

综述与专论

抗 体 酶

石 颖 许根俊 鲁子贤

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

提 要

根据酶活性部位的结构用免疫及其它方法得到的抗体酶具有催化活性, 为酶的结构功能研究和抗体与酶的应用等方面开辟了一个新的研究领域。

关键词 抗体酶, 催化性抗体, 酶

“抗体酶”(abzyme)^[1] 是八十年代后期才出现的一种具有催化能力的蛋白质, 其本质上是免疫球蛋白, 但是在易变区被赋予了酶的属性, 所以又称为“催化性抗体”(catalytic antibody), 是利用生物学与化学的成果在分子水平上交叉渗透研究的产物。由于抗体酶对于多个学科展示了较高的理论与实用价值, 它已经引起了广泛的关注。本文就抗体酶的研究进行回顾及讨论。

一、抗体酶的理论基础

研究表明, 动物的免疫系统潜伏着产生 10^6 种抗体的能力, 这种潜伏的能力尚有待于开发利用。人们早就注意到: 酶与抗体这两种蛋白质之间尽管功能不同, 但存在着惊人的相似之处, 尤其是它们在与各自的配基特异的结合过程中, 遵守同样的方式并表现出相近的动力学行为。人们不禁会问: 能将抗体变为酶吗? 最近的研究成果给出的答案是肯定的。

从理论上讲, 目前至少有三种方法可以将抗体变为酶。

拷贝法 用已知的酶作为抗原免疫动物, 获得了抗酶的抗体, 再将这抗体免疫动物, 并进行单克隆化即获得了单克隆的抗抗体, 将后者

进行筛选, 应获得具有原来酶活性的抗体(图 1a)。它的依据是抗体生成过程中存在着抗原与抗体互补性^[2]。经过两次拷贝, 通过酶的活性部位的单克隆抗体把活性部位的信息翻录到第二抗体上去, 如果结合基团和催化基团空间位置合适, 那么抗体可以具有催化活性。最近, 类似的方法已在配体-受体研究中得到应用^[3]。这种方法的优点是对于某些来源紧张的酶来说可以用生产单克隆抗体的方法来大量生产, 不足之处是这类抗体酶需要靠筛选来得到, 具有一定的盲目性和偶然性, 并且不能满足人们对新酶的需求。

引入法 借助于基因工程和蛋白质工程将催化基团引入到已有底物结合能力的抗体的抗原结合位点上。具体的方法可以采用寡核苷酸定点诱变技术将特定的氨基酸残基引入抗原结合部位, 使其获得催化功能。也可以采用选择性化学修饰的方法将人工合成的或天然存在的催化基团引入到抗原结合部位。迄今为止, 最成功的例子是本文将谈到的 Pollack 等人^[4]的工作。

诱导法 用事先设计好的抗原(半抗原)按照一般的单克隆抗体制备程序获得有催化活性的抗体(图 1b)。此法能否成功的关键在于合

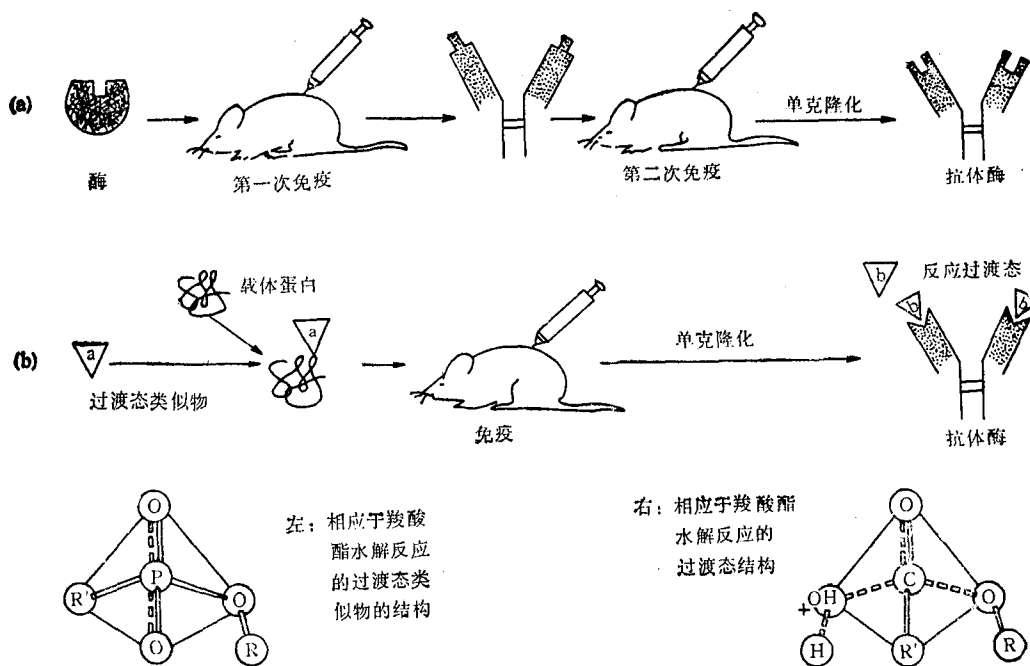


图1 抗体酶制备示意图
(a) 拷贝法 (b) 诱导法

理的制备抗原(半抗原), 因此必须要对酶的作用机制的知识有一定程度的了解。

在众多的观点中, Pauling^[5]的过渡态理论(Transition State Theory)得到了许多实验的证实, 获得了广泛的承认。按照这一观点, 酶与底物不是在初态, 而是在过渡态的时候两者互补, 亲合力最强, 释放出的结合能使过渡态络合物的能级降低, 从而帮助大量的反应物分子跨越能垒, 达到加速反应的目的。以此为根据, Jencks^[6]预言: 如果找到抗(某个反应)过渡态的抗体, 将其加入到该反应体系中, 就可能观察到这抗体对相应的化学反应的催化效应。实践中很难将过渡态俘获, 因此人们在制备抗体酶时采用的半抗原是个稳定的结构及电荷都与过渡态近似的过渡态类似物(transition state analog)(图3)。

应该特别指出, 单克隆抗体技术的日臻完善, 使制备具有相同抗原结合位点的均一化抗体成为可能, 这无疑为抗体酶技术的开发铺平了道路。

二、抗体酶的先驱工作

将抗体变为酶是一项难度非常大的工作。纵观其发展过程, 可将其粗略的分为两个阶段:

1. 尝试阶段 1986年以前的抗体酶的工作处于尝试阶段。由于作者对酶的作用机理的理解有些差别, 也由于实验技术的限制(有些工作发表在单克隆抗体技术问世之前)。这一时期的抗体酶的效率不高甚至观察不到催化能力。用诱导法制备抗体酶的作者有 Slobin^[7], Raso^[8], Burd^[9], Kohen^[10]等, 用引入法尝试的有 Royer^[11]等。针对的反应类型多为酯类的水解反应。

2. 初步成功阶段 1986年,《Science》杂志同时发表了两篇在抗体酶的实践上有重要突破的工作, 标志着抗体酶的研究进入一个新的阶段。

Pollack 等人^[12](Schultz 小组, University of California, Berkeley) 认定对-硝基苯酚磷酸胆碱酯(pNPPC)与由对-硝基苯酚, (N,N,N-三甲基)乙醇胺和碳酸形成的羧酸二

酯在水解反应中的过渡态结构相似(图 2a)。由此推测由前者为半抗原诱导产生的单克隆抗体可能对后者的水解反应有催化活性。通过对已制备好的单克隆抗体的筛选,果然找到了一株 MOPC 167, 使该水解反应速率加快 12000 倍;以后又筛选到另一株抗体酶 T15, 可以使反应加快 9200 倍。作者发现该催化反应的动力学行为满足米氏方程,并具有底物特异性及 pH 依赖性等酶反应的特征,还初步确定了参与催化的氨基酸残基。

从金属肽酶的研究成果中得到启发, Tramontano 等人^[1] (Lerner 小组, Research Institute of Scripps Clinic) 合成了一个含有吡啶甲酸的磷酸酯化合物为半抗原, 得到一单克隆抗体 6D4, 用来催化不含吡啶甲酸的相应碳酸酯化合物(图 2b)的水解反应,使反应加速近 1000 倍。

以上两个小组成功的关键在于过渡态类似物的巧妙运用。图 3 给出了他们使用的过渡态类似物与过渡态之间的关系。从那时起, 选择

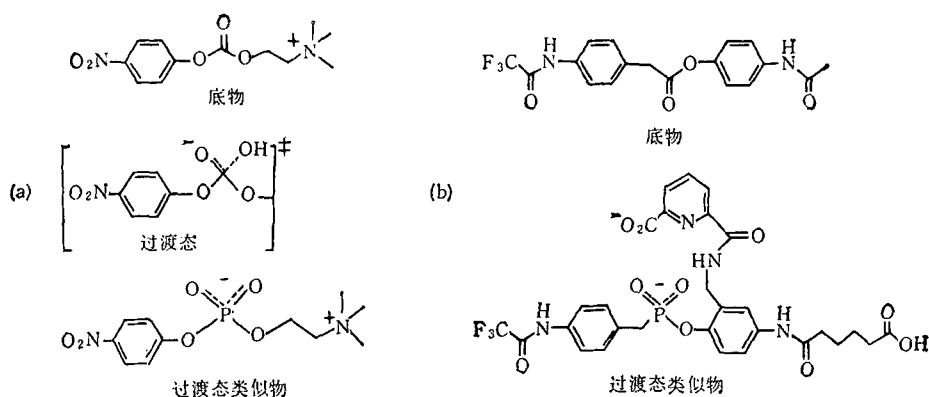


图 2

(a) Pollack 工作中底物,过渡态,过渡态类似物 (b) Tramontano 工作中的底物,过渡态类似物

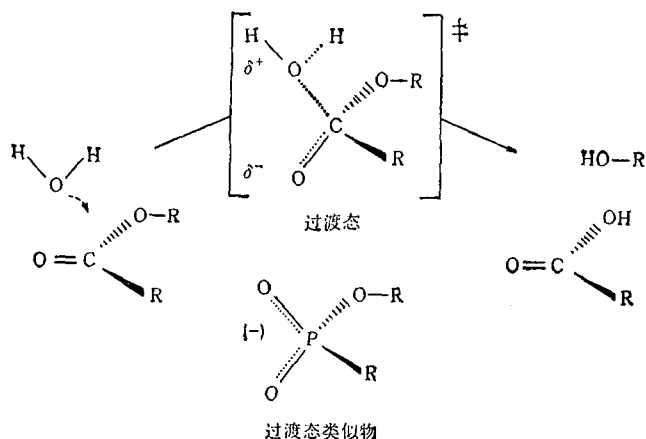


图 3 羧酸酯水解反应机理

合适的过渡态类似物来诱导体酶得到了迅速的发展,反应类型也不再局限于水解反应。

Napper 等人^[23] (Benkovic 小组, Pennsylvania State University) 首次观察到了抗体酶

反应的立体特异性。他们选用了—个环化的磷酸酯作为过渡态类似物去免疫动物,得到了单克隆抗体 24B11。然后用它来催化外消旋的羧基羧酸酯分子内环化形成内酯(图 4)。除了观

察到反应被加速 167 倍外,用 H-NMR 测定产物时,发现产物中的一种对映体的含量高出 94%,很明显,由于抗体酶的介入,使得原来自由能相等的反应途径变得不等了,因而出现立体选择性的环化反应。

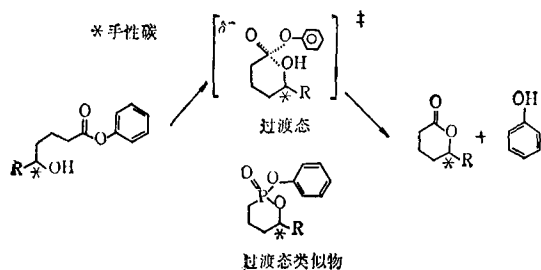


图4 Napper 工作中的反应机理

Hilvert 小组^[44] (Research Institute of Scripps Clinic) 和 Jackson 等人^[45] (Schultz 小组, U. of California, Berkeley) 分别制备了能催化协同反应的抗体酶。由于协同反应中化学键的断裂和生成同时进行,它的六元环或四元环过渡态有特定的立体结构,又由于反应中不形成离子型或游离基型的中间体,反应不需要酸、碱等催化基团催化,因此, Hilvert 等人认为这类反应更适合研制抗体酶。他们选用的是同一个有椅式构象的氧杂双环的化合物来模拟由分枝酸生成预苯酸这样一个 Claisen 重排反应的过渡态结构(图 5)。实验均获得成功,反应被加快 10^7 — 10^8 倍。这是首次用抗体酶催化了 C-C 键的生成。同时, Hilvert 也观

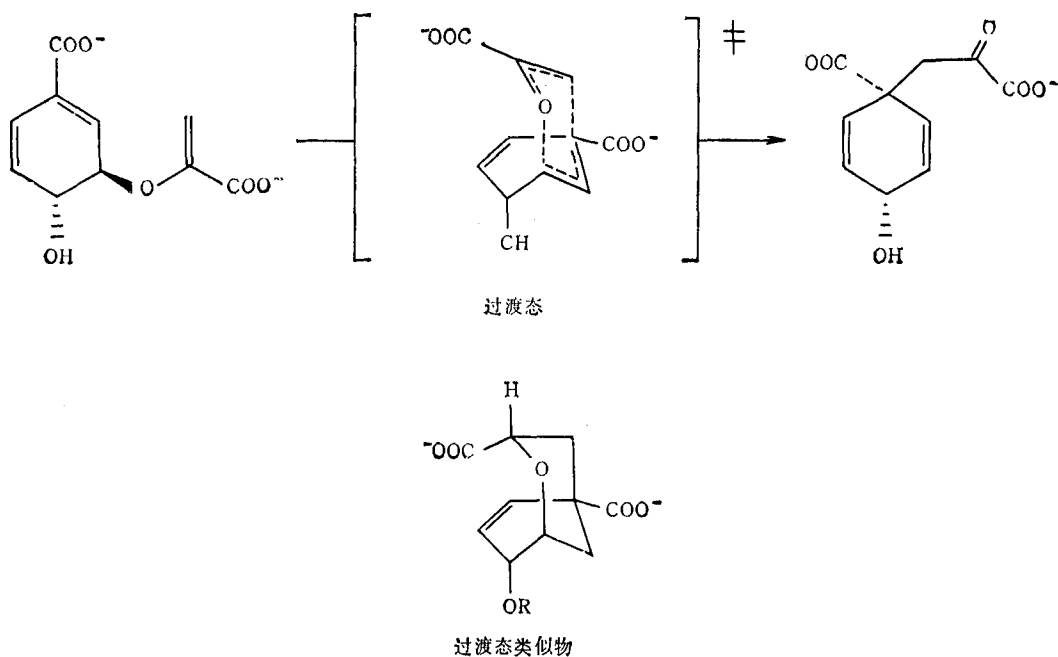


图5 由分枝酸生成预苯酸的反应机理

测到了该催化反应的立体特异性,只有一种旋光异构体能充当抗体酶 1F7 的底物。上述作者指出,这项工作对于采用非化学基团催化的抗体酶的发展有重要意义,它加深了人们对于酶的作用机理的一些讲法(如邻近效应,定向效应,熵阱模型,张力模型等)的理解。

与此同时,采取引入法制备抗体酶也取得

了突破性进展。Schultz 小组^[46]使用可裂解亲和标记物 (cleavable affinity label) 将亲核基团巯基 (-SH) 引入到抗 2,4-二硝基苯酚 (DNP) 的单克隆抗体 MOPC315 的抗原结合位点上(图 6)。这抗体酶对于含有 DNP 与香豆素的羧酸酯的水解反应的催化效率比二巯基苏糖醇 (DTT) 高了 60 000 倍。引入的巯基

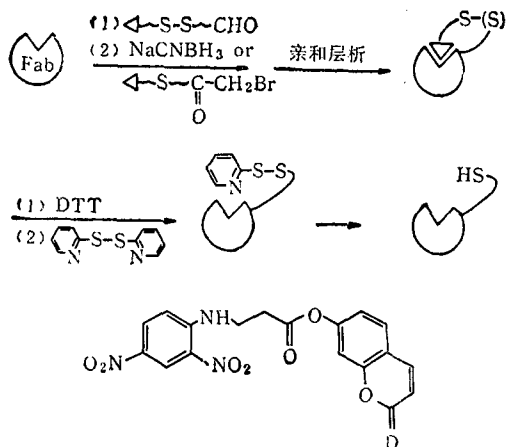


图6 Pollack 用引入法制备抗体酶示意图

不但可以作为催化基团,还可以联结荧光基团,用来研究抗原抗体结合反应,这就为蛋白质的功能修饰又开辟了一条新的途径。

Schultz 小组^[2]还有一项属于抗体酶范畴的工作是用胸腺嘧啶二聚体衍生物诱导能催化胸腺嘧啶二聚体光解聚反应的单克隆抗体。根据抗原抗体互补性原理,他们期望能用胸腺嘧啶二聚体在抗体的抗原结合部位诱导出光敏剂色氨酸的残基来。他们获得了成功,观察到了抗体对胸腺嘧啶二聚体解聚反应的光依赖性催化作用。

三、前 景

抗体酶的实践已清楚地表明,它是研究酶的作用机理的有力工具。在抗体酶获得成功之前,支持 Pauling 的过渡态理论的证据主要来自酶抑制剂的研究。抑制剂只能提供酶作用过程的结合专一性的信息,但不能给出结合后发生催化反应以及结合与催化之间的关系。在抗体酶的研究过程中,可以直接观察到过渡态理论对设计抗体酶所起到的重要作用,这也就为酶的过渡态理论的正确性提供了一个有力的实验证据。

在 Hilvert^[14] 和 Jackson^[15] 的工作之前,人们对分枝酸变位酶 (chorismate mutase EC. 5.4.99.5) 的了解甚少。在抗体酶的研究过程中,通过与分枝酸变位酶的催化效率相比较及

对照无催化剂时该反应的热力学参数,作者已能估计“转动作用”在抗体酶催化反应中所起的作用^[2]。

除了基础理论研究方面的价值之外,抗体酶的应用前景也很令人鼓舞。Lerner 指出^[6],如将目前进行的主要是催化水解反应的抗体酶研究深入下去,极有可能得到一类新型的蛋白酶, Schultz 称之为“序列专一性多肽水解酶”(sequence-specific peptidase)。它能按照人们的设计对特定的肽键进行水解。这种酶将为蛋白质化学工作者提供强有力的工具。在医学上这种抗体酶将有可能用来专一地破坏病毒蛋白质及专一地清除心血管病人血管壁上的血液凝块。Lerner 还提到将具有立体专一性的抗体酶用于制药工业是很有发展前途的,它有助于避免化学合成中遇到的令人头痛的对映体拆分的难题。

最近的研究成果表明^[4],由抗体酶催化的反应类型已从酰基转移反应,协同反应发展到光化学反应及氧化还原反应。相信随着反应类型的增加,抗体酶会展现更加诱人的前景。

四、抗体酶发展中存在的问题

对诱导法来说,若想得到高效率的抗体酶,选择好过渡态类似物是关键,而过渡态类似物的选择又依赖于人们对反应过渡态的全面了解,但化学反应的过渡态是极不稳定的结构,有些即使在摄氏零下几十度,仍然难以将其俘获下来以得到充足的结构信息,所以如何找到合适的过渡态类似物成了难题之一。

另外天然酶反应中有许多辅助因子参加,这使得酶反应更加丰富多彩。如何将辅助因子引入到抗体酶中以拓宽抗体酶研究的深度与广度,已成为有些作者^[1]关心的问题。天然酶还有一些特点是可以组成多酶体系以发挥高效率的催化作用,即使是单酶体系也通常是通过多个基元催化反应步骤来完成催化作用的,中间要经过多个过渡态。是否能够赋予用单一过渡态类似物诱导出的抗体酶具有这些复杂的特性,

(下转第 209 页)

- kheiten*, 1960; 20: 180
- 7 Ledeen R W *et al. Methods in Enzymology*, 1983; 83: 139
- 8 Kanfer J N *et al. Handbook of lipid research*. Plenum Press, 1983: 9—16

- 9 Aminoff D. *Biochem J*, 1961; 81: 384
- 10 Li S -Ch *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 101: 479

[本文于1989年3月18日收到]

ISOLATION AND COMPARISON OF GM₃ GANGLIOSIDE CONTENT IN THE LIVER OF SOME MAMMALS AND CANINE ERYTHROCYTES

Tsui Zhaochun Hou Weihong Zhu Zhengmei
(Dept. of Biochemistry, Dalian Medical College, Dalian)

ABSTRACT

Total gangliosides were isolated from the liver of healthy rabbit, pig, canine, and canine erythrocytes. After high performance thin layer chromatography of the total gangliosides, the chromatograms were scanned by TLC scanner, the percentage contents were obtained. On the basis of lipid-bound sialic acid contents, the authors found that canine erythrocyte had the highest GM₃ content. GM₃ isolated from compacted canine erythrocytes with a yield of 351.0 μ g per ml and the purity was 92.2%.

Key words ganglioside GM₃, liver, canine erythrocytes

(上接第 170 页)

显然是一个尚未解决的问题。

最后, 抗体酶是抗体与酶结合的产物, 它的发展有赖于抗体与酶的结构与功能的深入研究, 特别是对酶的作用机制的深入研究。而目前人们对抗体, 尤其是对酶的认识是极为肤浅的。

结 束 语

抗体酶作为一种新的生物工程技术已向人们展示了潜在的理论及应用价值。人们期望通过多学科的交叉协作, 随着单克隆抗体技术的发展及酶的作用机制的不断阐明, 抗体酶一定会给出更加令人振奋的成果。

参 考 文 献

- 1 Tramontano A *et al. Science*, 1986; 234: 1566
- 2 Schultz P G. *Science*, 1988; 240: 426
- 3 Williams W V *et al. Biotechnology*, 1989; 7: 471
- 4 Pollack S J *et al. Science*, 1988; 242: 1038
- 5 Pauling L. *Am Sci*, 1948; 36: 51
- 6 Lerner R A *et al. Sci Ame*, 1988; 258(3): 42
- 7 Slobin L I. *Biochemistry*, 1966; 5: 2836
- 8 Raso V *et al. Biochemistry*, 1975; 14: 591
- 9 Burd J F *et al. Analytical Biochemistry*, 1977; 77: 56
- 10 Kohen F *et al. Biochim Biophys Acta*, 1980; 629: 328
- 11 Royer G P. *Advances in Catalysis*, 1980; 29: 223
- 12 Pollack S J *et al. Science*, 1986; 234: 1570
- 13 Napper A D *et al. Science*, 1987; 237: 1041
- 14 Hilvert D *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 4953
- 15 Jackson D Y *et al. J Am Chem Soc*, 1988; 110: 4841

[本文于1989年9月22日收到]