

1972年諾貝爾醫學及生理獎 得主介紹

謝宏基

前言

雖然醫師們知道用疫苗保護人體以對抗疾病已有二百年以上的歷史了，但對於身體如何製造抗體，及抗體如何工作的根本問題，始終無法真正了解。直到本世紀六十年代初期，現任紐約洛克斐勒大學Gerald Maurice-Edelman 博士領導的研究團體，和牛津大學Rodney Porter 博士領導的研究團體，分別在美國及英國從事分析抗體結構的工作。1969年4月14日，Edelman 在美國實驗生物學協會的年會上發表有關 γ -球蛋白完整構造的第一篇報告；另一方面，與Edelman 無直接合作的Porter，也由不同的分析方法，得到相同的結果，那就是：抗體分子由四條多肽鏈構成，即兩條含446胺基酸的重鏈和兩條含214胺基酸的輕鏈，共計1320氨基酸或19,996原子。其中兩條重鏈結合成主幹而兩輕鏈構成分支部分。輕、重鏈皆含有可變區及恆定區，不同抗體的恆定區部分皆相同，可變區則否。每一輕、重鏈的可變區合而成爲特異抗原結合的位置，即抗體抗原結合部位。除此外，Edelman 尚說明爲何體內可形成各種不同的抗體以對抗不同的入侵物，以及爲何有些抗體黏上抗原而有些則攻擊抗原。他們的工作，首次闡明了抗體結構的問題，爲前所欠缺的免疫學基本問題，建立穩固的基礎；使科學家們得以從事免疫學各方面的探討，以實際應用到治病方面，例如：抗過敏，抗移植器官排斥作用，甚至於控制某些腫瘤

。因此，他們兩人共同獲得1972年諾貝爾醫學及生理獎。

Edelman 得獎時43歲。1929年7月1日生於紐約，1950年畢業於Ursinus College，同年6月11日與Maxine Morrison小姐結婚，至今共有二子一女。1954年得到賓夕法尼亞大學博士，1954~1955年任職於麻薩諸塞州總醫院，1957~1960年於洛克斐勒學院當助理醫師，1960年得到洛大哲學博士(Ph.D)。其後擔當生化學教學工作，到1966年終於獲得洛大生化學教授的職位。不但如此，他還是許多學會的會員，例：美國化學學會、美國生化學學會、美國免疫學家協會、遺傳學會、美國科學促進協會等等。並曾得到1954年賓州大學Spencer Morris獎，1965年Eli Lilly生化獎等等。近年來致力於蛋白質(蛋白質的Primary和Tertiary構造)，以及抗體構造的研究工作。R. Porter 得獎時55歲，1917年生於英國，是位害羞而略帶缺乏自信心的人，1946年開始在F. Sanger 的指導下做研究工作，一開始就對免疫反應感到興趣，而一直從事於此，現任牛津大學生化學教授。兩人花費許多精力在研究工作方面，一星期難得休假一天。休閒時，Edelman 多半拉小提琴、吟詩。Porter 則住在農莊，釣魚，養蜂，過著田園式的生活。

以下將介紹兩位得獎人的工作情形，取材於1972年12月11日在瑞典斯德哥爾摩皇家卡洛琳學院頒獎時的演說稿。

工作概況

免疫球蛋白的構造研究 R. Porter

1946年，當他正在F. Sanger 的督導下開始做研究工作時，Landsteiner著的「血清學反應的特異性」第二版到了英國。書內摘要記述著「抗體特異性」的許多資料，多半是蘭氏本人的工作成果，小部份是他人利用蘭氏配製「抗輔抗原抗體」(Antihapten Antibody)的技術；及測驗輔抗原對「抗血清與結合蛋白(Conjugated Protein)沉澱作用」抑制作用的報告；這本書內另載有Tiselius 和Pederson(瑞典生化學家)，以及Heidelberger 及Kabat的研究成果；所有兔子抗體皆在血清蛋白的 γ -球蛋白部分，分子量約150,000。此書內抗體特異性及有關 γ -球蛋白(即免疫蛋白)的結果，使他驚奇從而一直致力於此事的研究工作。

一. 抗體的活動部分 (Active Fragments)

用強鹼溶液或酸來解離特異沉澱物以得到抗體的方法已可進行，所以可研究抗體特異性(specificity)與構造的關係。最初的研究顯示結合特異性並不存於整個分子。Parven-tjev 和Petermann, Pappenheimer分別用pepsin處理馬抗毒素及抗白喉抗體，後者得到一裂解產物，分

子量 113,000 而已。Petermann 後來用 papain 處理人 γ -球蛋白，再用超離心，得到裂成 $\frac{1}{2}$ 的產物。同時，Landsteiner 發現：用酸處理過的絲蛋白 (fibroin) 產物，可抑制絲蛋白溶液與兔子抗血清的沉澱作用。故可推測：抗體抗原結合位置只佔抗體的一部分，稱為活動部分。他們曾用數種酸或酶處理抗體，但只有以 papain (木瓜酶) 處理過的產物。含有活動部分 (即能抑制抗原與全抗體的沉澱作用)。因此他們想分析這活動部分的結構。因分子量達四萬，不易分析，故送到劍橋大學的 Sanger 實驗室作胺基酸排列順序 (sequence) 的鑑定，但無成果獲致。因他們假定：「抗體是單條開放性多肽鏈 (Single open peptide chain) 而每種抗體的活動部分有相同 N-terminal，即 Alanine」而未考慮 N-terminal 是閉鎖性的。7 年後，再用 papain 結晶 (而非粗酶) 處理抗體，發現些新事物：(一) 產物經透析後易回復為蛋白 (抗體)。這些產物大小相同 (沉澱係數 3.5S)，為原蛋白 $\frac{1}{2}$ 而非 $\frac{1}{4}$ 。其中有一種在中性，低溫及鑽石形板上生成結晶。他當時認為這結晶不可能是蛋白質，把它當作是較不易溶解的胺基酸結晶，幾個月不去理會。幸而他請教任職於倫敦國家醫藥研究院 X 光結晶繞射圖譜員的鄰居 Olga Kennard 小姐，得知它原來是蛋白質結晶，即消化產物之一，稱 Fc，具有 γ -球蛋白的抗原特性。由 papain 分解抗體的研究顯示： γ -球蛋白 (現叫免疫球蛋白) 由緊湊折



Rodney Porter

疊而不被 papain 進一步消化的三個部分組成。其中二個稱為 Fab，(即抗體活動部分) 各含有一個可同可不同的抗體結合部位 (combining site)；另一個是 Fc，它除了具有免疫球蛋白的「補體結合性質」、「皮膚親和力」、「由母體經胎盤傳入胎兒」等性質外，尚有本身的抗原性。

二・四肽鏈構造的決定

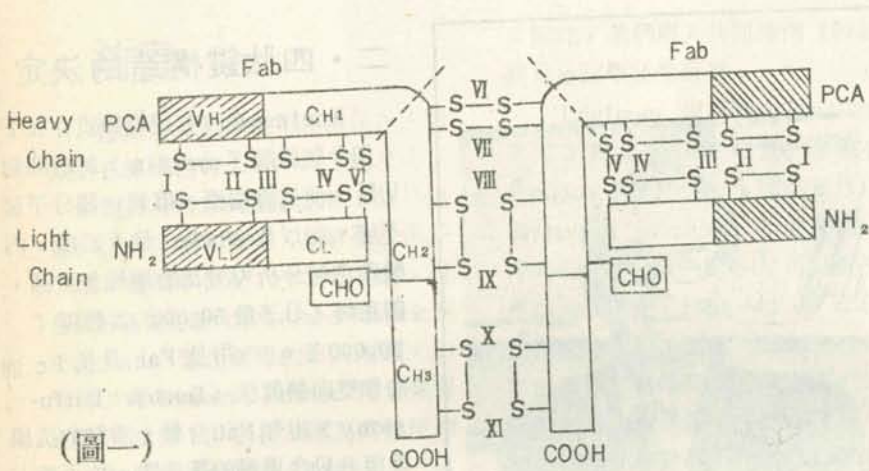
Edelman 在沒有變性物質存在下，用半胱胺酸 (cystein) 將鏈間鍵切斷，使抗體還原，得到一個分子量不變，而以 Sephadex 柱、乙酸、丙酸作色層分析可分出的兩種多肽鏈，即重鏈 (分子量 50,000) 及輕鏈 (20,000)。用抗 Fab 及抗 Fc 血清作雙向擴散法 (Double Diffusion)，得知 Fab 含輕、重鏈的抗原性而 Fc 只含重鏈的抗原性。故可得一四鏈構造 (見圖一)，papain 乃切斷重鏈中央部分。至於 N-terminal，因 glutamine 為在合成免疫蛋白時加入，在血液中並無，而代之以 PCA (pyrrolidone carboxylic acid)，故可推測 N-terminal 在細胞內被酵素催化而環化為 PCA，乃是閉鎖的。

三・與特異抗原的結合位置

雖然四鏈模型澄清了構造上的許多問題，但並沒有帶給抗體結合特異性任何進展。有人報告 mouse myeloma protein、即 MOPC315 的消化產物，叫 Fv，它含有 N-terminal 的那段包含重、輕鏈，對 DNP 輔抗原有親和力。

Bence Jones Protein 含有可變部分和恆定部分，而尿中的此 protein 已被証實僅含有輕鏈而已。人的 Kappa Bence Jones protein 自 N-terminal 算起的 107 個胺基酸排列是每個抗體不同的，而重鏈的前

1972年諾貝爾醫學及生理獎得主介紹



(圖一)

110 胺基酸也是如此，這兩個可變區共同形成結合位置。因有種種不同的排列，所以同樣結構網內可有千變萬化的結合位置形態。關於可變區那些 residues 確與結合位特异性有關，他得到幾個結論：

(1) 抗原位置的大小，約相當於六個肽（六個胺基酸）或六個醣的大小。

(2) 抗體內可能有 15 ~ 20 個決定抗體特异性的胺基酸 residues，叫接觸性胺基酸，直接與抗原形成鍵。若某一 residue 取代了此 15 ~ 20 個胺基酸的位置，則可變化成多種結合位置。

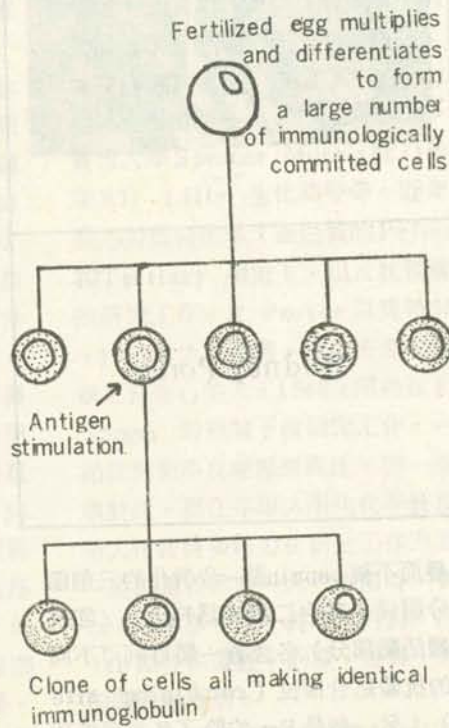
(3) 每一個可變區至少有 3 個超變部分 (hypervariable region)。由 myeloma protein 可變區內不同胺基酸 residues 出現頻率，及兔子 IgG 重鏈的胺基酸 residues 次序的研究，可設想超變部分多半只佔一或二個位置。胺基酸排列次序不易測出部分，可能就是超變部分。

(4) 此六個超變區輕、重鏈各三共同形成結合部位 (Combining site)。由親和力標示研究 (Affinity labeling study)：抗體與輔抗原結合產生共價鍵，經水解後，已標示的肽與已知胺基酸次序比較，可知標示的 reagent 皆接到六個超變部分。此研究可為明証。

(5) 結合位置旁可能有恐水區 (hydrophobic region)，與特异性無關，但可增加抗體對抗原的親和力。

有關結合位置的細節，有待 IgG 及其碎裂物的晶體圖研究才能得知。至於抗體多形性的基因來源，無定論。將在 Edelman 的文章內論及他們的理論。

抗體結構和分子免疫學
Gerald M. Edelman



(圖二)

抗體結構的工作，使免疫學與分子生物學相互關連；它們的研究，雖非一定能造成對免疫的了解，但是造成了觀念上的革新，而此革新供給了 Niels Jerne 及 Mac Farlane Burnet 提倡的 Clonal Selection Theory 以分子的基礎，成了現代免疫學的中心教條：即「抗原分子被身體確認，乃在於它能選擇某細胞群，使其增殖而製造更多的某種特异抗體」。由以前的研究我們得知每一個類淋巴細胞只能產生一種特异抗體。(見圖二)

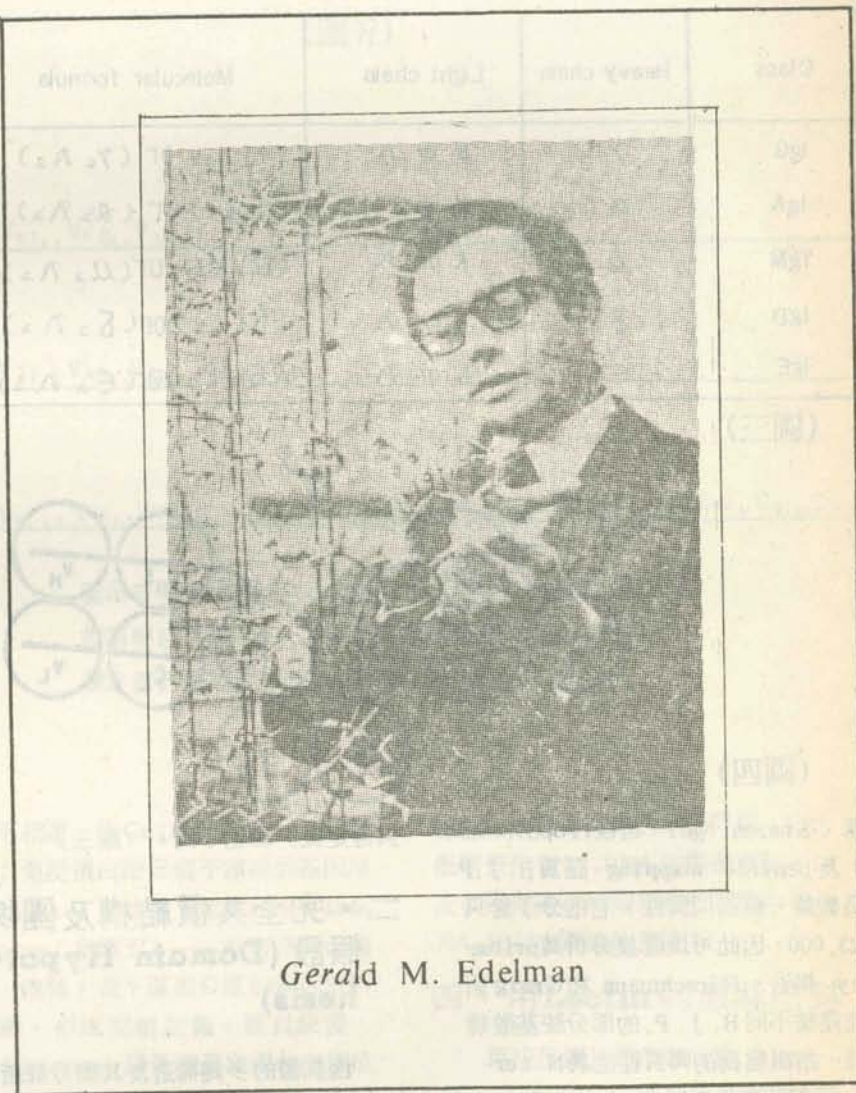
五十年代末了，抗體結構的研究

趨於激烈。Landsteiner 研究hapten 輔抗原知：免疫特異性存於抗原的 (determinant groups 與抗體的 Antigen combining site間的互補性。Tiselius由物理化學研究，得知抗體是一種在電荷上不均勻的蛋白質。另外研究則多少知道抗體有許多類別，且多半是兩價。以上對結構工作無多大決定性。

一·抗體的多鍵構造： 抗體大小及異質性(Heterogeneity)的問題

前已說過Porter 等用 papain 處理抗體，使其裂解為 Fab 及 Fc。另外Nisonoff 也用 pepsin 裂解抗體為不同碎粒。Edelman 則用還原 disulfide bond 處理 IgG, IgM, 造成分子量降低。因這並非裂解蛋白質，所以可知原蛋白質(抗體)乃為數條多肽鏈所組成。由後來研究顯示，這些多肽鏈即輕鏈(Light chain)、重鏈(Heavy chain)兩類。用超離心技術可知輕鏈分子量約20,000，應該可以直接分析。但是最大的困難，不是它的大小，而是它的化學異質性，及與抗原結合部分的分析。在此面臨兩個問題(1)我們所觀察到的異質性，是多肽鏈構造的不同產生的，還是它們 primary構造不同？(2)若為後者，我們如何獨得構造分析所需的同質物？

我們知道，有種淋巴細胞腫瘤——myeloma，能產生一種類似正常異



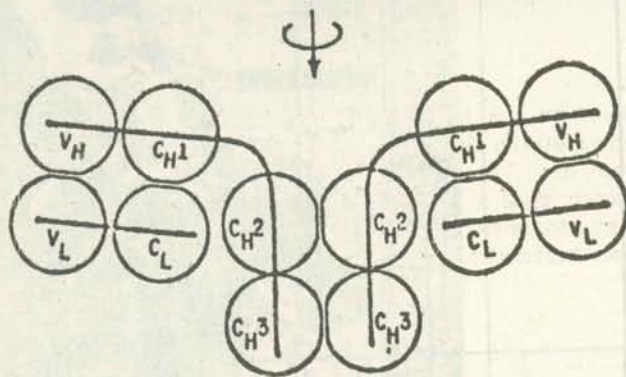
Gerald M. Edelman

質免疫蛋白的同質性血漿蛋白。病者的尿中含有大量抗原性與免疫蛋白相關而性質未明的 Bence Jones Protein (B. J. P. 同質性且低分子量)。因此 Edelman 及其同僚假設「此 protein 乃免疫蛋白的一個鏈，由

myeloma 細胞合成，但不併入同質性的 myeloma protein，因此由尿排出」。有一天，他和 Joseph Galy 加熱由血清蛋白分離出的輕鏈溶液，發現和 B. J. P. 有相同性質——初混濁，再加熱即澄清。再由澱粉凝膠電

Class	Heavy chain	Light chain	Molecular formula
IgG	γ	K or λ	$(\gamma_2 K_2)$ or $(\gamma_2 \lambda_2)$
IgA	α	K or λ	$(\alpha_2 K_2)$ or $(\alpha_2 \lambda_2)$
IgM	μ	K or λ	$(\mu_2 K_2)_5$ or $(\mu_2 \lambda_2)_5$
IgD	δ	K or λ	$(\delta_2 K_2)$ or $(\delta_2 \lambda_2)$
IgE	ϵ	K or λ	$(\epsilon_2 K_2)$ or $(\epsilon_2 \lambda_2)$

(圖三)



(圖四)

其恆定區)構造不同。(圖三)

二. 完全共價結構及團塊假設 (Domain Hypothesis)

因抗體的多鏈構造及其與分解產物間的關係已了解, 所以自1965年起, Edelman 和同僚七人開始致力於決定免疫蛋白的完全明確的參考性結構 (reference structure) 和免疫反應上不同生理功能在構造上的區域性劃分及其演化的情形。

由前所述 Porter 等的工作, 可明瞭抗體功能的區域性劃分。Hill等

人分析正常兔子 γ -鏈 (IgG的重鏈) Fc區的胺基酸成分, 發現重鏈的C-terminal 乃同質的。所以Hill與Singer等假定: 免疫蛋白的進化由控制其形成的基因的複製而達到目的。此假定獲得Edelman的支持。由胺基酸排列次序的檢查, 得到一些結論 (1) γ -鏈的恆定區 (以下稱C區) 由三個同質的C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}組成, 且與輕鏈恆定區C_L相似 (2) 輕重鏈可變區 (V區) 是同質的 (3) 每一V區或C區都各有一個 disulfide bond、故 intra-chain disulfide bond呈週期性分布於此構造的 (4) 所有 inter-chain disulfide bond皆位於重鏈中央部分。由以上結論, 令Edelman設想: 「抗體分子由摺疊在一緊密領域的一個個團塊結合而成。每一團塊由V同質或C同質組成, 由一個 intra-chain disulfide bond來穩定, 而由較不摺疊的多肽鏈部分與另一個團塊連結。每一團塊內的 tertiary 構造極相似, 且至少含有一種具有免疫蛋白功能的位置。」 (見圖四)

由獨立重輕鏈重組成活動性抗體分子以及親和力標籤實驗, 証實V區乃是與抗原結合部位。Haber將特異Fab的 disulfide bond 打斷, 再讓它在無抗原下回復為可與抗原結合的分子更可証明結合位置完全在V區內。故生一假設: 「不同淋巴球內, 不同重輕鏈的組合, 使少數V區即可生大量不同的結合位置。」分子免疫學剩下的工作在於得到與抗原結合位置的直接照片, 特別是抗體抗原結合的

湧 (Starch gel electrophoresis) 及 peptide mapping 証實B. J. P 為輕鏈、但為同質性, 它的分子量只23,000, 因此可以直接分析其 primary 構造。Hirschmann 和Craig研究幾種不同B. J. P.的部分胺基酸排列, 指出輕鏈的異質性位於N-terminal區而非C-terminal。Baruj Benacerra的實驗顯示出: 不同的B. J. P. 有不同的胺基酸成分, 故可推知不同的免疫蛋白 primary構造也是不同的。

綜上所述我們可知: 免疫蛋白的通性是多鏈構造以及異質性, 不同類抗體輕鏈相同 (K或 λ) 而重鏈 (尤

免疫學在醫學之應用

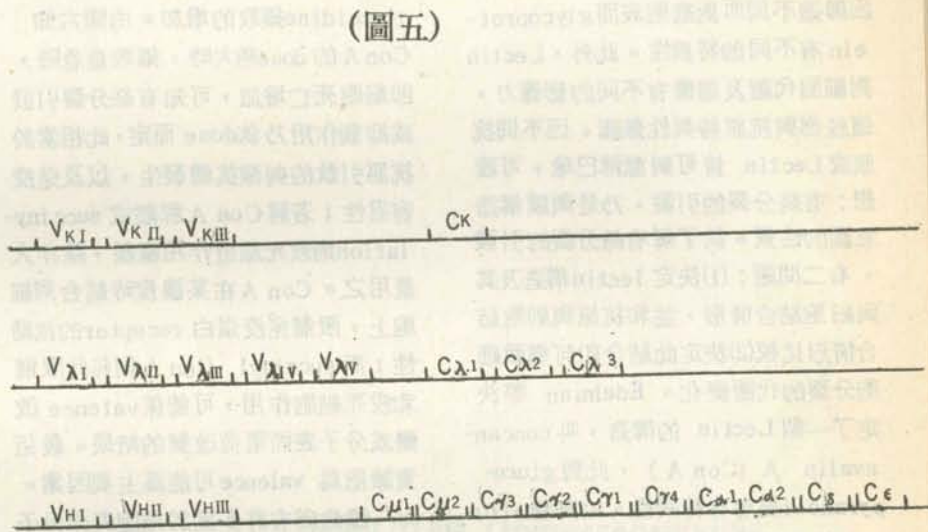
詳情。用X光晶體圖應可表明V區的情形，以及V區內 disulfide bond 如何穩定結合部位。

至於C區，tertiary 構造相似，但每一C區的功能，尚未確定。有一設想即：C_{H2} 對補體固定作用有用，而C_{H3} 乃是與淋巴球結合的部位。C_{H3} 已被証實可與macrophage 膜結合，且淋巴球也能合成類似C_{H3} 的分子，除此外無直接證明。

團塊假設已由X光晶體圖(X-ray crystallograph) 得直接證明。至於為何在演化過程中，這種結構被嚴格保存則不全明白，有一假設：雖然同分子內C區與V區結合是一種功能上的需要，但也有防止團塊間相互作用的必要。不論如何，免疫蛋白進化乃是基因複製產生，使由團塊數的增減而改變免疫功能。

三. Translocon: 進化及基因功能的假設單位

依 clonal selection theory，體內生來即具有各種不同的抗體，抗體V區的差異性可滿足許多種抗體的產生。這些差異可由幾方面來看(1)不同種類抗體的數目，與不同V_H 與V_L的乘積相當(2)由 myeloma protein 實驗知，V區可分為數個 subgroup，每一 subgroup 由數個 genes 或一群 genes 控制。此 subgroup 內某一氨基酸置換，需構造基因 (Structural gene) 的一個 base 改變才能產生。抗體其他實驗指出：輕鏈的兩種基因標誌間，及其與重鏈的基因標誌間皆不相連；而控制V區與C區的基因



圖示三個基因堆 (translocons)，其中第一、二基因堆控制輕鏈 (K和λ)，第三者控制重鏈。控制可變區和恆定區的基因在同一基因堆內也不相連。

也不相連，使 Gally 和 Edelman 猜想：免疫蛋白由三個不連接的基因堆 (cluster) 控制，這基因堆叫 translocon (見圖五)——這裏強調必須有一機轉，使V區與C區的基因資料相連，形成完整抗體。按此假設，translocon 為免疫蛋白進化的單位，即不同類免疫蛋白鏈的產生，來自某一前驅基因堆的複製以及染色體的重新排列。

免疫蛋白多樣式產生的關鍵，由鏈和 subgroup 方面轉到V區 subgroup內胺基酸排列的變化上。我們不知道這是由於體基因重排列，還是配子基因產生的。所以，抗體結構工作不

能解決抗體多樣式的來源問題。這大概需要作DNA、RNA的影像實驗，以及在發育適當時期類淋巴細胞中與DNA、RNA有關酶的實驗。

四. 用Lectin 刺激淋巴球

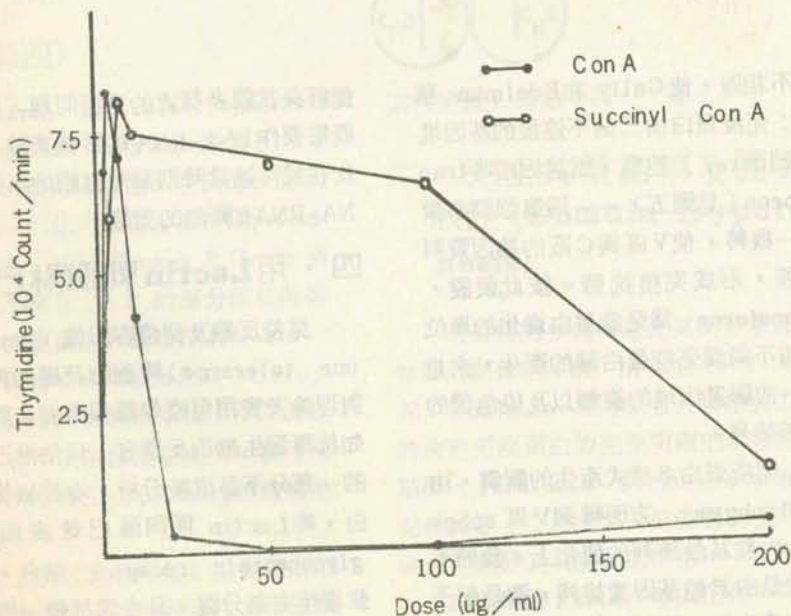
免疫反應及免疫容忍性 (immune tolerance) 時細胞反應的機轉對理論及實用免疫學都很重要。對已知抗原發生細胞反應者，只佔淋巴球的一部分不易直接分析。有種植物蛋白，叫Lectin 能與淋巴球表面的 glycoprotein receptor 結合，導致產生有絲分裂，且合成抗體。雖然產生的有絲分裂相似，但不同Lectin

因構造不同而對細胞表面 glycoprotein 有不同的特異性。此外, Lectin 對細胞代謝及運輸有不同的影響力, 這些都與抗原特異性無關。因不同抗原或 Lectin 皆可刺激淋巴球, 可設想: 有絲分裂的引發, 乃是與膜構造有關的性質。欲了解有絲分裂的引發, 有二問題: (1) 決定 lectin 構造及其與細胞結合情形, 並和抗原與細胞結合情形比較 (2) 決定此結合如何導致細胞分裂的代謝變化。Edelman 等決定了一個 Lectin 的構造, 叫 concanavalin A (Con A), 此對 glucopyranoside 等有特異性。由實驗, Con A 溶液刺激胸腺的淋巴球 (T cell) 而骨髓來者 (B cell) 則否, 造成

thymidine 攝取的增加。由圖六知 Con A 的 dose 稍大時, 攝取量急降, 即細胞死亡增加, 可知有絲分裂引發或抑制作用乃依 dose 而定, 此相當於抗原引致的刺激抗體發生, 以及免疫容忍性; 若將 Con A 解離或 succinylation 則殺死細胞作用極緩, 除非大量用之。Con A 在某濃度時結合到細胞上, 限制免疫蛋白 receptor 的流動性; 而 succinyl Con A 則無此限制和殺死細胞作用, 可能係 valence 改變或分子表面電荷改變的結果。最近實驗認為 valence 可能為主要因素。

雖然尚有許多關於細胞表面分子免疫的實驗要作, 但誘導有絲分裂機轉的分析無疑可澄清免疫誘導與容忍

(六)



之事。

五. 結論

免疫學是一門奇異的科學, 要了解免疫學的基本問題, 需要化學分析。抗體分子構造的決定是個頗具說服力的例子, 但要真正完成此項工作, 則需求下列各種滿意方法, 使免疫學連結到分子生物學: (1) 抗體異質性及免疫蛋白的複雜性已被合理化為與 selective theory 一致 (2) 抗體中「與抗原結合作用」和 effector function 的區域性化分已清楚了 (3) 抗體 primary 構造的詳細分析已提供研究免疫反應分子遺傳學的基礎 (4) 分子免疫學的觀念和方法, 已擴充至發育生物學 (development biology)。不管免疫反應是否成為唯一有用的模型, 我們可預測: 分子及細胞免疫專家的繼續工作, 可解決抗體多樣性的來源以及抗體合成、容忍性的誘導等主要問題。這些問題的解決, 對於生物學的其他範疇有啓示作用, 並使免疫學變成一種訓練以及重要性日增的醫學分支。

× × × × ×
取材自:

- 1 Who's Who in America, 1972
- 2 Science News 95:401-2 Apr. 26, 1969
- 3 Newsweek P. 69 Oct. 23, 1972
- 4 Science 180:830-840 May. 25, 1973
- 5 Science 180:713-717 May. 18, 1973