

シンカイヒバリガイの免疫機構の解明に向けた抗血液細胞の

モノクローナル抗体の構築

○関根 大介（北里大学，海洋研究開発機構），大石 和恵・中村 欽光（海洋研究開発機構），本郷 悠貴（東京海洋大学大学院，海洋研究開発機構），多米 晃裕（(株)マリンワークス），吉田 尊雄（海洋研究開発機構），中澤 正年（横浜市立大学），三宅 裕志（北里大学），丸山 正（海洋研究開発機構）

深海の熱水噴出域、湧水域に生息している深海性二枚貝の多くは、化学合成細菌と共生関係を形成している。シンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus japonicus*) はイガイ科シンカイヒバリガイ亜科 *Bathymodiolus* 属に分類される深海性二枚貝で、鰓上皮細胞内に共生するメタン酸化細菌（この場合にはメタン酸化細菌）からエネルギーを獲得し、生命活動を営んでいる。

深海性二枚貝の免疫機構については、血液中の血球が重要な役割を担っていると考えられている。これまでの研究から、シンカイヒバリガイの血球には、形態的に無顆粒細胞 Agranular cell (AGC)、少顆粒細胞 Hyaline cell (HYC)、顆粒細胞 Granular cell (GRC) の3種類が観察されている。この内、HYC と GRC については食食能を有することが知られているが、生体防御反応の詳細は未だ明確にされていない。また、共生細菌と外来微生物に対する免疫応答にどのような相違があるのかについても明らかにされていない。したがって、共生機構を考える上でも、生体防御に関わる知見を得ることは重要だと考えられる。

本研究では、深海性二枚貝の一種であるシンカイヒバリガイの生体防御を担う細胞として、血球に注目し、それらを機能的に分類するための細胞マーカーとしてモノクローナル抗体を作製することを目的とした。

材料は、2010年5月に、海洋調査船「なつしま」/無人探査機「ハイパードルフィン」による調査潜航 (NT10-08) で採取されたシンカイヒバリガイを用いた。シンカイヒバリガイの血球は、後閉殻筋から24G注射針と10ml注射器を用いて採取した。血球を抗原として Balb/c 7週齢の雌マウスを2週間おき3回免疫し、脾臓を摘出して抗体産生細胞である脾臓リンパ球を得た。このリンパ球とマウス由来の骨髄腫細胞 (NS-1) を、ポリエチレングリコール法によって細胞融合させた。ハイブリドーマを作製して96ウェルマイクロプレート内で培養し、培養上清中に分泌されるモノクローナル抗体を回収した。ホルマリン固定したシンカイヒバリガイの血球に対して、間接抗体蛍光法で蛍光陽性を示したハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、計64個のモノクローナル抗体を得た。免疫蛍光染色法によって、15クローンは血球全体が、30クローンは細胞膜が、19クローンは顆粒が蛍光陽性反応を示した。今後は作製した抗体の性状解析を進めて行く予定である。モノクローナル抗体は、抗原物質を高度に特異的に認識する均一な免疫グロブリンであり、血球の生化学的分類に加え、生体防御に関わる分子の認識や相互作用の解析にとっても優れたツールである。そこで、これらの抗体を用いて、血球の機能、生体内分布、各々の血球の外来性細菌と共生細菌に対する免疫反応を明らかにし、深海性二枚貝の共生を維持する機構について考えたい。