

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550155

研究課題名(和文) 二重免疫法によるテーラーメイド人工酵素(抗体酵素)の新機能創出  
 研究課題名(英文) Development of tailor-made catalyst (catalytic antibody) by heterologous immunization

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：

本研究では、「二重免疫法」と名付けた新たな免疫手法を用いて抗体酵素の新しい機能を創出するとともに、高活性化を検討した。特に触媒反応のための抗原結合部位における分子認識を最適化するための方法を開発した。トリフルオロアセチル基を有するリン酸遷移状態アナログとアセチル基を有するリン酸遷移状態アナログを順次免疫する二重免疫法によりそれぞれのハプテンを単独免疫する方法により得られた抗体酵素より触媒活性の高い抗体酵素を獲得することに成功した。抗体酵素の各種反応速度パラメーター、アミノ酸配列を決定し、抗体酵素の触媒機構について考察した。

研究成果の概要(英文)：

In this study we have studied the improvement of the catalytic antibodies by newly devised heterologous immunization. We have developed a method to improve the molecular recognition of the catalytic antibody in antigen-combining site. In heterologous immunization, in which acetyl-transition-state analog was injected into mice after injection of trifluoroacetyl-transition-state analog, catalytic antibodies with higher hydrolytic activities were obtained. The kinetic parameters and amino acid sequences were determined to discuss the catalytic mechanism of the catalytic antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：酵素、モノクローナル抗体、抗体酵素、免疫学、タンパク質、生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

これまで酵素機能を具現化する抗体酵素の研究からは、「どのようにして酵素機能が発揮されているか？」あるいは「酵素がどのように進化してきたのか？」などの疑問について新しい知見が得られている。しかしながら、

抗体酵素の触媒活性は、天然酵素に比べてかなり低いのが現状であり、未だ実用に供されていない。その理由の一つに、抗体酵素は遷移状態アナログの免疫によってのみ作製されるため、その触媒機構は、「遷移状態の安定化」のみを利用しており、触媒活性が低く、また、

多くの場合、エステル結合の加水分解反応のみに限定されている。さらに、従来の方法では、単一の遷移状態アナログを免疫することにより、抗体酵素を作製しているため、天然酵素で行われているような複数の触媒因子（遷移状態安定化、一般酸—塩基、金属触媒など）の組み合わせで触媒される反応を、単一の化合物で模倣することは困難である。この問題を打破する方法論の開発が強く求められている。そこで、我々は平成 17 年度～19 年度基盤研究(C)において、「遷移状態の安定化」に加えて「一般酸—塩基」触媒を「反応場」として利用することを検討した。そのために、構造的に類似な電荷の異なる 2 種類のハプテンを同一マウスに順次免疫する「二重免疫法」という、独創的な手法を検討し、実際に、活性の向上した抗体を獲得することに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究では、「二重免疫法」による抗体酵素の作製技術としての確立を目指して、新たに 2 種類のリン酸型遷移状態アナログを組み合わせることにより、抗体酵素の活性部位における分子認識の最適化を検討する。本研究を遂行することにより、「二重免疫法」を抗体酵素のあらたな作製技術として確立すると同時に、二重免疫法の適用範囲および二重免疫法の免疫学的な作用機序について明らかにすることができるものと期待される。また、これらの研究は、化学的には酵素反応の機能発現原理の解明に寄与し、また工学的には実用的なテラーメイド人工酵素の開発に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) 二重免疫法 (Heterologous Immunization) によるモノクローナル抗体の調製

まず、文献の方法に従い、トリフルオロアセチル基を有するハプテン **1** およびアセチル基を有するハプテン **2** を合成した (図 1)。次に、ハプテン **1** およびハプテン **2** を活性エステル化によりキャリアタンパク質 BSA および KLH と縮合させた。ハプテン **1**-KLH をマウスに 2 回免疫し、血中抗体価が十分に上昇したことを ELISA 法により確認した後、ハプテン **2**-KLH を最終免疫した。その後脾臓を摘出し、電気細胞融合法によりミエローマ細胞と細胞融合した。10 日後、培養上清を ELSA 法により調べ **1**-BSA および **2**-BSA の両方に結合活性を示した抗体産生ハイブリドーマをクローニングによりモノクローンとした。

### (2) 単独免疫法 (Homologous Immunization) によるモノクローナル抗体の調製

対照実験としてハプテン **1**-KLH のみをマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製した。ハプテン **1**-KLH をマウスに 2 回免疫し、

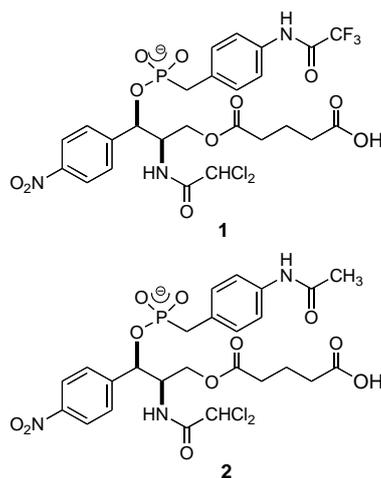


図 1. ハプテン **1** および **2** の構造

血中抗体価が十分に上昇したことを ELISA 法により確認した後、ハプテン **1**-KLH を最終免疫した。その後脾臓を摘出し、電気細胞融合法によりミエローマ細胞と細胞融合した。10 日後、培養上清を ELSA 法により調べ **1**-BSA および **2**-BSA に結合活性を示した抗体産生ハイブリドーマをクローニングによりモノクローンとした。

### (3) 触媒活性の測定

二重免疫法および単独免疫法で得られた全てのモノクローナル抗体について基質 **3** を用いて触媒活性を測定した。抗体濃度 (抗原結合部位) 5  $\mu\text{M}$ 、基質 **3** 濃度 200  $\mu\text{M}$  で 50 mM Tris HCl pH 8.0 中で加水分解反応を行い、HPLC により加水分解生成物 **4** の生成を追跡し、反応速度を決定した。

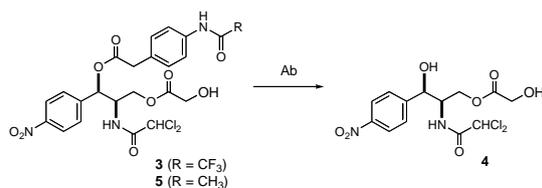


図 2. クロラムフェニコール誘導体の加水分解反応

### (4) 反応速度パラメーターの決定

二重免疫法および単独免疫法で得られた抗体酵素のうち最も高い触媒活性を示したそれぞれ 2 個の抗体酵素について濃度を変えた基質 **3** および **5** (図 2) を用いて反応速度パラメーターを決定した。

### (5) 抗体酵素のアミノ酸配列の決定

二重免疫法および単独免疫法で高い触媒活性を示したそれぞれ 2 個の抗体酵素について、ハイブリドーマから mRNA を抽出し、cDNA へ逆転写後、マウス抗体遺伝子クローニング用プライマーを用いて増幅させた。その後、

抗体発現用ベクターpARAに組み込みクローニングした。得られたベクターを大腸菌へ導入し、ELISA法によって抗体の産生を確認した後、DNAシーケンサーにより抗体遺伝子の配列を決定した。その結果より、抗体のアミノ酸配列を推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 二重免疫法によるモノクローナル抗体の作製

ハプテン **1-KLH** を5匹の Balb/c マウスに2回免疫し、ELISA法により血清の **1-BSA** に対する結合を調べたところ、いずれのマウスも51200倍以上の抗体価を示し、十分な上昇が確認された。そこで、これらのマウスの1匹にさらに **2-KLH** を最終免疫し、3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエロマ細胞との細胞融合を電気細胞融合装置を用いて行った。10日後に培養上清について **1-BSA** および **2-BSA** を用いてELISAを行い、これら両方に結合するクローンを選択し、クローニングした。その結果、50個のIgG産生ハイブリドーマを得た。それぞれのハイブリドーマを大量培養し、抗体は anti-mouse IgG+M アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

##### (2) 単独免疫法によるモノクローナル抗体の作製

上記でハプテン **1-KLH** を2回免疫後、血清の抗体価について十分な上昇が確認されたマウス1匹にさらに **1-KLH** を最終免疫した。(1)と同様の方法により44個のIgG産生ハイブリドーマを得た。それぞれのハイブリドーマを大量培養し、抗体は anti-mouse IgG+M アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

##### (3) 触媒活性の測定

単独免疫法で得られた44個のモノクローナル抗体および二重免疫法で得られた50個のモノクローナル抗体全てについてエステル基質 **3** の加水分解反応速度を測定した。その結果、単独免疫法では **4H4** および **8F4** が、また、二重免疫法では **5A6** および **3C7** が高い触媒活性を示した。

##### (4) 反応速度パラメーターの決定

二重免疫法で得られた抗体 **5A6** および **3C7** および対照実験として単独免疫法で得られた抗体 **4H4** および **8F4** についてまず、トリフルオロアセチル基が置換したエステル基質 **3** を用いて反応を行った。いずれの抗体も Michaelis-Menten 反応速度式に従って反応を加速し、求められた反応速度パラメーターは表1に示すとおりとなった。また、二重免疫法で得られた抗体 **5A6** および **3C7** は単独免疫法で得られた抗体 **4H4** および **8F4** よりも10

倍以上高い触媒活性を示した。

表1. 基質 **3** に対する反応速度パラメーター

Antibodies	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	$k_{cat}/k_{uncat}$
<b>4H4</b>	0.0219	5.6	3910	159
<b>8F4</b>	0.0156	2.3	6782	113
<b>5A6</b>	0.611	379	1612	4400
<b>3C7</b>	0.303	245	1237	2200

これらの抗体酵素はアセチル基を有するエステル **5** の加水分解もトリフルオロアセチル基を有するエステル **3** と同程度の触媒活性を示すことが判明した(表2)。

表2. 基質 **5** に対する反応速度パラメーター

Antibodies	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	$k_{cat}/k_{uncat}$
<b>4H4</b>	0.0153	3.4	4500	128
<b>8F4</b>	0.00853	3.5	2437	71
<b>5A6</b>	0.330	290	1138	2750
<b>3C7</b>	0.210	304	691	1750

##### (5) 遷移状態解析

二重免疫法で得られた抗体 **5A6** および **3C7** および単独免疫法で得られた抗体 **4H4** および **8F4** について、これら抗体酵素の触媒機構に関する情報を得るため、遷移状態解析を行った。

まず、これら抗体酵素のエステル **3** および **5** の加水分解反応における遷移状態アナログ **1** および **2** との結合活性(阻害定数  $K_i$ )を決定した。次に、それぞれの抗体酵素の反応加速( $k_{cat}/k_{uncat}$ )を基質の結合( $K_m$ )と遷移状態アナログの結合( $K_i$ )との比に対してプロットすると図3に示すようにほぼ傾き1の直線にのることが判明した。このことは、 $K_m/K_i = k_{cat}/k_{uncat}$  の関係が成り立つことを示しており、これらの抗体酵素はいずれも遷移状態の安定化を触媒機構として加水分解反応を加速していることが強く示唆される。

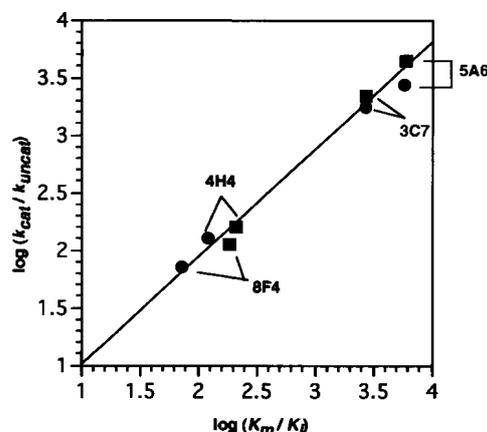


図3. 抗体酵素の遷移状態解析

これらの反応速度パラメーターから求めた

エネルギープロファイルは図4に示すとおりとなった。

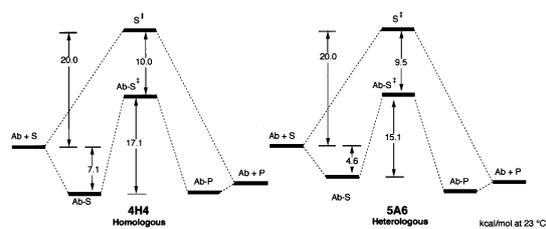


図4. 抗体酵素による触媒反応のエネルギープロファイル

単独免疫法で得られた抗体酵素4H4と二重免疫法で得られた抗体酵素5A6はいずれも遷移状態の安定化は同程度(約10 kcal/mol)であるのに対し、基質に対しては、4H4と比べて5A6の方が弱い結合であることが判明した。その結果、5A6の方が活性化自由エネルギーが小さくなり、高い触媒活性を示したものと考えられる。

#### (6) 抗体酵素のアミノ酸配列

二重免疫法で得られた抗体酵素5A6と3C7はそのアミノ酸配列が類似していた。同様に、単独免疫法で得られた抗体酵素4H4と8F4のアミノ酸配列も類似していた。しかしながら、二重免疫法で得られた抗体酵素のアミノ酸配列と単独免疫法で得られた抗体酵素のアミノ酸配列はかなり異なることが判明した。今後、触媒活性と立体構造との関係を明らかにする。

#### 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15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 1C9, *J. Mol. Biol.*, 283, 12259-12266 (2008), 査読有.
- [学会発表] (計50件)
- ① 巴谷 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 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.

- ③ 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).
- ④ T. Tsumuraya, F. Ishikawa, I. Fujii, Holoabzyme: A Single Antibody Catalyzes Multiple Chemical Transformations Upon Replacement of Artificial Cofactors, 3<sup>rd</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009年11月10日, Jeju, Korea.
- ⑤ 円谷 健, 抗体酵素の新展開, 第61回日本生物工学会大会, 2009年9月25日, 名古屋大学(愛知県).
- ⑥ T. Tsumuraya, 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ 円谷 健, 抗体を用いた高感度微量検出系の開発, 日本化学会第89春季年会, 2009年3月10日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県).
- ⑨ T. Tsumuraya, M. Hirama, I. Fujii, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Ciguatoxins, 12<sup>th</sup> Korean Peptide-Protein Society Symposium, 2008年11月21日, Seoul, Korea.
- ⑩ T. Tsumuraya, Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins, Ciguatera and Related Biotoxins Workshop, 2008年10月28日, Noumea, New Caledonia.

[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

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

### (2) 研究分担者

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