

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19685010

研究課題名（和文）抗体と遷移金属錯体を融合した不斉超分子触媒の開発

研究課題名（英文）Development of Asymmetric Supramolecular Catalysts with Antibodies and Transition Metal Complexes

研究代表者

山口 浩靖（YAMAGUCHI HIROYASU）

大阪大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：00314352

研究成果の概要（和文）：本研究では抗体の抗原結合部位を利用して特異的な反応場を構築することを目的に、人工系において有用な触媒として用いられている有機金属錯体に結合するモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体に金属錯体を取り込まれることによって初めて発現される特異な機能を見いだした。さらに金属錯体の立体異性体や光学活性を有する化合物に対して特異的に結合するモノクローナル抗体の作製に成功した。

研究成果の概要（英文）：Some monoclonal antibodies which can bind organic metal complexes with high specificity and high affinity were prepared in order to construct a specific reaction field utilizing their antigen-binding sites. Unique functions were developed by the incorporation of metal complexes into the binding site of monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies for stereoisomers of transition metal complexes or enantiomers of organic compounds were also prepared successfully.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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・遷移金属錯体・超分子・立体選択性・不斉触媒・エネルギー変換

1. 研究開始当初の背景

今までに作製されてきた触媒抗体（抗体酵素）はある反応の遷移状態アナログに対して作製されてきたが、その反応の種類には限りがある。人工系において有用な触媒として用

いられている有機金属触媒に対する抗体を作製し、有機金属錯体と抗体とのハイブリッド錯体を利用することによって様々な反応の触媒へと拡張することが期待される。

2. 研究の目的

有機金属錯体の中でも後周期遷移金属錯体は人工系において生体では見られないような反応触媒となる。この遷移金属錯体を取り込むことができる抗体を単離することにより、抗体は遷移金属錯体の周囲環境を規制する新たな配位圏（第2配位圏）として機能すると考えられる。つまり遷移金属錯体に対して化学的に均一な結合様式をもって結合する抗体を選別し、抗体と遷移金属錯体との錯体を形成させることができれば、遷移金属錯体のみでは制御が困難であった基質の立体制御、反応制御を実現できると考えた。本研究では種々の金属錯体を取り込むことができるモノクローナル抗体を作製し、抗体と金属錯体との複合体を用いた新規触媒機能を開発する。

3. 研究の方法

生体高分子の優れた分子認識能と遷移金属錯体の優れた触媒活性を融合した新規機能性超分子を構築する。ある一つの抗原にある特定の結合様式を持って結合するモノクローナル抗体は遷移金属錯体との複合体形成により、ある特定の環境を金属錯体周りに提供する。この空間を利用して新しい立体構造制御触媒システムを構築する。これまでの不斉触媒設計は金属に結合する配位子に不斉因子（キラル）を導入することによる制御が試みられてきた。本研究における抗体-遷移金属錯体は抗体蛋白質を不斉源とするもので、金属配位子が対照構造（アキラル）であっても不斉反応を誘起できるものと予想される。酵素同様に補因子（cofactor）を抗体に導入することによりテーラーメイドの触媒設計が可能になる。人工系において優れた触媒機能を有する遷移金属錯体を抗体結合部位中に固定することにより天然系では見られない触媒反応を抗体存在下で発現させ、より高度な反応制御を目指す。遷移金属錯体をビオチンに結合させて、アビジンとの錯体形成により間接的に遷移金属錯体を蛋白質環境下に導入した研究例はあるが、この蛋白質は遷移金属錯体に対する鑄型ではないため、触媒反応に基質選択性は見られず、酵素と同様の基質特異性と厳密な立体選択

性は得られていない。これに対して本研究の抗体-遷移金属錯体における金属錯体は直接抗体の結合部位により覆われた構造を有し、極めて厳密な基質特異性を示すものと期待される。

本研究では抗体に取り込む金属錯体を抗原決定基として用い、これをキャリアー蛋白質に導入することにより抗原を合成した。この抗原をマウスに免疫することにより、金属錯体に結合する抗体を産生する脾臓細胞を得た。この脾臓細胞と骨髄腫細胞とを融合することにより培養液中で生き続ける抗体産生細胞を調製した。検定用抗原を用いて、これらの細胞から産生される抗体との結合能をモニターすることによって、目的の抗体を作る細胞を選別した。細胞を一個まで希釈（限界希釈）することによりモノクローン化し、得られた細胞をマウス腹腔内に注入することによりモノクローナル抗体を含む腹水を得た。アフィニティーカラムを用いてモノクローナル抗体を精製した。

モノクローナル抗体と金属錯体や有機化合物との結合力を酵素標識抗体測定法（ELISA）、吸収・蛍光スペクトル測定により決定した。

遷移金属錯体に結合するモノクローナル抗体を用いて水素化反応、移動水素化反応を行い、遷移金属錯体のみ（抗体非存在下）での反応生成物の光学純度と比較検討した。

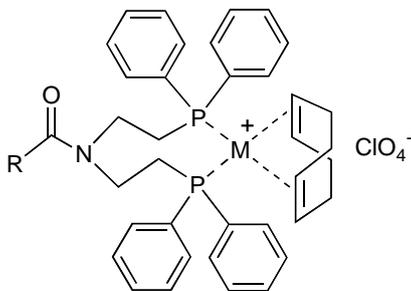
人工色素の金属錯体に結合するモノクローナル抗体を用いた系では、抗体と色素との複合体に光照射を行い、ここに電子アクセプター、犠牲ドナー、および白金コロイドを添加したときに発生する水素の濃度をモニターした。

4. 研究成果

(1) 遷移金属錯体に結合するモノクローナル抗体を用いた基質選択的不斉水素化反応

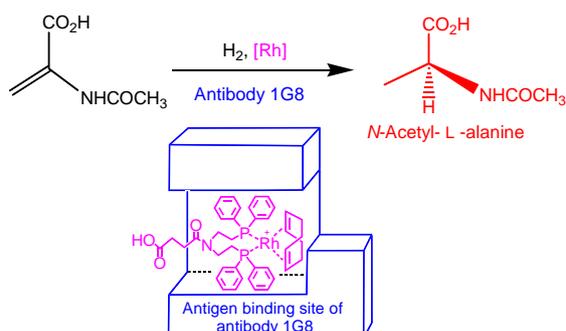
ジフェニルホスフィンとシクロオクタジエンを配位子とするアキラルなロジウム錯体 **1** を抗原決定基として、これをキャリアー蛋白質に導入した抗原をマウスに免疫することにより、錯体 **1** を特異的に結合するモノクローナル抗体 **1G8** を得た。得られた抗体は全て IgM（分子量 960000）であった。そのう

ちの1種、抗体1G8は錯体1と最も強く結合し、 2.3×10^{-7} Mの解離定数を有することがわかった。アルゴン雰囲気下リン酸バッファー(0.1 M, pH 7.0)中に抗体1G8と錯体1を混合し、ここにアミノ酸前駆体を基質として添加した。この溶液に水素をバブリングし、37°Cで12時間反応させた後、光学活性カラムを用いたHPLCあるいはGCにより分析した。



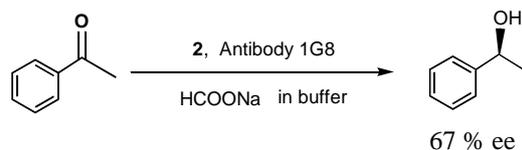
- 1: R = HOOC-(CH₂)₂-, M = Rh
 2: R = HOOC-(CH₂)₂-, M = Ir
 3: R = H₃C-N⁺(CH₂)₅-, M = Ir

アラニン前駆体の水素化反応では、抗体非存在下 D-体と L-体の両者のラセミ体が得られるのに対して、抗体存在下では L-体のみが生成していることがわかった。比較として牛血清アルブミン(BSA)と1との混合物あるいは他のIgM抗体と錯体1との混合溶液を用いて同様の条件下において2-アセトアミドアクリル酸の水素化反応を行ったところ、これらの反応生成物はすべて D-体と L-体のラセミ体であった。錯体1と抗体1G8との錯体系におけるエナンチオ選択性はロジウム錯体が抗体の結合部位に取り込まれることによりはじめて発現されたものであると考えられる。錯体1のみでの水溶液中での2-アセトアミドアクリル酸から N-アセチルアラニンへの転換率は11%であるのに対して、ロジウム錯体1と抗体1G8との錯体存在下での転換



率は23%となり、本抗体とアキラルなロジウムとの複合体は優れた不斉水素化触媒となることがわかった。

抗体1G8はロジウム錯体のみならず2や3のようなイリジウム錯体とも複合体を形成した。このモノクローナル抗体とイリジウム錯体との複合体を用いてケトン類およびイミン類の移動水素化を行った。本抗体は3Mギ酸ナトリウム存在下でも錯体2と安定な複合体を形成することがわかった。ギ酸ナトリウムを水素源とするアセトフェノンの移動水素化反応において、錯体2のみではラセミ体が得られるのに対して、抗体存在下では下記の生成物が67% eeで得られた。抗体がアキラルな配位子を有する遷移金属錯体に結合することによりケトンの移動水素化反応においても立体選択性を付与することができた。



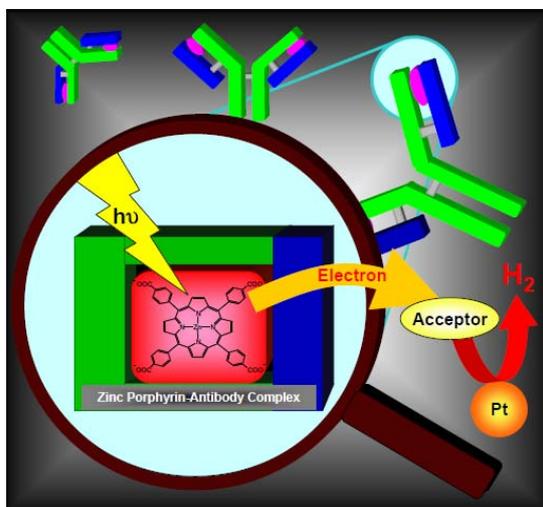
錯体3は別途作製したビオロゲンに対するモノクローナル抗体10D5と 5×10^{-6} Mの解離定数をもって結合することがわかった。抗ビオロゲン抗体が錯体3の末端に存在するビオロゲン部位に結合することにより金属錯体が抗体結合部位の表面に固定されることになる。抗体10D5と錯体3との複合体を用いてアセトフェノンの移動水素化を行った結果、錯体2のみの系と同様、生成物はラセミ体となることがわかった。この結果は金属錯体に「直接」結合する抗体を用いた結果と対照的で、本研究において見いだされた触媒反応の立体選択性はモノクローナル抗体がアキラルな遷移金属錯体に対して「直接」結合することによりはじめて発現されたものであり、抗体蛋白質が触媒の第2配位圏として重要な役割を果たしていることを示すものである。

(2) ポルフィリン-抗体錯体を用いた水素発生システムの構築

水溶性ポルフィリンであるテトラカルボキシフェニルポルフィリン (TCCP) に強く結合

するモノクローナル抗体を一連の細胞工学的手法により作製した。そのうちの一種、抗体2B6は電子ドナーであるTCPPの亜鉛錯体(ZnTCPP)と 2.1×10^{-8} Mの解離定数をもって錯体形成し、ZnTCPPの励起三重項寿命は抗体結合により0.5 msから1.2 msへ長寿命化した。この抗体-ポルフィリン錯体に電子アクセプターであるメチルビオロゲン(MV²⁺)を添加すると、ZnTCPPからMV²⁺への電子移動が促進され、抗体非存在下と比較して19倍のカチオンラジカル(MV^{•+})が生成した。このMV^{•+}生成速度は $1.3 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ に達することがわかった。分子量5万のH鎖2本と2万5千のL鎖2本からなる抗体2B6をdithiothreitolで処理し、H鎖とL鎖に分割した。抗体2B6のH鎖は抗体そのものと同様にZnTCPPと強く結合し、ZnTCPPからMV²⁺への電子移動はH鎖の存在下でも促進された。一方L鎖存在下でのMV^{•+}生成量はポルフィリンのみの系と同じであることから、MV^{•+}の効率的生成はZnTCPPと抗体2B6あるいは2B6-Hが結合してはじめて見られる現象であることがわかった。この系にプロトンの還元触媒として白金コロイドを添加し、水素発生システムを構築した。

ポルフィリンへの光照射による水素発生量は抗体2B6存在下において最も多く、ZnTCPPのみの系の18倍になった。H鎖存在下ではその4割程の水素発生が見られた。抗体L鎖存在下ではポルフィリンのみと同様、微量であった。抗体のH鎖とL鎖が協同的にZnTCPPからMV²⁺への電子移動を制御することで効率的な水素発生が起こったものと考えられる。



この水素発生効率は現存するポルフィリン-蛋白質錯体の中で最も高いことがわかった(日本化学会欧文誌BCSJ Awardを受賞)。

(3) 不斉・立体異性体を識別するモノクローナル抗体の作製

立体特異的な反応制御を目指して遷移金属イオンと配位可能なキラル化合物(キラル配位子)に対するモノクローナル抗体を作製した。光学活性化合物であるビナフチル誘導体を抗原決定基として設計した。ビナフチル誘導体のR体あるいはS体をそれぞれキャリアタンパク質に導入することによって合成された抗原に対して、特異的に結合する抗体がマウス体内で産生されていることがわかった。単離されたモノクローナル抗体は光学異性体の関係にある2つの化合物のうち、一方の光学異性体を特に強く結合することが明らかになった。一方の光学異性体を厳密に認識するモノクローナル抗体を用いて簡便な新規光学分割法を構築した。ビナフチル誘導体のS体に強く結合する抗体をセファロースビーズに固定化し、ここにビナフチル誘導体のラセミ体を通すことで一方の光学異性体を高い光学純度で精製できることを見いだした。

光学異性体を有するルテニウム-トリスピリジン錯体に対するモノクローナル抗体を作製することにも成功した。このルテニウム錯体は3つのスピリジン誘導体の配位する位置によってΔ体とΛ体の2種類の位置異性体が存在する。両者の混合物を免疫してモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体はルテニウムに配位しているリガンドのうち少なくとも2つのリガンドの位置を精密に認識していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

1. Yamaguchi, H.; Onji, T.; Ohara, H.; Ikeda, N.; Harada, A. Photoinduced Hydrogen Evolution System with an Antibody-Porphyrin Complex as a Photosensitizer, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 1341-1346. 査読有
2. Harada, A.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y. Polymeric Rotaxanes, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5974-6023. 査読有
3. 原田明, 山口浩靖, 自己組織化による超分子・分子マシンの構築, *高分子*, **2009**,

- 58, 457-460. 査読無
4. Yamaguchi, H.; Hirano, T.; Kiminami, H.; Harada, A. Asymmetric Hydrogenation with Antibody-Achiral Rhodium Complex, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, S128-S129. 査読無
 5. Kitagishi, H.; Kakikura, Y.; Yamaguchi, H.; Oohora, K.; Harada, A.; Hayashi, T. Self-Assembly of One- and Two-Dimensional Hemoprotein Systems by Polymerization through Heme-Heme Pocket Interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1271-1274. 査読有
 6. Yamaguchi, H.; Harada, A. Functionalized Antibodies as Biosensing Materials and Catalysts, *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 1184-1189. 査読有
 7. Kitagishi, H.; Oohora, K.; Yamaguchi, H.; Sato, H.; Matsuo, T.; Harada, A.; Hayashi, T. Supramolecular Hemoprotein Linear Assembly by Successive Interprotein Heme-Heme Pocket Interactions, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10326-10327. 査読有

[学会発表] (計 47 件)

1. 山口浩靖, 原田明, ポルフィリン-抗体錯体を用いたエネルギー変換・触媒システム(依頼講演), 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 29 日, 近畿大学 (大阪)
2. 祇園珠木, 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体による遷移金属錯体の配位子の立体特異的認識, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 近畿大学 (大阪)
3. 夢田まや子, 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体を用いたピレン誘導体の光物性制御, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 近畿大学 (大阪)
4. 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, モノクローナル抗体を用いたピナフチル誘導体の新規光学分割法の構築, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 近畿大学 (大阪)
5. Odaka, T.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Monoclonal Antibodies with Specific Binding Affinity for Binaphthyl Enantiomers, 239th ACS National Meeting, 2010 年 3 月 24 日, San Francisco (USA)
6. Odaka, T.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Monoclonal Antibodies with Specific Binding Affinity for Binaphthyl Enantiomers, Osaka University Macromolecular Symposium '09, 2009 年 12 月 13 日, 大阪大学 (大阪)
7. Gionn, T.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Preparation of Monoclonal Antibodies for Ruthenium (II) Tris-Bipyridine Complex and Their Enantioselective Binding Properties, Osaka University Macromolecular Symposium '09, 2009 年 12 月 13 日, 大阪大学 (大阪)
8. Yamaguchi, H.; Harada, A. Construction of Specific Reaction Control Systems Using Antigen Binding Sites of Antibodies, Osaka University Macromolecular Symposium '09, 2009 年 12 月 13 日, 大阪大学 (大阪)
9. 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, 京都高分子研究所 KIPS 若手高分子シンポジウム, 2009 年 12 月 11 日, 京都大学 (京都)
10. Yamaguchi, H.; Harada, A. Functionalized Catalysts with Monoclonal Antibodies (招待講演), IUPAC 5th International Symposium on Novel Materials and Synthesis (NMS-V), 2009 年 10 月 20 日, Shanghai (China)
11. 夢田まや子, 山口浩靖, 原田明, フェナントレン誘導体に対するモノクローナル抗体の結合特性及び光化学的挙動, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 17 日, 熊本大学工学部 (熊本)
12. 山口浩靖, 原田明, 機能性抗体超分子の合成, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 16 日, 熊本大学工学部 (熊本)
13. 祇園珠木, 山口浩靖, 原田明, ルテニウムトリスビピリジン錯体とモノクローナル抗体の錯体の光化学的特性, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 16 日, 熊本大学工学部 (熊本)
14. 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, ピナフチル光学異性体に特異的に結合するモノクローナル抗体の作製, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 16 日, 熊本大学工学部 (熊本)
15. 山口浩靖, 陰地威史, 大原英剛, 池田憲昭, 原田明, 抗体-ポルフィリン錯体を光増感剤とする光誘起水素発生システム, 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム, 2009 年 7 月 30 日, 東京大学 (東京)
16. Yamaguchi, H.; Hirano, T.; Kiminami, H.; Harada, A. Asymmetric Hydrogenation with Antibody-Achiral Rhodium Complex, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009 年 7 月 27 日, 名古屋国際会議場 (愛知)
17. 尾高友紀, 山口浩靖, 原田明, 光学活性ピナフチル誘導体に対するモノクローナル抗体の作製, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 29 日, 日本大学 (千葉)
18. Yamaguchi, H.; Onji, T.; Ohara, H.; Ikeda, N.; Harada, A. Hydrogen Evolution System Using Artificial Porphyrin-Antibody Complexes, The 237th ACS National Meeting, 2009 年 3 月 24 日, Salt Lake City (USA)

19. 山口浩靖, 平野瞳子, 木南英明, 原田明, 抗体-遷移金属錯体を用いた不斉水素化触媒, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 26 日, 大阪市立大学 (大阪)
 20. 山口浩靖, 陰地威史, 大原英剛, 池田憲昭, 原田明, 抗体-ポルフィリン錯体を光増感剤とする光誘起水素発生システム, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 26 日, 大阪市立大学 (大阪)
 21. Yamaguchi, H.; Onji, T.; Ikeda, N.; Harada, A. A Hydrogen Evolution System Using Artificial Porphyrin-Antibody Complexes, LXII Yamada Conference 2008, 2008 年 9 月 3 日, 淡路島 (兵庫)
 22. Yamaguchi, H.; Hirano, T.; Kiminami, H.; Harada, A. Asymmetric Hydrogenation with Antibody-Achiral Rhodium Complex, LXII Yamada Conference 2008, 2008 年 9 月 3 日, 淡路島 (兵庫)
 23. 祇園珠木, 夢田まや子, 山口浩靖, 原田明, ルテニウム(II) トリスビピリジン錯体に対するモノクローナル抗体の作製, 第 54 回高分子研究発表会, 2008 年 7 月 18 日, 神戸 (兵庫)
 24. Yamaguchi, H.; Harada, A. Construction of Biosensing Materials and Catalysts Using Monoclonal Antibodies (招待講演), The 3rd International Symposium on Polymer Chemistry (PC'2008), 2008 年 6 月 17 日, Hefei (China)
 25. 陰地威史, 山口浩靖, 池田憲昭, 原田明, ポルフィリン-高分子複合体形成によるポルフィリンからビオロゲンへの電子移動の制御, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 28 日, 立教大学 (東京)
 26. 山口浩靖, 原田明, 抗体超分子を用いたセンシングシステム, 第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 19 日, 名古屋工業大学 (愛知)
 27. Harada, A.; Hirano, T.; Kiminami, H.; Yamaguchi, H. Asymmetric Hydrogenation with Antibody-Achiral Rhodium Complex, 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes, 2007 年 8 月 29 日, 福岡国際会議場 (福岡)
 28. Yamaguchi, H.; Onji, T.; Ikeda, N.; Harada, A. Construction of a Hydrogen Evolution System by Using Artificial Porphyrin-Antibody Complexes, 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes, 2007 年 8 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡)
 29. Yamaguchi, H.; Hirano, T.; Kiminami, H.; Harada, A. Construction of Functionalized Catalysts Using Monoclonal Antibodies with Nonchiral Rhodium Complexes, 234th ACS National Meeting, 2007 年 8 月 21 日, Boston, MA (USA)
 30. 山口浩靖, 平野瞳子, 木南英明, 原田明, 遷移金属錯体を抗原結合部位に導入したモノクローナル抗体による触媒機能制御, 第 17 回バイオ・高分子シンポジウム, 2007 年 7 月 30 日, 上智大学 (東京)
 31. 陰地威史, 山口浩靖, 池田憲昭, 原田明, ポルフィリン-抗体錯体を光増感剤とする水素発生システム, 第 56 回高分子学会年次大会, 2007 年 5 月 30 日, 京都国際会議場 (京都)
- [図書] (計 2 件)
1. Yamaguchi, H.; Ogoshi, T.; Harada, A. Sensor Development Using Existing Scaffolds, *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*, Wiley-VCH, **2010**, in press.
 2. 山口浩靖, 原田明, 抗体エンジニアリング, *超分子サイエンス&テクノロジー-基礎からイノベーションまで*, NTS, **2009**, 990-999.
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・講師
研究者番号: 00314352
 - (2) 研究分担者
無し
 - (3) 連携研究者
無し