

氏 名	きた お ひろ ゆき 北 尾 洋 之
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1879 号
学位授与の日付	平 成 9 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	鳥類における抗体クラススイッチ機構の研究

論文調査委員 (主 査) 教授 山 岸 秀 夫 教授 梅 園 和 彦 教授 藤 吉 好 則

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類では抗原が体内に侵入すると、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 などの他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重鎖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で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各クラスの 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。

鳥類にも複数の抗体のクラスが存在し、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。このように明確に抗体のクラスの経時的変化 (広義のクラススイッチ) を観察できるのは哺乳類のほかに鳥類しかない。鳥類でも末梢 B 細胞における抗体のクラススイッチが行われていることが示唆され、哺乳類と同じクラススイッチ遺伝子組換え機構が働いている可能性が考えられた。本研究では、まず鳥類 (ニワトリ) 抗体重鎖定常部遺伝子上流域のイントロンにクラススイッチ遺伝子組換えを司るスイッチ領域が存在するか否かについて検討した。マウス S 領域をプローブとして、ニワトリ抗体重鎖遺伝子可変部 J 断片から μ 鎖定常部遺伝子までを含むゲノムクローンおよびそのサブクローンに対する緩やかな条件でのサザンハイブリダイゼーションを行い、 μ 鎖定常部遺伝子上流域のイントロンにマウス S 領域と弱い相同性のある領域の存在することを確認した。塩基配列を詳細に決定した結果、この領域は 5.1kb におよぶ 5 塩基対のコンセンサス配列から構成される繰り返し配列であることが示された。つまり、ニワトリ μ 鎖定常部遺伝子上流域のイントロンにもマウス S 領域と類似の構造のスイッチ領域 (ニワトリ S_{μ} 領域) が存在することが明らかになった。

哺乳類ではクラススイッチ遺伝子組換えの結果、 μ 鎖定常部遺伝子を含む領域が染色体上から切り出されることが知られている。ニワトリにもマウスと相同性のあるニワトリ S_{μ} 領域が存在することから、IgG など IgM 以外のアイソタイプの抗体を産生する細胞ではクラススイッチ遺伝子組換えを完了し、 μ 鎖定常部遺伝子を含む領域が染色体上から欠失していることが予想された。ニワトリを抗原刺激すると脾臓内に IgG 産生細胞が高い比率で存在するようになる。申請者は PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法を用いて、抗原刺激した脾臓特異的に μ 鎖定常部遺伝子を含む領域の欠失したゲノム DNA を検出することに成功し、その組換え点は先に同定したニワトリ S_{μ} 領域の中の広い範囲に分布していることを明らかにした。これらの結果は、哺乳類と類似のクラススイッチ遺伝子組換え機構がニワトリにおいても用いられていることを示すものであり、鳥類では初めての報告である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳類において、抗体の多様性は抗体遺伝子可変部領域での VDJ 遺伝子組換えによって産生されている。VDJ 遺伝子組換えは抗体遺伝子可変部において V, D, J 各断片を組み合わせる反応であり、各断片に隣接する保存された組換えシグナル

配列を介して組換えが起こる。この組換え機構は軟骨魚類から哺乳類に至るまで非常によく保存されている。IgG などの IgM 以外のアイソタイプの抗体の産生には抗体のクラススイッチが関与しているが、これも遺伝子組換えによっている。クラススイッチ組換えは VDJ 組換えと機構が異なり、定常部遺伝子上流域のイントロンに存在する繰り返し配列（スイッチ [S] 領域）をシグナルとしたゲノム上の定常部遺伝子間の組換え反応である。この組換え機構の存在は、これまで哺乳類でしか確認されていなかった。

申請者は、ゲノムクローニングとサザンハイブリダイゼーション法により、ニワトリの抗体重鎖定常部 μ 鎖遺伝子上流域のイントロンにマウス S 領域と相同性のある領域（ニワトリに $S\mu$ 領域）が存在することを確認した。さらに、このニワトリ $S\mu$ 領域の全塩基配列を決定し、ニワトリ $S\mu$ 領域が階層性を示す 2 種の繰り返し配列によって構成されていることを明らかにした。マウス $S\mu$ 領域は繰り返し配列の塩基配列決定が困難なため、まだ未決定配列を含んでいる。哺乳類 S 領域と類似の繰り返し配列が抗体重鎖定常部遺伝子上流域に存在していることが確かめられたのは哺乳類以外では初めてのことである。この結果は、哺乳類の S 領域をシグナルとするスイッチ組換え機構が鳥類においても存在することを示唆している。

マウスではクラススイッチ遺伝子組換えによって μ 鎖定常部遺伝子を含む領域が染色体上から切り出される。その結果、クラススイッチを完了し IgM 以外のアイソタイプの抗体を産生する細胞のゲノム DNA は、 μ 鎖定常部遺伝子を欠失している。ハプテン抗原で免疫したニワトリの脾臓内には IgG 陽性細胞が高い比率で存在する。申請者は PCR 法とサザンハイブリダイゼーションを用いて、抗原刺激を受けたニワトリの脾臓特異的に、クラススイッチ遺伝子組換えによって μ 鎖定常部遺伝子の欠失したゲノム DNA を検出することに成功した。検出した PCR 産物の解析から、先に同定したニワトリ $S\mu$ 領域内の広い範囲で組換えが行われていることを明らかにした。この結果はニワトリでも S 領域を介するクラススイッチ遺伝子組換え機構が働いていることを示している。

抗原に対応する抗体の多様性産生機構として、鳥類では哺乳類の VDJ 組換えと異なる遺伝子変換の利用が知られている。申請者の研究結果は、抗体のクラススイッチを引き起こす遺伝子組換え機構に関しては、鳥類、哺乳類の間で基本的に同じ機構が用いられていることを初めて明らかにしたものであり、抗体のクラススイッチ機構の進化という観点からも興味深い成果である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 9 年 9 月 12 日、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。