

## 論文の内容の要旨

論文題目：ニワトリ抗体遺伝子座における遺伝子変換と転写の共役

氏名：瀬尾秀宗

### <序>

生物はさまざまな外界の異物の侵入を受けているが、侵入してきた無数の異物を迎撃する機構が免疫システムである。中でも抗体分子は最も重要な役割をはたす因子の一つであることが古くから知られている。限られた数の抗体遺伝子から、多様な異物に対応する抗体分子をつくり出すメカニズムに関しては、数多くの研究がなされてきた。ヒトやマウスでは、抗体遺伝子の一次多様性は V(D)J 組換えにより獲得されることは周知のことであるが、ニワトリやウサギにおいては、これが遺伝子変換により引き起こされることが明らかになっている。この体細胞高頻度遺伝子変換は、高等真核生物の体細胞において遺伝子座特異的に起きる相同組換えであるという点で極めて興味深い現象であるが、さらに相同組換えを用いることで多様性を生み出しているという点は、相同組換えの進化における役割を考える上でも重要である。本研究において筆者は、相同組換えのモデル系としてニワトリ抗体軽鎖遺伝子座における遺伝子変換に着目し、ニワトリ B 細胞由来の培養細胞株 DT 40 を用いて解析を行った。DT 40 培養細胞では、抗体軽鎖遺伝子座において多様性獲得のための遺伝子変換が培養細胞レベルで起きていることが知られている。さらに、ターゲットインテグレーションが可能なことから、遺伝子操作が可能な系として、特に組換えの研究において活発に利用されている細胞株である。本研究では、この DT 40 細胞を用い

て遺伝子変換と転写の関係を解析することを試みた。

体細胞高頻度遺伝子変換と転写の共役関係は、以下の3つ事実から推測された。1) 体細胞高頻度突然変異と体細胞高頻度遺伝子変換は様々な点で機構を共有していることが明らかになってきているが、体細胞高頻度突然変異が転写と共役した現象であること。2) 酵母の減数分裂における遺伝的相同組換えの制御に、転写の機構を利用したクロマチンのアクセシビリティおよびヒストンのアセチル化の上昇が関与していること。3) V(D)J 組換えにおいてもクロマチンのアクセシビリティおよびヒストンアセチル化の上昇が重要であると考えられ、それに伴った転写の活性化がみられること。そこで本研究では、まず DT40 培養細胞をヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) で処理することで、抗体遺伝子座における遺伝子変換頻度にどのような影響が見られるかを調べた。その結果、TSA 処理により遺伝子変換頻度に著しい上昇が観察された。また TSA 存在下で遺伝子変換が活性化されている条件で、抗体遺伝子の転写やヒストンアセチル化が促進されることを確認した。以上の結果は、遺伝子変換が転写と共役して活性化される可能性を示唆する。そこで、次に人為的に転写誘導が可能な系を用いて、転写と遺伝子変換の関係を調べた。その結果、転写活性化に応じて遺伝子変換が活性化されることを見出した。以上から、ニワトリ DT40 細胞内では、転写の活性化と遺伝子変換との間に正の相関があることが強く示唆された。

## <結果と考察>

### トリコスタチン A 処理による遺伝子変換の促進

ニワトリ抗体軽鎖遺伝子座では、正常 V 遺伝子一つしか存在しないが、上流に 25 個の偽 V 遺伝子がクラスターを形成している。遺伝子変換により正常 V 遺伝子に偽 V 遺伝子が次々と上書きされることで、V 遺伝子の多様性が獲得される。DT40 では、抗体軽鎖遺伝子上の遺伝子変換が、培養細胞レベルで起きている。転写と遺伝子変換の関係を調べるために、TSA の遺伝子変換頻度に対する影響を検討した。遺伝子変換頻度は、以下のようにして測定される。通常 DT40 は、細胞表面にレセプター型 IgM を発現しているが、遺伝子変換により抗体遺伝子にフレームシフト変異等が導入され、IgM(-)になる細胞が出現する。遺伝子変換頻度は、この IgM(-)の細胞から IgM(+)細胞が出現する頻度を測定することで解析される。限外希釈法によりクローン化した細胞を 100 万個程度まで増殖させ、抗 IgM 抗体で染色し、FACS により IgM(+)細胞の割合を測定し、遺伝子変換頻度とした。この実験を TSA を加えた培地で行った場合、遺伝子変換頻度の著しい上昇がみられた。この TSA の効果は TSA 濃度依存的、また TSA 処理時間依存的であることも確認し、さらに TSA を抜くことで遺伝子変換頻度の促進は抑制される、可逆的な反応であることも明らか

になった。次に、実際に遺伝子変換が生じているかどうかを検討した。生細胞5000個をソートし、ゲノムを抽出後、PCRで抗体軽鎖遺伝子を増幅し、TAクローニング後、配列を調べた。すると、TSA処理をした細胞では遺伝子変換の結果と考えられる配列が見い出されたのに対し、TSA未処理細胞では特に検出されなかった。TSA処理細胞では、遺伝子変換に加え点突然変異、遺伝子欠失、遺伝子挿入などもみいだされた。次に、TSA処理により抗体軽鎖遺伝子の転写量が変化するかを調べた。リボソーム遺伝子の転写産物で標準化した場合、TSA濃度依存的に転写量は増大する傾向にあることも明らかになった。

#### 人工的コンストラクトにおける遺伝子変換

遺伝子変換の転写との関係をより詳しく解析するため、人工的なコンストラクト上で遺伝子変換を起こさせることを試みた。ニワトリ抗体軽鎖遺伝子に特徴的な配列として、核マトリックス結合領域(MAR)、及び3'エンハンサーがあげられる。テトラサイクリン誘導プロモータ下流にCFP遺伝子をつなぎ、さらにその下流にMAR、3'エンハンサーを配置し、更に誘導プロモーターより上流にGFP遺伝子を挿入したコンストラクトを作製した。CFPとGFPは極めて相同性が高いことから、もしこのコンストラクト上で遺伝子変換が起きうるならば、CFPがGFPに変換されることが期待される。これを、テトラサイクリン誘導転写因子発現ベクターとともにDT40細胞に共感染させ、テトラサイクリン誘導によりCFPを発現するクローンを得た。誘導後、FACSにより蛍光強度を測定すると、誘導時間依存的に通常のCFPより蛍光強度の強いクローンが出現した。本研究で用いたFACSでは、GFPはCFPより強い蛍光を発することから、一部にGFPの蛍光を発する細胞が出現した可能性を示唆している。この強蛍光が、GFPと同じ蛍光であるかどうかを調べるために、誘導5日目の細胞集団を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、CFPの蛍光を発する集団の中に、GFPの蛍光を発する細胞が混在していることが明らかになった。次に、これが遺伝子変換によりCFPがGFPに変換された結果かどうかを確認するため、強蛍光の細胞5000個からゲノムを抽出した後、誘導プロモーター下流の配列を増幅し、クローニング後、配列を解析した。するとCFPとGFPのキメラな配列が4種類、見い出された。同様にして、ドナーとなるGFPの領域の配列を調べると、いずれもGFPの配列しか見い出されなかった。

#### <考察>

TSAはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であることから、TSA処理により細胞全体のヒストンのアセチル化状態は上昇する。一般に、ある領域のクロマチンでのヒストンのアセチル化状態の上昇は、それに伴う転写活性上昇の必要条件であると考えられる。このこ

とから、TSA 処理により遺伝子の転写量は増大する傾向にある。実際本実験において、抗体軽鎖遺伝子の転写活性は TSA 濃度、さらに TSA 処理時間に依存して増大するという結果が得られている。従って、TSA 処理により抗体軽鎖遺伝子における遺伝子変換頻度が上昇したことは、遺伝子変換が転写に依存した制御を受けている可能性を示唆している。しかしながら、TSA 処理は抗体遺伝子の転写のみならず他の様々な因子の転写活性を変化させるため、遺伝子変換頻度の上昇は単に他の因子の転写量の変化による、二次的な影響である可能性も否定できない。そこで試みたのが人工的なコンストラクト上での遺伝子変換である。このコンストラクトにおいては、転写は誘導プロモーターにより制御され、他の因子の転写は影響を受けないことから、より直接的な解析が可能である。CFP と GFP のキメラな配列が見い出されたことは、CFP と GFP の間で組み換えが起こったことを示唆している。さらに、ドナーとなる GFP の配列には変化は見られず、このことは遺伝子変換が起きたことを意味している。FACS および顕微鏡の結果は、この遺伝子変換が転写誘導に依存して起きていること示唆している。以上の結果は、抗体遺伝子の遺伝子変換が転写と共役していることを強く示唆していると考えられる。

#### <展望>

本研究で得られた結果は、技術的観点からみても極めて興味深い。TSA 処理による遺伝子変換の加速や、人工的なコンストラクトにおける遺伝子変換は、人為的に相同組換えを制御しうることを意味している。特に人工的コンストラクトでの遺伝子変換に関しては、PCR を用いて試験管内で相同遺伝子間に相同組換えを起こさせる実験系である DNA シャフリングという技術を、生体内で再現しうることを意味する。DNA シャフリングの結果によると、突然変異よりも相同組換えの方が進化を加速する効果は高いということが示唆されており、細胞内で相同性のある任意の遺伝子の間での組換えを起こさせる技術は、任意の遺伝子を細胞内で進化させることに他ならない。細胞に適当な選択圧をかけることで、従来よりも高い活性を有する酵素等を、細胞内につくらせうる可能性を示唆している。