



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	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37177">https://hdl.handle.net/11094/37177</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</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

氏名・（本籍）	塚 田 聡
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 9 6 8 6 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 <sub>H</sub> Joinings in a Murine Immature B Cell Line. (マウス幼若B細胞の初期D J <sub>H</sub> 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<sub>H</sub>, D, J<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 結合、ついでV<sub>H</sub>-D J<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 結合 (D J<sub>H</sub>→D' J<sub>H</sub>') の影響を無視できず、初期 (primary) のD J<sub>H</sub> 結合 (germline→D J<sub>H</sub>) 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 tsO S-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<sub>H</sub> D J<sub>H</sub>, 他方が germline (G) 型であり、非許容温度 (39℃) にて高率に G alleleよりD J<sub>H</sub> 結合を生じる。この系を用いて初期D J<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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℃)、非許容温度 (39℃) 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 10<sup>5</sup> well になった時点で回収し、DNAを抽出した。J<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 領域 (J<sub>H1</sub>, J<sub>H2</sub>, J<sub>H3</sub>, J<sub>H4</sub>) が存在する。SPL 2-1-2 においては一方の allele 上では既に V<sub>H</sub>-D J<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 結合に際しては、最も 5' 側の D<sub>FL16.1</sub> 領域と、最も 3' 側の D<sub>Q52</sub> 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<sub>H</sub> 結合の影響を検討した。二次的 D J<sub>H</sub> 結合形成の速度は germline よりの初期 D J<sub>H</sub> 結合形成の速度と同程度であり、また D<sub>FL16.1</sub> 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<sub>FL16.1</sub> 領域への二次的 D J<sub>H</sub> 結合の寄与は 10% 以下と考えられた。さらに D<sub>FL16.1</sub> J<sub>H</sub> 及び D<sub>Q52</sub> J<sub>H</sub> 結合の J<sub>H</sub> 領域の使用頻度を調べたところ、同じ傾向がみられ、D<sub>Q52</sub> J<sub>H</sub> は不可避免的に初期 D J<sub>H</sub> 結合の結果であることから、これらの D<sub>FL16.1</sub> J<sub>H</sub> 結合の大部分も初期 D J<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>FL16.1</sub> 領域と、最も 3' 側で J<sub>H</sub> 領域に接した D<sub>Q52</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 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<sub>H</sub> 結合形成における D 領域の頻度分布には、最も 5' 側の D<sub>FL16.1</sub> 領域と、最も 3' 側の D<sub>Q52</sub> 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知見であり、よって本論文は学位に値すると認める。