

新 制

理

1022

学位申請論文

北尾洋之



学位申請論文

鳥類における抗体クラススイッチ機構の研究

北尾 洋之

表紙	1
目次	2
要旨	4
序論	
1) 抗体	5
1. 抗体の特徴	5
2. 抗体の多様性産生機構	6
3. クラススイッチとは	9
4. マウスIgH鎖定常部遺伝子群の構成と欠失モデル	10
5. クラススイッチ遺伝子組換え (S-S組換え) 制御機構	13
2) 他の脊椎動物のIgH鎖遺伝子群の構成	16
1. 無顎類 (Agnathans)	16
2. 軟骨魚類 (Chondrichthyans)	16
3. 硬骨魚類 (Teleosts)	17
4. 両生類 (Amphibians)	17
5. 爬虫類 (Reptilians)	18
6. 鳥類 (Avians)	18
7. 哺乳類 (Mammalians)	18
3) ニワトリ特有の抗体の多様性産生機構	20
1. ニワトリIgH鎖遺伝子群可変領域の構成	20
2. B細胞分化と抗体の多様性産生機構	20
4) 本研究の意義	23
材料と方法	
1) ニワトリ	24
2) ゲノムライブラリーの作製とスクリーニング	24
3) ハイブリダイゼーション	25
4) 塩基配列決定とその解析	25
5) PCR法による高GC含量のニワトリS $\mu$ 領域の増幅	26
結果	
1) ニワトリ抗体重鎖遺伝子の構成	27
2) 哺乳類S領域と相同性のある領域 (ニワトリS $\mu$ 領域) の存在	32

3) ニワトリS $\mu$ 領域を含むクローンC $\mu$ U-1の13.5kbのEcoRI断片のプラスミドベクターへのサブクローニングとクローニング時の欠失	35
4) ニワトリS $\mu$ 領域の位置	38
5) SpeI (2) 認識部位とPmaCI (1) 認識部位の間の領域の塩基配列	40
6) XbaI 認識部位とSpeI (2) 認識部位の間の領域の塩基配列	42
7) EcoRI (1) 認識部位とXbaI 認識部位の間の領域の塩基配列	44
8) EcoRI (1) 認識部位とPmaCI (1) 認識部位の間の領域全体の塩基配列と繰り返し配列	46
9) ニワトリ脾臓でのクラススイッチ遺伝子組換えの検出	49
<b>考察</b>	
1) $\mu$ 鎖定常部CH1エキソンの上流に存在するニワトリS $\mu$ 領域	53
2) ニワトリS $\mu$ 領域の上流のAT含量の高い繰り返し配列 (chkR $\mu$ 領域)	55
3) ニワトリにおけるクラススイッチ組換え	56
4) 両生類でのクラススイッチ組換え機構	57
<b>謝辞</b>	59
<b>参考文献</b>	60



## 要旨

哺乳類では抗原が侵入してくると、初めIgMクラスの抗体が産生されるが、時間的に遅れて同じ抗原に対するIgGなどのほかのクラスの抗体が産生されてくる。これは末梢B細胞が抗原刺激を受けて抗体の定常部のクラスを変化させることによる。このように抗原特異性を保持したまま抗体のクラスを切り換える現象をクラススイッチと呼ぶ。マウス、ヒトでは定常部遺伝子上流のイントロンに繰り返し配列により構成されるスイッチ (S) 領域が存在し、クラススイッチの分子機構はS領域間での遺伝子組換え (スイッチ組換え) によっている。

筆者は、ニワトリIgH鎖可変部から $\mu$ 鎖定常部遺伝子までの正確な制限酵素地図を作成した。 $\mu$ 鎖定常部遺伝子CH1エキソンの上流のイントロンには5kb以上におよびマウスS領域と相同性のある領域 (ニワトリS $\mu$ 領域) が存在していた。この領域は2相の繰り返し配列からなり、5塩基対の基本単位配列により構成されていた。さらに筆者は抗原刺激した脾臓ゲノムからPCRによりニワトリS $\mu$ 領域を介した組換え産物を検出した。これはニワトリにおけるスイッチ組換えの存在を示すものである。鳥類でクラススイッチ遺伝子組換えの存在を明らかにしたのは、これが最初の報告である。

# 序論

## 1) 抗体

### 1. 抗体の特徴

抗体（免疫グロブリン：Immunoglobulin, Ig）はさまざまな抗原を認識し、それと結合するという共通の性質をもつ。抗体分子は同一の重（H）鎖2本と同一の軽（L）鎖2本からなるヘテロ4量体を基本構造としている。各ポリペプチド鎖はN末の可変領域とC末の定常領域とから構成されている。可変領域は抗原と結合する領域であり抗体ごとに非常に多様である。定常領域は生理活性を決定しており、H鎖の定常領域の違いによって異なるエフェクター活性が発揮される。IgMは初期分化を完了した休止型B細胞表面に発現されて抗原を認識し、B細胞内へ分化活性化シグナルを誘導する。IgGは血清中に最も多く含まれ主な抗原抗体反応を担っており、IgEは即時のアレルギーに関与する。IgAは母乳に分泌されて、新生児の感染防御に重要な役割を果たしている。抗体のクラスとサブクラスを含めて、H鎖の定常領域が異なるものをアイソタイプと呼ぶ。H鎖のアイソタイプには、マウスでは $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 3$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ の8種存在し、それぞれIgM、IgD、IgG1、IgG2b、IgG2a、IgG3、IgE、IgAに対応している。



## 2. 抗体の多様性産生機構

抗原と結合する抗体の可変領域は非常に多様である。マウス抗体遺伝子可変領域はH鎖では250~1000個のV断片が存在するV遺伝子群、12個のD断片が存在するD遺伝子群、4個のJ断片が存在するJ遺伝子群にわかれた構造を、L( $\kappa$ )鎖では約250個のV断片が存在するV遺伝子群、4個のJ断片が存在しているJ遺伝子群にわかれた構造をしている。抗体の多様性は、H鎖、L鎖でこのように多数存在するV、D、J各断片が遺伝子レベルでさまざまな組み合わせで組換えを起こす(VDJ組換え)ことによって得られる(図1)。この組換えの際、組換え部位でDNAのランダムな欠失、挿入が起こることも含めて考えると、組換えによって産み出される多様性は $10^9$ 通り以上と見積もられ、環境中に存在するいかなる抗原にも対応することが可能と考えられている。

各V、D、J断片には隣接して、特徴的な7塩基対と9塩基対による組換えシグナル配列が存在する。このシグナル配列間で部位特異的な組換えが起こる。VDJ組換えの際、このシグナル配列の7塩基対と9塩基対の間のスペーサーが12塩基対のものと23塩基対のものとの間でのみ組換えが起こるという12/23スペーサールールが働いており(Sakano et al., 1981)、7塩基対と9塩基対の逆向き相同配列を信号とし、VとD、DとJ断片の間で正確に組換えが行われる。VDJ間の各組換え順は分化の過程で厳密に制御され、まずH鎖のD-J組換え、次にH鎖のV-DJ組換え、そしてL鎖のV-J組換えが完了する。

このVDJ組換えの際、VとD、DとJの断片間の領域が染色体より切り出され、環状DNAとして放出される。TCR $\alpha$ 鎖(Fujimoto and Yamagishi, 1987)、TCR $\beta$ 鎖(Okazaki et al., 1987)、TCR $\gamma$ 鎖(Iwasato and Yamagishi, 1992b)、TCR $\delta$ 鎖(Toda et al., 1988; Takeshita et al., 1989)、IgH鎖(Toda et al., 1989; Shimizu and Yamagishi, 1992)、Ig $\kappa$ 鎖(Hirama et al., 1991; Harada and Yamagishi, 1991)における組換えによる環状DNAが現在までに単離、同定されている。

VDJ組換えはリンパ球特有の機構であり、リンパ球の発生にはこの機構が必須である。VDJ組換えを特異的に活性化する遺伝子として、RAG-1、RAG-2の2つの遺伝子がクローニングされている(Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990)。これらの遺伝子はB細胞、T細胞に特異的に発現している。またこれらの遺伝子を欠損させたノックアウトマウスではVDJ組換えが誘導されず、B細胞、T細胞ともに未熟な段階で分化が停止し、重篤な免疫不全を引き起こす(Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992)。RAG-1、RAG-2の機能は最近まで不明であり、組換え酵素そのものである可能性、あるいは組

換えに関与する遺伝子発現の制御に関与している可能性が考えられていた。最近になって、*In vitro* での実験で、RAG-1、RAG-2タンパクによる組換えシグナル配列末端での2本鎖DNA切断反応が報告され (McBane et al., 1995; van Gent et al., 1996) 、RAG-1、RAG-2が組換え酵素の一要素であることが明らかになった。また、RAG-1、RAG-2タンパクによって切断されたDNA末端は、Ku蛋白質 (p70/p80) (Taccioli et al., 1994; Zhu et al., 1996) や *scid* 遺伝子産物と考えられているDNA依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) p350 (Blunt et al., 1995) などの一般的なDNA修復酵素の働きによってシグナル配列同士、コーディング領域同士が再結合され、シグナル結合とコーディング結合を形成する。



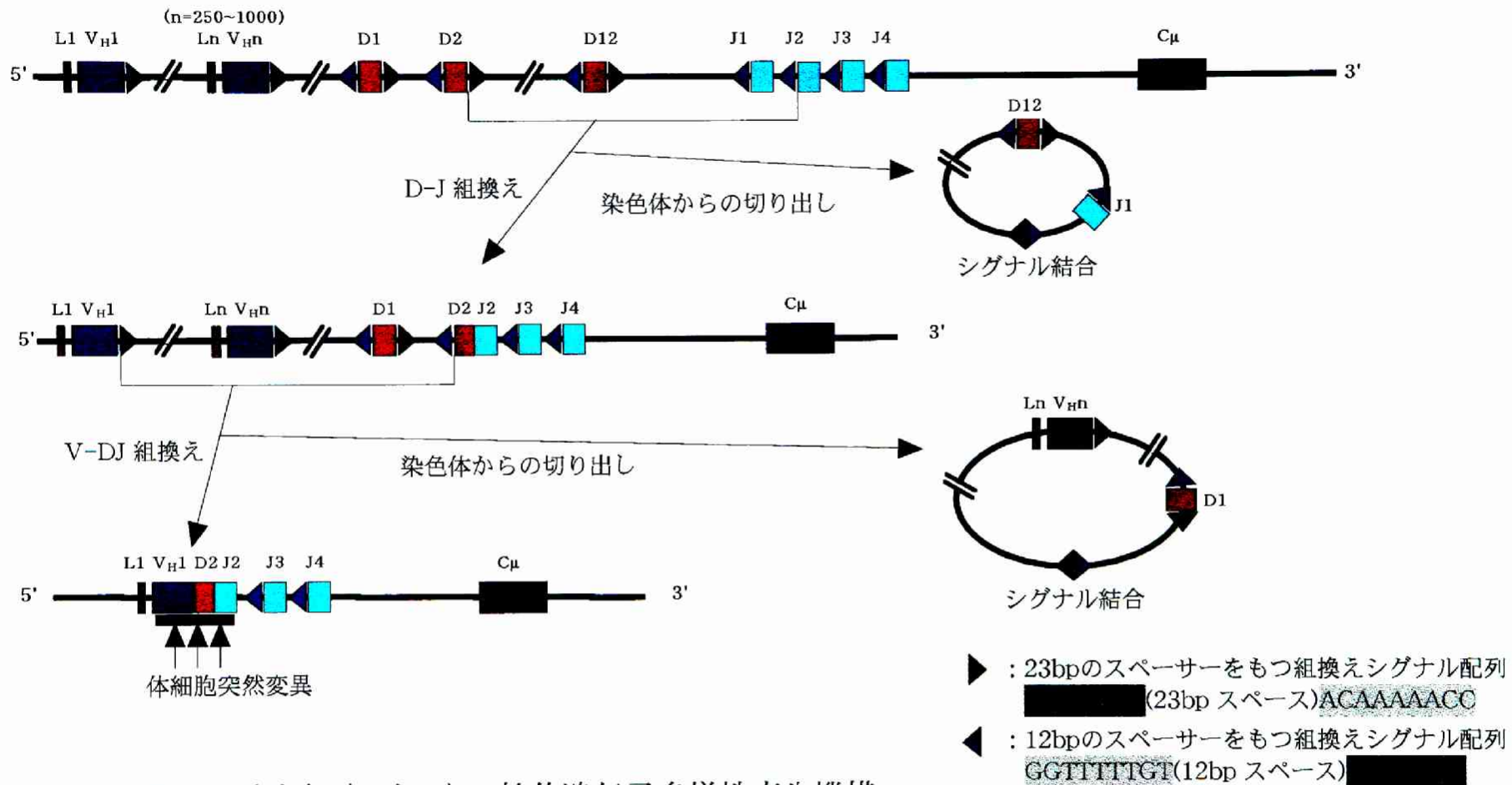


図1 哺乳類(マウス)の抗体遺伝子多様性産生機構

抗体はH鎖、L鎖とも、抗原と結合する可変領域、生物活性を決める定常領域からなる。生殖細胞中では抗体遺伝子の可変領域はV、D、J遺伝子という各断片にわかれてゲノム上に存在しており、B細胞分化の過程で各断片が遺伝子レベルで様々な組み合わせで組換えをおこす(VDJ組換え)。各V、D、J断片には隣接して、7merと9merのシグナル配列が存在する。VDJ組換えを行う酵素群は12bp-23bpスペース・ルールでシグナル配列を認識し、抗体遺伝子の再配列をおこなうと考えられている。

### 3. クラススイッチとは

B細胞は骨髄において、全能性造血幹細胞からproB細胞（B細胞に運命を決定されているが抗体遺伝子はまだ生殖細胞型）、preB細胞（抗体H鎖の組換えが完了している）の中間段階を経て分化してくる。抗体遺伝子H鎖、L鎖でVDJ組換えを完了したB細胞は抗原特異性が決定されており、細胞表面にIgMタイプの抗原受容体を発現する。その抗原特異性はその全ての子孫細胞へと受け継がれていく。

さらに分化が進んだ後、抗原による刺激などが加わると、このB細胞に由来する子孫細胞のなかに可変領域によって規定されている抗原特異性を変えることなく、その発現する抗体のクラス（アイソタイプ）を変換し、IgGやIgAなどを発現するものが現われる

(Nossal et al., 1964)。つまり、1つのB細胞の子孫細胞の間では可変領域は一定に保たれ、定常領域（H鎖のみ）が変化していくことで、同じ抗原に対応しながら異なったエフェクター機能をもつ抗体が産生されるのである。この現象を抗体のクラス（アイソタイプ）スイッチという。

この現象は抗原やT細胞などからの刺激によって誘導、制御されている。このため哺乳類では抗原刺激後、初めはIgMクラスの抗体が産生されるが、時間的に遅れてIgGなどのほかのクラスの抗体が産生されてくる。すなわち時間経過的にも抗原の侵入によって産生される抗体のクラス（アイソタイプ）が変換されていくように見える。広義のクラススイッチ現象とはこの経時的変化をさす。

現在、特定のサイトカインの刺激によって、試験管内でマウスのB細胞にこのクラススイッチを誘導することが可能である。脾臓から採取したB細胞をリポ多糖（LPS）で刺激すると、IgG2bとIgG3の産生が誘導されるが、同時にインターロイキン4（IL-4）を加えると、IgG1とIgEの産生が誘導されるが、IgG2bとIgG3の産生は抑えられる

(Kearney et al., 1976)。またIFN- $\gamma$ やTGF- $\beta$ による刺激ではIgAの産生が誘導される (Coffman et al., 1989)。




#### 4. マウスIgH鎖定常部遺伝子群の構成と欠失モデル

1978年、本庶と片岡は種々のマウス骨髓腫細胞（B細胞が最終的分化を遂げ大量の抗体を産生するようになった形質細胞が腫瘍化したもの）において、その細胞が産生している抗体のアイソタイプと免疫グロブリンH鎖定遺伝子の欠失様式に一定法則性があることをみいだした（Honjo and Kataoka, 1978）（図2）。例えば、IgG1産生細胞では $\gamma 3$ 鎖定常部遺伝子、IgG2b産生細胞では $\gamma 3$ と $\gamma 1$ 鎖定常部遺伝子というように、産生される抗体のアイソタイプによってどの遺伝子が欠失しているかが決まっているというのである。さらにH鎖定遺伝子群が転写の向きに可変部遺伝子群(V)- $\mu$ 鎖定常部(C $\mu$ )-C $\gamma 3$ -C $\gamma 1$ -C $\gamma 2b$ -C $\gamma 2a$ -C $\alpha$ の順に並んでいて、各アイソタイプの発現に際して可変部と発現される定常部との中間にある遺伝子が欠失すると考えると法則性が説明できることを発見し、いわゆる欠失モデルを提唱した。これは哺乳類の細胞分化における遺伝子組換えを実験的根拠をもって示した最初の例だと考えられているが、このモデルによると、クラススイッチ現象がIgMから始まって、IgGやIgAへと向かって起こり、原則として逆行しないことをうまく説明できる。

このモデルを証明すべく、1982年清水らによって、BALB/c系統のマウスにおけるIgH鎖定常部遺伝子群全領域の構成が決定された（Shimizu et al., 1982a）。その構成は、5'-JH-(6.5kb)-C $\mu$ -(4.5kb)-C $\delta$ -(55kb)-C $\gamma 3$ -(34kb)-C $\gamma 1$ -(21kb)-C $\gamma 2b$ -(15kb)-C $\gamma 2a$ -(14kb)-C $\epsilon$ -(12kb)-C $\alpha$ -3'となっており、本庶らの欠失モデルから予想されるものと完全に一致した（図3）。また可変領域の最下流に位置するJH断片はC $\mu$ の上流にしか存在しないこと、 $\delta$ 鎖以外の各定常部遺伝子のすぐ上流のイントロンにクラススイッチを起こす際の遺伝子組換えを司る領域（スイッチ（S）領域）が存在していることを明らかにし、 $\gamma$ 鎖などのアイソタイプの抗体の発現は、可変領域におけるVDJ遺伝子組換えと定常領域におけるクラススイッチ組換え（S-S組換え）という2種類の遺伝子組換え機構を経て起こるとする仮説に構造的な証拠を与えた。

非リンパ系細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )
IgM産生細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )
IgG3産生細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )
IgG1産生細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )
IgG2b産生細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )
IgG2a産生細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )
IgA産生細胞	( $\mu$ )	$\gamma 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2b$	$\gamma 2a$	( $\alpha$ )

図2 マウス骨髄腫細胞において発見された、産生される抗体H鎖アイソタイプと定常部遺伝子欠失の相関 (Honjo and Kataoka, 1978より)

各アイソタイプを産生する細胞において、ほぼ例外なく  で示した遺伝子が欠失している。当初、 $\mu$ 鎖と $\alpha$ 鎖遺伝子については定量されていなかったため、( )を付した。

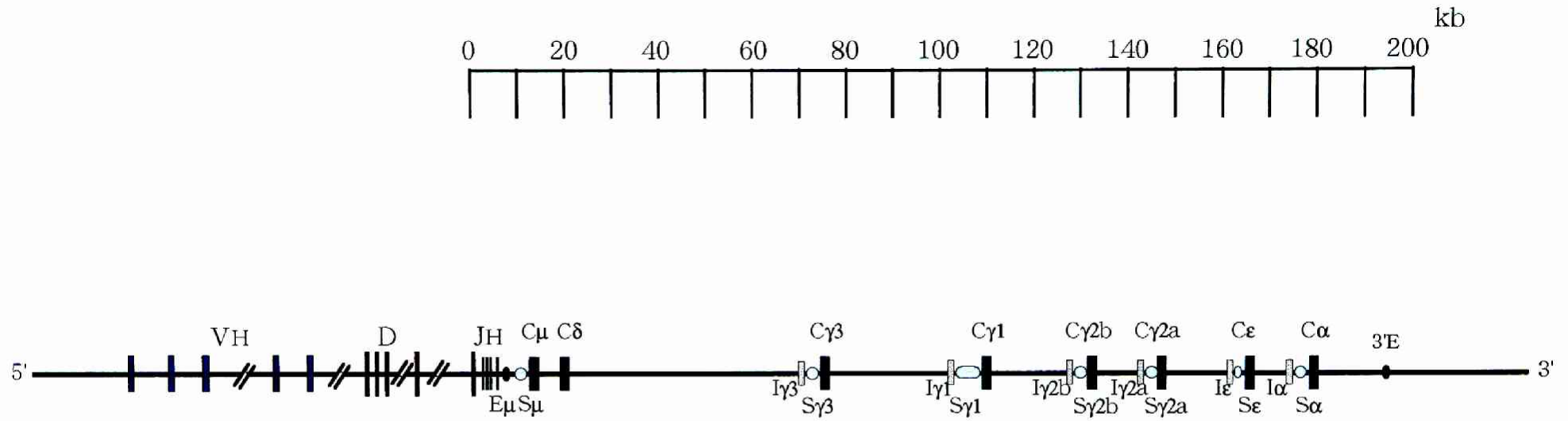


図3 BALB/c系統のマウスのIgH鎖定常部遺伝子群の構成 (Shimizu et al., 1982aより)

先に示したIgH鎖における定常部遺伝子欠失モデルから予想される構造と完全に一致している。

また、 $\delta$ 鎖を除く各定常部遺伝子上流には繰り返し配列からなるスイッチ (S) 領域、そして各S領域の上流にはその領域における生殖型転写を制御するプロモーター領域を含むI領域が存在している。

## 5. クラススイッチ遺伝子組換え (S-S組換え) 制御機構

さまざまなアイソタイプの抗体を産生する骨髓腫細胞から単離された発現型遺伝子の構造解析から、H鎖定常部遺伝子のすぐ上流のイントロン上に最終的にクラススイッチを起こすときの遺伝子組換えを司る領域 (スイッチ (S) 領域) が存在し、その領域は短い基本単位配列が多数繰り返された特徴的な構造をもっていることが明らかになった

(Kataoka et al., 1981; Nikaido et al., 1981, 1982; Dunnick et al., 1980)。具体的には、S領域は2種の5塩基 (GAGCTとGGGGT) を共通に含む20ないし80塩基対の単位配列が多数繰り返した構造をしている (Obata et al., 1981; Davis et al., 1980; Arakawa et al., 1993; Mills et al., 1990; Mizuta et al., 1991)。この繰り返し配列は長いもので数千塩基対にも及ぶ。また各S領域は互いに転写方向に対して順方向に相同性のある配列をしている。つまり組換えの信号となっている塩基配列は順方向に相同性があることになり、この点は7塩基対と9塩基対の逆向き相同配列を信号としている可変部遺伝子のVDJ組換えと本質的に異なっている。

可変部遺伝子のVDJ組換えでは、環状DNAが染色体より放出されることが確認されているが (図1)、LPSとIL-4などによって刺激し、クラススイッチを誘導したマウス脾臓細胞からも、クラススイッチ組換えによる環状DNAの産生が検出されている (Iwasato et al., 1990; Matsuoka et al., 1990; von Schwedler et al., 1990) (図4)。この環状DNAはクラススイッチ組換えが図4に示すように同一DNA分子内で起こった結果生ずるものである。また、組換え点の付近には最大2塩基までの相同性しか見られないことから、クラススイッチ組換えには細菌類において見られるいわゆる相同組換えとも異なる機構が働いていると考えられている。

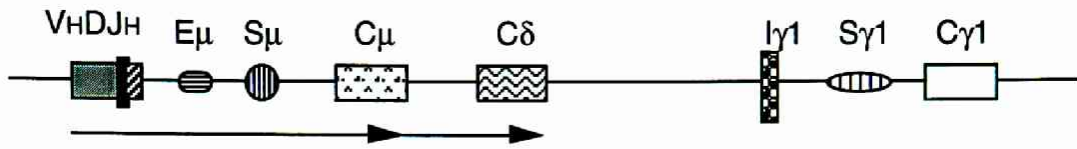
細胞内で複製することができないこの環状DNAは細胞増殖によって希釈されていく。つまり検出される環状DNAの頻度から組換え頻度そのものが割り出される。環状DNAのクローニング効率を解析した結果、クラススイッチを誘導するサイトカイン、IL-4やTGF- $\beta$ が組換えの完了した細胞の増殖を調節しているのではなく、組換えそのものを調節していることが明らかになった (Iwasato et al., 1990, 1992a; Matsuoka et al., 1990; Yoshida et al., 1990)。クラススイッチ組換えの標的遺伝子の特異性はこれらの因子の刺激によって組換え前のH鎖定常部遺伝子が転写される特異性と一致していることから接近可能化モデル (Accessibility Model) が提唱されている (Stavnezer et al., 1988; Lutzker et al., 1988)。サイトカインなどの刺激は組換え標的遺伝子の生殖型転写を活



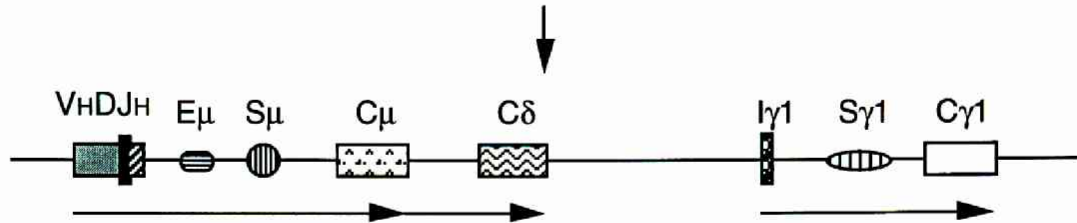
性化し、その結果染色体構造を開き、組換え酵素系の接近を可能にするというモデルであるが、サイトカインによる誘導時に検出される環状DNAの頻度から割り出された結果は、このモデルを支持する結果であった。

この接近可能化モデルは、特定の抗原による刺激を受けると、例えば可溶性タンパク抗原ではIgG1、寄生虫抗原ではIgE、ウイルス抗原ではIgG2aというように特定のアイソタイプの抗体が産生されやすいのはなぜかという古くからの問いに対する分子レベルでの答えを提供している。クラススイッチおよびクラススイッチ組換えは、特定の抗原の刺激によってT細胞などが産生する特定のサイトカインという外因性の因子によって制御されているのであって、自身のVDJ組換えやその産物といった内因性の因子によって制御されるものではないということであり、このことは、VDJ組換えが自身の組換えの状態を監視しながら組換えを巧妙に制御しているのとは対照的である。

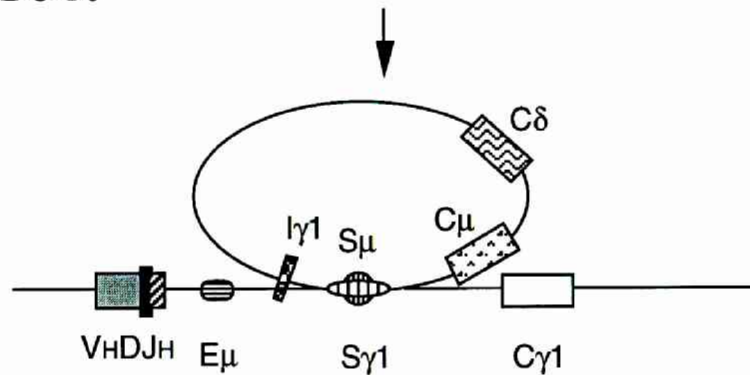
サイトカインによって発現が誘導される生殖型転写は、組換え標的定常部遺伝子のS領域の上流のプロモーター領域より始まり、Iエキソン、S領域を経てC領域を通過し、分泌型および膜結合型IgH鎖mRNAのpolyA付加位置で終わる。この転写産物はS領域の5'側のIエキソンがCHエキソンとの間でスプライシングを起こしS領域が除かれた "switch transcript" となり安定して存在することが知られている (Xu and Stavnezer, 1990)。この転写産物が現在未同定のスイッチ組換え酵素の標的特異性を決定する因子であるという説も提唱されている (Lorenz et al., 1995)。



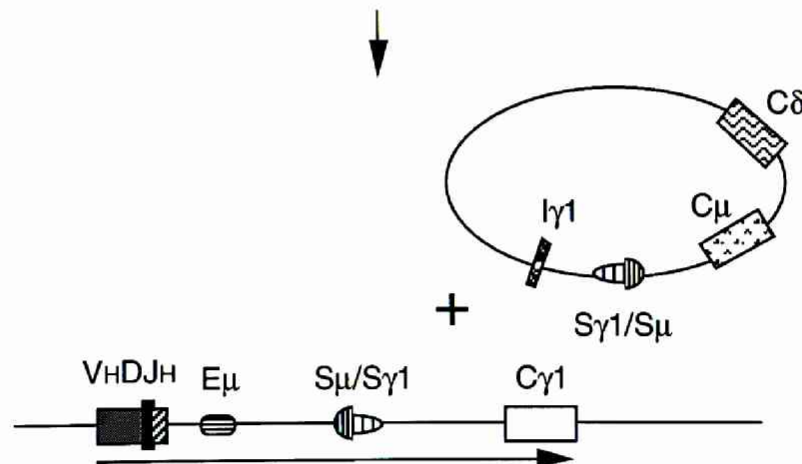
成熟・休止期の B 細胞では  $\mu$  鎖が単独で、もしくは  $\mu$  鎖と  $\delta$  鎖が alternative splicing によって同時に発現している。



抗原とサイトカインなどの刺激によりスイッチの標的遺伝子が組換えなしに転写される。一般に中間に位置する定常部遺伝子（この場合  $\gamma 3$ ）は転写されない。また標的遺伝子での転写産物はスプライシングを受け、S領域が除かれた形の "switch transcript" となる。



標的遺伝子に対して組換え酵素系が働き、環状 DNA の放出を伴う S - S 組換えが起こる。



スイッチ組換えを起こした遺伝子からの転写により第 2 のアイソタイプが発現される。転写の活性化によって大量の抗体が産生・分泌されるようになる。

図 4 クラススイッチ分子機構の模式図

## 2) 他の脊椎動物のIgH鎖遺伝子群の構成

現在までに報告のある各脊椎動物のIgH鎖遺伝子群の構成を図5に示した。

### 1. 無顎類 (Agnathans)

現在のところ、哺乳類のものと相同性のあるIg遺伝子や抗体分子は見つかっていない。液性免疫応答の認識分子として、不安定なヘテロ2量体が存在するという仮説が歴史的にあった。その候補としてメクラウナギから単離された分子は、Ig分子よりも補体の構成分子と相同性があることが確認されている (Ishiguro et al., 1992)。

### 2. 軟骨魚類 (Chondrichthyans)

軟骨魚類は、進化系統樹では現存する顎口類脊椎動物 (Jawed Vertebrate) のなかで一番哺乳類から遠い位置にあると考えられている。この種の免疫応答もやはり哺乳類と比べてかなりその様相が異なっている。

サメ (*Heterodontus francisci*) の抗体H鎖遺伝子群は、VH-DH1-DH2-JH-CHからなる単位がゲノム上に散在した特徴的な構造をしている。VH遺伝子断片上流にはオクタマー配列はなく、他の脊椎動物のVH遺伝子断片上流とは異なる転写制御領域が存在する。サメは各単位内で哺乳類と同じシグナル配列を用いたVDJ組換えを行っているが、V、D、J各断片の塩基配列は単位間で互いに非常に高い相同性があるため (Litman et al., 1993)、V、D、J各断片の組み合わせによる多様性は期待できない。しかし、組換え時のコーディング結合部における欠失やN挿入、また抗体遺伝子内での体細胞突然変異 (Hinds-Frey et al., 1993) が検出されることから、抗体の多様性産生機構はサメにおいても働いていると考えられている。このゲノム上に散在した単位の中には、非リンパ系細胞内でVDまたはDJが結合した形になっているものが存在する。これらは構造上偽遺伝子ではなく、抗体遺伝子として機能していることが予想されている (Kokubu et al., 1988b)。

サメでは1種のアイソタイプの抗体しか見つかっておらず、その分子構造は哺乳類のIgMタイプの抗体と最も近い。この抗体は哺乳類のIgMと同様、5量体としても分泌されるが、主に1量体として分泌されている。抗体の親和性成熟 (affinity maturation) は

見られず、あるハプテンに対する抗体の特異性は他の脊椎動物のものとは比べて低い

(Mäkelä and Litman, 1980)。調べられた限りでは、JH-CH間のイントロンには哺乳類のS領域に相同の配列は存在しない (Kokubu et al., 1988a)。抗体のクラスは1種だけであり、クラススイッチは起こらない。

### 3. 硬骨魚類 (Teleosts)

硬骨魚類のIgH鎖遺伝子群の全体構成は一般的に哺乳類と似ていて、同一染色体上に1つの遺伝子群として存在している。最も原始的な硬骨魚類、カタクチイワシ (*Elops saurus*) の各VH遺伝子断片の3'端には23塩基対のスペーサーの組換えシグナル配列が、またその上流には特徴的なオクタマー配列が存在する (Amemiya and Litman, 1990)。抗体のアイソタイプはIgMタイプ1種だけで、定常部CHの上流にVDJ組換えシグナル配列を持つJH断片が存在するという構造をとる。

VH遺伝子には複数のファミリーが存在し (Amemiya and Litman, 1990; Ghaffari and Lobb, 1991)、V、D、Jの組み合わせによる多様性産生を可能にしている。また、ナマズ (*Ictalurus punctatus*) のJH-CH間のイントロンには4塩基対の基本単位配列 (ATGT) のタンデムな繰り返し配列が存在するが、哺乳類のS領域と比べ短く、配列も異なる (Ghaffari and Lobb, 1992)。抗体のアイソタイプが1種だけということもあり、この領域のクラススイッチ組換えへの関与はないものと考えられている。

### 4. 両生類 (Amphibians)

硬骨魚類と同様に、両生類のIgH鎖遺伝子は同一染色体上に1つの遺伝子群として存在している。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のV、D、J断片の数は哺乳類より多く、11ファミリーのVH遺伝子、17個以上のDH断片、11個以上のJH断片からなる (Haire et al., 1990)。3種の抗体のアイソタイプ、IgM (Schwager et al., 1988)、IgX (Haire et al., 1989)、IgY (Amemiya et al., 1989) が同定されている。IgMは哺乳類のIgMに対応する抗体と考えられているが、IgX、IgYについては哺乳類に対応するものがない。

cDNAの塩基配列の比較から、同一のJH断片を用いているIgMとIgYが存在する。可変領域が1つしかないことから、これらのアイソタイプ間でのクラススイッチが示唆されて



に特徴的な繰り返し配列が存在し、IgX産生細胞にこの領域を介した組換えを検出したという報告がある (Mußmann and Du Pasquier., 1996)。

## 5. 爬虫類 (Reptilians)

爬虫類IgH鎖遺伝子群に関する知見は現在のところ非常に少ない。ワニ (*Caiman crocodylus*) のIgH鎖遺伝子群の構成は、種々の解析結果から染色体上に1つの遺伝子群として存在していることが示唆されている。しかし、カミツキガメ (*Chelydra serpentina*) IgH鎖遺伝子群は、サメのように染色体上に散在した構成をしていることが示唆されている。

## 6. 鳥類 (Avians)

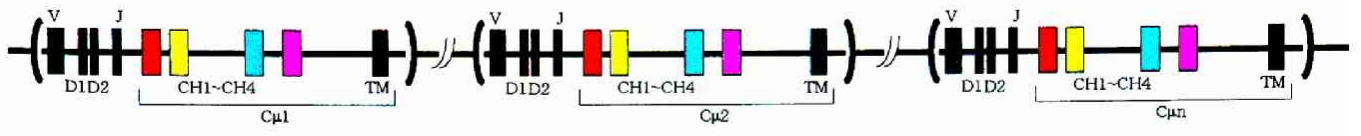
鳥類における抗体の多様性は、遺伝子変換という非常に特徴的な機構によって産生される。それに伴い、IgH鎖遺伝子群可変領域の構成も特徴的である。

ニワトリの抗体のアイソタイプはIgM、IgG、IgAの3種類が確認され、それぞれ哺乳類の抗体クラスと機能的に対応している。また、各々についてcDNAクローンが単離されている (Dahan et al., 1983; Parvari et al., 1988; Mansikka, 1992)。鳥類 (ニワトリ) では哺乳類と同様の広義のクラススイッチ現象が確認されている。現在のところ、IgH鎖定常部遺伝子群の構成は明らかにされておらず、クラススイッチの分子機構については未知である。

## 7. 哺乳類 (Mammallians)

IgH鎖定常部遺伝子群の構成についてはマウスの中の亜種間の系統分岐の解析から、亜種分岐後、非常に短い時間の進化の過程で、定常部遺伝子 (C $\gamma$ 2遺伝子) において頻繁に重複や欠失が起こっている証拠が得られている (Shimizu et al., 1982b; Huang et al., 1982)。他の哺乳類を調べても、保持する抗体のアイソタイプが種により異なることから、IgH鎖定常部遺伝子群は進化の過程で重複、欠失を繰り返してきたと考えられている。

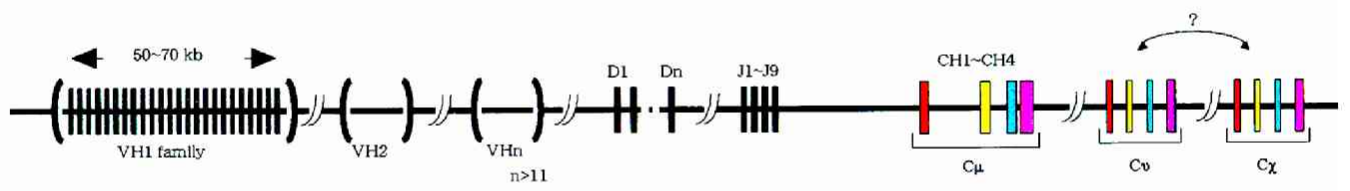
軟骨魚類 ( Shark : *Heterodontus francisci* )



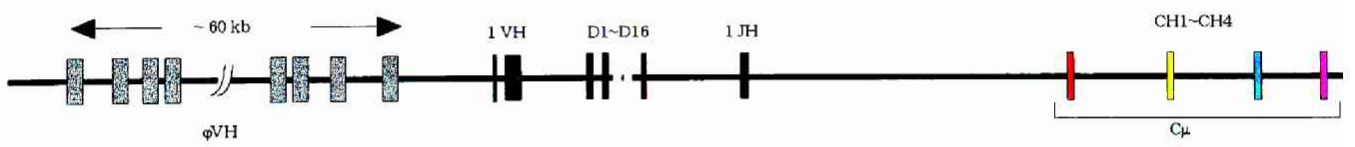
硬骨魚類 ( Channel catfish : *Ictalurus punctatus* )



両生類 ( Xenopus : *Xenopus laevis* )



鳥類 ( Chicken : *Gallus gallus* )



哺乳類 ( Mouse : *Mus musculus* )

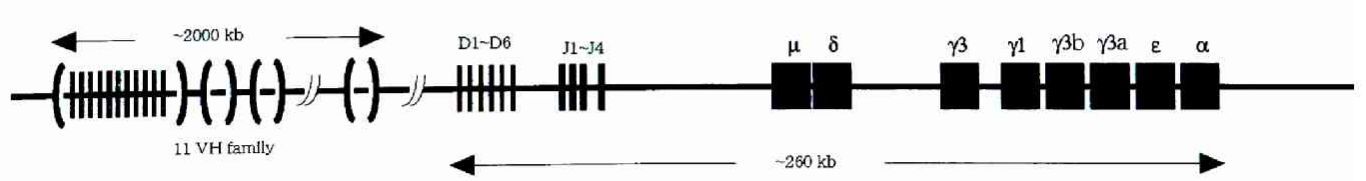


図5 脊椎動物免疫グロブリン重鎖遺伝子群の構成

多様性産生機構のちがいを反映して、抗体遺伝子座のゲノム構成は種によって大きく異なる。

### 3) ニワトリ特有の抗体の多様性産生機構

#### 1. ニワトリIgH鎖遺伝子群可変領域の構成

硬骨魚類、両生類、哺乳類の間では、IgH鎖遺伝子群、特に可変領域の構成が類似していることは先に述べたが、鳥類のIgH鎖遺伝子群可変領域はそれらと異なる、特徴的な構成をしている。

ニワトリのIgH鎖遺伝子座には、プロモーター領域、リーダー配列、組換えシグナル配列を持つ機能的なVH遺伝子が1個しか存在しない。JH断片も1個しか存在せず（DH断片は16個存在するが、互いに相同性が高い）、VDJ組換えによって産生される多様性は極めて限られている（Reynaud et al., 1989）（図6）。この機能的なVH遺伝子の上流には60~80kbにわたって80~100個の偽遺伝子断片群が存在する。ほとんどの偽遺伝子断片は3'端にD断片様の配列をもちV-Dの融合した形をしている。これらの偽遺伝子断片の上流にはプロモーター領域、リーダー配列がなく、組換えシグナル配列も存在しない。

IgL（ $\lambda$ ）鎖遺伝子群にも、機能的なV $\lambda$ 遺伝子、J $\lambda$ 断片は1個ずつしか存在せず、機能的なV $\lambda$ 遺伝子の上流に19kbに及ぶ、26個の偽遺伝子断片からなる領域が存在する（Reynaud et al., 1985; 1987; Kondo et al., 1993）。

#### 2. B細胞分化と抗体の多様性産生機構

ニワトリB細胞分化の器官、抗体の多様性産生機構は哺乳類と異なる。ニワトリB細胞前駆体のVDJ組換えは、胚発生初期に卵黄嚢、血液、骨髄、脾臓などの組織で検出され（Reynaud et al., 1992）、その時期は胚発生時期に限られる。マウスで骨髄においてVDJ組換えが個体が生存する間継続しているのとは対照的である。マウスにおいてVDJ組換えの順序が厳密に制御されているのと異なり、ニワトリではH鎖、L鎖の組換えの順序はランダムである（Benatar et al., 1992）。胚発生8-14日の間、ファブリキウス嚢が形成されて間もなく、およそ1万~3万個のB細胞前駆体がファブリキウス嚢の各濾胞に定着する。ニワトリではファブリキウス嚢が抗体遺伝子の多様性産生の器官である。初期胚の段階で手術によってこれを摘出すると、抗体遺伝子の多様性産生がなくなる。

ファブリキウス嚢で増殖を開始したB細胞では、組換えを完了したVH<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>断片、V $\lambda$ J $\lambda$ 断片に塩基置換が蓄積されていく（Reynaud et al., 1985; 1987; 1989; Thompson

and Neiman, 1987)。これは偽遺伝子からの遺伝子変換によるものである(図6)。ニワトリ抗体遺伝子の遺伝子変換については、同一の染色体上での*cis*の遺伝子情報の伝達反応であること(Carlson et al., 1990)、伝達される遺伝子の長さは10bpのものから200bp以上になるものまで存在すること(McCormack and Thompson, 1990)などの知見があるが、その分子機構は全く未知である。筆者のグループは、ファブリキウス嚢より単離した環状DNAのなかに、この遺伝子変換の中間体と考えられるものを確認している(Kondo et al., 1993)。このような遺伝子変換機構は他の複数の鳥類で確認され(McCormack et al., 1989)、哺乳類のウサギにおいても確認されている。

遺伝子変換による抗体遺伝子の多様化は、ファブリキウス嚢のみでなく脾臓胚中心においても継続している(Arakawa et al., 1996)。この機構がファブリキウス嚢におけるB細胞の一次レパートリー産生にだけでなく、末梢免疫組織におけるポストファブリキウス嚢B細胞の産生する抗体の親和性成熟にも貢献していることが示唆されている。



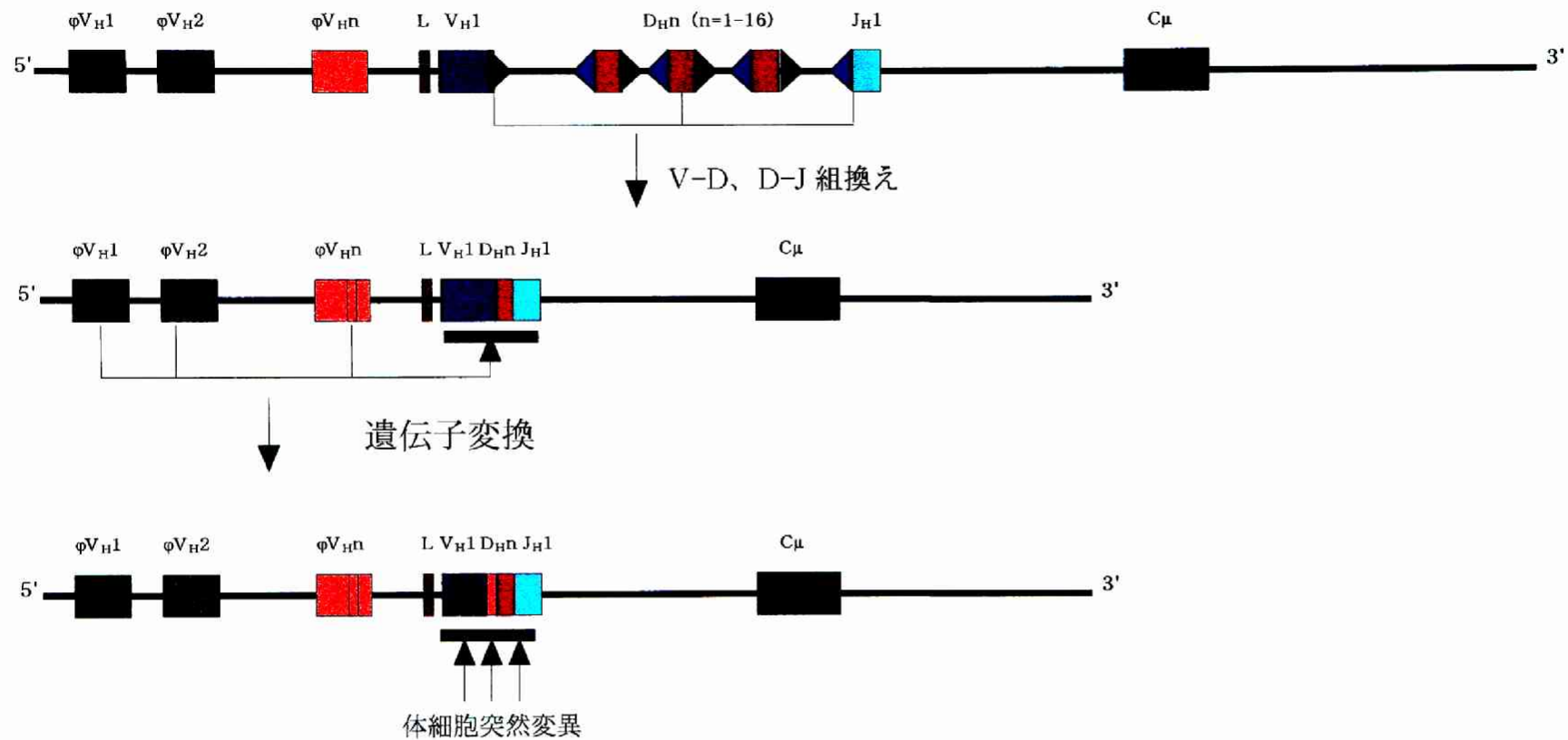


図6 鳥類(ニワトリ)の抗体遺伝子多様性産生機構

ニワトリでは組換え可能なV断片、J断片はひとつずつしかなく、組換えではほとんど多様性を生じない。しかし、B細胞発生の過程で、組換えを終えた抗体遺伝子には塩基置換が蓄積していく。これは、偽遺伝子ドナーからの遺伝子変換によることが明らかにされている。

#### 4) 本研究の意義

鳥類を抗原刺激すると、最初IgMタイプの抗体が産生されるが、後にIgMに代わってIgGまたはIgAタイプの抗体が産生されるようになる。このような明確な広義のクラススイッチ現象が観察されるのは哺乳類のほかに鳥類しかない。

鳥類では、抗体遺伝子可変領域において遺伝子変換という鳥類特有の分子機構を用いて抗体の多様性産生を行っている。その可変領域の構成も両生類、哺乳類と大きく異なることから、鳥類が両生類、哺乳類から分岐した後、進化していく過程で抗体遺伝子群において激しい変化があったことが想像される。当然その結果、定常領域も変化を受け、可変領域と同様に哺乳類のものとは異なった構成をしていることも考えられた。

哺乳類では繰り返し配列よりなるS領域を介したクラススイッチ遺伝子組換えによって抗体のクラススイッチを行っている。鳥類では抗体のクラスを切り換えるための分子機構は未知であり、その遺伝子群の構成によってはまったく異なる機構を用いていることも期待された。

筆者は哺乳類以外でクラススイッチ現象が見られる鳥類のうちでも最も免疫学的解析の進んでいるニワトリを材料として選び、抗体のクラススイッチ機構について解析を試みた。まず、ニワトリIgH鎖定常部遺伝子群の構成、特に可変領域から $\mu$ 鎖定常部遺伝子までの領域の構成について詳しく解析した。そして、抗原刺激したニワトリの脾臓ゲノムDNAから、クラススイッチ遺伝子組換えによって生じた産物を検出したので報告する。

## 材料と方法

### 1) ニワトリ

ニワトリは筑波家畜衛生研究所で飼育された白色レグホン近交系V系統 (H-B15) を用いた。

### 2) ゲノムライブラリーの作製とスクリーニング

ニワトリ肝臓組織より高分子DNAを精製し、制限酵素*Sau3A* IIによって部分分解した。15~20kbの断片をゲル電気泳動により分離精製し、*Bam*H Iにより消化されたファージベクターEMBL3 (Stratagene, La Jolla, CA) ヘライゲーションにより組み込んだ。*in vitro*パッケージングにはMaxPlax™ (Epicentre Technologies, Madison, CA) を利用した。ニワトリIgM鎖のcDNAは、SC系統のニワトリB細胞由来の細胞株、DT-40

(Baba et al., 1985) の全RNAからのRT-PCRによって調製されたものを用いた (清水章博士より供与を受けた)。CH3-CH4領域 (5'-

AGTGGATCCGTCGTGCAGCAGGACAT-3' と 5'-

ATCGAATTCACCCGAAGCCCTATCCA-3')、CH1-CH2領域 (5'-

GGAATTCCAACAACAGTTCCGTTT-3' と 5'-GGGATCCGCACTCCATCCTCTTGC-

3') を増幅するPCRプライマーはEMBL/Genbank/DBJのデータベース (アクセション番号: X01613) にある塩基配列に基づき制限酵素認識部位を付加して合成した。PCR増幅断片は*Eco*R Iと*Bam*H Iで消化し、プラスミドベクターpBluescript (KS) へクローニングし、塩基配列を確認した。CH3-CH4領域のクローン (C $\mu$ -D) は*Eco*R Iと*Bam*H I

で、CH1-CH2領域のクローン (C $\mu$ -U) は*Eco*R Iと*Sac* IIで切り出し、インサートをプローブとして使用した。

DJ-6はパーゼル免疫研究所のReynaudより供与を受けた (Reynaud et al., 1989)。

C $\alpha$ 定常部領域のプローブは、ツルク大学のMansikkaより供与を受けたcDNAクローンA1 (Mansikka, 1992) をもとに作製した。CH1-CH2領域を増幅するためのPCRプライ

マーCA1 (5'-AGTGGATCCGCTCCGCCAGCCGCCC-3') とCA3 (5'-

ATCGAATTCGCTGACGGTGGCGGTGA-3') は、EMBL/Genbank/DBJデータベー

ス（アクセッション番号：S40610）にある塩基配列に基づき制限酵素認識部位を付加して合成した。PCR増幅断片は制限酵素*EcoR*Iと*Bam*H Iとによって消化し、プラスミドベクターpBluescript (KS) にクローニングし、塩基配列を確認した。これをさらに*EcoR*Iと*Kpn*Iによって消化して、得られた457bpのDNA断片をプローブとして用いた。C $\gamma$ 定常部領域のプローブについては、Weissmann Institute of ScienceのParvariより供与を受けたcDNAクローンHC36 (Parvari et al., 1988) をもとに作製した。CHI領域内を増幅するPCRプライマーCG1 (5'-AGTGGATCCGATTGTACCCTCTATCC-3') とCG2 (5'-ATCGAATTCCTTGAACGTGATCCTCC-3') はEMBL/Genbank/DDBJデータベース（アクセッション番号：GGIGGH1）にある塩基配列に基づき制限酵素認識部位を付加して合成した。PCR増幅断片を制限酵素*EcoR*Iと*Bam*H Iとによって消化し、プラスミドベクターpBluescript (KS) にクローニングし、塩基配列を確認した。これをさらに*EcoR*Iと*Bam*H Iによって切り出したインサート（585bp）をプローブとして用いた。また、これらのプローブは[ $\alpha$ <sup>32</sup>P] dCTP (Amersham, Japan) で標識した。

### 3) ハイブリダイゼーション

10-300ngのDNAを制限酵素で消化し、0.5-0.7%のアガロースゲルに電気泳動した。これをナイロンメンブレンHybond<sup>TM</sup>-N+ (Amersham, Japan) にプロットし、プローブDJ-6、C $\mu$ -D、C $\mu$ -U、マウスS $\mu$  (pCS13の*Bam*H I断片) (Iwasato et al., 1990)、マウスS $\alpha$  (pCS16の*Xba*I断片) (Arakawa et al., 1993) でハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションは1M NaClで65℃でおこない、洗浄はDJ-6、C $\mu$ -D、C $\mu$ -U、pE13-D、pE13-CA'の場合は、0.1xSSC (1xSSCとは0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム)、0.1%SDSの条件下で65℃30分を2回、マウスS $\alpha$ 、S $\mu$ の場合、1xSSC、0.1%SDSの条件下で55℃30分を2回おこなった。オートラジオグラムはBAS2000 BioImage Analyzer (Fuji Film, Tokyo, Japan) によって解析した。

### 4) 塩基配列決定とその解析

PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer, Japan) による蛍光



ターミネイターサイクルシーケンス法で、autosequencer model 373A (Perkin Elmer, Japan) を用いて塩基配列を決定した。鋳型DNA内での2次構造は10%DMSO試薬を加えることで解消させた。転写因子結合部位の検索ソフトウェアには Genetyx-Mac ver.8.0 を、ホモロジープロット解析ソフトウェアにはDNASIS-Mac ver.2.4 を用いた。

#### 5) PCR法による高GC含量のニワトリS $\mu$ 領域の増幅

5.5kbに及ぶGC含量の高い繰り返し配列からなるニワトリS $\mu$ 領域のPCR反応による増幅には耐熱性 DNA polymerase、KOD-DASH (TOYOBO, Japan) を用いた。PCRプライマーuS $\mu$ 1 (5'-ACGAATTCGCACTAATTAGCGGGG-3')、uC $\mu$ 1-2 (5'-ACGGATCCGGAACGGAAGTGTGTTGG-3') は今回決定した塩基配列に基づき、またuC $\gamma$ 1-1 (5'-CGAGTCGGAACAACAGGCGG-3') はEMBL/Genbank/DDBJデータベース (アクセッション番号: GGIGGH1) の塩基配列に基づき合成した。PCR反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler (TP-2000) を用い、精製したゲノムDNA150ngを鋳型に総反応量50 $\mu$ lの系で、変成95 $^{\circ}$ C30秒、アニーリング58 $^{\circ}$ C10秒、伸長72 $^{\circ}$ C3分の反応を35サイクル行った。増幅産物のうち5 $\mu$ lを0.8~1%アガロースゲルに泳動したのち、ナイロンメンブレンHybond<sup>TM</sup>-N+ (Amersham, Japan) にプロットングし、pE13-DまたはpE13-CA' (pE13-DとpE13-CA'については図11を参照) のインサートをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、増幅断片を検出した。

## 結果

### 1) ニワトリ抗体重鎖遺伝子の構成

ニワトリ肝臓組織より抽出したゲノムDNAを用いて、制限酵素Sau3A Iによる部分分解ゲノムDNAライブラリーを作製し、 $10^6$ のファージクローンをニワトリIgH鎖定常部領域 $\mu$ 鎖 (C $\mu$ -D、C $\mu$ -U)、 $\alpha$ 鎖 (C $\alpha$ )、 $\gamma$ 鎖 (C $\gamma$ ) のcDNAプローブ、可変領域D、J断片を含むゲノムDNAプローブ (DJ-6) とによってスクリーニングした。その結果、C $\mu$ Dプローブにより13個、C $\mu$ Uプローブにより1個、C $\alpha$ プローブにより22個、DJ-6プローブにより1個のゲノムクローンを単離することができた。C $\gamma$ プローブによってはゲノムクローンを単離することができなかった。

C $\gamma$ プローブによってゲノムクローンを単離することができなかった理由は明らかではないが、1つの理由として考えられるのは、cDNAの塩基配列の情報から各定常部エキソン上に存在するSau3A I 認識部位の数が $\mu$ 鎖には1個、 $\alpha$ 鎖には1個なのに対し、 $\gamma$ 鎖には7個あるということがある。つまり $\gamma$ 鎖定常部領域には $\mu$ 鎖、 $\alpha$ 鎖に比べて多くのSau3A I 認識部位が存在するため、部分分解の時、ゲノムDNAが小さく分断されすぎてうまくクローニングされていないことが原因ではないかと考えている。今後、部分分解の条件を変える、クローニングに使う制限酵素を変える等の対策を考えている。

クローンC $\mu$ J-1 (DJ-6プローブにより単離された)、クローンC $\mu$ U-1 (C $\mu$ -Uにより単離された)、クローンC $\mu$ D-6、C $\mu$ D-12 (C $\mu$ -Dプローブにより単離された)、およびゲノムクローンDJ-6 (プローブとしても用いた) を用いて、IgH鎖遺伝子可変領域DH、JH断片から $\mu$ 鎖定常部遺伝子の分泌型 $\mu$ 鎖タンパクのC末端をコードするエキソン (CH4+Ctermエキソン) の3'端までの制限酵素地図を作成した (図7)。cDNAの塩基配列からCH1エキソンにはPmaC I、CH2エキソンにはPmaC IとSac II、CH3エキソンにはNco I、CH4+CtermエキソンにはNco I、Not Iの認識部位が確認されている。これらはゲノムDNA上には稀にしか存在しない制限酵素認識部位であり、これを目印に $\mu$ 鎖定常部遺伝子の各エキソンの位置を決定した。その結果、CH1エキソンとCH2エキソン、CH2エキソンとCH3エキソン、CH3エキソンとCH4+Ctermエキソンの間のイントロンの長さはそれぞれ4.3kb、4.0kb、3.2kbであった。また、JH断片とCH1エキソンの間のイントロンの長さは約10.8kbであった。

C $\alpha$ プローブにより単離されたクローン、C $\alpha$ -5、C $\alpha$ -6、C $\alpha$ -9、C $\alpha$ -13を用いて、 $\alpha$ 鎖定常部遺伝子のCH1エキソンの5'側からCH3エキソンの3'側までの簡単な制限酵素地図を作成した(図8)。CH1、CH3エキソンの位置は、CH1エキソンは*Kpn*I、CH3エキソンは*Not*Iといった制限酵素の認識部位から決定した。その結果、CH1エキソンとCH3エキソンの間のイントロンの長さは約10kbであった。

これらのイントロンの長さについて他の脊椎動物のIgH鎖定常部のイントロンと比較した(図9)。図より明らかのように、ニワトリのIgH鎖定常部のイントロンは他に比べて有意に長かった。この結果はIgH鎖定常部遺伝子群の進化を考える上で興味深いが、その生物学的意義については今のところ明らかではない。

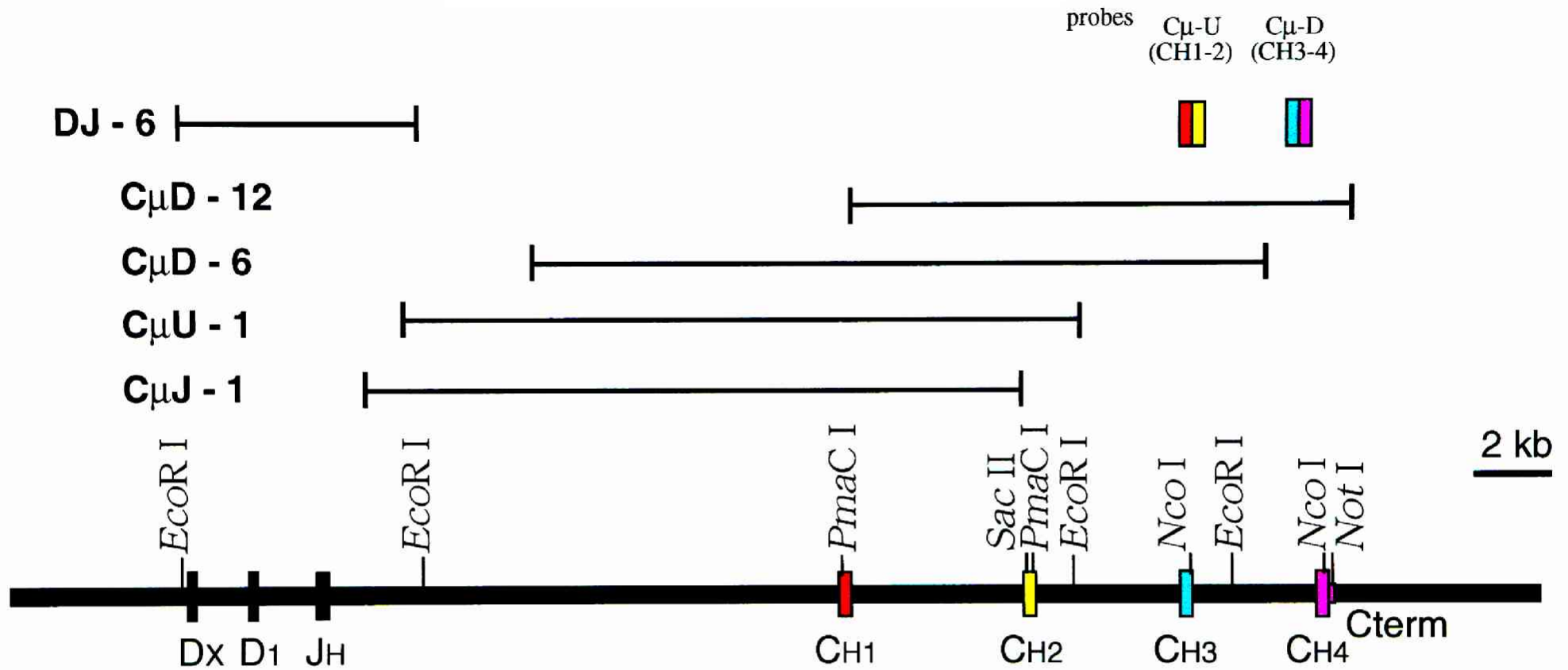


図7 ニワトリ抗体重 (IgH) 鎖遺伝子座の可変領域と $\mu$ 鎖定常領域のゲノム構造

ニワトリ肝臓ゲノムDNA *Sau3AI*部分分解ライブラリーをDJ-6ゲノムDNAプローブおよびC $\mu$ -U (CH1-CH2領域)、C $\mu$ -D (CH3-CH4領域) cDNAプローブでスクリーニングし、単離したファージクローンのうち4つを用いてゲノムマップを作成した。以前クローニングされていたDJ-6と併せて、J-Cイントロンをカバーすることができる。定常部エキソン上の制限酵素の認識部位から $\mu$ 鎖定常部領域の4つのエキソンの位置を同定した。

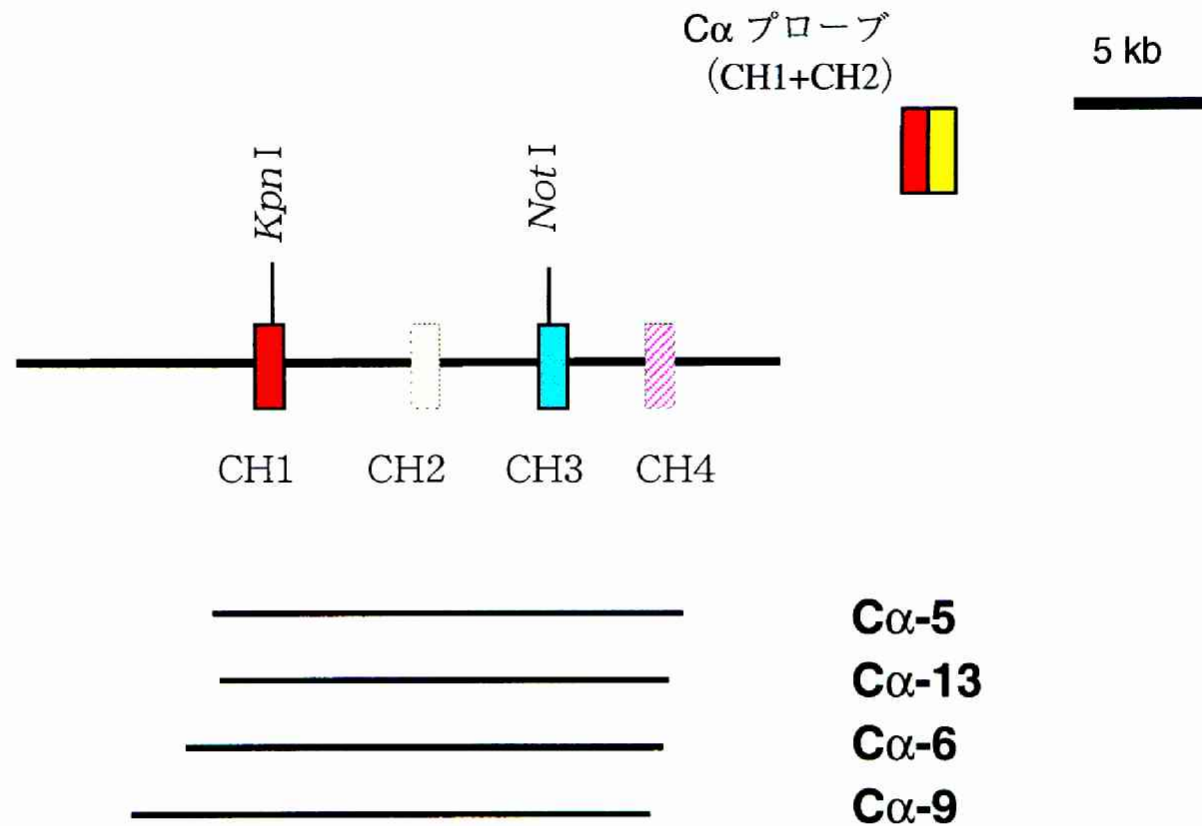


図8 ニワトリIgH鎖遺伝子座 $\alpha$ 鎖定常部領域のゲノム構造

ニワトリ肝臓ゲノムDNA *Sau3A* I部分分解ライブラリーをC $\alpha$  (CH1-CH2) cDNAプローブでスクリーニングし、単離したクローンを用いてゲノムマップを作成した。図に示した制限酵素の認識部位から、CH1とCH3の間は約10kbであった。

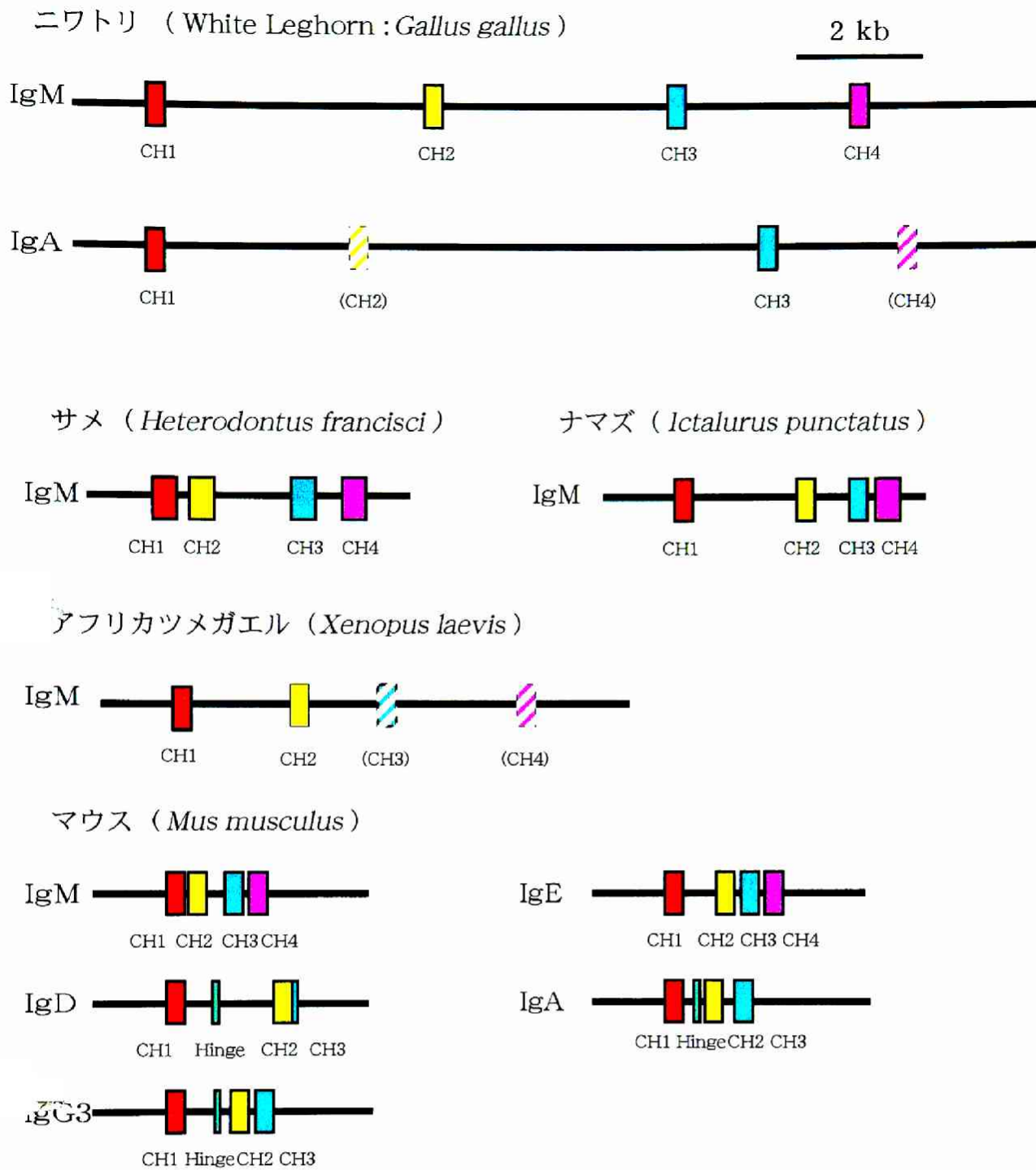


図9 脊椎動物の抗体定常部領域の構造

現在までに報告のある抗体重鎖定常部遺伝子の構造を比較した。ニワトリの定常部各エキソン間のイントロンは他の脊椎動物と比べて有意に長いことがわかる。



## 2) 哺乳類S領域と相同性のある領域（ニワトリS $\mu$ 領域）の存在

マウスでは、抗体のクラススイッチは、IgH鎖遺伝子定常領域においてクラススイッチ遺伝子組換えによる。 $\delta$ 鎖を除くすべてのクラスの定常部遺伝子上流のイントロンにスイッチ組換えを司るスイッチ（S）領域が存在している（Shimizu et al., 1982a）。このS領域はGC含量の高い繰り返し配列で構成されている。そこで今回単離した図7の4つのファージクローン、C $\mu$ J-1、C $\mu$ U-1、C $\mu$ D-6、C $\mu$ D-12の中にマウスS領域と相同性のある配列が存在するかどうか調べた（図10）。

まず、プローブとして用いたマウスS $\mu$ 領域とマウスS $\alpha$ 領域との間で緩やかな条件でサザンハイブリダイゼーションを行った。今回用いた2つのプローブは相互に相同性のあることがその塩基配列から判明しているが、Bio Imaging Plateへの照射時間は1分と非常に短いにも関わらず、互いに非常に強いシグナルを検出することができた（図10A）。

マウスS $\mu$ 、S $\alpha$ 領域をプローブとして、図7の4つのファージクローンに対するサザンハイブリダイゼーションを行い、図7で示された領域のなかに、マウスS領域と相同性のある領域が存在するかどうかについて調べた。図10Bで見られるように、C $\mu$ J-1、C $\mu$ U-1、C $\mu$ D-6の3クローンから弱く（Bio Imaging Plateへの照射時間も2時間）ではあるがシグナルを得ることができた。この結果は、今回クローニングした領域のなかにマウスS領域と相同性のある領域が存在することを意味している。今後、この存在が確認されたマウスS領域と相同性のある領域をニワトリS $\mu$ 領域と呼ぶこととする。

次に、ニワトリS $\mu$ 領域の存在する位置についてであるが、図10Bで他の3クローンと違い、C $\mu$ D-12からはシグナルを得ることができなかったことから、ニワトリS $\mu$ 領域は、図7の遺伝子地図から考えて、 $\mu$ 鎖定常部遺伝子CH1エキソンとCH2エキソンの間のイントロンより上流に存在することが明らかになった。

このニワトリS $\mu$ 領域とマウスS領域との相同性については、図10BのBio Imaging Plateへの照射時間が図10Aの時の120倍要したことから、ニワトリS $\mu$ 領域とマウスS領域との相同性は、マウスS $\mu$ 、S $\alpha$ 領域相互の相同性と比べ相当低いことがわかる。また、図10Bのハイブリダイゼーションの結果を見てわかるように、マウスS $\mu$ 領域のプローブよりマウスS $\alpha$ 領域のプローブを使った時に強いシグナルを得ることができることから、ニワトリS $\mu$ 領域はマウスS $\mu$ 領域よりマウスS $\alpha$ 領域との相同性の方が高いことも

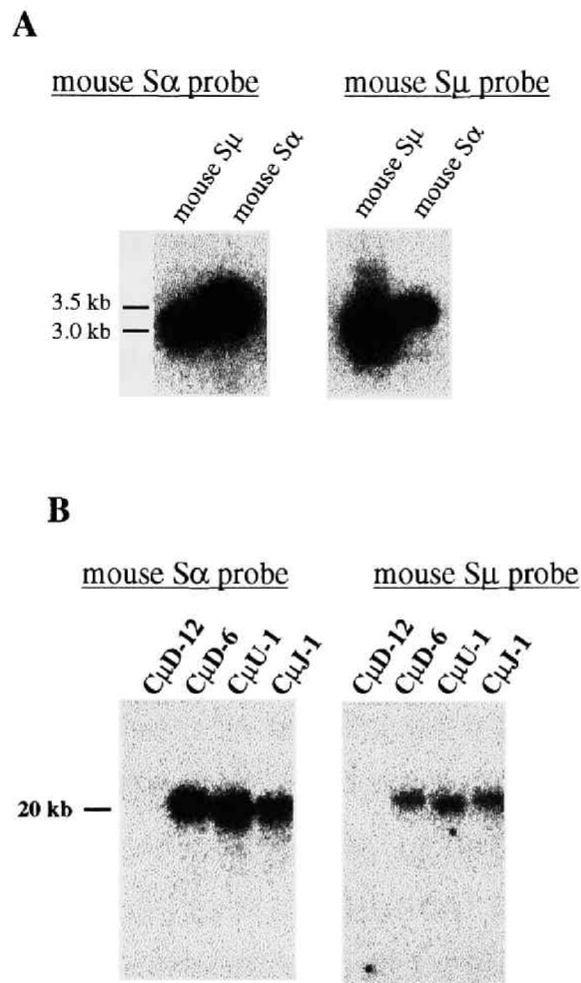


図10 マウススイッチ領域をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション

A. マウスS $\alpha$ 、S $\mu$ 領域プラスミドクローンを<sup>32</sup>Pで標識した。プローブとして用いたマウスS $\alpha$ 、S $\mu$ 領域は互いに強くクロスハイブリダイズした。

B. ニワトリJ-Cイントロン、C $\mu$ 領域ファージクローンのマウススイッチ領域との相同性を検証した。C $\mu$ D-6、C $\mu$ U-1、C $\mu$ J-1はマウスS $\alpha$ 、S $\mu$ いずれのプローブともクロスハイブリダイズした。マウスS $\alpha$ プローブはS $\mu$ プローブと比べより強くハイブリダイズしたため、以降の実験ではマウスS $\alpha$ プローブを用いた。

### 3) ニワトリS $\mu$ 領域を含むクローンC $\mu$ U-1の13.5kbのEcoRI断片のプラスミドベクターへのサブクローニングとクローニング時の欠失

ニワトリS $\mu$ 領域の詳しい位置とその塩基配列を決定するために、ニワトリS $\mu$ 領域を含むクローンC $\mu$ U-1を制限酵素 *EcoRI* で消化し、13.5kbのDNA断片をプラスミドベクターpBluescript (KS) にサブクローニングした。クローニングする際、独立した9個のクローンのプラスミドDNAを抽出してインサートの長さを調べたが、同一の長さをもつクローンは存在しなかった。インサート内で欠失が起こっていると考え、これらのうち最も長く、目的の長さのインサートを持つクローンを以下、pE13-Aとして用いた。

このpE13-Aを用いて、詳細な遺伝子地図を作成し、サブクローンpE13-B~Eを作成した(図11)。pE13-B~Eのクローニングの際も、pE13-Aのクローニングのときと同様に、それぞれについて複数クローンのプラスミドDNAを単離し、そのインサートの長さを調べた。pE13-D (1.1kb)、pE13-E (4.5kb) についてはすべてまったく同じ長さのインサートを含むものであった。しかし、pE13-B (9.0kb)、pE13-C (7.0kb) については中に目的のものより短いインサートを持つものが存在した。これもクローニングの際のインサートの中での欠失によるものと考えられたので、それぞれについて最も長い、目的の長さのインサートをもつクローンを以下、pE13-B、pE13-Cとして用いた。

pE13-Cをさらにサブクローニングし、pE13-CA' (2.5kb、CH1エクソン、CH2エクソン双方に認識部位が存在する制限酵素 *PmaCI* で消化しCH1エクソンとCH2エクソンの間のイントロンを除いたもの)、pE13-CB (4.5kb、pE13-CA'作成の際 *PmaCI* により切り出される断片)、pE13-CC (0.5kb、*SacII* と *EcoRI* とにより切り出される0.5kbの断片) として作成した。これらについてもそれぞれ複数のクローンのプラスミドDNAを抽出して、そのインサートの長さを調べたところ、pE13-CBとpE13-CCはすべて同じ長さのインサートを含むものであったが、pE13-CA'は一部のクローンに欠失が見られた。これについても最も長い、目的の長さのインサートをもつものを以下、pE13-CA'として用いた。

pE13-B (9.0kb) についても、制限酵素 *XbaI* と *SpeI* によって0.9kbの断片を切り出し、pE13-BB (0.9kb) としてサブクローニングした。これらについてもそれぞれ複数のクローンのプラスミドDNAを抽出して、そのインサートの長さを調べたが、すべて同じ長さのインサートを持っていた。

pE13-E (4.5kb) についてもさらにサブクローニングを行った。*KpnI* で消化した後

セルフライゲーションを行いpE13-EA (3.0kb) としてクローニングした。このpE13-EAについても複数のクローンのプラスミドDNAを抽出して、そのインサートの長さについて調べたが、すべて同じ長さであり、欠失のあるクローンは存在しなかった。

pE13-EAの *Kpn*I 側からの塩基配列を決定し、図 1 1 に示すようなPCR用プライマー uS $\mu$ 3 (5'-ACGAATTCATGAAGGTCAATGAAGGGGG-3') を作成した。pE13-Eを鑄型にして、uS $\mu$ 3とM13R (ベクターpBluescript(KS)のMCS [Multi Cloning site] の外側に存在して、MCS方向へのプライマー。5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') のプライマーのセットで増幅された断片をpGEM-Tベクター (Promega, Japan) にクローニングし、これをpE13-EB (1.8kb) とした。このpE13-EBについても複数のクローンのプラスミドDNAを抽出して、そのインサートの長さについて調べたが、すべて同じ長さであり、欠失のあるクローンは存在しなかった。

まとめると、pE13-A、B、C、CA'がインサート内で欠失を起こすクローンであった。また、pE13-CB、pE13-CC、pE13-E、pE13-D、pE13-BBがインサート内で欠失を起こさないクローンであることから、*Spe*I (2) 認識部位と*Pma*CI (1) 認識部位の間の領域において主に欠失が起こっていることが予想された (図 1 1 の青色で示した領域)。

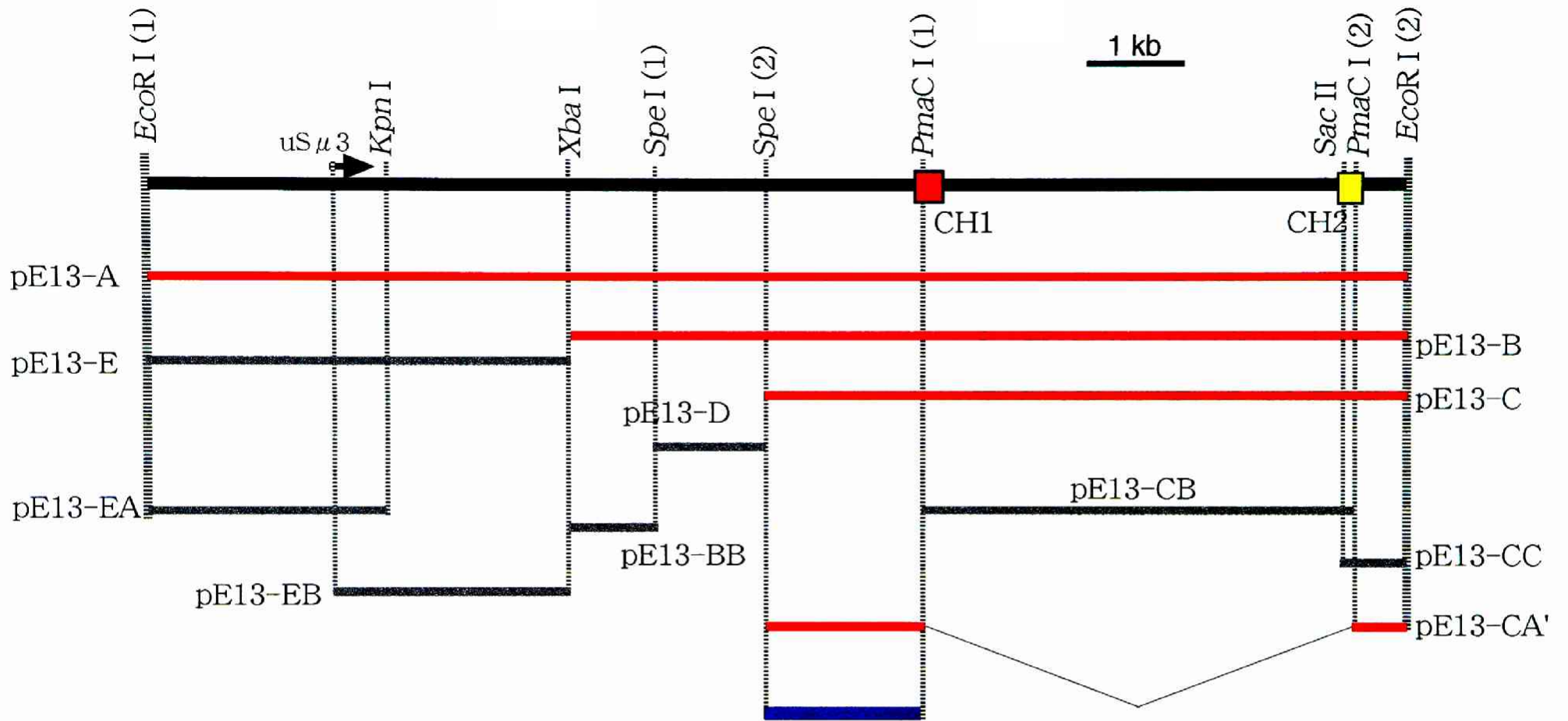


図11 CμU-1クローンのEcoRI断片のサブクローニング

マウスS領域とクロスハイブリダイズしたクローンCμU-1より図のようにプラスミドベクターへのサブクローニングを行った。クローニング時にインサート内で欠失が見られるクローンは朱色、欠失の見られないクローンは灰色で表示した。青色で示した領域で主に欠失が起こることが予想された。矢印はPCRプライマーuSμ3を示す。

#### 4) ニワトリS $\mu$ 領域の位置

図11で示したサブクローンpE13-A、B、C、D、Eをクローニング時に使用した制限酵素で切断し、2)で行ったのと同様の条件でマウスS $\alpha$ 領域とのサザンハイブリダイゼーションを行った(図12の左の写真)。pE13-A、pE13-B、pE13-Cのインサートからは強いシグナルが得られた。pE13-Dのインサートからはそれらに比べて弱いシグナルが得られた。しかしpE13-Eのインサートからはシグナルが得られなかった。

次に、pE13-Cのインサートを制限酵素*PmaCI*で消化したところ、1.5kbの断片からのみ強いシグナルが得られた(図12の左の写真の右端のレーン)。これらの結果から、ニワトリS $\mu$ 領域は制限酵素*XbaI*認識部位と*PmaCI*(1)認識部位の間の領域に存在し(図12の右の制限酵素地図で太い赤線で示した領域)、特に*SpeI*(2)認識部位と*PmaCI*(1)認識部位の間の領域にマウスS領域と相同性の高い領域が存在することが明らかになった。



probe : mouse  $S\alpha$

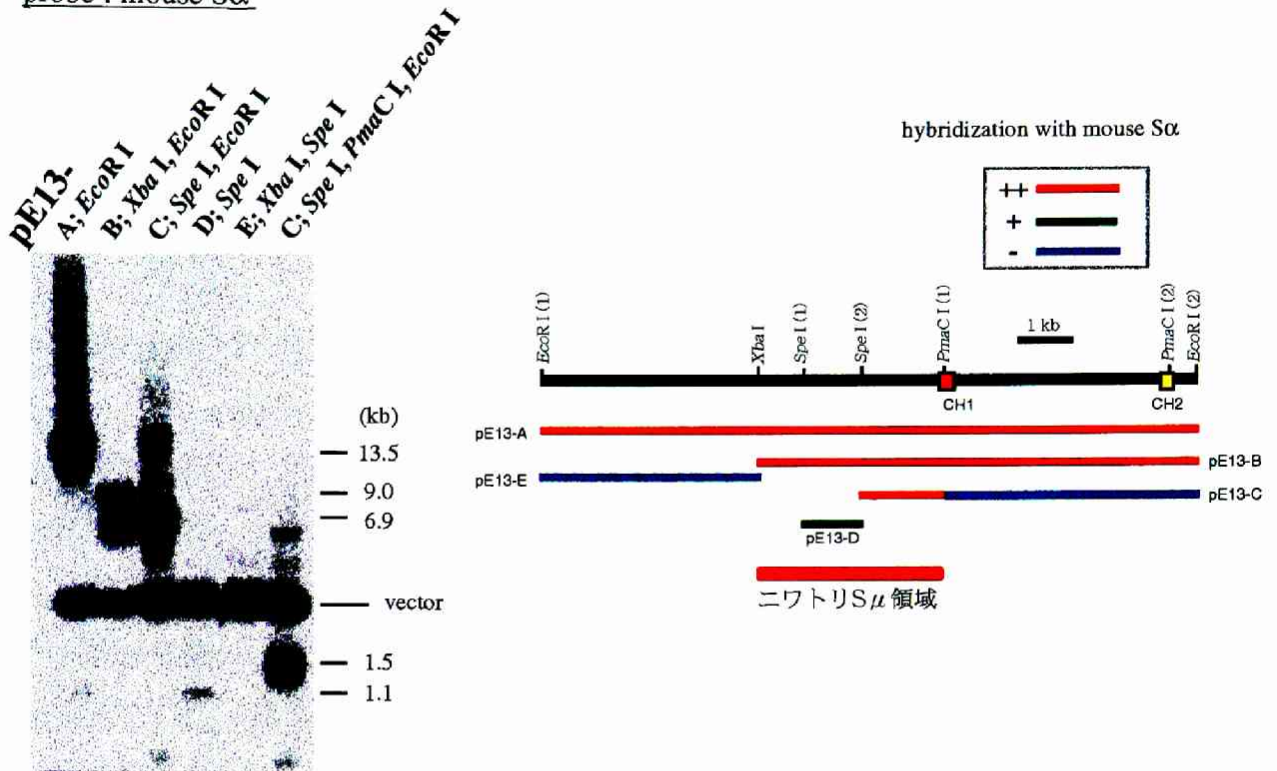


図 1 2 マウス $S\alpha$ 領域をプローブに用いたニワトリスイッチ領域のスクリーニング

ファージクローン $C\mu$ U-1はマウス $S$ 領域と相同性をもつ領域を含んでいた。 $C\mu$ U-1を制限酵素で切断し、プラスミドにサブクローニングし作成した5つのクローンpE13-A、B、C、D、Eをマウス $S\alpha$ プローブでハイブリダイゼーションを行った。

それぞれのプラスミドをサブクローニングの際に用いた制限酵素で切断した。pE13-CはCH1に存在するPmaCI部位でも切断された。プローブ陽性なDNA断片はpE13-A、B、D、及びCの1.5 kb Spe I(2)-PmaCI(1)断片、プローブ陰性なDNA断片はpE13-E、pE13-Cの5.0 kb PmaCI(1)-PmaCI(2)-EcoRI(2)断片であった。マウス $S\alpha$ と相同性をもつ領域は、XbaI-PmaCI(1) 3.5kb断片に絞られた。

## 5) *Spe*I (2) 認識部位と*Pma*CI (1) 認識部位の間の領域の塩基配列

図12の結果から、*Spe*I (2) 認識部位と*Pma*CI (1) 認識部位の間にマウスS $\alpha$ 領域と相同性の高い領域が存在することが示された。この領域は3)の結果から、クローニング時に欠失の起こりやすい領域であったので、pE13-Cは独立してクローニングした3つのクローンを用いて*Spe*I (2) 認識部位からそれぞれ約500bpの塩基配列を決定した。これらの塩基配列はすべて同一であった。そしてその塩基配列はCCCAGとTACAGという2つの5塩基対の基本単位配列が5bp毎に並ぶ繰り返し配列であった (Kitao et al., 1996)。

この領域は繰り返し配列であることからプライマー歩行法による塩基配列決定ができなかった。そこで、pE13-CA'を用いて*Spe*I (2) 認識部位から欠失クローンを作成し、全体の塩基配列を決定した。欠失クローンを作成するとき、インサート内での欠失が心配されたが、欠失クロンのインサートの長さを正確に測り、また欠失クローンを多数単離することで解決した。

また $\mu$ 鎖定常部のCH1エキソンのすぐ上流では上流、下流どちらからもシーケンス反応が阻害された (図13の $\uparrow$ )。ここにはC塩基の7つ並ぶ配列があり、これに起因すると考えられた。DNAの2次構造を解消する働きのある試薬であるDMSOをシーケンス反応液に加えるなどの工夫では反応は回復しなかった。欠失クローンを多数単離して反応の止まる領域のごく近傍まで欠失したクローンを選び、なおかつシーケンス反応時の鑄型の量を増やしてシグナルを強くすることでこの領域の塩基配列を決定し、全塩基配列をつなげることに成功した。

*Spe*I (2) 認識部位から*Pma*CI (1) 認識部位までの距離は1533bpであり、上記の5塩基対の基本単位配列の繰り返し配列は*Spe*I (2) 認識部位から1345bpに及んでいた (図13)。



## 6) *Xba*I 認識部位と *Spe*I (2) 認識部位の間の領域の塩基配列

pE13-Dの1.1kbの断片に、3'端の *Spe*I (2) 認識部位のすぐ上流域にシーケンス反応が阻害される領域が存在した (図14の↑)。このシーケンス反応はDMSOを反応液に加えることで回復した。pE13-Dが2次構造を形成することがシーケンス反応を阻害する原因であると考え、パリンδροーム配列を検索したところ、矢印の14bp上流からの CCAGCCC と38bp上流からの GGGCTGG という配列が存在することを確認した (図14の緑色の部分)。

シーケンス反応の効率の低さを克服して、pE13-Dの全塩基配列を決定した。全体で1134bpであった。また、pE13-BよりサブクローニングしたpE13-BBの0.9kbの全塩基配列も決定した。全体で917bpであった。この2つのクローンの連結は、pE13-Bのクローンの欠失クローンを作成し、一部塩基配列を決定することで確認した。*Xba*I 認識部位と *Spe*I (2) 認識部位の間の領域全体で2045bpであった。

この領域は、図13で明らかになった2つの5塩基対の基本単位配列と似ているが異なる、ACCAG と TAT(A/G)G という5塩基対の基本単位配列が並ぶ繰り返し配列であった (図14)。



TCTAGA [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGGT CGCCTGGAGC TGTACTGGTG CCAGTACCTG TATCC [REDACTED]  
 TATAA [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATAGGGGG CGCCGGGAGC TGTACTGGTT TGTACTGGTG  
 CCAGT [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGTGCA CTGGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGGGT CGCCTGAAGC  
 TGTACTGGTG CCGGT [REDACTED] TATCC [REDACTED] TACGGACCAT TATCC [REDACTED] TACGGAGGGG TTGCCGGGAG  
 CTGTACTGGT GCTGGT [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGTGC ACTGGG [REDACTED] TATCC [REDACTED]  
 TATCCACCC GTATCCGGGG GTTACCGGA GCTGTACTGG TTCTTACTGG TGCTGGG [REDACTED] TATCC [REDACTED]  
 TATCC [REDACTED] TATCCGGG GGTTACCGGG AGCTGTACTG GTTCTTACTG GTGCTGGG [REDACTED] TATAA [REDACTED]  
 TATCC [REDACTED] TATCCGGT GCACTGGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TCCGG [REDACTED] TATCCGG GGGCGCCTGG  
 AGCTGTACTG GTGCTGTT [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCAC CACTATCCGT GCCAGTATCC [REDACTED] TATCC  
 TATCC [REDACTED] TATCCAG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC GGGGGCGCCA GGAGCCGTAC TGGTTCGTCT [REDACTED] TATCC  
 TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC GGGTGTGCTG GGAGCTGTAC TGGTGCCTGT  
 ACTGGTGCTG GG [REDACTED] TATCCGGCCAGTATCC [REDACTED] TATCCGGTGCCTG GGGCCAGTATCC [REDACTED] TATCC  
 GG [REDACTED] TATCCGGGGGGCGC CTGGAGCTGT ACTGGTGCTG GT [REDACTED] TATCCGG [REDACTED] TATCCGG [REDACTED] TAT  
 GAAC TAGTAC GGACCAGTATCCGGGGTCGC CAGGAGCTGT ACTGGTGCCG GT [REDACTED] TATCCGG [REDACTED] TATCC  
 CCATGCAGTG GG [REDACTED] TATCCAG [REDACTED] TATCCAG [REDACTED] TATCCGGGAGGTT [REDACTED] GAGCTG TACTGGTTCT  
 TACTGGTGCC GGT [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGGTGACAA TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED]  
 AATAGGGGGG CGCTGGGAGC TGTACTGGTG CTGGT [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCATCAG TATGA [REDACTED]  
 TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGTTA CCGGGAGCTG TACTGGTTCT TACTGGTGCT AGG [REDACTED] TA  
 CGG [REDACTED] TA CGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGGGGGTG CCGGGAGCTG TACTGGTTCT  
 TACTGGTGCT GGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGCCAGTATCCGGTGCCTG GGGCCAGTATCC [REDACTED] TATCC  
 TCC [REDACTED] TATCCGGGGTCC [REDACTED] GAGCTA TACTGGTGCT GGG [REDACTED] TA CAG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TA  
 TGA [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGGG [REDACTED] TATCCGGGTTAC CGGTAGCTGT ACTGGTTTGT ACGGGTCTGG  
 G [REDACTED] TACG G [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCCGG [REDACTED] TATCCGGGGTCCCG GGAGCTGTAC TGGTTTGTAC  
 TGGTGCCGTT [REDACTED] CATGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC [REDACTED] AACAGTATCC  
 AACAGTATCC GGGGGCGCTG GGAGCTGTAC TGATTTGTAC TGGTGCTGGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TATCC  
 TATCC GCCAGTATCC GCCAGTATCC GTGGGCTCCA GGAGCTGTAC TGGTTCATAC TGGTACTGGG  
 TATGA [REDACTED] TATCCAG [REDACTED] TACGG [REDACTED] TATCC GTGCATTGG AACAGTACAA [REDACTED] TATCC  
 ACCGGTATCC GTGCCAATATCCGCCAGTAA GG [REDACTED] TATCCGGAGCACTG GGAGCTGTAC TGGTTTGGAC  
 TGGGGCTGGG [REDACTED] TATCC [REDACTED] TCCAG CCCAGTACAA [REDACTED] TATCCAG CCCAA TATCCAG CCCAGTCCAG  
 TCCAGTCCAA ACTAGT

↑

図 1 4 *Xba* I 認識部位から *Spe* I (2) 認識部位までの塩基配列

全体で2045bp。 [REDACTED] と TAT(A/G)G を基本単位配列とする繰り返し構造をしている。また↑の部分でシーケンス反応が著しく阻害された。 [REDACTED] の部分によって2次構造を形成していると考えられる。

## 7) *Eco*R I (1) 認識部位と*Xba*I 認識部位の間の領域の塩基配列

pE13-E (4.5kb) より作製したpE13-EA (3.0kb) は、両端からプライマー歩行法によってその全塩基配列を決定した。全体で2952bpであった。pE13-Eより作製したpE13-EB (1.8kb) はインサートの両端から塩基配列を決定してみたところ、繰り返し配列であった。このクローンは両端からの欠失シリーズを作製し、その全塩基配列を決定した。全体で1802bpであった。

これらを併せたpE13-Aの*Eco*R I (1) 認識部位と*Xba*I 認識部位の間の領域、つまりpE13-Eは4484bpになる (図 1 5)。

この領域には2種の繰り返し配列が存在していた。1つは図 1 4 と同様、ACCAG と TAT(A/G)G という5塩基対の基本単位配列が並ぶ繰り返し配列で、図 1 4 で示した領域と連続していた。もう1つはその上流に存在する、ATTAG と AAATA という5塩基対の基本単位配列が並ぶ繰り返し配列であった。この領域は、基本単位配列からもわかるように非常にAT含量が高く、またこの繰り返し配列の中に、Ig遺伝子のプロモーター領域などにその存在が認められるオクタマー配列が存在していた (図 1 5)。





## 8) *EcoRI* (1) 認識部位と*PmaCI* (1) 認識部位の間の領域全体の塩基配列と繰り返し配列

図13、14、15の結果を合わせて、*EcoRI* (1) 認識部位と*PmaCI* (1) 認識部位の間の領域全体の塩基配列を決定した。全体で8050bpであった。

この領域の繰り返し配列について調べるために、この8050bpの塩基配列をホモロジープロット法により解析を行った。この方法は2次元の平面の縦軸と横軸に解析を行う塩基配列を並べ、片方の軸の単位長の塩基配列毎にもう一方の軸の配列全体をホモロジーサーチする方法で、ある割合以上一致する場合を相同とみなし斜線で示すことで、視覚的にも繰り返し配列を同定しやすくなる。今回は単位長を20bpとしてホモロジーサーチを行い、まず90%以上一致する場合を相同とみなして解析を行った(図16)。

その結果、8050bpの配列中に3相に分かれた繰り返し配列が見つかった。つまり、先の図13、14、15の塩基配列で網掛けし色で塗分けた繰り返し配列の集合体に対応している。図12のクロスハイブリダイゼーションの結果とこの繰り返し配列を対比させた結果、一番下流の繰り返し配列がマウスS領域と一番強くハイブリする領域に存在すること、真ん中の繰り返し配列がマウスS領域と弱くハイブリする領域に存在すること、さらに、一番上流の繰り返し配列がマウスS領域とハイブリしない領域に存在することが判明した。下流の2相の繰り返し配列がニワトリS $\mu$ 領域と考えられ、今回同定された3相の繰り返し配列を上流から、図16に示したようにchkR $\mu$  (chicken  $\mu$  Repetitive)、chkS $\mu$ 1 (chicken S $\mu$ 1)、chkS $\mu$ 2 (chicken S $\mu$ 2) 領域と名付けた。それぞれの繰り返し配列の長さは、chkR $\mu$ 領域が1156bp、chkS $\mu$ 1領域が3743bp、chkS $\mu$ 2領域が1395bpであった。

次にホモロジーサーチの条件を75%以上と変更し同じ塩基配列をホモロジープロット法により解析した(図17)。その結果、chkS $\mu$ 1領域とchkS $\mu$ 2領域とは互いに相同性のある領域であるが、chkR $\mu$ 領域はchkS $\mu$ 1、2領域とは相同性のない繰り返し配列であることが明らかになった。

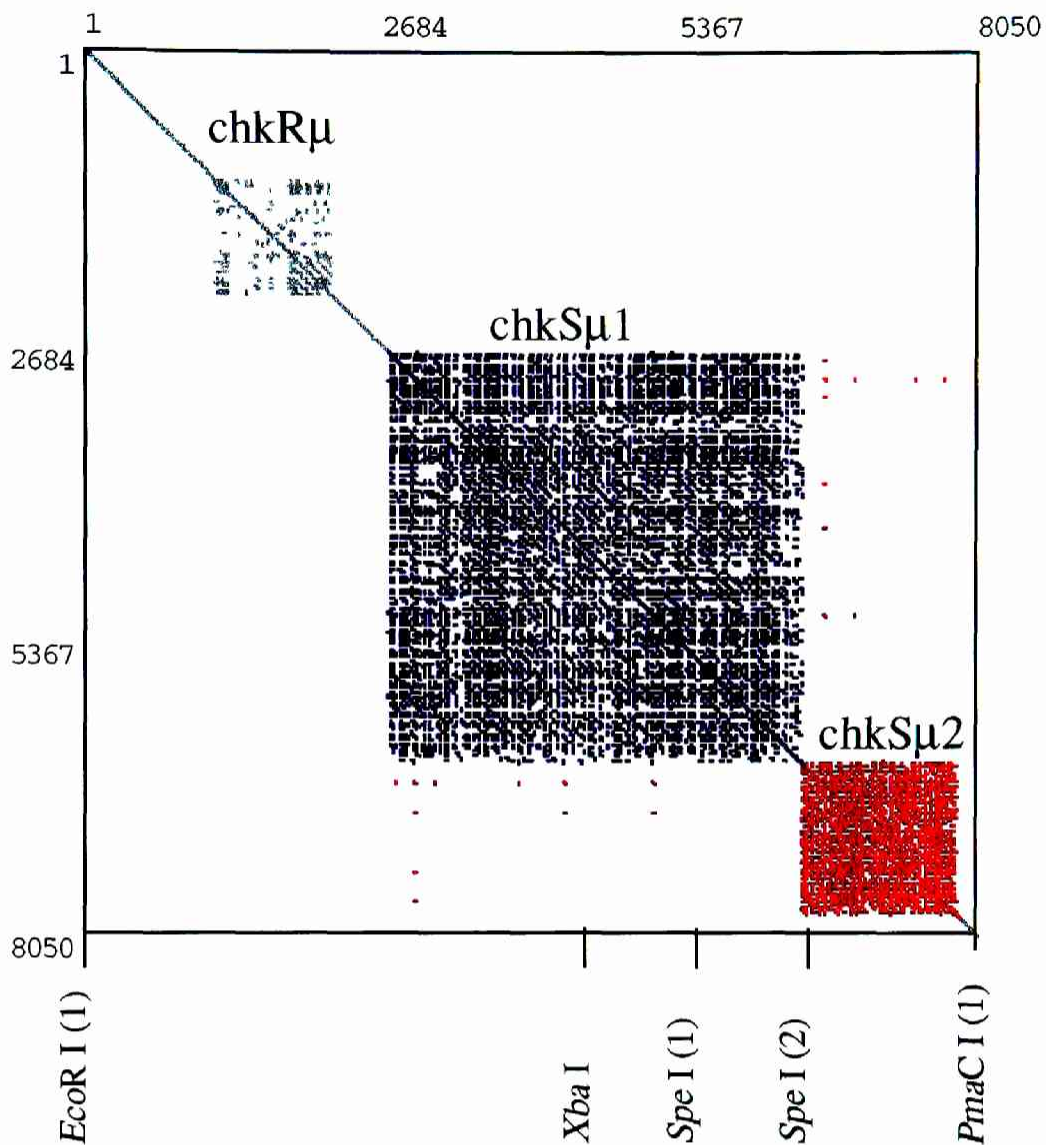


図 1 6 ニワトリIgH鎖遺伝子座のホモロジープロット解析

*EcoRI*(1)認識部位から*PmaCI*(1)認識部位まで、8050bpの塩基配列をホモロジープロット法により解析した。20bp単位長ごとに配列全体をホモロジーサーチをし、18bp(90%)以上一致する場合のみ相同とした。3つの繰り返し配列が存在していた。



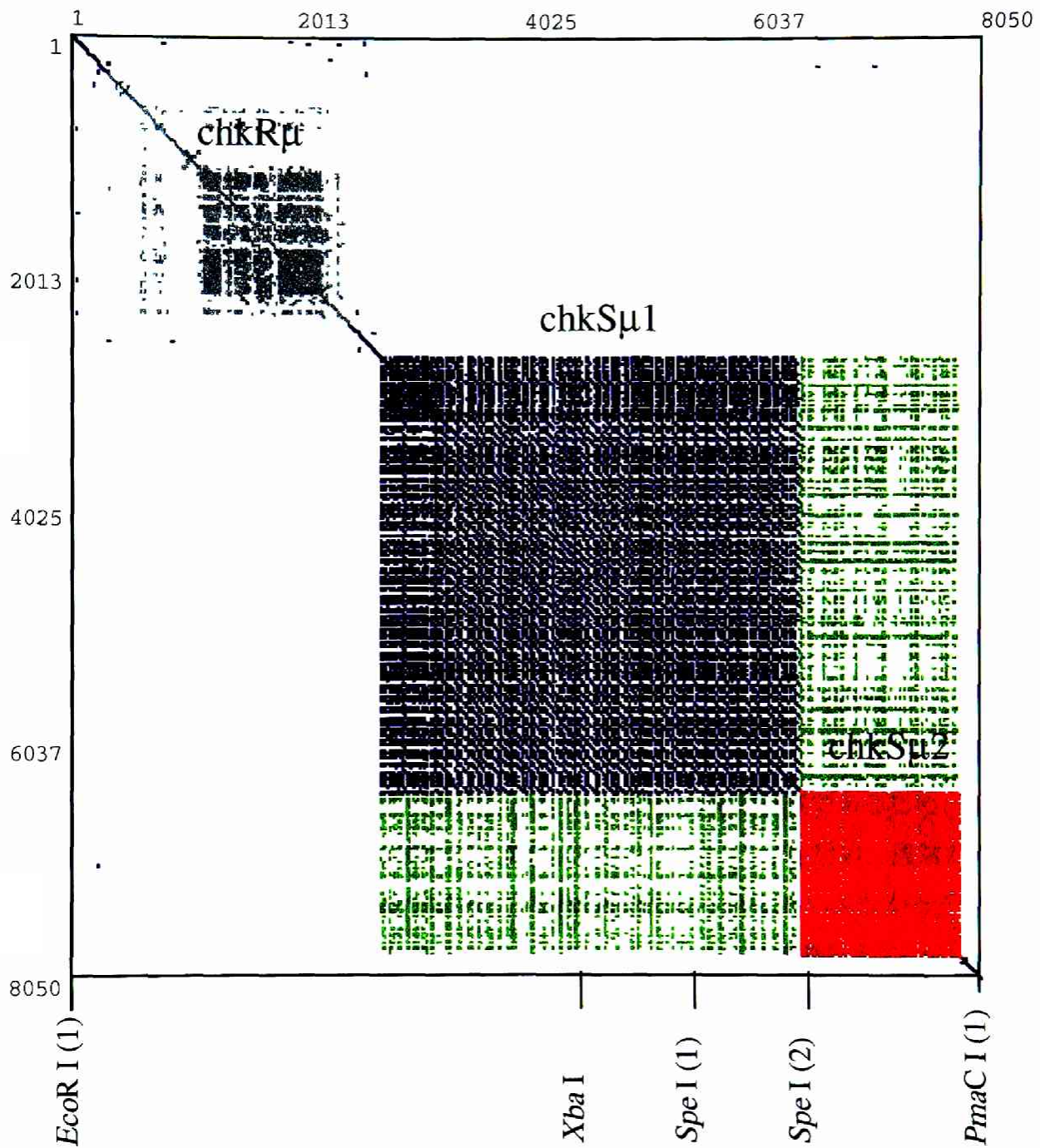


図17 ニワトリIgH鎖遺伝子座のホモロジープロット解析(2)

図16と同様の解析を、20bpのうち15bp(75%)以上一致する場合を相同として行った。3つの繰り返し配列ののうち、chkSμ1、chkSμ2領域は相互に相同性があるが、chkRμには下流のものと相同性がないことがわかる。

## 9) ニワトリ脾臓でのクラススイッチ遺伝子組換えの検出

これまでに示したように、ニワトリ $\mu$ 鎖定常部遺伝子上流のイントロンにマウスS領域と相同性があり、繰り返し配列より構成されるニワトリS $\mu$ 領域 (chkS $\mu$ 1, chkS $\mu$ 2領域) が存在することが明らかになった。ニワトリS $\mu$ 領域がニワトリにおけるスイッチ組換えを司るスイッチ領域として働いていること、さらに、ニワトリのIgM以外のクラスの抗体 (IgGまたはIgA) を産生するB細胞ではスイッチ遺伝子組換えによる $\mu$ 鎖定常部遺伝子のゲノム上からの欠失が見られることが期待された。

静注内免疫により抗原刺激を受けたニワトリでは、7日目に血清中のIgGの抗体価がピークを示す。その時、脾臓内には胚中心が形成され、ここではクラススイッチが起こっている。抗原刺激後形成される胚中心内には、IgM<sup>+</sup>B細胞が10±5%、IgG<sup>+</sup>B細胞が43±9%、IgA<sup>+</sup>B細胞が4±1%存在しており、また、脾臓全体でもIgG<sup>+</sup>B細胞が9±0% (IgM<sup>+</sup>B細胞: 76±9%、IgA<sup>+</sup>B細胞: 1±0%) 存在すると報告されている (浴野、私信)。

そこでNIP-BSAで静注内免疫後7日目の成鳥ニワトリ脾臓ゲノムDNAより組換えを完了したゲノムDNAをPCR法により増幅し、それを検出することを試みた (図18)。また、ネガティブコントロールとして、成鳥の肝臓、赤血球のゲノムDNAを用いた。

まず、図18に示す合成プライマーuS $\mu$ 1とuC $\mu$ 1-2を用いて、生殖型のゲノムDNA (5.5kb) を正確に増幅する条件について検討した。塩基配列決定の項でも触れたが、今回増幅するニワトリS $\mu$ 領域は、5.5kbにも及ぶGC含量の高い領域であるため、PCRによる増幅が困難であることが予想された。実際、uS $\mu$ 1とuC $\mu$ 1-2を用い、通常のrTaq polymerase (TaKaRa, Japan) によって増幅を試みたが、うまくいかなかった。プラスミドDNAを用いて詳細に調べた結果、図13で示した $\mu$ 鎖定常部遺伝子のCH1エキソンのすぐ上流のC塩基の並んだ特殊な配列の部分でPCR反応が阻害されていることが判明した。そこで、数種の耐熱性DNA polymeraseを用いてニワトリS $\mu$ 領域の増幅を試みたところ、KOD-DASH (TOYOBO, Japan) を用いて条件を適正に設定したときに脾臓、肝臓、赤血球のどのゲノムDNAからも効率よく生殖型ゲノムDNA (5.5kb) を増幅することが可能になった (図19A、ここではニワトリS $\mu$ 領域をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果を示したが、EtBrによる染色でも検出できた)。

この反応条件のもとに、合成プライマーuS $\mu$ 1とuC $\gamma$ 1-1を用いて、脾臓、肝臓、赤血球ゲノムDNAを鋳型にPCRによる増幅をおこなった。まず、EtBrによる染色では脾臓、肝臓、赤血球どのゲノムDNAからも増幅断片は検出できなかった。次に、chkS $\mu$ 1領域

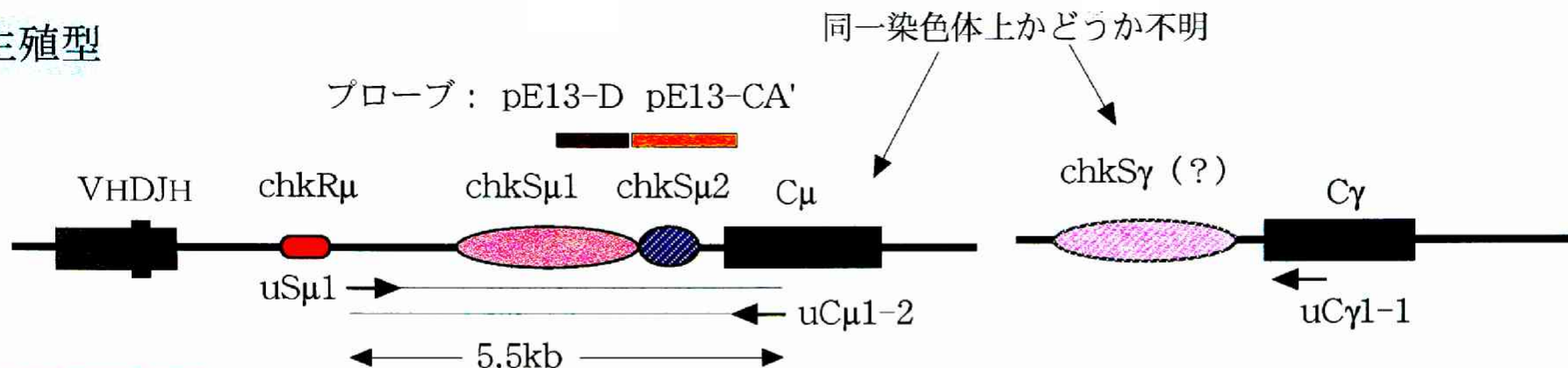
(pE13-D) をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、脾臓ゲノムDNAより独立に増幅した4つのサンプルではいずれからも複数の増幅断片が検出された。それに対し、肝臓ゲノムDNAからは非常に弱い増幅しか検出されず、赤血球ゲノムDNAからは増幅が全く検出されなかった(図19B)。これは脾臓特異的に $\mu$ 鎖定常部遺伝子をゲノム上から欠失する遺伝子組換えが起こっていることを示している。さらに、それぞれのサンプル間では増幅される断片の数およびその長さが異なっている(図19Bのspleenのレーン)ことから、組換え点が数kbの範囲に分散していることが示された。

次に脾臓ゲノムDNAより増幅した1つのサンプルについて、同時に2枚のナイロンメンブレンにプロットし、それぞれを2種のニワトリS $\mu$ 領域のプローブ、pE13-DとpE13-CA'によりサザンハイブリダイゼーションを行い増幅断片を検出した(図19C)。複数存在する増幅断片のうち、大部分はpE13-DとpE13-CA'、双方のプローブで検出することができた。このような増幅断片にはchkS $\mu$ 1およびchkS $\mu$ 2両領域が含まれることを示しており、図18Aに示すような下流のchkS $\mu$ 2領域におけるスイッチ組換えによる増幅断片である。これに対し、短い増幅断片の中には上流のプローブ、pE13-Dによってのみ検出されるものが存在した(図19Cで矢印で示したバンド)。この増幅断片にはchkS $\mu$ 2領域が含まれない、すなわちこれは、図18Bに示すような上流のchkS $\mu$ 1領域におけるスイッチ組換えによって生ずるゲノムDNAの増幅断片である。すなわちchkS $\mu$ 1、chkS $\mu$ 2両領域においてスイッチ組換えが起こっていることが示された。また検出される増幅断片数の比較から、組換えには下流のchkS $\mu$ 2領域がより高頻度で使われることが示唆された。

このように抗原刺激後の脾臓に特異的に(図19B)、chkS $\mu$ 1、chkS $\mu$ 2それぞれの領域を介したスイッチ組換え(図19C)により生ずるゲノムDNAを検出することができた。



## 生殖型



## 組換え産物

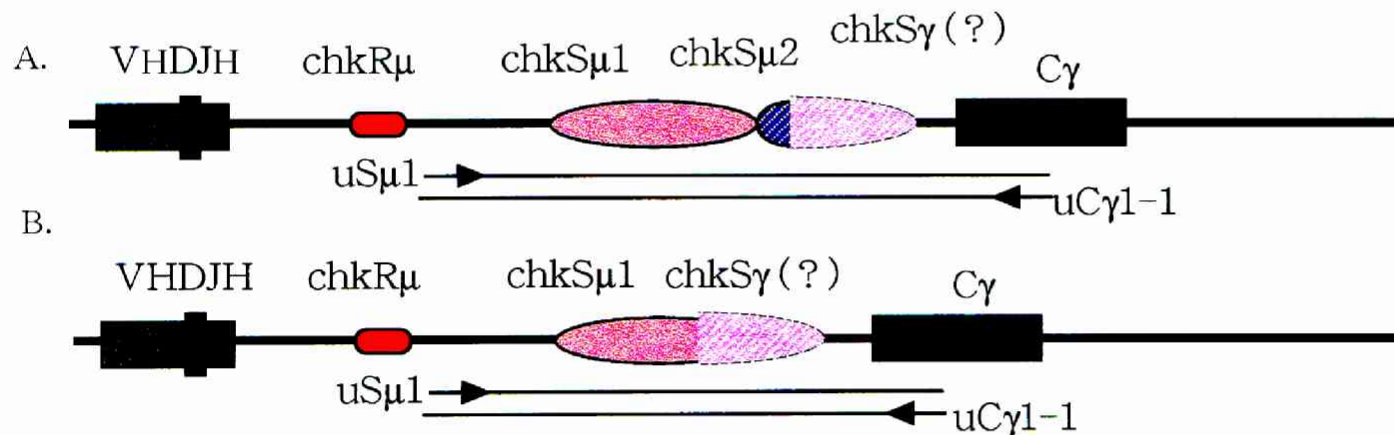


図 1 8 ニワトリクラススイッチ遺伝子組換え産物の検出

上記のようにプライマーを作製し、スイッチ組換え産物の検出を試みた。PCR用のポリメラーゼにはKOD-DASHを用い、図に示したニワトリ $S_{\mu}$ 領域のプローブ (pE13-D、pE13-CA') を用いたサザンハイブリダイゼーションにより、 $chkS_{\mu 2}$ 領域内 (A) もしくは $chkS_{\mu 1}$ 領域内 (B) での組換えによる産物を各々検出することに成功した。 $chkS_{\gamma}$ については未同定で、存在も明らかではない。

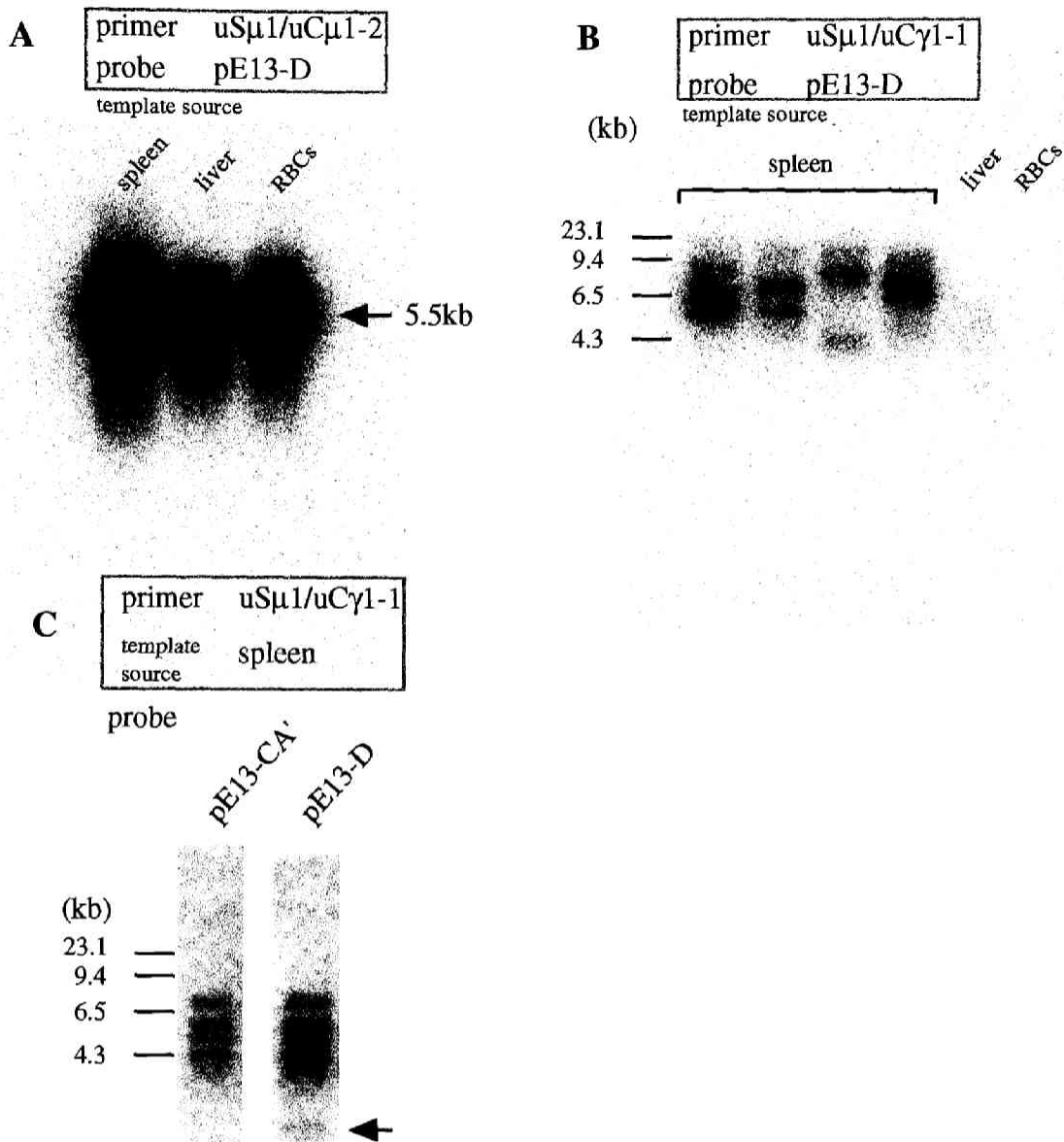


図19 ニワトリスイッチ組換え産物の検出

A. 生殖細胞型スイッチ領域のPCR; B. スイッチ組換え産物のPCR; C. 脾臓からのスイッチ組換え産物のPCRをニワトリS $\mu$ 領域に対する2種のプローブで検出。

脾臓、肝臓、赤血球からゲノムDNAを精製し、生殖細胞型及び組換え型のスイッチ領域をPCRで増幅した。PCR産物はスイッチ領域DNAプローブを用いたサザンハイブリダーゼーションで検出した。PCRプライマー、PCR鋳型の由来、ハイブリダイゼーションプローブは図中に示す。C.の矢印のバンドに注目。

## 考察

### 1) $\mu$ 鎖定常部CH1エキソンの上流に存在するニワトリS $\mu$ 領域

筆者はニワトリIgH鎖遺伝子 $\mu$ 鎖定常部CH1エキソンの上流のイントロンにマウスS領域と相同性のある領域（ニワトリS $\mu$ 領域）が存在することを確認した。S領域はマウスではクラススイッチ遺伝子組換えに必須の領域である。

S領域は繰り返し配列が階層構造をなしている。今回、ニワトリS $\mu$ 領域はマウスS $\alpha$ 領域と強くハイブリダイズする領域として同定された。マウスS $\alpha$ 領域は、5塩基対の基本単位配列 CTG(A/G)G からなり、これが集まって20-30 bpの単位、さらにこれが集まって80 bpの単位をなし、これらが10回繰り返して0.8 kbの単位、さらにこれが5回程度繰り返して4.2 kbのS $\alpha$ 領域を構成している。そして、そのスイッチ組換え点は、繰り返し単位の中のコンセンサス配列上に集中していることが明らかになっている (Arakawa et al., 1993)。他のアイソタイプのS領域についても同様なことが明らかになっており、マウスS領域はその繰り返し配列からなる1次構造と組換えという機能が対応している。

今回単離されたニワトリS $\mu$ 領域も高度な繰り返し配列をしている。chkS $\mu$ 1領域は ACCAG と TAT(A/G)G、chkS $\mu$ 2領域は CCCAG と TACAG という各々2つの5塩基対からなる基本単位配列の繰り返しによって構成されている。chkS $\mu$ 2領域ではこれらの繰り返し基本単位配列が5bp毎に並んでいる。このように繰り返し基本単位配列が一定間隔に並んでいる構造はマウスS $\mu$ 領域に見られる特徴であり (Nikaido et al., 1981)、ニワトリS $\mu$ 領域とマウスS $\mu$ 領域の構造的な相同性を見ることができる。

先に示したニワトリの繰り返しの5塩基対の4つの基本単位配列であるが、これらのうち3つの最後の3塩基はどれも CAG であり、相同性がある。この配列はマウスのS領域の繰り返し基本単位配列 CTG(A/G)G の最初の3塩基 CTG とうまく対応していることがわかる。つまり、ニワトリの繰り返し基本単位配列はマウスのものとほぼ相補的な関係にある。特に、chkS $\mu$ 2領域の CCCAG という配列はマウスの CTG(A/G)G という配列と完全に相補的である。このことは、ニワトリS $\mu$ 領域はマウスにおけるS領域とは転写の向きに対して逆向きの構造をしていることを示唆している。S領域の向きが反対であるとスイッチが阻害されるという報告がある (Daniels and Lieber, 1995) ことから、このニワ

トリS $\mu$ 領域の構造はニワトリのスイッチ分子機構を考える上でも非常に興味深い。今後、ニワトリS $\gamma$ 、S $\alpha$ 領域も同様に哺乳類のS領域と逆向きの配列であるかなど解析する必要がある。

マウスではS $\mu$ 領域が進化の過程で重複して各アイソタイプのS領域となっているという説があるが、ニワトリの他のアイソタイプのS領域もニワトリS $\mu$ 領域、特にchkS $\mu$ 2領域が重複した形をしていることも予想される。実際、chkS $\mu$ 1領域はchkS $\mu$ 2領域の2倍～3倍の長さであることから、chkS $\mu$ 1領域がchkS $\mu$ 2領域の重複によって現われた構造であることも考えられる。今後、ニワトリ $\gamma$ 鎖、 $\alpha$ 鎖定常部遺伝子上流域の構造解析の結果が待たれるところである。

## 2) ニワトリS $\mu$ 領域の上流のAT含量の高い繰り返し配列 (chkR $\mu$ 領域)

マウスではクラススイッチ組換えの前にその標的遺伝子のS領域の上流に存在するプロモーター領域より転写が開始される (Stavnezer et al., 1988; Lutzker et al., 1988)。そして、この転写はクラススイッチ組換えに必須である。筆者は、ニワトリS $\mu$ 領域の上流にAT含量の高い繰り返し配列 (chkR $\mu$ 領域) があることを示し、さらにその中に Ig 遺伝子のプロモーター領域に種を通じて存在するオクタマー配列が存在することを示した (図 15)。その存在位置と保持するモチーフから、このchkR $\mu$ 領域がニワトリS $\mu$ 領域の生殖型転写を調節していることが示唆される。また、マウスS $\mu$ 領域上流にはいわゆる I 領域の他にIgH鎖の転写を調節するエンハンサー領域 (E $\mu$ 領域) が存在することから、このchkR $\mu$ 領域がIgH鎖遺伝子の発現調節領域であることも期待される。

### 3) ニワトリにおけるクラススイッチ機構

筆者は、PCR法を用いて、抗原刺激したニワトリ脾臓ゲノムDNAより、 $\mu$ 鎖定常部と $\gamma$ 鎖定常部との間でのクラススイッチ遺伝子組換え産物を増幅することに成功した。鳥類においても、繰り返し配列よりなるS領域を介する、いわゆる領域特異的なクラススイッチ遺伝子組換え機構が働いていること、そしてその組換えはマウスS領域と相同性の高い繰り返し配列 (chkS $\mu$ 2領域) でだけでなく、マウスS領域とは相同性の低い繰り返し配列 (chkS $\mu$ 1領域) 内でも起こっていることを示した。

抗原刺激後出現するニワトリ脾臓胚中心には、IgMを単独で発現しているB細胞が8%、IgGを単独で発現しているB細胞が32%存在しているのに対し、IgMとIgGを同時に発現しているB細胞が10%も存在している。つまり、ニワトリ胚中心では抗原刺激を受けた多くのB細胞がIgGへのクラススイッチを起こし、その過程には哺乳類と同様の遺伝子組換え機構を用いているが、組換えを起こすB細胞の比率はマウスほど多くなく、スイッチ組換えを行わず、何らかの形でIgMとIgGを両方産生する細胞群がマウスなどと比べて高い比率存在していると考えられる。マウスでもこのようなIgMとIgGを両方産生する細胞群の存在が確認されており、その分子機構としてRNAレベルでのトランススプライシング機構が提唱されている (Shimizu et al., 1991)。このような機構が存在するなら、その機構は哺乳類よりむしろ鳥類において積極的に用いられていると考えることもできる。



#### 4) 両生類でのクラススイッチ組換え機構

最後に、興味深いことだが1996年バーゼル研年報に両生類クラススイッチ機構の研究が中間報告されている。ニワトリS $\mu$ 領域、マウスS領域の繰り返しの基本単位配列を、非公式に報告されているアフリカツメガエルのJH-C $\mu$ イントロンに存在する繰り返しの基本単位配列と比較してみた(図20) (Mußmann and Du Pasquier., 1996)。

その報告では、アフリカツメガエルのIgH鎖遺伝子JH-C $\mu$ イントロンに約5kbに及ぶ $\mu$ 鎖スイッチ領域が存在するとして、その領域は上限150bpの配列による繰り返し配列であり、AGCT という4塩基対を主な基本単位配列とする繰り返し配列であることが記されている。さらに $\chi$ 鎖定常部の上流にも数kbにおよぶ $\chi$ 鎖スイッチ領域も存在を示唆しており、こちらはTGCA と CATG という4塩基対を主な基本単位配列とする繰り返し配列であるとしている。さらにIgX産生B細胞では $\mu$ 鎖定常部遺伝子のゲノム上からの欠失があることも確認し、彼らはその組換え点も検出している。この組換えも哺乳類と同様、部位特異的ではなく領域特異的な組換えであるようである。もしこの報告が正しいならば哺乳類で見られるクラススイッチ組換え機構が変温脊椎動物の両生類に保持されていることになる。今回筆者は鳥類のクラススイッチ組換えを報告した。このクラススイッチ遺伝子組換え機構は、IgH鎖遺伝子を同一染色体上に1つの遺伝子群としてもち、さらに複数の抗体のクラスを保持するようになった両生類から鳥類、哺乳類に至るまで保存された機構であることになる。これはニワトリにおいて特有の抗体遺伝子の多様性産生機構が存在することと対照的である。

今後、ニワトリにおいて他のアイソタイプのS領域の繰り返し配列の特徴や組換え点の位置について詳しく調べることを考えているが、その結果、スイッチ組換え機構の種間での違いについても明らかになることを期待している。

A. マウス

S領域	基本単位配列
S $\mu$ , S $\gamma$ 3, S $\gamma$ 1, S $\gamma$ 2b, S $\gamma$ 2a, S $\epsilon$ , S $\alpha$	CTG(A/G)G

B. ニワトリ

	基本単位配列	
chkS $\mu$ 1 [相補鎖]	ACCAG CTGGT	TAC (A/G) G C (C/T) GTA]
chkS $\mu$ 2 [相補鎖]	CCCAG CTGGG	TACAG CTGTA]

C. ナマズ

基本単位配列
ATGT

D. アフリカツメガエル

基本単位配列	
S $\mu$	AGCT
S $\chi$	TGCA, CATG

図 20 スイッチ領域基本単位配列

A. マウスでは、C $\delta$ を除くそれぞれの定常部遺伝子のすぐ上流のイントロンにS領域が存在する。各S領域は数kbにわたる繰り返し配列であり、基本単位配列としてCTG(A/G)Gが同定されている。

B. ニワトリS $\mu$ 領域とみられるchkS $\mu$ 1, 2から同定された基本単位配列。1つのユニットの相補鎖 (CTGGG) がマウスの基本単位配列と一致する。

C. ナマズもIgH鎖遺伝子 $\mu$ 鎖定常部の上流に繰り返し配列をもつが、非常に短く(240bp)、スイッチ組換えへの関与はないと考えられる。

D. アフリカツメガエルでは上の基本単位配列からなる5kbに及ぶS $\mu$ 領域が存在し、その領域での組換えも報告されている。

## 謝辞

初めに、この5年半の間、終始変わらぬ熱意で御指導くださいました山岸秀夫博士に感謝致します。

遺伝子実験施設の清水章博士には博士後期課程の3年半の間、研究全般で御指導いただきました。非常に恵まれた研究環境を与えていただきましたことをとても感謝しております。

荒川央博士には私が研究生活をはじめるときに当たって実験技術の初歩から親切に指導していただいたことに始まり、今に至るまであらゆる場面で助言、助力をいただきました。熊本大学の浴野成生博士、保田昌宏先生には、我々の使用する実験動物であるニワトリを提供していただいたのみならず、*in vivo*免疫系の知識もご教授いただきました。遺伝子実験施設の方々には、日々の研究に関してのいろいろな助言をいただき、また様々な形で協力していただきました。井口八郎博士をはじめとする分子生物学教室の諸先輩方には特に修士過程の2年間、分子生物学における技法について御指導いただきました。

以上の方々を含め、さまざまな形で支えて下さった方々にこの場を借りて感謝の意を表したいと思います。

最後に陰でいつも支えてくれ、応援してくれた両親に感謝の意を表して、謝辞とさせていただきます。

## 参考文献

- Amemiya, C.T., Haire, R.N. and Litman, G.W. (1989) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a third distinct *Xenopus* immunoglobulin heavy chain isotype. *Nucleic Acids Res.* 17, 5388
- Amemiya, C.T. and Litman, G.W. (1990) Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 811-815
- Arakawa, H., Iwasato, T., Hayashida, H., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H. (1993) The complete murine immunoglobulin class switch region of the  $\alpha$  heavy chain gene—hierarchical repetitive structure and recombination breakpoints. *J. Biol. Chem.* 268, 4651-4655
- Arakawa, H., Furusawa, S., Ekino, S. and Yamagishi, H. (1996) Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. *EMBO J.* 15, 2540-2546
- Baba, T.W., Giroir, B.P. and Humphries, E.H. (1985) Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144, 139-151
- Benatar, T., Tkalec, L. and Ratcliffe, M.J. (1992) Stochastic rearrangement of immunoglobulin variable-region genes in chicken B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7615-7619
- Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A. and Jackson, S.P. (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine *scid* mutation. *Cell* 80, 813-823
- Carlson, L.M., McCormack, W.T., Postema, C.E., Humphries, E.H. and Thompson, C.B. (1990) Templated insertions in the rearranged chicken IgL V gene segment arise by intrachromosomal gene conversion. *Genes. Dev.* 4, 536-547
- Coffman, R. L., Lebman, D. A. and Shrader, B. (1989) Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by Lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 1039-1044

Dahan, A., Reynaud, C.A. and Weill, J.C. (1983) Nucleotide sequence of the constant region of a chicken  $\mu$  heavy chain immunoglobulin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 5381-5389

Daniels, G.A. and Lieber, M.R. (1995) Strand specificity in the transcriptional targeting of recombination at immunoglobulin switch sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5625-5629

Davis, M. M., Kim, S. and Hood, L. (1980) DNA sequences mediating class switching in alpha-immunoglobulins. *Science* 209, 1360-1365

Dunnick, W.A., Rabbitts, T. H. and Milstein, C. (1980) An immunoglobulin deletion mutant with implications for the heavy-chain switch and RNA splicing. *Nature* 286, 669-675

Fujimoto, S and Yamagishi, H. (1987) Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements *Nature* 327, 242-243

Ghaffari, S.H. and Lobb, C.J. (1991) Heavy chain variable region gene families evolved early in phylogeny. Ig complexity in fish. *J. Immunol.* 146, 1037-1046

Ghaffari, S.H. and Lobb, C.J. (1992) Organization of immunoglobulin heavy chain constant and joining region genes in the channel catfish. *Mol. Immunol.* 29, 151-159

Haire, R.N., Shamblott, M.J., Amemiya, C.T. and Litman, G.W. (1989) A second *Xenopus* immunoglobulin heavy chain constant region isotype gene. *Nucleic Acids Res.* 17, 1776

Haire, R.N., Amemiya, C.T., Suzuki, D. and Litman, G.W. (1990) Eleven distinct VH gene families and additional patterns of sequence variation suggest a high degree of immunoglobulin gene complexity in a lower vertebrate, *Xenopus laevis*. *J. Exp. Med.* 171, 1721-1737

Harada, K. and Yamagishi, H. (1991) Lack of feedback inhibition of V kappa gene rearrangement by productively rearranged alleles. *J. Exp. Med.* 173, 409-415

Hinds-Frey, K.R., Nishikata, H., Litman, R.T. and Litman, G.W. (1993) Somatic variation precedes extensive diversification of germline sequences and

combinatorial joining in the evolution of immunoglobulin heavy chain diversity. *J. Exp. Med.* 178, 815-824

Hirama, T., Takeshita, S., Yoshida, Y. and Yamagishi, H. (1991) Structure of extrachromosomal circular DNAs generated by immunoglobulin light chain gene rearrangements. *Immunol. Lett.* 27, 19-23

Honjo, T. and Kataoka, T. (1978) Organization of the immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2140-2144

Huang, C.M., Parsons, M., Wakeland, E.K., Moriwaki, K. and Herzenberg, L.A. (1982) New immunoglobulin IgG allotypes and haplotypes found in wild mice with monoclonal anti-allotype antibodies. *J. Immunol.* 128, 661-667

Ishiguro, H., Kobayashi, K., Suzuki, M., Titani, K., Tomonaga, S. and Kurosawa, Y. (1992) Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J.* 11, 829-837

Iwasato, T., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H. (1990) Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 62, 143-149

Iwasato, T., Arakawa, H., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H. (1992a) Biased distribution of recombination sites within S regions upon immunoglobulin class switch recombination induced by transforming growth factor beta and lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 175, 1539-1546

Iwasato, T. and Yamagishi, H. (1992b) Novel excision products of T cell receptor gamma gene rearrangements and developmental stage specificity implied by the frequency of nucleotide insertions at signal joints. *Eur. J. Immunol.* 22, 101-106

Kataoka, T., Miyata, T. and Honjo, T. (1981) Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 23, 357-368

Kearney, J.F., Cooper, M.D. and Lawton, A. R. (1976) B cell differentiation induced by Lipopolysaccharide IV: Development of immunoglobulin class restriction in precursor of IgG synthesizing cells. *J. Immunol.* 117, 1567-1572

Kitao H., Arakawa, H., Yamagishi, H. and Shimizu, A. (1996) Chicken immunoglobulin  $\mu$ -chain gene: germline organization and tandem repeats



characteristic of class switch recombination. *Immunol. Lett.* 52, 99-104

Kokubu, F., Hinds, K., Litman, R., Shablott, M.J. and Litman, G.W. (1988a) Complete structure and organization of immunoglobulin heavy chain constant region genes in a phylogenetically primitive vertebrate. *EMBO J.* 7, 1979-1988

Kokubu, F., Litman, R., Shablott, M.J., Hinds, K. and Litman, G.W. (1988b) Diverse organization of immunoglobulin VH gene loci in a primitive vertebrate. *EMBO J.* 7, 3413-3422

Kondo, T., Arakawa, H., Kitao, H., Hirota, Y. and Yamagishi, H. (1993) Signal joint of immunoglobulin V $\lambda$ 1-J $\lambda$  and novel joints of chimeric V pseudogenes on extrachromosomal circular DNA from chicken bursa. *Eur. J. Immunol.* 23, 245-249

Litman, G.W., Rast, J.P., Shablott, M.J., Haire, R.N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R.T., Hinds-Frey, K.R., Zilch, A. and Amemiya, C.T. (1993) Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 10, 60-72

Lorenz, M., Jung, S. and Radbruch, A. (1995) Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* 267, 1825-1828

Lutzker, S., Rothman, P., Pollock, R., Coffman, R. and Alt, F. W. (1988) Mitogen- and IL-4-regulated expression of germ-line Ig gamma 2b transcripts: evidence for directed heavy chain class switching. *Cell* 53, 177-184

Mäkelä, O. and Litman, G.W. (1980) Lack of heterogeneity in antihapten antibodies of a phylogenetically primitive shark. *Nature* 287, 639-640

Mansikka, A. (1992) Chicken IgA H chains : implications concerning the evolution of H chain genes. *J. Immunol.* 149, 855-861

Matsuoka, M., Yoshida, K., Maeda, T., Usuda, S. and Sakano, H. (1990) Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 62, 135-142

McBane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M. and Oettinger, M. (1995) Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387-395

McCormack, W.T., Carlson, I.M., Tjoelker, L.W. and Thompson, C.B. (1989) Evolutionary comparison of the avian IgL locus: combinatorial diversity plays a role in the generation of the antibody repertoire in some avian species. *Int. Immunol.* 1, 332-341

McCormack, W.T. and Thompson, C.B. (1990) Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity. *Genes. Dev.* 4, 548-558

Mills, F.C., Brooker, J.S. and Camerini-Otero, R.D. (1990) Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription. *Nucleic Acids Res.* 18, 7305-7316

Mizuta, T., Suzuki, N., Shimizu, A. and Honjo, T. (1991) Duplicated variable region genes account for double isotype expression in a human leukemic B-cell line that gives rise to single isotype-expressing cells. *J. Biol. Chem.* 266, 12514-12521

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V.E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877

Mußmann, R. and Du Pasquier (1996) Molecular mechanism of IgH class switching in *Xenopus*. *Basel Institute for Immunology annual report 1996*, p52

Nikaido, T., Nakai, S. and Honjo, T. (1981) Switch region of immunoglobulin C $\mu$  gene is composed of simple tandem repetitive sequences. *Nature* 292, 845-848

Nikaido, T., Yamawaki-Kataoka, Y. and Honjo, T. (1982) The nucleotide sequences of rearranged and germline immunoglobulin VH genes of a mouse myeloma MC101 and evolution of VH genes in mouse. *J. Biol. Chem.* 257, 7322-7329

Nossal, G.V.J., Szenberg, A., Ada, G.L. and Austin, C.M. (1964) Single cell studies on 19S antibody production. *J. Exp. Med.* 119, 485-502

Obata, M., Kataoka, T., Nakai, S., Yamagishi, H., Takahashi, N., Yamawaki-Kataoka, Y., Nikaido, T. and Honjo, T. (1981) Structure of a rearranged gamma 1 chain gene and its implication to immunoglobulin class-switch mechanism. *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2437-2441

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. and Baltimore, D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523

Okazaki, K., Davis, D.D. and Sakano, H. (1987) T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49, 477-485

Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Shoshana, T., Burstein, Y. and Schechter, I. (1988) Chicken immunoglobulin  $\gamma$ -heavy chains: limited VH repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the  $\gamma$ -heavy chain locus. *EMBO J.* 7, 739-744

Reynaud, C.A., Anquez, V., Dahan, A. and Weill, J.C. (1985) A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 40, 283-291

Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H. and Weill, J.C. (1987) A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48, 379-388

Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V. and Weill, J.C. (1989) Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59, 171-183

Reynaud, C.A., Imhof, B.A., Anquez, V. and Weill, J.C. (1992) Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *EMBO J.* 11, 4349-4358

Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M. and Tonegawa, S. (1981) Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 290, 562-565

Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Baltimore, D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048

Schwager, J., Mikoryak, C.A. and Steiner, L.A. (1988) Amino acid sequence of

heavy chain from *Xenopus laevis* IgM deduced from cDNA sequence: implications for evolution of immunoglobulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2245-2249

von Schwedler, U., Jäck, H.-M. and Wabl, M. (1990) Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* 345, 452-456

Shimizu, A., Takahashi, N., Yaoita, Y. and Honjo, T. (1982a) Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain. *Cell* 28, 499-506

Shimizu, A., Hamaguchi, Y., Yaoita, Y., Moriwaki, K., Kondo, K. and Honjo, T. (1982b) Japanese wild mouse, *Mus musculus molossinus*, has duplicated immunoglobulin gamma 2a gene. *Nature* 298, 82-84

Shimizu, A., Nussenzweig, M. C., Han, H., Sanchez, M. and Honjo, T. (1991) *Trans*-splicing as a possible molecular mechanism for the multiple isotype expression of the immunoglobulin gene. *J. Exp. Med.* 173, 1385-1393

Shimizu, T. and Yamagishi, H. (1992) Biased reading frames of pre-existing DH-JH coding joints and preferential nucleotide insertions at VH-DJH signal joints of excision products of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *EMBO J.* 11, 4869-4875

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.-P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. and Alt, F.W. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867

Stavnezer, J., Radcliffe, G., Lin, Y.-C., Nietupske, J., Berggren, L., Sitla, R. and Severinson, E. (1988) Immunoglobulin heavy-chain switching may be directed by prior induction of transcripts from constant-region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7704-7708

Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestly, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehman, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P. and Jeggo, P.A. (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265, 1442-1445

Takeshita, S., Toda, M. and Yamagishi, H. (1989) Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J.* **8**, 3261-3270

Thompson, C. B. and Neiman, P. (1987) Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell* **48**, 369-378

Toda, M., Fujimoto, S., Iwasato, T., Takeshita, S., Tezuka, K., Ohbayashi, T. and Yamagishi, H. (1988) Structure of extrachromosomal circular DNAs excised from T-cell antigen receptor alpha and delta-chain loci. *J. Mol. Biol.* **202**, 219-231

Toda, M., Hiramata, T., Takeshita, S. and Yamagishi, H. (1989) Excision products of immunoglobulin gene rearrangements. *Immunol. Lett.* **21**, 311-316

van Gent, D.C., Ramsden, D.A. and Gellert, M. (1996) The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* **85**, 107-113

Xu, M. and Stavnezer, J. (1990) Structure of germline immunoglobulin heavy-chain gamma 1 transcripts in interleukin 4 treated mouse spleen cells. *Dev. Immunol.* **1**, 11-17

Yoshida, K., Matsuoka, M., Usuda, S., Mori, A., Ishizaka, K. and Sakano, H. (1990) Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: evidence for successive class switching from mu to epsilon via gamma 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7829-7833

Zhu, C., Bogue, M.A., Lim, D.S., Hasty, P. and Roth, D.B. (1996) Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* **86**, 379-389