






学位論文審査の結果の要旨

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------|---|----|----|------|---|----|----|-------|----|----|-----|
| 専攻 | 生物圏生命科学専攻 | 氏名 | 額田 夏生 | | | | | | | | | | |
| 審査委員 | <table border="0"><tr><td>主査</td><td>教授</td><td>田丸 浩</td><td rowspan="3"></td></tr><tr><td>副査</td><td>教授</td><td>奥村 克純</td></tr><tr><td>副査</td><td>教授</td><td>幹 渉</td></tr></table> | | | 主査 | 教授 | 田丸 浩 |  | 副査 | 教授 | 奥村 克純 | 副査 | 教授 | 幹 渉 |
| 主査 | 教授 | 田丸 浩 |  | | | | | | | | | | |
| 副査 | 教授 | 奥村 克純 | | | | | | | | | | | |
| 副査 | 教授 | 幹 渉 | | | | | | | | | | | |
| 論文題目 (題目変更の有無) 有 <input checked="" type="radio"/> 無 <input type="radio"/> | コイ科魚類を用いた抗体生産方法の開発 (Research and development of antibody production using Cyprinidae) | | | | | | | | | | | | |
| <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>抗体 (Immunoglobulin: Ig) は、B細胞によって産生される糖タンパク質であり、免疫系の中でも獲得免疫において主要な役割を果たす分子である。B細胞表面の膜結合型受容体として、あるいは、血清や組織液中に分泌型抗体として存在している。抗体は細胞外の抗原を特異的に認識して結合し、中和反応、オプソニン化、補体やエフェクター細胞 (マクロファージ、好中球、ナチュラルキラー細胞など) の活性化によって、抗原の除去を助ける。化合物、ペプチド、タンパク質、細胞などの種々な標的を認識することができることから、新しい抗体作製に関する研究開発が世界中で進行している。また、この標的分子に対する高い特異性と親和性から、さまざまな分析試薬、診断薬や治療薬として幅広く利用され、医薬開発のみならず基礎生物学の研究ツールとしても必要不可欠な存在となっている。</p> <p>本研究ではまず、ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) を実験動物として用い、human leucine repeat-containing G-protein coupled Receptor (hLGR3) を抗原として免疫を行った。hLGR3タンパク質を発現した大腸菌を餌と混合して経口投与し、ドットブロット法による抗原抗体反応を検出した結果、免疫をしていないゼブラフィッシュと比較して有意にhLGR3特異的抗体の産生が確認された。しかしながら、ゼブラフィッシュを用いた場合では、一個体から採取できる血清の量が少なく、多くの個体をひとつのサンプルとして用いなければならないことや、個体毎の応答を観察できないといった問題があった。</p> | | | | | | | | | | | | | |

そこで次に、ゼブラフィッシュと同じコイ科に属するキンギョ (*Carassius auratus*) に着目した。さらに、キンギョの中でもスイホウガン (水泡眼) という品種は眼下に角膜が肥大化した水泡を持ち、この水泡は抗体を含むリンパ液で満たされていることがわかった。この水泡内に緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein: EGFP) をアジュバントと混合し、直接注入して投与することによって抗原特異的な抗体が産生されるかどうかの検討を行った。ドットブロット法による検出の結果、オイルベースまたは不活化大腸菌混合オイルベースをアジュバントとして抗原タンパク質と混合して投与した試験区において、初回抗原投与から42日目以降でEGFP特異的な抗体産生が確認された。次に、ゼブラフィッシュへ免疫実験を行ったhLGR3について、スイホウガンにも免疫実験を行った。水泡液中に抗原hLGR3タンパク質を注入して免疫を行い、ドットブロット法による検出を行った結果、hLGR3に対する抗体産生が示唆された。

キンギョ抗体についての詳細は未解明であったため、キンギョの脾臓および腎臓からgoldfish Immunoglobulin M (gIgM) の重鎖遺伝子のクローニングを行った。重鎖全長cDNAの塩基配列を決定した結果、取得したgIgM遺伝子の一つは1725 bp、575アミノ酸をコードしていた。さらに、取得した塩基配列をゼブラフィッシュなどの魚類抗体遺伝子配列と比較して分類した結果、gIgMの重鎖は少なくともV領域に6サブグループ、J領域に4ファミリー存在すると考えられた。定常領域の相同性をアミノ酸レベルで比較すると、コイ (*Cyprinus carpio*) の定常領域とおおよそ83%の相同性が、ゼブラフィッシュとは63%の相同性がそれぞれあることが確認された。次いで、得られた重鎖定常領域の配列をもとにしてCH3領域に対する抗体 (抗gIgMウサギポリクローナル抗体) を作製することで、スイホウガンの血清や水泡液中のgIgMを検出することが可能となった。さらに、水泡液からgIgMを精製することによって、作製した抗ウサギgIgM抗体を用いて水泡液中のgIgM量を定量することもできた。

以上の研究は、「Annals of Vaccines and Immunization」および「Journal of Marine Science & Development」において2報の原著論文として公表されており、日本生化学会中部支部では奨励賞を受賞している。したがって、本審査委員会では、申請論文が当該学問分野において十分な内容と新規性を有し、博士学位論文として適格であると全員一致で判断した。