

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

博士学位論文の要約

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

卒業年度：平成 30 年度 (2019 年 3 月)

所属：東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科応用生命科学専攻

学籍番号：1661001

氏名：小祝 敬一郎

クルマエビ類の血球細胞が司る生体防御研究は、発現する遺伝子のクローニングおよび発現変動解析を中心に研究が進められ、主要な免疫系が明らかになってきた。しかしながら、これまでの研究では全血球細胞を材料として研究が行われたため、いずれの血球細胞集団がいずれの免疫機能を有するのかが明確になっていない。免疫系を細胞集団レベルで研究するために、血球細胞の分類手法を開発することは極めて重要である。また、分子マーカーを指標に血球細胞を分類出来るということは、病原微生物の感染や免疫賦活剤投与時における血球細胞集団の変動を解析することを可能とし、クルマエビ類の生体防御応答を詳細に解析出来ることが期待される。さらに、客観的な血球細胞の分類手法の開発は、研究者および研究室間での統一した研究結果を得ることに繋がり、これまでもましてクルマエビ類生体防御研究の議論を活発にさせる。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の研究を行った。

第2章では、組織中に定着している血球細胞機能の分子生物学的機能解析を、次世代シーケンサーによる網羅的転写産物解析により行った。その結果、心臓およびリンパ様器官中の血球細胞は循環している血球細胞とは蓄積する転写産物が明らかに異なり、機能も異なることが推察された。一方、エラの血球細胞は循環血球細胞と類似した免疫関連遺伝子の転写産物蓄積パターンを見せた。これは他の免疫関連臓器と比較して、エラが異物に遭遇しやすい環境のためだと考えられた。これまで組織中の血球細胞は固着性血球細胞と称され、循環血球細胞と異なる細胞群であるという見方もあったが、フローサイトメーター解析のプロット図からは両者に明確な差が見られなかった。固着性血球細胞および血球細胞間を明確に分類するマーカーもしくは手法は未だ報告がないため、本研究では組織中の血球細胞は循環血球細胞の一部であると結論づけた。

第3章では、貪食能を有する血球細胞特異的細胞表面分子を探索するため磁気マイクロビーズを用いた貪食細胞の濃縮手法を開発し、濃縮された貪食細胞で特異的に蓄積される遺伝子転写産物を同定し抗体を用いた免疫学的染色により本遺伝子が貪食細胞のマーカーとなり得るかを評価した。本章において開発された磁気ビーズを用いる貪食細胞濃縮手法は簡便であり高価な機器を必要としないため、他の甲殻類の貪食血球細胞研究においても有用なツールとなる可能性が示唆された。次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子転写産物解析の結果、ビーズを貪食した血球細胞ではインテグリン遺伝子の転写産物の蓄積が多いことが判明した。本インテグリンに対するポリクローナル抗体を作製し、免疫学的染色を行った結果、全血球細胞はインテグリン陽性および陰性細胞の2種類に分類されたのに加え、ビーズ貪食血球細胞にもインテグリン陽性および

陰性細胞が存在することが明らかとなった。本結果より、クルマエビの貪食血球細胞には少なくとも 2 種類の集団が存在することが示唆された。また、昆虫類ではインテグリンが顆粒球のマーカー遺伝子として報告があることから、本インテグリン抗体もクルマエビの顆粒球を染色したことが予想された。

第 4 章では、血球細胞を糖鎖に基づき分類するため、レクチンの血球細胞に対する反応性をフローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡観察により確認した。その結果、クルマエビの血球細胞には、LEL および WGA が特徴的な染色性を示した。LEL は細胞表面に強い結合性を示す一方、WGA は細胞内の顆粒に強い結合を示すことが蛍光顕微鏡下で観察された。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標識マイクロビーズを用いた細胞磁気標識法により、2 つの血球細胞亜集団の分離に成功した。これら細胞集団は形態学的特徴およびその遺伝子転写産物の蓄積パターンから、既報の無顆粒球および顆粒球の 2 種類の集団であることが示唆された。また、ビーズを貪食した血球細胞に対して WGA が 100% の陽性率を示したことから、クルマエビにおいて顆粒球が貪食作用を主に担っていることが示唆された。

本研究から得られた結果より、クルマエビ血球細胞の分類に抗体やレクチンを用いることが有効であることが判明した。しかしながら、課題も多く残る。第一に、第 2 章および第 4 章のフローサイトメーター解析のプロット図が異なるように、実験に用いる抗凝固液や固定液の影響で血球細胞の形態が変化する現象が見受けられた。諸言でも述べた通り、クルマエビ類の血球細胞は未固定の状態では物理的な刺激に弱く、また、サンプリング時に用いる抗凝固液または固定液の種類によってその形態を変化させる。さらに現在、各国の研究室間では異な

るサンプリング手法, 抗凝固液および固定液が用いられており, 血球細胞分類の比較を異なる研究室間で行うことは非常に困難である. そのため, 最適な抗凝固液, 固定方法および染色方法の開発および標準化は今後のクルマエビ類免疫研究において重要な課題である. 第 4 章において血球細胞の分取に成功したが, 本血球細胞はホルマリンにより固定されていた. ホルマリンによる固定は核酸の抽出を困難にするため, 核酸抽出に影響を及ぼさない分類および固定方法の検討も今後の血球細胞研究には必要である. これらの課題を解決し, これまで報告されてきたマーカー遺伝子や糖鎖の組成, 形態学的特徴, 遺伝子転写産物および細胞機能を複合的に研究することがクルマエビ類の免疫機構の解明に繋がる.