

Title	γ3からγ2bへのpre-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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【41】

氏名・(本籍)	たに 谷	よし 慶	ひこ 彦
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8 1 1 8	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	γ 3 から γ 2 b 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を各種制限酵素で切断後, 各種プローブを用いて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γ2b⁺が出現し, そのγ2b⁺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γ3⁺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 $\gamma 2 b^+$ 細胞が出現してきたので、それぞれの $\gamma 3^+$ サブクローンより100% $\gamma 2 b^+$ のクローンを独立してとった(AT10-1-3-3-11~15-1)。③ $\gamma 2 b^+$ の6つの細胞を,³⁵S-メチオニンでラベルし、免疫グロブリンを抗 μ , $\gamma 3$, $\gamma 2 b$, 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 $\gamma 2 b$ 鎖のみを合成していた。④親株 $\gamma 3^+$ AT10-1-3-3と6つの $\gamma 2 b^+$ サブクローンAT10-1-3-3-1, AT10-1-3-3-11~15-1について、C κ , J_H, C $\gamma 3$, C $\gamma 2 b$ の解析を行った。1) EcoRIでDNAを断片化し、C κ , J_HをプローベとしてSouthern法を行うと、親株 $\gamma 3^+$ と6つのサブクローン $\gamma 2 b^+$ とも、C κ 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、C $\gamma 3$ をプローベとした場合、EcoRIでは親株 $\gamma 3^+$ 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 $\gamma 2 b^+$ 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も同様に、親株 $\gamma 3^+$ では12kb, 8kb, 6.6kb(胎児型12kb, 6.6kb)にバンドを認め、6つの $\gamma 2 b^+$ では12kb, 6.6kbに少しうすいバンドを認めた。3) 次に、C $\gamma 2 b$ を用いて、BglI, EcoRIで断片化したDNAを調べた。BglIでは親株 $\gamma 3^+$ は胎児型と同じ17kb, 7kbにバンドを認めたが、6つの $\gamma 2 b^+$ 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、S $\gamma 2 b$ をプローベとして、C $\gamma 2 b$ の再構成をより詳細に調べた。EcoRIでは、親株 $\gamma 3^+$ は胎児型と同じ6.6kbにバンドを認めたが、6つの $\gamma 2 b^+$ 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の時も同様に、親株 $\gamma 3^+$ では胎児型と同じ11kbにバンドを認めたが、6つの $\gamma 2 b^+$ サブクローンでは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。⑤ $\gamma 3$ から $\gamma 2 b$ 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S $\gamma 2 b$ をプローベとしてSouthern法を行った。6つの $\gamma 2 b^+$ サブクローンでは、それぞれに11.5~13.0kbのJ_HとS $\gamma 2 b$ 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S $\gamma 2 b$ 領域の介在遺伝子の欠失により、 $\gamma 3$ から $\gamma 2 b$ 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、① $\gamma 3$ から $\gamma 2 b$ 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 $\gamma 3^+$ 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 $\gamma 3$ から $\gamma 2 b$ 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 $\gamma 3$ から $\gamma 2 b$ 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 $\gamma 3$ 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。