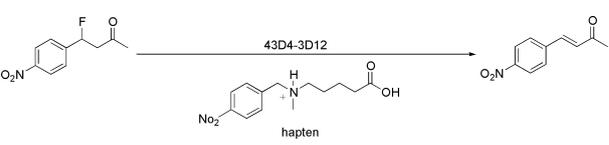


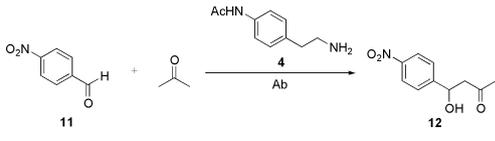
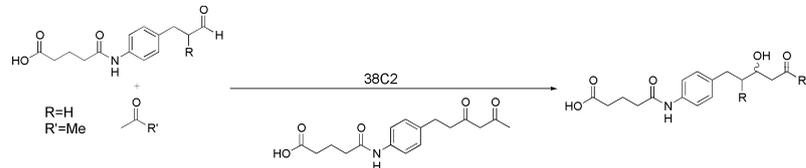
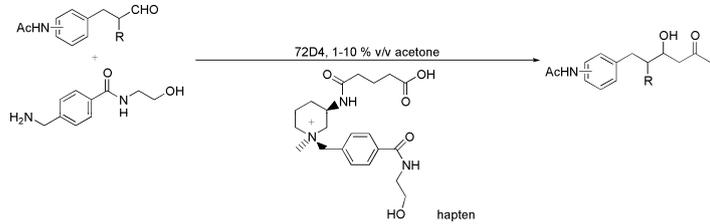
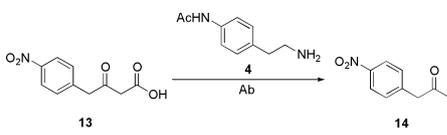
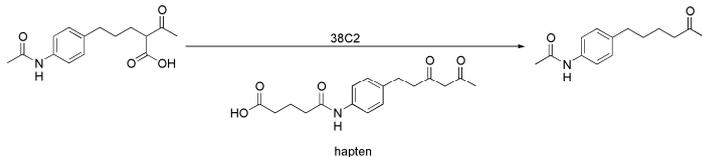
Figure 6. Antibody-catalyzed decarboxylation reaction

第8章 結語

ホロ抗体酵素の開発を目指して、ハプテンの設計および合成、マウスへの免疫、モノクローナル抗体の作製、活性スクリーニングを行い、抗体 25E2,27C1 の獲得に成功した。また、これら抗体はコファクター分子を入れ替えることによりアシル転移反応、 β 脱離反応、脱炭酸反応およびアルドール反応と触媒反応の種類および触媒機構を制御可能であり、さらに、これまで作製されてきた類似反応あるいは同様の反応を触媒する触媒抗体と比較しても同程度あるいはそれ以上の触媒活性をもつことがわかった(Table 1)。また、このように一つの酵素が触媒機構の異なる様々な反応を効率よく触媒する例は天然酵素にも抗体酵素にも例がなく非常に興味深い。

Table 1. Comparison of the catalytic activities for the antibody-catalyzed reactions between our antibodies and the other “specialized” catalytic antibodies.

Acyl-transfer reaction	catalytic activity
	<p>25E2 $k_{cat}/K_m/k_{uncat}=1.4\times 10^4$ 27C1 $k_{cat}/K_m/k_{uncat}=5.5\times 10^4$</p>
 <p>Jacobsen, J. R.; Schultz, P. G. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 1994, 91, 5888.</p>	<p>$k_{cat}/K_m/k_{uncat}=1.0\times 10^4$</p>
β -Elimination reaction	catalytic activity
	<p>25E2 $k_{cat}/K_m/k_{uncat}=2.4\times 10^5$ 27C1 no reaction</p>
 <p>Shokat, K. M.; Leumann, C. J.; Sugawara, R.; Schultz, P. G. <i>Nature</i>, 1989, 338, 269.</p>	<p>$k_{cat}/k_{uncat} = 8.8\times 10^4$</p>
Aldol reaction	catalytic activity

 <p>11 + $\xrightarrow[Ab]{4}$ 12</p>	<p>25E2 $k_{cat}/K_m/k_{uncat}=4.4\times 10^4$ 27C1 $k_{cat}/K_m/k_{uncat}=4.4\times 10^4$</p>
 <p>Wanger, J.; Lerner, R.A.; Barbas III, C.F. <i>Science</i>, 1995, 270, 1797.</p>	<p>$k_{cat}/k_{uncat} = 2.9\times 10^4$</p>
 <p>Reymond, J.-L.; Chen, Y. <i>J. Org. Chem.</i> 1995, 60, 6970.</p>	<p>$k_{cat}/k_{uncat} =$ $0.13-1.7\times 10^2$ (app.)</p>
<p>Decarboxylation reaction</p>	<p>catalytic activity</p>
 <p>13 $\xrightarrow[Ab]{4}$ 14</p>	<p>27C1 $k_{cat}/K_m/k_{uncat}=1.3\times 10^5$</p>
 <p>Björnstedt, R.; Zhong, G.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 1996, 118, 11720.</p>	<p>$k_{cat}/k_{uncat} = 1.5\times 10^4$</p>

審査結果の要旨

酵素は化学反応の遷移状態と結合し安定化することによって触媒機能を発揮している。これと同様に、化学的に安定な遷移状態アナログを抗原として得られる抗体タンパク質は、遷移状態に結合し安定化して、反応を触媒するようになる。このような触媒機能を持つ抗体を「触媒抗体」(Catalytic Antibody)と呼ぶ。先に述べたように、このような抗体は、遷移状態アナログの免疫によって作製されているが、本学位論文では、従来の遷移状態アナログ法とは全く異なる新しい方法論の開発し、「ホロ酵素型触媒抗体」の分子設計に成功している。抗体をアポ酵素として利用し、人工合成コファクター分子に対する抗原結合部位の構築し、反応性の異なる人工合成コファクターを入れ替えることにより、抗体が触媒できる反応の種類や触媒機構を制御することを可能にした。

リン酸ジエステル型ハプテンを合成し、これをマウスに免疫して2種の抗体を作製した。これら抗体は、アルコール化合物やチオール化合物を人工コファクターとして、アシル転移反応を触媒する。また、カルボン酸基をもつ人工コファクターでは、 β -脱離反応を触媒し、さらに、アミノ基をもつ人工コファクターを使った場合は、アルドール反応および脱炭酸反応を触媒する。従来の触媒抗体では、4種類の反応（アシル転移反応、 β -脱離反応、アルドール反応および脱炭酸反応）を触媒するには、対応する4種類の抗体が必要であるが、ホロ酵素型触媒抗体では、単一の抗体がこれら4種類の反応を触媒し、その触媒活性も従来の抗体に比べて、同等か、あるいはより高い活性を示す。このように、1つの触媒が反応機構の異なる多種の化学反応を効率よく触媒することは、天然酵素にも触媒抗体にも例がなく、酵素化学の基礎研究だけでなく化学工業への応用からも非常に興味深い。

人工コファクターの入れ替えによる機能変換は、言い換えると、活性アミノ酸残基を触媒反応に合わせて対応するアミノ酸に変換していることになる。これはタンパク質科学における部位特異的変異 (site-directed mutagenesis) を化学的に具現化したものであり、「化学的部位特異的変異」と名付けている。

以上のように、申請者は、生体触媒の研究に新しい方向性を示した。この新しい設計法により、さまざまな官能基をもつ低分子化合物を抗原結合部位に導入することが可能となり、触媒抗体の新しい展開が期待できるとともに、天然酵素の分子メカニズムの解明に貢献するものである。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文の審査ならびに最終試験の結果に基づき、申請者に対して博士（理学）の学位を授与することが適当であると結論した。