

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Saha Nil Ratan

水産増養殖において、魚病問題は克服が困難な重要課題である。病気への対応や、耐病性育種のためには、魚類の免疫系に関する理解が不可欠であるが、魚類においては最も基本的なことですら、知見が不十分な状態にあるのが実情である。本論文は、免疫グロブリン産生の内分泌系制御という重要課題に取り組んだもので、産卵期のニジマスでは耐病性が低下するのに対し、コイではなぜ低下しないのかという疑問から出発し、遺伝子レベルでの解析を進めるため、ゲノム情報が充実しているトラフグを用いた解析を行なったものである。

第1章から第3章は、コイ免疫能とステロイドとの関係を論じている。

自然条件下で飼育したコイでは、春の産卵期に性ステロイドの上昇が見られるが、IgM量、IgM産生細胞数は、産卵期を含む高水温時に高いことから、性ステロイドとの相関が明瞭でないこと、産卵期、高水温時にはコルチゾール (F) の上昇も見られ、よく知られるFの免疫抑制は認められないことを示している。そして、末梢血、脾臓、頭腎から得た培養白血球に、直接ステロイドホルモンを作用させたところ、FによるIgM産生細胞数、IgM産生量の抑制は顕著だが、性ステロイドの作用は明確でないという結果を得ている。高水温時の高いF濃度がなぜ免疫抑制につながらないのかについては今後の課題としている。さらに、ステロイドによる白血球のアポトーシス誘導を調べている。生細胞を染めるフルオレセインジアセテートと、死細胞を染めるヨウ化プロピディウムを用いたフローサイトメーター解析で、両染色法で陰性となる細胞としてアポトーシス細胞を検出する新たな手法を開発し、末梢血、脾臓、頭腎、胸腺から分離した白血球に各種ステロイドを添加して培養したところ、Fにより顕著にアポトーシスが誘導されることを見出している。これらの結果は、ニジマスとは異なり、魚種によるステロイドの作用機序の違いが明確になったとしている。

以後、遺伝子レベルでの詳細な解析のために、魚種をゲノム情報の充実したトラフグに代えている。

まず第4章では、免疫グロブリン遺伝子のクローニングについて記している。分泌型IgM (sIgM) と膜型IgM (mIgM)、それぞれのH鎖、共通のL鎖、そしてIgDについて、既知の動物で知られる配列に相同の配列をトラフグゲノムデータベースから求め、RACE法を適用しているが、sIgMの定常領域が哺乳類同様CH1からCH4までの4つのドメイン構造をとっているのに対し、mIgMではCH4の代わりに膜貫通ドメインが存在していること、可変領域 (VH) については得られた5つのクローンが配列の類似性から2つのグループに分けられること、L鎖が可変領域、定常領域1つずつのドメイン構造からなっていること、を明らか

にしている。さらに IgD については、可変領域、IgM μ 鎖の CH1、そして IgD δ 鎖定常領域の 7 つのドメイン、そして膜貫通領域で構成されていることを明らかにしている。

第 5 章では、免疫グロブリン遺伝子の発現解析について述べている。ノザンプロット、*in situ*ハイブリダイゼーション解析により、IgM の膜型 H 鎖、分泌型 H 鎖、L 鎖、そして IgD の遺伝子発現は、リンパ組織の細胞に明瞭に認められたほか、皮膚、鰓、消化管など、病原生物の侵入経路となる組織にも認められ、粘膜免疫系の存在が示唆されたとしている。

最後に第 6 章では、トラフグ IgM 産生におよぼすさまざまな因子の影響を調べている。IgM 遺伝子発現やアポトーシスを指標に、ステロイドや LPS の *in vitro* での作用を調べた結果、F がリンパ球のアポトーシスを誘導したのに対し、性ステロイドが影響を与えないこと、LPS 刺激では、リンパ球の由来組織により、アポトーシス誘導される場合、F によるアポトーシス誘導が抑制される場合があること、F が IgM mRNA 転写量を低下させるが、その効果は LPS 刺激した血球でも同様であり、LPS による刺激効果相殺することを明らかにしている。

以上、本研究は、魚類免疫系の内分泌系制御を、特に性成熟に関係するステロイドホルモンの免疫グロブリン産生に対する作用に魚種による違いがあり、それが産卵期の耐病性と関係することを示した極めて興味深い内容を含んでいる。さらに、ゲノム情報が充実して、免疫研究の進展が期待されているトラフグについて、最も根本的な分子である免疫グロブリンの一次構造を明らかにした点、今後の基礎となる極めて重要な研究である。この論文の高い完成度と、将来への貢献の大きさは、審査員一同高く評価するところであり、博士（農学）の学位を授与するに値するものと認めた。