Osaka University Knowledge Archive

Title	免疫グロブリンH鎖遺伝子のクラススイッチ組換えの分子機構
Author(s)	二階堂, 敏雄
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33947
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【23】

氏名・（本籍）	二階堂（にかいどう） 敏（とし） 雄（お）
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　6403　号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	医学研究科　生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**免疫グロブリンH鎖遺伝子のクラススイッチ組換えの分子機構**
論文審査委員	（主査） 教　授　本庶　佑 （副査） 教　授　近藤　宗平　　教　授　松原　謙一

論文内容の要旨

（目　的）

Bリンパ球の分化の過程で最初に発現されるH鎖はμ鎖であり，次にμ鎖とδ鎖が同時に細胞表面に現われ，最後にμ，γ，α又はε鎖のうちいずれかのみを産生するようになり，分化が完了する。1個のBリンパ球の分化の過程で産生されるH鎖は，V領域は同じであるが，C領域がμから次々とγ，α及びεへと変化してゆく事が知られており，これはH鎖のクラススイッチ現象といわれている。H鎖遺伝子の発現には少なくとも2段階の構造変換を必要とする。第1の変換は，V－D－J組換えと呼ばれ，V遺伝子D遺伝子J遺伝子という3つの遺伝子の組換えによる連結であり，J遺伝子がCμ遺伝子の上流に存在する為に，完成されたV領域はμ鎖として発現される。第二の変換は，S－S組換えと呼ばれるもので，各C遺伝子の上流に存在するS領域間で起こり，両者の中間にあるDNA断片を欠失し，その結果V－D－J組換えで完成されたV領域が別のC遺伝子と連結され，クラススイッチが完了する。S領域はこの組換えに関与する領域として機能的に定義された領域だが，構造上はクラススイッチ組換え部位周辺に単位配列の連続した反復が見出されている。本研究ではこれらの配列がクラススイッチ組換えに寄与するかどうか，またクラスに特異的な組換え配列が存在するかどうかを明らかにする為に，μ鎖遺伝子上流の領域を始め今まで十分解析がなされていなかった領域を含め，全てのS領域についてそれらの構造の詳細な解析を行い，塩基配列を決定し比較検討した。更に解析した構造をもとにクラススイッチ組換えの分子機構について検討を加えた。

（方法ならびに成績）

①　μ鎖S領域の構造：既に単離されていた未分化型μ遺伝子を含むクローンから，Sμ領域を含む制

限酵素Hind Ⅲで3.7キロ塩基対に切断されるDNA断片を単離し，制限酵素切断点地図を作ると共に，その塩基配列を決定した。また3.7キロ塩基対のHind Ⅲ断片の中心部には塩基配列決定の為に必要な制限酵素切断点が無かったので，制限酵素Alu Ⅰ，Ddel，Hph Ⅰで切断することによって中心部の塩基配列を類推した。その結果Sμ領域の周辺部は，GAGCT，GGGGTという2種類の5塩基対の配列より成り，$(GAGCT)_3$GGGGTという20塩基対の単位が最も高頻度に繰り返していることが明らかになった。また中心部はAGCTを認識して切断するAlu Ⅰで切断すると5塩基対と10塩基対のDNA断片が最も高頻度に見られ，CTNAGを認識するDde Ⅰでは5塩基対と15塩基対，GGTGAを認識するHph Ⅰでは20塩基対のDNA断片が最も高頻度に，次いで15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55そして90塩基対のDNA断片が見られた。これらの結果から中心部も全てGAGCTとGGGGTという2種類の5塩基対の配列よりなり，$(GAGCT)_3$GGGGTという20塩基対の単位が最も頻繁に繰り返していることが明らかになった。

② δ鎖，γ_3鎖及びγ_2a鎖のS領域の構造：未分化型のδ鎖遺伝子の上流とγ_3鎖産生骨髄腫DNA由来のγ_3鎖遺伝子の上流及び，未分化型のγ_2a鎖遺伝子の上流のDNA断片を単離して，制限酵素切断点地図を作ると共に塩基配列を決定した。その結果γ_3鎖産生骨髄腫においてもγ_3鎖遺伝子の上流でSμ領域とSγ_3領域とで組換えを起こしていることが明らかになり，既に部分的に決定されていたSγ_3の塩基配列よりも典型的な49塩基対の単位配列を見出すことができた。未分化型γ_2a鎖遺伝子の上流は，他のγサブクラスとは異なり52塩基対の単位配列よりなることが明らかになった。δ鎖遺伝子の上流の塩基配列を決定した領域に関しては，他のS領域に見られるような単位配列による反復構造は見られなかった。その為δ鎖遺伝子はS領域に相当する領域が無いと考えられ，δ鎖の発現はS－S組換えを必要としない別の機構で行なわれると考えられる。

③ ε鎖S領域の構造：ε鎖発現型のハイブリドーマのε鎖遺伝子の上流と未分化型のε鎖遺伝子の上流のDNA断片を単離して，その構造を解析し，比較検討した。発現型ε鎖遺伝子は，Sμ領域とSε領域との間に396～397塩基対よりなるSγ_2b領域のDNA断片を有していた。この事はこの細胞で発現されているV領域は，最初にμ鎖遺伝子の上流に存在し，次いでγ_2b鎖遺伝子と連結され，最後にε鎖遺伝子と連結されて発現した事を示している。またSε領域の構造は，典型的な単位配列をとらないが，おおよそ40塩基対を単位として繰り返している事が明らかになった。

（総　　括）

以上のようにS領域は，δ鎖遺伝子上流を除く全てのC遺伝子の上流に存在し，短いGAGCTとGGGGTという共通配列を有するクラスによって異る単位配列が数十回以上連続した反復構造より成り立っている事が明らかになった。（表）

また組換え点には，クラスによる特異性は見られず，1例を除いてTGGG又はTGAGという配列が付近に存在するので，この配列がこの組換えをつかさどる酵素の認識配列である可能性が高い。

これらの理由により，クラススイッチ組換えの機構は，各S領域に存在する高頻度反復配列によるhomologous recombinationであると考えられる。S－S組換えにおける組換え点の認識の甘さは，V領域とC領域の中間の介在配列中で起こる為に，連結部位そのものはそれほど正確である必要はなく，

（表）

S region	Prevalent unit sequences
S_{μ}[a]	GAGCTGAGCTGGGGTGAGCT
$S_{\gamma 3}$	PGGACCAGGCTGGGACAGCTCTGGGGAGCTGGGGTGGGTGGGAGTGTGG
$S_{\gamma 1}$	GPPTCCAGGCTGAGCAGCTACAGGGGAGCTGGGGYAPPTGGGAPTPTPG
$S_{\gamma 2b}$	GGGACCAG$^{T}_{A}$CCTAGCAGCTPTGGGGGAGCTGGGGA$^{A}_{T}$GGTPGGAPTPTGA
$S_{\gamma 2a}$	GGGACCAGGCAGTACAGCTCTGGGTPGGGPNCAGGCAGTACAGCTCTGNGTG
S_{ε}[a]	GGGCTGGGCTGAGCTGPGCTGAGCTGPGCTGAGCTGPPNT
S_{α}	ATGAGCTGGGATGAGCTGAGCTAGGCTGGAATAGGCTGGGCTGGGCTGGT GTGAGCTGGGTTAGGCTGAGCTGAGCTGGA
Common sequences	(G) AGCT(G), TGGG(G)

[a] Variable unit length.

むしろ抗原刺激後極めて短い時間に進行する効率のよい組換えが必要とされるからかもしれない。また各S領域の長さとマウスの血液中の抗体の量に相関性がある為，血液中の抗体の量にS領域の長さが，組換え頻度を上昇させるように働き，抗体量の増減に寄与している可能性が考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は，マウスのS領域の構造を塩基配列の決定により明らかにしたものである。その結果，Sμ領域は，20塩基対を基本単位とする反復配列よりなり，Sγ_3，Sγ_2a及びSεはSμと共通な配列を含む，各各のクラスに特異的な基本配列の反復よりなる事が明らかになった。またδ鎖上流には反復配列は見い出されなかった。これらの事によりδ鎖を除く全てのS領域は共通配列を有する反復配列よりなる事が明らかになり，これらの反復配列がクラススイッチ組換えに寄与している事が示唆された。

本論文は，クラススイッチ組換えに関与するS領域の構造を解析し，その分子機構の解明に貢献したので博士論文に値する。