



Title	免疫グロブリン軽鎖の可変領域の遺伝子再構成におけるN配列の意義の検討
Author(s)	松梨, 達郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41186">https://hdl.handle.net/11094/41186</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>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	松 梨 達 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 1 2 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 9 月 17 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	免疫グロブリン軽鎖の可変領域の遺伝子再構成における N 配列の意義の検討
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松澤 佑次 (副査) 教 授 平野 俊文 教 授 濱岡 利之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

免疫グロブリン遺伝子 (Ig) の可変領域の多様性は V (variable), D (diversity), J (joining) の 3 種類の遺伝子が再構成することにより形成される。さらに、これらの遺伝子が再構成する際に、塩基の欠失と付加が起こり、Ig 遺伝子の多様性が増大されるが、これには template dependent なもの (P 塩基) と、template independent なもの (N 配列) がある。N 配列は terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) が、付加していることが knockout mouse の結果より示されている。N 配列は、マウスの Ig 軽鎖 (L) 再構成においてはほとんどみられないが、ヒトにおいては認められる。今回、homologous recombination により TdT の promoter 領域を Ig 重鎖 (H) enhancer/promoter 領域 ( $E\mu V_H$ ) と組み換え、IgL の V-J 再構成において N 配列を高頻度に出現させたマウスを作成し、N 配列の役割について検討した。

### [方法ならびに成績]

TdT promoter 領域を  $E\mu V_H$  と組み換えたマウス ( $E\mu V_H^{+/+}$  マウス) の作成と解析

TdT promoter 領域を  $E\mu V_H$  と組み換え、PGK HSV tk および PGKneo<sup>r</sup> を挿入して作成した targeting vector を、embryonic stem (ES) 細胞 E14 にトランスフェクションし、G418 および gancyclovir を用いて double selection を行った。得られたコロニーより DNA を抽出、Southern blotting を行い、 $E\mu V_H^{+/-}$  クローンを選別した。 $E\mu V_H^{+/-}$  クローンを C57BL/6 (B6) マウス由来の Blastocyst にインジェクションし、それを偽妊娠マウス (ICR) の子宮にいれることにより生まれたキメラをさらに B6 マウスと交配した。生まれたマウスの尻尾からの DNA にて Southern blotting を行い、 $E\mu V_H^{+/-}$  マウスを同定した。さらにこれらをかけ合わせて生まれたマウスより、Southern blotting により  $E\mu V_H^{+/+}$  マウスを同定した。

B6 マウスおよび  $E\mu V_H^{+/+}$  マウスの TdT の発現をみるため、各組織から RNA を抽出し、Northern blotting を行った結果、正常 B6 マウスでは、TdT の発現は胸腺でみられる他は骨髄において低レベルで発現がみられるだけだが、

$E\mu V_H^{+/+}$  マウスでは胸腺、脾臓、骨髄、リンパ節において B6 マウスの胸腺と同レベルの TdT の発現がみられた。正常 B6 マウスでは TdT の発現がみられない胎児 (18.5 日) の胸腺、肝臓においても、TdT の発現がみられ、TdT の発現パターンは TdT の promoter による発現パターンから  $E\mu V_H$  による発現パターンに変わっていた。なお、いずれのマウスにおいても、非リンパ組織 (脳、腎臓) においては TdT の発現は認めなかった。

IgL 遺伝子 V-J 領域の N 配列の頻度を脾臓細胞について調べたところ、 $E\mu V_H^{+/+}$  マウスで 52% であり、C57BL/6 マウスの 4% と比し、高頻度に付加されていた。これにより TdT の発現を亢進させることにより、N 配列の挿入頻度を上げることができることが示された。

$E\mu V_H^{+/+}$  マウスは明らかな疾患を呈さず、組織学的にも異常は認めなかったが、 $E\mu V_H^{+/+}$  マウスの骨髄の B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> 細胞と B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> 細胞の細胞数の割合は 13% と 3% であり、コントロールとした C57BL/6 マウスおよび  $E\mu V_H^{-/-}$  マウスがそれぞれ 20% と 11%、19% と 10% であるのと比し、B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> 細胞の割合が半分以下に減少していた。このように B 細胞の成熟過程で IgM 出現により、negative selection を受けている可能性が考えられたため、 $E\mu V_H^{+/+}$  マウス骨髄の B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> 細胞および B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> 細胞それぞれについて、IgL 遺伝子 V-J 領域の N 配列の頻度を調べたが、62% と 53% であり、IgM 出現前後では有意な差はみとめなかった。一方、本来末梢血の IgL 遺伝子 V-J 領域に N 配列のみられるヒトにおいて、骨髄細胞を CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> 細胞と CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> 細胞に分けて、IgL 遺伝子 V-J 領域の N 配列の頻度を調べたが、68% と 63% であり、 $E\mu V_H^{+/+}$  マウスと同様、IgM 出現前後では有意な差はみとめず、塩基配列のレベルでは、細胞数が IgM 出現後に減少することの理由は、解明できなかった。

#### [総括]

TdT の promoter 領域を  $E\mu V_H$  と組み換えたマウス ( $E\mu V_H^{+/+}$  マウス) では、こうした操作 (knock-in) により、TdT の発現の本来みられる胸腺以外に、脾臓、骨髄、リンパ節においても発現がみられる等、TdT 本来の promoter による発現パターンから  $E\mu V_H$  による発現パターンに変えることができることが示された。さらに、TdT の本来発現しない IgL 遺伝子再構成時に TdT を高発現させることにより、本来 N 配列のない IgL 遺伝子の V-J 領域に N 配列を挿入できることが証明された。このマウスでは、骨髄において IgM 陽性細胞が正常の約半分に減少しており、骨髄において negative selection が起こることが示唆された。promoter の knock-in は今まで世界に例がなく、transgenic mouse では高発現が得られない遺伝子に対しては、発現パターンを変える新しい方法となりうると考えられる。また、骨髄で IgM 細胞の減少を見たことは、今後 IgL 鎖の CDR3 の多様性が自己抗原をふくめた各種抗原への反応性をいかに変化させるかを検討するためのモデルマウスとなると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

免疫グロブリン軽鎖遺伝子 (IgL) の V (variable), J (joining) の遺伝子再構成において付加される塩基である N 配列の意義を検討するために、その N 配列を付加する酵素である terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) の promoter 領域を Ig 重鎖 enhancer/promoter 領域 ( $E\mu V_H$ ) と組み換えたマウス ( $E\mu V_H^{+/+}$  マウス) を作成し、解析した。こうした操作 (knock-in) により、 $E\mu V_H^{+/+}$  マウスでは、TdT の発現の本来みられる胸腺以外にも、脾臓、骨髄、リンパ節においても発現がみられる等、TdT 本来の promoter による発現パターンから  $E\mu V_H$  による発現パターンに変えることができることが示された。さらに、TdT の本来発現しない IgL 遺伝子再構成時に TdT を高発現させることにより、本来 N 配列のない IgL 遺伝子の V-J 領域に N 配列を挿入できることが証明された。このマウスでは、骨髄において IgM 陽性細胞が正常の約半分に減少しており、骨髄において negative selection が起こることが示唆された。promoter の knock-in は今まで世界に例がなく、transgenic mouse では高発現が得られない遺伝子に対しては、発現パターンを変える新しい方法となりうると考えられる。また、骨髄で IgM 細胞の減少を見たことは、今後 IgL 鎖の CDR3 の多様性が自己抗原をふくめた各種抗原への反応性をいかに変化させるかを検討するためのモデルマウスとなると考えられる。これらの知見は、学位の授与に値すると考えられる。