

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

細胞表面抗原を用いた魚類生殖細胞操作法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 市田, 健介 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1550

博士学位論文内容要旨
Abstract

専攻 Major	応用生命科学専攻	氏名 Name	市田健介
論文題目 Title	細胞表面抗原を用いた魚類生殖細胞操作法の開発		

本研究室では代理親魚技術を用いたクロマグロ種苗の作出に取り組んでいる。具体的には、ドナーとなるクロマグロの生殖細胞を宿主となるサバ科魚類の腹腔内に顕微注入し、ドナー生殖細胞を自身の生殖腺に取り込んだ宿主魚を飼育、成熟させることで、宿主から機能的なクロマグロ配偶を作出するという技術である。本技術において宿主生殖腺へと生着可能な細胞は一部の未分化生殖細胞のみであることがこれまでの研究により明らかとなっている。そのため、本技術においてはクロマグロ生殖腺から未分化生殖細胞が十分量含まれた生殖腺細胞を調整し、移植後に生殖細胞の挙動を経時的に追跡することが極めて重要となる。しかしながら、飼育に莫大なスペース、コストのかかるクロマグロでは、未分化生殖細胞が十分量含まれた生殖腺を供給することが困難であることに加え、遺伝子組み換えを施していない個体をドナーとして使用しているため、ドナー細胞から未分化生殖細胞を特異的に単離することや、その移植後の挙動を追跡することができない。そこで、クロマグロ未分化生殖細胞を生きた状態のまま標識できれば、ドナー細胞中に含まれる未分化生殖細胞の可視化、単離、追跡等が可能となり、本技術における一連の細胞操作を著しく効率化することが可能となると考えた。そこで、本研究ではクロマグロを材料に用い、未分化生殖細胞である精原細胞の細胞膜表面を特異的に標識可能なモノクローナル抗体を作製し、その抗体を蛍光色素で標識することで、クロマグロ精原細胞の可視化、単離、追跡技術の樹立を目指した。

まず、クロマグロ精原細胞集団を免疫することで精原細胞の膜表面に対する特異抗体の作製を行った。フローサイトメーターを用いて調整した A 型精原細胞集団を、生きた状態のままマウスに 5 回免疫することで、1152 種類のハイブリドーマを作成することに成功した。次に Cell-enzyme linked immunosorbent assay (cell ELISA)により、抗原に対して強い力価を持つ 384 抗体を選択した。さらに、生きたクロマグロ精原細胞に対して、384 抗体による免疫細胞染色を行うことで、細胞表面抗原を認識可能な抗体の選抜を行った結果、40 抗体において細胞表面におけるシグナルが観察され、細胞表面抗原を認識することが明らかとなった。次に、細胞表面抗原を認識可能なこれら 40 抗体のうち、クロマグロ精原細胞を濃縮可能な抗体を免疫細胞染色後のフローサイトメーターにより絞り込んだ。その結果、19 種類の抗体が精原細胞を濃縮可能であることが明らかとなった。しかし、これら 19 種類の抗体は精原細胞を認識し濃縮することは可能であるものの、A 型精原細胞を特異的に認識するとは限らない。そこで、免疫組織染色により A 型精原細胞を特異的に認識可能な抗体をスクリーニングした結果、No152 抗体および No180 抗体がクロマグロ A 型精原細胞を特異的に認識することを見出した。以上のように、本実験により、クロマグロ精原細胞の細胞表面抗原を認識可能な 2 つの抗体を樹立することに成功した。

次に、上記の 2 抗体を用いて、クロマグロ精原細胞の可視化、単離、濃縮技術の樹立を行った。まず No152 抗体および No180 抗体をプロテイン A カラムで精製した後、緑色蛍光色素である Alexa 488 で直接標識し、これを用いて全精原細胞集団中における精原細胞の特異的な可視化を試みた。その結果、クロマグロ精原細胞懸濁液に対し蛍光標識抗体を加え、30 分静置するという非常に簡便な実験操作のみで、精原細胞の特徴を有する細胞集団を特異的に可視化することに成功した。次に、これらの可視化された細胞が間違いなく精原細胞であるかを検証するため、可視化した細胞をフローサイトメーターで分取した後、各生殖腺細胞特異マーカーによる RT-PCR および *in situ* hybridization を行った。

その結果、いずれも精原細胞の分子的な特徴を示し、本抗体が精原細胞を特異的に可視化したものと結論付けた。さらに、A型精原細胞特異マーカーである *dead end* 遺伝子の *in situ hybridization* の結果、可視化された細胞の70%以上が *dead end* 陽性であり、本抗体は非常に高純度でクロマグロA型精原細胞を単離、濃縮することが可能であることが明らかとなった。最後に、蛍光標識抗体を用いて可視化した細胞をそのままニベ孵化仔魚腹腔に移植することで、これら可視化した細胞の宿主生殖腺への移動が可能であるか、さらにその挙動追跡が可能であるかを検証した。その結果No152抗体で標識した細胞は緑色蛍光を保持したままニベ宿主生殖腺へと移動し、そこに生着することが観察された。

以上の研究により、細胞表面抗原を認識可能な抗体を駆使することで、生きたクロマグロ精原細胞の可視化、単離、追跡技術の開発に成功した。今後は本抗体を駆使することによるクロマグロ代理親魚技術の樹立や、本研究室が代理親魚技術と同様に取り組んでいるクロマグロ精原細胞の *in vitro* 培養への貢献が期待される。