
研究報文

マウス抗体クラススイッチ過程の 速度論に基づく解析

宮田 堅司

Analysis for the Class Switching Process of mouse by Rate Theory

Kenji Miyata

Summary

The class-switching process of immunoglobulin(Ig) gene-transcribing cells was investigated in the thymus of BALB/c female mice. The ratios of IgM, IgG1, IgG3 and IgE-transcripts were determined with aging by realtime PCR. Logarithmic values of IgG1/IgM and IgG3/IgM increased rapidly from birth to several weeks and then gradually. While that of IgE/IgM increased similarly to about 7.5 weeks and it decreased afterwards.

Rate theory was applied to analyze these results with supposing both that transcript-quantity was proportional to the number of transcribing cells and that IgM-transcribing cells were supplied continually from stem cells in vivo. On the first order differential concurrent model, in which IgM cells recombined Ig genes and changed to other Ig class-transcribing with rate constants k , the rate equations were solved theoretically. The calculated values of $\log \text{IgG1/IgM}$ and $\log \text{IgG3/IgM}$ were good agreement with experimental ones for periods up to 400 days after birth. But, in the case of $\log \text{IgE/IgM}$, which had a maximum, this theory could not agree the maximum value.

(Received September 8, 2011)

I. はじめに

胸腺は、発生期に原基に流入した幹細胞に由来する T リンパ球がポジティブ-ネガティブ選択を受け分化増殖する一次リンパ性器官とされている^{1), 2)}。しかし、マウス胸腺では、胎生期から抗体遺伝子の転写産物が検出され、生後にはクラススイッチ現象も認められること³⁾、また、少なくとも IgE 転写に関しては脾臓とは異なることを示した⁴⁾。また、抗体 μ 鎖遺伝子の転写産物のうち、膜結合型 IgM の転写産物量の加齢に伴う変化をリアルタイム PCR 法で調べ、加齢に伴う IgM の膜結合型から分泌型への変化を、転写量が転写細胞数に比例すると仮定すれば、細胞の分化過程を一次並列反応の速度論で解析できることを示した⁵⁾。本報では、リアルタイム

PCR 法により、マウス胸腺での IgM, IgG1, IgG3 および IgE の転写量比の加齢変化を測定し、その結果を細胞分化の速度論で説明できることを明らかにした。また、胸腺での T 細胞受容体の β 鎖 (TCR β) と IgM の転写量比も測定し、マウス胸腺には T リンパ球だけでなく、B リンパ球系の細胞が存在し続けることを示唆した。

II. 方法

1. 材料

コンベンショナルな条件下で飼育した BALB/c 雌マウスを用いた。出生後 3 週間は母親マウスと同居させ、21 日齢で分離した。固形試料 (MF, オリエンタル酵母) および水道水は自由に摂取させた。頸椎脱臼させたマウスを開胸し胸腺を摘出した。摘出した試料はサンプルチューブに入れ、直ちに液体窒素中で凍結した後、 -80°C で保存した。

2. トータル RNA の抽出および逆転写反応

凍結した組織より、酸性グアニジチオシアン酸-フェノール-クロロホルム法によってトータル RNA を抽出した⁶⁾。精製したトータル RNA を、濃度 100 ng/μl に調整した水溶液 3 μl を鋳型として逆転写反応を行った。逆転写反応は M-MLV リバーストランスクリプターゼ (ReverTra Ace- a, 東洋紡), oligodT20 プライマーを用い、30℃ で 10 分間、さらに 42℃ で 20 分間行った。99℃ で 5 分間処理することにより反応を停止させるとともに鋳型 RNA を分解した。この反応産物を水で 15 倍に希釈した溶液をリアルタイム PCR の試料溶液とした。

3. リアルタイム PCR

インターカレーター法リアルタイム PCR (LineGene, BioFlux) の反応溶液はメーカーのプロトコルに従い、SYBR Green mix (Real time PCR Master Mix, 東洋紡) 7.5 μl, forward primer および reverse primer (4 pmol/μl) を各 1.5 μl, 試料溶液 4.5 μl, 合計 15 μl とした。PCR 反応は、95℃ 10 分の前処理後、変性 94℃ 15 秒, アニーリング 60℃ 15 秒, 伸長反応 72℃ 30 秒のサイクルを 45 回行い、各サイクルの伸長反応終了毎に蛍光強度を測定し増幅曲線を得た。

さらに、増幅反応終了後に増幅された DNA の融点解析を行い、増幅された DNA が均一なものであることを確認した。増幅反応に用いたプライマーを表 1 に示した。いずれのプライマーも、少なくとも一つのイントロン領域に間に含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。これらのプライマーにより、IgM, IgG1, IgG3, IgE および TCR β の場合ともに、110 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。

4. 転写量比の測定

リアルタイム PCR のインターカレーター法では、増幅された 2 本鎖 DNA に取り込まれた色素が励起されて発する蛍光強度を測定することにより、増幅曲線がリアルタイムに得られる。増幅曲線より蛍光

強度が一定値に達するまでに要した PCR のサイクル数 n を読み取った。たとえば、試料溶液中に存在した IgG1 と IgM とのコピー数比 (転写量比) の常用対数値 $\log \frac{IgG1}{IgM}$ は ① 式で求めることができる⁵⁾

$$\log \frac{IgG1}{IgM} = (n_M - n_{G1}) \log 2 \dots \text{①}$$

ここで、 n_M および n_{G1} は、それぞれ IgM の増幅曲線および IgG1 の増幅曲線の蛍光強度が一定値に達するのに要したサイクル数である。

III. クラススイッチ過程の速度論

抗体産生細胞の分化過程において、抗体遺伝子は μ 鎖および L 鎖の可変領域の再編成の後に転写され始め、膜結合型の IgM が産生される⁷⁾。その後、分化成熟する間に分泌型の IgM や、他のクラスの抗体を産生する様になる。転写量はその転写細胞濃度に比例すると仮定し、IgM 転写細胞から他のクラスの転写細胞へと分化する過程を並列反応とみなした。抗体のクラススイッチ過程は、1 つの抗体産生細胞では一度だけ起こる現象とされているので、IgM 転写細胞から IgG1 転写細胞への分化過程を図 1 の様に表示した。

IgM を転写する M 細胞から IgG1 を転写する G1 細胞

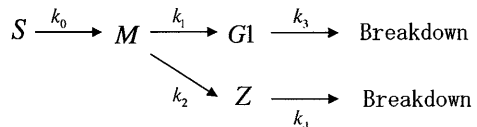


図 1 IgG1 転写細胞の分化過程

IgM 転写細胞 (M) からクラススイッチにより IgG1 転写細胞 (G1) へ分化する過程、および IgD 以外のその他のクラスの転写細胞 (Z) へと分化する過程を並行過程で表した。S は M 細胞の前駆細胞、あるいは幹細胞を表し、M 細胞を供給し続けると仮定した。G1 細胞および Z 細胞は、その後機能を失うか、破壊される。k は各過程の分化の速度定数を表す。

	For.	Rev.
IgM	ACGTGTCTCCACATGTGCT	ACAGGTCAGGTTAGCGGACT
IgG1	TGGCAAGGAGTTCAAATGCA	GAATGGGTACACCTGTGGA
IgG3	AGGAGTTCAAATGCAAGGTC	GTGGGGGTATGGTGTATACT
IgE	AAGAACTTCACATGCCACGT	GATGAATGGAGTAGCTCCAA
TCR β	ACCCAAACCTGTCCACACAGA	CATAGAGGATGGTTGCAGAC

表 1 PCR 反応にもちいたプライマー

これらのプライマーは、少なくとも一つのイントロン領域に間に含むエクソン領域に相補的に結合するように設定した。いずれの場合にも 110 塩基対の DNA 鎖が増幅される。

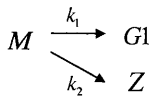


図 2 一次並行反応モデル

この過程の速度式を解く場合に、 M 細胞の濃度 $[M]$ は初期濃度 $[M]_0$ に保たれると仮定する。

胞へ分化する過程の速度定数を k_1 、 $IgG1$ 以外のクラスの抗体を転写する細胞へ分化する過程の速度定数を k_2 とした。 k_0 、 k_3 および k_4 の過程を含む速度式を解くことは困難なので、図 2 に示した並行反応分化過程の速度式を考えると、

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M] - k_2[M] \dots \textcircled{2}$$

$$\frac{d[G1]}{dt} = k_1[M] \dots \textcircled{3}$$

$$\frac{d[Z]}{dt} = k_2[M] \dots \textcircled{4}$$

となる。これらの速度式を解く際に、生体内では前駆細胞あるいは幹細胞を表す S 細胞から M 細胞は供給され続けると考えられるので、 M 細胞の濃度 $[M]$ はほぼ一定に保たれ初期濃度 $[M]_0$ に等しいとおくことにより、図 1 の k_0 過程を考慮すると、

$$\log \frac{[G1]}{[M]} = \log \frac{k_1}{k_1 + k_2} \left\{ 1 - e^{-(k_1 + k_2)t} \right\} \dots \textcircled{5}$$

となる。この式の $[G1]$ および $[M]$ を $IgG1$ および IgM で置き換えれば ① 式となり、この式が転写量比の理論値を与える。

⑤ 式は、 $t \gg 1$ の場合、

$$\log \frac{[G1]}{[M]} = \log \frac{k_1}{k_1 + k_2} \dots \textcircled{6}$$

$t < 1$ の場合、

$$\log \frac{[G1]}{[M]} = \log t + \log k_1 \dots \textcircled{7}$$

となり、加齢に伴い $\log \frac{[G1]}{[M]}$ は一定値に近づくことが予測され、日齢の高い領域の値から $\frac{k_1}{k_1 + k_2}$ を求めることが可能である。一方、 $\log \frac{[G1]}{[M]}$ を $\log t$ に対してプロットすると、日齢の低い領域では傾き 1 の直線となることが予測され、 $\log t$ を 0 に外挿することにより k_1 を求めることが可能である。しかし、 $t < 1$ の領域で精度の高い測定値を得ることは困難なので、 $\log t < 1$ の領域で傾き 1 の直線を利用して k_1 の値を求める。

$IgG3$ および IgE 転写細胞に関しても同様に取り扱

うことが可能である。

IV. 結果および考察

$IgG1$ の場合、 $\log \frac{[G1]}{[M]}$ は $\log t$ に対してほぼ直線的に増大した (図 3)。

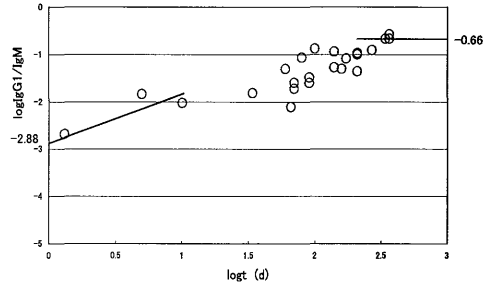


図 3 $IgG1$ 転写細胞分化過程速度定数の決定

$\log \frac{IgG1}{IgM}$ 測定値を $\log t$ に対してプロットした。 $\log t \leq 1$ の領域で傾き 1 の直線を外挿し $\log k_1 = -2.88$ と求めた。また、 t が大きい領域で $\log \frac{k_1}{k_1 + k_2} = -0.66$ と求めた。

日齢 t が大きい領域より、 $\log \frac{[G1]}{[M]} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} = -0.605$ となり、 $\frac{k_1}{k_1 + k_2} = 0.248$ が得られた。また、 $\log t$ が 1 より小さい領域において、傾き 1 の直線と縦軸との交点より $k_1 = 0.0015$ (1/d) が得られた (表 2)。

	k_1 (1/d)	$k_1 / k_1 + k_2$
$\log IgG1 / IgM$	0.0013	0.22
$\log IgG3 / IgM$	0.00019	0.035
$\log IgE / IgM$	0.00021	0.038

表 2 クラススイッチ過程の速度定数

図 3, 4, および 5 より求めた k_1 および $\frac{k_1}{k_1 + k_2}$ の値を示した。

$\log \frac{[G3]}{[M]}$ および $\log \frac{[E]}{[M]}$ を $\log t$ に対してプロットした結果を図 4 および 5 に示した。

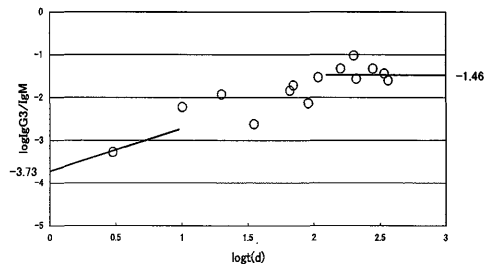


図 4 $\log \frac{IgG3}{IgM} - \log t$ プロット

$\log \frac{IgG3}{IgM}$ の値は $\log t$ に対して直線的に増大した。

$\log \frac{[G3]}{[M]}$ は $\log \frac{[G1]}{[M]}$ の場合と同様にほぼ直線的に増大

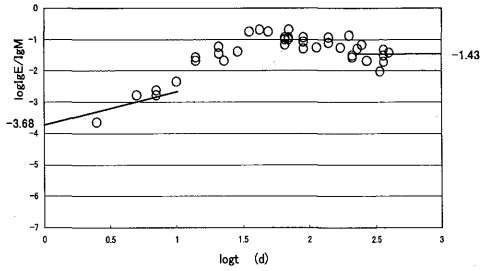


図5 $\log \frac{IgE}{IgM} - \log t$ プロット
 $\log \frac{IgE}{IgM}$ の値は $\log t$ が 1.6 付近で極大となった。

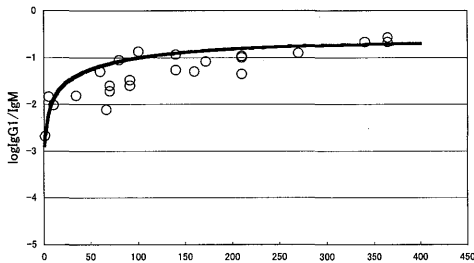


図6 $\log \frac{IgG1}{IgM}$ の加齢変化
 $\log \frac{IgG1}{IgM}$ 値は生後数週齢の間に急激に増大し、その後ほぼ一定値となった。表1に示した速度定数を用いて⑤式により計算した理論曲線も示した。

した。しかし、 $\log \frac{[E]}{[M]}$ の場合には、 $\log t$ が 1.6 付近、すなわち生後7~8週齢あたりまで直線的に増大し、その後緩やかに低下し極大値が存在した。 $\log \frac{[G3]}{[M]}$ および $\log \frac{[E]}{[M]}$ の場合に求めた k_1 および $\frac{k_1}{k_1+k_2}$ の値も表2に示した。

表2の値を用いて⑤式により計算した理論値と測定値の日齢変化を図6、7および8に示した。

$\log \frac{[G1]}{[M]}$ および $\log \frac{[G3]}{[M]}$ の場合には、調べた日齢領域において良く一致し、胸腺内での分化過程を速度論で説明することが可能であった。 $\log \frac{[E]}{[M]}$ の場合には極大値が存在するために、図1に示した様な1次並行反応に基づく速度論では説明できなかった。速度式では反応物質の濃度に依存する項が反応の駆動力となるが、 IgE の転写に関しては濃度項の他に別の駆動力、あるいは濃度項への影響が無視できない因子が存在することが示唆された。

日齢が十分大きい領域、すなわちクラススイッチ反応が定常的に進むと考えられる領域での $\frac{k_1}{k_1+k_2}$ の値は、胸腺でクラススイッチを行う細胞のうち、 IgM 転写細胞から $IgG1$ 、 $IgG3$ あるいは IgE 転写細胞へと分化する比率を表わすと見なすことが可能であ

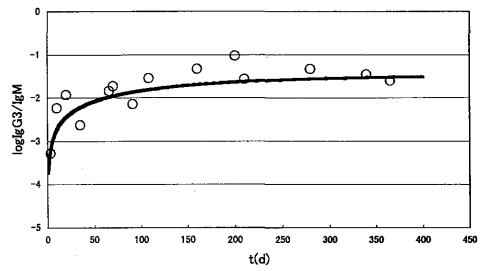


図7 $\log \frac{IgG3}{IgM}$ の加齢変化
 表1に示した速度定数を用いて計算した理論値と良く一致した。

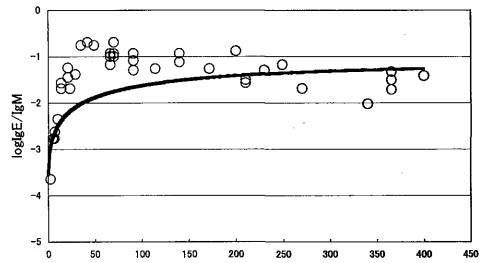


図8 $\log \frac{IgE}{IgM}$ の加齢変化
 $\log \frac{IgE}{IgM}$ の測定値には極大値が存在するために、理論値との乖離が認められた。

る。この値は $IgG1$ の場合が最も大きく、約22%であった。 IgE 転写細胞および $IgG3$ 転写細胞へと分化する比率は、それぞれ約3%であり、胸腺での IgE 転写細胞への分化の割合は意外に大きかった。血中の IgE 抗体量は、 $IgG1$ や $IgG3$ 抗体量と比較すると極微量であることが知られている⁸⁾。このことは、胸腺で検出された IgE の転写が胸腺に分布する血管内に存在するBリンパ球に由来するものではないことを示唆している。すなわち、胸腺はTリンパ球が分化成熟する器官とされているけれども、抗体遺伝子を転写する細胞が存在し、クラススイッチも起きていることからすると、Bリンパ球系の細胞も分化する器官であることが示唆される。 $TCR \beta$ をTリンパ球の指標、 IgM をBリンパ球の指標として、これらの転写量比 $\frac{IgM}{TCR \beta}$ の値は生後直後から徐々に増大し、およそ10倍まで増大した(図9)。このことは胸腺にBリンパ球が存在し続けることを示唆している。

V. 要約

マウス胸腺での抗体遺伝子の転写量比の経時変化を測定し、胸腺でも抗体のクラススイッチ過程が起

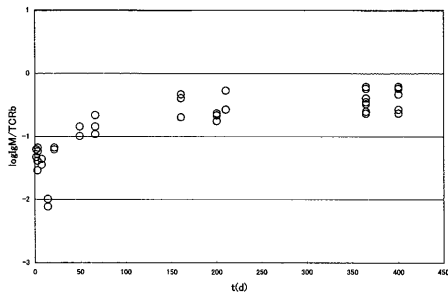


図 9 $\log \frac{IgM}{TCRb}$ の加齢変化

加齢に伴い徐々に増大し、20 週齢あたりからほぼ一定となった。

きていることを示唆した。また、クラススイッチ過程の細胞分化を一次並行反応とみなすことにより、測定結果を速度論で解析する方法を示した。ただし、 IgE の結果に関しては、濃度項が分化反応の駆動力である反応速度論では説明できず、他の因子を考慮した方法論が必要であることが判明した。

文献

- 1) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male : *Immunology*, 5th ed. (Mosby) , 158 (1998)
- 2) R. Rugh : *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing) , 265 (1968)
- 3) 安達綾希子, 井上摩耶, 大野理絵, 城清佳, 長尾美沙子, 宮田堅司 : 本誌, **61**, 7-12 (2006)
- 4) 浅貝愛美, 木下裕子, 瀧本優子, 辻朋子, 長谷麻子, 山本愛子, 宮田堅司 : 本誌, **60**, 1-5 (2005)
- 5) 楠本瑠美, 長尾由貴子, 橋本珠実, 舟木真知子, 三仲亜季子, 森林さやか, 山田浄, 宮田堅司 : 本誌, **62**, 13-17 (2007)
- 5) P. Chomczynski and N. Sacchi : *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 7) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male : *Immunology*, 5th ed. (Mosby) , 163 (1998)
- 8) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male : *Immunology*, 5th ed. (Mosby) , 72 (1998)