触媒抗体の機能発現メカニズムと分子認識

藤井 郁雄*

Molecular Recognition and Mechanism Displayed by Catalytic Antibodies

Ikuo Fujii*

Although numerous of strategies for the generation of catalytic antibodies have been developed, investigations of the expressed immunoglobulin proteins have resulted in only a limited understanding of antigen-combining site structures and catalytic function. When mice are immunized with a hapten conjugated to a carrier protein, a few, and occasionally several, of the dozens of antibodies that bind the hapten are characterized to be catalytic. Thus, the diversity of the immune response can provide a panel of catalytic antibodies that possess varying degrees of catalytic activity and substrate specificity. However, it is unclear how structural differences in the antigen-combining sites of these antibodies correlate with catalytic activity. For example, how do catalytic and noncatalytic (affinity) antibodies differ on a structural basis? Are catalytic antibodies derived from noncatalytic antibodies by mechanisms involved in antibody diversification or are they encoded in the germ-line repertoire? To understand the structure-function relationship and the molecular mechanisms by which catalytic antibodies are generated in immune responses, heavy and light chain variable region primary structures of antibody repertoires (involving catalytic and noncatalytic antibodies) were deduced from cDNA generation, cloning, and sequencing, in addition, three-dimensional molecular models were constructed based on the primary sequence data and kinetic studies using a variety of substrate derivatives.

Key words : Catalytic antibody ; Immune response ; Antibody diversity ; Transition-state analog ; Antigen-combining site ; Variable region ; Prodrug ; Carbohydrate ; Ester hydrolysis ; Substrate specificity.

1. はじめに

酵素触媒の特徴の1つは、酵素が化学反応の遷移状態に結合し、安定化させることによって反応を触媒していることである¹⁾。そこで、遷移状態に似た安定な化合物を合成し、これを抗原として抗体を作製すれば、得られた抗体は反応の遷移状態を安定化し、酵素のような触媒活性を獲得するようになる²⁾。このような考えをもとに、1986年、触媒活性をもつ抗体(触媒抗体 Catalytic Antibodies)の第1号が報告された³⁾。その後の活発な研究により、今日まで数十種の触媒抗体が報告され、抗体が触媒する反応の種類も増えてきている⁴⁾。触媒抗体の新技术は抗体のもつ多様性を巧みに利用している。すなわち、

ヒトやマウスの体内には $10^8 \sim 10^{12}$ 種類にも及ぶ抗原結合特異性の異なった抗体レパートリーが備わっているので、抗原をデザインすることによって、自由自在にテラーメイドの触媒抗体を手に入れることが可能になる。そのため、化学のみならず生命工学や医学を含めたあらゆる分野でその応用が期待されている。

今日、遷移状態アナログの設計など触媒活性を誘導するための方法論が活発に研究されている。しかし、発現された触媒抗体タンパク質の構造と機能に関する研究は比較的少ない。触媒抗体獲得の基盤となる指導原理の確立のためには、触媒抗体の構造と機能を明らかにし、触媒抗体とハプテンあるいは基質との相互作用を分子レベルで理解する努力が必要であろう。本論文では、最近筆者らが作製した触媒抗体を紹介しながら触媒抗体の機能発現メカニズムと分子認識について解説したい^{5,6)}。また触媒抗体の理論的な背景や一般的な作製法および触媒

* 蛋白質工学研究所 ()

* Protein Engineering Research Institute ()

反応例については他の総説を参考していただきたい⁷⁾。

2. 触媒抗体の機能発現メカニズム

今日、種々の方法論を駆使して触媒抗体の作製が検討されている。その代表的な例として3つのアプローチを挙げることができる。すなわち、抗体のハプテンに対する立体的かつ電子的な相補性を利用して、1)反応の遷移状態を認識する抗原結合部位を構築する(遷移状態の安定化)、2)抗原結合部位に触媒機能をもつアミノ酸残基を誘導する(一般酸塩基・触媒など)、3)金属や補酵素などの触媒活性基に対する結合部位を構築(co-factor 結合部位)する方法である。筆者らは遷移状態の安定化を触媒因子とする抗体を作製し、反応速度論や抗原結合部位の分子モデリングから、触媒抗体の触媒機能の発現メカニズムについて検討した。

2.1. クロラムフェニコール・エステル誘導体の加水分解反応⁵⁾

最近、筆者らは触媒抗体応用の具体例として、プロドラッグ医薬品を活性化する触媒抗体を作製し、触媒抗体の医学応用への可能性を示すことに成功した⁵⁾。プロドラッグとは、医薬品の毒性軽減や持続性の向上などを目的として化学修飾された化合物であり、投与後生体の酵素やpHの変化によりもとの医薬品に変換され薬理作用を発揮するものである⁸⁾。しかしながら、プロドラッグ化の方法は生体内の酵素の存在、酵素反応の種類、酵素の発現部位と発現量によって制限されていて、いつも効果的に行われているわけではない。そこで、触媒抗体の技術をプロドラッグの活性化へと展開できれば、部位特異的な医薬品の活性化が可能になるばかりか、効果的なプロドラッグのデザインにより従来使用できなかった

医薬品もプロドラッグとして利用できるようになる。そこで、モデル医薬品として抗生物質であるクロラムフェニコール1を用い、そのエステル誘導体を加水分解する抗体を作製した(図1)。

クロラムフェニコール1は古くから構造-活性相関が詳しく研究されており、以下に述べる3つの理由により、クロラムフェニコールを本研究のモデル医薬品として選んだ⁹⁾。第1に、抗生物質であるので、簡単な細菌の増殖阻害実験によってプロドラッグの活性化が評価できる。第2に、クロラムフェニコールは分子内に *p*-ニトロフェニル基をもち、強い免疫原性が期待できる。第3に、基質と生成物とのコンホメーションの変化により生成物による反応阻害の問題を克服した高いターンオーバーをもつ触媒抗体を獲得することが期待できる。

触媒抗体の低活性の理由の1つとして生成物阻害が指摘されている。本研究のように実用的な細菌の増殖阻害を目的とする場合、高濃度のクロラムフェニコールの生成が必要であり、そのためには数多くの代謝回転を行える触媒抗体の作製が要求される。図2にクロラムフェニコールの抗菌活性の作用機序を示す。クロラムフェニコールは細菌のリボソームに結合し、タンパク質合成を阻害して抗菌活性を発揮する¹⁰⁾。一方、分子内に存在する2つの水酸基のどちらかがエステル化されると抗菌作用を失う¹¹⁾。クロラムフェニコールのX線およびNMR構造解析の結果から、分子内の2つの水酸基は水溶液中でも強固な水素結合を形成しており、この立体構造および電子状態が細菌のタンパク質合成に必要なリボ核酸類に似ていることが示唆されている¹²⁾。すなわち、クロラムフェニコールはリボ核酸類のリボソームへの結合を競合的に阻害する。ところが、水酸基のエステル化などにより水素結合できなくなると(3-アセチルクロラムフェニコールなど)、もはやリボ核酸類に似た立体構造をとれなくなり、その結果、リボソームへの結合活性を失う。このようなクロラムフェニコールとクロラムフェニコール・エステル誘導体との立体構造の変化を利用して生成物阻害の問題を克服することを計画した。そこで、クロラムフェニコール・モノエステル誘導体2をプロドラッグとして用いることにし、これを加水分解する触媒抗体を、反応の遷移状態アナログであるホスホン酸エステル誘導体3をハプテンとして作製した(図1)。ホスホン酸エステル誘導体3の免疫により得られる抗体は、生成物であるクロラムフェニコール1よりも基質であるクロラムフェニコール・モノエステル誘導体2に強く結合することが期待され、生成物による阻害を克服できると考えた。

遷移状態アナログであるホスホン酸エステル誘導体

Fig.1 Prodrug activation via antibody-catalyzed reaction.

Fig. 2 Action mode of chloramphenicol.

を、クロラムフェニコール1を原料に合成し、KLHと縮合後、これを抗原としてマウスに免疫した。常法に従ってモノクローナル抗体を作製し¹³⁾、最終的にハプテンに結合活性をもつ12種の抗体をイオン交換(Mono Q)およびアフィニティー(Protein G)クロマトグラフィーにより精製した。この12種の抗体についてクロラムフェニコール・モノエステル2の加水分解活性を調べたところ、6種の抗体に顕著な反応の加速が観測された。そこで、これら6種の抗体の中で最も活性の高い抗体6D9についてその触媒反応を詳細に検討した。

2.2. 触媒抗体によるプロドラッグ医薬品の活性化

触媒抗体6D9によるプロドラッグ医薬品の活性化を細菌の増殖阻害実験により検討した¹⁴⁾。触媒抗体によるプロドラッグの活性化における最大の利点は、活性化の特異性が高い点であり、用いられるプロドラッグは天然酵素に対しては安定で、触媒抗体でのみ活性化されることが要求される。そこで、増殖阻害実験に用いる細菌として枯草菌を選んだ。枯草菌は菌体外に様々な加水分解酵素を分泌することが知られているので、本プロドラッグ2の天然酵素に対する安定性が評価できる¹⁵⁾。

増殖阻害実験はペーパーディスク拡散法で行った(図3)¹⁴⁾。プロドラッグ2だけの添加では菌の増殖を阻害することはできなかったが(図3b)、触媒抗体6D9と一緒に加えるとくっきりとした阻止円(黒くみえる部分)が観測された(図3a)。以上の結果から、このプロドラッグ2は少なくとも枯草菌の分泌する加水分解酵素に対しては安定であり、テラーメイドの触媒抗体6D9でのみ分解されること、さらに阻止円の大きさから推定して、本抗体は十分量のクロラムフェニコール1を生成し、効

Fig. 3 Growth inhibition assay of *Bacillus subtilis* ISW 1214 was performed by the paper-disc agar diffusion method (18): (a) 100 mM substrate plus 20 μ M antibody, (b) 100 mM substrate alone, (c) 20 μ M antibody alone, (d) 2.0 mM chloramphenicol. An overnight culture (100 μ l) of *Bacillus subtilis* ISW 1214 and melted top agarose (3.0 ml adjusted to pH 8.0 by the addition of 1.0 N NaOH) were mixed and spread onto a 90 mm LB agar plate. After each sample of 10 μ l was applied to the 6.0 mm paper discs resting on the plates, the plates were placed at 37°C for 18 h.

果的に代謝回転をしていることが判明した。

2.3. 反応速度論的考察

抗体6D9はMichaelis-Menten型反応速度式に従って¹⁶⁾、本加水分解反応を触媒し($k_{cat}=0.133 \text{ min}^{-1}$, $K_m=64 \mu\text{M}$)、無触媒反応に比べて反応を1800倍加速した。また、反応液にハプテンとして用いた遷移状態アナログ3を添加したところ、抗体6D9による触媒反応は完全

に阻害された($K_i=0.06\ \mu\text{M}$)。このことより、本加水分解反応は抗体の抗原結合部位で触媒されていることが判明した。触媒反応が遷移状態理論に従うとすれば、その反応加速は抗体の基底状態と遷移状態に対する結合活性の比率から予測できると言われている($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}=K_m/K_i$)¹⁶⁾。基質および遷移状態に対する抗体の結合活性をそれぞれ K_m 値およびハプテンの K_i 値、また抗体には2つの抗原結合部位があるので1抗原結合部位あたりの活性を $1/2\ k_{\text{cat}}$ 値とすると、抗体6D9の場合、反応加速と結合活性の比率がほぼ一致する($1/2\ k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}=900$, $K_m/K_i=1100$)。このことから用いたハプテンは理想的な遷移状態アナログであり、触媒抗体6D9はハプテンのホスホン酸エステル部分をよく認識していることが示唆される。

次に、触媒抗体技術の最も深刻な問題点である生成物による反応阻害について検討した。反応液にあらかじめ生成物であるクロラムフェニコールを加え、本抗体($2\ \mu\text{M}$)による加水分解反応を追跡したところ、大過剰のクロラムフェニコール($10\ \text{mM}$)の添加においても反応の阻害を観測することはできなかった。このことから、触媒抗体6D9は生成物阻害をうけることなく、高いターンオーバーで加水分解反応を触媒して大量のクロラムフェニコールを生成することが判明した。

2.4. 触媒抗体6D9の基質特異性

触媒抗体の基質認識を検討するため、基質2の誘導体を合成し、触媒活性を測定した(表1)。

2.4.1. 位置選択性

クロラムフェニコール・モノエステル2は反応条件下($\text{pH}\ 8.0$)、エステル基の転位によって位置異性体2aと

Fig. 4

2bの平衡混合物として存在する。抗体6D9はホスホン酸エステル3を抗原として作製されたものであるので、触媒抗体6D9が加水分解するエステルは2bではなく、2aであると推定される。それを証明するため、水酸基の一方を保護しエステル基の転位を防いだ基質4およびその位置異性体5について抗体6D9の触媒活性を調べた(図4)。抗体6D9は基質4の加水分解を触媒し、反応は原料が完全に消費されるまで進行した。一方、基質5に対しては触媒活性を示さず、完全な位置選択性を示した。すなわち、抗体6D9はハプテンに相補的な高い位置特異性を有することが判明した。

2.4.2. 基質特異性

トリフルオロアセチル基をアセチル基に変換した基質6について、抗体6D9の反応性を検討した(図5)。抗体6D9は基質4に対しては加水分解活性をもつものの、基質6に対しては低い触媒活性しか示さなかった。また、ニトロ基をジクロロアセチルアミド基に変換した

Table 1 Kinetic parameters of the hydrolysis by antibody 6D9 and 7C8^a

		substrate			
antibody		4	6	8	9
6D9	$k_{\text{cat}}\ (\text{min}^{-1})$	0.29	0.060	0.024	0.066
	$K_m\ (\mu\text{M})$	50	515	255	56
	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}^b$	1790	410	310	1870
	K_m/K_i^c	833			
7C8	k_{cat}	0.229	0.245	0.015	0.140
	K_m	3.8	12	4.2	6.0
	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}^b$	1414	1680	195	3980
	K_m/K_i^c	12			

^a In 10% DMSO/50 mM Tris, pH 8.0. ^b The first order rate constant of spontaneous hydrolysis (4: $1.62 \times 10^{-4}\ \text{min}^{-1}$, 6: $1.5 \times 10^{-4}\ \text{min}^{-1}$, 8: $7.5 \times 10^{-5}\ \text{min}^{-1}$, 9: $3.5 \times 10^{-5}\ \text{min}^{-1}$). ^c The inhibitor constant (K_i) of transition-state analog 3 (6D9: $0.06\ \mu\text{M}$, 7C8: $0.31\ \mu\text{M}$)

Fig. 5

基質7に対しては全く反応性を示さなかった。さらに、ジクロロアセチル基をアセチル基にした基質8についても触媒活性の低下を観測した。一方、抗体6D9は基質4および基質9に対してはほぼ同じ K_m 値および反応加速 (k_{cat}/k_{uncat}) を示したことから、同程度の基質親和性をもつ同程度の遷移状態の安定化により反応を触媒していることが判明した。以上のことから、抗体6D9はトリフルオロアセチル基、ジクロロアセチル基、ニトロフェニル基の各構造部分を強く認識していること、また基質の3位官能基部分は抗原結合部位の外にあって抗体との相互作用がないことが示唆された。

2.5. 抗原結合部位の分子モデリング

触媒抗体6D9について、基質特異性および可変領域のアミノ酸配列をもとに抗原結合部位の分子モデルを作製した。抗体の多様な基質特異性は超可変領域の6つのループ構造によって形造られている¹⁷⁾。これらのループ構造はアミノ酸配列およびその長さにおいて多種多様であるにもかかわらず、ループ構造のペプチド主鎖がとりうる立体配置の種類はそれほど多くなく、いくつかの構造に分類される (canonical structure)¹⁸⁾。また、ループ構造を支えるフレーム領域のアミノ酸配列は抗体間でよく保存されている。このような理由から、抗体はタンパク質の分子モデリングの恰好のターゲットになっており、最近では分子モデリングによって超可変領域の構造をX線結晶解析の分解能と同レベルの誤差範囲で予測できたという報告が相次いで出されている¹⁹⁾。分子モデリングの手法については他の機会に詳しく述べたい。

図6に抗体6D9抗原結合部位を側面からみた構造を示した。抗原結合部位の底の部分に Trp(H47)、Phe(H100k)、Val(L94)およびPro(L95)からなる疎水性ポケットが観測され、また抗原結合部位の上部には Tyr(H58)、Arg(H100b)およびHis(L27d)などの触媒活

Fig. 6 Molecular model of the catalytic antibody 6D9-hapten complex.

性が期待されるアミノ酸残基が存在している。そこで、ハプテンとして用いたホスホン酸エステル3と抗体とのドッキングを試みた。先の基質特異性の結果から2つのモデルが考えられた。1つは疎水性ポケットがニトロフェニル基を、もう1つはフェニルアセチル基を包接したモデルである。ところが、疎水性ポケットの底にはニトロ基と相互作用することが期待される Arg 等の正電荷を持つアミノ酸残基は存在せず、逆に負電荷を持つ Asp が存在する。このことよりニトロフェニル基を疎水性ポケットに取り込ませたモデルは不適切であると判断した。そこで、フェニルアセチル基を疎水性ポケットに取り込ませ分子モデルを作製すると、興味深いことに抗原結合部位の上部に存在する His(L27d) がハプテンのホスホン酸エステル部分と相互作用することが判明した。

以上の結果および反応速度論の研究から、触媒抗体6D9においては、 V_L の CDR-1 領域の His(L27d) が加水分解反応の遷移状態を安定化し触媒機能を発現しているものと推定した。

3. 触媒抗体の多様性

免疫系の多様性により、単一のハプテンを免疫に用いた場合にも複数の触媒抗体とともに多数の結合活性のみを有する非触媒性の抗体が得られる。このことから、以下のような触媒抗体に関する基本的な疑問が生まれてくる。単一のハプテンから得られた一連の触媒抗体がどのような結合活性や触媒活性をもっているのか。また、触媒活性のある抗体とないものとではどのような違いがあるのか。誘導された触媒抗体は生殖細胞型胚遺伝子から発現されたものか、あるいは体細胞突然変異の結果なのか。このような問題を明らかにすることは、今後のハプ

テン設計に関して多大な知見を与える。先に述べたプロドラッグを活性化する触媒抗体作製の際に、ハプテン結合活性のみを有する抗体(非触媒抗体)とともに加水分解活性をもつ触媒抗体を得た。そこで、この単一の遷移状態アナログの免疫によって誘導される一連の触媒抗体(6種)および非触媒抗体(5種)の触媒活性ならび結合活性、さらにこれら抗体の変領域部のアミノ酸1次構造を比較した²⁰⁾。

3.1. 単一の遷移状態アナログより誘導される触媒抗体の結合活性と触媒活性

一連の抗体のハプテン3に対する見かけの結合定数(aK)を競合的酵素標識抗体測定法²¹⁾により検討した(表2)。触媒活性の最も高い抗体6D9は11種の抗体中7番目の結合活性を示した。またハプテンへの結合活性の最も高い抗体1G6には触媒活性が認められなかった。遷移状態アナログの免疫によって得られた触媒抗体が遷

Table 2 aK Values determined for the mAbs by hapten competitive ELISA and their kinetic parameters in the hydrolysis of substrate 4.

Clone	$I_{50} (\pm S.D.) M^a$	$aK (\pm S.D.) M^{-1}b$	$k_{cat} (min^{-1})$	$K_m (\mu M)$
1G6	$1.4 (\pm 0.1) \times 10^{-8}$	$7.2 (\pm 0.5) \times 10^7$		
4B5	$8.5 (\pm 2.5) \times 10^{-8}$	$1.2 (\pm 0.4) \times 10^7$	0.091	5.8
7A11	$1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-7}$	$9.2 (\pm 0.9) \times 10^6$		
3A7	$6.8 (\pm 1.2) \times 10^{-7}$	$1.5 (\pm 0.3) \times 10^6$		
8D11	$3.0 (\pm 0.6) \times 10^{-6}$	$3.5 (\pm 0.7) \times 10^5$	0.073	14.2
9C10	$5.0 (\pm 1.0) \times 10^{-6}$	$2.1 (\pm 0.4) \times 10^5$	0.016	2.5
6D9	$5.9 (\pm 0.5) \times 10^{-6}$	$1.7 (\pm 0.2) \times 10^5$	0.29	50
9B7	$8.2 (\pm 1.1) \times 10^{-5}$	$1.3 (\pm 0.2) \times 10^5$		
3G6	$2.2 (\pm 1.2) \times 10^{-5}$	$6.5 (\pm 3.5) \times 10^4$	0.019	59.5
6A6	$2.7 (\pm 0.7) \times 10^{-5}$	$4.0 (\pm 1.1) \times 10^4$		
7C8	$2.5 (\pm 0.3) \times 10^{-4}$	$4.1 (\pm 0.5) \times 10^3$	0.229	3.8

^a I_{50} , hapten concentration required for 50% inhibition of maximal binding in a competitive ELISA.

^b $aK = 1/I_{50}$.

	1	10	20	30	40	52	60
				CDR1		CDR2	
6D9	QVKLL	ESGGGLV	KPGGSLK	LSCAASG	FTFSNYAMS	WVRQTPEK	RLEWVVIS
4B5	-----	D-----	-----	S-G-----	D-G-----	AT-TTD	TYT---
8D11	-----	D-----	-----	SFG-----	DM-----	AT-T	YIYT-S
3G6	-----	-----	-----	T-V-----	-----	AT-----	RYT--P
9C10	-----	-----	-----	E-----	T-I-----	AT-----	S-TYT--R
7C8	-----	AV-----	A-V-----	KT-----	SSYIN-LK-K	QGS---	IAW-YA-SGGTV-N
1G6	-----	-----	-----	NT--V-----	-----	A-----	T--P
7A11	-----	PE--R--	ALV-I--	K--Y--	TDHYIN---	K-GQG---	IGW-YP-IND-K-N
6A6	-----	PE-----	A-V-M--	RT--Y--	TS-VIH--	K-R-GQG-Q	IGY-NPYNDGTK-N
9B7	-----	AE--RS-	A-V-----	T-----	NIKD-YVH--	K-G--QG-R	IGR-AP-NGDTV-A
3A7	-----	AE-----	A-V-----	TT---NIKD	TYLH--K-R--	QG---	IGR-DPANGNTK-N
		70	82	90	100		113
				CDR3			
6D9	DSVKGR	FTVSRD	NARNILY	LQMTSL	RSED	TAMFYCAR	VSHYDGR
4B5	-----	I-----	K-T-----	K-----	Y---	IPYVTY	GGFYAM-Y-Q
8D11	-----	I-----	K-T-----	S--K-----	I--S-	IPYLN	SGGFYGM-H-Q
3G6	-----	I--S-K-T	-----	S-----	I-Y--	RGNN....	YD--Y-Q-TL
9C10	-----	-----	N-----	S-----	L-Y--	RDY-----	TY-Q-L---
7C8	QHFTDK	KARLTV	-TSSSTA	-M-FS--	-TT-S-I-Y	--YRYDE-....	-AY-Q-L---
1G6	-----	I--D-----	S-----	S-VS.....	-----	T-----	
7A11	EKFR-KA	-LTV-TSSSTA	---LS--TF	---V-----	WTGGY-....	-AY-Q-L---	---A
6A6	EKF--KA	-LTS-RSSRTA	-MELS--T	---S-V-Y--	-DKG.....	Y--Q--TL	---
9B7	PKFQ-KA	-MTA-TSS-TA	---LNI-T	---V-Y-NSKRG		AY-Q-L---	---A
3A7	AKFL-KA	-TI-TSS-TA	---HLS--T	---V-Y-N.....	-----	AN-Q-L---	---A

Fig. 7 Deduced amino acid sequence comparison of V_H cDNA generated from eleven anti-3 monoclonal antibodies. Dashes (—) denote identity to antibody 6D9 and dots (.), utilized to align sequences, represent no amino acid residue at a position. CDR designations and amino acid residue numbering are as Kabat *et al.*²³⁾

移状態の安定化によって反応を触媒するとすれば、理想的には結合活性の高いものに強い触媒活性が期待できるが、現実には結合活性と触媒活性には相関関係を認めることができなかった。すなわち、非触媒抗体(例えば、抗体1G6)はジクロロアセチル基やニトロフェニル基などのホスホン酸エステル部分以外の官能基と強く相互作用しているものと推察される。

3.2. 抗体可変部(Fab)のアミノ酸配列の比較

12種の抗体のうち11種について抗原結合部位を形成する可変領域(V_H および V_L)のアミノ酸配列を決定し、相同性を比較検討した(図7, 8)。個々のアミノ酸配列から Neighbor-Joining 法²²⁾で作製したH鎖およびL鎖の系統樹を図9に示す。触媒活性をもつ6種の触媒抗体のうち5種の抗体(4B5, 8D11, 6D9, 9C10, 3G6)は V_H において70~85%, V_L において89~95%の高いアミノ酸配列の相同性を示した。Kabatらの抗体アミノ酸配列の分類に促え²³⁾, これら5種の触媒抗体はH鎖L鎖とも同一のサブグループ(H鎖: V_H IIID, L鎖: V_L II)に属する。唯一触媒抗体7C8のみが他と異なるアミノ酸配列をもち、異なるサブグループ(H鎖: V_H IIA, L鎖: V_L V)に分類される。一方、触媒活性のない5種の抗体同士(1G6, 3A6, 7A11, 9B7)のアミノ酸配列は V_H において46~78%, V_L において52~72%

の低い相同性を示した。また、これら非触媒性の抗体のアミノ酸配列は触媒抗体のそれとも異なることが判明した。

3.3. 基質特異性の比較

基質4およびトリフルオロアセチル基をアセチル基に変換した基質6について、一連の触媒抗体の反応性を比較した(図10)。5種の触媒抗体(6D9, 8D11, 4B5, 9C10, 3G6)は、基質4に対しては強い加水分解活性をもつものの(図10a)、基質6についての触媒活性はかなり低下した(図10b)。一方、触媒抗体7C8は基質4および6のどちらに対しても、同程度の活性を示した。この結果は、先のアミノ酸配列を比較した結果とよく一致する。すなわち、アミノ酸配列の相同性の高い5種の触媒抗体では同一の基質特性を持ち、分子認識の様式(基質との結合方向や相互作用)が類似している。一方、他とはアミノ酸配列の異なる触媒抗体7C8では分子認識の違いから基質特性が異なることが推察される。

3.4. L鎖CDR1のHis(L27d)

先の抗体6D9の分子モデルから触媒残基と推定したL鎖のHis(L27d)はアミノ酸配列の相同性の高い5種(4B5, 8D11, 6D9, 9C10, 3G6)の触媒抗体のうち4種(4B5, 8D11, 6D9, 9C10)の抗体に保存していた(図8)。触媒抗体3G6ではこの位置のアミノ酸が

	1	10	20	27	30	40	50	
	CDR1				CDR2			
6D9	ELVMTQTPLSLPVLG	QASISCRSSQTIV	HSNGD	TYLDWFLQKPGQSPKLLIYKVS	NRFS			
4B5	-----S-----		H	N	E	Y		
8D11	-----		HN	N	Q	Y	N	
3G6	-----Y-----	S	Y	D	N	E	Y	N
9C10	-----		SL	H	S	N	E	Y
7C8	-----AT-S-TP--SV-L--A--SVSN	K-H-YQ--SHE--R--KFA-QSIP						
1G6	-----AT-S-TP--SV-L--A--S-SN	H-YQ--SHE--R--KYT-QSI						
7A11	-----AI-S--P-ERV-F--A--SVGT	NIH--Q--TNG--R--KYA-ESV						
6A6	-----A--S--QR-T--A--ESVDNYGISL	MN--Q--P--V--AT--QG						
9B7	-----S-MS--TV--T-HA-RV-SN	NIG-LQ--K-I-G--HGT-LED						
3A7	-----S-MYA--ERVT-T-KA--D-NS	S--H--K--S--RANTLLV						
	60	70	80	90	100	109		
	CDR3							
6D9	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTFGGGTKLEIKRA							
4B5	-----T-----							
8D11	-----							
3G6	-----N--T-----L-F-----							
9C10	-----							
7C8	-I-S-----S--S-NS--T--F-I-F-H-THGR-L--A--L--							
1G6	-I-F-----T-NS--T--F-M-F-H-SNSW-L--A--LN--							
7A11	-I-S-----S-NS--S--IAD--Q-SNNR-L--S--L--							
6A6	--A-----S-N-HP--ED-TAM-F-Q-SKEF-L--A--L--							
9B7	--S-----A-YS-T--SL-S--FAD--V-YAQF-Y-----							
3A7	--S-----Q-YS-T--SL-Y--M-L--L-YDEF-Y-----							

Fig. 8 Comparison of the deduced amino acid sequences of V_L for eleven anti-3 monoclonal antibodies. See legend to Fig. 7 for symbol designation.

デオタイプ抗体では、個々の抗体のアミノ酸配列は高い相同性をもつ²⁵⁾。筆者らは抗体のアミノ酸配列を決定し始めた当初、多種多様なアミノ酸配列の出現を予想した。なぜなら、これらの触媒抗体および非触媒抗体は抗イデオタイプ抗体としてスクリーニングされていないからである。予想されたように、ハプテンに結合するだけの非触媒抗体間では、多様なアミノ酸配列を示した。ところが、触媒抗体間では予想に反して、相同性の高いアミノ酸配列が観測された。これらのことから、触媒抗体が触媒機能を発現するためのハプテンに対する認識様式はきわめて特定されたものであり、結合活性のための分子認識のように多種多様なものではないことが示唆された。すなわち、抗体の触媒機能は、免疫系の多様性から生まれる偶発的なものではなく、ラショナルなハプテンの設計によって発現されるものと解釈される。

4. 触媒抗体の分子認識

抗体と酵素、元来この2つの蛋白質は生体内で全く異なった役割を果たすよう進化してきた。酵素の特性は効率的な触媒作用であり、抗体の特性は多種多様な物質に特異的に結合する高い認識能である。このような見地から、触媒抗体の有機合成化学への応用として位置および立体高選択的反応への展開が期待される。今日まで速度論的光学分割²⁶⁾や不斉誘導²⁷⁾などいくつかの成功例が報告されている。しかし、その高い認識能のために、触媒抗体はある1種類の基質のみの反応触媒となり、酵素のような生体触媒としての応用性が制限されている。今後の触媒抗体の展開を考えると、望んだ位置および立体選択性と同時に基質の応用性を兼ね備えた触媒抗体のデザインが切望される。このような問題点に立脚して、筆者らは独自の基質特異性と応用性に関するデザインにより、糖エステル誘導体の位置および立体選択的加水分解反応を触媒する抗体を作製した⁶⁾。本触媒抗体は他の数種の糖エステル誘導体を基質とする幅広い応用性を有する。ここでは本抗体のデザインを紹介するとともに得られた基質特異性の結果をもとに触媒抗体による分子認識について解説する。

4.1. 糖エステル誘導体の位置選択的加水分解

抗体の高い認識能を考えると、分子内に多くの同一官能基を有する糖類の位置および立体特異的反応は触媒抗体の有用性が最も発揮されるターゲットであろう。安価で容易に入手できる糖類は、天然物合成、あるいは不斉合成の際の不斉制御素子や不斉配位子の出発原料として繁用されている。糖類を基質として合成を行う際には、化学変換の拠点とするための任意の水酸基をいかにして

他の水酸基と区別するかが合成の効率を支配する重要な問題となってくる。特に糖鎖合成の場合は、多数存在する水酸基を特定するために保護脱保護の操作を繰り返さなければならず、結果的に目的物を低収率でしか得られないことが多い。糖基質中の水酸基の保護脱保護にかかる労力を軽減することができれば、糖質関連化合物の合成をより効率的なものにすることができる。このような観点から、糖基質の立体構造を認識して複数個存在するエステル結合の1つを選択的に切断する触媒抗体の創製を計画した(図11)。

Fig. 11 Regio- and stereoselective deprotection of acylated carbohydrate via catalytic antibodies.

4.2. 抗体の抗原結合様式(X線構造解析)

望んだ位置および立体選択性と同時に基質の応用性を兼ね備えた触媒抗体をどのようにしてデザインするか。その1つのアプローチとして、基質の選択性を期待する部位にだけ相互作用し、他の部分とは相互作用しない抗体を作製することを考えた。そこで、ハプテンの表面積とハプテンの抗体に結合している部分面積の関係をX線構造解析のデータから考察した(表3)。ホスホリルコリン²⁹⁾やフルオロセイン³⁰⁾などの小さなハプテンでは分子全体が抗原結合部位に覆われる。例えば、フルオロセインの場合、分子の総表面積が282 Å²であり、抗体-ハプテン複合体では分子表面積の94%の266 Å²が抗原結合部位の中に埋もれている。一方、比較的大きなハプテンでは、分子の一部が抗体によって認識される。例えば、19個のアミノ酸からなるペプチド³²⁾では分子表面積が1172 Å²であり、分子の39%が抗原結合部位と相互作用している。すなわち、抗体可変領域の6つのループ構造からなる抗原結合部位もその大きさに限りがあり、ハプテン分子の大きさを考慮することで抗体によって認識される部分と認識されない部分をデザインすることが可能になる。

4.3. 基質特異性と応用性のデザイン

以上のような考察から、免疫に用いるハプテンとしてホスホン酸エステル10をデザインした(図12)。まず、

Table 3 Contributions of antigen-combining sites to buried surface of haptens.

Hapten			Hapten in complex		Antibody
Name	M.W.	surface area (Å)	buried surface area (Å)	%	
phosphocholine	169	169	137	81	McPC603 ²⁹⁾
fluorescein	320	282	266	94	4-4-20 ³⁰⁾
progesterone	314	538	241	45	DB3 ³¹⁾
Peptide (19-AA)	836	1172	460	39	B13I2 ³²⁾
lysozyme	14000	5430	750	14	HyHEL-5 ³³⁾
neuraminidase	50000	14648	879	6	NC41 ³⁴⁾

抗体により4位エステルの加水分解反応の遷移状態を認識し、安定化するために4位にホスホン酸エステルを導入した。さらに、基質応用性の獲得のために、アルコールのエステル保護基として *N*-acetyl 4-amino phenyl-acetyl 基を用いた。抗体のX線解析から、ハプテンと抗体との結合の最大総接触面積は700~800 Å²程度であることが知られている。もし糖類のエステル保護基として汎用されているアセチル基を用いた場合、基質の溶媒可接表面積(solvent accessible surface area: ASA)は615 Å²となり、分子全体が抗原結合部位にすっぽりと埋まってしまうことになる。この場合、高い基質特異性は獲得できるものの広い応用性は期待できない。ハプテン

Fig. 12 Molecular design of catalytic antibodies.
• Specificity plus applicability

10の構造を分子力場計算(Biosym Technology Inc., Discover-CVFF)で最適化の後、ASAを計算すると分子全体では約1520 Å²であり、また10の特徴的構造である3,4位エステル基部分の溶媒可接表面積は576 Å²であった。すなわち、ハプテン10の免疫で得られる抗体の抗原結合部位は、3,4位部分構造を認識し、抗体で認識できない他の部分構造(1,2,6位)に基質の応用性が期待される。

4.4. 触媒抗体の作製

合成されたハプテン10をキャリアー蛋白質(KLH)に縮合し、これを抗原としてマウスに免疫した。常法に従ってモノクローナル抗体を作製し、12種の抗体(IgG)を大量調製、精製した。次いで、得られた抗体の基質11に対する触媒活性を検討したところ、2種の抗体に顕著な触媒活性を観測した(図13)。活性の高かった抗体17E11について速度論的考察を行ったところ、抗体17E11による加水分解反応はMichaelis-Menten型反応速度式

Fig. 13

Table 4 Regioselectivity of antibody-catalyzed hydrolysis of diester 11^a.

17E11 (μM)	diester 11 (μM)	conversion (time)	3-OH : 4-OH	
0	150	<1.0 % (60 min)	20	80
2	150	26 % (60min)	5	95
30	150	100 % (20 min)	ND	100

^aReaction condition: 10 % DMSO/ 50 mM Tris (pH 8.2)

に従い、ハプテンの添加によって阻害された。触媒抗体 17E11 は加水分解反応を 2740 倍加速した (K_m 6.6 μM, k_{cat} 0.182 min⁻¹)。

4.5. 位置および立体選択性

基質 11 の加水分解反応はそれぞれのエステル基の加水分解とともに生成物であるモノエステル体のアシル基転位を伴っている。その結果、10% DMSO/Tris(50 mM, pH 8.2)の条件下で位置異性体の 3-OH 体 12 と 4-OH 体 13 を 1 : 4 の比率で生成する。触媒抗体 17E11 (2 μM) は基質 11 (150 μM) を 60 分間で約 26% 加水分解し、3-OH 体 12 と 4-OH 体 13 を 1 : 20 の比率で生成した(表 4)。この生成比もアシル基転位の影響をうけていると考えられる。そこで、4 位エステル基の加水分解反応のみを触媒する目的で、大量の触媒抗体 (30 μM) を用いて本反応を検討したところ、反応開始後 20 分で加水分解は完全に集結し、4-OH 体 13 が優先的に生成した。3-OH 体 12 の生成は全く検出できなかった。一方、本触媒抗体は 4 位の立体異性体であるガラクトース誘導体 14 には作用しなかった。以上のことから、本抗体は高い位置選択性とともに立体選択性を示し、4 位エステル基の加水分解反応のみを触媒することが判明した。

4.6. 基質特異性の拡張

2 位置換基がハプテンの構造とは大きく異なっている

Fig. 14

トリエステル基質 15 について応用性を検討した(図 14)。基質 15 の自然分解 (50 mM Tris HCl, pH 8.2) は複雑な位置異性体の混合物を与えた (2-OH : 3-OH : 4-OH = 1.0 : 0.7 : 0.2)。一方、触媒抗体 17E11 による反応では、複雑なアシル基の転位を伴うにもかかわらず 4-OH 体が優先的に生成し、4 位エステルの加水分解を相対速度 (ν_{cat}/ν_{uncat}) として 91 倍加速した。さらに、本触媒抗体は 1 位の β 異性体 16 に対しても作用し、4 位エステル基を選択的に加水分解することが判明した。本抗体が 1 位置換基の応用性を示したことから、オリゴ糖鎖への展開が期待され、現在ジおよびトリサッカライドを基質として本抗体の触媒反応を検討中である。残念なことに、本抗体は 6 位メチルエーテル体 17 の 4 位エステル基の加水分解を触媒できなかった。

4.7. 触媒抗体 17E11 Fv 部分の分子モデリング

先の触媒抗体 6D9 と同様な手法を用いて抗体 17E11-ハプテン複合体の分子モデルを作製した(図 15)。抗原結合部位の中央部分に Trp(L33), Phe(L96) の疎水性アミノ酸残基が存在し、この 2 つのアミノ酸残基の間にフェニル環ひとつ分に相当するポケットが形成されている。先の基質特異性の結果を考慮して、4 位フェニルアセチル基をこのポケット内に包接させたと L 鎖の Arg(L90) がハプテンのホスホン酸部分と相互作用する

Fig. 15 Molecular model of the catalytic antibody 17E11-hapten complex.

ことが判明した。このことから、L鎖 Arg が遷移状態の安定化に寄与する触媒残基であると推定している。1位および2位置換基は抗原結合部位の外側に存在するためハプテン以外の官能基に変換しても分子認識には影響を与えない。一方、6位水酸基側はH鎖 Tyr(H101)からなる分子壁によって取り囲まれ、6位置換基の応用性を妨げていることが推測される。現在、分子モデリングから得られた情報をもとに、部位特異的変異操作によって触媒抗体の基質特異性の再設計を検討している。例えば、6位置換基側に存在するかさ高い Tyr を Ala に変換することにより6位側の基質特異性が広がるものと期待している。このような分子モデリング部位特異的変異の連携手法は基質特異性の変換ばかりでなく、高い触媒活性をもつ2世代目の触媒抗体構築のための重要な方法論となるであろう。

5. おわりに

冒頭で述べたように、触媒抗体の新技术は抗体のもつ多様性を巧みに利用している。しかし、その抗体の多様性は逆に触媒抗体のデザインを複雑で混沌としたものにしてしている。ほんとうにハプテンのデザインどおりに触媒抗体が誘導され、ハプテンのデザインどおりの機能で化学反応を触媒しているのであろうか。今後の触媒抗体の発展と応用を考えると、ここで紹介したように誘導された触媒抗体の分子認識や触媒機構を詳細に調べ、多様性から生じるブラックボックスを埋めていく努力が必要であろう。そのような研究がより高活性な触媒抗体のためのハプテン設計につながると確信している。

謝辞 本研究の成果は蛋白工学研究所・触媒抗体グループの共同研究者諸氏の努力の賜であり、特にプロドラッグ医薬品の活性化に関する研究においては、宮下英昭、原 智子研究員、田中富士枝博士、また糖エステル誘導体の選択的加水分解反応の研究においては、岩瀬好治博士、樹下恵子、福山史朗研究員、さらに抗体の分子モデリングにおいては中村春木博士、谷村隆次研究員の御協力に深く感謝の意を表する。

(平成6年7月26日受理)

文 献

- 1) L. Pauling, *Am. Sci.*, **36**, 51 (1948)
- 2) W. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969, p.288
- 3) A. Tramontano, K.D. Janda, R.A. Lerner, *Science*, **234**, 1566 (1986)
- 4) R.A. Lerner, S.J. Benkovic, P.G. Schultz, *ibid.*, **252**, 659 (1991)

- 5) H. Miyashita, Y. Karaki, M. Kikuchi, I. Fujii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5337 (1993)
- 6) Y. Iwabuchi, H. Miyashita, R. Tanimura, K. Kinoshita, M. Kikuchi, I. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 771 (1994)
- 7) 藤井郁雄, 蛋白質核酸酵素, **37**, 654 (1992); ファルマシア, **28**, 263 (1992); 池田昇司, K.D. Janda, 有合化, **51**, 284 (1993); 藤井郁雄, 宮下英昭, 細胞工芸, **12**, 33 (1993)
- 8) P.K. Banerjee, G.L. Amidon, *Design of Prodrugs*, ed. H. Bundgaard (Elsevier Science Publishing Company, Inc., Amsterdam), 1985, Chap 2
- 9) F.F. Hahn, *Antibiotics*, eds. D. Gottlieb, P.D. Shaw (Springer, Berlin-Heidelberg-New York), Vol.1, 1967, pp.308-330
- 10) R.R. Traut, R.E. Monro, *J. Mol. Biol.*, **10**, 63 (1964)
- 11) W.V. Shaw, J. Unowsky, *J. Bacteriol.*, **95**, 1976 (1968)
- 12) O. Jardetzky, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2498 (1963)
- 13) G. Kohler, C. Milstein, *Nature*, **256**, 495 (1975)
- 14) E.C. Herrmann, J. Gabliks, C. Engle, P.L. Perlman, *Proc. Soc. Expt. Biol. and Med.*, **103**, 625 (1960)
- 15) F.G. Priest, *Bacteriol. Rev.*, **41**, 711 (1977)
- 16) J.W. Jacobs, *Bio/Technology*, **9**, 258 (1991)
- 17) A. Nisonoff, *Introduction of Molecular Immunology*, Second Ed. (Sinauer Associate, Inc., Sunderland, MA), 1984, Chapter 5
- 18) C. Chothia, A.M. Lesk, *J. Mol. Biol.*, **196**, 901 (1987)
- 19) A.C.R. Martin, J.C. Cheetham, A.R. Rees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9268 (1989)
- 20) H. Miyashita, T. Hara, R. Tanimura, F. Tanaka, M. Kikuchi, I. Fujii, *ibid.*, **91**, 6045 (1994)
- 21) S. Rath, C.M. Stanley, M.W. Steward, *J. Immun. Methods*, **106**, 245 (1988)
- 22) N. Saitou, M. Nei, *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406 (1987)
- 23) E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, C. Foeller, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed. (U.S. Public Health Serv., Natl. Inst. Health, Bethesda, MD), (1991)
- 24) A. Nisonoff, *Introduction of Molecular Immunology*, Second Ed. (Sinauer Associate, Inc., Sunderland, MA), 1984, Chapter 10
- 25) J. Schilling, B. Clevinger, J.M. Davie, H.G. Kunkel, *Nature*, **283**, 35 (1980); P.J. Gearhart, N.D. Johnson, R. Douglas, L. Hood, *ibid.*, **291**, 29 (1980); W. D. Bedzyk, L. S. Johnson, G. S. Riordan, E.W. Voss, Jr., *J. Biol. Chem.* **264**, 1565 (1989); W. D. Bedzyk, J. N. Herron, A. B. Edmundson, E.W. Voss, Jr., *ibid.*, **265**, 133 (1990)

- 26) K.D. Janda, S.J. Benkovic, R.A. Lerner, *Science*, **244**, 437 (1989)
- 27) I. Fujii, K.D. Janda, R.A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8528 (1991)
- 28) R.R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 212 (1986) and references therein.
- 29) E.A. Padlan, G.H. Cohen, D.R. Davis, *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, **136 C**, 259 (1985)
- 30) J.N. Herron, X.-M. He, M.L. Mason, E.W. Voss, Jr., A.B. Edmundson, *Proteins*, **5**, 271 (1989)
- 31) J.H. Arevalo, M.J. Taussig, I.A. Wilson, *Nature*, **365**, 859 (1993)
- 32) R.L. Stanfield, T.M. Fieser, R.A. Lerner, I.A. Wilson, *Science*, **248**, 712 (1990)
- 33) S. Sheriff, E.W. Silvertown, E.A. Padlan, G.H. Cohen, S.J. Smith-Gill, B.C. Fazel, D.R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8075 (1987)
- 34) W.R. Turip, J.N. Varghese, R.G. Webster, G.M. Air, W.G. Laver, P.M. Colman, *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, **54**, 257 (1989)

第52巻第11号予定

巻頭言

Preface to the First English Issue of Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi

(*J. Synth. Org. Chem., Jpn.*) 森 謙治

総合論文

Total Synthesis of (+)-Leinamycin	福山 透ら
MOP: A Monodentate Chiral Phosphine Ligand for Catalytic Asymmetric Reactions	林 民生
Designer Lewis Acids for Selective Organic Synthesis	山本 尚ら
Organic Reactions in Crystal	戸田 美三夫
Synthetic Chemistry of Cyclopropanone Acetals. Penitricin and Buckminsterfullerene	中村 栄一
Computer-Aided Conformational Design on Macrolide Synthesis	米光 幸
Asymmetric Heck Reaction: Catalytic Asymmetric Syntheses of Bioactive Molecules	柴崎 正勝ら
Sugar Acetylene for New Stereocontrolled Synthesis	磯部 稔
Neocarzinostatin Complex: Molecular Recognition and Chromophore Analogs	平間 正博
Catalytic Addition of C-H Bonds to Multiple Bonds. The First Stage	村井 眞二

REVINDEX, 新しい合成ほか