

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550196

研究課題名(和文) 金属を抗原結合部位にもつテーラーメイド人工酵素(抗体酵素)の創製

研究課題名(英文) Studies on the introduction of transition-metal compounds into the antigen-combining site of tailor-made artificial enzyme (catalytic antibody)

研究代表者

円谷 健 (Tsumuraya, Takeshi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00372855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗原結合部位に金属錯体をコファクターとして導入することにより、遷移金属による触媒機能を抗体タンパク質に導入する手法を開発した。遷移金属錯体は多様な反応性を有しているため、これらを抗原結合部位に導入できれば、抗体酵素の応用範囲は大きく広がる。特に、(1)遷移金属錯体を含む遷移状態アナログを免疫する方法、および(2)ホロ酵素型抗体酵素を用いて抗原結合部位に遷移金属含有人工コファクターとして導入する二つの方法について検討した。

研究成果の概要(英文)：In this study we have developed methods for the introduction of transition metal compounds as cofactors into the antigen-combining site to function as metal enzymes. Because transition metal catalysis catalyzes a variety of chemical transformations, the introduction of a transition metal into the antigen-combining site widens the versatility of antibody catalysts. We have studied two methods to introduce the transition metal to the antigen-combining site, (1) immunization of the transition-state analog which contains transition metal compounds, and (2) introduction of transition metal containing artificial cofactors into the antigen-combining site by using the technique of holoenzyme.

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 分子認識 生体分子 人工酵素

1. 研究開始当初の背景

これまでの酵素機能を人工的に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のか？」あるいは「酵素がどのようにして進化してきたのか？」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。そこで、この問題を打破する方法論を開発するために、平成17年～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、構造的に類似した電荷の異なる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。さらに平成20～22年度基盤研究Cにおいて、2種類のリン酸型遷移状態アナログを免疫する「二重免疫法」により遷移状態への分子認識が向上し、触媒活性が向上した抗体酵素を獲得することに成功した。

2. 研究の目的

本研究では、抗体酵素の触媒活性を向上させるための新たな戦略として抗原結合部位に金属コファクター結合部位を導入することとした。本研究を遂行することにより、金属錯体コファクター結合部位を抗体酵素の抗原結合部位に構築する技術として確立すると同時に、抗体酵素の適用範囲を拡大することができ、また、抗体酵素の新たな機能を創出することができるものと期待される。これらの研究は、化学的には酵素反応の機能発現の解明に寄与し（抗体の場合、膨大な遺伝子情報や立体構造が比較的容易に利用できるため、通常の酵素と比べてその解析が容易となる）、また工業的には、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)ハプテンの合成とモノクローナル抗体の調製

まず、文献既知の化合物1を原料としてハプテン2を合成した(図1)。次にハプテン2を活性エステル化法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2-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脾臓細胞とミエローマ細胞とを細胞融合した。10日後、培養上清をELISA法により調べ2-BSAに結合活性を示したハイブリドーマを

クローニングによりモノクローンとした。それぞれのハイブリドーマを大量培養した後、培養上清をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、精製抗体を得た。

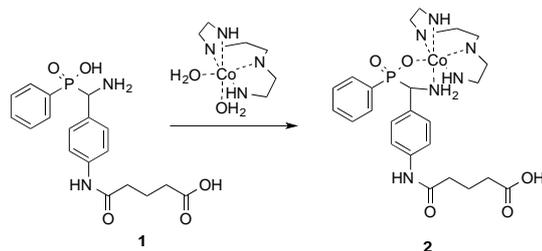


図1. 金属含有ハプテンの合成

(2)触媒活性の測定

得られた全てのモノクローナル抗体についてエステル基質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 μM, 基質3濃度200 μMでCo錯体の存在下, 50 mM TrisHCl pH 8.0中で加水分解反応を行ない(図2), 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。

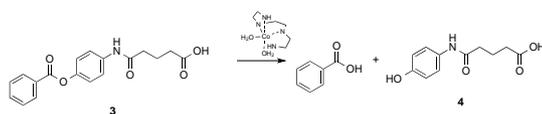


図2 エステルの加水分解反応

(3)ホロ酵素型抗体酵素の分子設計

ホロ酵素型抗体酵素の新たな金属錯体含有コファクターとしてp-アセトアミドフェニル基を有する金属錯体を設計し、合成した。特に、金属錯体は多様な反応性を有しているため、金属錯体含有コファクターを抗原結合部位に導入できれば、抗体酵素の適用範囲は大きく広がる。また、金属錯体含有コファクターとしては、水中で安定な金属錯体であることが必須であるため、既に水中で過酸化酸素の共存下で酸化反応触媒として実績のあ

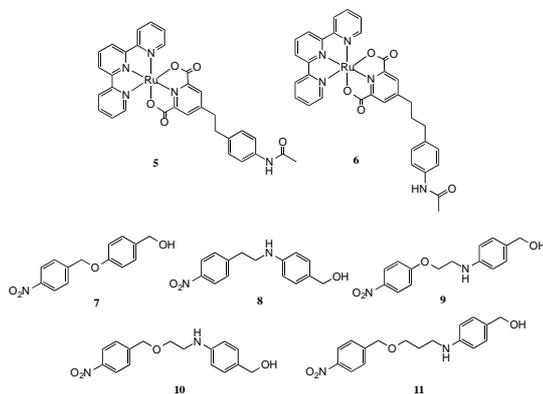


図3 金属錯体含有人工コファクター及び基質の構造

る Ru 錯体 5 および 6 を設計した (図 3). また基質として p-ニトロフェニル基とベンジルアルコールを異なる長さのメチレン鎖で結合させた一連の化合物 7, 8, 9, 10, 11 を設計した.

(4)ホロ酵素型抗体酵素の酸化触媒反応

反応に用いたホロ酵素型抗体酵素としては, 様々な反応における詳細な触媒反応のメカニズムが検討されている 27C1 を用いることとした. 27C1 をマウス腹水により大量調製し, protein G アフィニティークロマトグラフィーにより精製した. 27C1(10 μ M)を 50 mM TrisHCl pH 8.0 中で, 2 種類の金属含有コファクター5 あるいは 6 の存在下(2.5 mM), ベンジルアルコール誘導体 7~11(2~5 mM)の過酸化水素(50 mM)による酸化反応を検討した. 生成するベンズアルデヒド誘導体の精製を HPLC で追跡して, 反応速度を測定した.

4. 研究成果

(1)モノクローナル抗体の作製

ハプテン 2-KLH を 5 匹の Balb/c マウスに 2 回免疫した後, ELISA 法により血清の 2-BSA に対する結合活性を調べたところ, いずれのマウスも 51200 倍以上の抗体価を示し, 十分な抗体価の上昇が確認された. そこで, これらのマウスの中から最も高い抗体価を示したマウスについて再度 2-KLH を免疫し, 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. 約 10 日後に培養上清について 2-BSA を用いて ELISA を行ない, これ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, 20 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 ファフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した. 2 個のモノクローナル抗体をのぞいた 18 個について, 反応アッセイに十分な精製抗体が得られた.

(2)触媒活性の測定

得られた 18 個のモノクローナル抗体全てについてそれぞれエステル基質 3 の加水分解反応速度を測定した. その結果, いずれの抗体についても, 抗体非存在下での反応に比べて顕著な触媒活性を示す抗体はなかった.

(3)金属含有人工コファクターおよび基質化合物の合成

金属含有人工コファクターとして Ru 錯体と p-アセトアミドフェニル基とをメチレン鎖で結合させた化合物 5 および 6 を合成した. また, 基質として p-ニトロフェニル基とベンジルアルコールを同様に異なる長さのメチレン鎖で結合させた一連の化合物 7, 8, 9, 10, 11 を合成した.

(4)ホロ酵素型抗体酵素 27C1 による酸化触媒

反応の触媒活性の測定

27C1(10 μ M)を 50 mM TrisHCl pH 8.0 中で, 2 種類の金属含有コファクター5 あるいは 6 の存在下, ベンジルアルコール誘導体 7~11 の過酸化水素による酸化反応を検討した. 生成するベンズアルデヒド誘導体の精製を HPLC で追跡して, 反応速度を測定した. その結果, 金属含有コファクター6 を用いた場合に, 基質 8 の酸化反応で抗体非存在下の反応に比べて 5 倍以上の反応加速が観測された (図 4). 現在, 反応速度論の解析等詳細について検討中である.

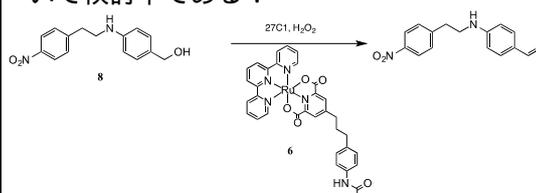


図 4 ホロ酵素型抗体酵素 27C1 による酸化触媒反応

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 7 件)

Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, and Masahiro Hirama, Preparation of Anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies Using Synthetic Haptens: Sandwich ELISA Detection of Ciguatoxins, J. AOAC Int. 2014, 97, 373-379, 査読有, DOI: 10.5740/jaoacint.SGETsumuraya. Fumihiro Ishikawa, Kouki Uno, Masao Nishikawa, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Antibody-catalyzed decarboxylation and aldol reactions using a primary amine molecules as a functionalized small nonprotein components, Bioorg. Med. Chem. 2013, 21, 7011-7017, 査読有, DOI: 10.1016/j.bmc.2013.09.015. Epub 2013 Sep 19.

Takeshi Tsumuraya and Ikuo Fujii, Directed Evolution of Hydrolytic Antibodies in Phage-displayed Combinatorial Libraries, Chemistry Letters 2013, 43, 272-280, 査読有, DOI: 10.1246/cl131220.

Takeshi Tsumuraya, Katsutoshi Takeuchi, Shuji Yamashita, Ikuo Fujii, and Masahiro Hirama, Development of monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA, Toxicon 2012, 60, 348-357, 査読有, DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.04.347.

Takaaki Kojima, Satoshi Karasawa, Atsushi Miyawaki, Takeshi Tsumuraya, and Ikuo Fujii, Novel screening system for protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation assay in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.* 2011, 111, 397-401, 査読有, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.013.
Mingzhe Liu, Muye Xu, Xian Jun Loh, Hiroshi Abe, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Tae Il Son, and Yoshiro Ito, PEGylated antibody in organic media, *J. Biosci. Bioeng.* 2011, 111, 564-568, 査読有, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.01.001.
織田昌幸, 巴谷健, 藤井郁雄, 酵素反応における基質の基底状態不安定化の熱力学的特性, 2011, 89, 388-390, 査読有, https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8907/8907_tokushu_6.pdf.

[学会発表](計 23 件)

巴谷健, 武綾香, 多田俊治, 山口亜佐子, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素はどのようにして反応を触媒するのか?, 第 16 回生命化学研究会, 2014 年 1 月 9 日, KKR ホテル熱海.

巴谷健, 藤井郁雄, 抗体を使ってシガテラ食中毒を予防する, 大阪府立大学・大阪市立大学ニューテクフェア 2013, 2013 年 11 月 27 日, 大阪産業創造館.

巴谷健, 武綾香, 多田俊治, 山口亜佐子, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素 27C1 の構造解析と触媒機構, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月 29 日, 名古屋大学.

Takeshi Tsumuraya, Chun Wu, Satoshi Inouye, and Ikuo Fujii, CATALYTIC ANTIBODIES WITH LUCIFERASE ACTIVITY, *Enzyme Engineering XXII*, 2013 年 9 月 26 日, Toyama.

巴谷健, 武綾香, 多田俊治, 山口亜佐子, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素 27C1 の構造解析と反応機構, 第 13 回日本蛋白質科学会, 2013 年 6 月 14 日, とりぎん文化会館.

Takeshi Tsumuraya, Takeshi Sato, Masahiro Hirama, and Ikuo Fujii, PRODUCTION OF ANTI-CIGUATOXIN MONOCLONAL ANTIBODIES USING SYNTHETIC HAPTENS: SANDWICH ELISA DETECTION OF CIGUATOXINS, *Marine and Freshwater Toxins Analysis, 4th Joint Symposium & Task Force meeting*, 2013 年 5 月 5 日, Baiona, Spain.

巴谷健, 武綾香, 多田俊治, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素 27C1 の立体構造解析, バイオインターフェース先端マテリ

アル第 3 回シンポジウム, 2013 年 2 月 8 日, 大阪市立大学.

西川昌央, 石川文洋, 巴谷健, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素の脱炭酸反応, バイオインターフェース先端マテリアル第 3 回シンポジウム, 2013 年 2 月 8 日, 大阪市立大学.

Takeshi Tsumuraya, Fumihiro Ishikawa, and Ikuo Fujii, Holozyme and Site-directed Chemical Mutation, *The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012)*, 2012 年 11 月 28 日, 東京工業大学蔵前会館.

西川昌央, 石川文洋, 巴谷健, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素による脱炭酸反応, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 2012 年 9 月 7 日, 北海道大学.

Takeshi Tsumuraya, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich ELISA Detection of Pacific Ciguatoxins, *2nd Asian Chemical Biology Conference*, 2012 年 7 月 4 日, Southern Beach Hotel & Resort OKINAWA.

Takeshi Tsumuraya, Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich ELISA Detection of Pacific Ciguatoxins, *Marine and Freshwater Toxins Analysis: Third Joint Symposium and AOAC Task Force meeting*, 2012 年 6 月 18 日, University of Puget Sound, Washington, USA.

Takeshi Tsumuraya, Fumihiro Ishikawa, and Ikuo Fujii, Holoenzyme: a single antibody catalyzes multiple chemical transformations upon replacement of artificial cofactors, *The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium in Enzyme Engineering*, 2012 年 5 月 30 日, エクセルホテル東急金沢.

巴谷健, テーラーメイド人工酵素(抗体酵素)の新展開, 酵素工学研究会第 47 回講演会, 2012 年 4 月 27 日, 京都テルサ.

巴谷健, 山下修治, 平間正博, 藤井郁雄, モノクローナル抗体を用いた海洋毒シガトキシンの微量検出法の開発, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日, 慶応大学日吉キャンパス.

藤原大佑, 叶正茂, 巴谷健, 藤井郁雄, オーロラキナーゼ A 特異的ペプチド阻害剤を創出する, 第 14 回生命化学研究会, 2011 年 12 月 2 日, ラフォーレ南紀白浜.

巴谷健, 石川文洋, 藤井郁雄, ホロ酵素型抗体酵素は様々な反応を触媒する, 第 14 回生命化学研究会, 2011 年 12 月 2 日, ラフォーレ南紀白浜.

巴谷健, 平間正博, 藤井郁雄, モノクロ

ーナル抗体で海洋毒を検出する, 第 14 回生命化学研究会, 2011 年 12 月 2 日, ラフォーレ南紀白浜.

巴谷健, 抗シガトキシン(Ciguatoxin)抗体の作製と太平洋型シガトキシンの微量検出法の開発, 平成 23 年度自然毒部会研究発表会, 2011 年 11 月 22 日, 京都府総合教育センター.

巴谷健, 藤井郁雄, 山下修治, 竹内勝俊, 石原祐樹, 平間正博, 有機合成を基盤とする抗シガトキシン抗体の作製と太平洋型シガトキシンの微量検出法の開発, 第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2011 年 11 月 8 日, 徳島あわぎんホール.

⑳ 巴谷健, 山下修治, 竹内勝俊, 石原祐樹, 平間正博, 藤井郁雄, 抗シガトキシン抗体を利用した太平洋型シガトキシンの微量検出法の開発, 第 53 回天然有機化合物討論会, 2011 年 9 月 27 日, 大阪国際交流センター.

㉑ Takeshi Tsumuraya, Fumihiro Ishikawa, and Ikuo Fujii, Holoabzyme: a single antibody catalyzes multiple chemical transformations upon replacement of artificial cofactors, Enzyme Engineering XXI, 2011 年 9 月 18 日, Vail, Colorado, USA.

㉒ 巴谷健, 山下修治, 竹内勝俊, 石原祐樹, 平間正博, 藤井郁雄, シガテラ原因毒素シガトキシンCTX1Bを認識する抗体の作製と微量検出法の開発, 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「エポカルつくば」.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪府立大学理学系研究科生命化学研究室

ホームページ

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~fujii/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巴谷 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