Osaka University Knowledge Archive

Title	エステル加水分解活性を有する触媒抗体の作製およびその構造と機能に関する研究
Author(s)	宮下, 英昭
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42974
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 72 】

氏　　名	宮下英昭（みやしたひであき）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学位記番号	第　14936　号
学位授与年月日	平成11年9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**エステル加水分解活性を有する触媒抗体の作製およびその構造と機能に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授 関　達治 （副査） 教授 卜部　格　教授 金谷 茂則　教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

本論文は触媒抗体技術の応用化を目的としてクロラムフェニコールまたは糖における反応に関与する触媒抗体を作製し、さらに得られた触媒抗体の構造と機能に関する基礎的な知見を得るため、生化学的および分子生物学的技術を用いて解析を行った研究成果をまとめたもので、以下の6章から構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の背景、目的、概要について述べている。

第2章では、医薬品に関与する触媒抗体の作製について述べている。クロラムフェニコールプロドラッグのエステル加水分解における遷移状態アナログを作製し、それをハプテンとしてモノクローナル抗体を作製することにより得られた抗体がクロラムフェニコールプロドラッグをクロラムフェニコールに変換する反応を有することを示している。

第3章では、触媒抗体技術の糖鎖合成への応用を目的として、糖基質の4位エステル結合のみを選択的に切断（脱保護）する触媒抗体を作製したことについて述べている。抗体の抗原結合部位とハプテンとの結合の最大総接触面積を考慮してハプテンを合成し、モノクローナル抗体を作製した結果、得られた抗体17E11は糖基質の4位エステル結合のみを選択的に加水分解することができ、また種々の糖基質誘導体に対する反応性から基質の1位、2位部分は抗体17E11の抗原結合部位から外へ出ていると考えられ、種々のオリゴ糖鎖への応用展開（基質特異性の拡張）の可能性を示唆している。

第4章では、クロラムフェニコールプロドラッグ活性化を行う触媒抗体を作製する際に得られた複数の触媒抗体と結合活性のみの触媒抗体のアミノ酸一次配列を調べ、一つのハプテンから得られる抗体は多様性に富んでいるが、触媒活性を持つ抗体は相同性の高い配列であるということを示している。

第5章では、クロラムフェニコールプロドラッグ活性化を行う触媒抗体6D9の構造と機能に関する基礎的な知見を得るため、生化学的および分子生物学的技術を用いて解析を行ったことについて述べている。アミノ酸一次配列の比較、アミノ酸残基の特異的化学修飾、分子モデリングおよび部位特異的突然変異の導入によりL鎖27dのヒスチジンが触媒に関与する重要なアミノ酸残基であることを明らかにしている。

第6章は総合考察および要約であり、本研究で得られた成果を総括するとともに、今後の展望について述べている。

論文審査の結果の要旨

生体内で異物に結合する役割を持つ抗体に触媒活性を持たせた触媒抗体は最初に報告(1986年)されてから様々な研究が行われたが、実用化を見越した研究および触媒抗体の構造機能相関といった蛋白工学的な研究はほとんど行われていない。触媒抗体は化学合成反応や酵素反応では成しえない反応を触媒することができ、医学、薬学、工学の様々な分野での応用化が期待されるとともに、タンパク質の構造機能相関の解明という基礎的な問題に対する最適な研究材料であると考えられる。本論文は触媒抗体技術の応用化を目的としてクロラムフェニコールまたは糖における反応に関与する触媒抗体を作製し、さらに得られた触媒抗体の構造と機能に関する基礎的な知見を得るため、生化学的および分子生物学的技術を用いて解析を行った一連の研究成果をまとめたもので、主な成果は以下のとおりである。

(1)医薬品に関与する触媒抗体の作製が可能であることを初めて示し、プロドラッグの活性化が触媒抗体技術の医薬品への実用化に適していることを示している。また、基質と生成物の構造変化に着目し、触媒抗体の問題点である生成物阻害が克服できることを明らかにしている。

(2)糖鎖合成技術では、必要とする水酸基の遊離のために種々の保獲基をその特性に応じて使い分け、保護-脱保獲の操作を繰り返すといった多大な労力が費やされるが、本研究の結果は触媒抗体による効率的な水酸基遊離の可能性を示している。また、抗体の抗原結合部位とハプテンとの結合の最大総接触面積を考慮してハプテンを合成することにより、基質特異性が拡張できることを示している。

(3)一つのハプテンから得られた複数の触媒抗体と結合活性のみの触媒抗体のアミノ酸一次配列を調べ、一つのハプテンから得られる抗体は多様性に富んでいるが、その中において触媒活性を持つ抗体は相同性の高い配列であるということを明らかにしている。

(4)得られた触媒抗体の機能に関与するアミノ酸を同定するため、アミノ酸一次配列の比較、アミノ酸残基の特異的化学修飾、分子モデリングおよび部位特異的突然変異の導入といった生化学的および分子生物学的技術を用い、触媒に関与する重要なアミノ酸残基がL鎖27dのヒスチジンであることを明らかにしている。

以上のように、本論文はプロドラッグの活性化および糖鎖合成技術に関する触媒抗体を作製し、触媒抗体技術の医学、工学への実用化の可能性を示すとともに生成物阻害の克服、基質特異性の拡張に関する方法論を追及し、さらに触媒抗体の分子レベルでの解析により有用な知見を得ており、その成果は生物工学の発展に寄与するところが大である。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。