



Title	Non-productive VHDJH2結合後, VH-JH3結合を起こしH鎖産生に到ったpre-B細胞株の解析
Author(s)	小守, 壽文
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36489
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

氏名・(本籍)	こ	もり	とし	ひさ
	小	守	壽	文
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8 4 7 1		号
学位授与の日付	平	成	元	年 3 月 2 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	Non-productive $V_H D J_{H2}$ 結合後、 $V_H - J_{H3}$ 結合を起こし H鎖産生に到った pre-B 細胞株の解析			
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

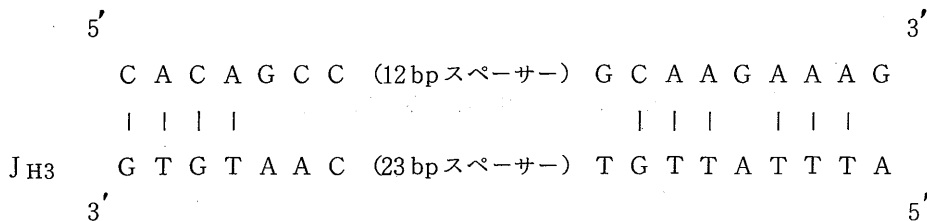
〔目 的〕

免疫グロブリンH鎖の可変領域をコードする3つのセグメント (V_H ; variable, D; diversity, J_H ; joining) の再構成は、高度に保存されたシグナル配列を介して行なわれている。今回Abelson virusでトランスフォームしたpre-B細胞株で、non-productive $V_H D J_H$ 結合後さらに新たな再構成を起こしH鎖産生に到った細胞株を得たので、その再構成機構を解析した。

〔方法ならびに成績〕

Abelson virusでトランスフォームしたpre-B細胞株AT8-1は免疫グロブリンを産生していないクローンであるが、これを0.33%軟寒天培地でさらにクローニングし、免疫グロブリンを産生していない3つのサブクローンAT8-1-12, AT8-1-14, AT8-1-16を得た。これらのサブクローンを in vitroで培養していると、ケイ光染色で細胞質内に μ 鎖あるいは r_2b 鎖を検出できる細胞が出現したので、抗 μ あるいは抗 r_2b 抗体と抗 $V_H 315$ 抗体(MOPC 315 ミエロマ蛋白のH鎖のV領域と特異的に反応する抗体)で二重染色することにより、 $\mu^+ \cdot V_H 315^+$ クローンAT8-1-12-1, AT8-1-14-1, AT8-1-16-1あるいは、 $r_2b^+ \cdot V_H 315^+$ クローンAT8-1-12-5をクローニングした。これらの産生する μ あるいは r_2b 蛋白を抗 μ 抗体あるいは抗 r_2b 抗体で免疫沈降させSDS-PAGEで解析すると、やや小さい μ 蛋白(Mr 74,000)あるいは r_2b 蛋白(Mr 54,000)を産生していた。AT8-1のサブクロンの再構成パターンを5'Dプローベ、 J_{H4} プローベを用いSouthern法により解析した。AT8-1-12の再構成パターンは VDJ^-/VDJ^- であり、AT8-1-14とAT8-1-16は VDJ^-/DJ^- であった。しかし、 $V_H 315$ 抗体と反応するH鎖を産生するこれらのサブクローンでは、 VDJ^- 結合を含む

断片はさらに再構成を起こしていた。3つの独立したクローンで全く同一の再構成を起こしH鎖産生に到っていたので、このうちの1クローンAT8-1-12-5とその親株AT8-1-12のJ_H領域をλファージを用いてクローニングし、dideoxy法により塩基配列を決定した。AT8-1-12とそのサブクローンAT8-1-12-5の一方の染色体上のJ_H領域の塩基配列は全く同一であったが、他方のJ_H領域では、AT8-1-12でV_H36-60 Dsp2 J_H2 結合を、AT8-1-12-5ではV_H36-60 J_H3 結合を起こしており、AT8-1-12-5では親株AT8-1-12のV_Hの84番目のThreonine コドンよりJ_H3の5'側のシグナル配列7merまで444bpが欠失していた。3つの独立したクローンで同一の再構成を起こしており、しかも3'側のDNA組み換え部位がシグナル配列9mer-23bp-7merとJ_H3とのちょうど間であったので、5'側の組み換え部位付近でもシグナル配列となりうる配列が存在しないか検索した。V_H36-60の配列の中にTCR遺伝子のJセグメントの7mer GGCTGTGのインバーテッド配列であるCACAGCCが存在していた。しかも、そのさらに3'側に12bpを介在してアデニンを多く含む9mer GCAAGAAAGが存在していた。これらと同一の配列はシグナル配列として未だ報告はないが、V_H-J_H3結合において下図のようにJ_H3の5'側の7merと4塩基対を、9merと6塩基対を形成する。



さらに、この7merは3'側の7merの基本型CACAGTGと5塩基が一致し、しかも高度に保存され7merのCore配列と考えられている組み換え部位に接した4塩基CACAを含んでいる。一方9merも3'側の9merの基本型ACAAAAACCと5塩基の一致をみる。またJ_H3との結合において上図のように12/23 joining ruleにも合致する。したがって、この配列がV_H-J_H3結合のシグナル配列として用いられていることが強く示唆される。

〔総括〕

1) V_HDJ_H 結合後に、新たな同一の再構成を起こしH鎖産生に到った3つの独立したクローンを得た。

2) このうちの1クローンとその親株のJ_H領域の塩基配列を比較すると、H鎖産生株では親株のV_H36-60D J_H2 結合より、V_H36-60の84番目のThreonine コドンからJ_H3の5'側のシグナル配列7merまで444bpが欠失し、V_H36-60-J_H3 結合を起こしていた。

3) V_H-J_H3結合におけるシグナル配列として、V_H36-60とN配列で形成される7mer CACAGCC-12bp スペーサー-9mer GCAAGAAAG が関与していることが示唆された。

4) この7merはTCRのJセグメントの7merのインバーテッド配列であり、DNA組み換え酵素がT・B細胞に共通あることを示唆する。さらにこのDNA組み換えは、シグナル配列類似の配列を持つ癌遺伝子を含む様々な遺伝子と、VDJ結合後に残ったJ_Hとの異常な再構成の可能性をも示唆するかもしれない。

論文の審査結果の要旨

免疫グロブリン遺伝子の再構成機構を解明する目的でこれらの実験を行なった。Abelson murine leukemia virus でトランスフォームした未熟B系細胞株を用い、 V_HDJ_H 結合と J_H との再構成を初めて見い出した。

これは non-productive V_HDJ_H 結合後に更に再構成することによりH鎖産生に到る新たな機構となりうる。又、この再構成に関わると考えられるシグナル配列も見い出し、シグナル配列を介した再構成であることを示した。