

Title	REGULATION OF THY-1 GENE EXPRESSION BY THE METHYLATION OF THE 5' REGION OF THY-1 GENE AND INTRACELLULAR REGULATORY FACTORS IN IMMATURE B CELLS
Author(s)	清水, 義文
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37940
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	清 水 義 文
博士の専攻分野	博士 (医学)
学位記番号	第 10184 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 内科系専攻
学位論文名	REGULATION OF THY-1 GENE EXPRESSION BY THE METHYLATION OF THE 5' REGION OF THY-1 GENE AND INTRACELLULAR REGULATORY FACTORS IN IMMATURE B CELLS (幼若 B 細胞における Thy-1 遺伝子 5' 領域のメチル化と細胞内制御因子による Thy-1 遺伝子の発現調節)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 羽倉 明 教授 濱岡 利之

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

Thy-1 抗原は、細胞の分化段階や組織特異的に発現されており、その発現パターンは種によっても異なっている。マウスの Thy-1 遺伝子のプロモーター領域は TATA ボックスを持たない非典型的な構造をしており、その塩基配列は CG に富んでいる。この構造はハウスキーピング遺伝子にみられ、これらの遺伝子のプロモーター領域の CG はメチル化から保護されていることが知られている。今回、Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性変異株により樹立した細胞質内 μ^- Thy-1 $^-$ の幼若 B 細胞株が、培養温度を 35°C から 39°C に shift up することにより Thy-1 抗原を表出する現象を得たので、5' 領域の DNA のメチル化と細胞内制御因子による Thy-1 遺伝子の発現調節との関連について解析を試みた。

(方 法)

1. 細胞: FL 2-52-2 は、Balb/c マウスに Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性変異株を感染させることよって得られた細胞質内 μ^- B 220 $^+$ Thy-1 $^-$ 幼若 B 細胞株である。細胞のクローニングは限界希釈法によった。
2. フローサイトメトリーによる解析: 細胞表面抗原は、抗 Thy-1.1 (TIID 7e) 及び抗 Thy-1.2 (30-H12) モノクローナル抗体を用いフローサイトメーターによる間接蛍光抗体法によった。
3. DNA のメチル化状態の解析: CCGG 配列をとともに認識する制限酵素 Msp I と Hpa II を用いた Southern hybridization により Thy-1 遺伝子 5' 領域の切断様式の違いを検索した。
4. Thy-1 a 対立遺伝子の導入: Thy-1 a 対立遺伝子の全長を pSV 2-neo ベクターに組み込み、電気穿孔法を用いて細胞に導入した。後 G 418 にて選択した。

(成 績)

1. FL 2-52-2 細胞株の表現型は35°Cの培養条件下では極めて安定であった。しかし、培養温度を39°Cに変え2週間培養を続けると Thy-1 抗原を表出するに到った。限界希釈法により Thy-1⁺ の細胞をサブクロニングし、FL 2-52-2-1 とした。この細胞も35°Cで培養する限り長期にわたりその表現型は安定であったが、再び39°Cで培養を続けると3週間後には Thy-1⁻ の細胞集団が生じてきた。これは、39°Cの培養条件下では一度 Thy-1⁺ となった細胞が再び Thy-1⁻ となったことを示す。そこで再度 Thy-1⁻ に転じた細胞を限界希釈法によりサブクロニングし、FL 2-52-2-1-1 と命名した。この3クローンより DNA を抽出し、Thy-1 遺伝子5' 領域をプローベとして Southern hybridization を行なったところ、同領域のCCGG 部位は FL 2-52-2 においてはメチル化されているが、他の2クローンにおいては脱メチル化の状態にあることが判明した。
2. とともに Thy-1 抗原陰性の FL 2-52-2, FL 2-52-2-1-1 に Thy-1^a 対立遺伝子を導入し、その産物である Thy-1.1 抗原の表出を調べたところ、FL 2-52-2 より得た G418 耐性クローンは3クローンすべて Thy-1.1 抗原を表出したのに対し、FL 2-52-2-1-1 より得た G418 耐性クローンは10クローンすべて Thy-1.1 抗原を表出していなかった。一方内因性の Thy-1^b 対立遺伝子産物である Thy-1.2 抗原はどちらの場合も陰性のままであった。このことより Thy-1 遺伝子発現に必要な細胞内因子が FL 2-52-2 には存在するが、FL 2-52-2-1-1 には存在していないことが示唆された。

(総 括)

1. Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性変異株により樹立した細胞質内 μ^- B 220⁺ Thy-1⁻ 幼若 B 細胞株において培養温度を変化させることにより Thy-1 抗原の一過性発現がみられた。
2. 幼若 B 細胞株において、Thy-1 遺伝子の5' 領域のメチル化と細胞内制御因子の有無という少なくとも2つの異なった機構により Thy-1 遺伝子の発現調節が行われていることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Thy-1 抗原が、Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性変異株により樹立した幼若 B 細胞株において発現していることを見出した。この Thy-1 抗原の発現は、培養温度を許容温度から非許容温度へ変化させることによって誘導され、その発現には Thy-1 遺伝子の5' 領域の脱メチル化が関与していることを示した。非許容温度での長期培養により、この Thy-1 陽性の幼若 B 細胞は再び Thy-1 陰性となるが、この過程では、Thy-1 遺伝子にトランスに作用する転写活性化因子の消失、ないしは転写抑制因子の出現により Thy-1 遺伝子の転写が抑制されていることが示された。