

Title	Estimation of D Segment Usage in Initial D to JH Joinings in a Murine Immature B Cell Line.
Author(s)	塚田, 聡
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37177
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	塚 田 聡
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9686 号
学位授与の日付	平成3年3月26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	Estimation of D Segment Usage in Initial D to J _H Joinings in a Murine Immature B Cell Line. (マウス幼若B細胞の初期D J _H 結合形成におけるD領域の選択的使用)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 濱岡 利之

論文内容の要旨

(目 的)

免疫グロブリン重鎖 (IgH) 遺伝子はV_H, D, J_H の三種の遺伝子領域から成り, 遺伝子再構成により, まずD J_H 結合, ついでV_H-D J_H 結合が生じ機能的IgH 遺伝子となる。最初の再構成であるD J_H 結合が生じる際のD領域の使用頻度はintactな IgH 遺伝子領域の recombinase に対する accessibility, あるいは recombinase 自体の特性を反映していると考えられる。しかし, 現在報告されている幼若B細胞株は, 両 allele が既に再構成した状態のものがほとんどであり二次的 (secondary) におこるD J_H 結合 (D J_H → D' J_H') の影響を無視できず, 初期 (primary) のD J_H 結合 (germline → D J_H) 形成におけるD領域の使用については解析が困難であった。我々の分離した Abelson マウス白血病ウイルスの温度感受性変異株 tsOS-59により transform し樹立したマウス幼若B細胞株SPL 2-1-2 は一方の allele がV_H D J_H, 他方が germline (G) 型であり, 非許容温度 (39°C) にて高率に G alleleよりD J_H 結合を生じる。この系を用いて初期D J_H 結合におけるD領域の使用を検討した。

(方法ならびに成績)

1. 初期D J_H 結合を観察する至適条件を設定するため, SPL 2-1-2 細胞株における許容温度 (35°C), 非許容温度 (39°C) でのIgH 遺伝子の再構成の頻度を測定した。各温度にて一定期間培養後, microtiter plate へ0.3 cell/well で limiting dilution し, さらに各 well の細胞が10⁵ well になった時点で回収し, DNAを抽出した。J_H 領域 probe を用い, Southern blotting 法により解析したところ, 2週間の培養では非許容温度では約20%の頻度で G alleleよりD J_H 結合が生じていることが観察された。許容温度での再構成は10%以下であった。二次的D J_H 結合の影響を最少限に抑え, かつ

統計的に有意な clone 数を得るため、以下の解析は非許容温度で 2 週間培養における再構成の観察により行なった。

2. 許容温度にて維持していた SPL 2-1-2 の 11 の独立した clone について、上記条件の培養の後、各々につき 40-50 個の subclone を得、D_{J_H} 結合を形成しているものについて使用されている D 領域を deletion mapping 法によって調べた。マウス IgH 遺伝子の D 領域は染色体上で 5 側より順に FL 16.1, SP-1, FL 16.2, SP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 及び Q52 の 12 個の segment より成り、Q52 の 3' 側に J_H 領域 (J_{H1}, J_{H2}, J_{H3}, J_{H4}) が存在する。SPL 2-1-2 においては一方の allele 上では既に V_H-D_{J_H} 結合が生じており germline 型の D 領域が存在しないため、D 領域 probe を用いて Southern blotting し、残存した D 領域を調べれば D_{J_H} 結合に使用された D 領域を推定することができる。その結果、初期 D_{J_H} 結合に際しては、最も 5' 側の D_{FL16.1} 領域と、最も 3' 側の D_{Q52} 領域の 2 つが最も高頻度で使用されることが示された。
3. さらに上記の結果における二次的 D_{J_H} 結合の影響を検討した。二次的 D_{J_H} 結合形成の速度は germline よりの初期 D_{J_H} 結合形成の速度と同程度であり、また D_{FL16.1} 領域の使用頻度は 30% 程度であることがわかった。したがって成績 2 で使用されていた D_{FL16.1} 領域への二次的 D_{J_H} 結合の寄与は 10% 以下と考えられた。さらに D_{FL16.1} J_H 及び D_{Q52} J_H 結合の J_H 領域の使用頻度を調べたところ、同じ傾向がみられ、D_{Q52} J_H は不可避免的に初期 D_{J_H} 結合の結果であることから、これらの D_{FL16.1} J_H 結合の大部分も初期 D_{J_H} 結合の結果であることが示された。

(総括)

IgH 遺伝子の初期 D_{J_H} 結合形成における D 領域の頻度分布には 2 つのピークが存在することが示された。即ち、最も 5' 側の D_{FL16.1} 領域と、最も 3' 側で J_H 領域に接した D_{Q52} 領域が最も高頻度で使用されていた。このように D 領域において J_H に近位の領域のみでなく、遠位の領域も使用頻度が高いことは Ig 遺伝子の clonal diversity の増加に寄与していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は免疫グロブリン H 鎖における germline 型遺伝子からの初期 D_{J_H} 結合形成を in vitro において解析可能な系を初めて樹立し、それにより従来不明であった初期 D_{J_H} 結合形成における D 領域の usage を観察し得た論文である。結果は明快であり、初期 D_{J_H} 結合形成における D 領域の頻度分布には、最も 5' 側の D_{FL16.1} 領域と、最も 3' 側の D_{Q52} 領域の 2 つのピークが存在することを初めて示した。これは従来報告されたことの無い新発見であり、よって本論文は学位に値すると認める。