

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008-2010

課題番号：20310138

研究課題名(和文) 試験管内進化を基盤とする抗体酵素の新機能開拓

研究課題名(英文) Generation of a New Class of Catalytic Antibodies based Directed Evolution

研究代表者

藤井 郁雄 (IKUO FUJII)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号：70189984

研究成果の概要(和文)：

化学反応の遷移状態を模倣した安定な化合物「遷移状態アナログ」をハプテンとして免疫すると、天然酵素と同様な触媒活性をもつ抗体が得られる。本研究では、これまで我々が行ってきた抗体酵素に関する研究を発展させ、試験管内進化による抗体酵素の高機能化を行う。また、進化型ハプテンの免疫より得られたホロ酵素型抗体酵素の新しい機能を開拓する。

研究成果の概要(英文)：

In this study we have tried to generate a new class of catalytic antibodies by two ways, directed evolution and newly designed hapten immunization. We have developed a yeast surface-displayed library of catalytic antibodies showing a luciferase-like activity. In addition, we demonstrate a single antibody catalyzing multiple chemical transformations by the generation of antigen-combining site that function as an apoprotein for binding functionalized small non-protein components. Replacement of this cofactor with acidic and amino cofactors enabled the antibodies to catalyze β -elimination, decarboxylation and aldol reactions with large rate accelerations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：抗体酵素, モノクローナル抗体, 免疫学, タンパク質

1. 研究開始当初の背景

人工酵素を創り上げていくことは、生物学者のみならず化学者の究極の目標である。この20年間、この目標に向けて、いくつもの新しい手法が開発されている。その中で最も信頼できるものの一つは、免疫システムの多様性と特異性を利用して、テーラーメイドの

触媒活性をもつ抗体分子を作製する方法である。化学反応の遷移状態を模倣した安定な化合物(遷移状態アナログ)をハプテンとして免疫すると、天然酵素と同様な性質(触媒活性、基質特異性、立体選択性、位置選択性など)をもつ抗体が得られる。このような抗体を「抗体酵素:Catalytic Antibody」と呼ぶ。

これまでに、いくつもの抗体酵素が開発され、触媒する化学反応の種類も 100 種類を超えている。抗体酵素は、「新しい人工酵素を創り出す」ための有力な方法であり、既存酵素の機能改良を目的とする従来の酵素工学手法とは全く異なる方法論である。原理的には、目的とした化学反応の遷移状態アナログを合成できれば、如何なる化学反応（反応が水中で進行するかぎり）に対しても抗体酵素を作製することが可能である。当研究室では、早くから本研究分野に取り組んできており、免疫システムがもつ抗体タンパク質の多様性を利用して、テラーメイド人工酵素である「抗体酵素」を開発してきている (*J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8527, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 771, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 2332, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 5341, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 1656, *J. Immunol. Methods*, **2002**, *269*, 269, *J. Mol. Biol.*, **2007**, *367*, 133-147, *J. Mol. Biol.*, **2007**, *369*, 198-209)。また、試験管内進化の主要技術であるファージ表面ディスプレイ法を利用して、抗体の基質特異性の改良 (*Nature Biotechnology*, **1998**, *16*, 463) や抗体の親和性の最適化に成功している (*Nature biotechnology*, 2001, **19**, 563-567)。

2. 研究の目的

本研究では、細胞表面ディスプレイ法を利用し、試験管内進化を基盤にして抗体酵素の新しい機能を開拓するとともに、高活性化を行う。また、従来の遷移状態アナログを免疫する手法とは全く異なる新しい抗体酵素の作製法の開発を目指して、進化型ハプテンを設計し、ホロ酵素型抗体酵素の創出を行う。この研究は、学術的には分子進化原理、構造形成原理、機能発現原理の解明に貢献し、工学的には実用的なテラーメイド人工酵素の開発に繋がる。

3. 研究の方法

I) 抗体酵素の試験管内進化

最近、酸化反応を触媒する抗体の作製に、世界で初めて成功した。私たちは、セレンテラジンをルシフェリンとするウミホタルのルシフェラーゼに着目し、ルシフェラーゼ活性をもつ抗体を作製した(図1)。本抗体(7D10)は、分子状酸素によるルシフェリンの酸化反応を触媒し発光する。そこで、本抗体(7D10)の酵母表面提示ライブラリーを構築する。

I-a) 抗体酵素の酵母表面ディスプレイ

酵母 *Aga2* subtype のC末端に、抗体 scFv フラグメントを融合させ、酵母表面に提示させる。

I-b) 酵母表面ディスプレイ・ライブラリーの構築

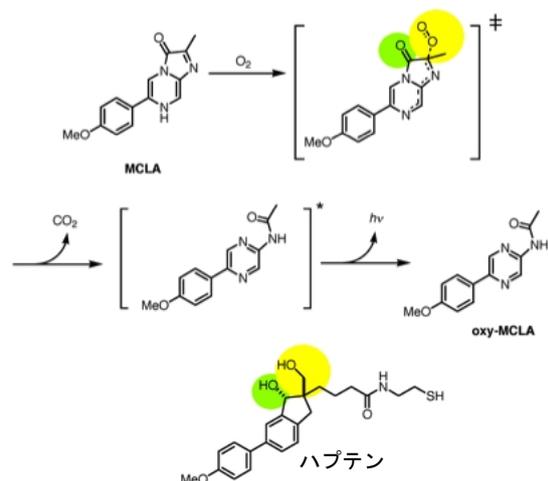


図1. ルシフェラーゼ様抗体酵

抗体 7D10 の scFv フラグメントを酵母表面に提示させ、PCR により抗原結合部位にランダム変異を導入して、抗体 7D9 変異体の酵母表面抗体ライブラリーを作製する。

I-c) セルソーターによる酵母表面ディスプレイ・ライブラリーのスクリーニング

抗原(ハプテン)をビオチン化し、これに結合する抗体提示酵母をセルソーターより選別し、高結合活性の抗体を取得する。

II. ホロ酵素型抗体酵素の新機能開拓

これまでの抗体酵素の多くは遷移状態アナログの免疫によって作製されている。そこで、筆者らは、従来の遷移状態アナログを免疫する手法とは全く異なる新しい抗体酵素の作製法の開発を目指して、ホロ酵素型抗体酵素の分子設計を検討した。ホロ酵素は、活性部位に低分子有機化合物の補酵素をもち、これを触媒基として化学反応を触媒する。そこで、抗体をアポ酵素として利用し、基質分子に加えて、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を行った。反応性の異なる人工合成コファクター分子を設計し、それら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目指した(図2)。

図2に示すようなリン酸ジエステルハプテン1の設計を行った。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

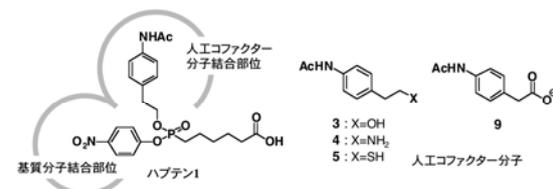


図2. ホロ酵素型抗体酵素の創出

酸エステル部分は、アシル基転移反応の遷移状態を模擬すると同時に抗原結合部位に基質分子結合部位を与える。2) *N*-アセチルフェネチル部分は種々の人工コファクター分子結合部位を抗原結合部位に構築する。また、電荷を持たないリン酸ジエステルハプテンを免疫に用いることにより、アシル基転移反応の遷移状態を強く安定化するようなアミノ酸残基が誘導されることに起因する遷移状態の安定化を触媒因子とするというよりも、基質分子および人工コファクター分子の2分子を幾何学的に適切な位置に置くことによる近接効果を主要な触媒因子とする抗体酵素の作製が期待される。これにより求核触媒、酸・塩基触媒能をもつ補酵素あるいは人工コファクター分子を抗原結合部位に導入し、それらを入れ替えるという新しい概念を導入することにより、人工コファクター分子により触媒できる反応の種類を制御可能な、天然にはない機能性をもつ抗体酵素の開発につながると期待される。そこで、種々の人工コファクター分子を用いて、本抗体酵素の触媒反応を検討し、新たな機能を開発する(図3)。

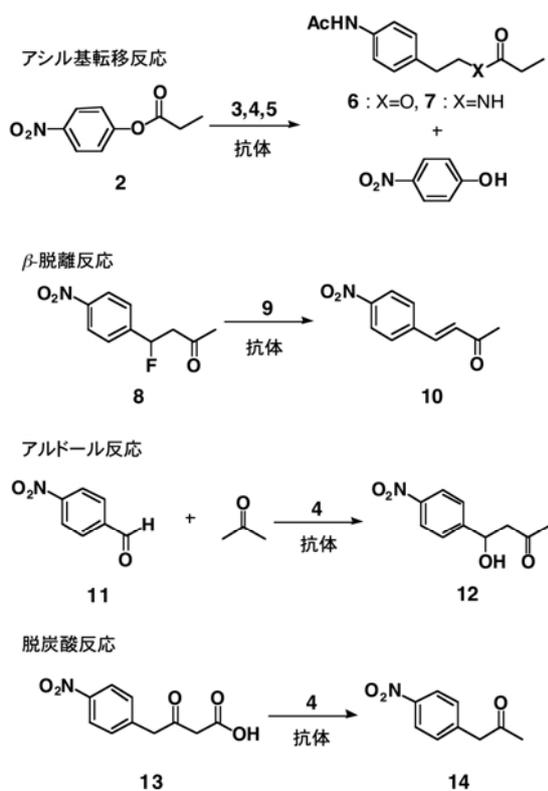


図3. ホロ酵素型抗体酵素による触媒反応

II-a) 抗体酵素によるアシル転移反応

基質分子としてエステル **2** を用い、人工コファクター分子としてヒドロキシル基をもつ化合物 **3**、アミノ基をもつ化合物 **4**、チオー

ル基をもつ化合物 **5** を添加し、求核触媒としてアシル基転移反応を検討する。

II-b) 抗体酵素による β -脱離反応

基質として β -ハロケトン **8** を用い、人工コファクター分子としてカルボキシル基をもつ化合物 **9** を添加すれば塩基触媒として β 脱離反応を検討する。

II-c) 抗体酵素によるアルドール反応および脱炭酸反応

人工コファクター分子としてアミン分子 **4** を添加すればエナミン機構を経るアルドール反応および脱炭酸反応を検討する。

4. 研究成果

1) 抗体酵素の試験管内進化

I-a) 抗体酵素の酵母表面ディスプレイ

ルシフェラーゼ様触媒機能を有する抗体酵素 7D10 および 18F9 の単鎖 Fv 抗体(scFv) を作製を検討した。pETscFv ベクターをタンパク質合成用宿主大腸菌に形質転換後、Histag カラムで精製し、組み換え scFv 抗体を得た (80 μ g)。

7D10scFv の酵母表面提示型プラスミド pYD12 を構築し、それらを酵母表面へ提示させ、蛍光強度を FACS によって定量化した。提示の確認は、1 次抗体として抗 FLAG マウス抗体、2 次抗体として Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を反応させて検出した。また、提示された scFv フラグメントとハプテンとの特異的結合は、ビオチン化ハプテン、R-PE 標識ストレプトアビジンによって検出した(図2)。その結果、効率的な表面提示、および特異的に抗原へ結合することを確認した。

I-b) 酵母表面ディスプレイ・ライブラリーの構築

PCR 法によって scFv にランダム変異を導入した酵母表面提示型 scFv ライブラリーを構築した。ライブラリーサイズはそれぞれ 7D10: 3.2×10^5 、18F9: 1.4×10^6 であった。

I-c) セルソーターによる酵母表面ディスプレイ・ライブラリーのスクリーニング

得られたライブラリーは、磁性アフィニティビーズとマグネットによる MACS システムによって結合性クローンを濃縮し、FACS によるスクリーニングを 3 回繰り返した。スクリーニングで得られたクローンの DNA 配列を解析し、再び酵母表面へ提示し、FACS 測定における蛍光強度から解離定数 K_d を決定した。その結果、解離定数は 7D10-1-C が 6.2 nM、7D10-2-H が 5.91 nM となり、7D10-野生型の 10.9 nM よりも高い親和性を示した。一方、11-H は 4.59 nM であった。

続いて、酵母表面提示用ベクター pYD12 に

組み込まれていた、変異体および野生型 scFv フラグメント領域を大腸菌発現ベクター pIT2 にクローニングを行い、大腸菌によって scFv フラグメントを合成し、His-tag を利用して精製を行った。その結果、収量は野生型が 0.131 mg、1-C が 0.439 mg、2-H が 0.202 mg、11-H が 0.365 mg となり、変異体の合成量は野生型に比べ約 2 倍以上高く、効率よく合成される変異体を選択されたことが明らかになった。

さらに、表面プラズモン共鳴 (SPR 法) を用いて K_d 値を測定した。その結果、1-C が 2.3 nM、2-H が 0.49 nM となり、野生型の 4.5 nM よりも高い親和性を示した。また、11-H は 3.63 nM であった。この、変異体の方が K_d 値が低いという結果は、酵母表層に提示し、FACS 測定における蛍光強度から求めた K_d 値の結果と一致し、セルソーターを用いた選別によって、ハプテンとの親和性がより高い変異体が取得されたことが明らかになった。

11. ホロ酵素型抗体酵素の新機能開拓

11-a) 抗体酵素によるアシル転移反応

ハプテン **1** を担体タンパク質である スカシ貝ヘモシアニン (KLH) やウシ血清アルブミン (BSA) への縮合を行い、KLH-ハプテン縮合体 (KLH-**1**) を Balb/c マウスに免疫した。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。

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** とアルコール **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。人工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** のいずれを用いた場合にも高い触媒活性を示した (図 4)。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、両抗体はハプテン **1** に対し非常に高い結合能を有し (25E2: $K_d = 27$ nM; 27C1: $K_d = 8.7$ 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) はハプテン **1** の添加あるいは各種人工コファクター分子を反応系から除くことによって完全に阻害された。このことより、本抗体が触媒する反応は抗体の抗原結合部位で起こり、その触媒反応には人工コファクター分子が必須であることが判明した。

11-b) 抗体酵素による β -脱離反応

前項で述べたアシル基転移反応の結果から、抗原結合部位に人工コファクター分子結合部

位を構築できたことが明らかとなった。また、ホロ酵素型触媒抗体の最大の特徴と利点は、人工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、人工コファクター分子としてフェニル酢酸誘導体 **9** を用い、塩基触媒による β -脱離反応を検討した (図 5)。その結果、抗体 25E2 が β -ハロケトン **8** 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 はこの β -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 **9**=122 μ M、 K_m **8**=864 μ M、 k_{cat} =0.89 min^{-1} と決定した。また、 k_{cat}/K_m **8**/ k_{uncat} = 2.4×10^5 と非常に大きな速度加速を示すことがわかった。

11-c) 抗体酵素によるアルドール反応および脱炭酸反応

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、アルドール反応を触媒する多くの酵素が見いだされている。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。その中でも、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 (図 6)。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を捕捉できたことにより、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。

クラス I アルドラーゼは同様のエナミン機構により β -ケト酸の脱炭酸反応も触媒することが知られている。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 **13** の脱炭酸反応を検討した (図 3)。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**=6.9 mM、 K_m **13**=2.1 mM、 k_{cat} =1.29 min^{-1} と決定した。また、 k_{cat}/K_m **13**/ k_{uncat} = 1.4×10^5 と非常に大きな速度加速を示すことがわかった。

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 13 件)

① M. Ui, Y. Tanaka, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, M. Hirama, K. Tsumoto,

- Structural and energetic hot-spots for the interaction between a ladder like polycyclic ether and the anti-ciguatoxin antibody 10C9Fab, *Mo. Biosyst.*, 7, 793-798 (2011), 査読有.
- ② T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Hirama, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Pacific Ciguatoxins, *Toxicon*, 56, 797-803 (2010), 査読有.
- ③ D. Fujiwara, Z. Ye, M. Gouda, K. Yokota, T. Tsumuraya, I. Fujii, Selection of Inhibitory Peptide for Aurora-A Kinase from a Phage-displayed Library of Helix-Loop-Helix Peptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1776-1772 (2010), 査読有.
- ④ R. El-Haggar, K. Kamikawa, K. Machi, Z. Ye, Y. Ishino, T. Tsumuraya, I. Fujii, Molecular Design of Small Organic Molecules Based on Structural Information for a Conformationally Constrained Peptide that Binds to G-CSF Receptor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1169-1172 (2010), 査読有.
- ⑤ M. Oda, M. Saito, T. Tsumuraya, I. Fujii, Contribution of the trifluoroacetyl group in the thermodynamics of antigen-antibody binding, *J. Mol. Recogn.*, 23, 263-270 (2010), 査読有.
- ⑥ M. Inoue, N. Lee, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Hirama, Use of Monoclonal Antibodies as an Effective Strategy for Treatment of Ciguatera Poisoning, *Toxicon*, 53, 802-805 (2009), 査読有.
- ⑦ F. Ishikawa, T. Tsumuraya, I. Fujii, A Single Antibody Catalyzes Multiple Chemical Transformations upon Replacement of the Functionalized Small Non-protein Components, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 456-457 (2008), 査読有.
- ⑧ T. Tsumuraya, I. Fujii, Molecular Basis for Transition-state Stabilization in Catalytic Antibodies, *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, 81, 1039-1052 (2008), 査読有.
- ⑨ M. Ui, Y. Tanaka, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, M. Hirama, K. Tsumoto, How protein recognizes ladder-like polycyclic ethers: interactions between ciguatoxin (CTX3C) fragments and its specific antibody 10C9, *J. Biol. Chem.* 19940-19947 (2008), 査読有.
- ⑩ T. Matsubara, M. Iida, T. Tsumuraya, I. Fujii, T. Sato, Selection of carbohydrate-binding domain with a helix-loop-helix structure, *Biochemistry*, 6745-6751 (2008), 査読有.
- ⑪ K. Tsumoto, A. Yokota, Y. Tanaka, M. Ui, T. Tsumuraya, I. Fujii, I. Kumagai, Y. Nagumo, H. Oguri, M. Inoue, M. Hirama, Critical Contribution of Aromatic Rings to Specific Recognition of Polyether Rings by Antibody: The Case of Ciguatoxin CTX3C and Its Specific Antibody 10C9, *J. Mol. Biol.*, 283, 12259-12266 (2008), 査読有.
- [学会発表] (計 50 件)
- ① 円谷 健, 竹内 勝俊, 山下 修治, 平間 正博, 藤井 郁雄, CTX1B 左端構造を認識するモノクローナル抗体の作製と CTX1B の微量検出法の開発, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 11 日, 日本化学会第 91 春季年会 (2011) 講演予稿集.
- ② Ikuo Fujii, Generation of artificial enzymes in the immune system. 2010 環太平洋国際化学会議, 2010 年 12 月 18 日, Honolulu, USA.
- ③ T. Tsumuraya, C. Katono, M. Oda, N. Ito, I. Fujii, Thermodynamic and structural basis for transition-state stabilization in antibody-catalyzed hydrolysis, 2010 環太平洋国際化学会議, 2010 年 12 月 18 日, Honolulu, USA.
- ④ Ikuo Fujii, MicroAntibody: Directed Evolution of Antibody-like Peptides in Phage-displayed libraries, The 14th Korean Peptide-Protein Symposium (KPPS), 2010 年 12 月 2 日, ソウル大学 (ソウル市・韓国)
- ⑤ Ikuo Fujii, Fumihiro Ishikawa, Takeshi Tsumuraya, Holoabzyme: Construction of an antigen-combining site for catalytic components, The Eleventh China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2010 年 11 月 5 日, Chengdu, China
- ⑥ 山口 亜佐子, 相野 弘明, 円谷 健, 藤井 郁雄, 抗シガトキシン (CTX3C) ヒト化抗体の創製, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 2010 年 9 月 25 日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府).
- ⑦ T. Tsumuraya, F. Ishikawa, I. Fujii, Holoabzyme: A Single Antibody Catalyzes Multiple Chemical Transformations Upon Replacement of Artificial Cofactors, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009 年 11 月 10 日, Jeju, Korea.
- ⑧ T. Tsumuraya, I. Fujii, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Pacific Ciguatoxins, 2009 International Symposium and Annual Meeting, Recent

Trends in Bioconvergence Technology,
2009年6月25日, Daejeon, Korea.

⑨ T. Tsumuraya, F. Ishikawa, I. Fujii,
Holoabzyme: A Single Antibody Catalyzes
Multiple Chemical Transformations upon
Replacement of Artificial Cofactors, VII
European Symposium of The Protein
Society, 2009年6月15日, Zurich,
Switzerland.

⑩ T. Tsumuraya, M. Hirama, I. Fujii,
Production of Monoclonal Antibodies for
Sandwich Immunoassay Detection of
Ciguatoxins, 12th Korean Peptide-Protein
Society Symposium, 2008年11月21
日, Seoul, Korea.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: シガトキシン類 CTX1B および 54-デオ
キシ CTX1B を認識するモノクローナル抗体お
よびそれを用いるシガトキシン類検出キット
発明者: 藤井 郁雄, 円谷 健, 平間 正博,
山下 修治

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-226734

取得年月日: 2010年10月6日

国内外の別: 国内

名称: シガトキシン類を認識するヒト化抗体
発明者: 藤井 郁雄, 円谷 健, 山口 亜佐
子, 平間 正博

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-70349

取得年月日: 2010年3月25日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://if.b.s.osakafu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 郁雄 (FUJII IKUO)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号: 70189984

(2) 研究分担者

円谷 健 (TSUMURAYA TAKESHI)

大阪府立大学・理学系研究科・准教授

研究者番号: 00372855