触媒機能を有する抗体タンパク質

TSUMURAYA Takeshi 円谷 健 大阪府立大学大学院理学系研究科 助手

天然の酵素分子が、化学反応において遷移状態の基質分子と結合することによって触媒機能を発揮しているように、化学的に安定な遷移状態アナログを抗原として得られる抗体タンパク質は、遷移状態の基質分子と結合することにより安定化し、触媒機能を獲得するようになる。このような触媒機能を有する抗体タンパク質を抗体酵素 (Catalytic Antibody)とよぶ。ヒトやマウスの体内には 10¹² 種類の膨大な抗体のレパートリーが備わっているため、この方法を使うことによりテーラーメイドな触媒分子の設計が可能となる。ここでは、抗体酵素の作製原理、作製方法、実際の応用例について解説する。

1 はじめに

生体内には、 もともと特定の化合物を特異的に認識し、 強く結合するタンパク質が備わっている。すなわち、免疫 応答によってもたらされる抗体である。ヒトやマウスの体 内には $10^8 \sim 10^{12}$ 種類にもおよぶ反応性の異なる抗体が備 わっているので、原理的にはほとんど全ての外来物質に対 する抗体タンパク質が作製されることになる。これまでの 免疫学は、免疫応答の調節機構や抗原抗体反応の分子認識 をその研究対象にしてきた。ところが、ここ20年ほどの 間に免疫学は、有機化学との学際領域に全く新しい研究分 野を展開し始めている。天然の酵素分子が化学反応におい て遷移状態の基質分子と結合し、安定化することによって 触媒機能を発揮しているように、化学的に安定な遷移状態 アナログを抗原として得られる抗体タンパク質は、天然酵 素と同様に遷移状態の基質分子に結合して安定化し、反応 を加速するようになる。このような触媒機能を有する抗体 タンパク質を「抗体酵素」(Catalytic Antibody)とよぶ 1),2)。 先にも述べたように、ヒトやマウスの体内には膨大な種類 の抗体レパートリーが備わっているため、適切な遷移状態 アナログを設計することにより、自由自在に希望する反応 を触媒することができる抗体タンパク質、つまりテーラー メイドの抗体酵素を創り出すことが可能となる。特に、従 来の化学触媒や天然酵素では達成できない反応性や特異性 を自由自在に設計可能な抗体酵素は、有機合成化学の新し い触媒試薬として、また、生命工学や医学、環境科学をふ くめた様々な分野でその応用が期待されている。本稿では、 抗体酵素の基本的な作製原理、作製方法、および実際の応 用例について解説したい。

2 抗体タンパク質の構造

抗体タンパク質は4本のポリペプチド鎖からなり、免疫グロブリン(Ig)と呼ばれる。免疫グロブリンは5種類のタイプに分けられるが、ここでは最も典型的な IgG を例にとり、その基本的な構造について解説する。

抗体タンパク質は図1に示すように2本の軽鎖(L 鎖)および重鎖(H 鎖)からなり、その全体の形はしばしば Y 字型で表される。およそ 100 アミノ酸残基からなる構造単位 (ドメイン) は、イムノグロブリンホールドと呼ばれるほとんど同じ立体構造をしている。アミノ末端側のドメイン に特にアミノ酸配列の変化に富むドメインがあり、これを可変領域(F_V)と呼び、H 鎖可変領域を V_H , L 鎖可変領域を V_L という。それ以外のドメインはほとんどの抗体で同じアミノ酸配列を持つことから、定常領域(C_H1,C_H2,C_H3 および C_L)と呼ばれている。

抗体タンパク質をパパインと呼ばれるタンパク質分解酵素で処理すると3つの断片に分けることができる。そのうち2つは全く同じ分子種で、抗原結合部位を持っていることから F_{ab} (fragment antigen binding) と呼び、また、もう1つは F_{c} (fragment crystallization)と呼ばれる。

可変領域の全域にわたってアミノ酸配列の多様性が分布しているわけではなく、ほとんどは抗体間でよく保存されている。多様性に富む領域は V_H で3カ所 V_L で3カ所の合計6カ所あり、これを超可変領域と呼ぶ。保存されている領域はドメインの構造を支える β シート構造を形成しており、フレームワーク領域と呼ばれている。一方、超可変領域はこの β シートに隣接してループ構造をとり、6本のループ構造により抗原に相補的な結合部位を形成することか

ら相補性決定領域(CDR)と呼ばれる。

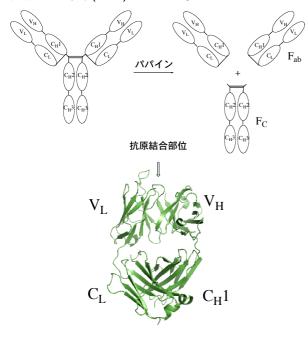


図1 抗体タンパク質の構造。抗体の構造の模式図 (上) および抗体の結晶解析の例(下)。

3 多様な抗体タンパク質ができる仕組み

免疫系は、外から侵入してくる抗原に応答し、高い親和性と特異性をあわせもつ抗体タンパク質を産生する。侵入してくる抗原は、多種多様なものであるから、それら全てに対応するには特別な抗体産生のメカニズムが必要である。

抗体タンパク質の多様性は、抗体の抗原結合部位をコー ドする遺伝子セグメント (H鎖: V_H,D,J_H遺伝子群, L,鎖: $V_{x}J_{x}$ 遺伝子群)の組み合わせにより生ずる(図2)。マウ スの場合, V₄遺伝子群は 100 個以上の遺伝子があり, D 遺伝子は約 15 個, Jн遺伝子は 5 個存在する。また、L 鎖 を形成する V.遺伝子群は 200~300 個, J.遺伝子群は 5 個 の遺伝子からなる。これらの遺伝子が、B 細胞が骨髄中の 幹細胞から成熟 B 細胞に分化・成熟する過程で再編成さ れる。このような仕組みで生じた特異性の異なる抗体タン パク質(10⁸ 種類)は、B 細胞表面に提示され、外来抗原の 侵入に備えている。第1免疫応答(1次抗原応答)では、 抗原に親和性のある抗体を提示している B 細胞が形質細 胞あるいは記憶細胞へと分化・増殖を始める。この増殖の 過程で体細胞高頻度変異の結果、あるものは抗原との親和 性が低下し、また、あるものは抗原との親和性が向上する。 そこで、第2、第3免疫に応答して、親和性のより高い抗 体を提示している B 細胞が選択され、分化・増殖する。 この過程をアフィニティーマチュレーションと呼ぶ。

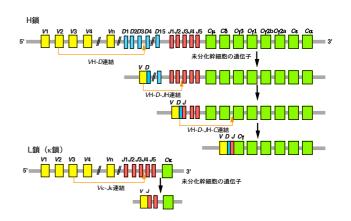


図2 抗体遺伝子の再編成による多様性の発生。抗体 タンパク質の多様性は、抗体の抗原結合部位をコード する遺伝子セグメントの組み合わせにより生ずる。

4 抗体を酵素にする:抗体酵素

4.1 遷移状態の安定化

酵素は数多くの分子の混合物の中から望みの化合物を見つけ出し、その分子の化学反応を数億倍も加速することができる。酵素のような効率的かつ特異的な触媒分子を自由自在に創り上げていくことは、化学を志すものの永年の夢である。酵素は酸-塩基触媒や金属触媒などを使って化学反応を効率よく触媒しているが、もっとも大きな特徴は、遷移状態の基質分子と特異的に結合し、安定化することに

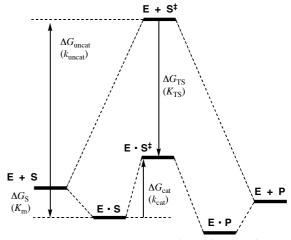


図3 酵素触媒反応と非触媒反応の自由エネルギー変化。化学反応は高エネルギーの遷移状態を経て進行し、生成物(P)を与える。基質が基底状態(S)から遷移状態(S^{\dagger})になるためには、高い活性化エネルギーが(ΔG_{uuxal})が必要である。一方、酵素触媒反応では、酵素(E)が遷移状態(S^{\dagger})の基質分子に結合し、安定化(ΔG_{rs})することによって反応の活性化エネルギー(ΔG_{cal})を減少させ化学反応を促進する。また、基質の基底状態(S)とは弱く結合(ΔG_{s})して、活性化エネルギー(ΔG_{cal})をより減少させている。言い換えれば、酵素は遷移状態への親和性(K_{rs})と基底状態への親和性(K_{rs})と基底状態への親和性(K_{rs})との差を最大にすることによって触媒活性を最大にする。

よって反応を加速させているということである(図3)。

遷移状態において化学結合が一方では形成されつつあり, また他方では切断されつつあるエネルギー状態の高い極め て不安定な状態である。化学反応の起こりやすさは、遷移 状態のエネルギーと基底状態のエネルギー差、すなわち活 性化エネルギーの大きさによってきまる。酵素は、遷移状 態の基質分子と結合することによって、活性化エネルギー を減少させて、化学反応を加速する。抗体酵素の触媒作用 も、酵素と同様に反応の遷移状態の基質分子を安定化する という事に基づいている。すなわち、抗体酵素を得るため には、遷移状態の基質分子に結合する抗体を作製すればよ いことになる。しかしながら、遷移状態の分子は非常に不 安定な化学種であるため、これを合成したり、ましてや免 疫することはとうてい出来ない。そこで、反応の遷移状態 と立体的かつ電子的によく似た安定な化合物、すなわち「遷 移状態アナログ」を合成し、免疫する。このようにして得 られた遷移状態アナログに結合する抗体は、遷移状態の基 質分子とも結合し、化学反応を触媒するようになる。

4. 2 抗体酵素の作製

実際に、どのようにして抗体酵素を作製するのかについて、エステルの加水分解反応を例にとり、説明する(図4)。

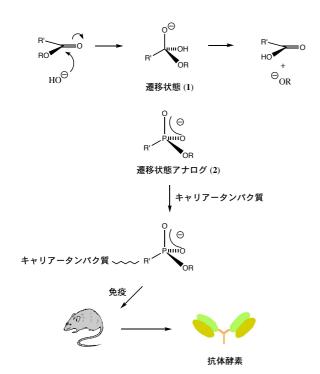


図4 抗体酵素の作製。

エステルの加水分解反応は、カルボニル基の酸素原子上に負の電荷をもつ高エネルギーな四面体遷移状態(1)を経て進行する。この遷移状態(1)によく似た安定な化合物としてリン酸エステル誘導体(2)が遷移状態アナログとして使われる。リン酸エステル(2)は以下の点で遷移状態アナログとして適切であると考えられている。(i) 負の電荷を持つ。(ii)正四面体構造である。 (iii)P-O 結合は、C-O 結合

に比べ長い。従って、リン酸エステル(2)を免疫してモノ クローナル抗体を作製すればいいわけだが、このような低 分子化合物は通常免疫応答を起こすことができない。そこ で、リン酸エステル(2)をキャリアータンパク質と結合さ せ、これを抗原としてマウスに接種し、免疫応答を誘導す る。その後、3~4回の接種をくりかえしたのち、脾臓を 摘出し、ミエローマ細胞*1と融合して、抗体を産生するハ イブリドーマを作製する(図5)。ハイブリドーマの中か ら、目的とする抗体を産生するハイブリドーマを ELISA*2 法により選択し、その後クローニングという操作を経てモ ノクローンとする。抗体は、ハイブリドーマを大量培養し た上清からアフィニティークロマトグラフィー等により精 製して得られる。実際に、リン酸エステル(2)を免疫する ことによって得られる抗体は、反応の活性化自由エネルギ ーを減少させ、加水分解反応を加速する。 現在、エステル 加水分解の遷移状態(1)のアナログとしてリン酸エステル (2)を免疫することによって、数多くのエステル加水分解 を触媒する抗体酵素の作製が行われている。

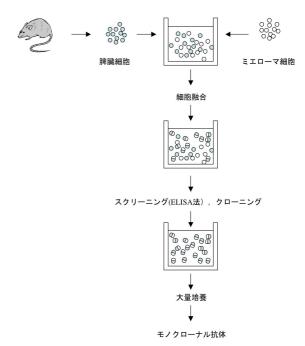


図5 モノクローナル抗体の作製法。抗体産生細胞である脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを融合すると両方の性質を持ったハイブリドーマができる。すなわち、ハイブリドーマは、抗体を産生し、かつ、永遠に増殖する性質を持っている。この中から、目的の抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、モノクローンとする。

5 抗体酵素の実際

5.1 医薬品への応用

抗体酵素を利用したプロドラッグ医薬品を特異的に活性 化する生体触媒の作製が検討されている(図6)。プロド ラッグとは、医薬品の物性の改善や毒性軽減を目的として 化学修飾された化合物であり、それ自体は薬理活性を示さないが、投与後に生体の酵素や pH の変化によりもとの医薬品 (親ドラッグ) に変換されて薬理活性を発揮するものである。もし、生体内の天然酵素に対して安定なプロドラッグをテーラーメイドな抗体酵素で活性化できれば、病巣特異的なドラッグデリバリーが可能となり、抗体酵素の応用として特に期待されている。プロドラッグであるエステル(3)の加水分解反応の遷移状態アナログであるリン酸エステル(4)を合成し、これをマウスに免疫することにより、プロドラッグ(3)を活性化する抗体酵素が作製され、X 線結晶解析を含めた触媒機構の詳細が検討されている。

が体酵素
$$O_2N$$
 O_1 O_2N O_3N O_4 O_4 O_5N O_5N O_4 O_5N O_5N

図6 抗体酵素によるプロドラッグの活性化。

5.2 化学反応選択性の制御

抗体酵素は基質分子に特異的な分子認識場を創ることができるため、従来の化学では不可能と考えられる反応を進行させることが出来る。その例を図7に示した。ボールドウィン則 2 に従えば、基質5の環化反応は、5員環生成物7を生ずるはずである。しかしながら、遷移状態ア

ナログ 8 の免疫により得られた抗体酵素 26D4 は6 員環生

遷移状態アナログ(8)

図7 抗体酵素による化学反応選択性の制御。 成物 6 を与える。その他、様々な反応において抗体酵素 の分子認識場を利用することにより,通常の反応では進行 しないような反応を進行させられることが示されている。

6 おわりに

1986 年に最初の抗体酵素が報告されてから、今日までのおよそ20年の間に数多くの抗体酵素が作製され、いろいろな化学反応が抗体によって触媒可能であることが明らかとなった。また、最近ではX線結晶解析を初めとして、抗体酵素の触媒機構の実体も明らかにされている。これらの結果は、酵素の触媒機構を説明するうえでも、重要な知見を与えている。さらに、応用面へ目を向けてみると、実際に有機合成の1ステップとして抗体酵素反応が使われた例もあらわれてきている。現在、抗体酵素の研究は、基礎的な抗体酵素の実体に関する研究と応用面での研究の両面から進められている。今後、このような研究を基盤として抗体酵素がより確実な物資変換の技術として確立されることを切望している。

参考文献

- 1)藤井 郁雄, 化学と工業,第50巻,第7号,996(1997).
- 2) Ehud Keinan (Ed.), Catalytic Antibodies, Wiley-VCH (2005).

用語解説

- *1 多発性骨髄腫瘍細胞の一種で、免疫した動物から調製した抗体産生細胞 (脾臓細胞やリンパ節細胞) との細胞融合により抗体産生ハイブリドーマ を作製することができる。
- *2 Enzye-linked immunosorbent assay (酵素免疫測定法) の略。抗体に結合した酵素の反応で抗原を定量しようと開発された方法。
- *3 立体電子的効果の考察に基づいた、環化反応の起こりやすさに関する一般則。



つむらや・たけし

著者紹介 [経歷] 1990 年筑波大学大学院博士課程化学研究科化学専攻修了(理学博士), 1990 年マサチューセッツ工科大学化学科博士研究員, 1992 年花王基礎科学研究所主任研究員, 1997 年生物分子工学研究所主任研究員, 2003 年生物分子工学研究所主席研究員, 2003 年大

阪府立大学先端科学研究所助手,2005年より現職。[専門]生物有機化学,タンパク質工学,ペプチド化学。[趣味]釣り。[連絡先]599-8570大阪府堺市学園町1-2 (勤務先)