

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

[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：小祝 敬一郎

博士論文題目：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

博士論文審査：

申請者から提出された論文については審査委員と申請者の間で質疑応答が行われ、一部修正が行われた。公開発表会は平成 31 年 2 月 14 日に実施され、博士論文としての質を十分に確保しているとの結論に至った。

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。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。しかし、ギムザ染色法の技法は統一されておらず、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。ヒトの白血球は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。代表的な生体防御関連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。

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。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。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。

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。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。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。本研究成果は、今後、クルマエビ類の免疫・生体防御学分野研究の発展に大きく貢献するものと思われた。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、各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。まず、学術論文は 3 編が第 3 著者 (Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Mol. Immunol. 85:1-8. doi: 10.1016/j.molimm.2017.01.024.、The immune functions of sessile hemocytes in three organs of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* differ from those of circulating hemocytes. Fish Shellfish Immunol. 78:109-113. doi: 10.1016/j.fsi. .2018.04.036.、RNA-seq identifies integrin alpha of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* as a candidate molecular marker for phagocytic hemocytes. Dev Comp Immunol. 81:271-278. doi: 10.1016/j.dci.2017.12.014.) として公表済みであるとともに、国際学会での発表が 5 回、国内での学会での発表が 7 回あることと合同セミナーは企業型セミナーを履修していること確認した。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。

学術論文は英語で書かれており、かつ、国際会議で、英語で発表しており、英語の学力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 (8 月 16 日) 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。