

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550112

研究課題名（和文） 光学活性体認識モノクローナル抗体と熱応答性粒子を融合した新規触媒の開発

研究課題名（英文） Development of Novel Catalysts Utilizing Monoclonal Antibodies Specific for Optically Active Compounds with Thermoresponsive Particles

研究代表者

山口 浩靖（YAMAGUCHI HIROYASU）

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00314352

研究成果の概要（和文）：本研究では優れた分子認識能を有し、テーラーメイドで標的物質を取り込むことができる生体高分子「モノクローナル抗体」に注目した。抗体が結合する物質として、不斉金属触媒反応におけるリガンドとして広く利用されているビナフチル誘導体（BINAP）の前駆体の光学活性体を選んだ。得られた抗体はビナフチル誘導体の一方の光学異性体に強く結合することがわかった。モノクローナル抗体と高分子材料を組み合わせ、抗体のキラル認識を可視化するシステムを構築することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Monoclonal antibodies are considered to be one of the suitable proteins which can be used as a tailor-made chiral recognition reagent. In this study, a chiral binaphthyl derivative was chosen as a target molecule (haptent) which is a precursor for 2,2'-bis(diphenyl phosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP), a widely used ligand in asymmetric metal-catalyzed reactions. We demonstrated that one of the monoclonal antibodies elicited against the binaphthyl derivative could differentiate one of the enantiomers. We could clearly visualize chiral recognition events of the antibody by using poly-*N*-isopropylacrylamide (pNIPAM) bearing the chiral binaphthyl derivative.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：モノクローナル抗体・立体特異性・キラル・分子認識・熱応答性・ビナフチル誘導体

1. 研究開始当初の背景

既存のタンパク質に触媒活性を有する金属錯体を導入した研究が最近になっていくつ報告されている。例えば遷移金属錯体にピオチンを化学修飾し、アビジンと錯体形成させることにより金属錯体をタンパク質上に固定する試みが行われている。しかしこの系では遷移金属錯体が間接的にタンパク質中に固定されることから厳密な反応制御を実現することは容易ではなく、低分子系の遷

移金属錯体の配位子設計による触媒の機能化と同様、多くの試行錯誤を必要とする。これに対して遷移金属錯体あるいは不斉配位子を厳密に認識し、直接的に結合することができるタンパク質が合成できれば、その遷移金属錯体との複合体はより高度な反応制御が可能になると予想される。生体高分子と人工系低分子触媒との融合による新たな機能性触媒の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

優れた分子認識能を有する生体高分子「抗体」を用いて、光学活性（キラル）化合物を特異的に結合させて一方の立体異性体を単離するとともに、この識別された立体異性体を配位子とする金属錯体と抗体との複合体を作製する。テーラーメイドの抗体がキラル有機金属触媒と結合することによってもたらされる「第二配位圏」を利用して種々の不斉反応における高次基質選択性・立体選択性を発現させる。さらにこの抗体を熱応答磁気粒子に固定することで目的のキラル金属触媒単離・精製を容易にする。この粒子が温度に応じて分散・凝集を起こすことを活用して均一・不均一系の両触媒システムが構築できる。凝集した抗体担持粒子は磁石により相分離可能となるため、触媒の回収も容易となり再利用が可能になる。本システムを構築することによりキラル分子の分離精製法の革新、新規抗体触媒の創製、および環境調和型材料の創出を目指した。

3. 研究の方法

本機能性触媒システムの構成成分であるモノクローナル抗体を作製し、その抗体の基質結合能、立体選択性を調べた。抗体が結合する標的分子（抗原決定基）として不斉触媒（遷移金属錯体）の代表的な配位子の部分構造に用いられているビナフチル誘導体を用いた。ビナフチル誘導体とキャリアー蛋白質を結合させて免疫用抗原を合成した。この抗原をマウスへ免疫し、マウス血中に目的の抗原分子に結合する抗体が産生されたことを酵素標識抗体測定法（ELISA）で確認した。抗体産生細胞である脾臓細胞をマウスから摘出した。マウス由来の骨髄腫細胞と融合後、目的物質と結合する抗体を産生する細胞を選した。これらの抗体産生細胞をモノクローナル化した後に、増殖した細胞からモノクローナル抗体を得た。モノクローナル抗体とビナフチル誘導体（R体及びS体）との結合力をELISAにより評価した。

ここで得られたモノクローナル抗体は本研究課題における重要な分子認識素子であり、さらに特異的な触媒機能を発現させる第二配位圏となる。原子移動ラジカル重合法により抗原決定基として用いたビナフチル誘導体を熱応答性高分子（ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）、pNIPAM）に導入し、ここに抗体を添加したときの下限臨界共溶温度（LCST）の変化を観察した。さらにここにビナフチル誘導体を添加したときのLCSTの変化をモニターした。

4. 研究成果

一連の細胞工学的手法を用いて、ビナフチル誘導体と結合する抗体を産生する細胞を

選別した。これらの抗体産生細胞をモノクローナル化した後に、増殖した細胞からモノクローナル抗体を得た。モノクローナル抗体とビナフチル誘導体（R体及びS体）との結合力を調べた結果、本抗体はビナフチル誘導体の一方の光学異性体（S体）に強く結合することがわかった。（R体よりもS体に約320倍高い親和性を有していることが酵素標識抗体測定法（ELISA）により明らかになった。）

S体とR体との結合力の差を利用して、遠心限外濾過操作を行うだけで、S体とR体のラセミ体から高純度の光学異性体を分離することに成功した。

熱応答性高分子を利用した新規キラル分子認識システムを開発することができた。ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）の中央部にリンカーを介してビナフチル誘導体（S体）を結合させた熱応答性ポリマーを合成した。このポリマーと抗体S1E11を混合すると、その下限臨界溶液温度（LCST）が上昇することがわかった。この複合体にビナフチル誘導体（S体）を添加するとLCSTが減少した。一方、R体を添加してもこのような変化は見られなかった。抗体の特異的な分子認識によりポリマーの集積挙動が変化することを利用して、目視でもキラル分子が検出できることがわかった。

S-またはR-ビナフチル誘導体を有するモノマー、アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドを共重合し、抗原ゲル（Ag(S)-gelおよびAg(R)-gel）を合成した。S体のビナフチル誘導体を免疫して得られたモノクローナル抗体にビニル基を導入し、これをアクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドと共重合することにより抗体ゲル（Ab-gel）を得た。Ag(S)-gelとAb-gelを湿潤環境下、37°Cで8時間接触静置した。これらのゲルはリン酸バッファー中で振とうしても離れず、強く接着していることがわかった。このようなゲルの接着は、同種のゲル同士やアクリルアミドゲルでは起こらなかった。Ab-gelをAg(S)-gelとAg(R)-gelの2種ゲルとそれぞれ接触させて同様の実験を行ったところ、Ab-gelは特異的にAg(S)-gelと接着した。このゲル接着はゲルに導入したモノクローナル抗体の特異的な光学異性体認識に起因していると考えられる。ゲルに抗原・抗体をそれぞれ固定することにより、抗体のキラル認識を可視化することができた。

抗体と同様、ターゲットとなる分子を認識するホスト分子としてシクロデキストリンを用い、これをポリアクリルアミドゲルに導入してホストゲルを合成し、上記モノクローナル抗体を固定したゲルと同様、分子認識に基づくゲルの特異的な接着挙動が観察された。

また抗体のターゲット分子を工夫することにより、爆発物質を検出できる抗体を作製することにも成功した。

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 5 件)

- ① Yamaguchi, H.; Harada, A. Specific Biosensing with Supramolecular Complexes of Antibodies, *Chemical Sensors*, 査読有, 27, 2011, 8-14.
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2011/2011-1abt.htm#3>
- ② Yamaguchi, H.; Kobayashi, R.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Harada, A. Self-Assembly of Gels through Molecular Recognition of Cyclodextrins: Shape Selectivity for Linear and Cyclic Guest Molecules, *Macromolecules*, 査読有, 44, 2011, 2395-2399.
DOI: 10.1021/ma200398y
- ③ 山口浩靖, 橋爪章仁, 高島義徳, 原田明, 自己組織化超分子ポリマーの機能化—分子認識に基づく特異的なゲル集積—, *化学工業*, 査読無, 63, 2012, 96-104.
<http://www.kako-sha.co.jp/2012contentskagaku.htm>
- ④ Matsumoto, T.; Yamaguchi, H.; Kamijo, K.; Akiyoshi, M.; Matsunaga, T.; Harada, A. Development and Characterization of a Monoclonal Antibody against Triacetone Triperoxide, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 査読有, 86, 2013, 198-202 (BCSJ Award Article).
DOI: 10.1246/bcsj.20120253
- ⑤ 原田明, 山口浩靖, 高島義徳, 橋爪章仁, 分子認識を“この目で”見る—巨視的世界で実現した超分子のホスト-ゲスト相互作用—, *月刊化学*, 査読無, 67, 2012, 26-30.
<http://www.kagakudojin.co.jp/book/b101568.html>

[学会発表] (計 15 件)

- ① 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, 光学活性ビナフチル基に対するモノクローナル抗体の作製とそれをを用いた光学分割, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010 年 5 月 28 日, パシフィコ横浜 (横浜市).
- ② 山口浩靖, 原田明, 抗体と人工金属錯体との複合体を用いたエネルギー変換・触媒システム, バイオインダストリー協会 e バイオ (Electron-oriented Biotechnology) の展開, 2010 年 8 月 24 日, (財)バイオインダストリー協会 (東京都中央区).
- ③ 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体を用いた機能性触媒・エネルギー変換システム, 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9

月 15 日, 北海道大学 (札幌市).

- ④ 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, 光学活性ビナフチル基に対するモノクローナル抗体の作製とその応用, 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 16 日, 北海道大学 (札幌市).
- ⑤ 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体を用いた機能性超分子錯体の合成, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 2010 年 9 月 24 日, 大阪大学 (豊中市).
- ⑥ Yamaguchi, H.; Harada, A. Functionalized Catalytic and Energy Conversion Systems with Monoclonal Antibodies, *Pacificchem 2010*, 2010 年 12 月 15 日, Honolulu, Hawaii (USA).
- ⑦ 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体を用いたビナフチル誘導体の簡便な光学分割とエナンチオ選択的検出法の構築, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 27 日, 神奈川大学 (横浜市).
- ⑧ 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体を用いたビナフチル誘導体の光学分割とエナンチオ選択的検出, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 28 日, 大阪国際会議場 (大阪市).
- ⑨ Yamaguchi, H.; Harada, A. Functionalized Catalytic and Energy Conversion Systems with Monoclonal Antibodies, *Bio-inspired Materials and Functionalities*, 2011 年 6 月 21 日, Hampshire Hotel Plaza, Groningen (The Netherlands).
- ⑩ 山口浩靖, 尾高友紀, 原田明, モノクローナル抗体を用いたキラル分別と特異的キラル可視化システム, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 14 日, つくば国際会議場 (つくば市).
- ⑪ 山口浩靖, 尾高友紀, 原田明, モノクローナル抗体によるビナフチル誘導体のキラル認識と特異的検出システム, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 30 日, 岡山大学 (岡山市).
- ⑫ Yamaguchi, H.; Harada, A. Visualization of Specific Molecular Recognition Events by Monoclonal Antibodies or Cyclodextrins with Synthetic Polymers, *International Symposium on Polymer Chemistry (PC2012)*, 2012 年 6 月 5 日, Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun (China).
- ⑬ 永田健人, 山口浩靖, 原田明, 抗体修飾ゲルを用いた新規キラル識別・自己組織化システム, 第 61 回高分子討論会, 2012 年 9 月 20 日, 名古屋工業大学 (名古屋市).
- ⑭ Yamaguchi, H. Functionalized Catalytic and Energy Conversion Systems with

Monoclonal Antibodies, Osaka University
Macromolecular Symposium '12, 2012 年 11
月 10 日, 大阪大学 (豊中市).

- ⑮ Yamaguchi, H.; Hashidzume, A.; Takashima,
Y.; Harada, A. The 9th SPSJ International
Polymer Conference, 2012 年 12 月 13 日,
神戸国際会議場 (神戸市).

[図書] (計 2 件)

- ① Yamaguchi, H.; Harada, A. Wiley-VCH,
Supramolecular Polymer Chemistry (ISBN:
978-3-527-32321-0), 2011, 127-150.
② Yamaguchi, H.; Harada, A. John Wiley &
Sons, Inc., Chemosensors: Principles,
Strategies, and Applications (ISBN:
978-0-470-59206-9), 2011, 211-228.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ情報

[http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/yamaguchi/
index.html](http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/yamaguchi/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 浩靖 (YAMAGUCHI HIROYASU)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00314352

(2) 研究分担者

原田 明 (HARADA AKIRA)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：80127282