

S.P.P. 2006

抗体産生の多様性

(多様な抗体を生成する遺伝的原理の解明)

福井県立高志高等学校

五十嵐康太 鈴木伶実 河原幸平

青山未央 柳原早季

実験の目的

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化することを確かめる!!

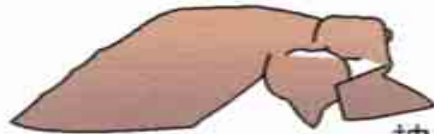
共通実験

- ・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

(共通実験についての報告は省略します)

今回の講座の実験の概要

マウス肝臓
凍結保存中
(抗体を作
らない細胞
の代表)



抽出と精製

ゲノムDNA

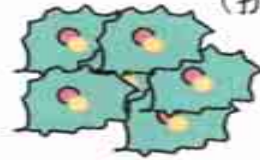


κ 軽鎖抗体遺伝子
に違いがあるかを
両ゲノムで比較

- ・ 可変部と連結部が結合しているかどうか。
- ・ 連結によりその間の配列が失われているか。

PCR法

ハイブリドーマ細胞
(抗A抗体を作る細胞)



ゲノムDNA



PCR法

ハイブリドーマが発現しているのは
1種類のκ軽鎖。

抗体κ軽鎖
mRNAの
配列情報を
役立てる。

簡単な
分析の原理



mRNAは連結した
構造だから、短い
DNAが増幅。
サイズはゲノムの
ものと同じはず。



この間が200Kbp
と長いのでPCR
酵素は働かない

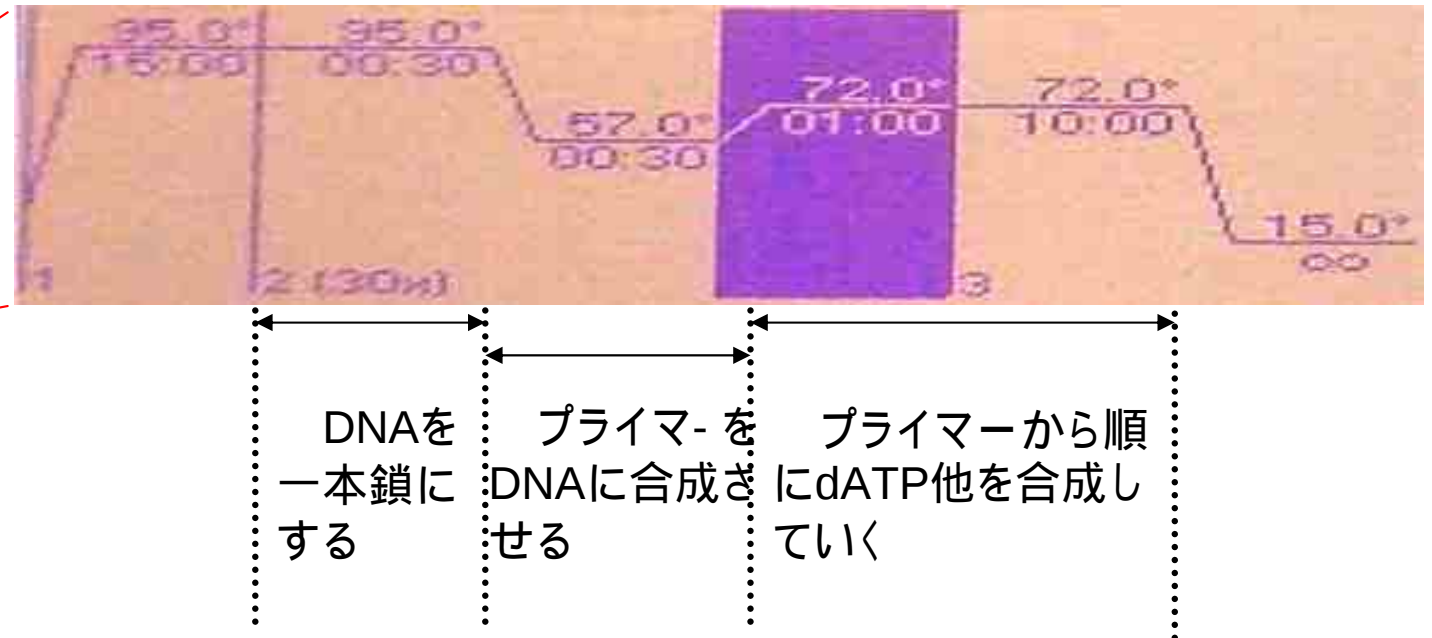
連結した場合は
短いDNAが増幅

- ・ 設定したプライマーを用いたPCR反応によりDNAが増幅するかどうか。
- ・ 増幅DNAを寒天ゲルで分離し、DNAを可視化、そのサイズ (bp) を決定し予測値と比較。
- ・ 増幅したDNAのシーケンスにより配列情報を得、連結した構造を確認。

1. MM、プライマー、DNA、滅菌水を混合する

MMとは・・・Master Mixの略 PCR Buffer, MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Taq DNA Polymeraseがあらかじめ最適化濃度に調整されている

2. PCRする



3. PCRで増やしたDNAの一部を電気泳動する



電解質を含むアガロース(寒天)ゲルに電流を流すと、その中の荷電粒子がゲルの目をくぐって移動する。2本鎖DNAの場合は、DNAの大きさのみに依存して分離する。

このように仮定した遺伝子に構造変化があったとして、これを実験的に証明するにはどのようにすればいいか？

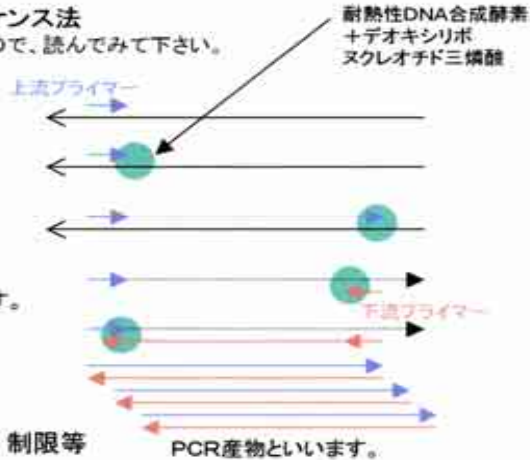
利用できる実験方法で最適なのはPCR法とDNAシーケンス法
各方法についての詳細な解説は、巻末の参考資料にありますので、読んでみてください。



- DNAの単鎖同士が結合して2本鎖を形成する原理は？
対合するDNAの塩基配列が相補的であるから。
- 塩基が相補性ということとは？
A=TとG=Cという対合ができること。
- 具体的には、鎖には方向性があり、必ず、2本鎖は双方向性です。

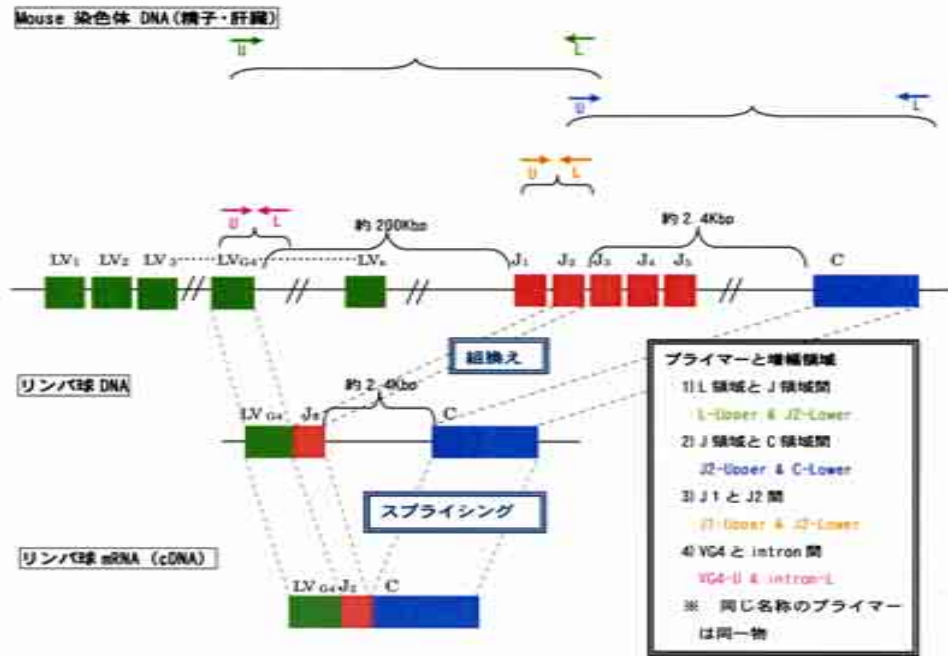
AGTCTAGGCAATT
TCAGATCCGTTAA

- 1本鎖のDNAに、短い、20塩基位のオリゴDNAを加えると短いオリゴDNAの塩基配列と相補的な配列の部分に結合します。
- その結合の特異性は4の20乗塩基に一度した現れません。それは1、1×10の12乗塩基に1度ですから、ヒトゲノム上に1回あるかどうかです。単純確率としてですが。

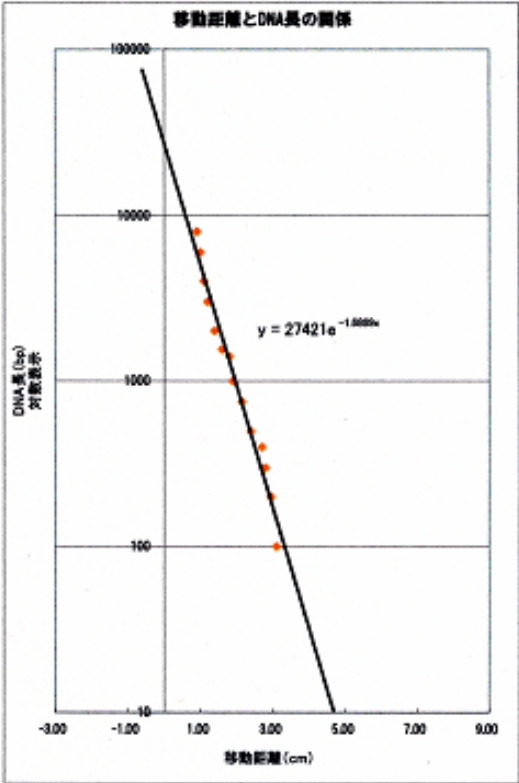
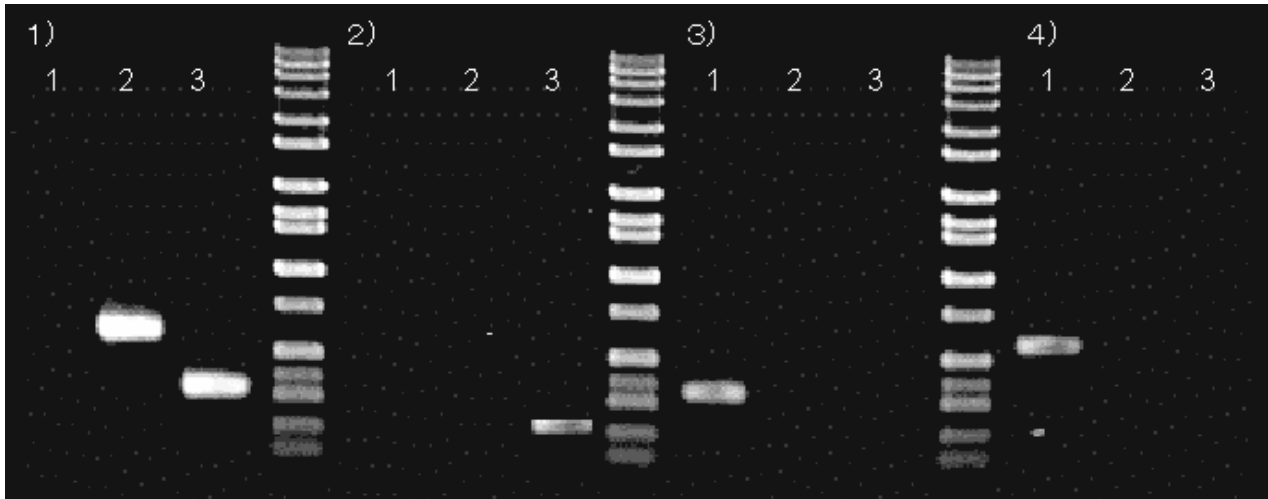


- 制限等
- もし、途中でDNAが切断していたら、産物はできません。
 - プライマー間が長くても産物はできません。
 - 途中に複雑な配列があると産物はできません。
 - 産物のDNAシーケンスができます。

κ 軽鎖遺伝子の模式図と増幅用プライマー位置関係



PCR法。対称から採取したDNAを増幅することができる。
(プライマーの種類によって増幅できる場所が違ってくる。)



移動距離からDNA長を求める

移動距離 (cm)	DNA長 (bp)
3.3	104,823,232

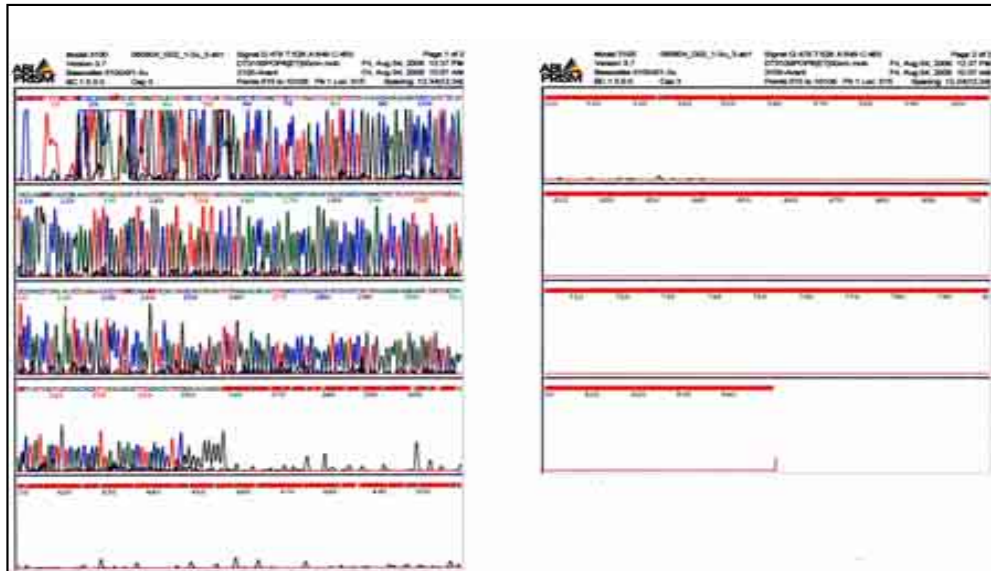
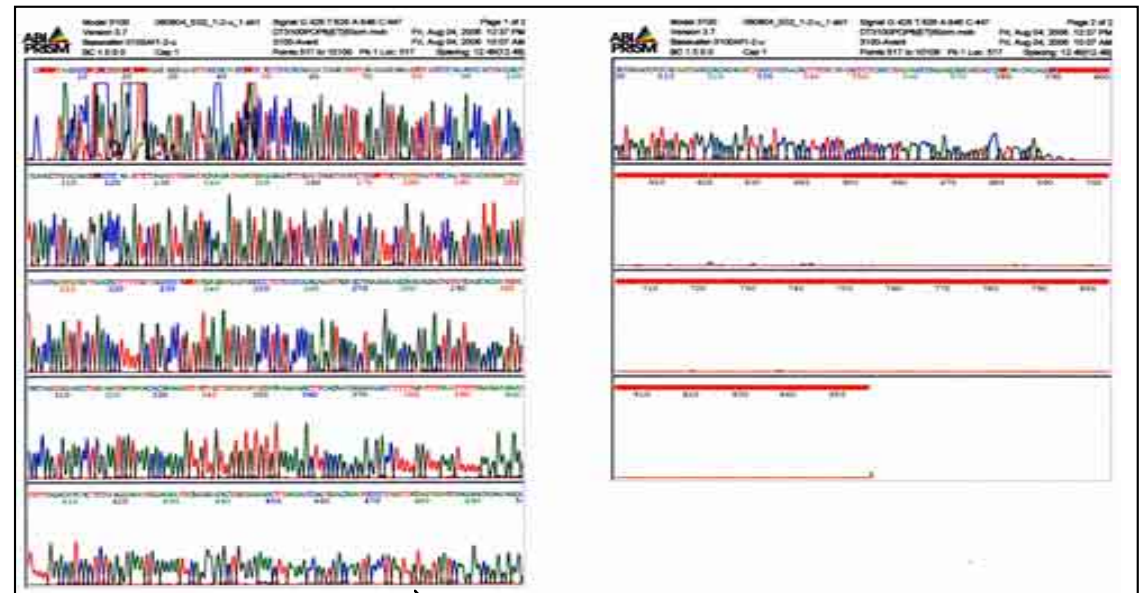
← 電気泳動の移動距離とDNAの長さの関係。左下の枠に移動距離を打ち込むとDNAの長さが分かる。

4. PCRで増やしたDNAの一部を精製し、シーケンサーにかける

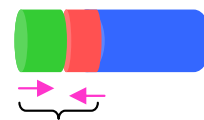
- ・高分子コロイドであるDNAをエタノールと塩で凝集・沈殿させる。余分な塩類や低分子成分は沈殿しない。
- ・上記の沈殿を遠心し上清を取り除いてエタノールを蒸発させると、DNAが精製できる。



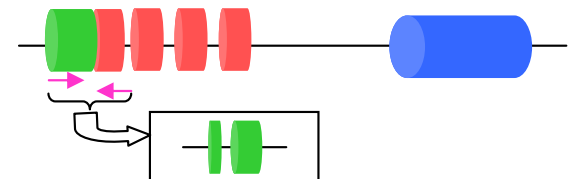
シーケンサー: DNAの配列を読み取る機械



ハイブリドーマのmRNAのL領域とV領域間のPCR産物をシーケンス反応した結果



ハイブリドーマから得たDNAのL領域とV領域間のPCR産物をシーケンス反応した結果



より詳細に構造を見ると、DNAではLとVの間は離れている。

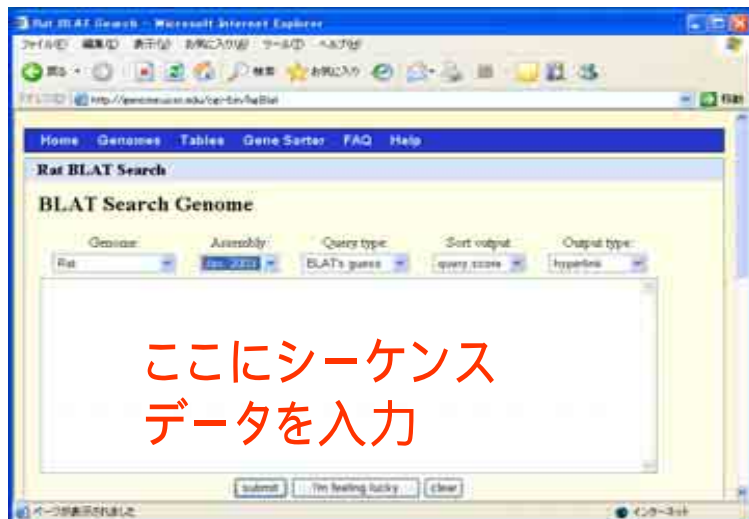
1 - 2のシーケンスデータ

```
CGCTCTGTTAANTGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTGAGAGTGCAGAG
AAGTGTGGATGCAACCTCTGTGGCCATTATGATACTCCATGCCTCTCTG
TTCTTGATCACTATAATTAGGGCATTGTGCTACTGGTTTTAAGTTTCCCCA
GCTCCCCTGNAATTTTCCATTTCTCAGAGTGATGTCCAAAATTCTTCTT
AAAAATTTAAATCAAAAGGTCTCTGGCTGTGAAGTCTTTTATACATATA
TAACAATAATCTTTGTGTTTATCATTCCAGGTTCCACTGGTGACATTGTG
CTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCAC
CATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATA
TGCAGTGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTAT
CTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATG
CTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTTCGGAGGGG
GGG
```

1 - 3のシーケンスデータ

```
TCTGTTATTGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG
ACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTG
GGGCAGAGGGCCACCATCTCATAACAGGGTCCAGCAAAAGTGTCA
GTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCA
GGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGA
ATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCA
ACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTTCGGAGGG
GGG
```

5 . シーケンスデータをUCSC (University of California Santa Cruz) のサイトでBlat検索する



・結果のうち、一番ヒットの割合が多いものを選んで詳細を見
てみる。

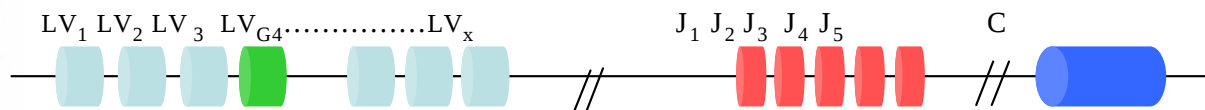
LCA

YCA

11

12

14



70447829-70656482の間の

を示している。

上の図の色

の色が

対応する。

15

c

cDNA の配列

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttcaggg
ttccactggg gacattgtgc tgacacagtc tccctgttcc ttagctgtat
ctctggggca gaggggccacc atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt
acatctggct atagttatat gcacttggtac caacagaaac caggacagcc
acccaaacac ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct ggggtccctg
ccagggtcag tggcagtggt tctgggacag acttcacctt caacatccat
cctgtggagg agggagatgc tgcaacctat **TACACGTTCC GAGGGGGGAC**
CAAGCTGGA **ATAAAAC** CAT CCAGTGAGCA GTTAACATCT GGAGGTGCCT
CAGTCGTGTG CTTCTTGAAC AACTTCTACC CCAAAGACAT CAATGTCAAG
TGGAAGATTG ATGGCAGTGA ACGACAAAAT GGCCTCCTGA ACAGTTGGAC
TGATCAGGAC AGCAAAGACA GCACCTACAG CATGAGCAGC ACCCTCAGT
TGACCAAGGA CGAGTATGAA CGACATAACA GCTATACCTG TGAGGCCACT
CACAAGACAT CAACTTCACC CATTGTCAAG AGCTTCAACA GGAATGAGTG
TTAGAGACAA AGGTCTGAG ACGCCACCAC CAGCTCCCCA GCTCCATCCT
ATCTTCCCTT CTAAGGTCTT GGAGGCTTCC CCACAAGCGA CCTACCACTG
TTGCGGTGCT CCAAACCTCC TCCCGACCTC CTTCTCTCTC TCCTCCCTTT

ゲノム上のL領域、V(G4)領域、J領域、C領域がハイブリドーマのDNAでは組換えが起こり、cDNAではスプライシングが起きていることが、電気泳動の図やシーケンスデータから分かった。抗体遺伝子が変化することを体験できた。

【講座を終えて】

今まで免疫について特に考えたことがありませんでしたが、今回の実験講座に参加して、免疫に関心を持つことが出来ました。

最初、使用する実験器具にはかなり高価なものもあると聞き、失敗したらどうしようとか、ノーベル賞をとった利根川博士の実験をするということで、そんな難しそうなことが出来るかなと思っていました。

けれど実際は、担当してくださった先生方がとても好意的で親しみやすく、むしろ楽しく実験でき、充実した2日間を過ごすことが出来ました。

今回実験したのは大学生も苦勞するという免疫の分野らしく、私はまだ理解できないところが多いのですが、いずれ理解できたら良いなと思います。

最後に、担当してくださった松川先生、岸本先生、吉村先生、ありがとうございました。