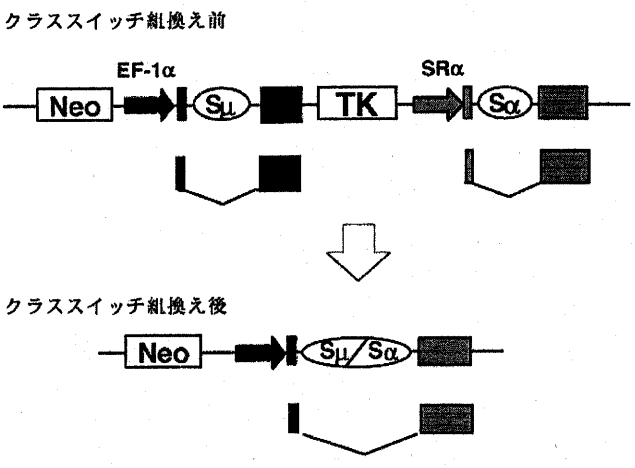
氏名	木下和生（きのした かずお）
学位(専攻分野)	博士（医学）
学位記番号	論医博第1777号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Target specificity of immunoglobulin class switch recombination is not determined by nucleotide sequences of S regions. （免疫グロブリンクラススイッチ組換えの標的特異性はS領域の塩基配列によっては規定されない）
論文調査委員	（主査）教授 湊 長博　教授 坂口志文　教授 本庶 佑

論文内容の要旨

【背景】抗体のクラススイッチは抗体重鎖遺伝子におけるDNA組換えにより制御されている。DNA組換えはスイッチ（S）領域と呼ばれる反復配列に富む配列で起こること，組換えには標的となるS領域の転写が必要であることは分かっているが，その分子機構の詳細は不明である。IgMがクラススイッチによりIgG，IgA，IgEのうちのどのクラスへ変換されるかはサイトカインにより制御されている。組換えに先立って，同じサイトカインが対応するS領域の転写を誘導することから，転写を介した制御がクラス特異性をもたらしているモデルが提唱された（accessibility model）。しかし，未だ同定されていない組換え酵素がクラス毎のS配列を区別する結果，クラス特異性をもたらしている可能性も残されていた。また組換え酵素がサイトカインにより活性化されるのかあるいは恒常的に活性をもつのかについても不明であった。

【目的】申請者はこれらを明らかにするため，クラススイッチ組換え酵素の人工基質を作成し，これを用いて，組換え酵素にはクラス特異性がないことを示し，組換え酵素活性はサイトカインにより誘導されることを示した。

【方法】クラススイッチ組換え酵素の人工基質には2つのS領域があり，それぞれ独立した構成的プロモーター（EF-1α，SRα）により転写を受ける。内在性の抗体遺伝子と同様にS領域はスプライシングにより転写産物から除去される。2つの転写単位の間にはチミジンキナーゼ（TK）遺伝子が挿入されているため，S領域間での組換えが起こった後の細胞をガンシクロビルにより選別することができる。組換え前には上流と下流の転写単位からそれぞれことなる転写産物が生成され，組換え後には，組換え後転写産物が作られる。これらをRT-PCR法により増幅することで組換えを検出することができる。また人工基質DNAを直接genomic PCRで増幅することにより組換えを検出し，また，組換え点の解析を行なうこともできる。



この人工基質をIgAへのクラススイッチを高頻度に誘導することのできるCH12F3-2細胞株に導入した。細胞にサイトカイン刺激（CD40L＋IL-4＋TGF-β）を加え，内在性の抗体遺伝子がIgAへのクラススイッチ組換え（Sμ とSα の組換え）をおこす条件で，人工基質上での組換えが誘導されるかどうかを，RT-PCR, genomic PCR，ガンシクロビル選別により検討した。

【結果】上流の転写単位にSμ，下流の転写単位にSα を配した人工基質の場合，内在性の免疫グロブリン遺伝子がSμ からSα へ組換えを起こすのと同時に，人工基質上でSμ からSα への組換えが誘導された。この組換えがサイトカイン刺激に依存していることと，2つのS領域のうち一つがかけても組換えが起こらなかったことから，人工基質上での組換えはクラススイッチ組換えと同じ機構で起きていると考えられた。さらに，組換えにはS領域の転写だけでは不十分で，サイトカ

イン刺激による組換え酵素の活性化が必要であることが示唆された。

下流のSを他のクラスのS領域（Sγ1，Sε）に置換した基質でも同様に組換えが誘導された。このことは組換えのクラス特異性がS領域の塩基配列では規定されないことを示している。また下流のSαを通常とは逆の向きに配置した場合にも同様に組換えが誘導された。このことはS領域には方向特異性がないことを示している。

【考察】組換え酵素はサイトカイン刺激により活性化されること，組換えのクラス特異性は標的S領域の塩基配列により規定されないことが示され，クラス特異性は標的S領域の転写のみにより制御されていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

抗体のクラススイッチは抗体重鎖遺伝子におけるDNA組換えにより制御されている。特定のクラスへの変換は組換え酵素がクラス間のS配列の違いを認識するのか，組換え酵素活性がサイトカインにより誘導されるのかどうか不明であったので，申請者は新たに組換え酵素の人工基質を作成し，これらの点を検討した。

転写を受ける2つのS領域とそれらの間にチミジンキナーゼ遺伝子を有する組換え酵素の人工基質をIgAへのクラススイッチを高頻度に誘導できるCH12F3-2細胞株に導入した。得られた細胞をCD40L＋IL-4＋TGF-βで刺激し，内在性抗体遺伝子でIgAへのクラススイッチ組換えを誘導する際に，人工基質上での組換えが誘導されるかどうかを検討した。

その結果，上流の転写単位にSμ，下流の転写単位にSαを配した人工基質でSμからSαへの組換えが誘導され，サイトカイン刺激による組換え酵素の活性化が必要であることが示唆された。また，下流のSαを他のクラスのS領域（Sγ1，Sε）に置換した基質，Sαを逆向きに配置した基質でも同様に組換えが誘導された。この研究により，組換え酵素はサイトカイン刺激により活性化されること，組換えのクラス特異性は標的S領域の一次的塩基配列では規定されないことが示された。

本研究は免疫学の中心課題であるクラススイッチDNA組換えの分子機構の解明に寄与するところが大である。よって，本研究は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，本学位授与申請者は，平成14年3月13日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け，合格と認められたものである。