

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

【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：市田 健介

博士論文題目：細胞表面抗原を用いた魚類生殖細胞操作法の開発

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2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され、誤記の訂正や表現の修正等が施された。

本研究は、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。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。これらのスクリーニングにより、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、これを用いて全精巣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、クロマグロ精巣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ことを検証するため、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。

これらの成果は、今後水産学分野のみならず、基礎生物学の発展にも大きく貢献する優れた研究といえる。以上の内容から、学生から提出された博士論文は、国内外の研究の水準に照らし、水産学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おり、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2月14日に行われた。審査委員一同出席の下、学生に対して、博士論文の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応答時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。学術論文は1編が第一著者として公表済み (K Ichida, K Kise, T Morita, R Yazawa, Y Takeuchi, G Yoshizaki: *Theriogenology* 101, 91-98, 2017)であることを確認した。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、外国語の学力については問題ないと判断した。また、講演発表は国際会議2回、国内学会6回、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会のポスター発表では優秀賞を受賞し、それにより学長賞も受賞していることを確認した。

合同セミナーについて、規定の学習時間および出席回数を満たしていることを確認した。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。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。