

Title	Southwestern Blotting 法による免疫グロブリン遺伝子の recombinational signal sequence に結合する核蛋白の解析
Author(s)	三宅, 正剛
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/36929">http://hdl.handle.net/11094/36929</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

氏名・(本籍)	三 宅 正 剛
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 8794 号
学位授与の日付	平成元年7月5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	Southwestern Blotting 法による免疫グロブリン遺伝子の recombinational signal sequence に結合する核蛋白の解析
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)

IgH鎖V領域遺伝子は、DJ<sub>H</sub>結合、次いでV<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub>結合が起こり、機能的V領域が形成される。このIgH鎖V領域遺伝子の再構成において、生殖細胞型V<sub>H</sub>、D、J<sub>H</sub>遺伝子に隣接して存在する高度に保存された塩基配列、すなわちheptamer配列(以下7merと略す)とnonamer配列(以下9merと略す)が重要な役割をはたしている。また、pre-pre B細胞株AT11-2はBalb/cマウスをAbelson virusでtransformした細胞株で、培養中にV<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub>結合を起こし機能的V領域が形成される。よってAT11-2の核抽出物中には、免疫グロブリン遺伝子のrecombinational signal sequence(以下RSSと略す)である7merと9merに結合する物質が存在する可能性が高いと考え、AT11-2のsubclone及び各種培養細胞株の核抽出物に対して、種々のRSSプローベをもちいてSouthwestern Blotting法(以下SW法と略す)を行い、7mer及び9merに特異的に結合するDNA結合蛋白を同定し、この蛋白の相対分子量及び細胞の分化に関連した発現に対する解析をおこなった。

#### (方 法)

1. 細胞: AT11-2のsubcloneであるpre-pre B細胞株AT3-44-17, Abelson transformantでpre B細胞株AT1-3-5-1, ミエローマ細胞株P3U1, pre T細胞株LyB-1, 成熟T細胞株BW5147及び線維芽細胞株ANN-1をもちいた。
2. 核抽出物: 対数増殖期にある各細胞より粗核分画を分離し、0.3M NaClで核蛋白を抽出した。
3. SW法: 各細胞株の核抽出物をSDS-PAGE後、nitrocellulose filterへ転写し、各種competitorとともに<sup>32</sup>Pで標識した二本鎖RSSプローベとhybridizeした。そのfilterを0.3M NaClで

洗い, autoradiography にかけて。

4. プローブ: DNA合成装置により合成した一本鎖DNAを anealing させ, 二本鎖DNAとしてもちいた。

(成 績)

1. AT 3-44-17, AT 1-3-5-1 及び LyB-1 に対して, 7 mer-23bp-9 mer プローブ及び 9 mer-12bp-7 mer プローブをつかい SW法を行い, Mr115kd のバンドが検出された。そして, poly (dI-dC)・poly (dI-dC) による competition assay 及び <sup>32</sup>P で標識しないプローブによる cold competition assay によって, この Mr115kd の物質が, これら二種のプローブに対し, もっとも特異的な結合をする物質であることが判明した。この物質は, 熱処理及び porteinase K 処理で DNA 結合活性が消失することから蛋白質に由来することがわかった。また, Mr115kd のバンドは, BW5147 及び ANN-1 でもわずかに認められたが, P 3 U I では認められなかった。
2. AT 3-44-17, AT 1-3-5-1 に対して, 9 mer-12bp-7 mer プローブの 7 mer の一塩基を変更したプローブ及び 9 mer の二塩基を変更したプローブをつかい SW法をおこなうと, 9 mer-12bp-7 mer プローブをもちいた時に比べて, Mr115kd のバンド強度は有意に低下を認めた。
3. 7 mer-23bp-9 mer プローブ及び 9 mer-12bp-7 mer プローブを中心に分割し, 新たに 7 mer 領域プローブ及び 9 mer 領域プローブを作製し SW法をおこなった所, いずれのプローブにおいても Mr115kd のバンドは検出された。

(総 括)

1. SW法によって, 免疫グロブリン遺伝子の RSS に塩基配列特異的に結合する Mr115kd の DNA 結合蛋白が同定された。
2. Mr115kd の RSS 特異的 DNA 結合蛋白は, 未熟 B 及び T 細胞株で多量に検出され, 成熟 T 細胞株及び線維芽細胞株でも微量は検出されたが, ミエロー細胞株には認められなかった。
3. この蛋白は, RSS のうち 7 mer 配列及び 9 mer 配列を認識していることが明らかになった。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は, Southwestern Blotting 法をもちいて, 免疫グロブリン遺伝子の再構成に関与する核内因子の同定を目的としたものである。本法によって, 免疫グロブリン遺伝子の recombinational signal sequence の heptamer 配列及び nonamer 配列を特異的に認識する相対分子量115K ダルトンの DNA 結合蛋白が同定された。この蛋白は, 未熟 B 細胞株及び未熟 T 細胞株には多量に存在したが, ミエローマ細胞株には存在せず, 成熟 T 細胞株及び線維芽細胞株には微量に存在した。