

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410184

研究課題名(和文) ホロ酵素型抗体酵素法によるテーラーメイド人工酵素(抗体酵素)の新機能開拓

研究課題名(英文) Tailor-made artificial enzymes (catalytic antibodies) by the development of holo-abzymes

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工コファクター分子を認識する抗原結合部位を構築し、触媒として作用する官能基を持つ人工コファクターを外部から導入することによりホロ酵素型抗体酵素を構築した。ホロ酵素型抗体酵素では、コファクター分子を入れ替えることにより、抗原結合部位の特定の部位に様々な官能基(触媒残基)を導入することが可能となり、1種類の抗体で様々な反応を触媒できた。また、ホロ酵素型抗体酵素のX線結晶解析に成功し、その立体構造を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this work we have developed holo-abzyme in which the antigen-combining site can bind the artificial cofactors which have functional groups for the catalysis. The holo-abzyme catalyzes various types of chemical transformations by simply exchanging the artificial cofactors. We also succeeded in the X-ray crystal analysis of holo-abzyme 27C1, showing the molecular basis of the catalysis by 27C1.

研究分野：生物有機化学

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

天然酵素のような高い特異性と優れた反応効率を兼ね備えた触媒分子(人工酵素)を創り上げることは、化学者の究極の目標である。今日まで、新しい人工酵素開発のために、さまざまな方法論が検討されてきている。その中でもっとも信頼できる方法の一つが、免疫システムの多様性と特異性を利用することにより、テラーメイドな触媒活性をもつ抗体タンパク質を作製する方法である。化学反応の遷移状態を模倣した安定な化合物(遷移状態アナログ)をハプテンとして免疫すると、天然酵素と同様の性質(触媒活性、基質特異性、立体選択制、位置選択制など)をもつ抗体が得られる。このような抗体を抗体酵素(catalytic antibody)と呼ぶ。抗体酵素は「新しい人工酵素を創り出す」ための有力な手法であり、既存酵素の機能改良を目的とする従来の酵素工学的手法とは全く異なる方法論である。抗体には 10^8 を超える多様性があるため、原理的には、目的とした化学反応の遷移状態アナログを設計、合成することができれば、いかなる化学反応(反応が水中で進行するかぎり)に対しても抗体酵素を作製することが可能となる。我々の研究室では、早くから本研究分野に取り組み、免疫システムが持つ抗体タンパク質の多様性を利用して、テラーメイド人工酵素である抗体酵素を開発し、その機能発現機構の詳細について明らかにしてきた(総説: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, *81*, 1039)。

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、抗体酵素は単一の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、「遷移状態優先結合」のみを利用しており、触媒活性が低い。すなわち、天然酵素は、複数の触媒因子(遷移状態優先結合、一般酸-塩基触媒、金属触媒など)を利用して化学反応を触媒するが、このような複数の遷移状態を単一の化合物で模倣するのは困難である。また、抗体酵素は多くの場合、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、平成17~19年度および平成20~22年度基盤研究Cにおいて、構造の類似した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、それぞれ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、先に述べた問題点を解決するための新たなアプローチとしてホロ酵素型

抗体酵素法を開発する。ホロ酵素型抗体酵素とは、抗体をアポ酵素として利用し、様々な(触媒として作用しうる)官能基をもつ人工合成コファクター分子に対する抗原結合部位を構築する。これまでの抗体酵素の作製法では、遷移状態アナログの免疫によって触媒残基となるようなアミノ酸残基を抗原結合部位に誘導する。これに対し、ホロ酵素型抗体酵素法では、抗原結合部位に人工コファクター分子を認識する抗原結合部位を構築し、触媒として作用しうる官能基を持つ人工コファクターを外部から導入する。このような抗体が作製できれば、コファクター分子を入れ換えることにより、抗原結合部位の特定の部位に様々な官能基(触媒基)を導入することが可能となる。これまでに申請者は、従来法とは全く異なる抗体酵素の開発を目指して、ホロ酵素型抗体酵素の分子設計を検討している(*J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 456-457)。天然のホロ酵素は、活性部位に低分子有機化合物のコファクターをもち、これを触媒基として、アミノ酸残基のみでは困難な多彩な化学反応を触媒する。抗体をアポ酵素として利用し、反応性の異なる人工合成コファクター分子を入れ換えることにより、抗体が触媒できる反応の種類や触媒機構を制御可能となる。

3. 研究の方法

ハプテン1の免疫によって、人工合成コファクター分子を結合する抗体を取得している。ハプテン1(図1)はエステル交換反応の遷移状態アナログであると同時に2つの特徴を持っている(*p*-ニトロフェニルリン酸エステル部分は、抗原結合部位に基質分子結合部位を与え、*N*-アセチルフェネチル部分は種々の人工コファクター分子結合部位を構築する)。

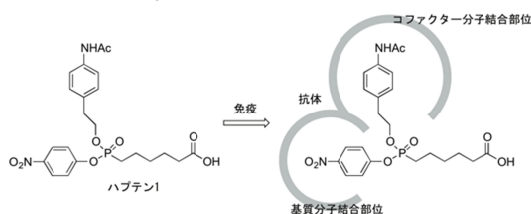


図1. ホロ酵素型抗体酵素の構築

本ハプテンにより、近接効果を主要な触媒因子とする抗体酵素の作製が期待される。免疫により誘導された50種類のハプテン結合性モノクローナル抗体について、エステル2を基質として、またアルコール3を人工コファクターとして、触媒活性をスクリーニングしたところ2種類の抗体(25E2および27C1)がアシル基転移反応を触媒した(図2)(*J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 456-457)。そこで、本研究では、他の人工コファクターを用いて、50種類のハプテン1結合性モノクローナル抗体をスクリーニングし、アルドール反応や β -脱離反応、ビニルエーテルの加水分解反応、酸

化反応などを触媒する抗体酵素の作製を行う(図2)。これにより求核触媒能, 酸・塩基触媒能, 金属触媒能をもつ人工コファクター分子を抗原結合部位に導入し, それらを入れ替えるという新しい概念を適用することにより, 人工コファクター分子により触媒できる反応の種類を制御可能な, 天然にはない機能性をもつ抗体酵素の開発につながると期待される。

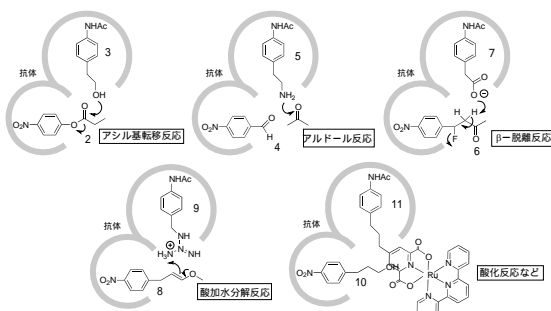


図2. ホ口酵素型抗体酵素法による抗体酵素の多機能化

(1) モノクローナル抗体の調製

既に獲得した50個のハプテン1結合性抗体産生ハイブリドーマについて, 約200 mLまで大量培養した。それぞれの抗体について, 抗マウスIgGアフィニティークロマトグラフィーを用いてFPLCにより精製した。

(2) アミン型コファクター5およびカルボン酸型コファクター7の合成

アミン型コファクター5およびカルボン酸型コファクター7をそれぞれ市販の試薬を原料として, 収率よく合成した。

(3) アルドール反応を触媒する抗体酵素の創出

50個のハプテン1結合性モノクローナル抗体についてp-ニトロベンズアルデヒド4およびアセトンを基質として, アミン型人工コファクター5を用いてスクリーニングし, アルドール反応を触媒する抗体酵素を特定した。これらの抗体酵素について, マウス腹水を用いてハイブリドーマを大量調製し, 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。その後, 得られた抗体を用いて反応速度と基質濃度との関係を調べ, Michaelis-Mentenの式より反応速度パラメーター(k_{cat} および K_m)を決定した。

(4) 酸性コファクターおよび金属錯体含有コファクターの設計, 合成および新規触媒反応の検討

新たに酸性人工コファクター9および金属作体含有コファクター10を設計, 合成した。金属作体含有コファクターとしては, 水中で安定な金属作体であることが必須であるため, 既に水中で過酸化水素の共存下で酸化反応触媒として実績のあるRu錯体10を設計した。Ru錯体10の合成に関しては, 類似のRu錯体の合成及び反応について精力的に研究している京都大学科学研究所高谷光准教授

の協力を得て行った。50個のハプテン1結合性モノクローナル抗体について酸性コファクター9を用いていくつかの酸性触媒反応を検討したが, いずれも反応は加速されなかった。また, Ru錯体コファクター10を用いてアルコール11の酸化反応を検討したところ, 反応の加速が観測された。

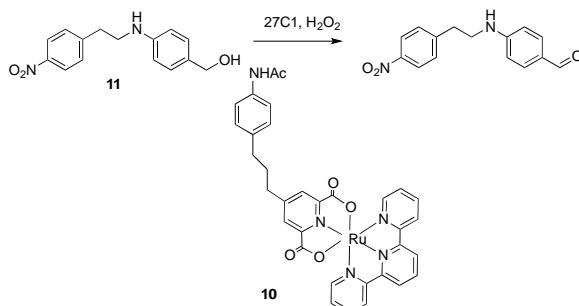


図3. ホ口酵素型抗体酵素27C1による酸化反応

(5) 抗体酵素の抗体遺伝子のクローニングおよび抗体酵素のX線結晶解析

抗体酵素25E2および27C1の抗体遺伝子を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, 抗体発現ベクターへ組み込みクローニングを行った。得られたベクターを大腸菌に形質転換し, 培養上清をELISA法によって調べ, 抗体遺伝子の発現を確認し, DNAシーケンスにより抗体のアミノ酸配列を推定した。

抗体25E2および27C1について, それぞれの抗体を大量培養した後, パパインで消化し, Fab断片を調製した。Fab断片についてイオン交換クロマトグラフィーにより同一の等電点を持つ画分を回収し, ハプテン1と混合し, 峽結晶を作成した。その結果, 27C1について良好な結晶が得られたため, Spring-8にて回折X線の測定を行った。得られた回折データを用いて27C1とハプテン1との立体構造を決定した。

4. 研究成果

(1) アルドール反応を触媒する抗体酵素の創出とその機能解析

50種類の抗体について, アミン型コファクター5を用いて, p-ニトロベンズアルデヒド4のアルドール反応の触媒反応を測定した。抗体(5 mM)の存在下, アセトン(5%), アミン型コファクター4 (20 mM), p-ニトロベンズアルデヒド4 (1.5 mM)を混合し, 25°Cで反応させた。反応はHPLCを用いて生成物の精製を追跡し, アルドール反応の反応速度を決定した。その結果, 50種類のうち抗体27C1および25C6が効率よくアルドール反応を触媒していることが判明した。

同様に, アミノ型コファクター4をもちいてβ-ケトカルボン酸の脱炭酸反応を検討したところ, アルドール反応のと同様に27C1および25C6が高い触媒活性を示すことが明らかとなった。なお, これらの抗体の触媒活

性はいずれもこれまでに作成されてきたアルドール反応および脱炭酸反応を触媒する抗体酵素と比べても同程度かそれ以上の高い触媒活性を示すことが明らかとなった。

(2) 酸性コファクター分子を用いた新規触媒反応の検討

新たに合成した酸性コファクター-9 および、 β -ヒドロキシケトンの脱水反応およびメトキシメチル基の脱保護反応などいくつかの酸性触媒反応について検討したが、いずれの抗体についてもこれらの反応について、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) 金属作体含有コファクター分子を用いた酸化反応の検討

27C1 (10 mM) を 50 mM TrisHCl pH 8.0 中で、金属含有コファクター-10 の存在下、ベンジルアルコール誘導体 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生成を HPLC で追跡して、反応速度を測定した。その結果、基質 11 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。現在、反応機構等詳細について検討している。

(4) ホ口酵素型抗体酵素 27C1 の立体構造の解明

精製した抗体 27C1 の Fab 断片を濃度が 5 mg/mL となるように調製し、sitting drop 蒸気拡散法により結晶化条件を探索した。最終的に 2% 1,4 -dioxana, PEG 3350 20~26%, 0.1 M Na Citrate pH 5.8 - 6.1 の結晶化条件で 20 °C にて良好な結晶が得られた。その結晶を用いて SPring-8 にて回折 X 線測定を行ったところ、分解能 2.57 Å までの回折データを収集することができた。本結晶は斜方晶系に属し、空間群は C2, 格子常数は $a = 158.0$, $b = 39.4$, $c = 71.7$, $\alpha = 90$, $\beta = 113$, $\gamma = 90$ 非対称単位には 1 分子が含まれることが判明した。



図 4. ホ口酵素型抗体酵素 27C1 の立体構造

得られた回折 X 線データを用いて構造解析を行った。フリー工合成を行い電子密度図を得た。この電子密度図に適合するようにプログラム Molrep (CCP4) を用いて抗体 27C1 の構造を構築し、プログラム Refmac5 (CCP4) によって構造を精密化し、構造の修正と精密化を繰り返して行い、最終的に R-factor が 24.3%, R-free-factor が 33.7% となった。抗体 27C1Fab-ハプテン複合体の構造を図 4 に示した。ハプテンの 2 個のベンゼン環は重なり合う形で抗原結合部位に入っており、その周辺には多くの芳香族アミノ酸残基が疎水的な環境を形成していた。ハプテンのリン酸基がもつ酸素原子との間に水素結合のような相互作用を持つと考えられるアミノ酸残基は存在しなかった。従って、27C1 では、近接効果が最も有効に働いているものと推定された。

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)

Daisuke Fujiwara, Kousuke Mihara, Yusuke Nakamura, Takeshi Tsumuraya, and Ikuo Fujii, Generation of Molecular-Targeting Peptides for Proteins Kinases: A Phage-displayed Library of Helix-Loop-Helix Peptides conjugated with Adenosine, Peptide Science, 169-170 (2016), 査読有, <https://www.prf.or.jp/ps.html>.

Fumihiro Ishikawa, Masato Shirahashi, Hiroshi Hayakawa, Asako Yamaguchi, Takatsugu Hirokawa, Takeshi Tsumuraya, and Ikuo Fujii, Abzyme engineering by site-directed chemical mutation, ACS Chemical Biology, 11, 2803-2811 (2016), 査

読, DOI: 10.2142/biophysico.13.0_135.

Masayuki Oda, Takeshi Tsumuraya, and Ikuo Fujii, Effects of conformational strain of substrate on binding kinetics of catalytic antibody, Biophysics and Physicobiology, 13, 135-138 (2016), 査読有, DOI: 10.2142/biophysico.13.0_135.

Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, and Masahiro Hirama, Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens. Sandwich ELISA detection of ciguatoxin, J. AOAC Int., 97, 373-379 (2014), 査読有, DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGETsumuraya>.

Takeshi Tsumuraya and Ikuo Fujii, Directed evolution of hydrolytic antibodies in phage-displayed combinatorial libraries, Chem. Lett.,

43, 272-280 (2014), 査読有 .
DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.131220>.

[学会発表](計 26 件)

大迫洸樹, 石川文洋, 巴谷健, 藤井郁雄,
ホ口酵素型抗体酵素: 人工コファクター
の入れ替えによる複数の化学反応の制御,
バイオインターフェース先端マテリアル
の創生第7回シンポジウム/第6回バイオ
メディカルフォーラム, 2017年2月10
日, 大阪市立大学阿倍野キャンパス(大
阪府大阪市).

Daisuke Fujiwara, Kousuke Mihara,
Yusuke Nakamura, Takeshi Tsumuraya,
Ikuo Fujii, Generation of molecular -
targeting peptides for protein
kinases: a phage-displayed library of
helix-loop-helix peptides conjugated
with adenosine, 第53回ペプチド討論会,
2016年10月26日~28日, 京都テルサ(京
都府京都市).

Takeshi Tsumuraya, Sandwich ELISA
detection of ciguatoxins using
anti-ciguatoxin monoclonal antibodies,
Workshop on Emerging Marine Toxins,
2016年9月6日, Baiona (Spain).

巴谷健, 有機合成化学との連携による抗
体タンパク質の機能化, 2016年ヘテロ原
子部会第1回懇話会 2016年5月16日,
大阪府立大学植物工場研究センター(大
阪府堺市).

吉村美穂, 武田祐輔, 宮本尚樹, 巴谷健,
藤井郁雄, 新規アフィニティマチュレ
ーション方(急がば回れ法)による抗体
酵素 6D9 の機能向上, 第5回バイオ・メ
ディカルフォーラム 2016年2月19日,
大阪府立大学(大阪府堺市).

城戸研仁, 島悠人, 山口亜佐子, 多田俊
治, 巴谷健, 藤井郁雄, 加水分解抗体酵
素の触媒機構に関する分子論的研究: 6D9
および 9C10 の X 線結晶構造解析, 第5回
バイオ・メディカルフォーラム, 2016年
2月19日, 大阪府立大学(大阪府堺市).

巴谷健, 吉村美穂, 宮本尚樹, 武田祐輔,
藤井郁雄, 「急がば回れ法」によって抗体
酵素の活性を向上させる, 第18回生命化
学研究会, 2016年1月8日, 石川屋旅館
(長崎県南島原市).

Takeshi Tsumuraya, Sandwich ELISA
detection of ciguatoxins using
anti-ciguatoxin monoclonal antibodies,
Pacifichem 2015, 2015年12月15日~
2015年12月20日, Honolulu, USA.

S. Yamashita, K. Takeuchi, T. Koyama,
T. Tsumuraya, M. Inoue, I. Fujii, M.
Hirama, Practical route to the left
wing of CTX1B and synthesis of
hapten-KLH conjugated: Total
synthesis of CTX1B and 54-deoxyCTX1B,

Pacifichem 2015, 2015年12月15日~
2015年12月20日, Honolulu, USA.

S. D. Soelberg, T. Tsumuraya, M. Hirama,
T. Yasumoto, I. Fujii, C. E. Furlong,
Near real time detection of
ciguatoxins using a field-portable
surface plasmon resonance sensor
system, Pacifichem 2015, 2015年12月
15日~2015年12月20日 Honolulu, USA.
Takeshi Tsumuraya, Production of
Monoclonal Antibodies for Sandwich
ELISA Detection of Ciguatoxins, The 3rd
OPU-TKU International Symposium, 2015
年11月19日, 大阪府立大学(大阪府堺
市).

Naoki Miyamoto, Miho Yoshimura,
Nobutoshi Ito, Takeshi Tsumuraya, Ikuo
Fujii, Structural and Functional
Analysis of Antibody 7B9 Catalyzing
Hydrolyses of *p*-Nitrobenzyl Esters,
The 3rd OPU-TKU International Symposium,
2015年11月19日, 大阪府立大学(大阪
府堺市).

城戸研仁, 島悠人, 山口亜佐子, 巴谷健,
多田俊治, 藤井郁雄, 加水分解抗体酵素
9C10 の結晶構造解析, 日本結晶学会平成
27年度年会, 2015年10月17日~2015
年10月18日, 大阪府立大学(大阪府堺
市).

巴谷健, 武綾香, 山口亜佐子, 多田俊治,
藤井郁雄, ホ口酵素型抗体酵素 27C1 の立
体構造解析, 日本結晶学会平成 27 年度年
会, 2015年10月17日~2015年10月18
日, 大阪府立大学(大阪府堺市).

巴谷健, 平間正博, 藤井郁雄, シガトキ
シンのサンドイッチ ELISA における検出
感度の向上, 第9回バイオ関連化学シン
ポジウム, 2015年9月10日~2015年9
月12日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本
県熊本市).

道上雅孝, 叶正茂, 越塚靖彦, 巴谷健,
藤井郁雄, VEGF 標的ペプチドの分子設計
と活性制御に向けた多面的アプローチ,
第9回バイオ関連化学シンポジウム,
2015年9月10日~2015年9月12日, 熊
本大学黒髪キャンパス(熊本県熊本市).

宮本尚樹, 吉村美穂, 巴谷健, 伊藤暢聡,
藤井郁雄, 新規アフィニティマチュレ
ーション法: 「急がば回れ法」による抗体
酵素の機能向上, 第9回バイオ関連化学
シンポジウム, 2015年9月10日~2015
年9月12日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊
本県熊本市).

吉村美穂, 武田祐輔, 宮本尚樹, 巴谷健,
藤井郁雄, 抗体酵素 6D9 の触媒活性の向
上, 第9回バイオ関連化学シンポジウム,
2015年9月10日~2015年9月12日, 熊
本大学黒髪キャンパス(熊本県熊本市).
城戸研仁, 島悠人, 山口亜佐子, 巴谷健,
多田俊治, 藤井郁雄, 加水分解抗体酵素

の触媒機構に関する分子論的研究, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015 年 9 月 10 日~2015 年 9 月 12 日, 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県熊本市).

宮本直樹, 円谷健, 伊藤暢聡, 藤井郁雄, p-ニトロベンジルエステル加水分解抗体酵素 7B9 の機能解析, 日本化学会第 95 回春季年会, 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県船橋市).

⑳ Takeshi Tsumuraya, Masahiro Hiram, Ikuo Fujii, Improvement of Sandwich ELISA Detection of Ciguatoxins, 日本化学会第 95 回春季年会, 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県船橋市).

㉑ 円谷健, 平間正博, 藤井郁雄, 海洋毒シガトキシン抗体を使って検出する: どれくらい微量検出ができるのか, 第 17 回生命化学研究会, 2015 年 1 月 8 日, 高知三翠園(高知県高知市).

㉒ Takeshi Tsumuraya, Fumihiro Ishikawa, Ayaka Take, Asako Yamaguchi, Toshiji Tada, Ikuo Fujii, Holoabzyme: a single antibody catalyzes multiple chemical transformations upon replacement of artificial cofactors, Active Enzyme Molecules, 2014 年 12 月 17 日~2014 年 12 月 19 日, 富山国際会議場(富山県富山市).

㉓ Naoki Miyamoto, Takeshi Tsumuraya, Nobutoshi Ito, Ikuo Fujii, Structural and Functional Analyses of Catalytic Antibody 7B9 for the Deprotection Reaction of p-Nitrobenzyl Ester, Active Enzyme Molecules, 2014 年 12 月 17 日~2014 年 12 月 19 日, 富山国際会議場(富山県富山市).

㉔ 宮本直樹, 円谷健, 伊藤暢聡, 藤井郁雄, p-ニトロベンジルエステル保護機を脱保護する抗体酵素 7B9 の構造解析および機能解析, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 2014 年 9 月 11 日~2014 年 9 月 13 日, 岡山大学(岡山県岡山市).

㉕ Takeshi Tsumuraya, Production of Anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies using Synthetic Haptens: Sandwich ELISA Detection of Ciguatoxins, Rapid Test Workshop "Rapid Testing or Seafood Contaminants", 2014 年 8 月 27 日, Seattle, USA.

〔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

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻 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

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