

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 河辺 元子

ニホンウナギは重要な養殖対象魚種であるが、種苗は天然のシラスウナギに頼っているのが現状であり、その資源量の急激な減少が深刻な問題となっている。人為的な種苗生産技術の開発も 1961 年から始められたが、困難を極め、実験条件下では全生活史の管理もできるようになったものの、仔魚期の生残率が極端に低く、量産化には多くの課題が残されている。健苗性を評価し、生残につながる要因を解析して行くことが重要であり、耐病性という観点から仔魚の健苗性を評価する指標を確立しようというのが本研究である。

研究は、仔魚の質を評価する指標として、胸腺分化や T 細胞の機能発現に関わる 2 つの分子、T 細胞特有のチロシンキナーゼである *Lck* と、リンパ球の抗原受容体の遺伝子再編成に関わる *RAG1* に着目して進められている。これは、天然のウナギ仔魚（レプトセファルス）では腎臓や脾臓が未発達なのに対し、胸腺のみがよく発達しているという報告に基づくもので、妥当な選択と言える。これらの分子について、一次構造を決定し、発現解析を行った結果、ウナギ *lck* と *rag1* は孵化後の仔魚から発現しており、T 細胞の関わる免疫システムが仔稚魚期から機能し、T 細胞の分化・成熟を誘導する機能的な胸腺をもつという興味深い結論を得ている。

本論文の第一章では、ニホンウナギ免疫関連遺伝子の cDNA クローニングと一次構造解析について記している。取り上げた分子は *Lck* と *RAG1* である。

Lck は成熟した T 細胞の機能に関わるタンパク質である。T 細胞が抗原刺激を受けると、T 細胞の細胞内領域において *Lck* が CD4/CD8 と結合し、T 細胞を活性化する。そこで、ウナギ成魚の末梢血白血球からナイロンファイバーカラムを用いて T 細胞を多く含む分画を得て、その cDNA プールから、RACE 法による cDNA クローニングにより *lck* の塩基配列を決定している。その結果、ウナギ *Lck* は Src ファミリーチロシンキナーゼに特徴的な SH4, Unique domain, SH3, SH2, SH1 (キナーゼ領域) で構成されていた。Unique domain には CD4/CD8 との相互作用に必要な CXXC モチーフ(ウナギ *Lck*; CXXCXC)を、SH1 ドメインと C 末端側には *Lck* のキナーゼ活性の制御に関わる 2 つのチロシン残基を有していることを確認している。また、他生物種の既知 *Lck* とのアライメント解析により、71.2-80.2% と高い同一性を示したことも合わせて、配列を決定した遺伝子がウナギの *Lck* をコードしているものと結論付けている。

胸腺内で T 細胞が分化する過程で、V(D)J リコンビネーションといわれる遺伝子再編成により T 細胞受容体の高度な多様性が形成されるが、*RAG1* は、*RAG2* と共にこの遺伝子再編成を担う分子である。胸腺は成長と共に退縮することから、20g 程度の小型のウナギから胸腺を切り出し、その cDNA プールから RACE 法による cDNA クローニングにより *rag1* 遺伝子の塩基配列を決定している。ただし、5'側の配列は、動物種間での変異が大きく、適

切なプライマーが設計できず、全長は決定できていない。一次構造解析の結果、DNA 結合モチーフである Zinc finger domain, RSS を認識する Rag Nonamer binding domain, さらに活性中心と考えられる DDE モチーフが保存されていること、哺乳類や他魚種の Rag1 と 62.9-77.8% という高い同一性を示していること、さらには最近公開されたニホンウナギのゲノムデータベースには、他に類似の配列がないことから、決定した配列がニホンウナギ RAG1 をコードする遺伝子の部分配列であるものと結論付けている。なお、ゲノムデータベース上でも 5' 端側の情報は欠落しているという。

第二章では、ニホンウナギ *lck*, *rag1* の発現解析について論じている。

まずウナギ末梢血白血球と、そこから分離した T 細胞に富む画分とで、*lck* の発現を調べ、ウナギ *lck* が T 細胞で発現していることを確認している。組織別 RT-PCR や、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、*lck* や *rag1* が胸腺で強く発現し、胸腺、T 細胞系の指標としてこれらの分子が適切であることを示している。

仔魚期の発現については、受精後 3 日目と 7 日目の人工孵化仔魚と、天然のレプトセファルス個体で調べている。いずれの遺伝子も受精後 3 日目、7 日目の人工孵化仔魚に発現が認められたが、発生初期の段階から T 細胞を介した免疫システムが機能していることを明らかにしている。一方、天然のレプトセファルスでは *lck* は認められたが、*rag1* の発現が見られないという興味深い結果が得られている。

ウナギの仔魚は、孵化直後からシラスウナギへ変態するまでの、約半年間に及ぶ長い期間、主に T 細胞を介した免疫システムが生体防御を担っているものと考えられる。本研究の結果は、*lck* や *rag1* といった免疫系の遺伝子がウナギ仔魚の健苗性を検討するための有用な指標となる可能性を示し、今後これらの生体防御関連遺伝子の解析が、ウナギ仔魚の生残の改善に繋がる種苗生産技術の開発へ発展することが期待される。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。