

氏 名	澤 匡 明
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1003 号
学位授与の日付	平成 10 年 5 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on the Generation of Catalytic Antibodies for Chemiluminescence and Glycoside Hydrolysis (化学発光及びグリコシド結合加水分解を触媒する抗体触媒の作製に関する研究)
	(主査)
論文調査委員	教 授 小 田 順 一 教 授 岩 村 俣 教 授 上 野 民 夫

論 文 内 容 の 要 旨

触媒活性をもった抗体すなわち抗体触媒は、酵素にかわる新しいテラーメイドの人工触媒として注目されており、あらゆる分野での応用が期待されている。本論文は、抗体触媒の高い基質特異性に注目し、分析分野への応用を目的として、化学発光および糖加水分解を触媒するモノクローナル抗体の作製研究についての成果をまとめたものである。

第1章では、抗体触媒の概念や、これまでに報告されている抗体触媒の例からその特徴や問題点などを論じることにより、本論文における研究の目的および意義について述べている。

第2章では、化学発光を触媒する抗体の作製を行った結果について述べている。化学発光反応には、直接および間接化学発光の2種類の形式の反応があり、本章では、この2つの形式の化学発光を触媒するモノクローナル抗体の作製についてそれぞれ研究を行っている。まず、直接化学発光を触媒する抗体を得るために、新しい発光性基質、アデマンチルフェニルジオキセタン誘導体を設計し、その合成に成功している。この発光性基質は、フェノール性水酸基の保護基を β 脱離によって脱保護することにより、化学発光を制御できるように設計されている。つぎにこの基質の保護基の β 脱離反応を触媒する抗体を誘導するため、抗原(ハプテン)の設計を行っている。このハプテンは次の3つの特徴を持った構造になっている。第1に、基質の保護基のプロトンを引き抜くため、負電荷を帯びた塩基性残基を抗体内部に誘導するよう、陽電荷を帯びたアミノ基を有している。第2に、 β 脱離の際に、基質の保護基をエネルギー的に有利なアンチ脱離の立体配座に固定するため、固定された二環性のトロパン骨格を有している。最後に、大きなアデマンチル部分を模倣するためのピペリジノ基を有している。こうして設計された立体構造について、基質とハプテンの安定構造を分子軌道計算で求め、両構造がよく似ていることを確認している。このハプテンを全13工程で合成し、合成したハプテンを用いてマウスを免疫し、40種類のモノクローナル抗体の誘導に成功した。得られた抗体について、化学発光を指標としたアッセイを用いて活性の検討を行ったが、上記の脱保護反応を触媒し、化学発光を開始させる抗体は見いだせなかった。しかし、第3章でグリコシダーゼ活性を指標としたスクリーニングを実施し、グリコシド結合を切断する活性をもった抗体を見いだしている。

つぎに、アリアルシュウ酸エステルの加過酸化水素分解を触媒し、その励起生成物からの励起エネルギーを抗体内部にある発光団(トリプトファン等)が受け取り発光する間接化学発光をめざし、抗体触媒の作製を行っている。まず、間接化学発光を示す基質として、ビス(o-ニトロフェニル)シュウ酸エステルの合成を行っている。次に、この加過酸化水素分解反応の遷移状態アナログとして、ホスホン酸を分子内に有するハプテンを7工程で合成し、このハプテンを用いて、46種類のモノクローナル抗体の誘導に成功している。得られた抗体について、化学発光を指標としたアッセイ法を用いて活性の検討を行ったが、目的の間接化学発光を触媒する抗体は見いだせなかった。

第3章では、多糖を配列特異的に加水分解する触媒の開発をめざし、第2章で得られた抗体について、グリコシド結合の

加水分解活性の検討を行っている。第2章で設計したトロパン骨格をもつハプテンはグリコシド結合の加水分解における遷移状態にもきわめて類似している。そこで、トロパン骨格を有するハプテンを用いて誘導した40種類のモノクローナル抗体について、ガラクトース誘導体の加水分解反応を指標としたスクリーニングを行ったところ、2種類の抗体が加水分解活性をもつことが判明した。このうちの1種類、18D5について、その反応のpH依存性を検討したところ、pHが酸性になるほど、その活性は上昇した。これらの結果から、反応は特殊酸触媒作用で進行し、抗体は反応の途中に生じる遷移状態の安定化に寄与しているものと示唆された。

第4章では、本研究において得られた結果のまとめが述べられている。

論文審査の結果の要旨

これまで、有機化学者は、複雑な分子の合成や修飾を行うのに効率的で高選択性を有する人工触媒の開発に多大の努力を払ってきた。近年、触媒活性をもつ抗体（抗体触媒）が報告され、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。しかし、今日まで100種類以上の抗体触媒が報告されているにもかかわらず、その触媒活性の低さゆえに、実用化されている例はごく僅かしかない。本論文は、こういった背景をふまえて、抗体触媒を有機合成のような物質生産への応用ではなく、抗体の高い選択性を生かした分析分野への応用の研究成果を取りまとめたものであり、評価すべき点は次の通りである。

1. 直接化学発光を示し、その発光反応を β 脱離機構による保護基の切断で制御できる新規な発光性基質を設計し、その合成に成功した。この発光性基質の保護基を切断する反応を触媒する抗体を得るために、抗原となるハプテンを設計し、合成に成功している。このハプテンの設計に当たり、基質の保護基を β 脱離の際にエネルギー的に有利なアンチ脱離の立体配座に固定するという新しい発想を取り入れている。このハプテンを用いて、40種類の抗体の誘導に成功した。

2. 間接化学発光を示す化合物として、ビス(o-ニトロフェニル)シユウ酸エステルを合成した。この化合物は過酸化水素と反応して、励起生成物を生じ、共存する蛍光物質にエネルギーを転移し、その励起された蛍光物質が発光するという間接化学発光を示す。本論文では、抗体触媒が、この基質と過酸化水素との反応を触媒し、その上、触媒である抗体自身が蛍光物質の役割をかねて発光するという、全く新しい発想を提案している。この抗体触媒を得るために反応の遷移状態をホスホン酸で模倣したハプテンを設計し、その合成に成功した。このハプテンを用いて、46種類の抗体の誘導に成功した。

3. 直接化学発光を触媒する抗体を得るために設計したハプテンが糖の加水分解の遷移状態にも類似していることに着目し、すでに得られている抗体について再度、糖加水分解活性測定を行い、グリコシダーゼ活性を有する抗体触媒を見いだした。これまで、数多くの抗体触媒が報告されているにもかかわらず、糖の加水分解を触媒する抗体の例はわずかに4例だけであり、その活性は非常に低い。よって、本論文の結果は、グリコシダーゼ活性を有する抗体触媒を創造するために必要なハプテンの設計論として一般的に適用可能であり、特に重要な成果といえる。

以上のように、本論文は、抗体触媒を化学発光と組み合わせて高感度な分析に応用しようとする全く新しい着想や、糖の加水分解抗体触媒を誘導するためのハプテン設計における新しい方法論など、今後の抗体触媒の分野において、新たな指針を示した。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成10年3月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。