



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	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36929
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)	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_H 結合、次いで V_H-DJ_H 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_H, D, J_H 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 7 mer と略す）と nonamer 配列（以下 9 mer 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_H-DJ_H 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 7 mer と 9 mer 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 プローブをもちいて Southwestern Blotting 法（以下 SW 法と略す）を行い、7 mer 及び 9 mer 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 ³²P で標識した二本鎖 RSS プローブと hybridize した。その filter を 0.3M NaCl で

洗い, autoradiography にかけて。

4. プロローベ: 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 プロローベ及び 9 mer-12bp-7 mer プロローベをつかい 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 ^{32}P で標識しないプロローベによる cold competition assay によって, この Mr115kd の物質が, これら二種のプロローベに対し, 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 プロローベの 7 mer の一塩基を変更したプロローベ及び 9 mer の二塩基を変更したプロローベをつかい SW法をおこなうと, 9 mer-12bp-7 mer プロローベ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 プロローベ及び 9 mer-12bp-7 mer プロローベを中心に分割し, 新たに 7 mer 領域プロローベ及び 9 mer 領域プロローベを作製し SW法をおこなった所, いずれのプロローベにおいても 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。