
研究報文

抗体クラススイッチ過程の活性化自由エネルギー

犬竹真奈美, 梶谷 奈央, 高橋 知実, 富永佳央理,
仲林 祐衣, 藤本 真代, 山戸 美幸, 宮田 堅司

Free Energy of Activation in vivo for the Class Switch Process of Antibody

Manami Inutake, Nao Kajitani, Tomomi Takahashi, Kaori Tominaga,
Yui Nakabayashi, Mayo Fujimoto, Miyuki Yamato and Kenji Miyata

Membrane-bound form IgM (IgM_m) and total IgM (IgM_t) transcriptions were measured by real time PCR method in the thymus and the spleen of BALB/c male mice and the change of logIgM_m/IgM_t ratios with age were detected. Kinetics was applied and both the rate constant k_1 , corresponding to the process in which IgM_m-transcribing cells differentiate into ones transcribing secretory type IgM and k_2 , corresponding to the process in which those into cells transcribing other class Ig, were determined.

ΔG_1^* and ΔG_2^* , free energy of activation corresponding to k_1 and k_2 process in each, were calculated from k_1 and k_2 by application of theory of absolute reaction rate. ΔG_1^* and ΔG_2^* were 110 to 120 kJ/mol both in the thymus and in the spleen. By considering the phenomenal differences in k_1 and k_2 processes, the difference of ΔG_2^* and ΔG_1^* might be able to regard as the free energy of immunoglobulin class switch process ΔG_c^* . The values of ΔG_c^* were small unexpectedly, 2.9 kJ/mol in the thymus and 5.7 kJ/mol in the spleen.

(Received September 22, 2008)

I. はじめに

前報において、リアルタイムPCR法により、BALB/c マウスの胸腺での膜結合型 IgM (IgM_m) と全 IgM (IgM_t; 膜結合型と分泌型の和) の転写量比の加齢変化を測定し、その結果を速度論で解析できることを示した¹⁾。本報では、胸腺の他に脾臓における転写量比の加齢変化を測定し、IgM_m 転写細胞から分泌型 IgM を転写する細胞へ、あるいは他のクラスの抗体を転写する細胞へと変わる過程の速度定数を求めた。また、強制的に抗原を投与した場合の転写量比の変化を調べた。

通常、ある過程の活性化エネルギーは、温度を変化させて速度定数を測定することにより求められる

ので²⁾、in vivo での測定は困難である。そこで、リアルタイム PCR 法の測定結果を速度論で解析することにより求めた速度定数に、絶対反応速度論を適用することにより、マウスでの抗体遺伝子のクラススイッチ過程の活性化自由エネルギーを計算することを試みた³⁾。

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。固形飼料 (MF, オリエンタル酵母) および水道水は自由に摂取させた。生後直後より 400 日齢まで、経時的に頸椎脱臼させたマウスを開腹、開胸し胸腺および脾臓を摘出した。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。

抗原としてオボムコイド (Sigma, T9253) を用いた。オボムコイドを生理食塩水に溶解 (4mg/ml) し、等容積の Freund のコンプリートアジュバント (Difco, 263810) と十分に混合、W/O 型のエマルジョンとし、28日齢および223日齢マウスの背部皮下に 0.1ml (オボムコイド $100\mu\text{g}$) 接種した。14日後に Freund のインコンプリートアジュバント (Difco, 263910) をもちい、同様に調製したエマルジョン 0.1ml (オボムコイド $100\mu\text{g}$) を同部位に接種した。接種後2~7日後に胸腺および脾臓を摘出、凍結保存した。

2. RNA の抽出、逆転写反応および Realtime PCR

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⁴⁾。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。トータル RNA 300ng 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、メーカーのプロトコールに従い、 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 (Line Gene, Bio Flux) を行った。反応は、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 $10\mu\text{l}$ の溶液、あるいは、それぞれ1.5倍容量をもちい、合計 $15\mu\text{l}$ の溶液で行った。PCR 反応は、 95°C 10分の前処理の後、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、 IgM_t および 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⁵⁾。プライマーは、少なくとも一つのイントロン領域を間を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 および IgM_m 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 TATACCTGTGTGTAGGCCA

プライマー- IgM_m -F AGGTTCTCAAAGCCTTCCTC

3. $\text{IgM}_m/\text{IgM}_t$ 比の測定

Realtime PCR のインターカラー法では、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40) 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。PCR 反応前に、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¹⁾。

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

III. 結果および考察

胸腺および脾臓での転写量比 $\log_{10} \frac{\text{IgM}_m}{\text{IgM}_t}$ を図1および2に示した。

前報と同様に、転写量は転写細胞数に比例すると仮定し、速度論を適用することにより¹⁾、膜結合型 IgM_m 転写細胞 M_m から分泌型 IgM_s 転写細胞 M_s への分化過程の速度定数 k_1 、および他の抗体クラスへの転写細胞への分化過程の速度定数 k_2 とを求めた (表1)。

また、これらの速度定数を用いて計算した転写量比 $\log_{10} \frac{\text{IgM}_m}{\text{IgM}_t}$ の経時変化の理論曲線も図1および2に示した。胸腺および脾臓の場合ともに、転写量比 $\log_{10} \frac{\text{IgM}_m}{\text{IgM}_t}$ は生後10週齢までは急激に減少し、その後ほぼ一定となる傾向を説明できた。

反応速度定数 k は、絶対反応速度論によると、透過係数を1とすると

$$k = \frac{\kappa T}{h} e^{-\Delta G^*/RT} \quad (2)$$

と表すことができる⁶⁾。ここで、 κ は Boltzmann 定数 $1.380 \times 10^{-23} \text{J/K}$, T は絶対温度、 h は Planck 定数 $6.626 \times 10^{-34} \text{Js}$, ΔG^* は活性化自由エネルギー、 R は気体定数 8.314J/Kmol である。胸腺および脾臓に関して、速度定数 k_1 および k_2 の値を用いて、 $T = 310\text{K}$ として (2) 式より計算した活性化自由エネルギー ΔG^*_1 および ΔG^*_2 を表1に示した。 ΔG^*_1 および ΔG^*_2 の値はおよそ 115kJ/mol 前後となった。これらの活性化自由エネルギーに対応する生体内過程は複雑であるけれども、 k_1 に対応する過程と k_2 に対応する過程との最も著しい、また、おそらく唯一の差異はクラススイッチ過程の存在である⁷⁾。したがって、 ΔG^*_2 と ΔG^*_1 の差をクラススイッチ過程

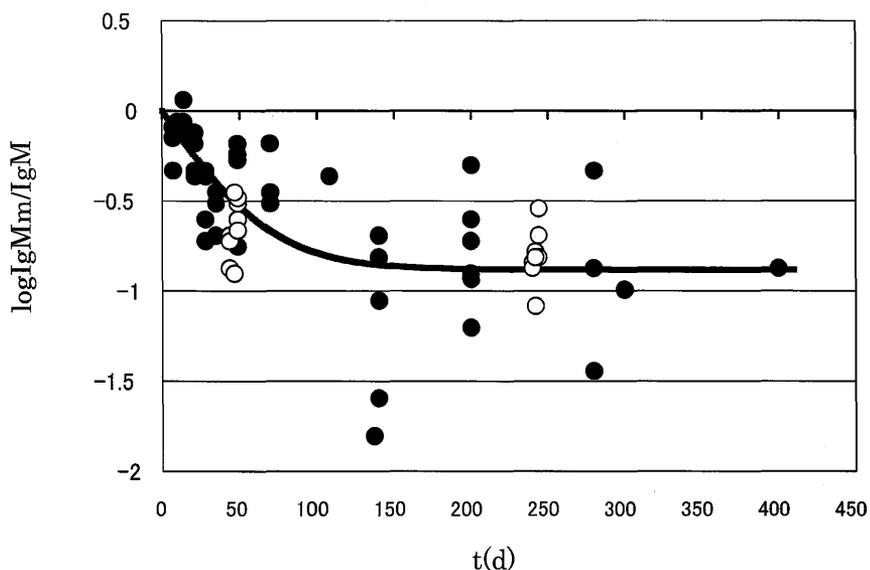


図 1 胸腺における転写量比の加齢変化

無処置マウスの膜結合型 IgMm と IgM の転写量比 $\log\text{IgMm/IgM}$ (●) は、生後 7 週齢あたりまで急激に低下し、その後、加齢に伴いほぼ一定値に近づいた。また、表 1 の速度定数 k_1 および k_2 を用いて計算した理論値 (—) を示した¹⁾。抗原接種による $\log\text{IgMm/IgM}$ (○) の変化は認められなかった。

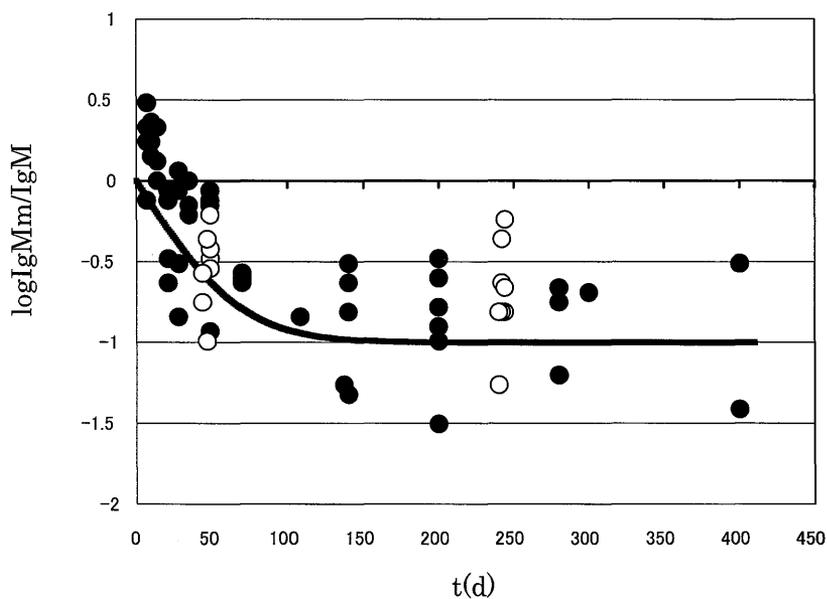


図 2 脾臓における転写量比の加齢変化

無処置マウスの膜結合型 IgMm と IgM の転写量比 $\log\text{IgMm/IgM}$ (●) は、生後急激に低下し、その後、加齢に伴いほぼ一定値に近づいた。また、表 1 の速度定数 k_1 および k_2 を用いて計算した理論値 (—) を示した¹⁾。抗原接種による $\log\text{IgMm/IgM}$ (○) の変化は認められなかった。

表1 速度定数および活性化自由エネルギー

	k_1 (1/d)	k_2 (1/d)	ΔG_1^* (kJ/mol)	ΔG_2^* (kJ/mol)	ΔG_e^* (kJ/mol)
胸 腺	0.0289	0.00438	116.4	119.3	2.9
脾 臓	0.0345	0.00382	114.0	119.7	5.7

の活性化エネルギー ΔG^* とみなすことが可能である。 ΔG^* の値は、胸腺では2.9kJ/mol、脾臓では5.7 kJ/molとなった。クラススイッチ過程の活性化自由エネルギーは以外に小さく、ATP1molの加水分解で供給可能な値であり、生体内での値として妥当な値であると考えられる。(2)式により活性化自由エネルギーを計算する際に、透過係数を1と仮定しない場合には、 ΔG^*_1 および ΔG^*_2 の値は表に示した値とは異なってくるけれども、 k_1 および k_2 過程での透過係数はほぼ等しいと置くと、クラススイッチ過程の活性化エネルギー ΔG^* は表の値となる。

クラススイッチ過程の活性化自由エネルギーは小さな値であった。抗体遺伝子のクラススイッチ過程は、酵素によるDNAの組換えが起こる過程でDNAの切断を伴う複雑な反応であり⁸⁾、活性化エンタルピーは相当に大きな値であると推測される。しかし、同時に、エンタルピー変化を打ち消すのに十分なエントロピー変化が起きているものと考えられる。

抗原としてオボムコイドを接種したマウスの胸腺および脾臓での測定値も図1および2に示した。抗原投与した6週齢および34週齢近傍のマウスでの転写量比 $\log_{10} \frac{IgM_m}{IgM_r}$ は、胸腺および脾臓ともに、無処置マウスの結果と変わらなかった。抗原接種しても、クラススイッチを起こす反応の速度定数は変わらず、すなわち、活性化自由エネルギーも変化しなかった。このことは、抗原接種により、あるクラスの抗体遺

伝子の転写細胞が増加してくる現象は、抗原を認識可能な受容体を持った既存の細胞が選択され分裂増殖する、いわゆるクローン選択⁹⁾が起きていることによると考えられる。

文 献

- 1) 楠本瑠美, 長尾由貴子, 橋本珠実, 船木真知子, 三仲亜希子, 森林さやか, 山田 淨, 宮田堅司: 本誌, 62, 13 (2007)
- 2) V. Fried, U. Blukis and H.F. Hameka: *Physical chemistry*, (Macmillan Publishing), 68 (1977)
- 3) 猪飼 篤 監訳, 櫻井 実, 佐藤 衛, 中西 守, 伏見 譲 訳: *バイオサイエンスのための物理化学*, (東京化学同人), 230 (2004)
- 4) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, 162, 156 (1987)
- 5) 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)
- 6) 長谷川繁夫, 平井西夫, 後藤春雄 訳: *アイリグ絶対反応速度論 上*, (吉岡書店), 201 (1964)
- 7) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5 th ed. (Mosby), 102 (1998)
- 8) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: *Immunology*, 5 th ed. (Mosby), 167 (1998)
- 9) K. Rajewsky: *Nature*, 381, 751 (1996)