

研究報文

マウス CD3 サブユニットの転写量比について

岡部 由実, 奥村 朋子, 風味 紗知子
 笹川 万李衣, 宮田 堅司

The Transcript-ratios of CD3 Subunits of Mouse

Yumi Okabe, Tomoko Okumura, Sachiko Kazami,
 Marie Sasagawa and Kenji Miyata

Summary

The transcripts of T cell receptor β chain (TCR β) and CD3 subunits, CD3 γ , CD3 δ and CD3 ϵ , were detected through realtime PCR in thymus and spleen of BALB/c female mouse from neonates to 400 days. The logarithmic transcript-ratios of logCD3 γ /TCR β and logCD3 δ /TCR β were equal nearly, and larger than those of LogCD3 ϵ /TCR β by 1 in thymus and spleen over all measurements. Genes of CD3 γ , CD3 δ and CD3 ϵ were known to localize on a chromosome 9, and the distance between CD3 γ and CD3 δ was 1.2 kb.p.. Whereas CD3 ϵ gene was apart 12 kb.p. at least from CD3 γ or CD3 δ . From the consideration by the equation for transcription, it was suggested that genes of CD3 γ and δ were situated in an identical atmosphere where usable energy for transcription was same level.

(Received September 11, 2013)

I. はじめに

二種類の遺伝子間の転写量比は、リアルタイム PCR 法により容易に測定可能である^(1,2)。前報において、分子レベルで転写現象の力学モデルを考察し、遺伝子間の転写量比の加齢変化を記述する二階微分方程式 (転写方程式) を導き、マウス胸腺における T 細胞受容体 β 鎖と種々のインターロイキン (IL) との転写量比の加齢変化をよく説明できることを示した⁽³⁾。転写量比の加齢変化を転写方程式に基づき解析することにより、その遺伝子の転写に利用可能なエネルギーに関する情報を得ることができる。

T 細胞受容体複合体は T 細胞受容体 (TCR) の α , β 鎖と CD3 の複合体であり、CD3 は γ , δ , ϵ および ζ 鎖からなる⁽⁴⁾。本報では、マウスの T 細胞受容体複合体を構成するサブユニット間の転写量比の加齢変化を測定し、CD3 γ , δ 鎖と ϵ 鎖との転写量は約 10 倍異なることを見だし、この差違について考察した。

II. 方法

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。胸腺および脾臓の摘出、トータル RNA の抽出、逆転写反応およびリアルタイム PCR はこれまでと同様に行った⁽²⁾。T 細胞受容体 β 鎖 (TCR β) および CD3 の γ 鎖 (CD3 γ)、 δ 鎖 (CD3 δ) および ϵ 鎖 (CD3 ϵ) を検出するのに用いた PCR 用のプライマーを表 1 に示した。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、いずれの場合にも 110 塩基対の DNA フラグメントが増幅される。

表 1 リアルタイム PCR で用いたプライマー

	For.	Rev.
TCR β	ACCCAAACCTGTACACAGA	CATAGAGGATGGTTCAGAC
CD3 γ	TATCTCATTGCGGGACAGGA	TGGTCATATTCGCCGTCTT
CD3 δ	ACTGCTTTGACAGACATGAG	CTGGGTATCTTCACGATCTC
CD3 ϵ	AAGAATAGGAAGGCCAAGGC	TCATAGTCTGGTGGGAAC

得られた増幅曲線より、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。例えば、試料溶液中に存在した $TCR\beta$ と $CD3\gamma$ とのコピー数比の常用対数値 $\log \frac{CD3\gamma}{TCR\beta}$ は①式で求めた。

$$\log \frac{CD3\gamma}{TCR\beta} = (n_{TCR\beta} - n_{CD3\gamma}) \log 2 \dots\dots\dots ①$$

ここで、 $n_{TCR\beta}$ および $n_{CD3\gamma}$ は $TCR\beta$ および $CD3\gamma$ の増幅曲線が一定の蛍光強度に達するに要したサイクル数を表す。その他の場合の転写量比も同様にして求めた。

Ⅲ. 結果および考察

胸腺での、 $TCR\beta$ に対する $CD3\gamma$ 、 $CD3\delta$ および $CD3\epsilon$ の転写量比の加齢変化の測定結果を図 1 に、脾臓での結果を図 2 に示した。

胸腺および脾臓の場合ともに、 $CD3\gamma$ と $CD3\delta$ の転写量比は常に同程度であった。 $CD3\epsilon$ の転写量比は、 $CD3\gamma$ や $CD3\delta$ のおよそ 1/10 であった。 T 細胞受容体複合体 1 ユニットの、 $TCR\alpha$ および $TCR\beta$ がそれぞれ 2 サブユニット、 $CD3\gamma$ と $CD3\delta$ が 1 サブユニットずつ、 $CD3\epsilon$ および $CD3$ の ζ 鎖 ($CD3\zeta$) がそれぞれ 2 サブユニットずつで構成されている⁽⁴⁾。しかし、胸腺および脾臓において、日齢に関わらず $CD3\epsilon$ の転写量は $CD3\gamma$ や $CD3\delta$ の約 1/10 であった。このことは、転写量とタンパク質分子数が比例すると仮定すれば、 T 細胞受容体複合体と構成サブユニット間の平衡状態を考えると、 $CD3\epsilon$ の結合定数が $CD3\gamma$ や $CD3\delta$ の結合定数の約 100 倍であること

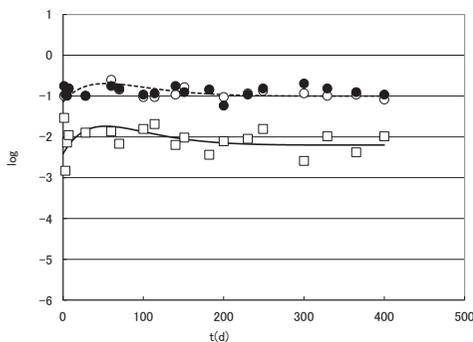


図 1 胸腺での $CD3$ サブユニット転写量比の加齢変化
 転写量比 $\log CD3\gamma/TCR\beta$ (○) と $\log CD3\delta/TCR\beta$ (●) は全日齢でほぼ一致した。 $\log CD3\epsilon/TCR\beta$ (□) は、 $CD3\gamma$ や $CD3\delta$ と比較すると -1 小さかった。③式により求めた理論値 ($\log CD3\gamma/TCR\beta$ および $\log CD3\delta/TCR\beta \dots, \log CD3\epsilon/TCR\beta$ —) も示した。

を示唆している。

また、脾臓と胸腺の場合とを比較すると、 $TCR\beta$ に対する $CD3\gamma$ 、 $CD3\delta$ および $CD3\epsilon$ の転写量比は、いずれも脾臓の方が大きかった。このことは、脾臓に存在する T 細胞には完成した T 細胞受容体複合体が多く、胸腺の T 細胞では未完成の T 細胞受容体複合体が多いこと、すなわち未成熟な T 細胞が多く存在することを示している。

転写現象を力学モデル化すると、転写量比 x の加齢変化は次の 2 階微分方程式である転写方程式②で表せる⁽³⁾。

$$\ddot{x} + 2ax + bx = bD \dots\dots\dots ②$$

ここで、 a 、 b および D は定数である。係数 a は、RNA ポリメラーゼが遺伝子上を移動する際の摩擦抵抗に依存し、細胞の種類、遺伝子の種類に関わらず同じ値をとる。 D は、細胞が転写に消費するエネルギーに依存する係数である。②式の一般解は

$$b - a^2 > 0 \text{ の場合,}$$

$$x = Ce^{-at} \cos(\sqrt{b - a^2}t + \beta) + D \dots\dots\dots ③$$

$$b - a^2 < 0 \text{ の場合,}$$

$$x = Ae^{-(a + \sqrt{a^2 - b})t} + Be^{-(a - \sqrt{a^2 - b})t} + D \dots\dots\dots ④$$

となり⁽⁵⁾、いずれの場合にも加齢に伴い転写量比 x は D に収束、あるいは漸近する。したがって、日齢の大きい場合の測定値より D の値を求めることが可能である。その値を用いて③式により計算した理論値も図 1 および 2 に示した。計算に用いたパラ

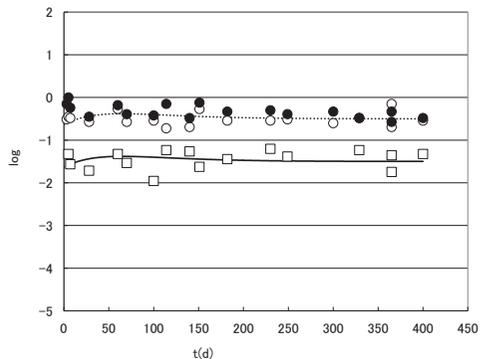


図 2 脾臓での $CD3$ サブユニット転写量比の加齢変化
 転写量比 $\log CD3\gamma/TCR\beta$ (○) と $\log CD3\delta/TCR\beta$ (●) は全日齢でほぼ一致した。 $\log CD3\epsilon/TCR\beta$ (□) は、 $CD3\gamma$ や $CD3\delta$ と比較すると -1 小さかった。胸腺の結果(図 1)と比較すると、いずれの場合も値が大きかった。③式により求めた理論値 ($\log CD3\gamma/TCR\beta$ および $\log CD3\delta/TCR\beta \dots, \log CD3\epsilon/TCR\beta$ —) も示した。

メーターの値を表 2 に示した。いずれの場合も、前報と同様に $a = 0.02$ とすることにより、転写量比の加齢変化を良く説明することが可能であった。

表 2 ③式での計算に用いたパラメーターの値

	$a(1/d)$	$b(1/d^2)$	β	C	D
胸腺 $\log CD3\gamma / TCRb$	0.02	0.0005	1.5	-2	-1
胸腺 $\log CD3\delta / TCRb$	0.02	0.0005	1.5	-2	-1
胸腺 $\log CD3\epsilon / TCRb$	0.02	0.0005	1.5	-3	-2.2
脾臓 $\log CD3\gamma / TCRb$	0.02	0.00042	1.5	-2	-0.5
脾臓 $\log CD3\delta / TCRb$	0.02	0.00042	1.5	-2	-0.5
脾臓 $\log CD3\epsilon / TCRb$	0.02	0.00042	1.5	-2	-1.5

胸腺および脾臓において、 $CD3\gamma$ と $CD3\delta$ の転写量がほぼ等しく、 $CD3\epsilon$ の転写量とは異なった。このことは、 $CD3\gamma$ の遺伝子と $CD3\delta$ の遺伝子は 9 番染色体上で比較的近くに存在し、約 2 kb.p. 程度離れているにすぎず⁽⁶⁾、局所的な ATP 濃度が等しいと見なせる雰囲気内であることを示唆している。一方、 $CD3\epsilon$ の遺伝子は同じ 9 番染色体上に存在するけれども、 $CD3\delta$ の遺伝子とは約 12kb.p.、 $CD3\gamma$ の遺伝子とは約 18kb.p. 離れており、ATP の局所濃度が異なると考えられる。

文献

- 1) 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 (2006)
- 2) 楠本瑠美, 長尾由貴子, 橋本珠実, 船本真知子, 三仲亜希子, 森林さやか, 山田浄, 宮田堅司: 本誌, 62, 13 (2007)
- 3) 宮田堅司: 本誌, 67, 19 (2012)
- 4) I. Roitt, J. Brostoff and D. Male: Immunology, 5th ed. (Mosby), 83 (1988)
- 5) 星崎憲夫, 町田茂: 基幹物理学 第 2 版 (てらべいあ), 254 (2009)
- 6) NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12501>