

## 論文審査の結果の要旨

氏名 瀬尾 秀宗

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

本論文は、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関係について解析した研究であり、4章から構成される。

第1章は、序として、関連分野の概略を解説している。ニワトリ抗体遺伝子座における遺伝子変換にはじまり、最近次々と明らかになりつつあるクロマチン構造による組換えの制御に関し説明するとともに、本実験に用いたDT40培養細胞の紹介も行っている。

第2章は、本論文で用いた方法と材料に関して述べている。

第3章は、DT40を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンA (TSA) による処理が、抗体遺伝子座におけるヒストンのアセチル化を伴った形で遺伝子変換頻度を上昇させるという結果に関して報告している。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。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遺伝子変換頻度を解析した。細胞をTSA処理することにより、IgMの出現頻度が著しく上昇した。これが遺伝子変換頻度の上昇によるものであるかどうかを確認するために、抗体軽鎖遺伝子可変領域の配列を解析した。その結果、TSA処理した細胞の軽鎖可変領域には、遺伝子変換の結果生じたと考えられる配列が多数見られたのに対し、TSA処理していない細胞に関しては全く見られなかった。以上から、TSA処理により、遺伝子変換頻度が上昇したことが示唆された。また、TSA処理は一般的に様々な遺伝子の転写活性を上昇させることから、抗体遺伝子の転写活性に影響を与えているかどうかを、ノーザンブロットにより検討した。その結果、TSA濃度依存的な抗体遺伝子の転写量の上昇がみられた。さらにTSA処理した細胞から抽出したトータルヒストンを、抗アセチル

化ヒストン抗体を用いたウエスタンブロットにより解析したところ、TSA 処理は細胞のヒストン全体のアセチル化状態を昂進させることが明らかになった。またクロマチン免疫沈降法をもちいて、抗体軽鎖遺伝子クロマチンのヒストン H4 のアセチル化状態も、TSA 濃度依存的な上昇を示すことが明らかになった。以上の結果から、ニワトリ抗体遺伝子座における遺伝子変換と、転写の相関関係が示唆された。

第4章は、遺伝子変換と転写の相関をより詳しく検討するために、抗体遺伝子を模した、人工的な構築物を DT40 細胞に導入し、解析している。テトラサイクリン誘導プロモーター下流に ECFP、抗体軽鎖遺伝子 MAR、抗体軽鎖遺伝子エンハンサーを順につなぎ、さらにプロモーターの上流に EGFP を挿入し、この構築物を DT40 に導入した。もしこの構築物で遺伝子変換が起きるのならば、ECFP が EGFP に変換され、これは蛍光の違いにより検出できる。誘導を開始したところ、転写誘導依存的に、EGFP 特異的な蛍光を発する細胞が出現した。これが遺伝子変換の結果であるかどうかを確かめるために、EGFP 特異的な蛍光を発する細胞集団を分取し、プロモーター下流の配列を解析したところ、ECFP 遺伝子と EGFP 遺伝子がキメラを形成した配列が複数見出された。しかしながら、プロモーター上流の配列は、EGFP のみが見られた。これらの結果は、転写誘導依存的に遺伝子変換が起きたことを示唆していると考えられる。

本研究では、細胞生物学的および分子生物学的手法を複合的に用いることによって、抗体遺伝子座における遺伝子変換と転写の共役の機構を研究している。本研究によって得られた結果は、新しい知見を多く含み、免疫細胞における遺伝子変換機構のみならず体細胞一般の組換え機構の研究に寄与するところが多いと考えられる。本論文の第3章および第4章は山田貴富、室伏擴、柴田武彦、太田邦史との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。