The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	γ3からγ2bへのpreーB細胞レベルでのクラス・スイッチ
Author(s)	谷, 慶彦
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35986
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【41】

氏名・(本籍)	谷(たに)　慶(よし)　彦(ひこ)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　8118　号
学位授与の日付	昭和63年3月25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	γ3からγ2bへのpre－B細胞レベルでのクラス・スイッチ
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］

B系細胞の分化におけるクラス・スイッチ機構を分子レベルで解析するには，in vitroでクラス・スイッチする細胞株が非常に有用である。我々が樹立したAbelson virusでtransformしたマウス未熟B系細胞株（AT11－2）は，全く免疫グロブリンを合成していないが，in vitroで培養中，細胞質内にμ鎖を認めるようになり，さらにγ3あるいはγ2bへとクラス・スイッチしていく。本研究ではμからγ3へクラス・スイッチしたpre－B細胞がさらにγ2bへとクラス・スイッチしていくことを認めたので，その機構について分子レベルで解析した。

［方　法］

①細胞；$\mu^+ \rightarrow \gamma 3^+$へクラス・スイッチしたpre－B細胞AT10－1－3－3を用いた。②細胞のクローニング：軟寒天培地（0.3%アガロース＋RPMI 1640＋5%ウシ胎児血清＋5×10^{-5}M 2－ME）に細胞をまき，パスツールピペットでつりあげた。③細胞質内免疫グロブリン：スライドガラスに固定した細胞を，間接蛍光抗体法を用いて検出した。④免疫グロブリン蛋白の解析：抗μ，γ3，γ2b，κ，λ鎖抗体を用い，SDS－PAGEにより解析した。⑤免疫グロブリン遺伝子の再構成：DNAを各種制酵素で切断後，各種プローベを用いてSouthern法で解析した。

［成　績］

①AT10－1－3－3をin vitroで培養していると自然に0.3%程度$\gamma 2b^+$が出現し，その$\gamma 2b^+$細胞をクローニングした（AT10－1－3－3－1）。②AT10－1－3－3をクローニングし，新たに$\gamma 3^+$のサブクローンを5つとった（AT－10－1－3－3－11～15）。これらのサブクローンも培養

中に0.1〜0.5%のγ2b^{+}細胞が出現してきたので，それぞれのγ3^{+}サブクローンより100%γ2b^{+}のクローンを独立してとった（AT10−1−3−3−11〜15−1）。③γ2b^{+}の6つの細胞を，^{35}S−メチオニンでラベルし，免疫グロブリンを抗μ，γ3，γ2b，κ，λ鎖抗体で沈降させ，SDS−PAGEで解析したところ，6細胞ともγ2b鎖のみを合成していた。④親株γ3^{+}AT10−1−3−3と6つのγ2b^{+}サブクローンAT10−1−3−3−1，AT10−1−3−3−11〜15−1について，Cκ，J_H，Cγ3，Cγ2bの解析を行った。1）EcoRIでDNAを断片化し，Cκ，J_HをプローベとしてSouthern法を行うと，親株γ3^{+}と6つのサブクローンγ2b^{+}とも，Cκでは胎児型と同じ17kbに，J_Hでは2.5kb（胎児型6.6kb）にバンド認めた。2）同様に，EcoRI，HindⅢでDNAを切断後，Cγ3をプローベとした場合，EcoRIでは親株γ3^{+}は18kbと14kb（胎児型18kb）にバンドを認め1本が再構成していた。6つのγ2b^{+}は18kbに少しうすいバンドを認め，1本の欠失が示唆された。HindⅢも同様で，親株γ3^{+}では12kb，8kb，6.6kb（胎児型12kb，6.6kb）にバンドを認め，6つのγ2b^{+}では12kb，6.6kbに少しうすいバンドを認めた。3）次に，Cγ2bを用いて，BglⅠ，EcoRIで断片化したDNAを調べた。BglⅠでは親株γ3^{+}は胎児型と同じ17kb，7kbにバンドを認めたが，6つのγ2b^{+}では17kb，7kb以外に4.5kb〜2.2kbの長さにそれぞれのサブクローンで異なった1本の再構成したバンドを認めた。4）さらに，EcoRI，HindⅢを用い，Sγ2bをプローベとして，Cγ2bの再構成をより詳細に調べた。EcoRIでは，親株γ3^{+}は胎児型と同じ6.6kbにバンドを認めたが，6つのγ2b^{+}サブクローンでは6.6kb以外にそれぞれ4.2〜5.6kbに1本の再構成したバンドを認めた。HindⅢの時も同様で，親株γ3^{+}では胎児型と同じ11kbにバンドを認めたが，6つのγ2b^{+}サベクローンでは11kb以外に2.4〜4.0kbにそれぞれ1本の再構成したバンドを認めた。⑤γ3からγ2bへのクラス・スイッチが，介在遺伝子の欠失によるのか，RNAのスプライシングによるのかを検討した。BamHIを用い，J_HならびにSγ2bをプローベとしてSouthern法を行った。6つのγ2b^{+}サブクローンでは，それぞれに11.5〜13.0kbのJ_HとSγ2bに共通にハイブリダイズするfragmentを認めた。このことから，J_HとSγ2b領域の介在遺伝子の欠失により，γ3からγ2bへクラス・スイッチしたことが示唆された。

［総　括］

pre−B細胞レベルで，①γ3からγ2bへクラス・スイッチすること，②そのクラス・スイッチは介在遺伝子の欠失によって起こること，③さらにその際認められるrecombination siteは，1つのγ3^{+}細胞からクラス・スイッチしているにもかかわらず，各サブクローンで，一定の決まった場所がなく，多様性が認められること，の3点を示した。

論文の審査結果の要旨

本研究は，Abelson murine leukemia virusでトランスフォームしたマウス未熟B系細胞株を用いて，pre−B細胞レベルでのγ3からγ2bへのクラス・スイッチ機構を分子レベルで解析したものである。こういった細胞株でのγ3からγ2bへのクラス・スイッチは全くの新知見であり，それが介在遺伝子

の欠失によって起こること，さらにその際認められるrecombination siteが1つのγ3細胞からクラス・スイッチしているにもかかわらず各サブクローンで一定の決まった場所がなく，多様性の認められること，も追加して示している。