



Title	免疫グロブリンH鎖V領域形成におけるSecondary DJH結合の証明
Author(s)	前田, 豊樹
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35272
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	前 田 豊 樹
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7674 号
学位授与の日付	昭和62年3月26日
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 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V領域形成におけるSecondary D J _H 結合の証明
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 進 (副査) 教授 濱岡 利之 教授 吉川 寛

論文内容の要旨

【目 的】

免疫グロブリンH鎖の可変部をコードするV領域遺伝子を、V_H, D, J_Hの3 segmentsより構成されており、V領域形成に際し、まず、両染色体上でD J_H結合をおこし、次いで、種々のV_Hセグメントが結合してV領域が完成することが知られている。我々は、Abelsonウイルスでトランスフォームしたマウス未熟B系細胞株AT11-2とそのサブクローンを解析し、D J_H結合が、その両側に存在するDとJ_Hの結合により新たなsecondary D J_H結合を形成し得ることを初めて示した。更に、このsecondary D J_HにV_Hセグメントが結合し、機能的にV領域が形成されることが判明したので報告する。

【方 法】

細胞のクローニング：0.3%軟寒天培地（0.3%アガロース＋ウシ胎児血清＋ 5×10^{-5} M 2-ME＋RPMI 1640）に細胞をまき、生じたコロニーを、パスツールピペットでつり上げ、培養した。

細胞質内免疫グロブリン：細胞固定後、直後または間接蛍光抗体法を用いて検出した。

Southern blotting法：細胞より、高分子DNAを抽出し、各種制限酵素で断片化し、アガロースゲルで電気泳動後、ニトロセルロースフィルターにトランスファーし、³²Pでラベルした各種プローブにてハイブリダイズし、フィルターを洗浄後、オートラジオグラフィーをとった。

【成 績】

- ① AT11-2-5-1-5（以下AT5-1-5と略す）は、D_{SP}2.8J₃とD_{FL16.1}J₃を含み、いずれも、V_Hと結合しておらず、J₄プローブでは、それぞれ11.0kbと5.4kbのEco RI断片として検出される。

- ② AT 5-1-5より分離したサブクローンAT 5-1-5-3-44 (以下AT 3-44と略す)では、 J_4 プローブで11.0kbと5.4kb以外に5.0kbにうすいバンドを認め、培養中に5.0kb Eco R I断片を含むサブクローンが生じたことが示唆されたので、更にクローニングを行なった結果、5.4kbと5.0kbの2本のバンドを示すサブクローンAT 3-44-17を分離し得た。この新たに生じた5.0kb Eco R I断片は、3種目のDセグメントの5'側領域のプローブ、5' D_{FL16} 、5' D_{SP2} 、5' D_{Q52} のうち5' D_{FL16} によってのみ再検出されたので、この5.0kb Eco R I断片には、新たに $D_{FL16}-J_H$ が形成されていることが示唆された。更に、5' D_{FL16} プローブにて、これらのバンド以外に特異なバンドは認められなかったので、5.0kb Eco R I断片には、Dセグメントのうち最も5'側に存在する $D_{FL16.1}$ が含まれていることが示唆された。
- ③ Eco R I-HindIII double digestでは、 J_4 プローブにて、AT 5-1-5は、1.5kbに胎児型のバンドを認めるのみであるが、AT 3-44-17では、4.0kbに再構成したバンドを認めた。また、この際、 $C\mu$ プローブを用いて、 J_4 の3'側領域は再構成していないことを確認した。HindIIIが J_3-J_4 間に切断点をもつことから、AT 3-44-17では、 J_3-J_4 間に再構成がおこっていると考えられた。以上の①②③のことから、AT 3-44-17に含まれる5.0kb Eco R I断片についてrestriction mapを描くと、 $D_{FL16.1}J_4$ が含まれていることが、より強く示唆された。
- ④ 更に、AT 3-44-17では、in vitro culture中に、自然に、細胞質内に μ 鎖を持った細胞が0.5%程度出現した。これをクローニングして細胞質内に μ 鎖を持ったクローンAT 3-44-17-1を得た。これは、Eco R I切断にて、 J_4 プローブで、5.4kbと2.1kbにバンドを認め、5' D_{FL16} プローブでは、5.4kbのバンドのみが再検出され、2.1kbのバンドは検出されず、AT 3-44-17で認めた5.0kbのバンドも消失していた。従って、この5.0kbから2.1kbへの再構成は、5.0kbの断片に含まれていたsecondary $D J_H$ に V_H セグメントが結合し、機能的 $V_H D J_H$ を形成したものと考えられた。
- 以上のことより、AT 5-1-5に含まれていた $D_{SP2.8}J_3$ は、サブクローンAT 3-44-17において、その $D J_H$ の5'側にある $D_{FL16.1}$ と3'側にある J_4 の結合により欠失して新たなsecondary $D J_H$ である $D_{FL16.1}J_4$ が形成され、更に、AT 3-44-17-1では、このsecondary $D J_H$ に V_H セグメントが結合し機能的なV領域が形成されたと考えられる。

[総 括]

今回、我々は、両染色体上で $D J_H$ 結合を起こしているPre-pre-B細胞において、1本の染色体上で、最初に形成されていた $D J_H$ 結合が、その両側のDと J_H の結合で生じたsecondary $D J_H$ 結合に置換されたことを初めて示した。更に、 V_H セグメントを結合して機能的V領域が形成される過程を示した。このことは、Pre-pre-B細胞の段階では、既に形成された $D J_H$ に様々な V_H が結合することでV領域の多様性が生じるのみならず、secondary $D J_H$ の形成により、1つのPre-pre-B細胞により生じる多様性が更に拡がり得ることを示している。

論文の審査結果の要旨

免疫グロブリンH鎖V領域遺伝子は、 V_H 、D、 J_H の3つの領域より成り、まず、D- J_H が結合し、次いで、 V_H が結合して、機能的V領域が完成する。本研究は、この過程をより詳細に解析する目的で、Abelson Pre-pre-B細胞株とそのサブクローンをサザン法により解析した。

その結果、D- J_H 結合の両側に存在するDと J_H がsecondary D- J_H を形成し、これに V_H が結合して、機能的V領域を形成し得ることを初めて明らかにしたものである。これは、Pre-pre-B細胞の段階におけるV領域の多様性発現機序に新知見を加えたものである。