

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288082

研究課題名(和文)抗体の分子認識能を活用した新規協奏機能超分子触媒の創製

研究課題名(英文)Creation of Novel Concerted Supramolecular Catalysts Utilizing Molecular Recognition Ability of Antibodies

研究代表者

山口 浩靖 (Yamaguchi, Hiroyasu)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00314352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：キラル認識抗体を用いることでより厳密かつ簡便な光学分割と不斉触媒反応が実現できると考え、本研究では軸不斉を有するビナフチル誘導体(BN)に対するモノクローナル抗体を作製し、その不斉認識能を調査した。モノクローナル抗体とBNのラセミ体を混合し、限外ろ過を行うだけで、高い光学純度の一方の光学異性体が得られた。また、ラセミ体を用いても不斉認識能を有する抗体を作製できた。

ロジウム錯体のみならずパラジウム錯体をも取り込むモノクローナル抗体を作製できた。アリル位アミノ化反応において、得られた抗体と遷移金属錯体との複合体を用いると立体選択的に反応が進行することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Binaphthyl groups with axial chirality compose many chiral ligands (ex. BINAP) used in asymmetric synthesis. Preparation of monoclonal antibodies (MABs) specific for each optical isomer is thought to be appropriate to realize convenient chiral separation and asymmetric catalytic system. We obtained MABs specific for one of optical isomers of binaphthyl derivative (BN) by immunization with racemic mixture. One of the chiral isomers of BN could be separated with high e.e. by a simple procedure using the corresponding mAbs.

MABs which can bind not only rhodium complex but also palladium complex were obtained. The catalytic activity of the complex between monoclonal antibody with the palladium catalyst was examined. Allylic amination reaction was found to be catalyzed with high stereoselectivity by utilizing the MAB-palladium complex.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：モノクローナル抗体 タンパク質 不斉触媒 キラル認識 遷移金属錯体 分子認識

1. 研究開始当初の背景

有機溶媒を用いない立体選択的精密合成は環境負荷軽減のための機能性材料合成において重要な課題である。現在に至るまでに様々な触媒活性を有する金属錯体が合成され、その配位子を工夫することにより不斉触媒が開発されている。しかし多くの場合、その分子設計には多くの試行錯誤を伴い、水系での触媒反応は今なお研究を推進する必要がある。一方、生体系では酵素のようなタンパク質又は補因子 - タンパク質錯体が極めて厳密な基質特異性を有し、立体特異的に反応を触媒する。人工系において合成された機能性有機金属触媒とタンパク質を融合することによって人工系と生体系の両者の長所を兼ね揃えた機能性触媒が構築できると考えられる。

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ビ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ある。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い。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、遷移金属錯体との複合体形成により高度な反応制御が可能になると予想される。生体高分子と人工低分子触媒との融合による新たな機能性触媒の開発、その機能性触媒を容易に反応系から分離・再利用できるようなシステム化が望まれている。

2. 研究の目的

生体分子と人工分子との融合により協奏的な触媒機能発現を可能にする超分子を開発する。本研究では優れた分子認識能を有する生体高分子「抗体」を基軸物質とする。テラーメイドの生体宿主分子「抗体」の結合部位に有機金属錯体を導入することにより、高機能触媒を開発する。

立体特異的な反応を行う上で、活性中心と

なる有機金属錯体の周りに反応制御場「第二配位圏」を構築し、その機能性触媒を容易に取り扱うことができるシステムを確立することができれば、触媒化学、タンパク質工学において大きなブレイクスルーになる。水系において金属配位子だけでは制御不能だった触媒反応の立体特異性の実現、触媒を容易に反応系から分離できる超分子型触媒の開発ができれば、持続可能な社会にふさわしい化学合成法として大きな伸展が期待できる。

3. 研究の方法

立体選択的に触媒反応を目指して、下記のような2種のモノクローナル抗体を作製した。(1) 遷移金属錯体のキラル源となるキラル化合物を認識するモノクローナル抗体と、(2) 不斉を持たない遷移金属錯体に直接結合するモノクローナル抗体である。(1)ではピナフチル誘導体を、(2)フェニルホスフィン配位子を有するパラジウム錯体またはロジウム錯体を用いた。合成した抗原決定基のキャラクターゼーション(純度と構造評価)は、種々のNMRスペクトル測定、質量分析、IR、および元素分析により行った。免疫用抗原をマウスへ2週間間隔で免疫した。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確認するために、金属錯体を別のキャリアタンパク質に結合させたものを用いて評価した。牛血清アルブミン(免疫用抗原は貝類のタンパク質であるヘモシアニン)に金属錯体を結合させた検定用抗原に、免疫マウスから採取した血液を添加して、目的物質に結合する抗体量を酵素標識抗体測定法(ELISA)によりモニターした。血液中に該当抗体が分泌されていることを確認した後に脾臓細胞を摘出した。マウス由来の骨髄腫細胞と融合することにより、マウス体外でも増殖可能な細胞を得る。培養細胞から分泌される抗体が抗原に結合するか否かをELISAにより測定し、結合する抗体を作り出す細胞を選別した。ELISA陽性が確認できた細胞腫に関しては、目的の抗体を産生する細胞を各々一個の細胞に希釈(モノクローン化)した。モノクローナル抗体を量産するために、抗体産生細胞をマウス腹腔内に注入し、2週間後

に腹水を採取した。抗体を特異的に結合するアフィニティーカラムを用いて抗体を精製した。各モノクローナル抗体と有機金属錯体との親和性を ELISA により評価した。

キラル認識抗体に関しては、ピナフチル誘導体の *R* 体、*S* 体に対する各解離定数を測定した。本抗体にピナフチル誘導体のラセミ体 (*R* 体と *S* 体の等量混合物) を添加し、この混合溶液を限外ろ過して、溶出されるピナフチル誘導体、ならびに抗体に結合したピナフチル誘導体の光学純度をそれぞれ旋光度検出装置や円二色性スペクトル測定装置を用いて測定した。

抗体と有機金属錯体の複合体存在下、炭素-炭素形成反応や、水素あるいは一酸化炭素/水素を加圧条件下で添加することにより水素化反応やヒドロホルミル化反応を行い、抗体の結合効果を検討した。抗体の非存在下と存在下においてそれぞれ得られる生成物の収率、立体選択性、光学活性を GC、HPLC によりモニターした。パラジウム錯体と抗体との複合体を触媒として用いて、上記触媒反応の他にアリル位アミノ化反応もを行い、触媒能、立体選択性を調査した。これらの結果を総合して、金属錯体に抗体が結合することによる第二配位圏の効果を検証した。本研究で得られたモノクローナル抗体と対応するキラル化合物をそれぞれ固定したゲルを合成し、2 種ゲルを接着させた。接着することによってはじめて触媒機能が発現するようなマクロスケールの不均一触媒を目指した。触媒反応を巨視的なスケールで制御するシステム開発の一環として、遷移金属錯体を捕因子として持つ酵素をアポタンパク質と捕因子に分けて、それぞれを高分子ヒドロゲルに固定し、触媒反応を制御する試みも行った。

4. 研究成果

(1) キラルを認識するモノクローナル抗体の作製

軸不斉を有するピナフチル誘導体 (BN) に対するモノクローナル抗体を作製し、その不斉認識能を調査した。ラセミ体の BN (BN (*rac*) と表記) を用いて作製したモノクローナル抗体は BN (*R*) より 14000 倍 BN (*S*) に強く

結合した。ラセミ体を用いて免疫することで、一方の光学異性体を強く結合する抗体を作製できることがわかった。この抗体は、ナフチル誘導体やピフェニル誘導体に対する結合力が BN と比較して極めて弱かった。このことから得られた抗体はピナフチル誘導体の軸不斉を厳密に認識していると考えられる。モノクローナル抗体とその結合部位に対して当量の BN (*rac*) を混合した後、限外ろ過によって遊離の BN を分離した。その光学純度を可視・紫外吸収スペクトルおよび円二色性スペクトルから算出した。その結果、BN (*R*) を用いた免疫により得た 6 種のモノクローナル抗体のうちの 1 種と BN (*rac*) 混合し限外ろ過を行うだけで、高い光学純度の異性体を得られることがわかった。

(2) パラジウム錯体を取り込むモノクローナル抗体の作製と機能化

ロジウム錯体を免疫して得られた抗体はロジウム錯体と同じホスフィン配位子を有するパラジウム錯体をも取り込むことがわかった。さらに、抗原決定基の部分構造に当たるフェニル化合物や、異なる配位子を持つパラジウム-ビピリジル錯体では十分な競争阻害が起こらなかった。以上のことから、本抗体は 2 つのフェニルホスフィン部位を協同的に認識し、パラジウム・ロジウム両錯体に結合していることが示唆された。

パラジウム錯体が触媒となるアリル位アミノ化反応の立体選択性について検討した。抗体存在あるいは非存在下での反応生成物を HPLC により分析した。抗体非存在下では反応生成物において *S* 体、*R* 体の両方のピークが観測され、パラジウム錯体のみでは立体選択性は見られなかった。一方、抗体存在下では *S* 体のピークはほぼ現れず、*R* 体が観察された。抗体存在下において高い光学純度で *R* 体が生成しており、高い立体選択性があることを発見した。

高分子ヒドロゲルに遷移金属錯体あるいはキラル化合物と対応するタンパク質をそれぞれ固定したとき、両ゲルを接触させると、該当タンパク質と相互作用の強い化合物が固定されたゲルと特異的に接着し、触媒反応

が制御できることも見出した。

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8件)

下記3件とその他5件、投稿中論文を除く

(1) Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Manual Control of Catalytic Reactions: Reactions by an Apoenzyme Gel and a Cofactor Gel, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 16254 (査読有).

(DOI: 10.1038/srep16254)

(2) 山口浩靖, 生体分子と人工化合物の融合による超分子錯体の機能化, *高分子* **2014**, 63, 43-44 (査読無).

(<http://main.spsj.or.jp/c5/kobunshi/kobu2014/1401.html#43>)

(3) Takashima, Y.; Uramatsu, K.; Jomori, D.; Harima, A.; Otsubo, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Ring-Opening Metathesis Polymerization by a Ru Phosphine Derivative of Cyclodextrin in Water, *ACS Macro Lett.* **2013**, 2, 384-387 (査読有).

(DOI: 10.1021/mz4001942)

[学会発表](計25件)

下記18件とその他7件

(1) 村田佳祐, 高島義徳, 原田明, 山口浩靖, パラジウム錯体を取り込むモノクローナル抗体の作製, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月24日 - 27日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市).

(2) Adachi, T.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Purification of Chiral Compound Using Monoclonal Antibodies for a Binaphthol Derivative, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月24日 - 27日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市).

(3) Adachi, T.; Odaka, T.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Characterization and Functionalization of Monoclonal Antibodies with Chiral Recognition Ability for Binaphthol Derivatives, 第64回高分子討論会, 2015年9

月15日 - 17日, 東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市).

(4) 安達琢真, 原田明, 山口浩靖, キラル認識能を有するモノクローナル抗体作製法, 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年9月10日 - 12日, 熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市).

(5) 安達琢真, 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, ビナフトール誘導体の光学異性を識別するモノクローナル抗体の作製とキャラクターゼーション, 第61回高分子研究発表会, 2015年7月17日, 兵庫県民会館 (兵庫県神戸市).

(6) Koyanagi, K.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Polymerization Mediated by RAFT Agents Bearing Cyclodextrin Moieties for Monomer Inclusion, 10th ISMSC-2015, 2015年6月28日 - 7月2日, Strasbourg, France.

(7) 山口浩靖, 抗体を用いた特異的反応場およびセンシング素子の開発, 第20回産学高分子研究会, 2015年6月15日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市).

(8) 小柳昂平, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, モノマー認識部位を導入したROMP触媒の開発と評価, 第64回高分子学会年次大会, 2015年5月27日 - 29日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).

(9) 安達琢真, 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, キラルを識別するモノクローナル抗体の作製とキャラクターゼーション, 第64回高分子学会年次大会, 2015年5月27日 - 29日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).

(10) 小柳昂平, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, モノマー認識部位を導入したRu錯体の開発とその開環メタセシス重合特性の評価, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月26日 - 29日, 日本大学船橋キャンパス (千葉県船橋市).

(11) 山口浩靖, 分子認識に基づく機能開拓 - 生体系と人工系のコラボレーション -, 国際高等研究所研究会「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」, 2014年度第1回研究会, 2014年12月14日 - 15日, 国際高等研究所 (京都府木津川市). [招待講演]

(12) 山口浩靖, ハイブリッドの科学 - 人工と

生体との接点から新しい機能を探る - ,第 23 回大阪大学理学研究科技術職員研修, 2014 年 10 月 31 日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市). [依頼講演]

(13) 山口浩靖, 「生体」と「合成」の接点 - ハイブリッド化による高分子の機能化 -, 生物医工学サロン第 56 回集会, 2014 年 8 月 20 日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市). [依頼講演]

(14) Yamaguchi, H.; Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Harada, A. Self-Assembly of Polymer Gels through Metal-Ligand Interactions, 6th International Symposium on Polymer Chemistry (PC2014), 2014 年 6 月 5 日 - 7 日, Shanghai, China. [招待講演]

(15) 山口浩靖, 生体高分子と合成高分子のハイブリッド触媒の開発, 産学高分子研究会, 2014 年 6 月 2 日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市). [依頼講演]

(16) 山口浩靖, 高分子を用いた見える化・機能化, 東工大資源研講演会, 2014 年 3 月 7 日, 東京工業大学資源化学研究所 (神奈川県横浜市). [特別講演]

(17) 山口浩靖, 自然から学ぶ高分子機能化学, 第 81 回高分子若手研究会[関西], 2013 年 11 月 16 日, 大阪工業大学大宮キャンパス (大阪府大阪市). [招待講演]

(18) Yamaguchi, H.; Harada, A. Functionalized Monoclonal Antibodies for Specific Sensing, Catalytic, and Energy Conversion Systems, 5th Gratama Workshop, 2013 年 5 月 30 日, 東工大蔵前会館 (東京都目黒区).

[図書](計 3 件)

(1) 山口浩靖, 元素ブロック導入ソフトマテリアルの自己組織化, 元素ブロック高分子 - 有機 無機ハイブリッド材料の新概念 -, 中條善樹監修, シーエムシー出版, 2015, 246-251.

(2) 山口浩靖, 自己組織化・自己集合性, 超分子材料の設計と応用展開, 原田明監修, シーエムシー出版, 2014, 10-20.

(3) 山口浩靖, 人工金属酵素の超分子的機能化, 超分子材料の設計と応用展開, 原田明監修, シーエムシー出版, 2014, 238-248.

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 (平成 25-26 年度)

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