

浅谈 2018 年诺贝尔化学奖：驾驭进化的力量

周颖[§], 朱理源[§], 邹鹏^{*}

北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

摘要: 定向分子进化是蛋白质工程领域的一项关键技术。通过在试管中模拟并加速自然界中的生物进化过程, 定向进化技术直接针对生物大分子的功能进行突变改造和筛选, 从中发现具有特殊功能的多肽和蛋白质。2018年的诺贝尔化学奖颁发给了美国加州理工学院的弗朗西斯·阿诺德、美国密苏里大学的乔治·史密斯和英国医学研究理事会分子生物学实验室的格里高利·温特, 以表彰他们在定向分子进化领域做出的开创性贡献。本文简述了定向分子进化技术的发展历程及其对绿色能源和生物医药行业的重要贡献。

关键词: 定向进化; 酶; 抗体; 噬菌体展示; 诺贝尔化学奖

中图分类号: G64; O6

A Brief Introduction to Nobel Prize in Chemistry 2018: Harnessing the Power of Evolution

ZHOU Ying[§], ZHU Liyuan[§], ZOU Peng^{*}

College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, P. R. China.

Abstract: In living organisms, protein functions are constantly evolving over generations throughout the history. Through iterative rounds of genetic mutations and natural selection of fit phenotypes, protein functions have been gradually optimized. This process could be mimicked and even greatly accelerated in the laboratory, when the selection pressure is directly applied to biomolecules of interest, which forms the basis of a technique called directed evolution. The Nobel Prize in chemistry 2018 was awarded jointly to Frances Arnold, George Smith and Gregory P. Winter for their pioneering contributions to the development and applications of directed evolution. Here we briefly review the history of this technique and its impact on renewable energy and pharmaceutical industry.

Key Words: Directed evolution; Enzyme; Antibody; Phage display; Nobel Prize in chemistry

1859 年, 查尔斯达尔文发表《物种起源》, 系统阐述了生物进化学说: 种群中的生物个体存在变异, 在为生存而斗争的过程中, 能够适应环境的有利变异个体得以存活、繁衍, 不利变异个体被淘汰, 即我们今天所熟知的“物竞天择、适者生存”法则。其实, 早在 34 亿年前地球出现生命开始, 生物进化的程序便已启动, 生物体在优胜劣汰的过程中不断得以进化。一万多年前, 随着地球文明进入农耕时代, 人类开始介入原本十分缓慢的进化过程, 例如培育农作物。在人为施加的选择压力下, 那些具有特殊表型(果实更大或更甜)的植株存活几率大大增加, 自然进化的过程被加速甚至改变。我们现在知道, 这些表型改变的背后是生物大分子结构与功能的改变。既然进化筛选的最终对象是生物大分子, 那么是否可以将这一过程在试管中加速完成, 而不再需要完整生命个体呢?

收稿: 2018-11-12; 录用: 2018-11-12; 网络发表: 2018-11-19

*通讯作者, Email: zoupeng@pku.edu.cn

[§]共同作者

基金资助: 基金委重大研究计划-培育项目(91753131); 国家青年千人计划

在自然进化过程中，被进化对象的基因型与表型统一存在于完整的生命体中，大自然通过筛选生命体适应环境的能力和繁殖速率来调整基因的分布。而进化一个生物分子(如蛋白质)所面临的难题是，表型(蛋白质的催化速率或结合常数)与基因型(编码蛋白质的基因序列)被割裂开，那些具有优良表型的蛋白质无法通过自我复制来获得数量上的优势，导致有利基因型得不到筛选和保留。如何将生物分子的表型与基因型连接起来是定向分子进化成败的关键。德国生物物理学家曼弗雷德·艾根(Manfred Eigen, 1967年诺贝尔化学奖获得者)于1984年讨论了这一问题^[1]，提出体外进化的基本程序，并诙谐地用BASIC计算机语言来描述这一算法(图1)。他的设想是：首先在一个基因库中引入突变，之后将突变基因单独分离出来，逐一进行扩增、表达和活性测试，筛选出的有利基因再回到第一步进一步突变优化，不断迭代实现进化。

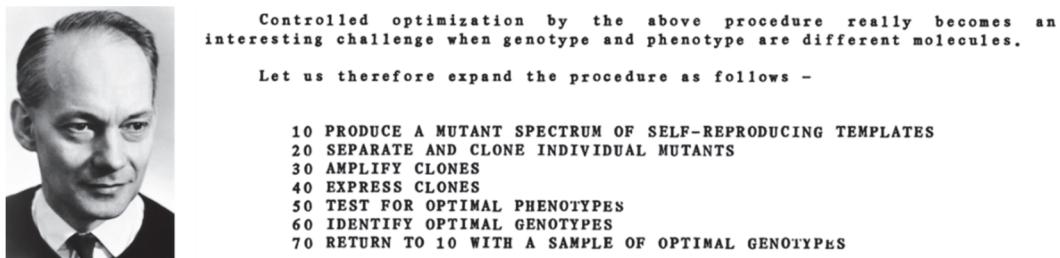


图1 曼弗雷德·艾根和他的定向分子进化算法^[1]

这一设想后来为弗朗西斯·阿诺德(Frances H. Arnold)实现^[2]。在同一时期，乔治·史密斯(George Smith)和格里高利·温特(Gregory P. Winter)采取了另一种策略，利用噬菌体这类结构简单的细菌病毒来巧妙地连接起基因型与表型。2018年诺贝尔化学奖授予了这三位科学家，以表彰他们在定向分子进化领域做出的开创性贡献。其中阿诺德由于“酶的定向进化”工作获得一半的奖金；史密斯和温特因为“多肽和抗体的噬菌体展示”分享另外一半奖金(图2)。



图2 获得2018年诺贝尔化学奖的三位科学家

1 酶的定向进化

弗朗西斯·阿诺德的经历颇具传奇色彩。她于1956年出生在美国宾夕法尼亚州匹兹堡市，本科在普林斯顿大学学习机械与航天工程专业，就读期间参与过可持续能源领域的研究。除专业课外，她还广泛涉猎经济学、俄语和意大利语，曾立志当一名外交官或企业家。毕业后，她先后在韩国、巴西工作，还设计过太阳能装置，然而最终决定回到学校，进入加州大学伯克利分校学习化学工程。

阿诺德于 1985 年获得博士学位，在完成短暂的博士后训练后，1986 年前往加州理工学院开始独立的研究生涯。这时她开始关注开发新型催化剂，并将目光锁定在酶上。

酶是生物化学反应的催化剂，不仅可以实现高效、专一和立体选择性的催化，还避免了使用高温高压等严酷的反应条件。这种精准催化的能力对于复杂产物的工业合成有着重要意义。然而对于大多数酶而言，温度、溶液酸碱度、盐浓度和离子强度等外在条件会极大地影响酶的稳定性、催化活性和选择性。更重要的是，很多化学反应在自然界中并不存在，需要对天然的酶加以改造才能实现催化。早期较为流行的思想是根据蛋白质的三维结构和催化机理来定点引入突变以改变酶的性能，但是遗憾的是，由于缺乏足够好的工具对蛋白质结构和功能进行预测，这种基于理性设计的改造成功率很低。

在认识到理性设计的局限性后，阿诺德决定通过定向进化技术来实现对酶的改造。她的开创性工作发表于 1993 年^[2]，在实验室中对枯草杆菌蛋白酶 subtilisin E 进行了三轮的突变和筛选，提高了在原本变性条件下(高浓度的有机溶剂 DMF)的稳定性。这一过程共计引入 10 个突变，使突变体在 60% DMF 溶液中活性比野生型高 256 倍。这项看似简单的工作具有里程碑的意义——不仅证实了蛋白质定向进化的可行性，还提出了蛋白质定向进化的具体操作流程(图 3)。主要包括以下步骤：1) 找到具有相同或者相似功能的酶作为进化起点；2) 通过不同分子生物手段引入突变，突变应具有一定的覆盖率和多样性。将突变基因转入细菌，使不同基因得到分离；3) 建立精准高效的筛选体系，通过不同的测试方法选出具有更优良目标性能的蛋白质突变体；4) 以此突变体为新的进化起点，进入下一轮“突变-筛选”，依次循环直到突变体的性能达到设定标准。艾根近十年前提出的想法得以具体实现。

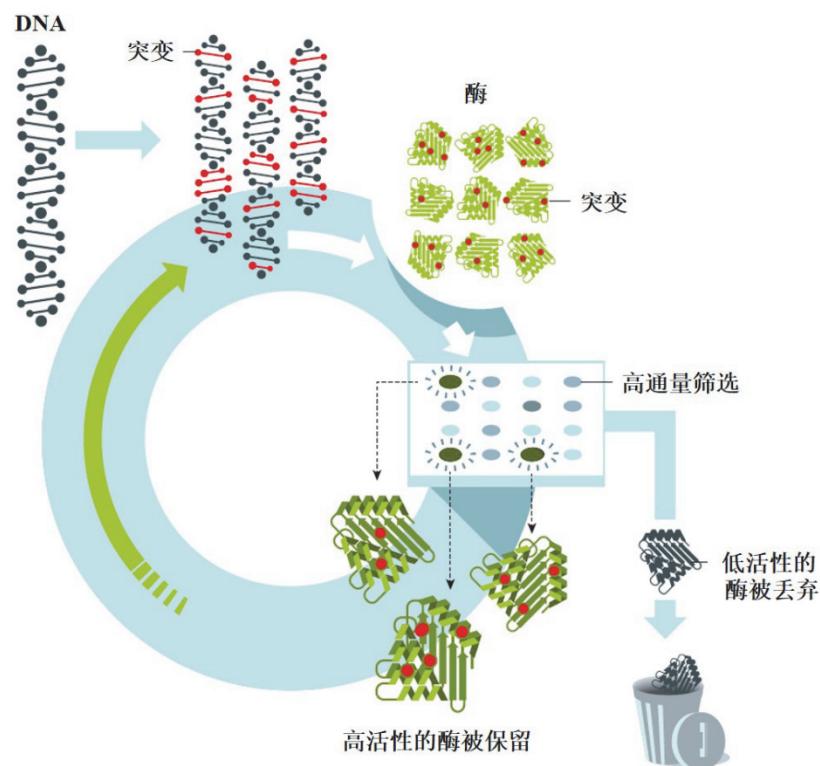


图 3 酶的定向进化流程

图片来源于 <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/popular-information/>

在这项开创性工作的基础上，阿诺德成功实现了对多种酶的改造，其中最具代表性的是针对细胞色素 P450 的一系列工作。细胞色素 P450 是一类结合血红素的氧化还原酶家族，广泛存在于原核与真核细胞中，能够催化有机小分子的氧化反应。对于环丙烷化、氮宾插入反应等本身并不存在于生物体的化学反应，阿诺德可以通过定向进化，极大地提高 P450 催化这类反应的效率和特异性^[3,4]。近两年，阿诺德还通过对另一类氧化还原酶细胞色素 C 进行改造，进化出能够催化形成碳—硅键和碳—硼键的酶，且立体选择性高于传统有机合成方法^[5,6]。

这些新型酶催化剂也在工业应用方面崭露头角。生物燃料是其中一例，这个领域面临的一大挑战是如何高效地将结构简单的烷烃氧化成醇。在进化之前，P450 酶与这些烷烃的结合能力很弱，催化效率低；经过几轮筛选进化后，P450 突变体得以高效地氧化各种链长的烷烃，从而为绿色合成生物燃料创造了条件^[7]。此外，定向进化在代谢途径和制药等方面也大显身手。阿诺德对类胡萝卜素的生物合成途径中的去饱和酶和环化酶等进行了定向进化，使其可以合成不同类胡萝卜素天然产物^[8]。在制药领域，2010 年默克公司(Merck)将转氨酶的定向进化应用于治疗 II 型糖尿病的药物西他列汀(Sitagliptin)的合成，相比于化学合成，转氨酶催化的绿色合成产率提升了 10%–13%^[9]。

2 多肽和抗体的噬菌体展示

抗体由免疫系统的浆细胞产生，能特异地识别和结合各种抗原，引起免疫响应以达到消除病原体的目的。抗体可以用来进行疾病的诊断和治疗，因此在临幊上具有重要的应用价值。为了获得能够靶向特定抗原的抗体，传统做法是把抗原注射到动物(如老鼠)体内引发免疫反应，再从血清中将诱导产生的抗体提纯出来。由此获得的是一群含有不同氨基酸序列的抗体的混合物，他们来源于不同的 B 细胞，称为多克隆抗体。为了得到能靶向单一表位的抗体，研究者们又发明了杂交瘤技术。具体做法是，在诱导动物体产生免疫反应后，研究者们从动物血清中提取出生产抗体的 B 细胞，再将其与骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞，从而使 B 细胞永生化。通过体外培养永生化 B 细胞，可以获得由单一种类 B 细胞产生的具有单一序列、识别单一抗原表位的抗体，称为单克隆抗体^[10]。

尽管如此，传统生产抗体的方法由于需要动物体内的免疫反应，还是有着诸多局限性：首先，从动物体内获得的抗体在应用于人体内的治疗时可能会导致人体的免疫排斥^[11]；其次，动物体内的免疫反应过程较难进行干预，例如人为地改变筛选过程的 pH、盐浓度等^[12]；此外，对于那些只引起很弱免疫反应的抗原，或者有较强毒性的抗原，则很难用动物体来筛选抗体^[13,14]；最后，利用动物免疫反应和杂交瘤技术生产出的抗体往往需要长达一年的时间^[15]。毫无疑问，人们希望能够摆脱对动物体的依赖，在试管中实现抗体的筛选。噬菌体展示技术的出现解决了这一问题。

噬菌体是能够侵染细菌的病毒，具有十分简单的结构(图 4)，其中衣壳蛋白由噬菌体的基因组所编码。这样一来，待筛选的多肽文库可以通过与噬菌体衣壳蛋白融合的方式被展示在噬菌体表面，从而可以利用噬菌体来对多肽进行筛选，这就是噬菌体展示技术。该技术最先由美国密苏里大学(University of Missouri)的乔治·史密斯在 1985 年提出^[16]。他所使用的噬菌体具有丝状结构，通过将编码 fECO1 (一种抗原蛋白质)的基因插入到噬菌体的衣壳蛋白 III 基因中，可以得到衣壳上展示有 fECO1 蛋白质的噬菌体。随后他将这些改造的噬菌体与其他噬菌体混合，另将一个培养皿的表面固定上针对 fECO1 的抗体，当噬菌体混合液加入这个培养皿后，那些表面表达了 fECO1 的噬菌体能够被特异地吸附和纯化出来，富集度高达 1000 倍。这就是噬菌体展示技术的雏形。

随后，在 1990 年，英国医学研究理事会分子生物学实验室(MRC Laboratory of Molecular Biology)的格里高利·温特提出可以将噬菌体展示技术用于抗体的筛选^[17]，做法实际上就是将史密斯的工作颠倒一下。具体来说，温特将目标抗原固定在一个琼脂糖基底上，而将不同序列的抗体片段通过与衣壳蛋白 III 融合表达的方式，展示在了不同噬菌体的表面。当这些噬菌体与固载的特定抗原混合后，不同噬菌体与固体表面的结合能力取决于其衣壳上展示的抗体对抗原的识别能力。温特首先将那些

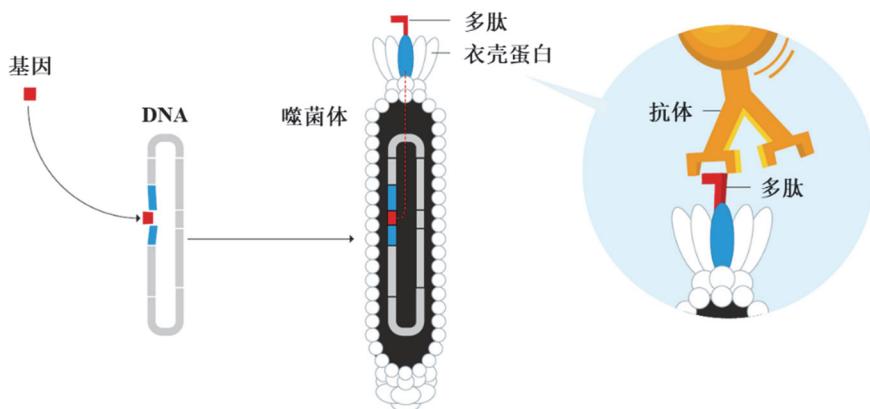


图 4 噬菌体展示方法

图片来源于 <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/popular-information/>

没有与抗原结合的噬菌体清洗掉，再将与抗原结合的噬菌体洗脱下来。这一过程可以重复多次，从而筛选得到具有高亲和力的抗体。相比于传统的动物免疫方法，噬菌体展示技术得以在试管中进行抗体筛选，不仅可以直接使用人源化的抗体以避免在未来应用中的免疫排斥，还大大加快了筛选的速度——由此发展出抗体往往只要两个月的时间^[18]。

温特建立起的筛选技术迅速被付诸实践。他利用噬菌体展示方法直接从未被免疫接种的志愿者的抗体文库中筛选出了 TNF α 的抗体^[19]，命名为 Adalimumab，在 2002 年被批准上市用来治疗类风湿性关节炎。这也是首个被批准使用的通过噬菌体展示技术筛选出来的抗体^[20]。这之后又相继有五个通过噬菌体展示筛选出来的抗体成功地被批准应用，有 60 多个筛选出的抗体处于临床测试的阶段^[21]。由此可见，噬菌体展示技术在抗体的筛选、药物和疫苗的研发方面展现出了非凡的潜力。除了巨大的应用价值，噬菌体展示技术还体现出利用微生物来进行蛋白质文库筛选的高效性，并由此启发了一系列变革性技术的发明，包括用于蛋白质筛选的细菌展示技术^[22]、酵母展示技术^[23]等。

3 结语与展望

定向分子进化技术属于化学与生物学交叉研究领域，通过在试管中模拟并加速自然界的生物进化过程，在很短时间内筛选得到性能优异的化学反应催化剂和抗体药物，并实现了在工业生产和临床医学等方面的重要应用。在基础科研领域，通过对定向分子进化结果的分析，我们也更深刻地认识到蛋白质从序列到结构到功能间的微妙关系。例如，传统观点认为，酶的活性中心附近的氨基酸残基往往比活性中心以外的残基更容易影响酶的活性。然而，阿诺德发现，经过定向分子进化，多数有利突变并非在酶的活性中心，而不少位于远离催化口袋的蛋白质表面，包括在蛋白质亚结构域的相互作用的界面上，突变的种类也千差万别。通过少数几个突变就可以完全改造酶的催化活性，这说明序列相似的蛋白质执行的功能可以完全不同。这些出人意料的发现一定程度上解释了为什么早期的蛋白质理性设计方法成功率很低。

值得关注的是，近年来蛋白质设计的算法不断得以优化，已出现不少能够成功预测，甚至从头设计全新蛋白质功能的实例。在不久的将来，随着超级计算机硬件的不断升级、人工智能的蓬勃发展以及量子计算技术的悄然兴起，我们可以预见蛋白质理性设计将扮演越来越重要的角色。这将成为对基于高通量筛选的定向分子进化技术的有力补充。甚至是否终将有一天，理性设计能彻底取代随机突变和筛选，使我们可以随心所欲设计蛋白质的功能？让我们拭目以待。

参 考 文 献

- [1] Eigen, M.; Gardiner, W. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 967.
- [2] Chen, K. Q.; Arnold, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5618.
- [3] Coelho, P. S.; Brustad, E. M.; Kannan, A.; Arnold, F. H. *Science* **2013**, *339*, 307.
- [4] Prier, C. K.; Hyster, T. K.; Farwell, C. C.; Huang, A.; Arnold, F. H. *Angew. Chem. In. Ed.* **2016**, *55*, 4711.
- [5] Kan, S. B. J.; Huang, X. Y.; Gumulya, Y.; Chen, K.; Arnold, F. H. *Nature* **2017**, *552*, 132.
- [6] Kan, S. B. J.; Lewis, R. D.; Chen, K.; Arnold, F. H. *Science* **2016**, *354*, 1048.
- [7] Glieder, A.; Farinas, E. T.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1135.
- [8] Schmidt-Dannert, C.; Umeno, D.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 750.
- [9] Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. *Science* **2010**, *329*, 305.
- [10] Kohler, G.; Milstein, C. *Nature* **1975**, *256*, 495.
- [11] Winter, G.; Milstein, C. *Nature* **1991**, *349*, 293.
- [12] Bradbury, A. R.; Sidhu, S.; Dubel, S.; McCafferty, J. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 245.
- [13] Konthur, Z.; Hust, M.; Dubel, S. *Gene* **2005**, *364*, 19.
- [14] Wang, H.; Yu, R.; Fang, T.; Yu, T.; Chi, X.; Zhang, X.; Liu, S.; Fu, L.; Yu, C.; Chen, W. *Toxins (Basel)* **2016**, *8*, 266.
- [15] Ohara, R.; Knappik, A.; Shimada, K.; Frisch, C.; Ylera, F.; Koga, H. *Proteomics* **2006**, *6*, 2638.
- [16] Smith, G. P. *Science* **1985**, *228*, 1315.
- [17] McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G.; Chiswell, D. J. *Nature* **1990**, *348*, 552.
- [18] Henrich, C.; Ylera, F.; Frisch, C.; Ten Haaf, A.; Knappik, A. *Handbook of Immunoassay Technologies*; Academic Press: London, 2018; pp 47–80.
- [19] Jespers, L. S.; Roberts, A.; Mahler, S. M.; Winter, G.; Hoogenboom, H. R. *Biotechnology* **1994**, *12*, 899.
- [20] Frenzel, A.; Kugler, J.; Helmsing, S.; Meier, D.; Schirrmann, T.; Hust, M.; Dubel, S. *Transfus Med Hemother* **2017**, *44*, 312.
- [21] Frenzel, A.; Schirrmann, T.; Hust, M. *MAbs* **2016**, *8*, 1177.
- [22] Daugherty, P. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 474.
- [23] Boder, E. T.; Wittrup, K. D. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 553.