

免疫レパトアの正確な 定量・モデル化技術の調査研究

Accurate quantification and modeling of immune repertoire.

目的 Purpose

免疫系の多様な受容体分子群（レパトア）の変化は免疫応答等を理解するための鍵となる。しかし、レパトア生成過程の確率性に起因する個体差が正確な定量解析を阻んでいる。本研究ではレパトアの正確な定量・モデル化を目指し、個体差の問題を回避し厳密な比較を可能にする手法を検討する。

方法 Method

本研究では実験レベルで個体差の問題を回避しレパトアの厳密な比較を可能にする遺伝学的手法として、1個体においてその免疫細胞レパトアを確率的にラベリング、等分して解析することを可能にする合成遺伝子を構築し、その動作をin vitroで検討した。

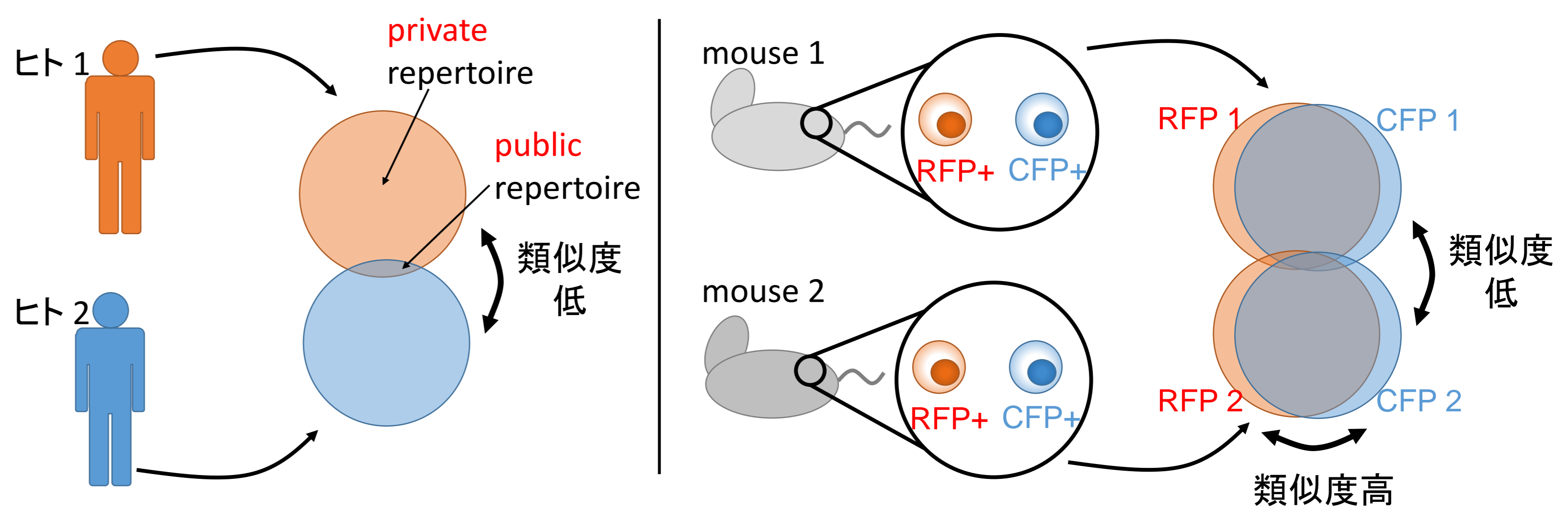
展望 Prospect

本研究により、構築した合成遺伝子が期待されたように動作することが示された。今後はこの合成遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えマウスを作製し、次世代シーケンサによる免疫レパトアの測定等を進め、免疫レパトアの正確な定量を可能にする汎用的ツールとして確立する。

免疫レパトア定量に向けた合成遺伝子の作製と検証

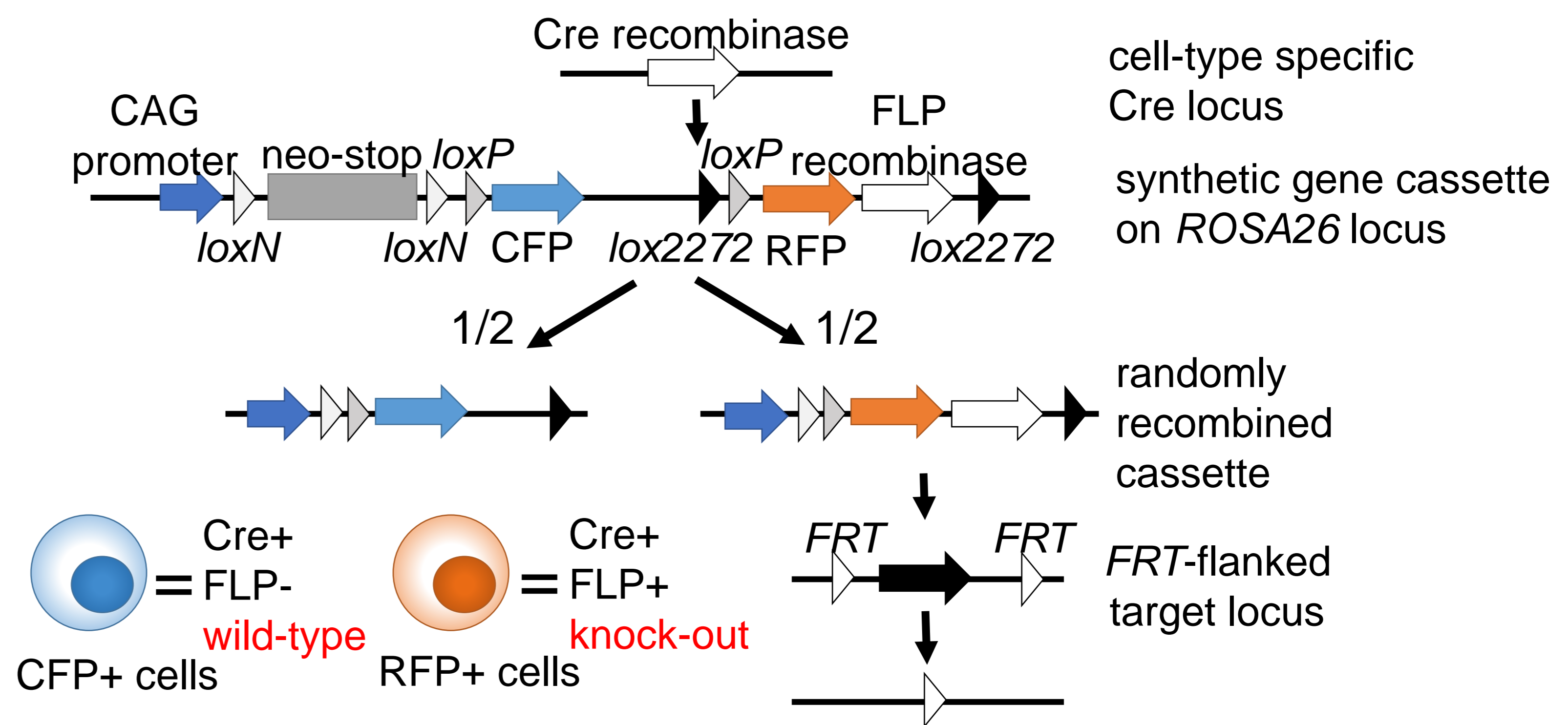
本研究の背景

本調査研究は、免疫レパトアの正確な定量を可能にするための遺伝学的手法の実装、解析を目指したものである。免疫系の多様性を持った受容体分子群（レパトア）の変化は定量化の努力がなされているものの、レパトア生成過程の確率性に起因する個体差が正確な解析を阻んでいる（右図）。本研究では実験レベルで個体差の問題を回避しレパトアの厳密な比較を可能にする遺伝学的手法として、1個体においてその免疫細胞レパトアを確率的にラベリング、等分することにより、類似度の高いレパトアを1個体内に作製し、それを解析する手法を検討した。



合成遺伝子の設計

本手法はCreリコンビナーゼを誘導することで染色体上に tandemに並んだCFP, RFP-P2A-FLPのどちらかが切り出され、残ったものが発現するというものである（右図）。また、本手法ではRFP-P2A-FLPが残った場合、FLPリコンビナーゼが発現することで、FRT配列を認識して組換えを引き起こし、染色体上の別の遺伝子座を選択的に欠損できるようになる。



合成遺伝子の検証

本手法の確認のために、CFP, RFP, FLPをクローニングし、Creリコンビナーゼに認識されるloxP配列とそのバリエーションを配置したCFP/RFP-P2A-FLP遺伝子を作製し、lox-stop-lox (LSL)の下流に配置した。この遺伝子をマウス胚性線維芽細胞 (MEF)にstable transfectionを行い、その細胞にtamoxifen誘導性CreリコンビナーゼCre-ERT2、およびFRT-stop-FRT-GFP遺伝子をtransfectionで導入した。すると、CFP陽性、RFP陽性、CFP/RFP両者とも陰性の細胞がそれぞれ観測された。また、RFP陽性細胞の中にGFP陽性細胞が観測され、CFP陽性細胞やCFP/RFP陰性細胞の中では観測されなかった（右図）。これは、当該手法が機能していることを示唆する。

