

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

クルマエビ *Marsupenaeus japonicus*
血球細胞の分子生物学的分類を目的とした基礎研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2023-07-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小祝, 敬一郎 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1762

博士学位論文内容要旨
Abstract

専攻 Major	応用生命科学	氏名 Name	小祝 敬一郎
論文題目 Title	クルマエビ <i>Marsupenaeus japonicus</i> 血球細胞の分子生物学的分類を目的とした基礎研究		

血球細胞を含む血液はクルマエビ類において免疫機構を司る重要な器官である。主要な免疫機構として、貪食作用、フェノール酸化酵素前駆体活性化系、血液凝固、包囲化、ノジュール化、抗菌ペプチド産生やオプソニン化があげられる。そこで、血球細胞を分類し各集団の機能を詳細に解析することは、クルマエビ類免疫機構解明に重要である。これまでクルマエビ類の血球細胞は、血液塗抹標本をギムザ染色液にて染色することにより無顆粒球、小顆粒球および大顆粒球の3種類に分類されてきた。ギムザ染色法は、主にアズール青とエオジンによって細胞内の好塩基性物質および好酸性物質を染色する技法であり、細胞の形態を判別するには有効であるが細胞機能の特定はできない。さらに、クルマエビ類血球細胞に対するギムザ染色法の技法は統一されておらず、希釈バッファのpH、染色時間、染色時の湿度や作業者の修練度などの様々な要因により染色結果が容易に変化する。そのため、研究室間で統一した結果を得ることが困難であり血球細胞研究の発展を妨げている。ヒトの白血球もギムザ染色にて顆粒球、単球およびリンパ球の3種類に形態的に大別されるが、より客観的かつ定量性に優れる細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いた分類を行うことが一般化されている。そこで本研究ではクルマエビ血球細胞の客観的な分類および分離手法開発のため、組織中の血球細胞機能の推定、貪食能を有する血球細胞特異的細胞表面分子の探索および細胞表面糖鎖に基づいた血球細胞分離手法の開発を行った。

甲殻類は開放血管系であり毛細血管は存在しないため、血液は心臓から動脈を通じて各組織中へ浸潤する形で循環を果たす。これまでクルマエビの心臓およびリンパ様器官に存在する血球細胞には、異物を貪食する働きがあることが組織切片像から報告されてきた。しかし、それら組織中に存在する血球細胞(固着性血球細胞)の分子生物学的な解析はなされていなかったため血液中に循環している血球細胞(循環血球細胞)との機能性の違いは明らかとなっていなかった。そこで、主要な免疫器官と考えられているエラ、心臓およびリンパ様器官の組織懸濁液から血球細胞を濃縮しmRNAを抽出した後、次世代シーケンサーによる網羅的転写産物解析(RNA-seq解析)に供し転写産物の定量化を行った。代表的な免疫関連遺伝子のみに着目した結果、抗菌ペプチドは循環血球細胞およびいずれの組織の固着性血球細胞でも転写産物の蓄積が確認された。また、フェノール酸化酵素前駆体活性化系や血液凝固関連遺伝子の転写産物の蓄積は循環血球細胞およびエラの固着性血球細胞で多かったが、心臓およびリンパ様組織中の固着性血球細胞では少ない傾向が示唆された。代表的な遺伝子の転写産物の蓄積が組織により異なったことから、組織により存在する固着性血球細胞が異なることが推察された。さらにギムザ染色による形態的特徴は循環血球細胞と固着性血球細胞で類似していたため、固着性血球細胞は循環血球細胞の一部が定着したものであると考えられた。

次に、貪食能を有する血球細胞(貪食細胞)を客観的に分類するため特異的な細胞表面分子の探索を行った。はじめにクルマエビ生体に磁性蛍光を有するビーズを注射し、3時間後に採血をすることによって、ビーズを貪食した細胞を含む全血球細胞を得た。全血球細胞に対して磁気による濃縮を行うことでビーズ貪食細胞集団を得た。そこから得られるmRNAを用いたRNA-seq解析の結果、膜タンパク質の1種であるインテグリンの転写産物が貪食細胞にて多く蓄積されていることが予測された。そこでインテグリン遺伝子の全長をクローニングするとともに、組織別のインテグリン転写産物蓄積量の比較を行った。さらにインテグリンタンパク質N末端の一部を大腸菌にて組み換えタンパク質と

して発現させ、免疫抗原とすることでインテグリン抗血清を得た。ビーズを貪食した血球細胞に対し、インテグリン抗血清で免疫学的染色を行った結果、約 90% の貪食細胞はインテグリン陽性であったが、その他の貪食細胞はインテグリン陰性であった。以上の結果より、クルマエビの血球細胞では特定の細胞集団が貪食作用を有すること、インテグリンの有無に基づき少なくとも 2 種類の貪食細胞が存在することが示唆された。

最後に、特定の血球細胞の分離技術の開発を行った。先の実験で得られたインテグリン抗血清は血球細胞の分類は可能であったが、magnetic activated cell sorting (MACS) 法による細胞分離に用いることはできなかった。細胞の表面には種々の糖鎖が存在し、糖鎖に結合するレクチンを用いることで細胞の分類および分離ができることが報告されている。そこで本研究ではレクチンを用いた血球細胞の分離を試みた。はじめに 8 種類の FITC 標識レクチンの血球細胞への反応性を比較し、クルマエビ血球細胞の分類に最適なレクチンの探索を行った。その結果、2 種類のレクチン、トマトレクチン (LEL) およびコムギ胚芽凝集素 (WGA)、において明瞭な蛍光強度の差と特定の血球細胞への結合が観察された。さらに、ビオチン標識された LEL およびストレプトアビジンマイクロビーズを用いた MACS 法により、LEL 弱陽性および LEL 強陽性血球細胞の分離に成功した。LEL 弱陽性血球細胞は比較的大きく、顆粒を細胞質内に多く蓄積していた。一方、LEL 強陽性血球細胞は比較的小さく、細胞質内の顆粒は観察されなかった。さらに LEL および WGA を用いた二重染色を行ったところ、血球細胞は 3 種類に分類された。また、*in vitro* でビーズの貪食を行わせた血球細胞を二重染色に供したところ、WGA 陽性細胞でのみ貪食が確認された。

以上の結果より、これまでギムザ染色法による形態的特徴のみで複数種として判別されていた血球細胞は、細胞表面分子に基づき抗体やレクチンを用いることで再現性が高く客観的に分類可能であった。さらに細胞表面糖鎖を標的としたレクチンを用いた分類および分離手法は、分離後も細胞の機能解析が可能であるため、全血球細胞でのみ調べられていた遺伝子転写産物の発現変動を、各細胞集団においても調べることが可能となった。各細胞集団における遺伝子転写産物や細胞機能を詳細に解析することは、血球細胞の司る生体防御機構を包括的に理解することにつながるため、本研究で得られた技法が広く普及することが期待される。