

S P P 2 0 0 6 免疫の驚異を学ぶ実験講座

丸岡高校 Cコース 抗体の多様性

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化する事を確かめる。
- ・ 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。

【実験内容】

《Cコース個別実験》

- ・ DNAの抽出
- ・ PCRによる目的DNAの増幅とその塩基配列の決定
ハイブリドーマのゲノムDNAとマウスの肝臓の細胞のゲノムDNAをPCR法で遺伝子増幅物を作り、寒天ゲルで分離する。またサイズ（bp）を決定する。

DNAをシーケンスにより配列情報を確認する。

《共通実験》

- ・ オクタロニー実験
- ・ B cell と T cell の観察

利根川理論 利根川博士が取り組んだのは、抗体分子の多様性の分子機構である。即ち、無限ともいえる種類の抗原を強く結合する能力を抗体分子に付与するために、マウスやヒトでは、抗体分子が抗原と結合する可変部をコードする遺伝子領域が全て異なっている。この違いは、元々染色体DNA上にある抗体遺伝子の可変領域が数十から数百種類もあることに基づいている。このような複数の可変領域遺伝子の中から、適当な遺伝子の一つを選択して、その他の可変領域遺伝子は使わない仕組みがある。これがDNAの組換えによることを世界で始めて見出した博士は、この業績が称えられノーベル賞を受賞した。この組換え(選択)により、体内を巡るBリンパ球の元になる前駆細胞の抗体遺伝子は皆異なっている。

抗体の多様性 抗体は、4本のアミノ酸の鎖からできており、中央にY字型を作る重鎖2本、Y字型の2本の先端の外側を作る軽鎖2本からできている。軽鎖、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 今回の実験は、抗体を作り出す第6染色体のDNAをマウスの肝臓と、分化したBリンパ球から抽出し、リンパ球からの軽鎖mRNAから逆転写酵素で作りに出したcDNAを材料にして、それらの構造の比較を行った。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に様々なプライマーを使った。その理由は別に示す。LV領域とJ領域間、J領域とC領域間、J1とJ2間、LVG4とその横のイントロン間で増幅させる。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。

結果と判定 この後、ゲル電気泳動で、(ア)DNAが存在するか、しないか？ (イ)存在する場合どれだけの分子量か？ (ウ)DNAシーケンサーにより、遺伝子のどこの塩基配列が選択されたのかを検証した。

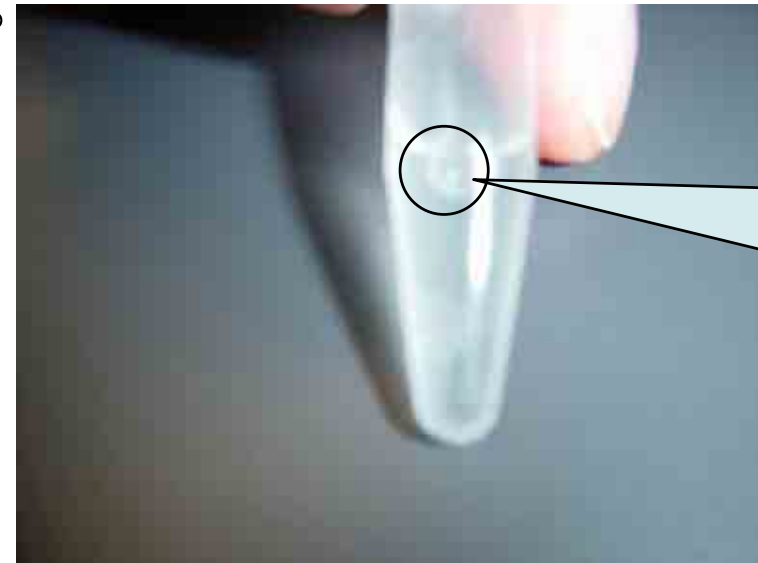
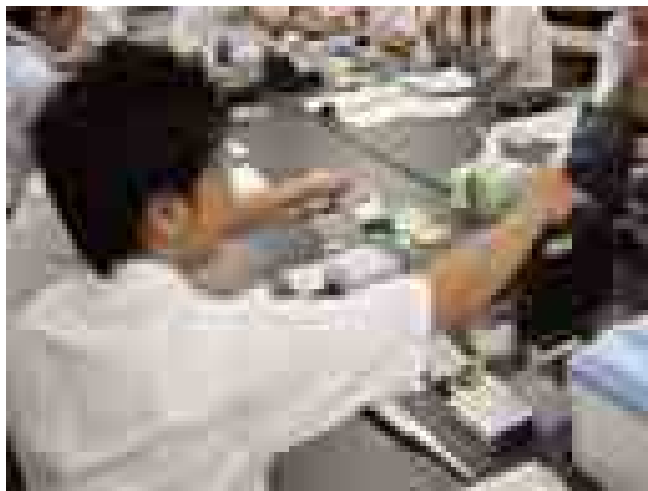
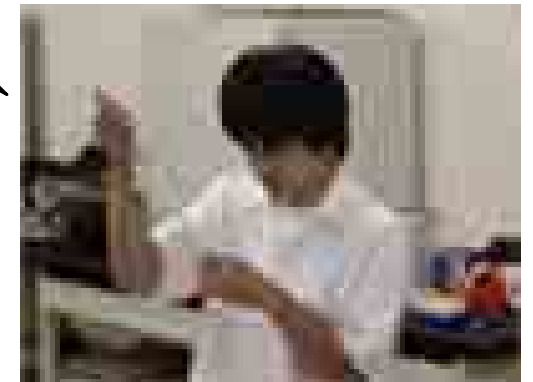
本実験の前にマイクロピペッターの練習をした。

ゲノムDNAの抽出・精製

マウスの肝臓を3mm角に切り、その肝臓からDNAを抽出する。

一つの核には、DNAの鎖が、つなぎ合わせると約1.5m近くの長さで存在する。
エッペンチューブ内で組織破壊をする。
遠心分離をし、上清を捨てる。(沈殿は核)
核に対してCell Lysis Solutionで核膜を溶かし、Proteinase K Solutionを加えて一晩、55℃保温してタンパク質を溶かす。
エタノールを加え遠心を行う。

1 μ l ~ 200 μ lの範囲で試料を採れるように、マイクロピペッターの使用訓練をした。



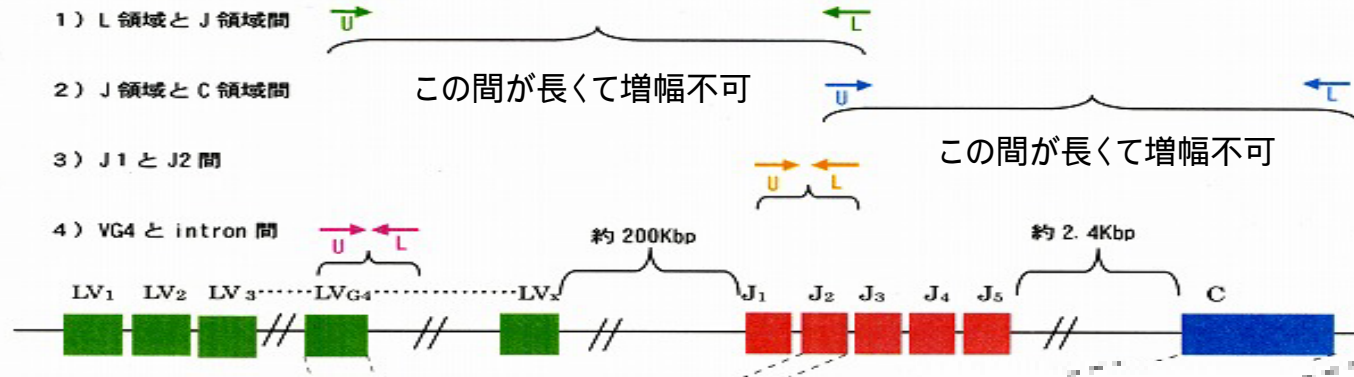
このぼんやりしたのがDNAです。

PCR法によるDNA増幅実験

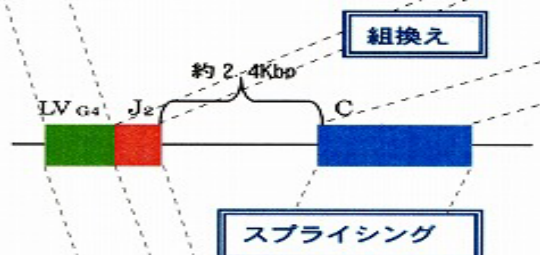
マウス肝臓のDNA、リンパ球のDNA、と鎖mRNAから作ったcDNA を様々なプライマーを用いて増幅した。

κ 軽鎖遺伝子の模式図と増幅用プライマー位置関係

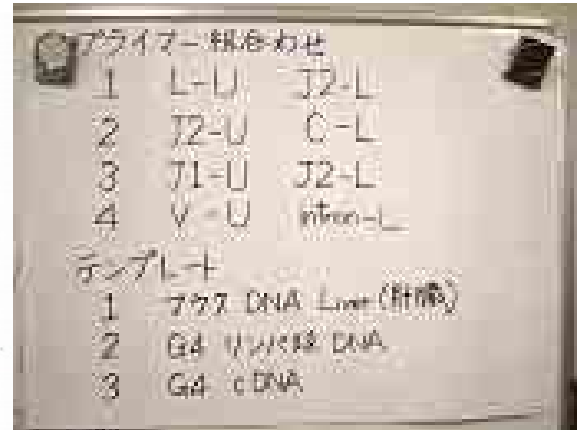
Mouse 染色体 DNA (精子・肝臓)



リンパ球 DNA



リンパ球 mRNA (cDNA)



プライマーと増幅領域

1) L 領域と J 領域間
L-Upper & J2-Lower

2) J 領域と C 領域間
J2-Upper & C-Lower

3) J1 と J2 間
J1-Upper & J2-Lower

4) VJ4 と intron 間
VJ4-U & intron-L

※ 同じ名称のプライマーは同一物

結果の予測

テンプレート		
1	2	3
-	+	+
-	-	+
+	-	-
+	-	-

【PCR法】

3段階により増幅させる。短時間によりDNA断片を百万倍にも増幅できる。1993年のノーベル賞受賞 (Mullis)

- 第一段階 / 変性: 2本鎖DNAを1本鎖DNAに解離させる。
- 第二段階 / 焼きなまし: 特定の領域をはさむ2本のDNAプライマーを相補的な塩基配列とくっつける。
プライマー・・・鎖の合成に必要な相補的なDNAの短い断片
- 第三段階 / 伸長: 耐熱性のポリメラーゼにより相補的な塩基を重合させ伸長させる。
ポリメラーゼ・・・ヌクレオチドどうしのリン酸と糖の部分と結合させる酵素。



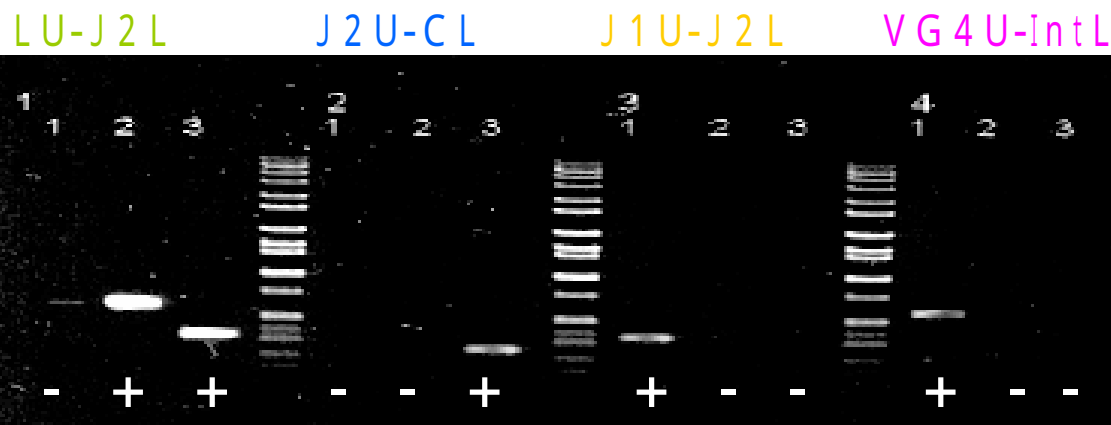
DNAの大きさを決める（電気泳動）

【ゲル電気泳動】

1%アガロースゲルを溶かし、試料を入れる穴が開くように固める。
PCRサンプルに10 ulの色素溶液を混合し試料を入れる穴に入れる。
100Vで35分電気泳動をする。

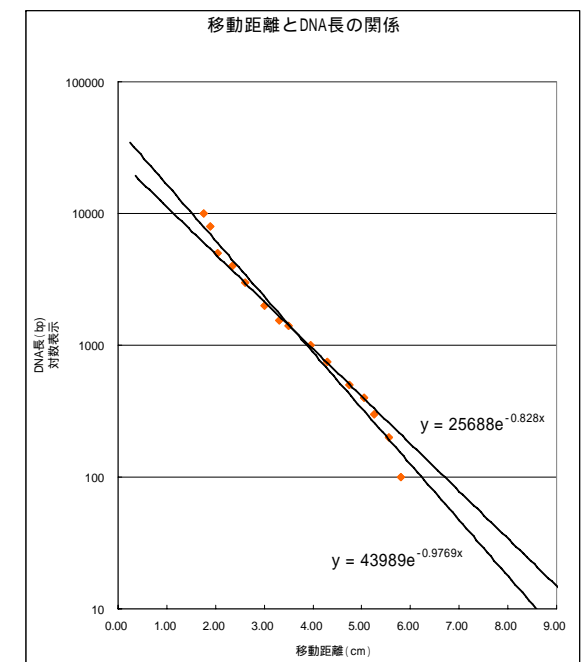
電気泳動後ゲルをGelRed染料で染色し、泳動蔵を写真に撮る。
電解質を含むアガロースに電流を流す。DNAはリン酸を持つので、(-)に帯電している。DNAはプラス方向に移動する。ゲルの網目をくぐって移動するので、分子量の小さいDNAは早く移動する。

マーカーとバンドサイ 原点からの泳動距離と塩基の長さの関係をスタンダードをもとにグラフ化する。その後、実験で得られたバンドのサイズをグラフに合わせサイズを推測する。



1. 肝臓ゲノムDNAではJ1U・J2LとVG4U・IntLのみがPCR産物ができた。
2. ハイブリドーマのゲノムDNAでは、LU・J2LのみがPCR増幅できた。
3. ハイブリドーマのcDNAではLU・J2LとJ2U・CLでPCR産物ができた。

以上の結果は予測と正確に一致した。



核酸の一次構造の決定

PCRの結果を確かめるために、連結が正確に行われたことをシーケンスして確認する。

【Sanger法】

配列を決めたい1本鎖のDNAの相補的コピーを作る時、通常のヌクレオチドとDNA阻害剤をつけ、蛍光発色団をつけたヌクレオチドを入れる。

DNAポリメラーゼで鎖を伸長する。

鎖は様々な長さで伸長をやめる。

試料をゲル電気泳動にかける。

DNAはマイナスの電荷を持っているので陽極に移動する。移動は分子量の小さいものが早く進むので、分子量の小さいものから検出器に到達する。

ゲルにレーザー光を当てて蛍光バンドを検出し、コンピューターで処理をしてデータを出す。



丸岡高校がシーケンサーで読んだ 軽鎖
cDNAのL-V-Jの配列

```
ATTATGATACTCCATGCCTCTCTGTTCTTGATCA  
CTATAATTAGGGCATTTGTCACCTGGTTTTAAGTT  
TCCCCAGCTCCCCTGNAATTTCCATTTCCCTCAG  
AGTGATGTCCAAAATCTTCTTAAAAATTTAAAT  
CAAAGGTCCTCTGGCTGTGAAGTCTTTTATACA  
TATATAACAATAATCTTTGTGTTTATCATTCCAG  
GTTCCACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCC  
TGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCC  
ACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAGTGTGAGTA  
CATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACA  
GAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTAT  
CTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCA  
GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC  
CCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCT  
GCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTA  
CACGTTCCGAGGGGGGGG
```

ハイブリドーマの組換え後のゲノムDNAの配列は勝山高校グループが読んだ。それらのデータをもとに考察した。

【今回の実験で分かった事】

今回の実験では、

LJ間は、最初遠かったのが、組み換えを受けて短くなった。

JC間は遠かったのがスプライシングを受けて短くなった。

J1とJ2間は最初短かったのが、J1が組み換えによりなくなってしまった。J2が選択された。

LVG4とイントロンは、組み換えによりイントロンの部分がなくなった。という事がわかった。

今回の抗体はLVG4とJ2と定常部からできている。

【考察】

利根川博士の言う通り、可変部・連結部から一つ選択して抗体を産生している。

オクタロニー法 《二次元免疫拡散法》 《二重免疫拡法》

【オクタロニー法】

1948年 Ouchterlony (オクタロニー) により考案されたゲル内沈降反応の一つ。

抗原や抗体が一方向にゲル層内を拡散し、出会ったところで沈降物を作る。

小試験管内に作られたゲル層 《一次元免疫拡散法》

ガラス板上に作られたゲル層に穴を開けて抗原溶液や抗体溶液を満たして拡散させる 《二次元免疫拡散法》

抗体、抗原どちらか一方のみをゲル内で拡散させる 《単純免疫拡散法》

抗体と抗原両方とも、別々の穴に入れゲル内で拡散させる 《二重免疫拡散法》

今回は、

《抗原》 唾液、赤血球溶液 (ヒト、マウス、羊)、血漿 (ヒト)、ヒトアルブミン
ヒトヘモクロビン

《抗体》 抗ヒトアミラーゼ抗体、抗ヒトヘモクロビン抗体、抗ヒトヘモクロビン抗体
を使用し、オクタロニー法を実施した。



【実験で分かった事】

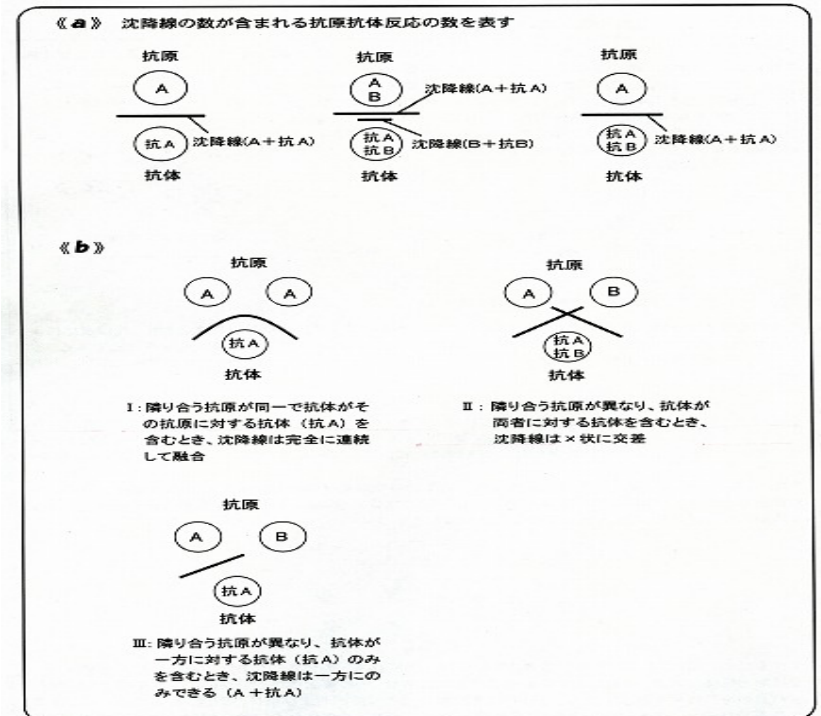
抗原と抗体が出会うと1本の沈降線ができる。

2種類の抗原とそれに対応する2種類の抗体が出会うと2本の沈降線ができる。

隣り合う抗原が同一で抗体がその抗原に対する抗体を含む時、沈降線は連続する。

隣り合う抗原が異なり、抗体が両者に対する抗体を含む時、沈降線は×状に交差する。

解説 オクタロニー法の基本的パターン



電子顕微鏡とレーザー顕微鏡による B cell、T cell の観察

【電子顕微鏡】

光より波長の短い電子を光源に用いる事により、より微細な構造(細胞内小器官・膜構造)を観察可能にした顕微鏡。

透過電子顕微鏡・・・0.1 μm の薄い切片にした試料に電子線を当て組織の内部構造を平面的に観察する顕微鏡

走査電子顕微鏡・・・表面を金でコーティングした試料の表面に電子線を当て、表面構造を観察する顕微鏡

【蛍光観察】

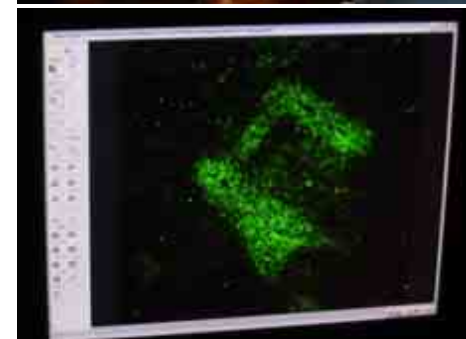
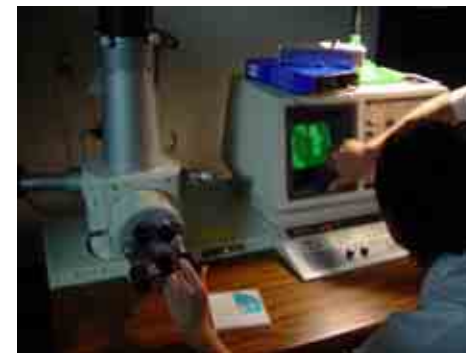
蛍光染色や標識した細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行う。

今回は、胸腺、脾臓の細胞のタンパク質を抗原として認識する一次抗体を標識する。更に一次抗体を抗原として認識する蛍光色素標識二次抗体を結合させる。目的のタンパク質の局在や量を観察することができる。

【実験で分かった事】

タンパク質を蛍光させることで、今まで判別できなかった細胞の種類を見分けることができるようになった。

今回は、胸腺に存在する T 細胞と B 細胞を区別し局在や比率を知ることができた。



2006 SPP の感想

西出浩一 色々な器具、機械に見て触れて関心興味が増しました。自分の将来が見えた気がします。

乾 拓朗 私達の体の中では毎日実験で分かった素晴らしい防御プログラムが働いている事を知りました。

南 聡 利根川博士の研究の内容を知って、抗体の多様性について興味湧き自分でも調べてみたいと思うようになりました。

土橋 優人 抗体の多様性の実験をし、遺伝子の組み合わせの変化により非常に多くの抗体をつくり出すことができるのを知りとても感動しました。

杉田 翔一 人間の体がこんなに複雑にできているとは思いませんでした。免疫の分野は奥が深いと思いました。

上中 一司 SPP 参加も実験内容もパワーポイントも初めてづくしでした。興味の持てる内容で楽しかったです。