



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36929">https://hdl.handle.net/11094/36929</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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

## 【45】

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）が重要な役割りをはたしている。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生が高いと考え、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、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プローブと hybridize した。そのfilterを0.3M NaClで

洗い、autoradiography にかけた。

4. プローベ：DNA合成装置により合成した一本鎖DNAを annealing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、7mer-23bp-9mer プローベ及び 9mer-12bp-7mer プローベをつかい 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  $^{32}\text{P}$  で標識しないプローベによる 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 proteinase 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、9mer-12bp-7mer プローベの 7mer の一塩基を変更したプローベ及び 9mer の二塩基を変更したプローベをつかい SW法をおこなうと、9mer-12bp-7mer プ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. 7mer-23bp-9mer プローベ及び 9mer-12bp-7mer プローベを中心で分割し、新たに 7mer 領域プローベ及び 9mer 領域プローベを作製し SW法をおこなった所、いずれのプローベにおいても 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 7mer 配列及び 9mer 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 法をもじいて、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。