Human Abzymes with Amylolytic Activity

澱粉分解活性をもつヒトアブザイム

Kulinskaya, Anna A.¹; Saveliev, Andrew N.²; and Neustroev, Kirill N.^{1*}¹ Molecular and Radiation Biophysics Division, Petersburg Nuclear Physics Institute of Russian Academy of Sciences, Gatchina, Russia² Biophysics Department, St.-Petersburg Technical University, St. Petersburg, Russia

* To whom correspondence should be addressed: Petersburg Nuclear Physics Institute, Russian Academy of Science, Gatchina, St. Petersburg, 188300, Russia.

FAX: 7-81271-32303, E-mail: neustk@omrb.pnpi.spb.ru

Key Words: *abzymes, amylolytic activity, autoimmune pathologies*

Abstract

Amylolytic abzymes are a new type of catalytically active human antibodies that have been found recently. Various immunoglobulins from the sera of patients with autoimmune diseases and human milk were found to possess amylolytic activity, which is expressed in their ability to hydrolyze α -(1,4)-D-glucosyl linkages of maltooligosaccharides, starch, glycogen, and several artificial substrates. Pure IgM fractions isolated from several tens of analyzed patients with clinically definite diagnoses of multiple sclerosis (MS) and systemic lupus erythematosus (SLE) had approximately three orders of magnitude higher specific amylolytic activity than those for healthy donors. Average values for the specific amylolytic activity of IgGs and sIgAs from human milk were five times less than of IgMs from autoimmune patients. Strict criteria were used to prove that the amylolytic activity of abzymes was their intrinsic property and was not due to any enzyme contamination. Fab fragments derived from IgM and IgG fractions of human abzymes displayed the same level of amylolytic activity. Values for Michaelis constants K_M in the abzyme-mediated hydrolysis of different α -D-maltooligosaccharides and α -D-maltooligosaccharides with chromogenic and fluorescent label on reducing end were in the range of 1–2 to 0.01 mM. Abzyme fractions from different donors demonstrated catalytic heterogeneity in Michaelis-Menten parameters and different modes of action in the hydrolysis of natural and artificial substrates. One part of amylolytic immunoglobulins exhibited exo-amylase action when others have also α -glucosidase activity yielding glucose and capable of cleaving p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside. Enzymatic properties of all tested amylolytic abzymes distinguished from those of putative human α -amylases. None of the IgM, IgG, and sIgA samples investigated showed transglycosylating ability.

要 約

澱粉分解活性をもつアブザイムが酵素活性をもつヒト抗体の新しいタイプとして最近発見された。自己免疫疾患患者の血清やヒトの母乳にはマルトースオリゴサッカライド、澱粉、グリコーゲンや人工基質の α -(1,4)-グルコシル結合を加水分解する活性をもつさまざまな免疫グロブリンがあることが知られていた。臨床的に多発性硬化症や全身性エリマトーデスであると診断された数十人の患者のIgM分画は健常者のものと比較して澱粉分解の比活性が約千倍高い。ヒト母乳のIgG, IgAの活性の平均値は比活性にして自己免疫疾患患者のIgMの五分の一以下であった。アブザイムの活性は抗体そのものがもつ性質であって酵素の混入によるものではないことを証明するための厳密な実験がおこなわれてきた。アブザイムのIgMとIgG分画をFabフラグメントにしても同程度の活性を示した。還元末端に発色団や蛍光標識をもつさまざまなマルトースオリゴサッカライドに対するアブザイムによる分解活性の K_M は1~2 mMから0.01 mMであった。異なるドナーからのアブザイムはミカエリスメンテン値の不均一性を示し天然基質や人工基質の分解様式にも差異がみられた。あるものはエキソ型アミラーゼ活性を示し、またあるものはグルコースを遊離する α -グルコシダーゼ活性を示しp-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノサイドを分解できた。調べられたすべての澱粉分解活性をもつアブザイムの酵素的性質はヒトの α -アミラーゼと異なっていた。IgM, IgG, sIgAはいずれもトランスグリコシレーション活性を示さなかった。

A. Introduction

Antibodies (Abs) possessing enzymatic activities

A. はじめに

酵素活性をもつ抗体(アブザイム)が存在することはよく知

(abzymes) are becoming a well-known phenomenon. The hypothesis of Jencks, that monoclonal antibodies directed against an analog of transition state of an enzymatic reaction can exhibit a catalytic function (1,2), forms the basis for understanding abzyme production. Thus, raising monoclonal or polyclonal antibodies to chemically synthesized haptens, which imitate transition states, show the presence of catalytic activity. With this approach, more than a hundred types of catalytic, mainly hydrolytic, activities were obtained (3,4). The method of immune response on transition state was also used for the creation of non-hydrolytic antibodies capable of catalyzing cationic cyclization (5), acyl-transfer reaction (6) and some others (7). Antibodies-enzymes were named 'abzymes' as an abbreviation between AntiBody and enZYME. Abzymes (Abzs) obtained by the above-mentioned method have extremely high catalytic efficiency: rate accelerations for catalytic antibody-mediated transformations are up to 10^6 higher than for un-catalyzed chemical reactions (8). In some cases, Abzs show higher stereospecificity than putative enzymes. This approach, *i.e.* immunization on various haptens, also enables obtaining new enzymatic activities, which do not have analogs in traditional enzymology (9).

Another successful method, the induction of anti-idiotypic antibodies, has been recently developed for the production of catalytically active antibodies. It is based on the production of secondary antibodies on antibodies initially elicited against the active center of the enzyme (10).

Several years ago, a phenomenon of *in vivo* generation of catalytic antibodies in the sera of humans was discovered. The first record on human catalytic IgGs isolated from the blood of patients with such autoimmune diseases as asthma and thyroiditis, reported their ability to hydrolyze peptides and proteins (11,12). It was the first time that human catalytic autoantibodies were also called abzymes. Further, all antibodies exhibiting enzymatic properties were given this name. Nuclear acid nicking activity was next observed at human autoantibodies. Thus, the IgG fractions isolated from the blood of patients suffering from systemic lupus erythematosus (SLE) were found to manifest DNA-hydrolytic activity (13,14). Further findings revealed that RNA-cleaving activity of immunoglobulins G and M correlates with a number of autoimmune pathologies, like multiple sclerosis (MS), SLE, Hashimoto's thyroiditis, polyarthritis, and rheumatoid arthritis (15-17). Noteworthy, healthy donors and patients suffering from influenza, pneumonia and tuberculosis do not exhibit essential level of RNA- and DNA-hydrolase activities of sera antibodies. However, both activities were found in IgG and sIgA fractions from human milk of healthy mothers (19).

The last catalytic activity that was detected in human autoantibodies was amylolytic. It appeared that human abzymes cleave off linkages both in different α -D-maltooligosaccharides and glycogen or starch (20). Below, we will discuss the spread-

られた現象である。酵素反応の遷移状態の基質アナログに対するモノクローナル抗体は触媒活性を示しうるという Jencks の仮説はアブザイムの生成を理解する根拠となっている。すなわち遷移状態を真似て化学的に合成されたハプテンに対してモノクローナルおよびポリクローナル抗体を作成すると酵素活性がみられる。この方法により百種類以上の触媒活性(主に加水分解活性)が得られた(3,4)。遷移状態に対する免疫応答の手法は加水分解活性以外の活性、ポリエンの環化(5)、アシル基転移(6)、その他(7)、をもつ抗体の作成にも用いられた。酵素活性をもつ酵素は抗体 AntiBody と酵素 enZYME の両方をあわせた略としてアブザイム abzymes (Abzs) と名付けられた。上記の方法で得られたアブザイムは非常に高い酵素活性をもち化学反応の速度を 10^6 倍にも高める(8)。いくつかの例ではアブザイムは酵素よりも高い立体特異性を示す。さまざまなハプテンによる免疫を行うという手法により古典的酵素学でアナログがみつからない新しい酵素活性を得ることも可能である(9)。

酵素活性をもつ抗体を作成するためのよい方法として抗イディオタイプ抗体を作成するという方法が最近開発された。これは酵素の触媒部位に対する抗体に対する二次抗体を作成するものである(10)。

数年前に *in vivo* でも触媒活性をもつ抗体が生成している現象がヒト血清において発見された。最初の報告は喘息や甲状腺炎のような自己免疫疾患患者の血液から分離された IgG がペプチドやタンパク質を加水分解する活性をもつというものであった(11,12)。またこれは酵素活性をもつヒトの自己抗体もアブザイムと呼ばれた最初でもあった。酵素活性をもつすべての抗体にこの名称が与えられるようになった。次に核酸にニックを入れる活性をもつものがヒト自己抗体に見つかった。全身性エリマトーデス(SLE)患者の血液の IgG 分画に顕著な DNA 分解活性があったのである(13,14)。引き続き IgG, IgM の RNA 分解活性がさまざまな自己免疫疾患、多発性硬化症(MS), SLE, ハシモト甲状腺炎、リウマチ性関節炎(15-17)、と関連することが明らかになった。特筆すべきことにインフルエンザ、肺炎、結核の患者と健康者のどちらの血清にも RNA や DNA の分解活性はないのに、健康な母親の母乳の IgG, sIgA には両方の分解活性が発見された(19)。

ヒト自己抗体の触媒活性として最後に見つかったのが澱粉分解活性である。ヒトのアブザイムには異なる α -マルトースオリゴサッカライドとグリコーゲンや澱粉を分解する活性が見

ing of human amyolytic abzymes and the specificity of their action.

B. Amyolytic Abzymes: Where Were They Found ?

All human antibodies with amyolytic activity are able to hydrolyze α 1,4-glucosidic bonds both in polymeric substrates (starch, glycogen, amylose) and maltooligosaccharides with a degree of polymerization (d.p.) greater than 3. In the latter case, amyolytic Abzs yield maltose, maltotriose and maltotetraose as main products of the hydrolytic reactions similarly to α -amylases (E.C. 3.2.1.1) from various sources (21,22). Like traditional exo-amylases, fractions of human Abzs with amyolytic activity hydrolyze also well-known, commercially available substrate, 4-nitrophenyl 4,6-*O*-ethylidene- α -D-maltoheptaoside (EPS), as well as *p*-nitrophenyl (PNP) α -D-maltooligosaccharides or 4-methylumbelliferyl (MeUmb) α -D-maltooligosaccharides (Fig. 1) (23,24). A part of the tested samples showed α -D-glucosidase (E.C.3.2.1.20) action and as such, were able to hydrolyze PNP α -D-glucoside, maltose and maltotriose. Obviously, such amyolytic abzymes produce glucose along with short maltooligosaccharides in the hydrolysis of polymeric and oligomeric substrates. It is glucose that is a final product of the completed hydrolysis catalyzed by human amyolytic Abzs of such mode of action (Fig. 1).

Initially, amyolytic activity was shown in the IgG preparations isolated from the blood of pregnant women and several cancer patients (20). Then, similarly to nuclear acid hydrolyzing activity, amyolytic function was found in IgG and sIgA fractions of human milk (23,24). Specific amyolytic activities*

いだされた (20)。以下にヒトの澱粉分解活性をもつアブザイムの分布と反応の特異性を述べたい。

B. 澱粉分解活性をもつアブザイム：どこで発見されたか？

すべての澱粉分解活性をもつヒト抗体は多糖類（澱粉、グリコーゲン、アミロース）および重合度3以上のマルトースオリゴサッカライドの α 1,4-グリコシド結合を加水分解する。後者の場合アブザイムによる主な生成物はマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースであり、この点はさまざまな由来の α -アミラーゼ (E.C. 3.2.1.1) による生成物と同様である (21,22)。エキソアミラーゼの場合のようにヒトアブザイムはよく知られた市販の基質、4-ニトロフェニル 4,6-*O*-エチリデン α -D-マルトヘプタサイド (EPS)、*p*-ニトロフェニル- (PNP) α -D-マルトースオリゴサッカライド、4-メチルウンベリフェル (MeUmb) α -D-マルトオリゴサッカライドも分解する (図1) (23,24)。一部のアブザイムは α -D-グリコシダーゼ (E.C.3.2.1.20) 活性をもち PNP α -D-グルコサイド、マルトース、マルトトリオースを分解する。明らかに、そのような澱粉分解活性をもつアブザイムの生成物はマルトースオリゴサッカライドの他にグルコースを含んでいる。そうしたアブザイムの反応が完全に進行した場合の最終産物はグルコースである。

最初に澱粉分解活性は妊娠女性やがん患者の血液の IgG 分画にみいだされた (20)。そして核酸ニッキング活性と同様に、ヒトの母乳の IgG, sIgA 分画に見つかった (23,24)。調べられた

Fig. 1. Exo-amyolytic and α -glucosidase activities of human abzymes.

* Here and therein, specific amyolytic activity was defined as an amount of Ig required for formation of 1 μ mole of reducing sugar at pH 7.0, 37°C.

of all 25 tested samples of immunoglobulins obtained from human milk were practically at the same level ranging in 0.15 – 0.25 U/mg (Fig. 2). Samples of milk were taken from healthy human mothers (19 = 35 years old) within the period from 1 week until 3 months of lactation. Higher values for the specific activity (about 1 U/mg) were estimated for IgMs from autoimmune patients suffering from MS and SLE (Fig. 2). It should be noted that stable increased level of amyolytic activity correlates only with IgMs from MS and SLE patients while it is significantly lower (about 20–40 times) for a number of IgG fractions at the same pathologies. Moreover, activity heterogeneity for IgG samples from different donors is quite high (Fig. 3). As a control, IgG and IgM preparations from more than 50 patients not suffering from autoimmune diseases were assayed (25,26). Absolutely in all cases, the level of the specific amyolytic ac-

25 検体のヒト母乳の免疫グロブリンの活性 (0.15~0.25 U/mg) は同程度であった (図2)。母乳は授乳開始 1 週間から 3 ヶ月までの健康な母親 (19 歳から 35 歳) から採取された。MS や SLE の自己免疫疾患患者の IgM は高い比活性を示した (図2)。活性が高いのは IgM であって、同じ患者の IgG の比活性は顕著に低かった (20 から 40 分の 1)。さらに異なるドナーからの IgG サンプルの活性にはばらつきがみられた (図3) (25,26)。いずれの場合においても健常者からの IgG, IgM 分画の澱粉分解活性は自己免疫疾患患者の場合の千分の一以下であった。アブザイムの澱粉分解活性は α -アミラーゼや α -グルコシダーゼそのものの

Fig. 2. Average specific amyolytic activity for different samples of human abzymes.

Fig. 3. A selective set of values for the specific α -amyolytic activities of SLE abzymes in the hydrolysis of PNP maltohexaose.

tivity of Abzs isolated from healthy donors was three orders of magnitude lower than for autoimmune patients and was in the range from 0.05–2 U/mg. It is not less than 10^2 times lower than for traditional α -amylases and α -glucosidases. Similarly low, when compared with putative enzymes, specific activities were demonstrated for proteolytic and nuclear acid nicking abzymes. However, we should remember that we deal with polyclonal antibodies and only part of which can display enzymatic activity. It was reported that at direct immunization with appropriate hapten (active immunization approach) only 1% of total IgGs were catalytic catalyzing the hydrolysis of carbamate insecticide (27). Therefore, we suppose that only 1% of catalytically active amylolytic antibodies can be observed in all investigated human Ig samples. This means that the specific activity of a catalytic fraction increases about 100 times and becomes of the same order as traditional α -amylases (21,22).

C. How to Purify Amylolytic Abzymes Effectively and Prove α -Amylase Activity of Autoantibodies ?

Purification of human catalytic antibodies is a separate problem in abzymology. Indeed, specific enzymatic activity of antibodies is several orders of magnitude lower than for similar putative enzymes. It is conditioned, as mentioned above, by a low amount of catalytic antibodies in the total fraction of human Igs. Therefore, removal of even minor admixtures of traditional enzymes during purification is absolutely essential (23,28).

Another point of issue that should be taken into consideration is the ability of Igs to form non-covalent complexes with various proteins and enzymes, which can be co-eluted with antibody fractions at chromatographic stages of purification (29). Methods of isolating human polyclonal catalytic antibodies both from blood and milk that have been developed include sulfate ammonium precipitation as a first step and two subsequent ion-exchange chromatographies using also FPLC on a Mono Q column (23,25). Then affinity chromatography or immobilized secondary antibodies produced against corresponding Igs are usually used. The final, fifth, step is a gel-permeation chromatography on a Superose 12 or Sephacryl S-200 column equilibrated with 1 M of guanidine chloride. This stage was added to the purification procedure in order to separate immunoglobulins from possible contamination from non-covalently bound enzymes and proteins. To purify IgGs with DNA-nicking activity, affinity chromatography on a column coupled with DNA was used at this stage (30). After all purification stages, Ig fractions are electrophoretically homogenous (23,25). However, homogeneity by SDS electrophoresis is an insufficient criterion to justify the presence of enzymatic activity in Ig fractions in view, first of all, of low specific activity of human Abzs. Several additional rigid criteria have been developed earlier to show the phenomenon of human natural proteolytic and DNA-nicking abzymes (12,14) and should be used each time when natural

活性の百分の一よりは高い。同様に本来の酵素と比較すれば低ながらもタンパク分解活性と核酸ニッキング活性があることも明らかにされている。今議論しているのはポリクローナル抗体であり、活性をもつものはほんの一部にすぎない。ハプテンを直接免疫した場合に得られる酵素活性をもつ IgG は全体の 1% という報告がある (27)。そこで今まで調べられたヒトの免疫グロブリンサンプルにおいても活性をもつものは 1% であると仮定すると、比活性は 100 倍になり本来の酵素と遜色ない値になる (21,22)。

C. 澱粉分解活性をもつアブザイムはどのように精製され、活性をもつことが証明されたのか？

触媒活性をもった抗体を精製するというのはアブザイム研究におけるひとつの課題である。抗体の酵素活性は本来の酵素の活性よりも比活性にして数桁低い。これは抗体の中で活性をもつものはごくわずかであることに起因する。そこで精製段階において本来の酵素を取り除くことが決定的に重要なことになる (23,28)。

もうひとつ考慮しなければならないことは抗体がさまざまなタンパク質や酵素と非共有結合して、それらの物質が精製段階のクロマトグラフィーで抗体と共に溶出されてくることである (29)。血液と母乳から酵素活性をもつポリクローナル抗体を分離するために、まず初めに硫酸沈殿をしてから FPLC の MonoQ カラムを用いた 2 段階のイオン交換カラムクロマトグラフィーが行われる (23,25)。その後アフィニティーカラムクロマトグラフィーやそれぞれの抗体に対する 2 次抗体を固定化したカラムがよく使用される。最後に 1M 塩酸グアニジンで平衡化されたゲル濾過カラム (Superose 12, Sephacryl S-200) が用いられる。最後のステップは抗体に非共有結合的に結合している物質を除くために付け加えられている。DNA ニッキング活性をもつ IgG を精製する場合には DNA を固定化したアフィニティーカラムが最終段階で用いられる (30)。これらの精製段階の終了時には Ig 標品は電気泳動的に均一である (23,25)。しかしヒトアブザイムの比活性が低いことを考えると SDS 電気泳動での均一性は免疫グロブリンそのものに酵素活性があることを証明するに

abzymes are under consideration. Direct evidences of the presence of amylolytic activity for IgG, IgM, and sIgA fractions of human antibodies are summarized as follows: a) complete adsorption of the considered activity by anti-Abs Sepharose and its elution from the adsorbent with buffer of low pH; b) gel-permeation chromatography of Abs under conditions of “acidic shock” (1 M acetic acid, pH 2.6) or in the presence of 6 M guanidine chloride did not lead to a disappearance of the activity, and the peak of activity tracked exactly with Abs (amylolytic activity in the fractions was restored after dialysis); c) Fab fragments obtained by papain digestion of corresponding IgGs and IgMs exhibited the same level of the amylolytic activity. Not less than 80% of initial amylolytic activity restored after acid shock conditions and 6 M guanidine chloride for both IgG and IgM samples as well as with their Fab fragments (20,23,25).

A further approach was used here for the first time, which provided direct evidence that IgG/IgM fractions at autoimmune pathologies and sIgAs from human milk do possess amylolytic activity. After SDS-PAGE of a preparation of native IgG and renaturation, an in-gel assay showed amylolytic activity only in a single protein band corresponding to the complete 150 kDa H_2L_2 -form of IgG (Fig. 4). SDS-electrophoresis in non-reducing conditions following by silver staining of the sIgA fraction revealed two protein bands (300 and 380 kDa), both of which had a positive reaction with anti-IgA Abs by immunoblotting (Fig. 4). The sIgA band of lower electrophoretic mobility corresponded in size to the 380 kDa (L_2H_2)₂JS-form of sIgA containing 1 S-chain, 72 kDa; 4 heavy-chains, 62 kDa; 4 light-chains, 23 kDa and 1 J-chain, 23–26 kDa. The 300 kDa form of the Ab with higher electrophoretic mobility lacks one of the subunits

は不十分である。ヒトアブザイムのタンパク質分解活性やDNA ニッキング活性を示すためにいくつかの厳しい検討がおこなわれ (12、14)、同様な検討は新規のアブザイムに対して要求される。IgG, IgM, および sIgA 分画の澱粉分解活性を示す直接的な証拠は以下の通りである。a) 抗抗体セファロースにより酵素活性が完全に吸収され低い pH で溶出されること; b) 酸性条件 (1 M 酢酸、pH 2.6) または 6M 塩酸グアニジン存在下においてもゲル濾過カラムクロマトグラフィーでの酵素活性のピークが消失せず、ピーク位置が抗体そのものの溶出位置と一致すること (澱粉分解活性は溶出サンプルの透析の後にも保持された); c) IgG や IgM をパパイニン処理して得られる Fab フラグメントにも同程度の澱粉分解活性があること。実際に IgG および IgM サンプルおよびその Fab フラグメントの澱粉分解活性の 80 % 以上は酸性条件や 6M 塩酸グアニジン存在下にも保持された (20、23、25)。

さらに自己免疫疾患患者の IgG/IgM 分画と母乳の sIgA が澱粉分解活性をもつことを示すために初めて用いられた方法を紹介する。非還元状態で SDS ポリアクリルアミド電気泳動をおこなったのちにゲル内で巻き戻しをおこない澱粉分解活性を測定すると、活性は IgG の H_2L_2 -型の分子量である 150 kDa の位置に一致して検出された (図4)。sIgA 分画を非還元状態において SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離して銀染色をおこなうと 300 および 380 kDa の 2 本のバンドがみられ、そのいずれもが抗 IgA 抗体により認識された (図4)。移動度の遅い方のバン

Fig. 4. *In situ* gel assay of amylase activity of catalytic IgG (A) and sIgA (B) Abs (5–7 μ g per sample) by SDS-PAGE. After electrophoresis the gel was incubated in conditions for renaturation of protein (see Methods) and then the amylase activity was revealed using extracts of 2 mm slices of the gel (activity shown on the right). Other lanes of the same gel were stained with silver (lanes 2) or were used for revealing the position of the IgG and sIgA by immunoblotting with conjugates of alkaline phosphatase with specific polyclonal anti-IgG (A) and anti-IgA (B) antibodies (lanes 1).

of the complete $(L_2H_2)_2$ JS-oligomeric form of sIgA and corresponds to a sIgA₂ type of Ab in which not all light chains are linked covalently to the oligomer by disulfide bonds; such molecules of sIgA can lose light subunits under drastic conditions of Abz purification (23,31). Elution of IgG and both sIgA fractions from the gel after separation by SDS-PAGE allowed isolation of Ab fractions with amylolytic activity.

As may be seen (Fig. 4), the amylolytic activity strongly corresponds to immunoglobulin bands (23). Similar results were obtained for IgMs from patients suffering from Ms and SLE (25,26). Since SDS dissociates all protein complexes and the electrophoretic mobility of hypothetical contaminating enzymes cannot coincide at the same time with that of IgM and IgG, the detection of amylolytic activity in the gel region corresponding only to the Abs, together with the absence of other bands of the activity or protein, provides direct evidence that the Abs possess amylolytic activity.

Subsequently, we can conclude that we deal with amylolytic activity of human immunoglobulins. Knowledge of kinetic characteristics and mode of action of amylolytic abzymes gives us additional evidence for this.

D. Hydrolytic Properties of Amylolytic Abzymes

Hydrolytic parameters of sIgAs and IgGs from human milk as well as IgGs and IgMs from MS and SLE patients were studied in the hydrolysis of starch as well as α -D-maltooligosaccharides and PNP-modified α -D-maltooligosaccharides of different length. Values for pH optima of hydrolysis both polymeric, oligomeric and artificial substrates do not vary and lay in the range of 6.5–7.0 for most of the tested samples. Only a part of IgMs from MS patients has more acid pH optimum at 4.5–5.5 (23–25,32). It should be noted that, in all cases, the hydrolytic reactions followed Michaelis-Menten kinetics expressed in linearity of Lineweaver-Burk plots. Values for K_M and k_{cat} and subsequently the ratio k_{cat}/K_M were calculated with the assumption that total

ドは $(L_2H_2)_2$ JS 型の 380 kDa の sIgA (ひとつの 72 kDa S 鎖、4 本の 62 kDa の H 鎖、4 本の 23 kDa の L 鎖、および 1 本の 23–26 kDa の J 鎖からなる)に相当した。300 kDa のバンドは $(L_2H_2)_2$ JS 型オリゴマーのサブユニットのひとつを欠くものであり sIgA₂ に相当する。これは全ての L 鎖が共有結合している訳ではないので過激な精製条件で L 鎖を消失している (23,31)。SDS 電気泳動後のゲルから澱粉分解活性をもった IgG や 2 種類の sIgA を溶出することができる。

図 4 からわかるように澱粉分解活性は免疫グロブリンのバンドと一致している (23)。同様な結果は MS や SLE の患者の IgM についても得られた (25,26)。SDS はタンパク質の複合体を解離させ、IgM と IgG と同じ挙動をする酵素はありえないので、電気泳動のゲルで抗体の位置にのみ活性が見いだされたということはその抗体自身が澱粉分解活性をもっていることを示す直接的な証明になる。

そこで私たちはヒト免疫グロブリンが澱粉分解活性をもつと結論することができる。アブザイムの反応定数や反応のメカニズムからさらに詳しい情報が得られる。

D. 澱粉分解活性をもつアブザイムの加水分解様式

母乳の sIgAs と IgGs、Ms や SLE 患者の IgG と IgM による加水分解定数は澱粉、鎖長の異なる α -D-マルトオリゴサッカライドおよびその PNP 修飾されたものを基質として調べられた。至適 pH はほとんどのサンプルにおいてポリマー、オリゴマー、人工基質のいずれを用いた場合にも 6.5–7.0 の範囲であった。一部の MS 患者の IgM だけが酸性の至適 pH (4.5–5.5) を示した (23–25,2)。すべての場合において反応はミカエリスメンテン

Table I. Kinetic parameters of hydrolysis of PNP maltopentaose catalyzed by several different Abz preparations.

Fraction of immunoglobulin*	K_M , mM	$k_{cat} \cdot 10^3$, s ⁻¹	k_{cat}/K_M , (mM · s) ⁻¹ 1% Abz
IgM ₂ (MS patient)	0.013 ± 0.001	84 ± 1	646 ± 1
IgM ₄ (MS patient)	0.54 ± 0.01	276 ± 3	51 ± 3
IgG ₈ (MS patient)	0.16 ± 0.01	105 ± 3	63 ± 3
IgM ₃ (SLE patient)	0.02 ± 0.001	290 ± 3	145 ± 3
IgG ₃ (SLE patient)	0.22 ± 0.01	205 ± 3	93 ± 3
IgM ₅ (SLE patient)	0.44 ± 0.01	805 ± 3	183 ± 3
IgG ₂ (human milk)	0.16 ± 0.01	54 ± 1	33 ± 1
IgG ₆ (human milk)	0.14 ± 0.01	10 ± 1	8 ± 0.5
sIgA ₁₆ (human milk)	0.12 ± 0.01	25 ± 1	20 ± 1
sIgA ₃₃ (human mik)	0.14 ± 0.01	28 ± 1	21 ± 1

*Subscripts correspond to patient numbers.

Ig fraction contains not more than 1% of amylolytic abzymes. Kinetic data for the hydrolysis of PNP maltohexaose catalyzed by abzymes from human milk and patients with autoimmune diseases are given in Table I. In contrast to sIgAs and IgGs from human milk, for which K_M values were in the range 0.1–0.2 mM (23), only some IgM samples from MS and SLE patients showed K_M values of two orders of magnitude lower (25,26). Such low (in μmol range) values of K_M are characteristic for human Abzs reported for DNA and protein-hydrolyzing polyclonal IgGs from human sera and milk (12,14,33). Analysis of obtained data on catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M), which were calculated based on the assumption that 1% of total Igs are amylolytic, show that the values are in the range from 10^2 to 10^4 ($\text{s} \cdot \text{mM}^{-1}$) that, in principal, coincide with catalytic efficiency of traditional glycoside hydrolases. The most important characteristic of the hydrolytic reactions catalysed by antibodies is a ratio $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$, which for amylolytic Abzs ranges in 10^4 – 10^5 and is similar for most other abzymes (1–4).

The dependence of the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) on the substrate length can be used to derive useful information about the active site of the depolymerases, namely the number of substrate binding sites available for oligomeric substrates. The dependence of the kinetic parameters K_M and k_{cat} on the substrate length was investigated with IgM fractions isolated from MS patients. IgMs tested did not exhibit α -glucosidase activity and were not able to cleave the short substrates PNPG₂ and PNPG₃, although they were active towards PNPG₄ through PNPG₈, thus demonstrating an exo-pattern of action. Values for k_{cat} decrease as the degree of substrate polymerization increases, while the effect of the substrate length on the K_M is more com-

型を示し、両逆数プロットは直線上にのった。 K_M と k_{cat} 値とその比 k_{cat}/K_M はアブザイムは全免疫グロブリンのうちの1%であるという仮定で計算された。母乳と自己免疫疾患患者のアブザイムによるPNPマルトヘキソースの分解の酵素学的定数を表Iに示す。母乳のsIgAsとIgGsの場合の K_M 値は0.1–0.2 mMであるのに対して(23)、MSやSLE患者からのIgMのあるものはきわめて低い K_M 値を示した(25,26)。そのように低い K_M 値Yはヒトの血清や母乳のIgGのDNAやタンパク質分解活性をもつアブザイムに特有なものである(12,14,33)。アブザイム含量を1%と仮定して計算した場合の触媒効率(k_{cat}/K_M)の値は 10^2 to 10^4 ($\text{s} \cdot \text{mM}^{-1}$)であってグリコサイドハイドロラーゼのものと同程度である。抗体による加水分解反応でもっとも重要な値は(k_{cat}/K_M)である。澱粉分解活性をもつアブザイムでは 10^4 – 10^5 であり他のアブザイムの場合と似た値である(1–4)。

k_{cat}/K_M 値の基質の長さに対する依存性から触媒部位の数、すなわち基質の結合の部位の数に関する知見が得られる。MS患者のIgMについて K_M と k_{cat} の基質の長さに対する依存性が検討された。このIgMは α -グルコシダーゼ活性をもたず短いPNPG₂とPNPG₃を分解することはできないがPNPG₄からPNPG₈までは分解できた。これはエキソ型の作用を示している。鎖長が長くなるほど k_{cat} 値は低下した。 K_M 値に対する効果はもっと複雑であった。いくつかのサンプルにおける加水分解反応の基質重

Fig. 5. Comparison of the relative velocity values for the abzyme-mediated hydrolysis of PNP maltooligosaccharides with d.p. 4–7 by several selected immunoglobulins. Numerals correspond to patient numbers.

plex. Dependences of hydrolytic velocities on d.p. of the substrates for several preparations are given in Fig. 5.

One more characteristic of subsite structure of amylolytic Abzs can be the inhibition constants (K_i), which were estimated for α -D-maltooligosaccharides of different lengths using EPS as a substrate. It should be noted that in all cases the inhibition of EPS-maltoheptaoside hydrolysis by maltooligosaccharides was competitive with respect to the substrate. For sIgA fractions from human milk, glucose, maltose, and maltotriose inhibited hydrolysis of EPS-hexaoside at a high concentration ($K_i > 20$ mM), while further lengthening of the oligomer led to a graduate increase of the ligand's affinity. Interestingly, the K_i value for maltohexaoside is of the same order of magnitude as the K_M values for EPS-hexaoside for several preparations of IgG and sIgA (23,24).

Transglycosylation, an inversion of the hydrolytic reaction, is a well-known feature of retaining glycoside hydrolases. Transglycosylating ability has been reported for α -amylases including human salivary α -amylase (34), a retaining glycosidase devoted to 13 glycoside hydrolase family according to Henrissat classification (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) (35). The reactions of substrate transglycosylation using various PNP maltooligosaccharides were studied for a set of different types of Igs exhibiting amylolytic activity. The transglycosylating activity of Abzs was investigated in the reaction of PNP G_3 using substrate concentrations up to 150 mM. As demonstrated by HPLC and TLC analysis, none of the amylolytic Ig fractions produced PNP maltooligosaccharides with a d.p. greater than 3, as would be expected if transglycosylation was occurring. When PNP G was used as a substrate for abzyme transglycosylation, neither PNP G_2 nor PNP G_3 were detected in the reaction mixture. Furthermore, the transglycosylation activity of selective IgMs was analysed using PNP G_4 , PNP G_5 , and PNP G_6 at 10 mM concentration. In all cases, no transglycosylation products were detected. The same behaviour demonstrated sIgAs and IgGs isolated from human milk.

D. Catalytic Microheterogeneity of Abz Action

Differences in Abz's action modes show much more clearly the catalytic heterogeneity of Igs than comparison of kinetic parameters of different preparations of human Abzs. The most vivid difference is that a part of Ig samples exhibits exo-amylase activity, while another demonstrates also α -glucosidase action expressed in Abz ability to hydrolyze short maltooligosaccharides. Therefore, all tested Ig preparations can be divided into two main groups according to their action patterns. Such differences in action modes have been detected for all studied types of immunoglobulins with amylolytic activity (22-26). Data on the presence of α -D-glucosidase activity (*i.e.* the ability to cleave off PNP α -D-glucopyranoside) in different samples of IgM and IgG from MS patients are introduced in Fig. 6.

合度への依存性を図 5 に示す。

澱粉分解活性をもつアブザイムの触媒部位の構造に関するもうひとつの情報として EPS ヘキシサイドを基質とした場合の鎖長の異なる α -D-マルトオリゴサッカライドの阻害定数 (K_i) があげられる。この阻害の様式はいつでも拮抗的であった。ヒト母乳の sIgA 分画においてグルコース、マルトース、マルトトリオースの阻害定数は 20 mM 以上であったがオリゴマーがさらに長くなると親和性が徐々に増加した。いくつかの IgG, sIgA においてマルトヘキサオースの阻害定数は EPS-ヘキシサイドの K_M 値と同程度である (23,24)。

加水分解反応の逆反応であるトランスグリコシレーションはグリコシド結合分解酵素のよく知られた性質である。トランスグリコシレーション活性はヒト唾液腺 α -アミラーゼ (34)、Henrissat の分類 (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) による 13 種類のグリコシド分解酵素ファミリー (35) について報告されている。さまざまな PNP マルトオリゴサッカライドを用いて澱粉分解活性をもつ免疫グロブリンのトランスグリコシレーション活性が調べられた。150 mM までの基質濃度に対して PNP G_3 へのトランスグリコシレーションの活性が測定された。HPLC と TLC 分析の結果では澱粉分解活性をもつ免疫グロブリンによる鎖長が 3 より長い PNP マルトオリゴサッカライド (トランスグリコシレーションが起こった場合に想定される生成物) の生成は認められなかった。PNP G をアブザイムトランスグリコシレーションの基質として用いた場合 PNP G_2 も PNP G_3 も検出されなかった。さらに IgM に対して 10 mM までの PNP G_4 , PNP G_5 , and PNP G_6 を用いた場合にもトランスグリコシレーションの生成物は検出されなかった。母乳の sIgA, IgG においても同様な結果であった。

D. アブザイムの触媒作用の多様性

異なるヒトアブザイム標品において速度パラメーターよりも作用メカニズムにおいてより明確な不均一性が見られる。もっとも顕著な差はある種の免疫グロブリンはエキソ型アミラーゼ活性を示すのに対して、あるものは短いマルトオリゴサッカライドも分解できるグルコシダーゼ活性をもつ点である。澱粉分解活性をもつ免疫グロブリンはいずれも作用にもとづいて 2 つのグループに分類できる (22-26)。異なる MS 患者の IgM, IgG の α -D-グルコシダーゼの検出 (PNP α -D-グルコピラノシドの分解) の結果を図 6 に示す。

Fig. 6. α -Glucosidase activity in PNP-Glc hydrolysis effected by IgMs and IgGs preparations from sera of SLE patients.

Analysis of a ratio of hydrolytic products within both groups (exo-amylolytic Abzs and exo-amylase/ α -D-glucosidase acting antibodies) also reveals catalytic microheterogeneity. Thus, several preparations of human milk sIgA and IgG devoted to the exo-amylase action group showed differences in relative contents of the hydrolytic products after the same conversion of maltooligosaccharides with d.p. 3-6 for each of the abzyme samples (23).

Reliable evidence of microheterogeneity of modes of action can be derived from the analysis of hydrolytic activities of Abzs using artificial substrates, PNP- or MeUmb α -D-maltooligosaccharides with various d.p. Product comparison of the MeUmb maltotetraose hydrolysis by a set of SLE IgMs resulted also in distinguishing of Abzs into two groups: the first was able to liberate free MeUmb during the hydrolysis in contrast to another one. Therefore, within exo-amylase-like acting Abzs we see two sub-groups, differentiated by their modes of action. The first is unable to bind MeUmb in the site +1 of the active center while the second performs this connection yielding free MeUmb during the hydrolysis (Fig. 7).

From our point of view, the most reliable evidence for the inherent amylolytic activity of human antibodies is a variability of action patterns displayed by abzyme fractions. One could only explain differences in samples isolated by a standard procedure by the presence of contaminating enzymes with different types of amylolytic activity in milk and sera of different donors, a hypothesis which we believe is very unlikely.

Summarizing all the results obtained on enzymatic properties of amylolytic human antibodies, we can show vivid differences between traditional human α -amylases and amylolytic antibodies. First of all, it is commonly accepted that α -amylases are retaining glycoside hydrolases, which possess transglycosylating abilities (34). Contrariwise, amylolytic abzymes do not reveal any transglycosylating properties. Sec-

エキソ型アミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性との比も触媒活性の不均一性を示している。エキソ型アミラーゼ活性をもついくつかの母乳の sIgA, IgG 標品において重合度 3-6 のマルトオリゴサッカライドの分解産物の相対的な割合には差異がみられる (23)。

作用機序に不均一性があることを示す信頼できる根拠は重合度の異なる PNP-およびメチルウンベリル α -D-マルトオリゴサッカライドを人工基質として用いたアブザイムの加水分解作用の解析によって得られる。SLE 患者の IgM によるメチルウンベリルマルトオリゴサッカライドの加水分解物の比較によっても 2 つのグループが区別できる：メチルウンベリルを遊離できるものとできないものに。エキソ型アミラーゼ様アブザイムの中でも作用の異なる 2 つのグループがある。1 つはメチルウンベリルを活性部位の +1 位に結合できないもので、もう 1 つは +1 位に結合することによりメチルウンベリルを加水分解の途中で遊離するものである (図7)。

私たちの考えではアブザイム分画の作用の多様性こそヒト抗体に固有の澱粉分解活性があることを示すもっとも強い証拠となる。サンプル間の差異を、混入している酵素の差異 (異なるドナーからの血清と母乳の酵素) だけで説明する仮説はきわめて考えにくいものである。

澱粉分解活性をもつヒト抗体の酵素学的性質をまとめると α -アミラーゼと澱粉分解酵素活性をもつ抗体との明確な差を示すことができる。第一に α -アミラーゼにはグルコシド分解活性がありトランスグリコシレーション活性をもつことがよく知られている (34)。これに対して澱粉分解活性をもつアブザイムにはトランスグリコシレーション活性はない。第二にアブザイム

Schematic representation of amylolytic abzyme active center and its binding sites

Fig. 7. Different action-patterns for SLE amylolytic abzymes.

ond, it is an independence of the initial rate of the hydrolysis by abzymes on the length of a substrate while human salivary α -amylase show linear increase of the initial hydrolytic velocity along with substrate degree of polymerization (21,22). Third, human salivary α -amylase requires chloride ions for the activity (36) in contrast to amylolytic antibodies. Undoubtedly proved inherent amylolytic activity of immunoglobulins is essential due to one more reason. The association of α -amylase with immunoglobulin fractions from human blood has been described in a macroamylasemia disease in which human sera α -amylases formed high molecular weight complexes associated with blood immunoglobulins (37).

E. Why do Abzymes Appear ? Hypotheses for Mechanisms of Formation

Although the first catalytic antibodies were discovered in the blood of humans about ten years ago, there is no unequivocal explanation of the mechanism of arising abzymes with enzymatic activities both in the sera of patients with autoimmune pathologies and in milk of clinically healthy women. Many investigators who are working in a field of abzymes agree that both mechanisms widely used for the generation of monoclonal antibodies *in vitro* (immunization against 'transition-state analog' of the reaction and approach of anti-idiotypic antibodies) could be realized in the formation of catalytic human antibodies. For example, catalytic polyclonal antibodies capable of hydrolyzing carbamate ester were reported to be produced after immunization against transition-state analog conjugated with BSA (27). It was Jerne *et al.* who introduced anti-idiotypic hypothesis of antibody formation (Fig. 8) (38). In anti-idiotypic sequence, Ab1 is antibody against the enzyme active center (an-

による加水分解の初速度は基質の重合度に依存しないがヒト唾液腺 α -アミラーゼの場合は重合度の増加とともに反応の初速度も直線的に増加する (21,22)。第三にヒト唾液腺 α -アミラーゼは活性に塩素イオンを必要とするが(36)、酵素の場合は必要としない。免疫グロブリンには α -アミラーゼの結合では説明できない固有の澱粉分解活性があることを示すもうひとつの理由がある。それは巨大アミラーゼ血症において血清中の α -アミラーゼが免疫グロブリンと結合した場合には高分子量の複合体を形成することである (37)。

E. なぜアブザイムは出現するのか？ 生成メカニズムに関する仮説

活性をもつ抗体がヒトの血液中に発見されてから約10年になるが自己免疫疾患患者の血清と健康な母親の母乳にアブザムが出現する理由は完全にはわかっていない。アブザイムの研究者の多くはアブザイムの生成には *in vitro* におけるモノクローナル抗体の生成 (遷移状態アナログに対する免疫や抗イデオタイプ抗体の作成) を適用できると考えている。たとえばBSAに結合させた遷移状態アナログを免疫することによりカルバメートエステルを加水分解できる抗体を作成できることが報告されている (27)。Jerneらは抗イデオタイプ抗体の仮説を導入した (図8) (38)。

Ab1は酵素の触媒部位を抗原とする抗体である。Ab2はAb1

Fig. 8. Schematic representation of formation of anti-idiotypic antibodies.

tigen); Ab2 is a secondary antibody against fragments of Ab1 and can have a similar primary and tertiary structure with the enzyme active center and therefore, display enzymatic activity. This sequence can be prolonged yielding catalytically inactive Ab3 and active Ab4.

In a number of works was shown that autoimmune diseases, in particular MS, associate with a large amount of DNA fragments and DNA-binding antibodies found in the sera of patients (39). It also strongly correlates with the existence of DNA-nicking catalytic antibodies. Therefore, we can suppose that some conformers of DNA fragments in the sera of donors with autoimmune pathologies quite precisely imitate the transition state of DNA hydrolysis leading subsequently to the generation of catalytic antibodies in frames of the first suggested approach. However, the second, 'anti-idiotypic' approach also can work here assuming that primary, secondary and further antibodies are being elicited against DNA-binding antibodies, which arise initially in the sera of patients with autoimmune diseases.

We cannot also exclude the possibility that some potential antigens can change their conformation due to interaction with certain proteins or enzymes and, as a consequence, the structure of the antigens in such complexes can mimic the structure of the transition state of the reaction involving this antigen conversion. It should be noted that a link between autoimmune disease and autoantibody-mediated catalysis is also suggested by observations that a mouse strain with a genetic predisposition to autoimmune disease mounts unusual catalytic antibody responses to transition state analogs (40).

What possible mechanisms of abzyme formation are there in human milk? Human milk contains various types of Abzs (IgG, IgM, IgA and sIgA), of which sIgA is the major component (> 85–90 %). As reported earlier, IgG and sIgA from healthy mother's milk possesses different catalytic activities. Moreover,

に対する2次抗体であり、酵素の触媒部位に似た1次構造および3次構造をとるために酵素活性をもつ。このような反応が続くと活性をもたないAb3および活性をもつAb4が出現する。

自己免疫疾患、特に多発性硬化症では、血清中に大量のDNA断片とDNAに結合する抗体がみられる(39)。これはDNAニッキング活性をもつ抗体の存在と密接に関係する。このことから自己免疫疾患患者の血清中のDNA断片はきわめて正確に加水分解中のDNAの遷移状態に近い構造をとるために酵素活性をもつ抗体を出現させるのではないかという推論が生まれる。また第二の仮説である抗イディオタイプ抗体説も考えられる。すなわち自己免疫疾患患者の血清中にDNAに結合する自己抗体が存在していて、それに対する抗体が次々に産生されるというものである。

潜在的な抗原が、あるタンパク質または酵素との相互作用により構造変化を起こして遷移状態と近い構造をとる可能性も否定できない。自己免疫疾患になりやすい遺伝的傾向のあるマウスの系統では遷移状態アナログに対する抗体の反応性が異常であるという報告は自己免疫疾患と自己抗体による触媒反応との間の関連性を示唆する(40)。

ヒト母乳におけるアブザイム生成のしくみはどのようなものだろうか。ヒト母乳にはさまざまなアブザイム(IgG, IgM, IgA and sIgA)が含まれ、なかでもsIgAが主成分である(> 85–90 %)。初期に報告されたようにヒト母乳のIgGとsIgAでは触媒活性が異なる。さらに活性をもつIgGが授乳期の母親の血清にも検出される。粘膜免疫では体液免疫とは異なる抗体、特に分

catalytic IgGs were detected in blood sera of mothers during the lactation period. Different antibodies and especially secretory immunoglobulins A are the main effectors of the mucosal immune system and their protective aspects are well documented (41). Milk contains a wide array of Abs to bacterial, viral, and protozoal antigens (42) with antimicrobial activity, which reach mucosal surfaces of intestinal and respiratory tracts and as a result protect infants from infection and disease. However, the mechanism by which sIgAs exert their antimicrobial activity is still a matter of debate. As yet, many sIgA protective functions have been demonstrated such as neutralisation and agglutination of pathogens, activation of alternate complement pathways, inhibition of foreign antigen entry into the mucosa and attachment (43). Pregnancy could "activate" or "trigger" autoimmune-like manifestations in clinically healthy women, and a sharp exacerbation of autoimmune reactions can occur in some cases soon after childbirth. Recently, it was demonstrated that a process of autoimmunization leading to production of natural Abs occurs both in serum of healthy pregnant women and in the milk of lactating mothers. It is more than likely that the formation of such an amount of polyclonal catalytic antibodies in human milk may be explained by anti-idiotypic theory.

What are the possible pathways of formation of amyolytic abzymes in humans with autoimmune diseases and in human milk? One can suppose that similar mechanisms occur in both cases due to quite strong similarity in enzymatic properties between IgM/IgG preparations from autoimmune patients and autoantibodies from human milk. A short review of successful attempts to produce monoclonal antibodies with glycoside hydrolase activities *in vitro* can clarify this question. A well-known analogue of transition state of glycoside hydrolase reactions, 1-deoxynajirimycin (an inhibitor of α -glucosidases and glucoamylases) (44), was used several times after its modification with PNP for generation of monoclonal antibodies (45). It has also been shown that even glycoside hydrolase inhibitors not conjugated to a carrier protein can act as haptens for the production of antibodies with targeted glycosidase activity. As a result, abzymes displayed k_{cat}/K_M ratios in the range 100–1000 ($s \cdot mM$)⁻¹ and possessed various glycoside hydrolase specificities. Thus, series of monoclonal antibodies manifesting β -D-glucosidase, α/β -D-galactosidase, β -D-N-acetylglucosaminidase, β -D-fucosidase activities along with α -glucosidase function were reported (45,46). Such absence of strict specificity can be explained if we take into consideration that transition state analogues imitating pyranose rings do not give absolute specificity towards glucose at immune response. In our case, the absence of other glycoside hydrolase activities than α -amyolytic and α -glucosidase activities in IgM/IgG fractions isolated from the sera of autoimmune patients suggests that at a quite high degree of probability anti-idiotypic mechanism of their generation occurs at autoimmune pathologies. Indeed, this approach can lead

泌型 IgA (sIgA)、が中心的な役割を果たして生体防御にかかわることはよく知られている (41)。母乳には細菌、ウイルス、から寄生虫といったさまざまな抗原に対する抗菌作用をもつ抗体が含まれ (42)、乳児の小腸や気道の粘膜面からの感染や病気をくい止めている。sIgA の抗菌作用についてはまだ議論があるが、病原体の中和や凝集、補体系活性化、外来抗原の進入や接着阻止といったさまざまな防御的作用が示されている (43)。妊娠は健康な女性に自己免疫疾患に似た応答を活性化させる、または引き起こすものであり、出産直後から自己免疫応答が昂進する。最近、アブザイム生成に至る自己免疫応答は健康な妊娠している女性の血清においても授乳中の母親の母乳においても起こっていることが示された。ヒト母乳における触媒活性をもつポリクローナル抗体の生成は抗イディオタイプ抗体によるものであるかもしれない。

自己免疫疾患患者と母乳に澱粉分解活性をもつアブザイムが出現する経路はどのようなものだろうか。自己免疫疾患患者の IgM/IgG 分画とヒト母乳の自己抗原の酵素学的性質はきわめて似ているので両者は共通したしくみで生成されと考えられる。グリコシド結合分解活性をもつモノクローナル抗体を *in vitro* で作成することに成功した試みからこの問題を考えてみよう。よく知られているグリコシド結合分解反応の遷移状態アナログ、1-デオキシナジリマイシン (α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの阻害剤) (44)、は PNP で修飾された後にモノクローナル抗体を作成するために用いられた (45)。キャリアタンパク質に結合させていないグルコシダーゼ阻害剤であってもグルコシダーゼと同じ活性をもつ抗体が生じた。得られたアブザイムの k_{cat}/K_M 値は 100~1000 ($s \cdot mM$)⁻¹ であり α -グリコシド結合をもつさまざまな基質に対して反応した。すなわち β -グルコシダーゼの他に α/β -D-ガラクトシダーゼ、 β -D-N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -D-フコシダーゼ 活性をもつ一連のモノクローナル抗体が報告された (45,46)。このように厳密な基質特異性がないことはピラノース環を真似た遷移状態アナログが免疫応答においてはグルコースとして特異的に認識されなかったためと考ええると説明できる。一方自己免疫疾患患者の血清の IgM/IgG 分画の場合は澱粉分解活性とグルコシダーゼ活性以外のグリコシド結合分解活性をもたないので、遷移状態アナログに対する抗体産生よりは抗イディオタイプ抗体産生によるアブザイム出現の可能性が高い。抗イディオタイプ抗体の場合には高い立体特

to high stereospecificity and stereoselectivity of abzymes produced in human sera and milk.

The discovery of the phenomenon of amylolytic autoantibodies at autoimmune abnormalities reveals direct therapeutic effect. As individual MS patients demonstrate a broad range of clinical symptoms, types of disease progress, and autoimmune status, etc, the definitive diagnosis of MS is still a very difficult challenge. Since in our experiments nearly 100 % of the MS patients were characterized by high amylolytic activity of IgMs, analysis of this activity by highly sensitive methods using 4-methylumbelliferyl maltooligosaccharides can probably be used as an additional criterion for this pathology.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Presidium of Academy of Sciences (Program “Physico-Chemical Biology”), RFBR (No. 03-04-48756) and a grant from the 6-th Competition-Examination for Young Scientists of RAS on Fundamental and Applied Researches.

異性と立体選択性をもつことが可能である。

自己免疫疾患における澱粉分解活性をもつ自己抗体の発見は臨床応用に直結する。多発性硬化症は臨床的にさまざまな兆候、症状の経過、自己免疫の状態を示し確定診断は現在でも非常にむずかしい。私たちの研究では多発性硬化症患者はほぼ100%の場合においてIgMに高い澱粉分解活性がみとめられた。4-メチルウンベリフェリル マルトースオリゴサッカライドを用いた高感度測定法は多発性硬化症の新しい診断法として利用可能であろう。

東京医科歯科大学歯学部
横山 三紀訳

References

1. Tramontano, A., Janda, K.D., and Lerner, R.A. (1986) *Science* **234**, 1566–1569
2. Lerner, R.A., and Tramontano, A. (1981) *Sci. Am.* **258**, 58–60
3. Lerner, R.A., Benkovic, S.J., and Shultz, P.J. (1991) *Science* **252**, 659–667
4. Benkovic, S.J. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 29–54
5. Li, T., Janda, K.D., Ashley, J.A., and Lerner, R.A. (1994) *Science* **264**, 1289–1293
6. Janda, K.D., Weinhouse, M.I., Schloeder, D.M., and Lerner, R.A. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1274–1275
7. Janda, K.D., Shevin, C.G., and Lerner, R.A. (1993) *Science* **259**, 490–492
8. Hilvert, D. (1992) *Pyre Appl. Chem.* **64**, 1103–1113
9. Suzuki, H. (1994) *J. Biochem.* **115**, 623–628
10. Izadyar, L., Friboulet, A., Remy, M.H., Roseto, A., and Thomas, D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8876
11. Paul, S., Volle, D.J., Beach, C.M., Jonson, D.R., Powell, M.J., and Massey, R.J. (1989) *Science* **244**, 1158–1162
12. Kalaga, R., James, L.L., O'Dell, J.R., and Paul, S. (1995) *J. Immunol.* **155**, 2695–2702
13. Shuster, A.M., Gololobov, G.V., Kvashuk, O.A., Bogomolova, A.E., Smirnov, I.V., and Gabibov, A.G. (1992) *Science* **256**, 665–667
14. Gololobov, G.V., Chernova, E.A., Schourov, D.V., Smirnov, I.V., Kudelina, I.A., and Gabibov, A.G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 254–257
15. Vlassov, A., Florentz, C., Helm, M., Naumov, V., Buneva, V., Nevinsky, G., and Giege, R. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 5243–5250
16. Andrievskaia, O.A., Buneva, V.N., Naumov, V.A., and Nevinsky, G.A. (2000) *Med. Sci. Monit.* **6**, 460–470
17. Nevinsky, G.A., and Buneva, V.N. (2002) *J. Immunol. Methods* **269**, 235–245
18. Kanyshkova, T.G., Semenov, D.V., Chlimankov, D.Y., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (1997) *FEBS Lett.* **416**, 23–27
19. Buneva, V.N., Kanyshkova, T.G., Vlassov, A.V., Semenov, D.V., Khlimankov, D.Y., Breusova, L.R., and Nevinsky, G.A. (1998) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **75**, 63–76
20. Savel'ev, A.N., Eneyskaya, E.V., Shabalin, K.A., Filatov, M.V., and Neustroev, K.N. (1999) *Prot. Pept. Lett.* **6**, 179–184
21. Brayer, G.D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E.H., Braun, C., Wang, Y., Nguyen, N.T., Overall, C.M., and Withers, S.G. (2000) *Biochemistry* **39**, 4778–4791
22. Suganuma, T., Ohnishi, M., Hiromi, K., Nagahama, T. (1996) *Carbohydr. Res.* **282**, 171–180
23. Savel'ev, A.N., Kanyshkova, T.G., Kulminskaya, A.A., Buneva, V.N., Eneyskaya, E.V., Filatov, M.V., Nevinsky, G.A., and Neustroev, K.N. (2001) *Clin. Chim. Acta* **314**, 141–152
24. Ivanen, D.R., Kulminskaya, A.A., Ershova, N.A., Eneyskaya, E.V., Shabalin, K.A., Savel'ev, A.N., Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A., and Neustroev, K.N. (2002) *Biologia (Bratislava)* **57**, 253–260
25. Saveliev, A.N., Ivanen, D.R., Kulminskaya, A.A., Ershova, N.A., Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Mogelnitskii, A.S., Doronin, B.M., Favorova, O.O., Nevinsky, G.A., and Neustroev, K.N. (2003) *Immunol. Lett.* **86**, 291–297
26. Neustroev, K.N., Ivanen, D.R., Kulminskaya, A.A., Brumer, 3rd, H., Saveliev, A.N., Nevinsky, G.A. (2003) *Human Antibodies* **12**, 31–34
27. Wang, J., Han, Y., Wilinon, M.F. (2001) *Biochem. J.* **360**, 151–157
28. Paul, S., Li, L., Kalaga, R., O'Dell, J., Dannenbring, R.E. Jr., Swindells, S., Hinrichs, S., Caturegli, P., and Rose, N.R. (1997) *J. Immunol.* **159**, 1530–1536
29. Paul, S., Mei, S., Mody, B., Eklund, S.H., Beach, C.M., Massey, R.J., and Hamel, F. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16128–16134
30. Gololobov, G.V., Mikhlap, S.Y., Starov, A.V., Kolesnikov, A.V., and Gabibov, A.G. (1994) *Appl. Biochem. Biotech.* **47**, 303–315
31. Nevinsky, G.A., Kit, Y.Y., Semenov, D.V., and Buneva, V.N. (1998) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **75**, 77–91

32. Ivanen, D.R., Kulminskaya, A.A., Shabalin, K.A., Isaeva-Ivanova, L.S., Ershova, N.A., Saveliev, A.N., Nevinsky, G.A., and Neustroev, K.N. (2003) *Med. Sci. Monit.* in press
33. Lacroix-Desmazes, S., Misra, N., Bayry, J., Villard, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2002) *J. Immunol. Methods.* **269**, 251–256
34. Usui, T., Murata, T., Yabuuchi, Y., and Ogawa, K. (1993) *Carbohydr. Res.* **250**, 57–66
35. Omichi, K., Hase, S., and Ikenaka, T. (1991) *J. Biochem. (Tokyo)* **109**, 410–415
36. Marshall, J.J., and Miwa, I. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **661**, 142–147
37. Adachi, K., Suzuki, K., Ohno, Y., and Sato, B. (1986) *Clin. Chim. Acta* **154**, 103–113
38. Jerne, N.K. (1974) *Ann. Immunol.* **125**, 373–398
39. Gabibov, A.G., Gololobov, G.V., Makarevich, O.I., Schourov, D.V., Chernova, E.A., and Yadav, R.P. (1994) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **47**, 293–303
40. Tawfik, D., Chap, R., Green, B., Sela, M., and Eshhar, Z. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2145–2149
41. Kim, K., Keller, M.A., and Heiner, D.C. (1992) *Acta Paediatr.* **81**, 113–118
42. Gregory, R.L., Kindle, J.C., Hobbs, L.C., Filler, S.J., and Malmstrom, H.S. (1990) *Oral Microbiol. Immunol.* **5**, 181–188
43. Eggert, F.M. and Gurner, B.W. (1984) *Infect. Immun.* **44**, 660–664
44. Braun, C., Brayer, G.D., and Withers, S.G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26778–26781
45. Yu, J., Choi, S.Y., Moon, K.-D., Chung, H.-H., Youn, H.J., Jeong, S., Park, H., and Schultz, P.G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**, 2880–2884
46. Suga, H., and Tanimoto, N. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11197–11198

Received on December 17, 2003, accepted on December 26, 2003

Profile of the Authors

Anna Kulminskaya graduated from St. Petersburg Technological Institute in 1994 and started to work at the Petersburg Nuclear Physics Institute under supervision of Dr. Kirill Neustroev. Now she is a Researcher in the Laboratory of Enzymology and supervisor of lab's microbial collection. Her current research interests are studies of the architecture of the active center of the exo-inulinase, transglycosylation reactions catalyzed by alpha-/beta-galactosidases and catalytic antibodies with carbohydrase activities.

★★★★★★★

Saveliev Andrew graduated from Biophysics Department of St. Petersburg Polytechnic University and is working here since 1978 up to now days. In 1987 he received his PhD and began teaching at the University. The field of his scientific interest is enzymology. Andrew has two daughters and likes traveling.

★★★★★★★

Kirill Neustroev graduated from Biophysics Department of St. Petersburg Polytechnic University in 1985 and started working at the Leningrad (now Petersburg) Nuclear Physics Institute. In 1993 he received his PhD and founded own research group focusing on investigations of glycoside hydrolases from microbial sources. The main research interests are carbohydrate-modified enzymes, transglycosylation, dehydrogenases and catalytic antibodies.