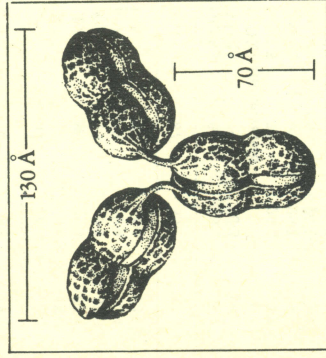




## 抗體多樣性的探討

### 前言

一個脊椎動物的免疫系統能製造出各式各樣具有不同特異性的抗體，這種幾乎沒有止境的多樣性是如何產生的呢？此一問題一直令免疫學家感到興趣，但又難以解答。近年來由於分子遺傳學和免疫化學的驚人進展，使得我們對於這問題的答案，有了進一步的了解。

### 一、緒論

脊椎動物的免疫系統對於進入到其體內的各類外來物（Foreign Substance）幾乎都能產生免疫反應，製造出對此抗原有特異性的抗體分子。西元1954年N. K. Jerne提出Clonal selection的假說，認為抗原不能決定抗體的分子結構，也就是說抗體不是以抗原為模型（template）而後才被合成，而應該是具有各種不同特異性的抗體，早已存在，抗原只具有選擇性的促進作用，刺激那些能和抗原結合的抗體，使其進一步地大量被製造出。後來的實驗証實了Clonal selection的假說。這麼一來，就面臨了一個相當棘手的難題，我們要如何來解釋生物體內這數以億計種不同特異性的抗體是怎麼被製造出來的。

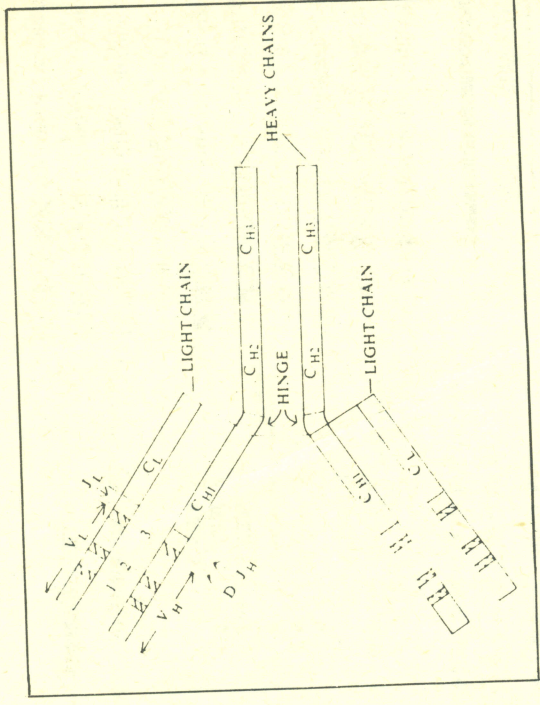
抗體分子是一種蛋白質，稱為免疫球蛋白（Immunoglobulin），它在淋巴球內的合成，依照遺傳學的c-

醫四 周志豪

ant dogma \*，必是有基因來控制分子中胺基酸的組成。因此後來 Germ Livn 學說和 Somatic mutation 學說的提出來解釋多樣性的產生。簡單地說 Germ Line 學說認為 Germ ( Germ cell ) 內已含有了要重組的抗體基因，而 Somatic mutation 學說則主張種細胞只有少數抗體基因，多樣性的產生是因為體細胞(即B淋巴球)內的抗體基因會發生突變所造成。這兩家學說在抗體多樣性的起源，這二種機制都是爭執不下，不過近來的研究顯示 Germ Line 學說似乎是對的，Somatic Germ Live 學說解釋多樣性的起源。

### 抗體分子結構和 Dreyer — Bennett 假說

抗體(或免疫球蛋白)是由二個相聯輕鏈(Light chain)和二個相聯重鏈(Heavy chain)所構成(圖一)。每一條輕鏈或重鏈，其胺基端有一多變區(variable region)，其餘的部分則為不變區(Constant region)，由於這種特殊的分子結構，使抗體具有雙重的功能。在多變區，輕鏈和重鏈共同構成一抗原結合部位(Antigen — binding site)，負責與抗原分子結合。在此區的胺基酸組成隨著不同的 clone \* 而有很大差異，因此能有各種不同的立體結構和鍵結，而產生各類不同的特異性來應付不同的抗原分子。至於不變區，輕鏈有 kappa (k) 和 Lambda (λ) 二種型(type)重鏈則可分為 5 種綱(class)  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ , 即構成 I<sub>M</sub>, I<sub>D</sub>, I<sub>G</sub>, I<sub>E</sub>, I<sub>A</sub> 五類免疫球蛋白，其所以如此分



圖一：抗體分子 (I<sub>G</sub>G) 的模型圖。

C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub> 和 C<sub>L</sub> 為重鏈和輕鏈不變區中的 domains。輕鏈的多變區由 V<sub>L</sub> 和 J<sub>L</sub> 基因所形成，重鏈的多變區由 V<sub>H</sub>，D 和 J<sub>H</sub> 基因所形成。高多變區 (hypervariable regions) 1, 2, 3 決定抗原的辨認和結合部位。不變區負責執行免疫功能，以除去抗原。

類是因每一型或綱的不變區其胺基酸順序在同個生物體內不同的 Clone 甚至同種的不同生物，幾乎相同。重鏈的不變區，其功能是負責執行抗體的免疫功能，如 I<sub>G</sub>E 與藥物過敏有關，I<sub>G</sub>G 與胎兒從母體獲得被動免疫有關……等等，不同的綱，其功能各有不同。不過同一個 clone 所產生的抗體其不變區可能不同，但可變區必定相同。因此對於某種特異性的抗體，隨著重鏈的綱的不同而有不同的免疫功能，故抗體可說是一個分子具有雙重的功能。

由於抗體這種特殊的分子結構，使得 ailliam J. Dreyer 和 J. C. Ballew Bennett 在 1960 代中期提出

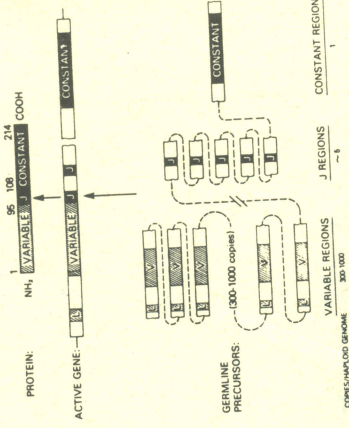
“two Gerlone polypeptide” 的假說，認為輕鏈或重鏈的多變區和不變區是由不同的基因來 Code，亦即一條 polypeptide 的胺基端和羧基端是染色體上不相鄰的段落來負責。若是以當時 one gene — one polypeptide 的假說來解釋，那麼我們很難說得通為何在演化的過程中，多變化區的 DNA 其突變的頻率是如此高，而相鄰不變區的 DNA 其順序又是如此的保留。不過 Dreyer — Bennett 的假說，卻需要引入 Split gene 的觀念和特殊的 DNA 重組機制來接合這分離的基因，這些在當時的遺傳學都是空前的創舉。

到了 1970 代早期 Philip Leder 等人利用 hybridization kinetics 的實驗，證明了在老鼠胚胎細胞的 genome \* 內的基因數目只有一個，最多也是數個，若是依照 one gene — one polypeptide 假說，在老鼠的胚胎細胞應該有數目極多的不變區基因，若是用 Dreyer — Bennett 之假說，則不變區的基因可以只有一個，而多變區的基因有很多個，不過其數目在當時因技術問題不能測出。此 h-

ybridization kinetics 實驗是最早證實 Drager - Bennett 假說是正確的，後來利用限制酶更証明了不變區和多變區的基因在胚胎細胞是相隔的，而在漿細胞 (plasma cell)，則經過重組變為相鄰的。(此重組的意義下面將再談到)。至此我們已確定 Drayer - Bennett 的假設基本上是正確的，不過實際的情形應該是 "Several genes - one polypeptide"。

### 輕鏈的多樣性：(見圖二)

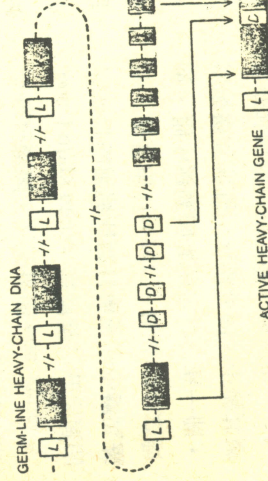
在此以老鼠的 Kappa chain 為例來介紹，因為有關抗體多樣性的研究，輕鏈的變化較單純，而 Kappa chain 在輕鏈所作的比例較高，故自然成了研究的主要對象。Kappa chain 負責多變區的基因與不變區基因，位在同一條染色體相隔甚遠的段落上。但不變區基因 (C<sub>k</sub>) 只有一個，而負責多變區的基因是由二個基因構成。— Variable (V<sub>k</sub>)，segment 和 Joint (J<sub>k</sub>) Segment。V<sub>k</sub> 大約有數百個，分成數個 Family 集中在 C<sub>k</sub> DNA 的 5' 端，而在 V<sub>k</sub> DNA 的 3 端和 C<sub>k</sub> DNA 的 5' 端為 J<sub>k</sub> DNA，其數目有 5 個 (但只有 4 個為 active，中間的一個不能進行重組)。V<sub>k</sub> gene 分成二段 exon，較小的 exon 負責 code Leader segment \* 較大的 exon 則 code 多變區的主要部



圖二：免疫球蛋白輕鏈基因的結構和重組之模式圖。塗色之區域表示有 codig 之順序 (即 exon) L, V, 和 J 分別代表悉水的 Leadr, V 基因和 J 基因，五個 J 基因中，位於中間的一個為 inactive (不能進行重組)

份 (第一個到第 95 個胺基酸的部分)。在細胞分化成 B 淋巴球時，V<sub>k</sub> 和 J<sub>k</sub> 會先發生重組，使 V - J 之間的 intron 移掉 J<sub>k</sub> 與 C<sub>k</sub> 之間的 DNA 沒有改變，經過重組的基因，才是有活性的，能夠被轉錄 (transcribe) 到 RNA 上。不過要形成 mRNA 要經過 RNA splicing \*，把 Leader 與 V<sub>k</sub> 主體間的 intron 和 J<sub>k</sub>, C<sub>k</sub> 之間的 intron 一起移掉，然後此 mRNA 再轉譯 (translate) 成完整的 Kappa chain。

### 重鏈的多樣性：(見圖三)

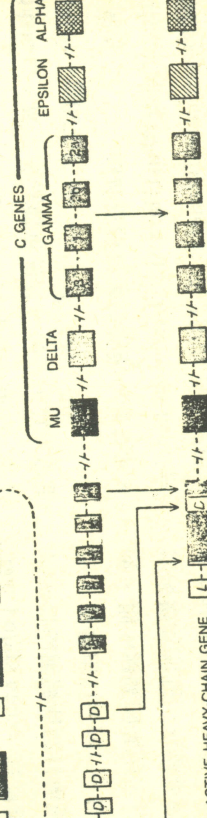


重鏈的基因重組大致與輕鏈類似，不過它有二點與輕鏈大不相同。第一，其 code 多變區的基因，除了有 Variable (V<sub>h</sub>)，joint (J<sub>h</sub>) DNA 外，另外在 V<sub>h</sub> 和 J<sub>h</sub> 之間多了一段 D (diversity) segment，此段所 code 的胺基酸恰好是重鏈多變區第三高多變區 (third hypervariable) 的主要部分。因此要形成完整的重鏈多變區基因，至少須要二次的重組，即 V - D 間一次，D - J 再一次。第二個不同點是重鏈不變區的基因，不像輕鏈只有一個，而是有數個，其數目與重鏈的網或亞網的數目一致，如老鼠就有 8 個 - C<sub>μ</sub>, C<sub>δ</sub>, C<sub>γ</sub>, C<sub>ε</sub>, C<sub>2b</sub>, C<sub>2a</sub>, C<sub>ε</sub>, C<sub>α</sub> (後面會再提到)。

### V (D) J 重組的 DNA 辨別順序 (Recognition Sequence) 和接合時的變異

利用基因工程的 cloning 和 DNA Sequencing 的技術，分析比較在 V, D, J 基因二旁的 DNA 順序結果發現到有二段特別保留的順序。在 V 基因的 3' 端往下行和 J 基因的 5' 端，往上行先有一段約 7 個核苷酸構成的

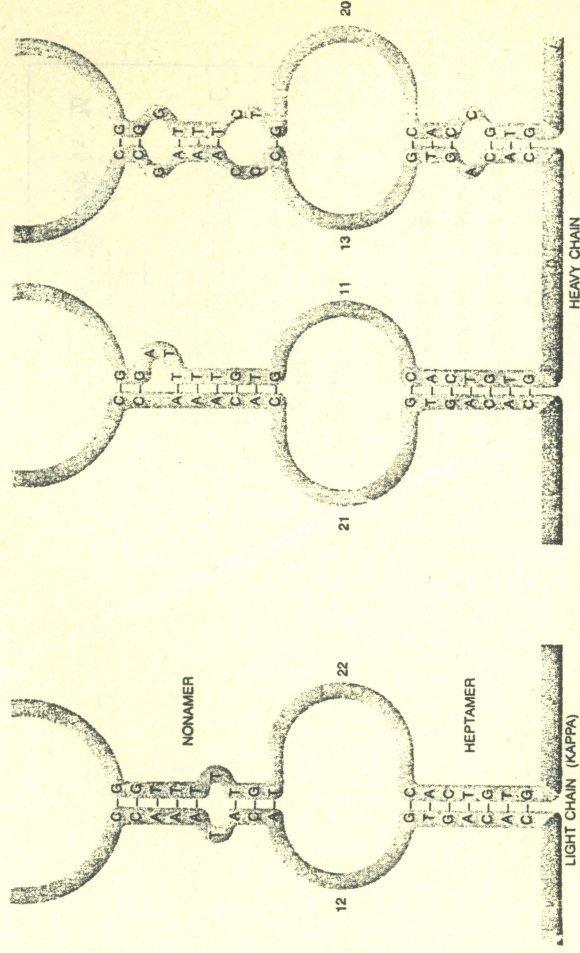
圖三：免疫球蛋白重鏈基因的結構和重組之模式圖。一個完整的重鏈基因是由 4 套基因構成，L/V, D, J 和 C 基因。體細胞的重組作用，把其中一個 L/V 基因，D 基因和 J 基因結合在一起形成多變區的部分。在另外在重鏈的不變區，有 8 個分離的 C 基因，分別 code 同網或亞網的不變區。(每個 C 基因，實際上還會分成 3 至 6 個的 exon 圖中是簡化的形式)



與輕鏈類似，不相同。第一，因，除了有Va<sub>h</sub>int( J<sub>h</sub> ) DNA之間多了一段gment，此段所是重鏈多變區的hypervariable要形成完整的重須要二次的重組D-J再一次。第變區的基因，不是有數個，其數的數目一致，如，C $\delta$ ，C $\epsilon$ ，C $\gamma$ ，C $\mu$ Ca (後面會再

mer，其順序為CACAGTG，個或22個核苷酸的約11個或約9個核苷酸構成，其順序在V基因ACA-mer，其順序為GGTTTTACC，在J基因為GGTTTTACC，(見圖四，圖五)由於這he-mer和nonamer可形成氮鹼之互補配對(A配T，C配G)，DNA中的每一個單股都摺成一個結構而把V基因和J基因拉在一起的底部。更特殊的是在he-mer和nonamer之間的spacer，小如如在V基因旁約為11個核苷酸(見圖四之V<sub>k</sub>)，那麼在J基因旁約為22個核苷酸，(見圖四之J<sub>k</sub>)。這種情形在V<sub>k</sub>，J<sub>k</sub>可觀察在V<sub>k</sub>，J<sub>k</sub>卻都是約22個核苷酸spacer，因此有人推測在D基因旁spacer必然都是約11個核苷酸，這推測在後來也被證實DNA中一個turn大約是105核苷酸，因此相隔11個核苷酸的mer和nonamer約隔了一個在22個核苷酸者約隔了2個核苷酸。基於以上DNA特殊的排列規則可假設出一種V(D)J重組，DNA接合的蛋白質有二類，能辨識隔一個turn的heptamermer，另一種能辨識隔2個turn的heptamer和nonamer。這蛋白質，能互相聚合(dimerize)，但同種的蛋白質則不能。由於蛋白質的聚合，使得V和J基因重組緊靠，並且能把這二個基因放在一起。這種機制有幾個特色

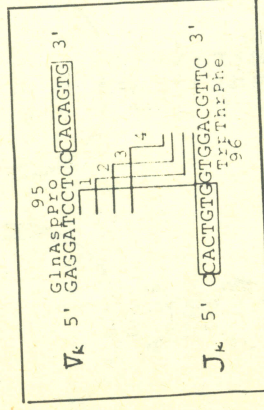
圖：在V和J基因二側辨識順序的比較。在圖右方的一排數字表示在heptamer和nonamer (十個核苷酸)之間核苷酸的個數。



圖五：在重細胞DNA中的辨識順序

明顯地是用於把輕鏈(左半部)和J基因在重鏈前接合在一起的。在重鏈(右半部)也有類似的機制，不過它多了一段D(Diversity)基因。詳情見文章之敘述。

|                   |                                           |      |
|-------------------|-------------------------------------------|------|
| V <sub>k41</sub>  | CACAGTGATACAAATCATACATAAAC                | (11) |
| V <sub>k2</sub>   | CACAGTGATTCAGGCCATGCATTAAC                | (11) |
| V <sub>k3</sub>   | CACAGTGATTCAGGCCATGCATTAAC                | (11) |
| V <sub>k21</sub>  | CACAGTGATTCAGGCCATGCATTAAC                | (10) |
| V <sub>H107</sub> | CACAGTGAGAGAGGTCTATTGTGAGCCACAGACATAAAC   | (22) |
| V <sub>A1</sub>   | CACAGTGAGAGAGGTCTATTGTGAGCCACAGACATAAAC   | (22) |
| V <sub>A11</sub>  | CACAGTGAGAGAGGTCTATTGTGAGCCACAGACATAAAC   | (22) |
| J <sub>k1</sub>   | GGTTTTGTAGAGAGGGGCGATGTCATAGTCTCTACTGTG   | (22) |
| J <sub>k2</sub>   | GGTTTTGTAGAGAGGGGCGATGTCATAGTCTCTACTGTG   | (23) |
| *J <sub>k3</sub>  | GGTTTTGTAGAGAGGGGCGATGTCATAGTCTCTACTGTG   | (20) |
| J <sub>k4</sub>   | AGTTTTGTATGGGGGTTCAGTGAAGGACACACAGTGTG    | (22) |
| J <sub>k5</sub>   | GGTTTTGTATGGGGGTTCAGTGAAGGACACACAGTGTG    | (22) |
| J <sub>H1</sub>   | AGTTTTGTATGGAGAGGGGCGATGTCATAGTCTCTACTGTG | (21) |
| J <sub>H2</sub>   | GGTTTTGTATGGAGAGGGGCGATGTCATAGTCTCTACTGTG | (22) |
| J <sub>H3</sub>   | ATTTATGTGTCAGGGGTCATCATTTGTTGTCATCATGTG   | (22) |
| J <sub>A1</sub>   | GGTTTTGTATGGAGAGGGGCGATGTCATAGTCTCTACTGTG | (11) |



圖六：接合多樣性 ( Junctional diversity ) 擴大了抗體的多樣性，在 V 和 J 基因重組的接合點，能有一段數個核苷酸的變化，而產生不同的核苷酸順序，如圖中之情形就有 4 種變化的可能性。此種變化位於多變區的第三高多變區，因此它能夠抗原結合部位產生很大的影響。

，第一它能防止 V - V 和 J - J 之間的接合，第二，它能適用於所有的抗體基因。

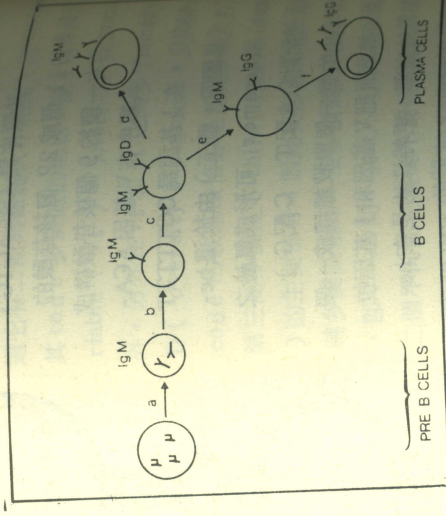
分析比較在 V (D) J 重組部位的胺基酸順序，可發現有特別高的多樣性。此種多樣性的產生是由於在 V, D, J 基因在接合時，接合的蛋白質它切開 DNA 的位置有變異，造成重組的部份有不同，而使接合處的 triplet codon 發生改變。由於此種 DNA 接合的彈性，使抗體多樣性的產生又多了一種方式。(見圖六)

#### 六產生抗體多樣性的機制

以下把產生抗體多樣性的機制做個整理，簡略地說可分成三種方式。  
1. 種系基因 ( Germ-line genes ) 一在種細胞內，已具有了所有將來繫細胞形成抗體所需要的基因。在輕鏈的 variable gene 約有 200 到 500 個 (數目尚未有定論)，重鏈的  $V_h$  基因也大致差不多。另外

$J_k$  和  $J_h$  基因的數目均為 4 個， $J_h$  的數目一說 4 個，也有 6 個的說法，最後重鏈選多了 D 基因，其個數約在 10 個左右。

2. 重組式的接合 ( Combinatorial joining ) 一由蛋白質順序 ( protein sequence ) 的研究顯示，對於任何一型的抗體基因，其 V 基因的任何一個均可能與任何的 J 基因產生重組，重鏈的 D 基因也是。依照此種接合，假設在重鏈中有 200 個  $V_h$  基因，10 個 D 基因，4 個  $J_h$  基因，則可能產生 8000 種變化。在輕鏈中，假設有 20 個 V 基因，4 個 J 基因，則有 800 種變化。值得注意的是不論是 V - J 重組或 V - D，D - J 重組，其重組的部位皆在抗體的第三高多變區內，也正是抗原結合部位的最重要之



圖七：B 淋巴球的分化，詳情見文章之敘述。

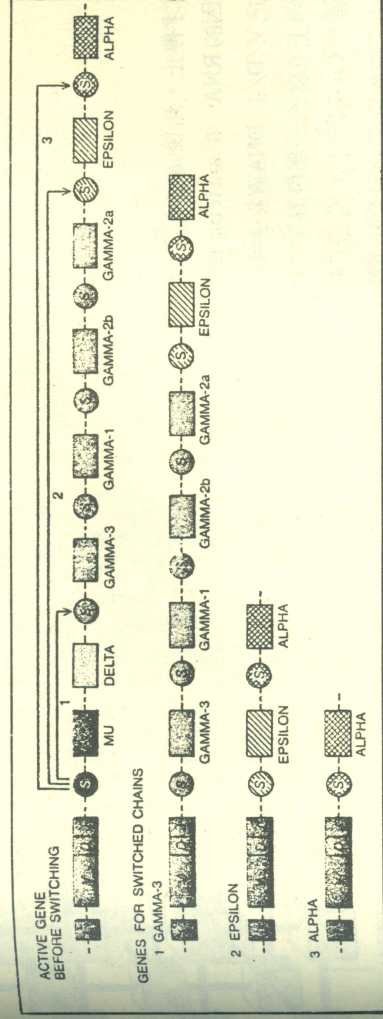
處。

3. 接合時的變異 一前已提到在 V (D) J 重組的部位，確實的接合點，並不一定，此謂之接合多樣性 ( Junctional diversity )，它能使變化再增加約 10 倍。因此前述重鏈有 8000 種變化，再加上它有二次的接合，共可得  $8000 \times 10 \times 10 = 8 \times 10^5$  種變化，而輕鏈則由 800 種變化增為 8000 種 (只有一次接合)。

最後抗體的抗原結合部位是由輕鏈和重鏈的多變區共同構成的，且此二鏈的結合完全獨立，因此抗體的多樣性經由上述的過程，應該能有  $8 \times 10^5 \times 8000$  種變化，亦即在  $10^8 \sim 10^9$  的等左右。

γ B 淋巴球的分化。

重鏈基因的表现比輕鏈來得複雜



八：重鏈的網轉換。只要B淋巴球在合成 $\mu$ 或 $\delta$ 重鏈，則重鏈基因之排列一定如最上圖所示。每個C基因之5'端有一些轉換信號（S圖中只畫一個代表）。這些信號就負責把V/D/J DNA重組接到下行（downstream）的C基因。圖中列了三種可能性。被轉換過的DNA再被轉錄成RNA，後經Slicing形成mRNA，分別code R<sub>3</sub>， $\delta$ 和 $\alpha$ 鏈。注意在 $\mu$ 和 $\delta$ 之間沒有轉換信號。

這可以由三點看出。第一，前面提到重鏈有數種不同的綱（class）或綱（subclass），每一種都有一種變區基因，如老鼠可分成8種。第二，所有這些不變區基因的任何一點都可與多變區的基因（已經重組過有分化上的控制）。

在B淋巴球分化的途徑上，最先變的細胞，其細胞質內只能發現到重鏈（見圖七），此時其DNA只發生變區的V-D J重組，稍後輕鏈的V-J重組才進行，製造出輕鏈（K $\lambda$ ），形成I $\mu$ M在其細胞表面，這細胞稱為pre-B cell。這些pre-B cell會不斷的分裂，繼續分化成

不成熟的B淋巴球，此時其表面的免疫球蛋白，除了I $\mu$ M還有I $\delta$ D。此淋巴球若有適當的抗原刺激，這些不成熟的B淋巴球又開始進行另一次分化，最後成為專門分泌抗體的漿細胞。在這第二次的分化過程中，至少包括了二項變化。第一I $\mu$ M不再附著在細胞的表面，同時I $\delta$ D不再被合成，而逐漸消失。第二，細胞可合成新一綱的免疫球蛋白，如I $\mu$ G, I $\mu$ E, I $\mu$ A。在此要注意，新種類的免疫球蛋白，其多變區與原來表面的I $\mu$ M, I $\delta$ D完全相同，且一旦細胞轉變成分泌某一種I $\mu$ ，則此細胞將永遠只能合成這種I $\mu$ ，其他種I $\mu$ ，或原先的I $\mu$ M均不能再合成。上述的過程，稱為綱轉換（Class-Switch）

#### 八重鏈的網轉換：（見圖八）

重鏈的網轉換也是一種DNA的重組，但它和多變區的V（D）J重組在本質上不相同。網轉換的作用是把C $\mu$ 的基因換成其他綱的基因，“（C $\mu$ 基因除外）”亦即把已重組好的V/D/J DNA接到其他C基因的5'端，而移掉原來二者之間的DNA。這種轉換的目的，是要改變抗體的免疫功能，而又不會改變抗體的抗原特異性。

因此它不同於V-J重組，其重組的部位並不緊鄰著有控制到蛋白的地區（即exon），而是在離exon一段距離的intron中。另外經由比較C基因二側的DNA順序，發現在J基因的3'端和C基因的5'端，在intron中也有特殊的辨別順序，但和V-J重組的CACAGTG等順序完全不同，並且在不同的C基因，其辨別順序也有些不同，不像V（D）J之辨別順序在不同的基因也幾乎相同。另外綱轉換的辨認順序的數目不只一個，而是有許多個，因此它重組的部位可發生在許多地方，而不像V-J重組那樣限制在某處。

前面一段提過在B淋巴球要分化成漿細胞時，I $\delta$ D的合成會停止，另外在不成熟的B淋巴球上通常除了I $\mu$ M外，還有I $\delta$ D，這種現象的原因，現在可以用綱轉換來解釋。經由DNA sequence的結果，在C $\mu$ 和C $\delta$ 之間的DNA未發現有任何綱轉換的辨別順序，因此當C $\mu$ 基因5'端的辨別順序和其他C基因的辨別順序重組時，C $\delta$ 基因一定會跟C $\mu$ 基因一起被移掉，因此發生綱轉換後I $\delta$ D一定停止製造。另外不成熟的B淋巴球在製造 $\mu$ 鏈的RNA時，其轉錄（transcription）會進行到C $\delta$ 基

因的 3' 端才停止，然後這包含了  $C\mu$ ， $C\delta$  基因的 RNA 在 solicing 時，一部份會把 V/D/J DNA 直接接到  $C\delta$  的基因上（當然一部份是 V/D/J DNA 接到  $C\mu$  基因上，而把  $C\delta$  基因除去）。由此我們也可看出 RNA splicing 在網轉換也扮演著重要的角色。

## 九．結論

由於免疫球蛋白基因的結構分析，使我們了解到一個完整免疫球蛋白基因的產生，需要二種不同型式的體細胞 DNA 重組亦即多變區的 V (D) J 重組和重鏈基因的網轉換。這二種 DNA 重組在許多方面均不相同，因此在細胞內是由二種不同的酶系統分別來進行。除了 DNA 重組外，我們也發現 RNA splicing 對於免疫球蛋白基因的表現也有控制的作用，如  $I_e$  M 和  $I_e$  D 的合成即需 RNA splicing 來控制。綜合以上的結果，使遺傳學家了解到基因的表現不像以往所認為的，在胚胎細胞中就已經被決定了，相反的在體細胞的分化過程中，有些基因會經由不同類型的重組排列，使基因的表現呈現出高度的多樣性。雖然目前我們了解的模型只限於免疫球蛋白的基因，但遺傳學家研究的方向已向轉向其他具有高多樣性的蛋白質系統，例如 T 淋巴球表面的抗原接受蛋白 (Antigen receptor) 即是一種，相信在不久的未來這些問題都能一一獲得圓滿的解答。

1. Central dogma - Describing the genetic informations should flow from DNA to protein, by way of RNA, but not the reverse.
2. Clone - A strain of cells descended from a single cell.
3. Split gene - Gene that is not continuous but has been interrupted.
4. Genome - All the genes of an organism or individual.
5. Leader sequence - A stretch of 15-30 mostly hydrophobic amino acids at the N-terminus of the integral or secreted proteins, usually is removed during or after its integration into the memb.
6. RNA splicing - Remove of introns from mRNA precursor.

## REFERENCES:

1. "The Genetics of Antibody Discovery", Philip Leder, May 1982, Scientific American.
2. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Vol: 45, pp. 839-898, 1980.
3. "Assembly of Immunoglobulin Heavy Chain Genes", Nature, Vol: 286, pp. 657-659, 1980.
4. "Antibody Discovery", J. G. Seidman et al., Science, Vol: 202, pp. 11-17, 1978.
5. "Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy chain genes", E. Sakano et al., Nature, Vol: 286, pp. 676-683, 1980.
6. "The Biological Origin of Antibody Discovery", A. R. Williamson, Annual Review of Biochemistry, Vol: 45, pp. 467-500, 1976.