

SPP2006 教育連携講座 免疫の驚異を学ぶ実験講座

勝山高等学校 荻安 理恵 牧野 佐紀 水上 祐貴子 村井 麗華

実験の目的

【Cコース個別実験】

- ・ 利根川博士のノーベル賞実験（多様な抗体を生成する遺伝的原理の解明）に挑戦し、多様性の確保のために抗体遺伝子が変わる事を確かめる。
- ・ 実験をまとめ発表する事によりプレゼンテーションの能力を身につける。

【共通実験】

- ・ オクタロニー実験
- ・ B cell と T cell の電子顕微鏡および蛍光レーザー共焦点顕微鏡による観察

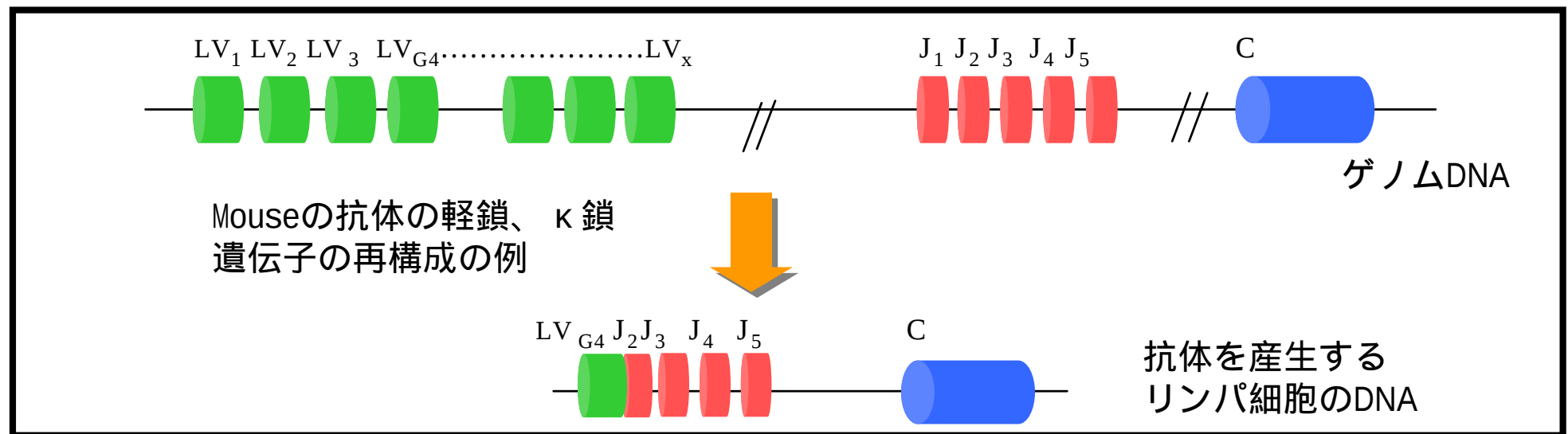
利根川博士のノーベル賞受賞の研究とは？

私たち(ヒト)の遺伝子は25000にも満たないとされています。

私たちの周りにはウイルスや細菌など、無数の抗原(病原体)が存在し、体はその一つ一つに対応する抗体をつくることで防御する仕組みを持っています。その数は1兆個ともいわれています。

この1兆個ともいわれる抗体を私たちはどのように作り出しているのでしょうか？

この謎を解いたのが利根川進博士の実験です。いくつかの遺伝子をつなぎかえて、多様な抗体をつくりだしていることを発見しました。これを「遺伝子再構成」と呼んでいます。



軽鎖は可変部(LV)100種類・連結部(J)4種類・定常部(C)からできており、可変部から1種類、連結部から1種類選択して軽鎖を作っている。その結果、 $(100 \times 4) \times$ 組み換えの曖昧さ要素10を掛け合わせると4000パターンの軽鎖ができあがることになる。重鎖のパターンを同様に考えると2400万パターンとなり、軽鎖と重鎖の組み合わせでできる抗体は全部で10の11乗種類のパターンができることになる。

実験の設定

以下のサンプルについてそれらの構造の比較を行った。

サンプル・・・ある特定抗原に対する抗体を作り出す第6染色体上のDNA:以下の1)～3)の方法で精製

- 1) マウスの肝臓から抽出したDNA
- 2) 分化したBリンパ球から抽出したDNA
- 3) Bリンパ球からの軽鎖mRNAから逆転写酵素で作ったcDNA。

比較方法は、それぞれのDNAをPCR法で増幅させる際に以下のようなプライマーを使った。

ア LV領域とJ領域間(LG4～J2間)

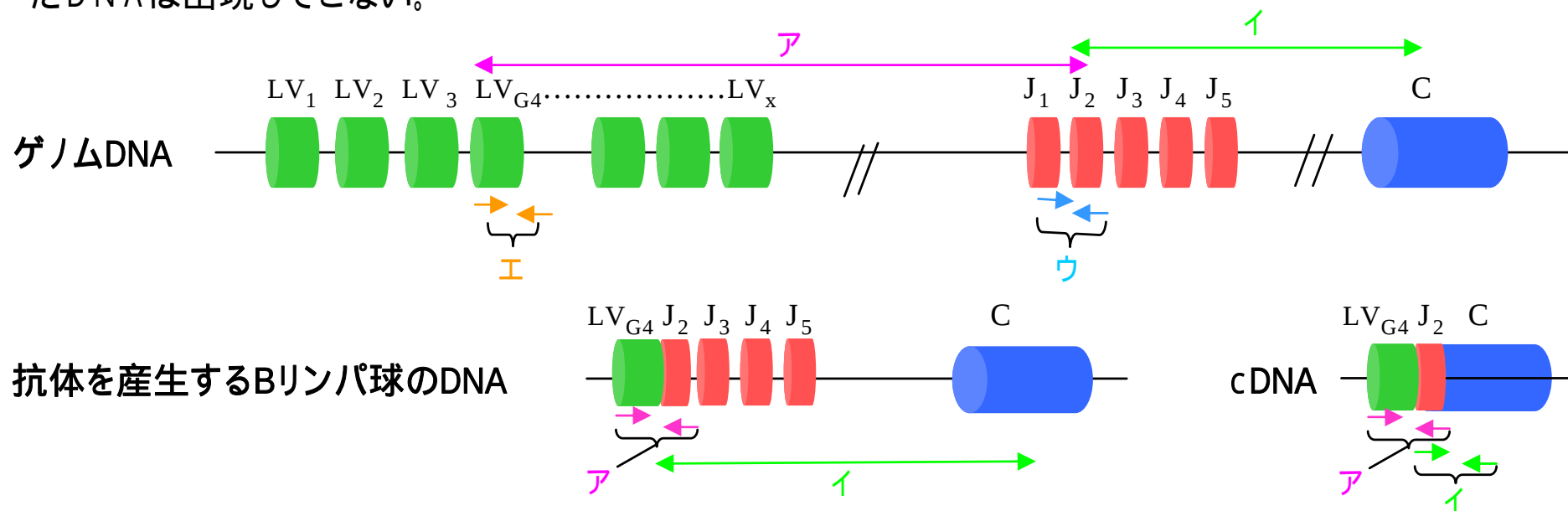
イ J領域とC領域間(J2～C間)

ウ J1とJ2間

エ LVG4とその横(J領域側)のイントロン間

60秒間増幅させ、1000bp(ベースペア)相当分の鎖を増幅させるように条件を設定した。

～の距離間が1000bp内であれば増幅されたDNAが蓄積し、1000bp以上であれば、増幅されたDNAは出現してこない。



サンプルの調整 ゲノムDNAの抽出・精製

サンプルから実験に用いるDNAを抽出・精製し, PCR法により増幅させた。



抽出されたDNA

PCRプロダクトの確認（電気泳動）およびプロダクトのDNAサイズ（bp）の推測

電気泳動の結果

ア～エ・・・4種類のプライマー（DNA上の増幅させる場所と長さが異なる）別の結果

1～3の各レーン・・・次の3種類のDNAサンプルを示す

1: マウス肝細胞から抽出したDNA (Liver DNA)

2: マウスBリンパ球から抽出したDNA (G4 DNA)

3: マウスBリンパ球から抽出したmRNAをもとに、
逆転写酵素により合成したcDNA (G4 cDNA)

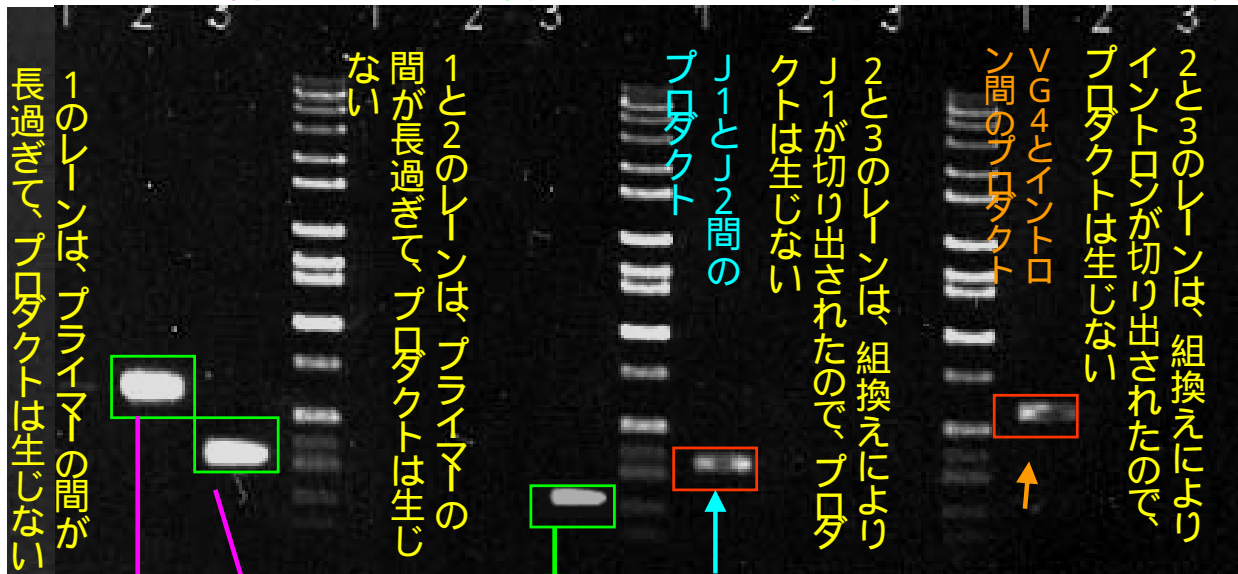
組換え
スプライシング

ア: LG4～J2間

イ: J2～C間

ウ: J1～J2間

エ: VG4～intron間

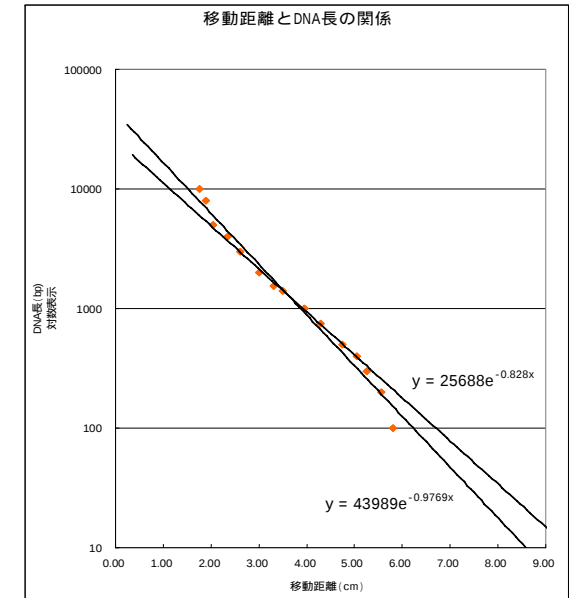


スプライシングによりプライマー間が短縮され、プロダクトを生じた

組換えとスプライシングによりプライマー間が短縮され、プロダクトを生じた
→ 勝山高校がシーケンス反応を行い配列を決定

組換えによりプライマー間が短縮され、プロダクトを生じた → 丸岡高校が配列を決定

DNAサイズ(bp)の推測



マーカー（サイズが予めわかっているもの）の原点からの距離とサイズで関係式を作る。
この式に、それぞれのバンドの原点からの距離を求めて、入力し、サイズを推測した。
結果（丸岡高校と勝山高校の4グループの平均値）を、下に示す。

スプライシング

ア - 2 620 bp (LG4～J2)

アー3 350 bp (LG4～J2)

イ - 3 273 bp (J2～C)

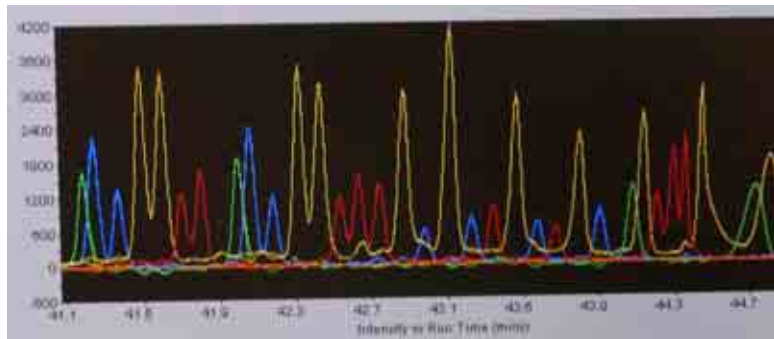
ウ - 1 392 bp (J1～J2)

エ - 1 554 bp (VG4～INT)

核酸の一次構造の決定および塩基配列データの解析

PCRにより得られたDNAプロダクト(ア-2, ア-3)の塩基配列を、自動DNAシーケンサーを利用して解読した。

解読したデータを, U C S C (<http://genome.ucsc.edu/>)でBLAT検索してみた。



ア-2

丸岡高校が決めたリンパ球DNAのLG4 ~ J2間の配列

```
CGCTCTGTTAANTGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTGAGAGTGCA
GAGAAGTGTGGATGCAACCTCTGTGGCCATTATGATACTCCATGCC
TCTCTGTTCTTGATCACTATAATTAGGGCATTGTCTACTGGTTTTAA
GTTTCCCAGCTCCCCTGNAATTTTCCATTTCTCAGAGTGATGTCC
AAAATTCTTCTTAAAAATTTAAATCAAAGGTCCTCTGGCTGTGAAG
TCTTTTATACATATATAACAATAATCTTTGTGTTTATCATTCCAGGT
TCCACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGT
ATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATAAGGGCCAGCAAAAGTG
TCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCA
GGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATC
TGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
CCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTAC
TGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGTTG
GAAATAAACgtaagtagtcttctcaactcttggt
```

ア-3

勝山高校が決めたリンパ球cDNAのLG4 ~ J2間の配列

```
TCTGTTATTGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTCCACTGGTGACATT
GTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGG
CCACCATCTCATACAGGGTCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATA
GTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCT
CATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTAACATCCATCCTGTGGAGG
AGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACG
TTCGGAGGGGGG
```

← J2領域 ← LG4領域 ← VG4領域

この紫文字部分がcDNAではなくっている配列。
cDNAではL領域とV領域が結合している(スプライシング)ことがわかる。

【今回の実験で分かった事】

考察 1

Bリンパ球が分化する過程において、可変領域と結合領域の間では不要部分の切り出しがおこなわれ、**可変領域(L + V_{G4})と結合領域(J₂)が直接連結する(組換える)**ことが示唆される。

考察 2

結合領域(J₂)が組換えにより可変領域(L + V_{G4})と連結した(考察1)後、**結合領域(J₂)と定常領域(C)の間の領域は、スプライシングの段階で取り除かれ**、抗体合成には使われないことが示唆される。

考察 3

考察1と2から、抗体合成にはDNA上の1種類の結合領域(J₂)だけが選択されて用いられることが示唆される。

考察 4

可変領域(L + V_{G4})が組換えにより結合領域(J₂)と連結した(考察1)後、**可変領域内の不要部分がスプライシングによって取り除かれて**L領域とV領域が直接結合することで、この可変領域(L + V_{G4})だけが抗体合成のために選択されて用いられることが示唆される。

結論

今回の実験によって、利根川 進博士が発見した「**抗体多様性確保のための遺伝子再構成のメカニズム**」を確認することができた。改めて、利根川博士はすごい仕事をやってのけたものだ感激している。

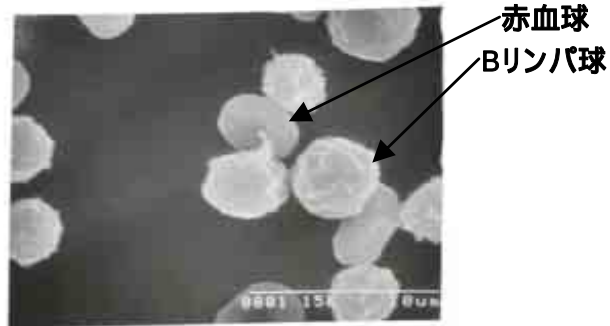
今回のSPP講座を受講してみて、PCRや自動DNAシーケンス法などを直接体験でき、分子生物学に対する興味がさらに強くなった。

共通実験

1 T細胞, B細胞の電子顕微鏡観察

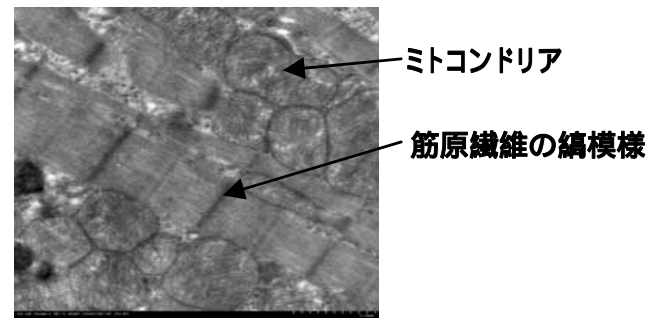
走査電子顕微鏡像(表面構造を立体的に表示する)

マウスの脾臓

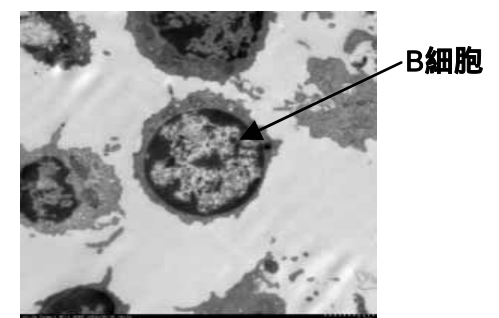


透過電子顕微鏡像(内部構造を平面的に表示する)

マウス心筋

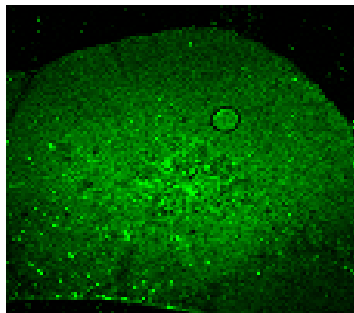


マウス脾臓



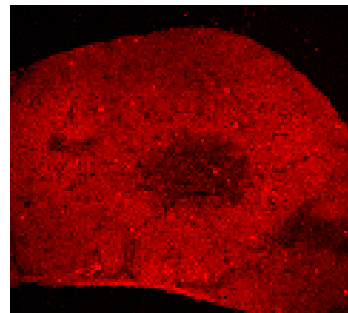
2 胸腺・脾臓の蛍光抗体法を用いたレーザー - 顕微鏡観察

マウス胸腺レーザー顕微鏡像



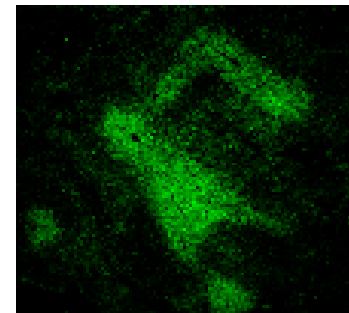
CD4が蛍光物質(緑)によって観察できる(ヘルパーT細胞)

マウス胸腺レーザー顕微鏡像



CD8が蛍光物質(赤)によって観察できる(キラーT細胞)

マウス脾臓レーザー顕微鏡像



とは同じ脾臓だが、レーザー顕微鏡によってどこにT細胞があるか観察できる

マウス脾臓レーザー顕微鏡像

