

深海性二枚貝の鰓と血球に対するモノクローナル抗体の構築

○大石和恵・中村欽光・小西正朗・日下智保・関根大介・本郷悠貴・藤倉克則・秦田勇二・吉田尊雄・丸山正（海洋研究開発機構）、多米晃裕（(株) マリン・ワーク・ジャパン）、中澤正年（横浜市立大学）

【緒言】 深海の湧水域や熱水噴出域に形成される高密度群集に優占する動物の生命活動は、化学合成細菌との共生システムによって支えられている。例えば、シマイシロウリガイ (*Calymene okutani*) やシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus japonicus*) は、その鰓の細胞内に、硫黄酸化ならびにメタン酸化細菌を有し、それらが産生するエネルギーに依存して棲息している。宿主である二枚貝の鰓細胞と共生細菌の間には緊密な相互作用があると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。また、外来性の細菌を排除する機構が、共生細菌をどのように認識し、維持するのかについても明らかになっていない。深海性二枚貝と共生細菌との共存システムを理解することを最終目的とし、鰓ならびに生体防御の中心を担う血球の構成物質を特異的に認識するモノクローナル抗体 (mAb) のライブラリーの構築を現在行っている。今回、その中から幾つかを報告する。

【材料と方法】 2009年、研究船「なつしま」による相模湾での研究航海 (NT09-06) で得られたシマイシロウリガイの鰓組織をホモジェネートして抗原サンプルを作製した。また、2010、2011年に、同研究船による相模湾での研究航海 (NT10-08, NT11-09) で得られたシンカイヒバリガイの血球、ならびに鰓のホモジェネート産物を抗原サンプルとして作製した。シンカイヒバリガイの鰓は、短期培養した同種血球を LPS 刺激して得られた上清を接種した個体から採取した (図1)。これらの抗原サンプルを、各々 Balb/c マウスに2週おきに3回接種し、最終接種の5日後に脾臓を摘出した。この脾臓リンパ球を同系のミエローマ細胞 NS-1 細胞と PEG 法により細胞融合させ、ハイブリドーマを作製した。HAT 選択培地で培養後、鰓組織や血球に反応する候補株を免疫染色法により選択し、さらにクローニングを行ない純化させた。

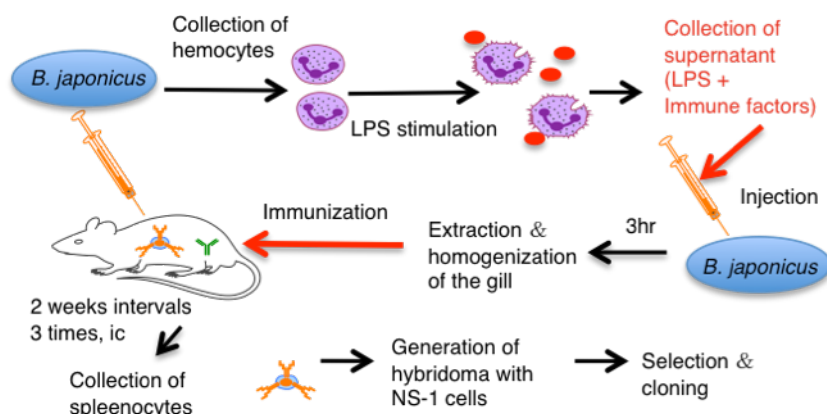


図1 シンカイヒバリガイ鰓 mAb ライブラリー構築のフローチャート

【結果と考察】構築した幾つかのライブラリーの中から、シロウリガイの鰓に対する2つの mAb クローンによる免疫染色像を図2に示した。シロウリガイの鰓の凍結切片を作製し、各々の mAb クローンの培地上清を反応させた。さらに Alexa488 conjugated anti-mouse IgG を反応させ、蛍光顕微鏡観察を行った。共生細菌の分布を示すために、切片を市販の anti-*E. coli* GroEL ポリクローナル抗体と反応させ、2次抗体として Alexa594 conjugated anti-rabbit IgG を加えた。図2は鰓の transverse section で、繊毛細胞を含む共生細菌の存在しない frontal zone (黄色矢印) と共生細菌を有する細胞が多く存在する intermediate zone (白矢印) の領域の免疫染色の結果を示した。mAb クローン No. COG3Y-1B3 の緑色のシグナルは、共生細菌を有する細胞の膜上ならびに鰓板間のスペースにのみ認められた (図2 (a))。このクローンはウエスタンブロットの結果から、鰓組織にのみ存在する抗原と結合し、さらに、鰓に大量に存在する粘液由来の糖との反応性を示した。これらの結果は、このクローンが認識する抗原は、鰓の主に共生細菌を有する細胞が特異的に産生するものであることを示しており、共生機構や生体防御との関連に興味もたれた。一方、mAb クローン No. COG3J-1D1 の緑色のシグナルは、共生細菌を有する細胞内に顆粒状に認められた (図2 (b))。赤いシグナルとオーバーラップすることから、共生細菌を特異的に認識すると考えられた。今後、生体内での菌の局在を調べるのに有用であると思われる。シンカイイバリガイの血球に対するモノクローナル抗体ライブラリーには、ある特定の細胞のグループに反応性を示すものが複数認められ、生体防御の中心を担う血球の生化学的な分類の可能性を示した。さらに LPS 刺激の有無により、シンカイヒバリガイの鰓の中で、そのシグナルの局在や発現が異なるモノクローナル抗体が得られ、細菌の認識や感染に関する研究に役立つと思われる。

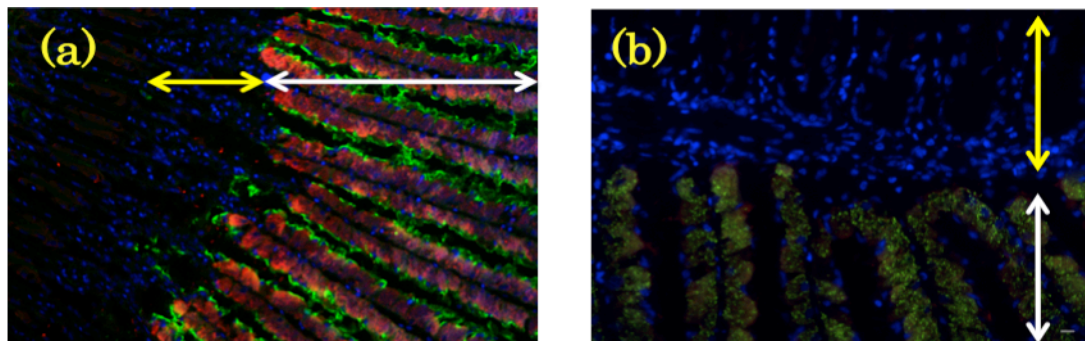


図2 シロウリガイ鰓特異的モノクローナル抗体による免疫染色

鰓の transverse section の中で、黄色矢印は共生細菌が存在しない frontal zone を、白矢印は共生細菌を有する細胞が密に存在する intermediate zone を示している。1次抗体として、(a) mAb クローン No. COG3Y-1B3、(b) mAb クローン No. COG3J-1D1 を反応させた。モノクローナル抗体は緑色のシグナルとして、共生細菌は赤色のシグナルとして表されている。青いシグナルは DAPI 染色で核の局在を示している。