

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

本研究室では生殖細胞の異種間移植を用いることで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。本技術は代理親魚技術と呼ばれているが、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、代理親魚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、クロマグロでは飼育に莫大なスペース、コスト、手間がかかるため、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、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、追跡技術の樹立を行うことを最終目標とした。

まず第 1 章では抗体を作製するための免疫抗原に使用するために、フローサイトメーターの散乱光を指標にクロマグロ精原細胞の濃縮技術の樹立を行った。クロマグロ生殖細胞集団をフローサイトメーターで光学的特徴を指標に解析することで、精原細胞集団が分布する分画を同定し、その分画を単離することで精原細胞の濃縮技術の開発を行った。本技術は木瀬らがサケ科魚類を用いて樹立した精原細胞の濃縮技術をそのままクロマグロに応用したものである (Kise et al., 2012)。しかしながら、本技術は精原細胞の光学的特徴を指標として精原細胞を濃縮する技術であるため、たとえ分類群の大きく異なる魚種でも精原細胞の光学的、形態的な特徴が保存されていれば、様々な魚種において応用可能であると考えられた。実際に本技術をクロマグロに応用したところ、様々な成熟段階の精巣からでも精原細胞を高純度で濃縮することが可能であった。

次に第 2 章では第 1 章の技術を用いて濃縮したクロマグロ精原細胞集団をマウスへと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 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巣細胞に対して、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トリ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。

さらに、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。さらに、可視化された細胞は可視化されていない細胞に比べ細胞直径が有意に大きいことが明らかとなった。これは精原細胞の形態的特徴に一致した。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、*in situ hybridization* の結果、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、クロマグロ精原細胞の濃縮技術および細胞表面抗原を認識可能な抗体を駆使することによる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。今後は本技術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。