

学 位 論 文 題 名

触媒抗体の作製，およびその触媒反応の解析：

基質およびハプテンの構造が触媒活性に及ぼす影響に関する研究

学位論文内容の要旨

物質を特異的に認識し結合する抗体に、化学反応を触媒する酵素様の活性を付与したのが「触媒抗体」である。従来の人工酵素の限界がはっきりと認識されてきているだけに、触媒抗体は「テーラーメイドの人工触媒」として有機化学のみならず生命工学や医学を含む広い分野への応用が期待されている。本研究の目的は、高活性で且つ汎用性のある触媒抗体の作成を実現するために、触媒抗体とハプテンもしくは基質との相互作用を分子レベルで理解することにある。本論文では、触媒抗体の作成、スクリーニングおよび触媒能の評価、解析を通じて、触媒抗体の分子認識および触媒機構について考察する。以下に要旨を纏める。

1. パラニトロフェニルフォスフォネートをハプテンとして免疫することによって、カーボネート基質を加水分解する触媒抗体を作製した。得られた3種類の触媒抗体と触媒能を持たない抗体群を比較した場合、ハプテンに対する結合能に全く違いは見られなかった。しかしハプテンの部分構造を有する誘導体を用いて抗体の認識能について解析したところ、触媒抗体と非触媒抗体に予測しなかった認識特異性が見られた。この結果は触媒機能の発現メカニズムを考える上で重要と考えられる。加えて、3種の触媒抗体のうち1つの触媒抗体（4A1抗体）は他の触媒抗体には見られない結合特異性を有することが示された。

2. 4A1触媒抗体はハプテンとは異なる嵩高い置換基を有する基質をハプテン構造に最も類似した基質の20倍も大きく加速した。速度論及び熱力学的解析より、4A1抗体が反応の遷移状態を選択的に安定化したために触媒反応が加速したものと推察された。更に、この4A1抗体が2種の光学異性体のうちS体の基質を選択的に触媒することが明ら

かとなり、不斉中心をもたないハプテンの免疫によっても抗体が基質を不斉認識しうることが示された。

3. 4A1抗体が触媒する加水分解反応において、ある基質は添加直後に速い生成物の遊離が認められたが、すぐにその遊離速度に低下が見られ反応が停止した。遊離した生成物の速度論および ^{13}C -NMRの解析結果より、この触媒能の喪失は基質が抗体をアシル化し安定なアシル反応中間体を生成したことに起因することが明らかとなった。このことは4A1抗体によるカーボネートの加水分解反応がアシル化中間体を経る多段階触媒反応をとることを示唆する。

4. 触媒抗体が多段階触媒反応をとる場合、遷移状態の安定化だけでは高いターンオーバーを得ることは難しいが、キャリアー蛋白の連結部分に嵩高い置換基を導入した基質に顕著なターンオーバーが見られた。1回しかターンオーバーしない基質と比較すると、どちらの場合もその初速度は有意に高く、ターンオーバーに見られる差は水酸イオンによる脱アシル化の反応速度の違いに起因すると思われた。一般にキャリアー蛋白への連結部位は触媒活性に与える影響が低いと言われていたが、我々が得た結果はこの部位の改変が反応収率を決定するターンオーバーに顕著な効果を及ぼすことを示した。

触媒として抗体を用いる意義はその多様な認識特異性を利用できることにある。しかしこの研究で示されたように、ハプテンあるいは基質に対する触媒抗体の認識特異性は未だ十分に理解されているとはいえない。1から4の結果は触媒抗体の分子認識および触媒機構について重要な知見を与え、今後の有用な触媒抗体の作成に役立つと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 丸 岡 啓 二

副 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 菊 池 九 二 三

学 位 論 文 題 名

触媒抗体の作製，およびその触媒反応の解析：

基質およびハプテンの構造が触媒活性に及ぼす影響に関する研究

物質を特異的に認識し結合する抗体に、化学反応を触媒する酵素様の活性を付与したのが「触媒抗体」である。触媒抗体は「テーラーメイドの人工触媒」として広い分野への応用が期待されている。本研究の目的は、高活性で且つ汎用性のある触媒抗体の作成を実現するために、触媒抗体とハプテンもしくは基質との相互作用を分子レベルで理解することにある。本論文では、触媒抗体の作成、スクリーニングおよび触媒能の評価、解析の結果について述べられている。本論文の要旨は以下の4点である。

1. パラニトロフェニルフォスフォネートをハプテンとして免疫することによって、カーボネート基質を加水分解する触媒抗体を作製した。得られた3種類の触媒抗体と触媒能を持たない抗体群を比較した場合、ハプテンに対する結合能に全く違いは見られなかった。しかしハプテンの部分構造を有する誘導体を用いて抗体の認識能について解析したところ、触媒抗体と非触媒抗体に予測しなかった認識特異性が見られた。この結果は触媒機能の発現メカニズムを考える上で重要である。加えて、3種の触媒抗体のうち1つの触媒抗体（4A1抗体）は他の触媒抗体には見られない結合特異性を有することがわかった。

2. 4A1触媒抗体はハプテンとは異なる嵩高い置換基を有する基質をハプテン構造に最も類似した基質の20倍も大きく加速した。速度論及び熱力学的解析より、4A1抗体が反応の遷移状態を選択的に安定化したために触媒反応が加速したものと推察された。更に、この4A1抗体が2

種の光学異性体のうちS体の基質を選択的に触媒することが明らかとなり、不斉中心をもたないハプテンの免疫によっても抗体が基質を不斉認識しうることが示された。

3. 4A1抗体が触媒する加水分解反応において、ある基質は添加直後に速い生成物の遊離が認められたが、すぐにその遊離速度に低下が見られ反応が停止した。遊離した生成物の速度論および ^{13}C -NMRの解析結果より、この触媒能の喪失は基質が抗体をアシル化し安定なアシル反応中間体を生成したことに起因することが明らかとなった。このことは4A1抗体によるカーボネートの加水分解反応がアシル化中間体を経る多段階触媒反応をとることを示唆した。

4. 触媒抗体が多段階触媒反応をとる場合、遷移状態の安定化だけでは高いターンオーバーを得ることは難しいが、キャリアー蛋白の連結部分に嵩高い置換基を導入した基質に顕著なターンオーバーが見られた。1回しかターンオーバーしない基質と比較すると、どちらの場合もその初速度は有意に高く、ターンオーバーに見られる差は水酸イオンによる脱アシル化の反応速度の違いに起因すると考えられる。一般にキャリアー蛋白への連結部位は触媒活性に与える影響が低いと言われていたが、この結果はこの部位の改変がターンオーバー数に顕著な影響を及ぼすことを示した。

以上、申請者は1 触媒抗体のユニークな分子認識およびその効率的な触媒機構を明らかにした。これらの成果はハプテン及び基質の設計に重要な知見を与え、今後の有用な触媒抗体の作成に役立つと考えられる。審査員一同は、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。