



Title	Estimation of D Segment Usage in Initial D to JH Joinings in a Murine Immature B Cell Line.
Author(s)	塚田, 聰
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
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、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)	塚 田 聰
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)における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SPL2-1-2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、SPL2-1-2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～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 S P L 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 F L 16.1, S P - 1, F L 16.2, S P - 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, H2, H3, H4}) が存在する。S P L 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_{F L 16.1} 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_{F L 16.1} 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_{F L 16.1} 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_{F L 16.1} 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 は不可避的に初期 D J_H 結合の結果であることから、これらの D_{F L 16.1} 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_{F L 16.1} 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_{F L 16.1} 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知見であり、よって本論文は学位に値すると認める。