

学位論文題名

免疫グロブリン遺伝子における遺伝子再編成機構の解析

学位論文内容の要旨

要 旨

免疫システムの基本的機能の一つは自己と非自己との区別である。生体は、この認識を行なうために 10^7 種とも云われる抗原を認識するリセプター分子を発現する。このリセプターの多様性は、このリセプターを発現する細胞であるリンパ球の分化に伴う DNA レベルでの組み換えによって創り出されていることが明かになった。この遺伝子とは、B 細胞では免疫グロブリン遺伝子、T 細胞では T 細胞リセプター遺伝子である。この組み換え現象は DNA 再編成 (DNA rearrangement) と呼ばれている。又、基質である DNA 断片の名称から「V(D)J 組み換え」とも呼ばれている。この機構については、基質である DNA 側から多くの解析が行なわれたにも拘らず、この反応を触媒する酵素系や、この反応を制御するトランス因子については未だ不明のままである。本研究では、第 1 に基質である DNA 側から組み換えによって生じる反応産物の解析を試みた結果を報告する。そして、第 2 に酵素系へアプローチするために *in vitro* V(D)J 組み換えアッセイ・システムの確立を試みた結果を報告する。本論文の要旨は、以下の 6 点である。

1. ヒト骨髓細胞より V(D)J 組み換え産物である環状 DNA を単離した。その構造解析の結果から、この環状 DNA は免疫グロブリン H 鎖遺伝子 JH₁ 領域と DXP1 領域の結合により生じた反応産物であることが明かとなった。

V(D)J 組み換えによって数 10 ～ 数 100 kb も離れた位置に存在する DNA 領域が結合することが発見された後、欠失した部分の存在状態に興味を持たれた。何故なら、数百 kb にも及ぶ DNA が、核内でどのように処理されていくかと言う疑問、更にこの部分の構造を正確に知ることによって、反応機構、例えば反応中間体の構造等を解明する糸口が見つかる可能性、そして、遺伝子再編成を起こす未知の遺伝子の単離の可能性等が存在したからである。1987 年、山岸等は、マウス胸腺細胞の T 細胞リセプター α 鎖遺伝子より V(D)J 組み換えの過程に生じたと考えられる環状 DNA を単離し、その DNA の一次構造を報告した。この構造は、胎児型 T 細胞リセプター遺伝子 α 鎖 DNA が V(D)J 組み換え酵素の認識部位 (Recombination Signal Sequence: RSS) の端で切断され、余分な塩基対を 1 塩基対も含まない型で他の RSS の端と head to head に結合していることを示していた。この事実は V(D)J 組み換え機構に対する当時の考え方を裏付けるものであった。

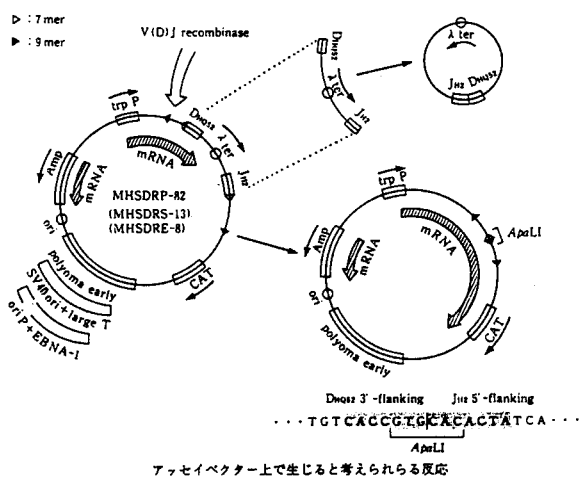
山岸等は当時、T 細胞リセプター遺伝子についての解析には成功していたが、主に V(D)J 組み換えの研究の行なわれてきた免疫グロブリン遺伝子に関しては成功していなかった。これは、彼等の環状 DNA の回収の方法に更に改善が必要であったことと、T 細胞における胸腺のように B 細胞を多量に調整出来る特定の組織が存在しなかったためだと考えられた。そこで、我々は、環状 DNA 回収法を一部改良することと、B 細胞を多量に調製するため、マウスではなく、ヒト骨髓より B 細胞を得ることにより環状 DNA の単離を試みた。この方法により初めて免疫グロブリン H 鎖遺伝子から環状 DNA が回収された。

2. 従来、塩基の挿入及び欠失を伴わないとされていたシグナル結合に 10 塩基対もの挿入を認めた。

1. で得られた V(D)J 組み換えに伴って生じた環状 DNA 由来と考えられるクローン HBMC-1 の構造解析の結果、このクローンが含むシグナル結合は、従来知られている構造とは異なっていた。この現象は、後に、Martin Gellert 博士等のグループによっても確認された。

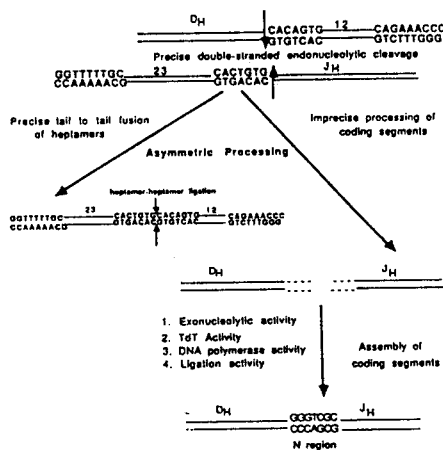
3. V(D)J 組み換え産物を、従来の方法より特異的且つ、高感度に検出するシステムを確立した。

以下の図に V(D)J 組み換え反応と Extrachromosomal vector を用いた V(D)J リコンビナーゼ・アッセイ法の原理を示す。



アッセイベクター上で生じると考えられる反応

- 注1) 真核細胞 DNA 複製起点周辺で、mRNA は転写されているが、配していない。
 注2) 環状 DNA が形成される前に末端が存在する直鎖状 DNA を配しているが、このような状態が存在するか否かについてははっきりしていない。理解を助けるために配してある。



Mechanism of VH gene segment assembly. (from F. Alt et al.)

V(D)J リコンビナーゼ本体を解析するためには、この酵素活性のアッセイ・システムが必要である。本酵素系の反応は 図に示すように RSS の認識、切断、ヌクレアーゼ活性による消化、N-nucleotide の付加、及び結合から成る一連の複雑な反応である。又、この組み換えは、各細胞の生涯の中で数回起これば充分その機能を果たし得る反応であるため、その活性は非常に低いか、非常に厳格な制御を受けている可能性が高い。従来、この反応の活性を定量的に測定する方法は存在しなかった。唯一、各々の細胞における V(D)J 組み換え活性の有無を検討する方法としては、RSS を組み込んだレトロウィルスのシステムがあるに過ぎなかった。しかしながら、このシステムは、レトロウィルスを染色体に組み込ませてしまうため、一旦ウィルスゲノム内で組み換えが生じた場合、このウィルスを含む細胞の子孫は総て V(D)J 組み換え酵素活性陽性と判断されることとなり、その結果、定量的測定が全く不可能であった。このため、定量的に V(D)J 組み換え反応を測定するシステムが是非とも必要であった。1978 年、Hesse 博士等は、extrachromosomal ベクター内に RSS を有するアッセイ・ベクターを用いることにより、半定量的な活性測定法を報告した。我々はこのシステムを基本にして更に感度及び V(D)J 組み換え反応特異性の高いアッセイ・システムの確立を試みた。

4. 上記 3. の方法を用いて初めてリンパ球組織における V(D)J リコンビナーゼの活性を直接測定した。その結果、thymus, bone marrow のみならず、spleen, lymph node にも弱いながら活性が認められた。この方法はシグナル等による V(D)J リコンビナーゼ活性制御の研究に貢献すると考えられた。

5. V(D)J 組み換え反応は DNA 複製反応を要求しないことが強く示唆された。

M. Lieber 博士等は extrachromosomal ベクターを用いた V(D)J リコンビナーゼ解析において、組み換えを起こしたベクターは、全て導入したリンパ球内で複製していることを突き止め、この結果から、彼は V(D)J 組み換えには DNA 複製が必要であると報告した。この事実は組み換え機構の部分的解析に留まらず、この反応の無細胞系を確立する上で、明確にしておかねばならない重要な点である。そこで我々は我々の確立した system を用いて V(D)J 組み換えと DNA 複製の関係を詳細に解析した。その結果、この両反応は全く独立していることが強く示唆された。

6. V(D)J 組み換え反応は、転写反応を要求しないことが強く示唆された。

遺伝子再編成を起こす前段階で V, J 及び C 領域が先ず転写される事実が報告された。更には、転写活性と遺伝子再編成の頻度に相関のあることも報告された。これらの研究は全てエンドジェナスな遺伝子についての研究であり、RNA の転写が V(D)J 組み換え反応に必要なのか、それとも組み換え反応に付随して起こる転写反応を単に検出しているのかを区別することは不可能であった。そこで、この両者の関係を明確にするために我々のアッセイ・システムを用いて解析を行なった。その結果、転写反応は V(D)J 組み換え反応に必要ではないことが強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 東 市 郎

学 位 論 文 題 名

免疫グロブリン遺伝子における遺伝子再編成機構の解析

免疫システムの大きな謎の1つは、 10^7 種以上の異なる抗原に応答することができることであった。いまでは、この抗原の多様性に対する、B細胞の産生する抗原蛋白質と、T細胞リセプターの多様性は、細胞の分化にともない、それぞれの遺伝子DNAの組換えによる再編成によって造り出されることが分かっている。この組換えは各々の遺伝子が有するDNA断片の名称から「V(D)J組換え」と呼ばれている。これらの研究は組換えの起きる前後の細胞の染色体DNAをクローニングし、その構造を比較検討することから始められた。構造解析から、組換えに関与するDNA上のシグナルとなる塩基配列も推定されている。続いて、組換えによって欠失する部分が染色体DNAから離れて、環状DNAとなることも示された。

申請者は、ヒト骨髓細胞よりV(D)J組換えの産物である環状DNAを精製濃縮しDNAクローニング法で単離に成功した。得たクローンは1個だけであったが、その構造解析の結果から、このDNA分子は免疫グロブリンH鎖遺伝子のJH1領域とDPX1領域の結合によって生じた産物であることが明らかにした。また、シグナル結合と呼ばれているこの結合部位には、10塩基対もの挿入が認められた。このような挿入は蛋白質に翻訳される、染色体上の組換えDNAの結合部分、即ちコーディング結合部位に発見され、抗原に多様性を与える原因の1つとなっているものであったが、環

状DNA上の結合部位にも存在することがあることを示す貴重な例となった。これらのB細胞での結果は、すでにT細胞リセプター遺伝子で報告されていたV(D)J組換え産物の環状DNAの研究結果とともに、この組換えの反応機構を考察する上で重要な役割を果たした。

また申請者は、V(D)J組換えをPCR(Polymerase Chain Reaction)法によって特異性が高く、かつ高感度に検出するシステムを確立した。ここで、用いるプライマーDNAの選択が大切であることを明確に示した。免疫グロブリン遺伝子由来の結合シグナルの配列を大腸菌のプラスミドDNAに組み込んで、組換えを検出するために必要な基質DNAを構築し、種々の培養細胞へ導入した。本来、この組換えは細胞内で数回起きれば十分な機能を果たし得る反応であるため、活性は極めて低く、かつ厳密な制御を受けていると考えられている。B細胞由来の培養細胞で組換えが検出されたほか、胸腺や骨髄細胞に加えて、脾臓やリンパ腺の細胞にも弱いながら活性が認められた。実験はまだ多種類の細胞の集団を用いたものであり、明確な結論には至らないが、免疫細胞の分化の場を考えるうえで示唆に富む結果であった。さらに従来、DNAの複製や転写の存在がこの組換え反応に必要であるという結果も報告されているが、申請者の系では、DNA複製や転写が見られないDNAにも組換えが起きており、複製や転写は必須ではないことを強く示唆する興味ある結果を得ている。

以上のように、申請者の研究は免疫グロブリン遺伝子再編成機構の解明に重要な貢献をしたと評価することができる。さらにこの分野の今後の課題である、反応に関わる酵素や因子の分離同定、あるいは遺伝子再編成が異常となる遺伝病の原因解明に至る糸口となり得る研究である。審査員一同、申請者が博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格があると判断した。