

Development of novel tools based on immune molecules for antibody detection in fish

学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2018
学位授与番号	12614博甲第494号
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001594/

[課程博士] (博士論文審査及び最終試験の結果要旨)

学生氏名： ジラポンパイロ ワリッサラ

博士論文題目： Development of novel tools based on immune molecules for antibody detection in fish
(魚類抗体検出のための免疫学的な新規手法の開発)

博士論文審査：

学生から提出された博士論文について、公開発表会が8月14日に行われ、審査委員と学生の間で質疑応答が繰り返された。

本研究は、複数の魚種に応用可能な魚類血中抗体認識する分子を開発することを目的として行われた。第一章では、魚類免疫グロブリン M (IgM) 重鎖を対象に、複数の魚種で比較的保存されているアミノ酸配列領域を標的としたペプチド抗体を調製し、その特異性を解析した。調製した2種類のウサギ抗血清を用いて魚類抗体の検出を試みたところ、これらはウェスタンブロット解析では利用可能であるものの Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA 法) では利用できなかった。

第二章では、IgM 重鎖に比べて魚種間でより保存されている IgM 軽鎖を対象に大腸菌組み換えタンパク質を調製した。3種類のヒラメ IgM 軽鎖遺伝子について組み換えタンパク質を調製し、これらを用いてウサギを免疫し抗血清を得て解析に供したところ、得られた抗血清はウェスタンブロット解析では利用可能であるものの ELISA 法では利用できなかった。

第三章では、生体内における抗体受容体の一つである Fc 受容体に着目し、ヒラメ Fc 受容体を用いた抗体の検出を試みた。網羅的遺伝子配列解析により得られた配列データより、4種類の Fc 受容体遺伝子を同定した。各遺伝子について大腸菌組み換えタンパク質を調製し、血清中の抗体分子との結合能を解析したところ、これら4種類の Fc 受容体は結合力に違いはあるものの、いずれも抗体と思われる血中のタンパク質と結合した。しかしながら、これらの組み換えタンパク質は種々の病原微生物とも結合することが示されたことから、これらを用いた魚類抗体の抗原特異性の解析はできないことが示された。

第四章では、ファージディスプレイ法を用い、種々の魚類抗体を認識する分子の探索を試みた。マグロ IgM で免疫したウサギ由来の脾臓より IgG 重鎖および軽鎖遺伝子より、PCR を用いて一本鎖多様性領域を増幅した。得られた断片を用いてファージディスプレイライブラリを構築し、魚類 IgM を用いたバイオパニング法により種々の魚類抗体を認識するクローンを単離した。4種類のクローンについて組み換えタンパク質を調製し、魚類 IgM に対する特異性を解析したところ、これらは全て ELISA 法に利用可能であった。

これらの成果は、複数の魚種において魚病対策を行う上で重要な知見となるのみならず、比較免疫学的にも有意義である。また、国内外の研究の水準に照らし、本成果は当該研究分野における学術的意義、新規性、独創性及び応用的価値を有している。以上のことから、申請者から提出された論文は、十分博士の学位に値することを審査委員一同確認した。

最終試験の結果要旨：

最終試験は8月14日に行われた。審査委員一同出席の下、学術論文については1編が第1著者として公表済み (Jirapongpairoj W., J. Immunol. Methods. 449, 71-75.) であるとともに、講演発表については国際会議2回発表していることを確認した。合同セミナーについては、企業型セミナーの単位を取得していることを確認した。また、大学院海洋科学技術研究科が指定した研究者倫理教育を修了していることを確認した。

学術論文は英語で書かれており、かつ、国際会議において英語で発表しており、語学については問題ないと判断した。また、申請者に対して、論文内容について最終確認のための質疑応答を行い、その内容は十分であった。一方、専門知識については公開発表会当日の質疑や予備審査時でのディスカッションを含め十分であると審査委員一同確認した。

以上から、学生について博士論文審査、最終試験とも合格と判定した。