
研究報文

抗体遺伝子転写細胞の分化過程の解析

—速度論による解析—

楠本 瑠美, 長尾由貴子, 橋本 珠実, 船木真知子, 三仲亜季子,
森林さやか, 山田 淨, 宮田 堅司

Analysis of The Differential Process of Immunoglobulin Gene-Transcribing-cells —Application of kinetic theory—

Rumi Kusumoto, Yukiko Nagao, Tamami Hashimoto, Machiko Funaki, Akiko Minaka,
Sayaka Moribayashi, Kiyoko Yamada and Kenji Miyata

Differential processes of immunoglobulin (Ig) gene-transcribing cells were investigated in the thymus of BALB/c male mice from neonatal to 40 weeks old. Both membrane-bound type IgM (IgM_m) and total IgM (IgM_t) transcriptions were detected by realtime PCR and the IgM_m/IgM_t ratios were determined. The ratio was approximately 1 to 1 week after the birth, and then decreased gradually following to age increase.

Kinetics was applied in order to analyze the result with supposing that the transcription quantity was proportional to the cell number, that immature cells transcribing membrane-bound type IgM_m continued to be supplied from stem cells *in vivo*, and that the concentration of total cells transcribing IgM_t was unchanged in the thymus with age. Immature IgM_m cells were thought to differentiate either to ones transcribing secretory type IgM (IgM_s) or to other class Ig-transcribing by recombining heavy-chain genes. Theoretical values were in fair agreement with experimental values of $\log IgM_m/IgM_t$ on the first order concurrent reaction process and the rate constants for each process were determined.

(Received September 1, 2007)

1. 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⁾。さらに、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 Realtime PCR 法で調べ、加齢に伴い膜結合型 IgM の

転写産物量が減少し、分泌型 IgM の転写産物量が増加する、すなわち胸腺の抗体遺伝子転写細胞も、抗原受容体としての膜結合型 IgM を持つ未成熟段階の細胞から⁵⁾分泌型 IgM を産生する成熟段階の細胞⁶⁾へと分化することを示した⁷⁾。本報では、加齢に伴う IgM の膜結合型から分泌型への転写量変化を、転写細胞数の変化と見なすことにより、一次並列反応の速度論で解析することを試みた。

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 雄マウスを用いた。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. RNAの抽出

凍結した組織より、酸性グアニジンチオシアン酸-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⁸⁾。エタノール沈殿法により精製したトータル RNA を、濃度 $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ に調整した。

3. 逆転写反応およびRealtime PCR

トータル RNA 300 ng 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- α , 東洋紡), oligodT20 プライマーを用い、 30°C で 10 分間、さらに 42°C で 20 分間行った。 99°C 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 (15 倍希釈試料溶液) を試料として Realtime PCR (LineGene, BioFlux) を行った。反応溶液はメーカーのプロトコールに従い、SYBR Green mix (Realtime PCR Master Mix, 東洋紡) $5\mu\text{l}$, forward primer および reverse primer ($4\text{ pmol}/\mu\text{l}$) を各 $1\mu\text{l}$, 15 倍希釈試料溶液 $3\mu\text{l}$, 合計 $10\mu\text{l}$ とした。PCR 反応は、 95°C 10 分の後、変性 94°C 15 秒, アニーリング 60°C 15 秒, 伸長反応 72°C 30 秒のサイクルを 45 回行い、各サイクルの伸長反応終了時点毎に蛍光強度を測定し、トータルの IgM (IgM_t) および膜結合型 IgM (IgM_m) の増幅曲線を得た。

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下記に示す。プライマーは、少なくとも一つのイントロン領域を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_t (全 IgM) および IgM_m (膜結合型 IgM) とともに 110 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。

プライマー IgM_t-R AACGTGTCCTCCACATGTGC
 プライマー IgM_t-F ACAGGTCAGGTTAGCGGACT
 プライマー IgM_m-R TATACCTGTGTTGTAGGCCA
 プライマー IgM_m-F AGGTTCTCAAAGCCTTCCTC

4. IgM_m/IgM_t比の測定

Realtime 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。IgM_t および IgM_m の増

幅曲線より、それぞれ蛍光強度が一定値 (相対強度 30) に達するまでに要した PCR のサイクル数 n_t および n_m を読み取った。15 倍希釈試料溶液中に存在した IgM_m と IgM_t のコピー数比の常用対数値 $\log_{10} \text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ は (1) 式で求めた⁵⁾。

$$\log_{10} \frac{\text{IgM}_m}{\text{IgM}_t} = (n_t - n_m) \log_{10} 2 \quad (1)$$

また、分泌型 IgM (IgM_s) と IgM_t のコピー数比の常用対数値 $\log_{10} \text{IgM}_s/\text{IgM}_t$ は、IgM_t と IgM_m のコピー数の差が分泌型 IgM_s のコピー数として、(2) 式で求めた。

$$\log_{10} \frac{\text{IgM}_s}{\text{IgM}_t} = \log_{10} (1 - 2^{n_t - n_m}) \quad (2)$$

III. 理 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_m が産生される⁵⁾。その後、成熟し分裂増殖する間に分泌型の IgM_s や、他のクラスの抗体を産生する様になる。抗体遺伝子の転写量は転写細胞数に比例すると仮定し、この抗体産生細胞の分化過程に反応速度論を適用した。

図 1a に示した様な分化過程を考える。M_m (膜結合型 IgM_m 転写) 細胞は M_s (分泌型 IgM_s 転写) 細胞およびクラススイッチにより他のクラスの抗体遺伝子を転写する細胞 (Z) へ分化することが可能であり、その後、細胞は機能を失うか破壊される。S は M_m 細胞の前駆細胞、あるいは、さらに遡って幹細胞を表す。ただし、IgD は IgM と同じ遺伝子転写産物のスプライシングの違いに因り生じるので⁹⁾、このモデルでは表示できない。k₀, k₁, k₂, k₃ および k₄ はそれぞれの反応過程の速度定数を表す。

この場合の速度式を解くことは不可能なので、k₁ および k₂ の並行反応過程のみを考える (図 1b)。

この場合の速度式は

$$\frac{d[M_m]}{dt} = -k_1[M_m] - k_2[M_m]$$

$$\frac{d[M_s]}{dt} = k_1[M_m]$$

$$\frac{d[Z]}{dt} = k_2[M_m]$$

となる。ここで [M_m] および [M_s] は M_m 細胞および M_s 細胞の濃度を表す。また、[M_t] は M_m 細胞と M_s 細胞を合わせた細胞の濃度である。これらを解くと (3) 式が得られる。

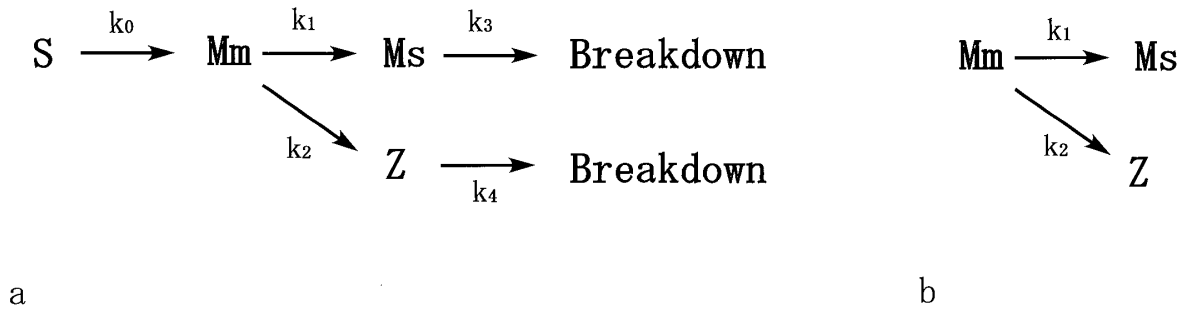


図 1 抗体遺伝子転写細胞の反応過程

a. 膜結合型 IgM を転写する細胞 (Mm) は、その前駆細胞、あるいは幹細胞 (S) から供給され続ける。Mm 細胞は、分泌型 IgM を転写する細胞 (Ms) へ、あるいは、クラススイッチを起こし他のクラスの Ig を転写する細胞 (Z) へ変化する。Ms あるいは Z 細胞は、その後機能を失うか、破壊される。k は各過程の速度定数
 b. 一次並行反応モデル

$$[M_s] = \frac{k_1}{k_1 + k_2} [M_m]_0 \{1 - e^{-(k_1 + k_2)t}\} \quad (3)$$

ただし、 $[M_m]_0$ は M_m 細胞の初期濃度である。生体内では図 1a に示した様に M_m 細胞は S 細胞から供給され続け、 $[M_t]$ は変わらないとすることにより、 k_0 、 k_3 および k_4 の過程を考慮する。また、分化初期には IgM 転写細胞は全て膜結合型の M_m 細胞であると考えられるので、

$$[M_m]_0 = [M_t]_0 \cong [M_t] \quad (4)$$

とおくと、

$$\log_{10} \frac{[M_m]}{[M_t]} = \log_{10} \left[1 + \frac{k_1}{k_1 + k_2} \{e^{-(k_1 + k_2)t} - 1\} \right] \quad (5)$$

$$\log_{10} \frac{[M_s]}{[M_t]} = \log_{10} \frac{k_1}{k_1 + k_2} \{1 - e^{-(k_1 + k_2)t}\} \quad (6)$$

が得られる。(5) 式より、 t が小さい場合には (7) 式が成立し

$$\log_{10} \frac{[M_m]}{[M_t]} = -0.434k_1 t \quad (7)$$

t が大きい場合には (8) 式が成立する。

$$\log_{10} \frac{[M_m]}{[M_t]} = \log_{10} \left(1 - \frac{k_1}{k_1 + k_2} \right) \quad (8)$$

IV. 結果および考察

(1) および (2) 式におけるコピー数比 $\log_{10} \text{IgM}_m / \text{IgM}_t$ および $\log_{10} \text{IgM}_s / \text{IgM}_t$ を細胞濃度比に置き換え、日齡 t が比較的小さい領域での $\log_{10} [M_m] / [M_t]$ の実験値を t に対してプロットし、原点を通る直線を引くと傾きは -0.0125 (1/d) となり、(7) 式より $k_1 = 0.0289$ (1/d) が得られた (図 2)。

また、 t が十分大きい領域では $\log_{10} [M_m] / [M_t]$ は

-1.20 となり、(8) 式より $\frac{k_1}{k_1 + k_2} = 0.937$ 、 $k_2 = 0.00194$ (1/d) が得られた (図 3)。これらの値を用いて $\log_{10} [M_m] / [M_t]$ を (5) 式より、また、 $\log_{10} [M_s] / [M_t]$ を (6) 式より計算した理論値および実測値を図 3 に示した。

実測値は、生後 1 週齢まではほとんど膜結合型 IgM_m であり、その後減少した。分泌型 IgM_s は徐々に増加し、3 週齢あたりで $\text{IgM}_m / \text{IgM}_t$ 比と $\text{IgM}_s / \text{IgM}_t$ 比が等しくなり、その後は IgM_s の方が多くなった。一方、理論曲線は 20.5 日で交叉し、この値は実測値と良く一致した。このことは、本解析方法が妥当なものであることを示唆している。 $\log_{10} [M_m] / [M_t]$ および $\log_{10} [M_s] / [M_t]$ の理論値は生後 20 週齢以降ほぼ一定となった。すなわち、免疫系が十分に分化していると考えられる段階でも、IgM 転写細胞の約 6% は膜結合型 IgM_m を転写している細胞であり、胸腺には幹細胞から分化してくる未成熟な M_m 細胞が存在し続けることが示唆された。

速度定数は $k_1 = 0.0289$ (1/d) および $k_2 = 0.00194$ (1/d) となり、 k_1 は k_2 の約 15 倍であった。

k_1 は M_m 細胞から M_s 細胞へ変わる過程の速度定数であり、 k_2 は IgM_m からクラススイッチで他のクラスの抗体遺伝子を転写する細胞 Z へ変わる過程の速度定数である。したがって、膜結合型 IgM_m を転写する細胞はほとんどが分泌型の IgM_s 転写細胞へと分化し、クラススイッチを行う細胞は約 6% にすぎなかった。抗原を強制的に接種すると、一次応答過程においては主に IgM が産生され、二次応答では IgG が多量に産生されることが知られている¹⁰⁾。しかし、強制的な抗原接種を行わず、環境抗原に暴露されている条件下でも、クラススイッチは起こり、

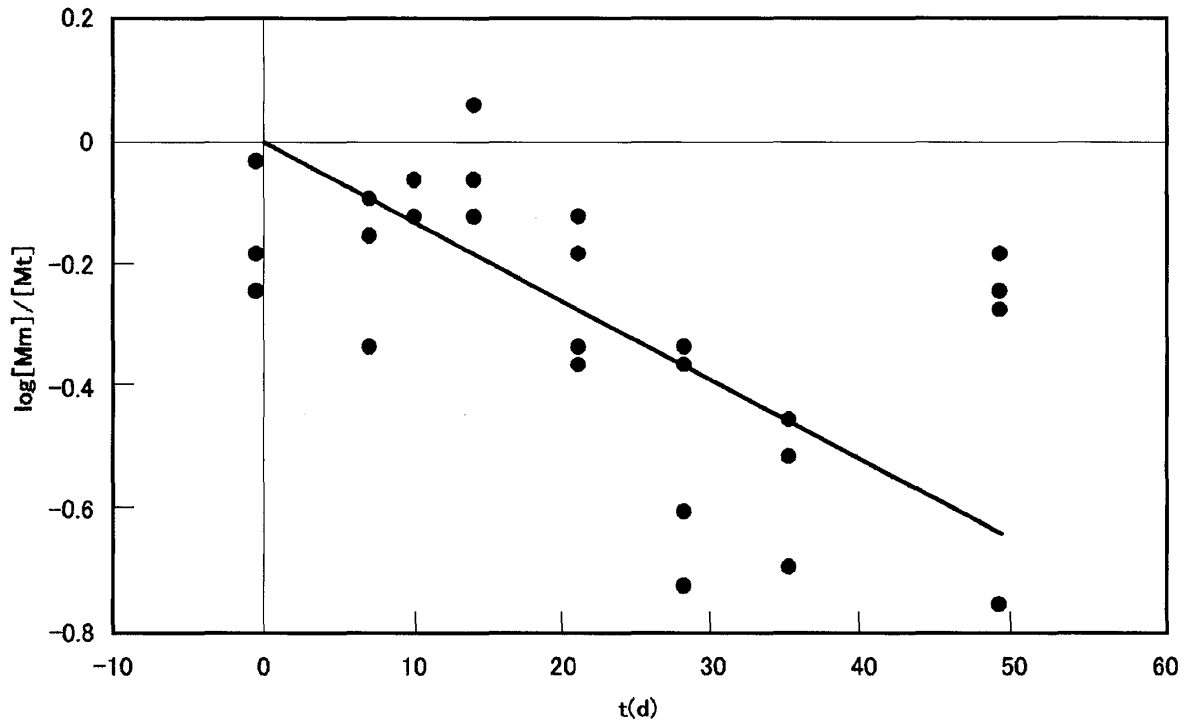


図 2 速度定数 k_1 の決定

7 週齢までの測定値 $\log[M_m]/[M_t]$ を t に対してプロットした。原点を通る近似直線の傾きは -0.01256 (1/d) となり、 $k_1=0.0289$ (1/d) が得られた

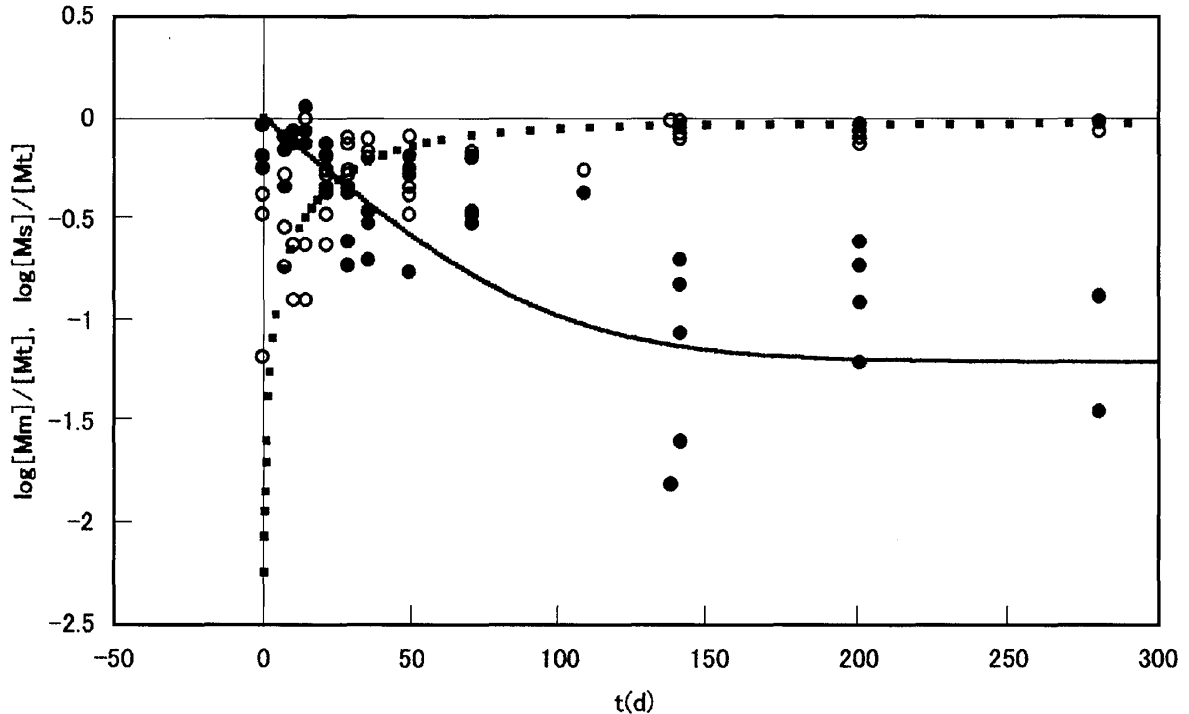


図 3 $\log[M_m]/[M_t]$ および $\log[M_s]/[M_t]$ の加齢変化

加齢に伴い $\log[M_m]/[M_t]$ (●) の測定値は徐々に減少し、 $\log[M_s]/[M_t]$ (○) の値は増大した。両者の値は 3 週齢で逆転した。 t が大きい領域での $\log[M_m]/[M_t]$ の値より、 $\frac{k_1}{k_1+k_2}=0.937$, $k_2=0.00194$ (1/d) が得られた。これらの値を用いて、一次並行反応にモデルにより計算した $\log[M_m]/[M_t]$ (—) の値、および $\log[M_s]/[M_t]$ (⋯) の値は測定値と良く一致した。また、2つの理論曲線は 20.5 日で交叉した。

RTPCR 法による逆転写産物を電気泳動したゲルの
デンストメトリーによると, IgM が最も多く転写さ
れているけれども, IgG や IgE もかなり転写されて
いる⁴⁾。この差異は, M_m 細胞が M_s 細胞や Z 細胞へ
変わる並列過程のみでなく, M_s 細胞でクラススィッ
チがおこり Z 細胞へ変化する過程も存在することを
示唆している。

(平成19.9.1.受付)

引用文献

- 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) 池田江季, 伊藤真紀子, 今井由実, 木村望美, 中嶋真理, 西川美絵, 若林明日香, 宮田堅司: 本誌, **59**, 31-36 (2004)
- 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) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 163 (1998)
- 6) R. C. Mackay: *Adv. Immunolo.*, **53**, 217 (1993)
- 7) 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)
- 8) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, **162**, 156 (1987)
- 9) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5th ed. (Mosby), 167 (1998)
- 10) K. T. Blackwell and W. F. Alt: *Annu. Rev. Genet.*, **23**, 605 (1989)