

〔原著〕 B 細胞分化における免疫グロブリン遺伝子の 多様性獲得機構とその限定

白 澤 卓 二*

(平成元年12月12日受付, 平成2年2月2日受理)

要 旨

B細胞は、その初期分化過程で免疫グロブリン遺伝子の再構成を起すことにより抗体の多様性を獲得することが知られている。しかし、いったんB細胞へコミットメントした幼若B細胞が分化する際にどの程度の多様性を獲得するかに関しては不明の点も多い。本論文では Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性株を用いて樹立した幼若B細胞クローンに *in vitro* で分化を誘導し、単一B前駆細胞由来の分化細胞群における免疫グロブリンH鎖遺伝子の多様性の獲得を検討した。確立された幼若B細胞クローンの免疫グロブリンH鎖遺伝子は分化誘導前にすでに非機能的VDJ結合および非機能的DJ結合で再構成が完了していたが、温度シフトにより分化を誘導すると、いったん終了した非機能的VDJ結合に新たなV_H遺伝子が再結合する遺伝子再構成(V_H遺伝子置換)が生じて機能的 μ 鎖が発現され、表面 μ 鎖陽性細胞へと分化することが明らかとなった。この系を用いて単一幼若B細胞が分化する際に発生する μ 鎖の多様性を解析した結果、ほとんどの分化したB細胞で同一V_H遺伝子がV_H遺伝子置換で使用されていることが明らかとなり、単一B前駆細胞に由来する μ 鎖の多様性は限定されていることが示された。またパルスフィールド法による解析より、選択的に使用されるV_H遺伝子は非機能的VDJ結合の上流約50Kb以内にマップされ、染色体上の近位的位置関係がV_H遺伝子置換時の選択的V_H遺伝子使用の一要因であることが示唆された。

Key words: B細胞分化, 免疫グロブリン遺伝子, 多様性獲得機構, V_H遺伝子置換, Abelson マウス白血病ウイルス

略語一覧: SDS: ドデシル硫酸ナトリウム, FACS: Fluorescence activated cell sorter

I. 緒 言

免疫グロブリンH鎖遺伝子は、B細胞の初期分化過程において3つの異なった遺伝子断片(V_H遺伝子, D遺伝子, J_H遺伝子)が再構成することにより完成する¹⁾。遺伝子再構成はまず両染色体でD遺伝子とJ_H遺伝子が結合し、次にV_H遺伝子がDJ_H遺伝子と結合して完成する²⁾。免疫の多様性つまり抗体の多様な特異性は、これらの遺伝子断片がランダムに結合し、また結合の際に結合部に塩基欠損、塩基挿入を伴い結合部多様性が生ずることにより獲得される³⁾。しかしながらランダムな遺伝子断片の結合はかなりの確率でアミノ酸のフレームの

読み枠のずれた非機能的VDJ結合をもたらす。一方、いったん非機能的VDJ結合が終了した後でも更に5'上流のV_H遺伝子が非機能的VDJ結合のV_H遺伝子に置き換わる「V_H遺伝子置換」により新たに機能的 μ 鎖遺伝子の発現をみた例が報告されている^{3,4)}。本論文では、BALB/cマウスの骨髓細胞にAbelsonマウス白血病ウイルス温度感受性株⁵⁾を感染させ、人為的に分化誘導可能な幼若B細胞クローンを樹立し、免疫グロブリン遺伝子の多様性獲得機構を解析した。これらの幼若B細胞クローンは、低温培養条件下では前B細胞の分化段階に属し、免疫グロブリンH鎖遺伝子は非機能的VDJ結合および非機能的DJ結合で終了しているが、高温培養

* 千葉大学医学部肺癌研究施設第二臨床研究部

Takuji SHIRASAWA: The Limitation of μ Chain Diversity Generated in Progenies Derived from a Single Precursor Pre-B Cell.

Department of Chest Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received December 12, 1989. Accepted February 2, 1990.

条件下ではいったん終了した非機能的 VDJ 結合に V_H 遺伝子置換が誘導され、その結果、表面 μ 鎖陽性細胞へと分化することが明らかとなった。このシステムを用い、単一 B 前駆細胞が成熟 B 細胞へ分化する過程でどの程度の多様性を獲得できるかを調べる事が可能となった。本論文では特に免疫グロブリン H 鎖遺伝子の多様性の獲得に関して、再構成の際に使用される V_H 遺伝子の多様性に関して解析した。その結果、単一 B 前駆細胞由来の分化細胞群中のほとんどの細胞が、同一 V_H 遺伝子を再構成 (V_H 遺伝子置換) で使用していることが明らかとなり、単一 B 前駆細胞より発生する μ 鎖の多様性は極めて限定されたものであることが示された。また V_H 遺伝子置換において常に特定の V_H 遺伝子が使用される機序として、使用される V_H 遺伝子と非機能的 VDJ 結合の染色体上での相対的位置関係がその一因となり得る可能性を考察した。

II. 実験方法

1) 細胞株の樹立および分化誘導

前 B 細胞株 46 は BALB/c マウスの骨髓細胞に Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性株⁵⁾を 35°C にて、感染させることにより樹立した。前 B 細胞クローン 46-6, 46-12 は、46 を限界希釈することにより樹立された。Ig 6.3 は分化誘導された 46-6 を更にサブクローン化することによって得られた。それぞれのクローンは、培養条件を 35.5°C から 37.5°C に温度シフトすることにより分化誘導し、数週後に抗 μ 鎖抗体およびモノクローナル抗体 14.8 による免疫蛍光染色および FACS 解析を施行し、細胞表面 μ 鎖および B 220 抗原の発現を判定した。抗 μ 鎖抗体は、ヤギ抗 μ 鎖抗血清を抗原カラムで精製することにより得られた⁶⁾。モノクローナル抗体 14.8 は B 220 特異的抗体⁷⁾で、C. Paige 博士より恵与された。

2) DNA の抽出およびサザン解析

ゲノム DNA は FACS 解析した日に培養細胞より Maniatis らの方法⁸⁾に従って抽出した。DNA は制限酵素 (EcoRI, PvuII) で消化後、0.8% のアガロース電気泳動にて分画し、アルカリ処理後ニトロセルロースフィルターに転写した。ハイブリダイゼーションは、50% ホルムアミド、0.5% SDS 溶液、5× Denhardt 溶液、4× SSC 溶液 (600mM NaCl, 60mM Sodium Citrate)、10% デキストラン硫酸溶液中で 42°C の条件で一晩反応させた。フィルターの洗浄は、0.1× SSC、0.1% SDS 溶液中で 65°C の条件で行った。サザン解析に用いたプローブは、MEP 203⁹⁾ の 1.9 Kb EcoRI/BamHI 断片を J_H プローブとして、pP 4-12A-1¹⁰⁾ の

1.1 Kb BamHI 断片を 5' D プローブとして、分化誘導前のクローン 46-6 より単離された非機能的 VDJ 断片上流の 1.0 Kb EcoRI/BamHI 断片を、5' V_H プローブとして使用した。

3) ゲノム遺伝子の単離と解析

分化誘導前の非機能的 VDJ 断片としてクローン 46-6 および 46-12 のゲノム DNA より J_H 断片を含む 4.8 Kb の EcoRI 断片を λ gt10 EcoRI アームに組み込み単離した。分化誘導後の機能的 VDJ 断片として分化誘導後のクローン 46-6 および 46-12 のゲノム DNA より J_H 断片を含む 2.5 Kb XbaI 断片を λ gtWes XbaI アームに組み込みそれぞれ単離した。クローン 46-6 の DJ 断片として、 J_H 断片を含む 4.6 Kb XbaI 断片を、クローン 46-12 の DJ 断片として J_H 断片を含む 7.5 Kb XbaI 断片をそれぞれ λ gtWes XbaI アームに組み込み単離した。単離された断片はプラスミドベクターにサブクローン化し Dideoxy 法にて塩基配列を決定した。プライマーとして以下の合成オリゴマーを使用した。 J_{H1} プライマーとして、5'-AAA CGG TGA CCG TGG TCC-3', J_{H4} プライマーとして、5'-AGA CGG TGA CTG AGG TT-3', V_H 17.2.25 プライマーとして、5'-GAA GTT CCA GGG CAA GGC C-3', V_{H6} , プライマーとして、5'-CTT TTC CTG GAG CCT GC-3' をそれぞれ使用した。

4) パルスフィールド法による染色体遺伝子の解析

培養細胞を 0.6% 低融点アガロース中に 10^7 /ml になる様に調整し、McClelland らの方法¹¹⁾に従って高分子 DNA を調整した。1 ブロック中に DNA が 5 μ g になる様にゲルを調整し、過剰量の NarI で消化後、パルスフィールド電気泳動装置・GeneLine (Beckman, Palo Alto, CA) にて、電流 150mA, 60 秒パルスの条件で 20 時間電気泳動し、1% のアガロースで分画した。分画後ゲルを 240mM HCl で 10 分間酸処理後、0.2N NaOH/1.5 M NaCl 溶液中で 30 分間アルカリ処理し、同溶液でナイロンメンブレンにアルカリトランスファーした後、前述のごとくサザン解析した。 V_{H6} プローブとして分化誘導後の機能的 VDJ 断片より 5' 上流領域およびリーダー領域を含む 0.2 Kb XbaI/PvuII 断片を用いた。サイズマーカーとして酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の染色体 DNA を使用した。

III. 実験結果

1) in vitro での分化誘導

幼若 B 細胞株 46 は Abelson マウス白血病ウイルス温度感受性株を BALB/c マウスの骨髓に感染後、メチル

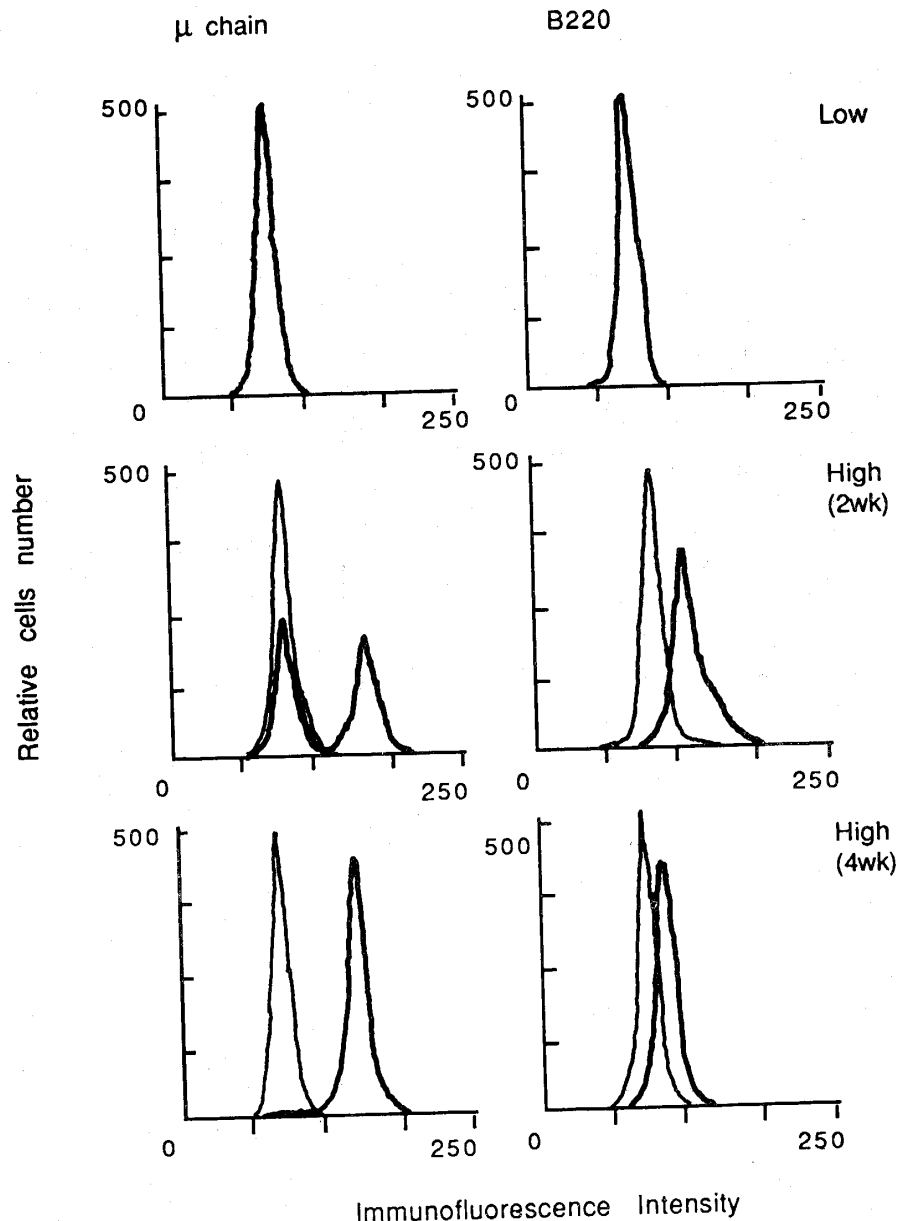


図 1. FACS によるクローン 46-6 の分化誘導前後における表面 μ 鎖および B 220 抗原の解析. 分化誘導前 (上段: Low), 分化誘導後 2 週目 (中段: High), 分化誘導後 4 週目 (下段: High) のクローン 46-6 をそれぞれビオチン結合ヤギ抗 μ 鎖抗体 (左レーン) およびビオチン結合 14.8 (右レーン) で反応後, avidin-FITC で発色させた. コントロール抗体として正常ヤギ免疫グロブリン (左レーン) および正常ラット免疫グロブリン (右レーン) を使用した. 横軸に蛍光強度を対数スケールで表示した.

セルロース中に出現したコロニーをクローン化することにより樹立した。46を限界希釈法により更にサブクローン化しクローン46-6, 46-12を得た。これらのクローンは Abelson ウイルスのゲノムへの挿入部位が一致しており共通単一前駆細胞に由来したクローンであると考えられた。分化誘導前 (低温培養条件下) にはこれらのクローンはいずれも細胞内 μ 鎖陰性, 表面 μ 鎖陰性であった。これらのクローンを高温培養し分化誘導するとクローン46-6では5回中3回, クローン46-12では, 6回

中3回の頻度で分化誘導された。クローン46-6の分化誘導の経過を FACS 解析にて示す (図1)。分化誘導後2週目で約50%の細胞が表面 μ 鎖陽性細胞へ, 分化誘導後4週目でほとんどの細胞が表面 μ 鎖陽性細胞へと分化した (図1左)。一方, 分化抗原である B220は分化誘導後2週目で陽性となった (図1右)。分化誘導されないクローンは高温条件のまま1か月以上培養しても分化誘導されなかった。

分化誘導前後の免疫グロブリンH鎖遺伝子の再構成の

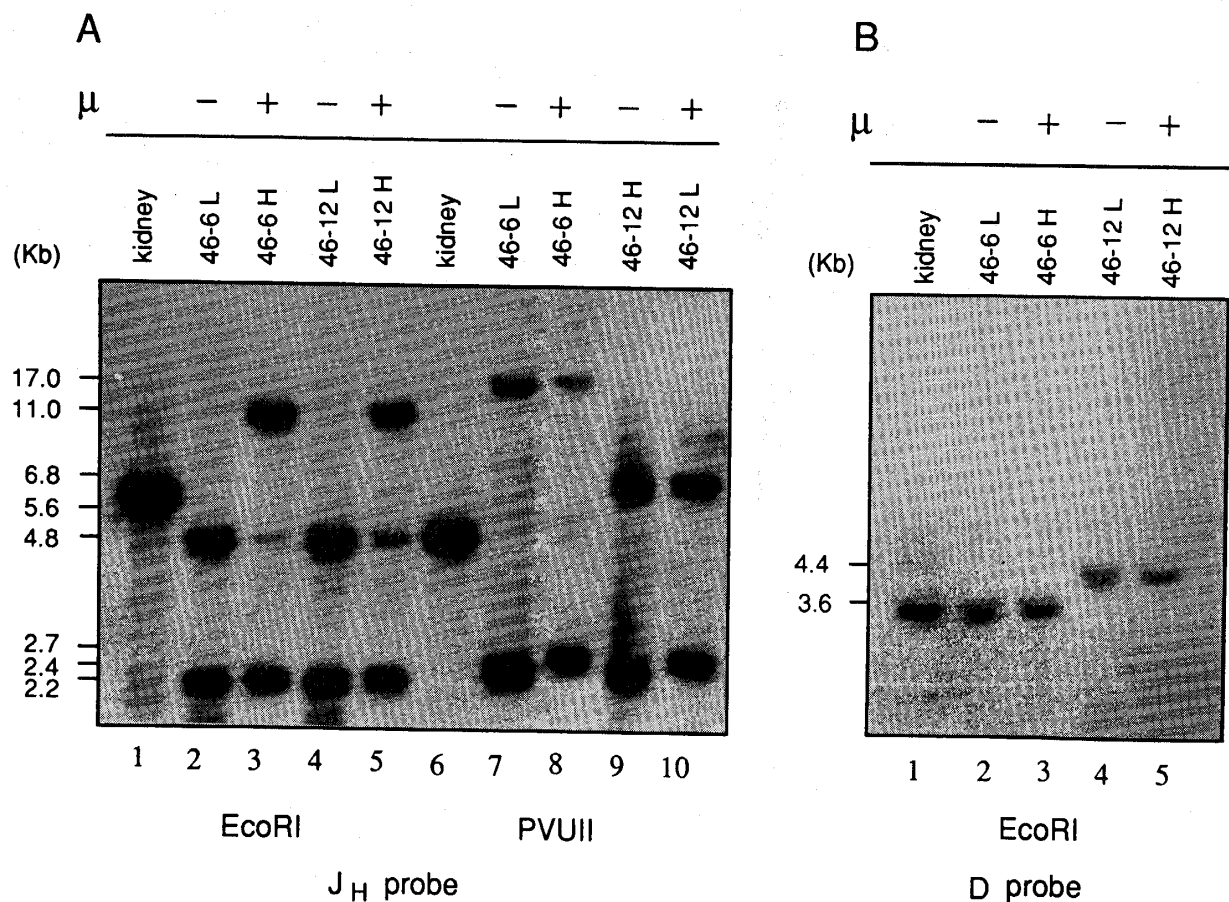


図 2. 分化誘導前後における免疫グロブリンH鎖遺伝子の再構成。

(A) J_H プロブを用いたサザン解析

マウス腎 (レーン1, 6), 分化誘導前46-6 (レーン2, 7), 分化誘導後46-6 (レーン3, 8), 分化誘導前46-12 (レーン4, 9), 分化誘導後46-12 (レーン5, 10) より DNA を抽出し EcoRI (レーン1, 2, 3, 4, 5) または PvuII (レーン6, 7, 8, 9, 10) で消化後, J_H プロブを用いてサザン解析をした。胎児型断片 (5.6 Kb EcoRI 断片, 4.8 Kb PvuII 断片), クローン46-6 および 46-12 の分化前 VDJ 断片 (4.8 Kb EcoRI 断片, 2.4 Kb PvuII 断片), クローン46-6 および 46-12 の分化後の VDJ 断片 (11.0 Kb EcoRI 断片, 2.7 Kb PvuII 断片), クローン46-6 の DJ 断片 (2.2 Kb EcoRI 断片, 17 Kb PvuII 断片), クローン46-12 の DJ 断片 (2.3 Kb EcoRI 断片, 6.8 Kb PvuII 断片) を図に示した。

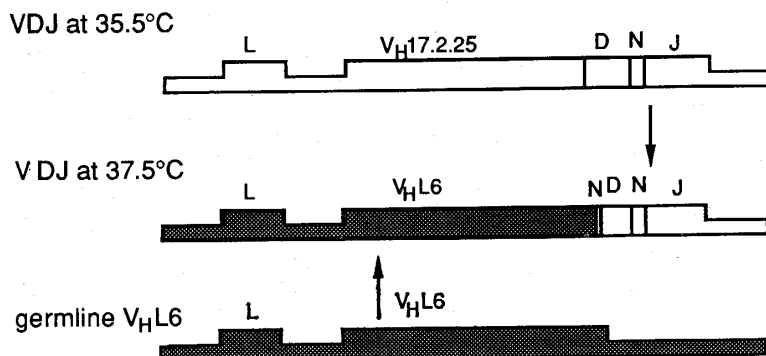
(B) Dプロブを用いたサザン解析

マウス腎 (レーン1), 分化誘導前46-6 (レーン2), 分化誘導後46-6 (レーン3) 分化誘導前46-12 (レーン4), 分化誘導後46-12 (レーン5) より DNA を抽出し EcoRI で消化後, 5'D F116プロブでサザン解析した。胎児型 EcoRI 断片 (3.6 Kb) およびクローン46-12における再構成 EcoRI 断片 (4.4 Kb) を図に示した。

有無を J_H プロブを用いたサザン法で解析した (図2) EcoRI および PvuII 消化後のクローン46-6, 46-12では分化誘導前にすでに胎児型断片は検出されず, 両染色体共に再構成していると考えられた (図2 Aレーン2, 4, 7, 9)。これらのクローンに分化誘導をかけると両クローン共に分化誘導前に検出された4.8 Kb EcoRI 断片および2.4 Kb PvuII 断片が消失または減弱して11.0 Kb EcoRI 断片および2.7 Kb PvuII 断片が検出されるようになった (図2 Aレーン3, 5, 8, 10)。これらのサザン解析での変化は表面 μ 鎖発現の変化と一致していることから, 新たに出現した11.0 Kb EcoRI 断片およ

び2.7 Kb PvuII 断片が機能的 VDJ 断片と考えられた。一方, 5'Dfl_{16.1} プロブを用いたサザン解析でクローン46-6は分化誘導前後共に3.6 Kb の胎児型 EcoRI 断片しか検出されなかったが (図2 Bレーン2, 3), クローン46-12では分化誘導前後共に胎児型断片は消失していて, 4.4 Kb の再構成 EcoRI 断片のみ検出された (図2 Bレーン4, 5)。これらのサザン解析より, (1) これらのクローンでは V_H 遺伝子断片と DJ 遺伝子断片間の通常の再構成によって μ 鎖発現が起きたのではなく, いったん終了した非機能的 VDJ 断片が更に上流の V_H 遺伝子と再構成を起こして μ 鎖発現が誘導されたこ

A



B

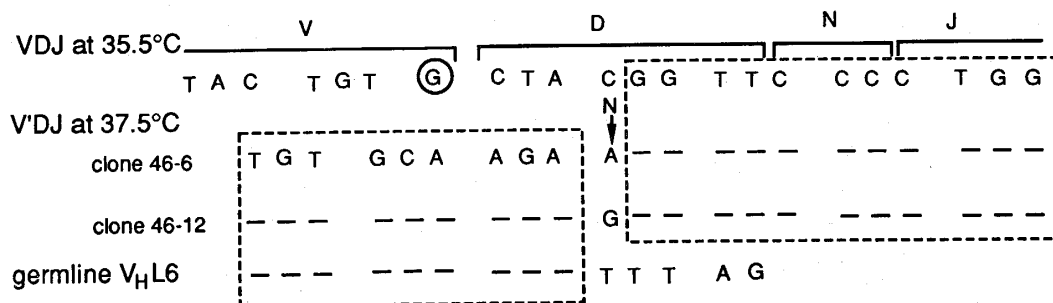


図 3. 分化誘導前の VDJ 結合と分化誘導後の VDJ 結合

(A) クローン46-6およびクローン46-12より単離された分化誘導前後の VDJ 断片の構造。リーダー、N配列、D領域、J領域をそれぞれL、N、D、Jで示した。塩基配列の一致する部分を黒ぬりおよび白抜きで示した。

(B) 分化誘導前 VDJ 結合および分化誘導後 VDJ 結合の結合部塩基配列。

分化誘導前 VDJ 結合で、丸で囲った塩基で frame shift が起きていることを図に示した。一印でそれぞれの塩基が一致することを示した。胎児型 V_{HL6} 遺伝子塩基配列を下に示した。

と、つまり以前より報告があった V_H 遺伝子置換が起きていること、(2) 分化した細胞集団のほとんどの細胞が V_H 遺伝子置換において同一 V_H 遺伝子を使用したこと、および (3) クローン46-6とクローン46-12では、分化誘導で変化がみられなかった他方の染色体において違った DJ 結合による再構成が終了していることが示唆された。また、両クロンの独立した数回の分化誘導において、免疫グロブリンH鎖の再構成の有無を同様にサザン解析すると、分化誘導に成功した μ 鎖陽性クローン (クローン46-6では5回中3回、クローン46-12では6回中3回) では、すべてのクローンで同一の再構成断片の変化が検出された (データ省略)。従って、両クロンの合計6回の独立した分化誘導においても同一の V_H 遺伝子を使用した V_H 遺伝子置換が誘導されたことが示唆された。一方、分化誘導が不成功に終わった μ 鎖陰性クロー

ンにおいても同様にサザン解析すると、解析した5クローン全てにおいて再構成断片の変化は認められなかった (データ省略)。以上の結果より、分化誘導の不成功は非機能的再構成の結果ではなく、遺伝子の再構成そのものが誘導されなかったためであると考えられた。また、 κ 鎖および λ 鎖の再構成はサザン解析の結果認められなかった (データ省略)。以上のサザン解析の結果より、確立された幼若B細胞クローンにおける分化誘導はいったん終了した非機能的 VDJ 断片に更に V_H 遺伝子置換が誘導され機能的 μ 鎖が発現された結果であること、および V_H 遺伝子置換の際に常に同じ V_H 遺伝子を使用したことが示唆された。

2) 分化誘導前後における VDJ 結合断片の解析

サザン解析の結果を更に分子レベルで確認する目的でそれぞれのクロンのゲノム DNA から分化誘導前後

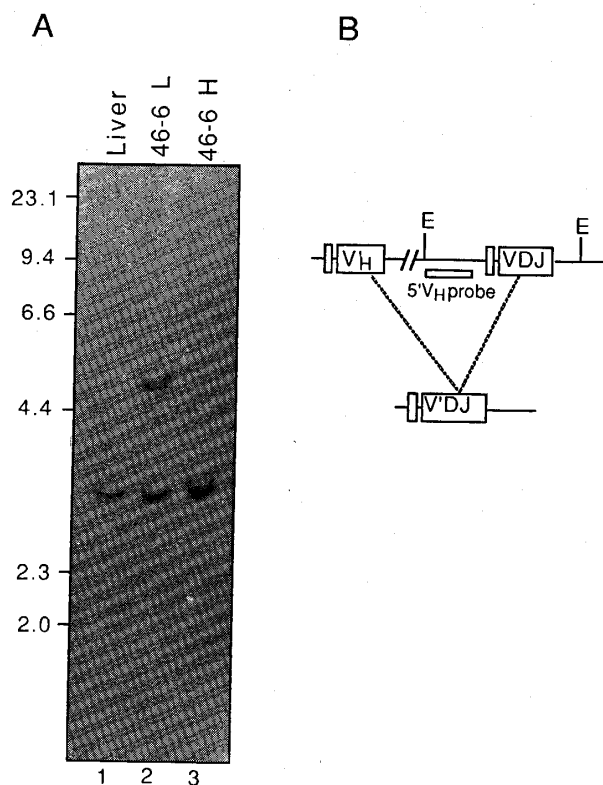


図 4. 介在部領域が V_H 遺伝子置換によって欠失することを示したサザン解析。

(A) マウス肝 (レーン1), 分化誘導前クローン46-6 (レーン2), 分化誘導後クローン46-6 (レーン3) より DNA を抽出し, EcoRI で消化後, 図Bに示す 5' V_H プロブを用いてサザン解析した。胎児型 EcoRI 断片 (3.2Kb) および再構成 VDJ 断片 (5.2 Kb) が検出された。

(B) V_H 遺伝子置換が欠失モデルによって起きたことを示す模式図。

E は EcoRI サイトを示す。

における非機能的 VDJ 結合断片および機能的 VDJ 結合断片を単離し塩基配列を決定した。分化誘導前の非機能的 VDJ 結合はクローン 46-6 と 46-12 で完全に一致し, V_H 遺伝子として J558ファミリーに属し抗 NP 特異的 V_H 遺伝子として報告されている V_H 17.2.25¹²⁾, D 遺伝子として Df 116.1¹³⁾, J 遺伝子として J_H1¹⁴⁾ が使用されていて, DJ 結合間に 3 塩基の N 配列を認めた (図 3 A)。しかしながら, この結合は V_H 断片と DJ 断片のアミノ酸のフレームの読み枠がずれるいわゆる out of frame の VDJ 断片であった (図 3 B)。

一方, 分化誘導後の VDJ 結合は上記の非機能的 V-DJ 結合の DJ 部分に新たな V_H 遺伝子が結合した V-VDJ 結合 (V_H 遺伝子置換) で, V_H 断片と DJ 断片のアミノ酸の読み枠が一致する機能的 VDJ 結合であった (図 3 A, B)。新たに結合した V_H 遺伝子の塩基配列は

いずれのクローンも抗ヒト癌モノクローナル抗体 L 6 で使用されている V_H 遺伝子と完全に一致した¹⁴⁾ (図 3 A)。また V_H 遺伝子置換に際して, 分化誘導前の非機能的 VDJ 結合の DJ 断片より 4 塩基の欠損および, 1 塩基の N 配列の挿入を認めた (図 3 A, B)。挿入された N 配列はクローン 46-6 の場合は アデニンが 1 塩基挿入され, クローン 46-12 の場合は グアニンが 1 塩基挿入されていた (図 3 B)。N 配列は μ 鎖ポリペプチド鎖の 95 番目のアミノ酸コードンの第一塩基を構成するため, アデニンが挿入されたクローン 46-6 では 95 番目のアミノ酸がアルギニンにより構成され, グアニンが挿入されたクローン 46-12 では グリシンにより 構成されることが明らかとなった。

一方, クローン 46-6 およびクローン 46-12 より単離された DJ 結合の塩基配列を決定すること, 両者共に Dsp 遺伝子¹⁵⁾の 5' 上流に存在する 12 スペース領域と J_H4 断片が結合していて, D 領域および 5' 上流の 7 mer 配列を欠く非機能的 DJ 結合であった。従って, これらのクローンの免疫グロブリン H 鎖遺伝子座は, 両染色体共に正常な V-DJ 結合を 起こし得る可能性がなかったことが明らかとなった。また, D プロブを使用したサザン解析でクローン 46-12 に検出された再構成断片 (図 2 B) は, DF 116.1 を利用した DJ 結合を反映したものではなく, クローン 46-12 で特異的に発生した DF 116.1 周辺領域での塩基欠損である可能性が示唆された。

3) V_H 遺伝子置換における再構成の機序

V_H 遺伝子置換の再構成の機序を調べる目的でまずこの再構成が欠失モデル (deletion) によるのか, 逆位モデル (inversion) によるのか検討し, 更にパルスフィールド電気泳動法を用いて使われた V_H 遺伝子と非機能的 VDJ 遺伝子の染色体上の相対的距離をマップした。

免疫グロブリン遺伝子あるいは T 細胞受容体遺伝子の再構成は介在領域が欠損すること (欠失モデル) または染色体上で逆転して組み替えを起こすこと (逆位モデル) によって発生すると考えられているが¹⁶⁾, 実際の再構成でどちらの方法をとるかは, お互いの遺伝子が染色体上同じ方向を向いているか, 反対方向を向いているかによる。最近, 環状 DNA の発見により実際に欠損部分が環状 DNA として細胞内に存在することが証明された¹⁷⁾。この介在部領域をプローブとして V_H 遺伝子置換がどちらの機序によって起きているのかを検討した。用いた介在部領域プローブは分化誘導前の非機能的 VDJ 結合の 5' 上流の EcoRI/BamHI 断片で, EcoRI 消化後の肝臓 DNA で 3.1Kb の胎児型 EcoRI 断片を特異的に検出した (図 4 A レーン 1)。従って, もし再構成が

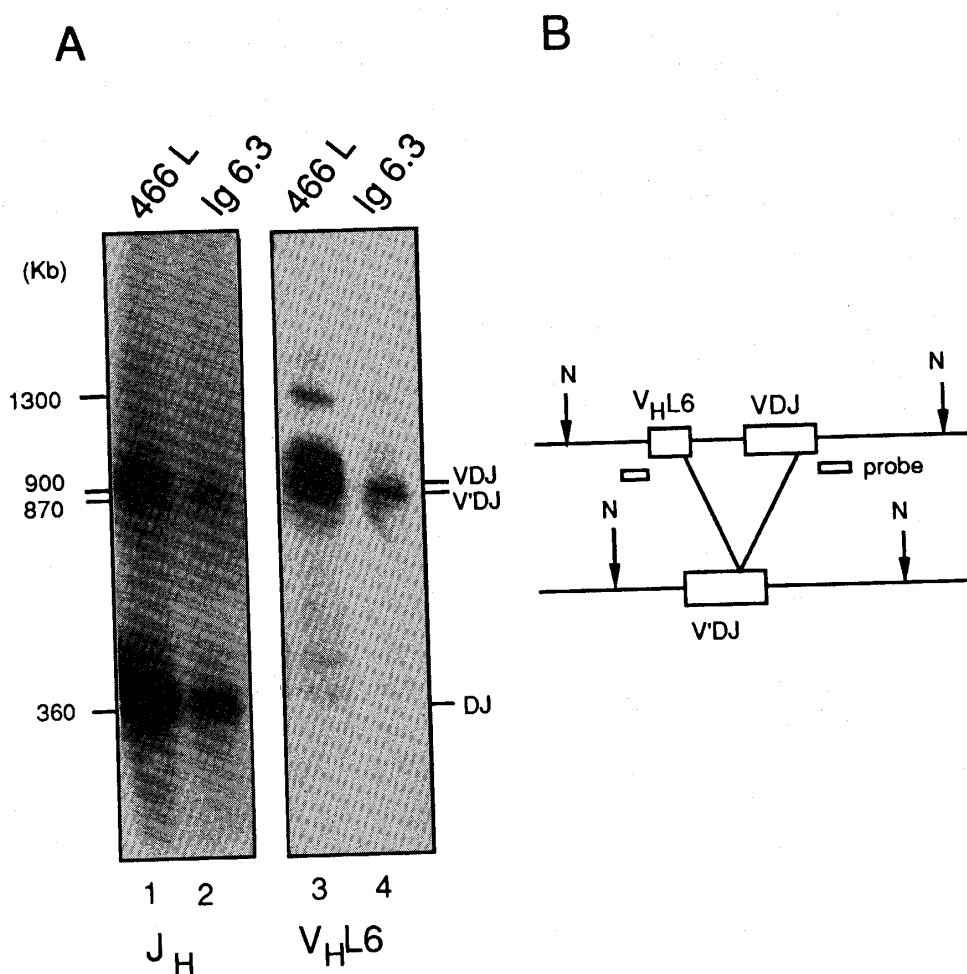


図 5. パルスフィールド法による V_{HL6} 遺伝子および非機能的 VDJ 結合のマッピング。

(A) 分化誘導前クローン46-6 (レーン1, 3), μ 鎖陽性クローン Ig 6.3 (レーン2, 4) より DNA を調整し, NarI で消化後 J_H プロープおよび V_{HL6} プロープを用いてサザン解析をした。分化前の VDJ 断片および V_{HL6} 遺伝子を含む断片 (900Kb), V_H 遺伝子置換後の VDJ 断片を含む断片 (870Kb) および DJ 断片 (360Kb) を図に示した。

(B) V_H 遺伝子置換前後における両遺伝子の染色体上でのマップ。
Nは NarI サイトを示す。

欠損による場合はこのプロープが検出する断片は染色体上から消失しバンドは検出されなくなり、もし逆位による場合は新たな再構成バンドが出現することになる。分化誘導前後のクローン46-6に関してこの介在部領域の変化を検討した。分化誘導前の EcoRI 消化後のクローン46-6では、3.1Kbの胎児型断片以外に5.2Kbの再構成バンドが検出されるが分化後のクローン46-6では3.1Kbの胎児型断片しか検出されず、新たな再構成断片は検出されなかった(図4Aレーン2, 3)。同様の結果は XbaI 消化後の DNA に関して確認できたことから、この V_H 遺伝子置換が欠失モデルによって発生したことが示された。次に、 V_H 遺伝子置換における特定の V_H 遺伝子の選択的使用の機序を調べる目的で、パルスフィールド法を用いて常に使用される V_H 遺伝子と非機能的

VDJ 結合断片の相対的距離を染色体上にマップした。図5に示したように、制限酵素 NarI は、両遺伝子間 (V_{HL6} 遺伝子および非機能的 VDJ 断片) に認識部位がないので、 J_H プロープおよび V_{HL6} プロープで検出される断片は両遺伝子を含む NarI 断片である。分化誘導前後における NarI 断片の変化を調べると、約900Kbの両遺伝子を含む NarI 断片が V_H 遺伝子置換によって約870Kbに変化していることが判明したので、欠失した介在領域は約50Kb以下と推定された。マウスにおいて V_H 遺伝子は平均約10Kbないし20Kbの間隔で存在すると報告されているので¹⁸⁾, V_{HL6} 遺伝子は、非機能的 VDJ 断片の極めて近傍に局在することが明らかとなった。

IV. 考 察

B細胞はその初期分化過程で免疫グロブリン遺伝子断片 (V, D, J 遺伝子) がランダムに結合することによりその抗体多様性を獲得することが知られている。しかし、胎児肝由来の幼若B細胞の解析より、個体発生初期のB細胞に誘導される再構成においては、 V_H 遺伝子ファミリー中の最も3'側にある V_H 遺伝子群が選択的に使用されることも報告されている¹⁹⁾。本論文では、人為的に分化誘導可能な幼若B細胞クローンをを用い、V-VDJ結合 (V_H 遺伝子置換) において使用される V_H 遺伝子のレパートリーを検討し、V-VDJ結合においては特定の V_H 遺伝子が選択的に使用されることを初めて明らかにした。V-VDJ結合 (V_H 遺伝子置換) はすでにいくつかの培養細胞株で報告されているが^{3,4)}、この結合において使用されている V_H 遺伝子のレパートリーおよびその選択的使用に関しては不明であった。

本論文では、V-VDJ結合で使用されている V_H 遺伝子 ($V_H L6$ 遺伝子) をパルスフィールド法を用いて解析し、V-VDJ結合で使用される V_H 遺伝子が非機能的VDJ結合の上流約50Kb以内にマップされることを明らかにした。マウスの V_H 遺伝子が10Kbないし20Kbの間隔で分布していると報告されていることから推測して¹⁸⁾、この V_H 遺伝子が非機能的VDJ結合の5'上流の最も近接した遺伝子である可能性も示唆された。

Reth らも5'上流の最も近接した V_H 遺伝子が V-VDJ結合で使用された例を報告していることから⁴⁾、V-VDJ結合において選択される V_H 遺伝子は非機能的VDJ結合との相互の距離に強く影響を受けることが示唆された。

一方、再構成における V_H 遺伝子の選択的使用は、使用される V_H 遺伝子が再構成の誘導以前に何らかの機構で決定されていることを示唆する。免疫グロブリン遺伝子の再構成におけるリコンビネーション機構は、認識配列への結合蛋白の結合、DNAの切断、切断端における塩基欠損および塩基挿入、切断端の結合などのマルチステップで構成されていると提唱されている¹⁶⁾。従って、本論文で解析した幼若B細胞クローンはこれらのリコンビネーションの初期ステップがすでに終了した状態で細胞がトランスフォームし、リコンビネーションがストップしたが、分化の誘導に伴いその後のリコンビネーションのステップが更に誘導され、その結果特定の V_H 遺伝子が使用される可能性も考えられた。

また、V-VDJ結合 (V_H 遺伝子置換) では通常のリコンビネーションで確認される7mer配列および9mer

配列の組み合わせがなく、どのような機構で誘導されるかに関しては不明である。Reth および Kleinfeld らはこの点に関して、 V_H 遺伝子領域の3'端近傍に存在する内在性7mer配列 (TACTGTG) が V-VDJ結合に重要な役割を果たしていることを推察している^{3,4)}。本論文で解析された幼若B細胞クローンで使用された非機能的VDJ結合にも上記の内在性7mer配列が認められ、この可能性を示唆した。一方、D-J_H結合はT細胞でも誘導されるが、 V_H -D-J_H結合はT細胞では誘導されず、B細胞で特異的に誘導されると報告されていることから^{9,20)} V_H -D-J_H結合には、現在必要であると考えられている V_H 遺伝子3'側に隣接する7mer配列、9mer配列以外に、V領域中に別の認識配列が存在する可能性も示唆されている。V-VDJ結合においても7mer配列のみでリコンビネーションが誘導されるのか、あるいは他の認識配列がV領域中に存在し、リコンビネーションにそれらの認識配列が必要になるのかに関しては今後の問題である。しかし、いずれの場合にも再構成の際には V_H 遺伝子座の活性化が先立って誘導されると考えられ、Wang らはこの活性化に免疫グロブリンH鎖エンハンサー領域が重要な役割を果たしていることを推測している²¹⁾。本論文で解析された幼若B細胞クローンでも、V-VDJ結合で使用される V_H 遺伝子 ($V_H L6$ 遺伝子) が局在する遺伝子座は分化誘導前にすでに活性化されていて、種々の sterile message の転写が認められた (未発表データ)。従って、V-VDJ結合において重要なファクターとなる両遺伝子の相対的位置関係に、非機能的VDJ結合の3'側に存在するエンハンサー領域の影響が、関与している可能性も考えられ、今後の解析が必要と思われる。

稿を終えるにあたり、御校閲、御指導を賜りました千葉大学医学部・肺癌研究施設第二臨床研究部門栗山喬之教授、並びに高次機能制御研究センター・免疫機能分野谷口 克教授に深甚の謝意を表します。直接御指導、御助言を頂きました国立予防衛生研究所・細胞免疫部竹森利忠部長、並びに技術的助言を頂きました (財) 癌研究所・ウイルス腫瘍部吉田光昭部長に深謝致します。

SUMMARY

Immunoglobulin heavy chain genes are constructed by the recombinational assembly of V, D, and J gene segments. The diversity of heavy chain is, in large part, generated through this assembly process. I have established differentiation-inducible pre-B cell clones by using temperature-sensitive mutant of Abelson murine leuke-

mia virus. These precursor clones in VDJ-/DJ-context differentiated into surface μ positive cells by V_H gene replacement without the expression of known light chains. The analysis of μ chain diversity in progenies of these precursor clones indicated that a unique V_H gene was preferentially used in all progenies by V_H gene replacement, suggesting that the μ chain diversity generated by V_H gene replacement from a single precursor clones was limited. By pulse field gel electrophoresis analysis, this unique V_H gene was mapped within 50kb upstream of non-functional VDJ complex. This result suggested that the nearby V_H gene was preferentially selected in V_H gene replacement.

文 献

- 1) Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581, 1983
- 2) Alt F, Yancopoulos G, Blackwell T, Wood C, Thomas E, Boss M, Coffmann R, Ronnberg N, Tonegawa S and Baltimore D: Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 3: 1209-1219, 1984.
- 3) Kleinfeld R, Hardy R, Tarlinton J, Dangi J, Herzenberg L and Weigert M: Recombination between an expressed immunoglobulin heavy chain gene and a germline variable gene segment in a $Ly-1^+$ B-cell lymphoma. *Nature* 322: 843-846, 1986.
- 4) Reth M, Gehrmann E, Petrac E and Wiese P: A novel V_H to V_HDJ_H joining mechanism in heavy-chain production. *Nature* 322: 840-842, 1986.
- 5) Takemori T, Miyazoe I, Shirasawa T, Taniguchi M and Graf T: A temperature-sensitive mutant of Abelson Murine leukemia virus confers inducibility of IgM expression to transformed lymphoid cells. *EMBO J* 6: 951-956, 1987.
- 6) Takemori T and Rajewsky K: Lambda chain expression at different stages of ontogeny in C57BL/6 and SLJ mice. *Eur J Immunol* 11: 618-625, 1981.
- 7) Kincade P, Lee G, Watanabe T, Sun L and Scheid MP: Antigen displayed on murine B lymphocyte precursors. *J Immunol* 127: 2262-2268, 1981.
- 8) Maniatis T, Fritsch E and Sambrook J: Molecular Cloning; A Laboratory Manual. pp 280-281, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1982.
- 9) Kurosawa Y, Boemer H, Haas W, Sakano H, Traunecker A and Tonegawa S: Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* 290: 565-570, 1981.
- 10) Reth M, Jackson S and Alt F: V_HDJ_H formation and DJ_H replacement during pre-B differentiation: non-random usage of gene segments. *EMBO J* 5: 2131-2138, 1986.
- 11) MacClelland M, Jones R, Patel Y and Nelson M: Restriction endonucleases for pulse field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res* 15: 5985-6005, 1987.
- 12) Loh D, Bothwell A, White-Scharf M, White-Scharf M, Imanishi-Kari T and Baltimore D: Molecular basis of a mouse strain-specific anti-hapten response. *Cell* 33: 85-93, 1983.
- 13) Kurosawa Y and Tonegawa S: Organization, structure and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med* 155: 201-218, 1982.
- 14) Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W and Tonegawa S: Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 286: 676-683, 1980.
- 15) Liu A, Robinson R, Hellstrom K, Murry E, Chang C and Hellstrom I: Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3439-3443, 1987.
- 16) Alt F and Baltimore D: Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: Implication from a chromosome with evidence of three D-J_H fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4118-4122, 1982.
- 17) Okazaki K, Davis D and Sakano H: T cell receptor β gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: Direct evidence for intermolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49: 477-485, 1987.
- 18) Kemp D, Tyler B, Bernard O, Gough N, Gerondakis S, Adams J and Cory S: Organization of genes and spacers within the mouse immunoglobulin V_H locus. *J Mol Appl Gen* 1: 245-261, 1981.
- 19) Yancopoulos G, Desiderio S, Paskind M, Kearney J, Baltimore D and Alt F: Preferential utilization of the most J_H-proximal V_H gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* 311: 727-733, 1984.
- 20) Ferrier P, Covey L, Suh H, Winoto A, Hood L and Alt F: T cell receptor DJ but not VDJ rearrangement within a recombination substrate introduced into a pre-B cell line. *Internatl Immunol* 1: 66-74, 1989.
- 21) Wang S and Calame K: The endogenous immunoglobulin heavy chain enhancer can activate tandem V_H promoters separated by a large distance. *Cell* 43: 659-665, 1985.