抗体触媒

荒田 洋 治* (第1部)
長野 哲 雄**・光 本 篤 史** (第2部)

Catalytic Antibody.

Yoji ARATA* (Section 1), Tetsuo NAGANO** and Atsushi MITSUMOTO** (Section 2)

Monoclonal antibodies with catalytic activity have recently been generated and shown to carry out a variety of organic reactions, which include hydrolysis, lactonization, bimolecular amido bond formation, Claisen rearrangement, Diels-Alder reaction, elimination, photochemical and redox reactions. These antibodies, which are elicited by using natural products or synthetic compounds as haptens, possess high substrate specificity. The catalytic activity of these antibodies is strongly inhibited by the haptens.

These new enzymelike catalysts were first prepared on the basis of the idea of the stabilization of transition state configurations on chemical pathways. Since the first successful attempt of the preparation of the catalytic antibody, a number of experimental data have been compiled in a short period of time and it has now become clear that the reduction of entropy in reactions, the introduction of adequate catalytic amino acid groups, and the incorporation of a variety of co-factors are also important factors in designing the catalytic antibody.

With the further progress in this field, many more interesting catalytic antibodies will be produced. It is also hoped that efforts in designing the antigen binding sites for the generation of new catalytic antibodies will be helpful in promoting a better understanding of the molecular mechanisms of antigen recognition and of a variety of chemical reactions in general.

第1部

抗体の構造化学：化学反応の場としての抗原認識部位の成り立ち

1. Pauling の洞察

タンパク質が、どのようにして、「もの」を識別するかに興味をもっていた Pauling は、1936 年、免疫化学の重鎮 Landsteiner と意見を交わしたことがきっかけとなって、酵素による基質の認識、さらに抗体による抗原の認識の特徴について、より広い観点から考えることになる¹⁾。その結果、Pauling は、抗体と酵素は、いずれも、相手(抗原と基質)に相補的な構造を用意しているが、酵素は基質そのものの構造ではなく、遷移状態にある基質

の構造を認識する点に特徴があること、即ち、基質は、活性部位においては、自由な状態ではとることのできない歪のかかった構造をとっているため、より低いエネルギーで、生成物に移行すると結論した²⁾。Pauling の考えを受けて、Jencks は、化学反応の場としての抗原結合部位の意義について言及している³⁾。ここまで述べてくると、今日、“Catalytic antibody”として発展させられている有機化学の新しい流れに、Pauling のアイデアが深く関わっていることが分かる。

2. 認識分子としての抗体の特徴

抗体は、生物(脊椎動物)が、「未知の構造」を認識するために創り出した、無限の多様性をもつタンパク質群である。生物は、外敵から自らを守るために、たとえ、過去に一度も遭遇したことのない「エイリアン」であって

* 東京大学薬学部薬品物理化学教室

** 東京大学薬学部薬品代謝化学教室

()

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo ()

も、それを認識し、排除する機構を備えていなければならない。生物が、このために創り出した抗体は、化学的にみれば、無限に多様な反応の場の集合であるといつてよい。これは、触媒活性を担うタンパク質をデザインするにあたって、この上もなく魅力的な性質である。

抗体は、抗原刺激を受けて、リンパ球から分化、増殖した形質細胞によって産生される。同一の抗原は、一般には、異なる多種類のBリンパ球を刺激し、これによって多種類の抗体(ポリクローナル抗体)が産生される。

ポリクローナル抗体のメンバーであるそれぞれの抗体は、注目する抗原に対して、結合する共通の性質をもつが、それぞれの親和性、特異性は異なっている。多種類のクローンが産生する抗体の集団であるポリクローナル抗体を用いて、酵素活性を発現しようとする試みは古くからあるが、明確な結果は得られていない。抗体が、多種類の抗原結合部位をもつタンパク質分子の混合物であるためである。

それぞれのクローンを増やして抗体を作ることができれば、抗原結合部位が均一のタンパク質(モノクローナル抗体)が得られるはずであるが、これは一般には不可能である。形質細胞が生き長らえて抗体を産生し続ける状態を実現できないからである。しかし、腫瘍化した形質細胞(ミエローマ細胞)との細胞融合によって、望みの抗体産生細胞に「永遠のいのち」を与えるモノクローナル抗体の技術がルーチン化されるにおよび、事態は一変し、Paulingのアイディアは現実のものとなった。

3. 抗体の構造化学

以下、抗体の多様性を担う抗原結合部位の成り立ちについて簡単にまとめる^{4,5,6)}。抗体分子は、約110個のアミノ酸残基からなる球状の単位(ドメイン)を基本構造とする。抗体は、ドメイン4個がつながったH鎖(heavy chain)と、ドメイン2個がつながったL鎖(light chain)が、それぞれ2本づつ集まった巨大な集合体(分子量150 kDa)である。それぞれのドメインには、図1のように名前がつけられている。

Fig. 1 抗体分子のドメイン構造

抗体は、プロテアーゼ処理によって、2つの機能単位、FabとFcに分離できる。Fabは、抗原結合能をもつ領域、Fcは、抗原(異物)の排除にかかわる活性を発現する領域である。抗体の特徴は、 V_H , V_L ドメインが集まって、抗原認識の多様性を担う点にある。 V_H , V_L は、それぞれのペプチド鎖のなかに、3カ所、その抗体の個性(多様性)の情報が塗りこめられた部分をもつ。この部分は抗原結合の相補性を決定するという意味でCDR(complementarity determining region)とよばれる。L鎖、H鎖それぞれ3個のCDR(CDR1, CDR2, CDR3)、合計6本のペプチドセグメント(タンパク質高次構造上ではループ)がより集まって抗原結合部位を形作っている。図2で斜線をつけた部分がこれに相当する。

Fig. 2 Fabのかたち。CDRを斜線で示す

抗体は、溶媒に露出したCDRが作る「でこぼこの面」を使って抗原を認識する。CDRの作る面の構造を支える足場が、 V_H , V_L の残りの部分、さらには C_H1 , C_L である。既に述べたように、抗原結合部位は反応の場として無限の可能性をもつ。ある抗体では、電荷に富み、またある抗体(例えば抗ステロイド抗体の場合)ではそれはより疎水的である。また抗原結合部位の全面を使ってもなおあまりある巨大な抗原を相手にすることがある反面、場合によっては、抗原結合部位の内側のどこかにおさまってしまうような小さな抗原を結合することもある。抗原結合部位への抗原のおさまり方も、電荷でつなぎとめられるもの、水素結合を形成するもの、疎水結合をするものなど、きわめて多様である。

さらに、ひときわ柔らかい抗原結合部位がある一方、硬くて、変形の余地のないものもある。抗体はこのような場を使って、相手の分子を硬く、あるいは軟らかく固定する。マクロにみれば抗原結合部位の入り口や深さ、柔軟さに差があり、一方、ミクロにみれば、類似の結合部位であっても、抗原分子をとり囲み、接触、相互作用する可能性のあるアミノ酸残基はきわめて多様性に富

む。従って、抗体の種類を選ぶことによって、反応の場をさまざまな形でデザイン、コントロールすることが可能となる。さらに、遺伝子の改変によってその可能性を、一層ふくらませることができるはずである。

4. 今後への期待

第2部で述べるように、抗体の抗原結合部位が、さまざまな有機化学反応の場となることがすでに示されている。抗原結合部位の構造は、あらゆる物理化学的性質を内蔵した「宝の山」である。今後、より広い可能性をもつ抗体分子のデザインへ研究をすすめるためには、抗原結合部位を、有機化学反応の場として統一的に捉え、整理すべきである。それには、

- 1) 抗原結合部位の構築原理の構造化学的理解⁴⁾
- 2) 抗原結合部位の改変のための実用的方法の確立：遺伝子組み換え、大量発現系⁷⁾
- 3) 必要とする抗体の迅速かつ確実なスクリーニング法の確立⁸⁾
- 4) 本来、水溶液において、その機能を発現する抗体タンパク質分子表面上で、可能な限り広範に有機化学反応を行うための条件設定

など基礎・応用両面で、研究を深める必要がある。

今後、有機化学の深い洞察と造詣、免疫構造化学の理解の連携によって、この分野はさらに大きく魅力的なものへと発展していくであろう。

第2部

抗体触媒の概念に基づく有機反応

前述した Pauling による「酵素の遷移状態認識」仮説に基づき、各種抗体が調製された。以下に、これら抗体を用いた有機反応を反応タイプ別に分類し、解説する

(表1)。なお初期の反応例については、Hiratake らによっても紹介されている。参照されたい^{1,2)}。

Table 1 Organic reactions based on catalytic antibody concept.

run	reaction type	hapten	substrate(s)	product(s)	comments	ref.
1	Carbonate hydrolysis				$k_{cat}=0.4\text{min}^{-1}$ $K_m=208\mu\text{M}$ $k_{cat}/k_{uncat}=770$	3
2	Carbonate hydrolysis				$k_{cat}=1.4\pm 0.2\text{min}^{-1}$ $K_m=660\pm 120\mu\text{M}$	4
3	Ester hydrolysis				$k_{cat}=(2.7\pm 0.2)\times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ $K_m=(1.90\pm 0.2)\mu\text{M}$ $k_{cat}/k_{uncat}=960$	5,6

run	reaction type	hapten	substrate(s)	product(s)	comments	ref.
4	Ester hydrolysis	9	15	13 + 16	$k_{cat} = (0.8 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ $K_m = (0.62 \pm 0.05) \mu\text{M}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 210$	5,6
5	Ester hydrolysis	17	18	19 + 20	$k_{cat} = 20 \text{sec}^{-1}$ $K_m = 1.5 \text{mM}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 6.25 \times 10^6$	7
6	Ester hydrolysis	17	21	13 + 20	$k_{cat} = 2 \text{sec}^{-1}$ $K_m = 0.15 \text{mM}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 1.2 \times 10^5$	7
7	Amide hydrolysis	22	23	24 + 25	$k_{cat} = 0.08 \text{min}^{-1}$ $K_m = 562 \mu\text{M}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 2.5 \times 10^5$	8
8	Ester hydrolysis in reverse micelles	26	27	28 + 29	$k_{cat} = 3.89 \text{min}^{-1}$ $K_m = 569 \mu\text{M}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 3 \times 10^3$	9
9	Stereo-specific ester hydrolysis	30	31a: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_2\text{-Ph}$ 31b: $R_1 = \text{CH}_2\text{-Ph}, R_2 = \text{H}$	32 + 33	$k_{cat} = (2.3 - 18.7) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ $K_m = 4.4 - 14.8 \mu\text{M}$ $k_{31b}/k_{31a} = 0.005 - 0.025$	10
10	Stereo-specific ester hydrolysis	34	35a: (S) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ 35b: (R) $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$	36a: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ 36b: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ + 25	$k_{cat} = 4.6 \text{min}^{-1}$ $K_m = 4 \text{mM}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 8 \times 10^4$	11
11	Stereospecific lactonization	37	38	39 + 28	$k_{cat} = 0.50 \text{min}^{-1}$ $K_m = 78 \mu\text{M}$ $k_{cat}/K_{uncat} = 167$	12

run	reaction type	hapten	substrate(s)	product(s)	comments	ref.
12	Stereo-specific bimolecular amide bond formation		+		$k_{cat} = 0.066 \pm 0.026 \text{ min}^{-1}$ $K_m(39) = 4.9 \pm 3.8 \text{ mM}$ $K_m(41) = 1.2 \pm 0.8 \text{ mM}$	13
13	Bimolecular amide bond formation		+	+ 28	$k_{cat} = 0.023 \text{ min}^{-1}$ $K_m(44) = 2.2 \text{ mM}$ at 20 mM of 45	14
14	Bimolecular amide bond formation	43	44 + $n\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_2$ 47	+ 28		14
15	Bimolecular amide bond formation	43	44 +	50a: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ 50b: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ + 28	S:R selectivity ratio = about 2.2	14
16	Sequence specific peptide hydrolysis		52a: $n=2$ 52b: $n=3$ Gly-COOH	53a: $n=2$ 53b: $n=3$ + 54	turnover number $6 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$	15
17	Ester hydrolysis	59 The antibody used was prepared by chemical modification of MOPC315.	60a: $n=1$ 60b: $n=2$ 60c: $n=3$ 60d: $n=4$	61a: $n=1$ 61b: $n=2$ 61c: $n=3$ 61d: $n=4$ +	$k_{cat}(60a) = 0.008 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ $k_{cat}(60b) = 0.052 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ $K_m(60b) = 2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ $k_{cat}(60c) = 0.011 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ $k_{cat}(60d) \leq 0.001 \text{ min}^{-1}$	16
18	Ester hydrolysis	59 The antibody used was prepared by chemical modification of MOPC315.	60b	61b + 62	$k_{cat} = 0.87 \pm 0.08 \text{ min}^{-1}$ $K_m = 1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$	17
19	Ester hydrolysis	59 His. mutant of MOPC315 was prepared by site directed mutagenesis	60b: $n=2$ 60d: $n=4$ 60e: $n=5$	61b: $n=2$ 61d: $n=4$ 61e: $n=5$ + 62	$K_m(60d) = 2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ $k_{cat}(60d) = 0.18 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$	18

run	reaction type	hapten	substrate(s)	product(s)	comments	ref.
20	Claisen rearrangement				$k_{cat} = (0.39-2.5) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ $K_m = 38-51 \mu\text{M}$ $k_{cat}/k_{uncat} = 110-250$	19,20
21	Claisen rearrangement		64	65	$k_{cat} = 2.7 \text{ min}^{-1}$ $K_m = 260 \mu\text{M}$ $k_{cat}/k_{uncat} = 1 \times 10^4$	21
22	Photo-dimerization				70a:70b = 1.13:1 (with antibody) 0.45:1 (without antibody)	22
23	Photo-sensitized cleavage of a thymine dimer				$k_{cat} = 1.2 \text{ min}^{-1}$ $K_m = 6.5 \mu\text{M}$	23
24	Diels-Alder reaction				$k_{cat} = 4.3 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ $K_m(76) = 21 \pm 4 \text{ mM}$ at 0.61 mM of 75	24
25	β -Elimination				$k_{cat} = 0.304 \text{ min}^{-1}$ $K_m = 214 \mu\text{M}$	25
26	β -Elimination	81	84: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{NO}_2, X = \text{F}$ 86: $R_1 = \text{NO}_2, R_2 = \text{H}, X = \text{H}$ (inhibitor)	85: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{NO}_2$	$k_{cat} = 0.079 \text{ min}^{-1}$ $K_m = 571 \mu\text{M}$	25
27	Redox reaction				Reduction of Safranine T in the Presence of Antibody	26

run	reaction type	hapten	substrate(s)	product(s)	comments	ref.
28	Redox reaction	$R = \text{---NH---CH}_2\text{---Lys-protein}$	90	91	$k_{\text{cat}} = 0.02 \text{ s}^{-1}$ $K_m(\text{sulfite}) = 3 \text{ mM}$ $K_m(90) = 0.6 \mu\text{M}$	27,28

1. 加水分解反応

本反応は抗体を用いて行われたはじめての例である。エステル・アミドの加水分解反応は、炭素を中心原子とした四面体型の遷移状態を経て進行する。この遷移状態は安定には存在しないが、炭素をリンに変えることにより遷移状態アナログとして安定に単離することができる。この遷移状態アナログをハプテンとして得られる抗体は、反応の遷移状態を認識し、その状態を安定化する。それによって反応触媒として作用することができる。Schultzらは、*p*-ニトロフェニルホスホリルコリン(1)に特異的な抗体として知られていた MOPC 167 が、炭酸エステル(2)の加水分解を触媒することを報告した³⁾。1は対応する炭酸エステルの遷移状態アナログであり、抗体 MOPC 167 は加水分解の遷移状態を認識することにより複合体を形成し、その結果反応の活性化エネルギーを下げ、反応を促進したと考えられる。MOPC 167 による加水分解活性は $k_{\text{cat}} = 0.4 \text{ min}^{-1}$, $K_m = 208 \mu\text{M}$ であり、加速効果は無触媒時に比べ 770 倍であった(表 1, run 1)。ハプテン(1)はこの反応を競合的に阻害すること ($K_i = 5 \pm 1.5 \mu\text{M}$)、コリン部位をもたない化合物はこの抗体触媒の基質とはならないこと、*N*-メチル基を *N*-エチル基に変換した化合物およびメチレン鎖にメチル置換基を導入した化合物の K_m はいずれも 2 よりも大きい値を示すことなど、この触媒が天然酵素にみられるような高い基質特異性をもつことも明らかとなった。さらに、リン酸エステル(6)をハプテンとして得た抗体も対応する炭酸エステル(7)の加水分解活性を有することが報告されている⁴⁾。この場合もメチル-2-ニトロフェニル炭酸エステルを基質としないなど、高い基質特異性を示した(表 1, run 2)。

一方、Lerner らもリン酸エステルをカルボキシエステルの加水分解反応の遷移状態とみなし、それをハプテンとして抗体を調製している⁵⁾。これは抗体触媒の概念に基づいた反応の最初の報告例である。彼らはハプテン

(9) から得られた抗体が、10, 15 の加水分解反応をそれぞれ 960 倍、210 倍で加速することを見いだした(表 1, run 3, 4)。アセチル体(11)を基質としないことは、この触媒が $\text{CF}_3\text{CO-}$ と $\text{CH}_3\text{CO-}$ を識別したことを示している。また、12 は基質よりも遙かに低濃度で反応を競合的に阻害する⁶⁾。その後 17 をハプテンとして得られた抗体の中に 18 や 21 の加水分解を 10^5 から 10^6 のオーダーで加速するものも得られている(表 1, run 5, 6)⁷⁾。この値は天然の酵素に匹敵するものである。また抗体の化学修飾による検討および pH-反応速度の相関の結果からチロシン、ヒスチジンなどのアミノ酸残基が触媒活性発現に重要であることが示唆された。

アミドの加水分解はペプチダーゼとの関係から興味ある反応である。この反応にも遷移状態アナログを用いた抗体触媒が利用された(表 1, run 7)。アミド結合の加水分解はエステルに比べて高いエネルギーを必要とするが、本研究⁸⁾で得られた抗体は 2.5×10^5 倍の加速効果を示しており、その基質特異性と合わせ、実用的人工ペプチダーゼ、プロテアーゼ創製の可能性を示唆している。

抗体による加水分解反応を実用的有機反応へ応用する研究として、逆相ミセル中での反応がある(表 1, run 8)。従来の研究はほとんどの場合、水系で行われているが(アミドの加水分解反応では co-solvent として少量の DMF あるいは DMSO- CH_3CN を使用)、非水溶媒系、有機溶媒-水系での抗体の使用が可能となれば、その応用範囲は大きく広がる。Durfor らはフェニルホスホネート(26)をハプテンとして調製した抗体を用いて、逆相ミセル中にてフェニル酢酸エステル(27)の加水分解を行った。 $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}} = 3 \times 10^3$ と高い値を示し、逆相ミセル中でも抗体の触媒活性が保持されることが示された⁹⁾。 $\text{H}_2\text{O}/\text{detergent}$ のモル比 W_0 を変化させることにより、ミセル中に取り込まれる抗体サイズにあわせてミセルのサイズを調製することができる。この反応においては $W_0 = 28$ の時、触媒活性は最大となり、抗体の分子サイズとの相関が示された。

さらに加水分解反応の応用研究として基質分子の反応点近傍に不斉中心を導入し抗体による立体特異性を調べたものがある(表1, run 9)。ラセミ体のハブテンで免疫すると、R 体、S 体のハブテンに対する抗体がそれぞれ独立に産生されるため、精製されたモノクローナル抗体は R 体か S 体のどちらか一方を特異的に認識することになる。即ち、そのような抗体を用いて反応を行えば、立体特異的加水分解が進行することになる。実際、ラセミ化合物(30)をハブテンとした場合、その抗体は(S)フェニルアラニンを含み31aを31b(R 体)にくらべ選択的に加水分解した。反応速度比(k_{31b}/k_{31a}) $<5 \times 10^{-3}$ の抗体も得られている。この結果はD-アミノ酸を含むハブテンは天然型のL-アミノ酸を含むものより高い抗原性を有するためと説明された¹⁰⁾。

ある種の天然リパーゼは(R, S)- α -フェネチルアセテートを特異的に(R)- α -フェネチルアルコールに加水分解する。このリパーゼ活性発現を目的として不活性なエステルの加水分解を行った例がある(表1, run 10)。34をキャリアタンパク質に結合し、それを抗原として抗体の調製を行った結果、11種の抗体のうち9種は(R)体(35b)を、他の2種はS 体(35a)を特異的に加水分解した。ラセミ化合物で免疫した場合でも、得られる抗体はどちらかのエナンチオマーに明確な特異性を示している点、注目される¹¹⁾。

2. ラクトン化反応および2分子アミド結合形成反応

δ -ヒドロキシエステルが分子内で環化し、 δ -ラクトン化する反応にも抗体触媒が応用された(表1, run 11)。これは遷移状態がエステルの加水分解反応と同じであり、リンを中心にした正4面体型のアナログをハブテンとして用いることができるためである(図3)。調製された抗体は反応を167倍加速し、また前述のエステル

の加水分解と同様ハブテンはラセミ体であるが、抗体は94% e.e. の光学収率で δ -ラクトンを与え、立体特異的に環化した¹²⁾。

さらに、この抗体は2分子アミド結合形成反応も触媒する。上記の δ -ラクトンと

-フェニレンジアミンとからアミドを形成する反応は、 δ -ラクトンができる時と類似の遷移状態を経るので、先の抗体はこの反応をも加速できると考えられた。結果として、触媒活性はみられたが、生成物による阻害のため収率5~10%で反応は停止した(表1, run 12)¹³⁾。

ラクトンを経由せずにアミド体を形成する反応として、化合物(43)をハブテンとして得た抗体を用いて、エステル体(44)とアミン体 $C_6H_5CH_2NH_2$ (45)、 $nC_4H_9CH_2NH_2$ (47)あるいは $C_6H_5CH(CH_3)NH_2$ (49)を反応させた例がある。47を45とともに用いた場合、無触媒では47の方がより高い反応性を示すにもかかわらず(生成比46/48=0.72)、抗体存在下でその比は逆に3.7となる(表1, run 13,14)¹⁴⁾。また49のラセミ体を用いた場合、生成物(50)の(S)体/(R)体=2.2となり、ここでも選択性が示された(表1, run 15)¹⁴⁾。

3. 金属錯体を co-factor としたペプチドの位置特異的加水分解反応

Lerner らは、抗体と基質が結合する部位に co-factor として金属錯体を存在させ、ペプチドの位置特異的加水分解を試みている¹⁵⁾。これは51をハブテンとして調製した抗体を用い、ペプチドの加水分解をCo(III)、Zn(II)、Ga(III)、Fe(III)、In(III)、Cu(II)、Ni(II)、Lu(III)、Mg(II)、Mn(II)などの金属のトリエチレントラミン(trien)錯体存在下、中性条件でおこなったもので、52a, 52bに関しては、Gly-Pheのアミド結合が選択的に開裂した(表1, run 16)。一方、図4に示す55, 56, 57, 58は全く加水分解されなかった。反応を促進する機構としては2通り考えられる。

Fig. 3

Fig. 4

1つは図4Aに示すように、金属が基質アミドのカルボニル基に直接配位することにより、カルボニル炭素へのOH⁻あるいはH₂Oによる求核反応をおこやすくする機構。もう1つは図4Bに示すように、金属に配位したOH⁻がアミドのカルボニル基を攻撃する機構である。この両者いずれもが関与している可能性があるが、51で調製した抗体は金属 co-factor と基質ペプチド両方を加水分解に適当な位置に固定することにより反応を加速し、位置選択性を生じたものと考えられる。即ち、抗体は都合の良い反応の場を提供していることになる。

4. 化学修飾抗体によるエステル加水分解反応

次に、3. とは別の観点から効率良く反応を進行させた方法として、反応遷移状態が結合する部位近傍を化学修飾し、抗体に触媒機能を人工的に付与した報告がある(表1, run 17)¹⁶⁾。MOPC 315は置換基を有する2,4-ジニトロフェニルに特異的に結合する抗体として知られている。Schultzらは、図5に示す反応経路により、MOPC 315の結合部位にあるリジン残基にS-S結合を介してイミダゾール基を導入した。この半合成抗体を用いて60a~60dのクマリンエステルを加水分解したところ、 $k_{cat}(60a) = 0.008 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}(60b) = 0.052 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}(60c) = 0.011 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}(60d) < 0.001 \text{ min}^{-1}$ の触媒活性であった。60bが最も良い

Fig. 5

基質であり、他の3種には大きな促進効果がみられないことは、抗体の結合部位と反応部位の長さが厳しく規定されていることを示している。彼らは、この報告以前にMOPC 315をチオールで化学修飾した例も報告している(表1, run 18)¹⁷⁾。

5. Site-directed mutagenesisにより調製された抗体を用いたエステル加水分解反応

4. で紹介した化学修飾法を発展させたものとして、特異アミノ酸置換導入法を用いて抗体MOPC 315の基質結合部位近傍にあるチロシン残基をヒスチジン残基に交換し、この再構成変異株抗体を用いてエステルの加水分解反応を調べた報告がある¹⁸⁾。この変異株(hybrid Fv fragment)のジニトロフェニル誘導体に対する結合親和性は野生株に比べ1/8~1/2に落ちているが、エステル60bの加水分解は野生株に比べ逆に初速度で45倍、塩基触媒4-メチルイミダゾールに比べ実に 9×10^4 倍加速した。しかし、メチレン鎖が2つ減少した60bあるいは1つ増加した60eを基質とした場合には加速効果はなく、ジニトロフェニルリジンを添加した場合は、60dの加水分解が阻害されるなど、まさに酵素特有の基質特異性を有している。イミダゾールのアシル化剤ジエチル炭酸エステルで反応が抑制されることも、イミダゾールの効果を裏付けている(表1, run 19)。

6. Claisen 転位¹⁹⁻²¹⁾

細菌や植物が芳香族アミノ酸を生合成する過程に、コリスミン酸(64)からプレフェン酸(65)への転位反応がある(図6)。これは生合成過程の重要な反応であり、コリスミン酸ムターゼにより触媒される($k_{cat}/k_{uncat} = 3 \times 10^6$)。

Fig. 6

化合物(66)がこの酵素の強力な阻害剤($K_i=0.15\ \mu\text{M}$)となることが知られており、酵素反応機構としてClaisen 転位が予想される。遷移状態アナログである63, 67をハプテンとして得られた抗体は、この反応を触媒しただけでなく、ラセミ体のコリスミン酸のうち(−)体だけを反応の基質とし、(+)体は基質としないという立体特異性も示した。さらに66はこの抗体触媒に対しても強力な阻害剤となった($K_i=0.6\ \mu\text{M}^{20}$, $K_i=9\ \mu\text{M}^{21}$)。この反応は抗体触媒を用いない場合、副生成物として *p*-ヒドロキシベンゾエートを生じる(表1, run 20, 21)。

7. 光二量化反応

光二量化反応は閉環体の立体選択性、位置選択性に関して特に良く研究されてきた。抗体触媒をこの反応に用いた場合、選択的にどの生成物ができるか、抗体の鑄型効果がどのように機能するか、興味をもたれるところである。メチル-*p*-ニトロ-*trans*-シンナメート(69)の光二量化反応で、68をハプテンとして得られた抗体を存在させた場合、70aと70bの生成比は1.13:1であり、存在しない場合(0.45:1)にくらべて70aの生成割合が上昇した。顕著な触媒活性こそ示さなかったものの、ハプテンと同じ立体構造の化合物をより多く生成したことは、鑄型としての効果を発揮したといえる²²⁾。しかしながら、本反応はハプテンと生成物の構造はほぼ同じであり、今まで述べてきた抗体触媒の概念にあてはまるか否か疑問である(表1, run 22)。

8. チミンダイマー-光開裂反応

DNAに紫外線を照射するとピリミジン塩基の二量体が生成する。これはDNAの複製・転写の障害となり、紫外線による細胞致死の原因の一つとなっている。一方、生体内にはこの障害に対して、いくつかの修復機構があ

ることも知られている。その1つに酵素的な光回復がある。その酵素反応のメカニズムの詳細な明らかではないが、酵素内のフラビン、インドール、キノンなどが光増感剤として二量体からの電子の授受に関与し、ピリジンダイマーからモノマーへの変換反応を触媒している、と考えられている。*cis-syn* チミンダイマー(71)をハプテンとして得られた抗体は、6種のうち5種が光照射(300 nm)によりモノマーを再生する反応を触媒した。そのうちの1種について速度定数を求めたところ、基質(72)に対し $k_{\text{cat}}=1.2\ \text{min}^{-1}$, $K_m=6.5\ \mu\text{M}$ であった。この値は天然の光回復酵素(DNA photolyase: $k_{\text{cat}}=3.4\ \text{min}^{-1}$)に匹敵するものである。これらの抗体の認識部位では、チミンダイマーとの π -スタッキング相互作用によりトリプトファンが適当な位置に誘導され、光増感剤として働いていると考えられる(表1, run 23)²³⁾。

9. Diels-Alder 反応

熱的2分子反応であるDiels-Alder反応に抗体触媒が応用された。Diels-Alder反応は周知のように合成化学上価値の高い反応であるが、その遷移状態は生成物に類似した骨格をしている。そのためこの反応に抗体を触媒として用いる場合、何をハプテンとするかが最大の問題である。HilvertらはDiels-Alder反応による環化反応物は不安定であるが、二次的にすみやかに安定な生成物を与える反応(図7)に抗体触媒を応用した。即ち、テトラクロロオフェンジオキシド(TCTD: 75)は *N*-エチルマレイミド(NEM: 76)と反応して、化合物(78)を生成する。熱的に不安定なこの化合物は SO_2 を遊離し、安定な生成物ジヒドロ-*N*-エチルテトラクロロフタルイミド(77)を与える。この報告で注目される点はアミノ酸残基を修飾したことである。TCTD(75)はリジン残基と反応することが知られており、抗体中のリジン残基により反応が阻害される可能性がある。彼らはリジン残基のア

さらに小アニオン種(F^- , Cl^- , Br^- , I^- など)でも抑制された。このように2つ以上の基質が結合することができる抗体を用いた反応は、広範な有機化学に应用可能であり、意義深いと思われる。

12. おわりに

抗体触媒は化学における新しい概念として登場してきた。この分野の特徴はオリジナル文献が'89年12月現在30報弱であるのに対して、そのreviewもほぼ同数、書かれていることであろう。これは抗体触媒が合成化学のテクニックとしての有用さだけでなく、その考え方・概念の新規性・おもしろさに起因するものと考えられる。

主としてSchultzとLernerの2グループにより展開されてきた抗体触媒の化学は、初期の加水分解反応にとどまらず、ここ1~2年で多くの有機化学反応に応用された。有機合成化学者にとって、抗体による立体・位置特異的反応は看過できぬ報告である。今後この抗体触媒がいわゆる“tailored enzyme”として真に有用な合成触媒となるためには、単に免疫化学の知識のみならず、高度な有機化学の力が必要となるであろう。この新領域の化学に日本の若い化学者の参加が望まれる。

(平成2年3月2日受理)

文献 (第1部)

- 1) L. Pauling, *Nature*, **248**, 769 (1974)
- 2) L. Pauling, *American Scientist*, **36**, 51 (1948)
- 3) W.P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York (1969)
- 4) 加藤晃一, 荒田洋治, シリーズ分子生物学の進歩 **3**, 第3章 免疫グロブリンの高次構造と機能 (1990)
- 5) 荒田洋治, 代謝 **25** (臨時増刊号) 免疫 '88 (1988)
- 6) 岩波講座免疫科学, 第2巻 (1983)
- 7) E. Baldwin, P.G. Schultz, *Science*, **245**, 1104 (1989); R. Wetzl, *Protein Engineering*, **2**, 169 (1988)
- 8) W.D. Huse, L. Sastry, S.A. Iverson, A.S. Kang, M.A.-Mees, D.R. Burton, S.J. Benkovic, R.A. Lerner, *Science*, **246**, 1275 (1989)
- 9) A. Tramontano, K.D. Janda, R.A. Lerner, *Science*, **234**, 1566 (1987)
- 10) A. Tramontano, K.D. Janda, R.A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 6736 (1986)
- 11) A. Tramontano, A.A. Ammann, R.A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2282 (1988)
- 12) K.D. Janda, D. Schloeder, S.J. Benkovic, R.A. Lerner, *Science*, **241**, 1188 (1988)
- 13) C.N. Durfor, R.J. Bolin, R.J. Sugawara, R.J. Massey, J.W. Jacobs, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8713 (1988)
- 14) S.J. Pollack, P. Hsiun, P.G. Schultz, *ibid.*, **111**, 5961 (1989)
- 15) K.D. Janda, S.J. Benkovic, R.A. Lerner, *Science*, **244**, 437 (1989)
- 16) A.D. Napper, S.J. Benkovic, A. Tramontano, R.A. Lerner, *ibid.*, **237**, 1041 (1987)
- 17) S.J. Benkovic, A.D. Napper, R.A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 5355 (1988)
- 18) K.D. Janda, R.A. Lerner, A. Tramontano, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4835 (1988)
- 19) B.L. Iverson, R.A. Lerner, *Science*, **243**, 1184 (1989)
- 20) S.J. Pollack, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1929 (1989)
- 21) S.J. Pollack, G.R. Nakayama, P.G. Schultz, *Science*, **242**, 1038 (1988)
- 22) E. Baldwin, P.G. Schultz, *ibid.*, **245**, 1104 (1989)
- 23) D. Hilvert, K.D. Nared, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5593 (1988)
- 24) D. Hilvert, S.H. Carpenter, K.D. Nared, M-T.M. Auditor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4953 (1988)
- 25) D.Y. Jackson, J.W. Jacobs, R. Sugawara, S.H. Reich, P.A. Bartlett, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4841 (1988)
- 26) A. Balan, B.P. Doctor, B.S. Green, M. Torten, H. Ziffer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 106
- 27) A.G. Cochran, R. Sugawara, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7888 (1988)
- 28) D. Hilvert, K.W. Hill, K.D. Nared, M-T.M. Auditor, *ibid.*, **111**, 9261 (1989)
- 29) K.M. Shokat, C.J. Leumann, R. Sugawara, P.G. Schultz, *Nature*, **338**, 269 (1989)
- 30) K.M. Shokat, C.J. Leumann, R. Sugawara, P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1172 (1988)
- 31) N. Janjic, D. Schloeder, A. Tramontano, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6374 (1989)
- 32) N. Janjic, A. Tramontano, *ibid.*, **111**, 9109 (1989)

文献 (第2部)

- 1) 平竹 潤, 小田順一, 化学, **43**, 52 (1988)
- 2) 平竹 潤, 小田順一, 化学, **43**, 525 (1988)
- 3) S.J. Pollack, J.W. Jacobs, P.G. Schultz, *Science*, **234**, 1570 (1986)
- 4) J.W. Jacobs, P.G. Schultz, R. Sugawara, M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2174 (1987)