

ミクロのマジックハンド・人工酵素をめざして

長崎大学薬学部 岩淵 好治

【はじめに】

19世紀初頭に至るまで、有機物は生きている動植物の体内にのみ宿る『生命力』によって作られ、元素からの合成は不可能であると信じられてきた。1828年、Wöhler¹⁾によって『生氣論』が打破されて以来、有機化学は膨大な体系を築き上げながら進歩を続け、1973年、R. B. Woodward 教授によって Vitamin B12²⁾が、そして1994年、岸 儀人教授によって Palytoxin³⁾が化学全合成されたことをもって「もはや人類に合成不可能な有機化合物はない」とさえ云われるようになった。しかし、我々の体内で起こっている力強くかつ精緻な化学反応を見せしめられた後で、化学の粋としての有機合成化学を顧みるとき、いかに多くの課題が我々に残されているかが判ってくる。

数百万種類もの分子の混合物の中から望みの化合物を見つけ出し、その分子が関わる反応の速度を数億倍にも加速する、酵素のような選択的かつ効率的な触媒を人工的に構築していくことは、化学者のみならず工学を志す者の永年の夢であり、あらゆる分野の研究者が独自の的方法論を駆使してこの問題に取り組んでいる。いわゆる人工酵素を設計するにあたり問題となることは、相補的な多点相互作用を通して基質を取り込む『認識の場』と触媒機能が発揮される『化学反応の場』をいかにナノ(10-9)メートルという分子の世界の精度で構築するかということである。今日なお、包接化合物(シクロデキストリンなど)の化学修飾や既存酵素の遺伝子操作などによって”認識の場”の構築に多大な努力が続けられている⁴⁾。

ところで、生体にはもともと特定の化合物を特異的に認識し、それと強く結合するタンパク質が備わっている。免疫応答によってもたらされる抗体(antibody)である。即ち、ヒトやマウスの体内には 10^8 - 10^{12} 種類にも及ぶ抗原結合特異性の異なった抗体が備わっているため、抗原をデザインすることによって、自在にオーダーメイドの『認識の場』を有する抗体を手に入れることが可能になる。そこで、この抗体に『化学反応の場』とするための触媒機能を導入できれば、任意の化学反応を触媒する人工酵素を創りだすことが出来るはずである。触媒抗体(catalytic antibody)の概念は、こうした化学と生物学の境界領域に生まれてきた。1986年、触媒抗体の第1号が R. A. Lerner(スクリプス医学研究所)らによって報告された⁵⁾。彼らは巧みに反応の遷移状態を模倣したハプテンを合成し、これを免疫することにより遷移状態に相補的な抗体を作成し、エステル結合の加水分解反応を触媒する抗体を生み出した。

触媒抗体技術は抗体のもつ多様性を利用できることから、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の応用が期待されている。本公開講座では、最近演者らが作製した触媒抗体を紹介しながらその作製法及びその応用の可能性について解説したい。

【触媒抗体の作製】

さて、如何にして抗体に触媒機能を導入するか。今日、様々な立場から、種々の方法論で触媒抗体の作製が試みられているが、代表的なものとして2つのアプローチをあげることができる。一つは、ハプテンと抗体の立体的かつ電子的な相補性を利用するアプローチであり、これにより1) 化学反応の遷移状態を認識する抗原結合部位の構築(遷移状態の安定化)、2) 抗原結合部位に触媒活性を發揮するアミノ酸残基(His, Asp, Lysなど)の誘導(Bait-and-Switch法)、3) 金属や補酵素などの触媒活性基に対する結合部位の構築が図られている。もう一つは、基質特異的な抗体を直接化学修飾するか、あるいは部位特異的の変異法によって触媒活性基を導入する方法である。ここではこれまで多くの成功を収めている第一の方法について解説する。

一般に化学反応の触媒現象は、エントロピー因子、酸-塩基触媒、静電的效果などの触媒因子の組み合わせによって起こるものと理解されている。これと比較して生物の体内で行われている酵素触媒の目立つ特徴の1つは、酵素が化学反応の遷移状態に結合し、それを安定化させることによって反応の活性化自由エネルギーを減少させ、化学反応を促進していることである。触媒抗体の触媒作用も、酵素と同様に反応の遷移状態を安定化するという点に基づいている。すなわち、反応の遷移状態と立体的かつ電子的によく似た化合物『遷移状態アナログ』を合成し(真の遷移状態は合成できないので)、これをハプテンとして免疫する。こうして得られた抗体は反応の遷移状態と結合し、それを安定化することによって反応を触媒する。図1にエステル結合の加水分解反応を示す。エステルの加水分解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四面体遷移状態(A)を経て進行する。この四面体遷移状態(A)に立体的かつ電子的に相補的な抗原結合部位をもつ抗体は、反応の活性化自由エネルギーを減少させ、加水分解反応を触媒する。ホスホン酸エステル(B)が真の遷移状態に近い構造単位であることが ab initio 計算結果からも支持されており、現在、(A)の遷移状態アナログとして(B)を免疫することによって加水分解反応を触媒する抗体の作製が行われている。

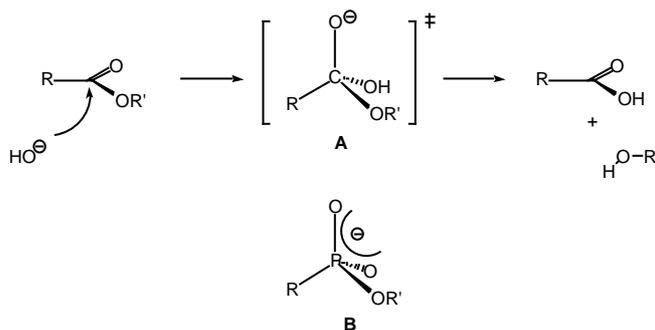


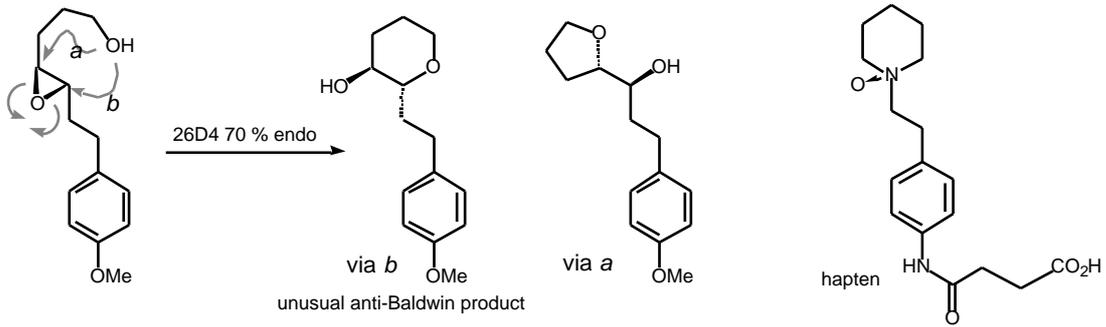
図1 エステル結合の加水分解反応における遷移状態(A)と遷移状態アナログ(B)

【触媒抗体による化学反応性の制御】

化学反応は自然界の法則に則って原子と原子の連結にあずかる電子の属性が変化することである。有機反応についても様々な法則性が見いだされており、新規反応の設計や未知の系における化学反応の生成物の予測等に役立っている。しかし、一方でそれらの『法則』はしばしば『化学反応の限界』として我々に回り道を強制する。もし、基質分子に特異的な反応場あるいは分子認識場を与えることができれば、従来は不可能と見なされていたタイプの反応を進行させることができるかも知れない。このような発想から、「常識」を覆す反応を触媒する抗体が獲得されてきている。

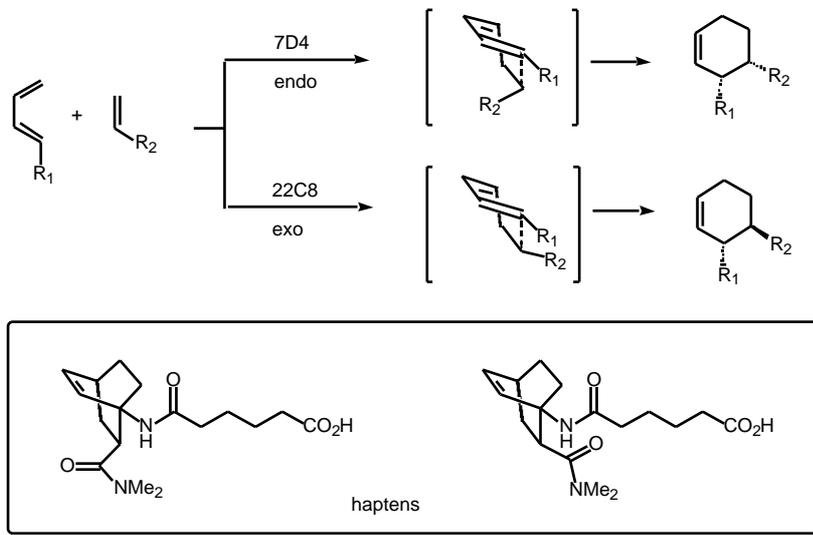
Baldwin 則に反する環化モードの反応を触媒する抗体

K. D. Janda, C. G. Shelnlin, R. A. Lerner, *Science*, **259**, 490 (1993)



Diels-Alder 反応の選択性を制御する触媒抗体

V. E. Gouverneur, K. N. Houk, B. de Pascual-Teresa, B. Beno, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science*, **262**, 204 (1993)



糖エステル結合の位置および立体選択的脱保護反応

Y. Iwabuchi, H. Miyashita, R. Tanimura, K. Kinoshita, M. Kikuchi, I. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 771-772

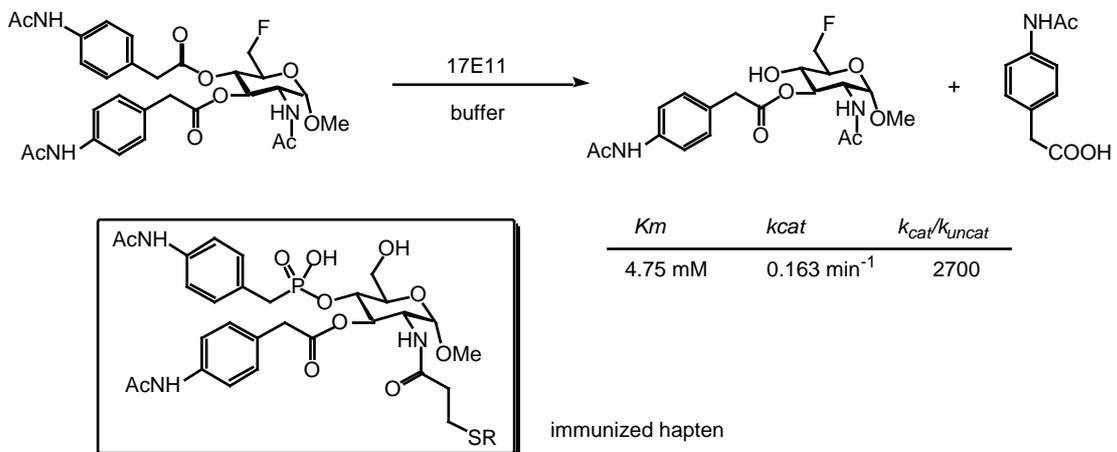


図 2 化学反応の選択性を制御する触媒抗体

【触媒抗体の高活性化】

ハプテンの免疫によって多様な分子認識能を付与し得る触媒抗体の方法論は「人工酵素」作製のための有力な方法論と位置づけられる。しかし、これまで獲得されてきた100種類にも及ぶ触媒抗体の触媒活性は、いずれも酵素の触媒活性に比べてかなり低い。これは触媒抗体が(1)単一のハプテンの免疫刺激によって誘導されているために限定的な触媒因子しか誘導されない(2)ハプテンが反応の遷移状態を忠実に反映していないなどが原因と考えられる。この問題点を解決すべく、現在、蛋白工学的的手法⁶⁾や免疫法の工夫⁷⁾、さらには反応性ハプテンの活用⁸⁾などの研究が進められている。

【触媒抗体の応用—プロドラッグの活性化】

プロドラッグとは、医薬品の物性・体内動態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、それ自身は薬理活性を示さないが投与後生体の酵素や pH の変化によりもとの医薬品(親化合物)に変換され薬理作用を発揮するものである。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。そこでもし、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、標的指向法(図3参照)との組み合わせにより部位特異的な医薬品の活性化が可能になるばかりか、論理的な分子設計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はずである。

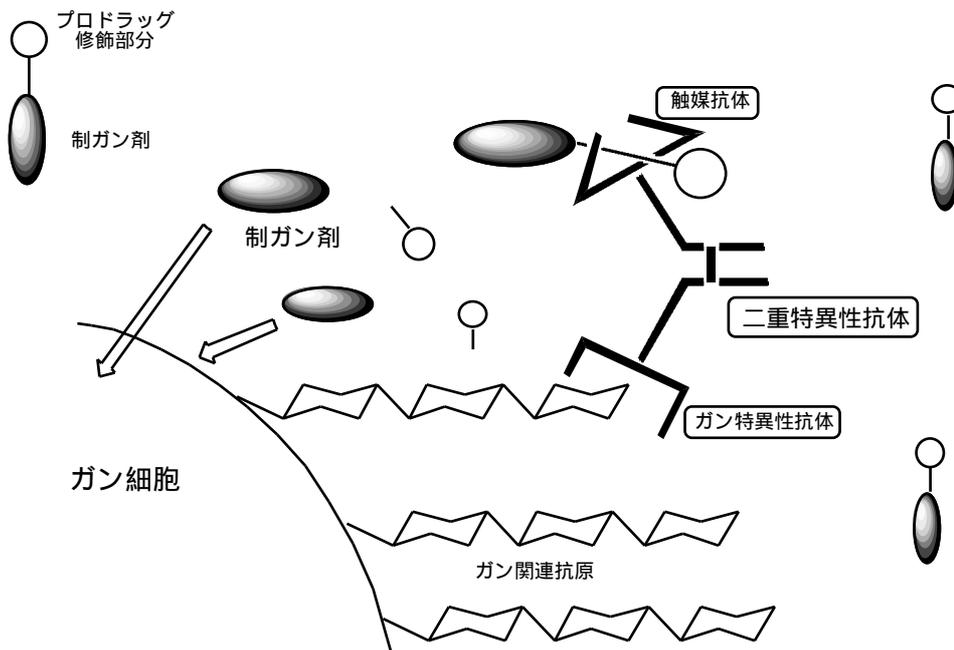


図3 二重特異性抗体(触媒抗体+ガン特異性抗体)による病巣特異的プロドラッグ医薬品の活性化

特に抗腫瘍剤等の化学療法剤は、骨髄・胃腸粘膜への重篤な傷害、脱毛、悪心などの副作用を引き起こすことが多い。そのため投与量を制限せざるを得ず、結果的に薬剤本来の効果が期待される投薬ができなくなってしまう場合が多い。そこで特に腫瘍細胞で特異的に活性化されるプロドラッグの開発が強く望まれている。ここでは特異的なプロドラッグ活性化法に焦点をしばって1)核酸誘導体、2)アルキル化剤、3)アントラサイクリン系抗生物質を取り上げてそのプロドラッグ化と触媒抗体による活性化の可能性について解説する。

1. ヌクレオシド誘導体

ヌクレオシド誘導体は、代謝拮抗による不完全 DNA あるいは RNA の生成によって細胞毒性を発現する。フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、フルオロウリジン、アラビノシルシトシン、メルカプトプホスホンリボシド、チオグアノシン、アラビノシルフルオロウラシル、アザウリジン、アザシチジン、フルオロシチジン、フルダラピン等が、現在薬剤として使用されている。これまでのプロドラッグ化の試みとしてリボース 5' 位にアシル基を導入したプロドラッグ化の試みが知られているが、体内に遍在する内因性エステラーゼにより加水分解されて活性体となってしまう、ターゲティングには適切でない。

最近、抗腫瘍性ヌクレオシド誘導体の触媒抗体による活性化の試みが報告された⁹⁾(図4)。プロドラッグとしては5-フルオロデオキシウリジン (1) の5' 位 1 級水酸基を非天然型 D-パリンエステルで保護した化合物 (2) を用いている。これまで知られている限りにおいては、5' 位で分岐している D-パリンのエステルを加水分解できる天然エステラーゼはないことから、このプロドラッグは触媒抗体によってのみ活性化されることが期待される。ハプテン(6)を抗原としてマウスに免疫し、プロドラッグを活性化する抗体 49.AG.659.12 を得ることに成功している。抗体 49.AG.659.12 は Michaelis-Menten 型反応速度論に従って、本加水分解反応を触媒し ($k_{cat}=0.03\text{min}^{-1}$, $K_m=218\text{mM}$)、無触媒反応に比べて反応速度を 980 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 49.AG.659.12 による触媒反応は完全に阻害された ($K_i = 0.27\text{mM}$)。ついでプロドラッグの活性化を細菌 (*Escherichia coli* HB101) の増殖阻害実験により評価した。5-フルオロデオキシウリジン (1) は 30mM の濃度で大腸菌の成育を完全に阻止する。プロドラッグ (2) は 400 mM の濃度でも影響は見られなかったが、触媒抗体 20 mM を加えると大腸菌の成育は完全に阻止された。しかしながら、低活性など多くの問題点があり、実用化に向けて今後の展開が期待される。

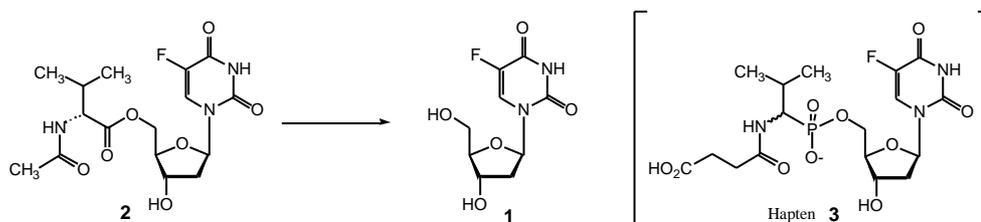


図4 5-FU プロドラッグを活性化する触媒抗体 49.AG.659.12

2. アルキル化剤

この範疇に属する薬剤は、蛋白質・核酸の非酵素的アルキル化によって細胞毒性を発揮するところからアルキル化剤と総称され、シクロホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、メクロレタミン等が現在臨床で使用されている。いずれも制癌剤として最初に使用されたナイトロジェンマスタードの毒性軽減を目的として合成されたいわゆるマスク化合物である。しかし、シクロホスファミド (4) は、肝ミクロソームによる代謝によって細胞毒性を示す活性薬物 (5) になることが示されており、また、メルファラン (7) はアミノ酸とナイトロジェンマスタード結合させた化学構造を持つことから活性代謝細胞による選択摂取が期待されたが、必ずしも腫瘍細胞でのみ活性化されていないことから、新たな観点からのプロドラッグ化が望まれている。アルキル化剤をターゲットとする触媒抗体作製のハプテンとして図5に示す方法論が考案されている¹⁰⁾。触媒抗体による活性化が可能になれば幅広い投薬プログラムを設定することができると期待される。

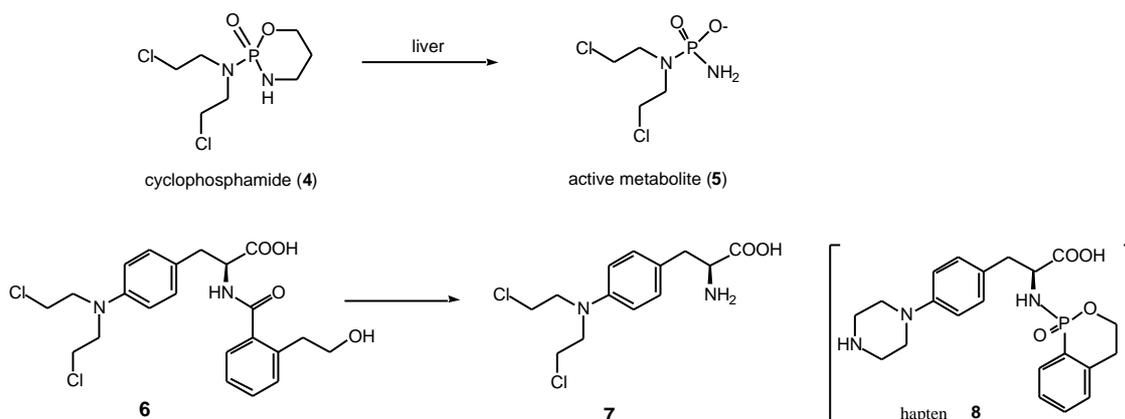


図5 アルキル化剤をプロドラッグ化するための戦略

3. アントラサイクリン系抗生物質

ダウノマイシン (ダウノルピシシ) (9)、アドリアマイシン (ドキシソルピシシ)、アクリルピシシに代表されるアントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質は、DNA と結合してインターカレーションにより安定な結合を作り、DNA ポリメラーゼ及び DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性を阻害して腫瘍細胞の増殖を阻害する。臨床的には悪性リンパ腫、固形癌に対して汎用されている。重篤な副作用が伴うにもかかわらず、適切な方法論がなかったためにプロドラッグ化はほとんど検討されていない。ダウノマイシン (9) は DNA との複合体の X 線結晶解析から、アグリコン部分の B, C, D 環が塩基対間にインターカレートし、A 環とアミノ糖部分が minor groove に埋まる様式で結合していることが示されている。また活性発現のためにはアミノ糖部分が必須であることが知られていることからアミノ糖のアミノ基に立体的に嵩高いアシル基を結合させた (10) がプロドラッグとして考案された。(9) は立体障害のために DNA にインターカレートすることができなくなっており、ハプテン (11) の免疫によって作製される触媒抗体によって活性体への変換が可能となると考えられている (図6)。

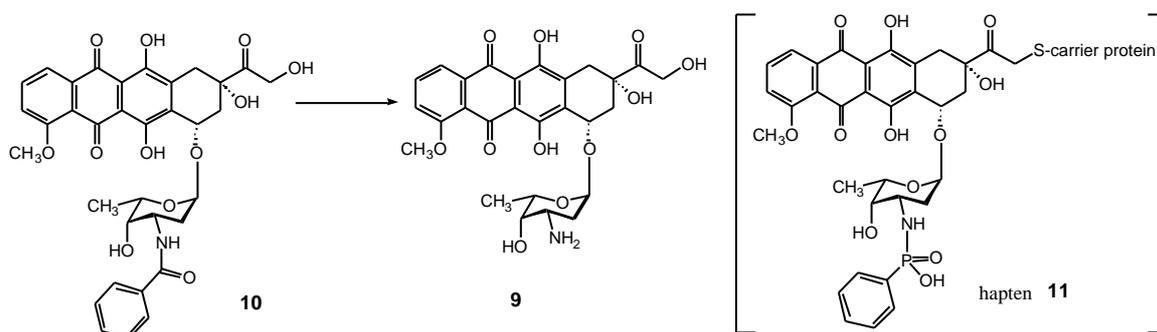


図6 ダウノマイシンをプロドラッグ化するための戦略

【おわりに】

テラーメイドの生体触媒として触媒抗体の可能性とその応用性には限りがない。たとえば、ウイルスの被膜タンパク質と特異的に結合し、そのタンパク質を加水分解する触媒抗体は抗ウイルス剤として有用である。また、最近、酵素欠損症の治療に遺伝子治療が試みられ始めているが、この分野にも触媒抗体の応用が可能である。欠損酵素の代用として触媒抗体を投与するか、あるいは直接、患者に遷移状態アナログで免疫し患者の体内で触媒抗体を発現させるワクチン療法的な方法も考えられる。

今後、触媒抗体の研究が有機化学から免疫学さらには臨床医学の幅広い研究分野の相互協力によって、実用化へと発展していくことを期待している。

【引用文献】

1. Wöhler, F. Ann. Phys. Chem. 1828, 12, 253.
2. Woodward, R. B. Pure & Appl. Chem. 1973, 145.
3. Suh, E. M.; Kishi, Y. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 11205.
4. Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry, VCH: Weinheim, 1995.
5. Tramontano A.; Janda, K. D.; Lerner, R. A. Science, 1986, 234, 1566.
6. Fujii, I.; Fukuyama, S.; Iwabuchi, Y.; Tanimura, R. Nature Biotech. 1998, 16, 463.
7. Wisching, P.; Ashley, J. A.; Lo, A.-H. L.; Janda, K. D.; Lerner, R. A. Science 1995, 270, 1775.
8. Tsumuraya, T.; Suga, H.; Meguro, S.; Tsunakawa, S.; Masamune, S. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 11390.
9. Campbell, D. A.; Gong, B.; Kochersperger, L. M.; Yonkovich, S. Gallop, M. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116: 2165.
10. Kenten, J. et al.: Prodrug activated by targeted catalytic proteins. WO 93/02703 (18 Feb.1993).