

平成 25 年 5 月 1 日

平成 24 年度かき研究所研究助成 報告書

研究課題名：マガキ血球における貪食胞の形成と成熟

氏名：阿部 史隆

所属：東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻博士課程前期 2 年

私は修士論文研究を進めるにあたり、かき研究所から研究助成を受けることができました。その結果、下記に示す研究の遂行に対して大きな助けとなりましたので、御礼を申し上げるとともに研究内容の概略を報告いたします。

●マガキ血球における貪食胞内酸性化

ヒトの白血球では、細菌などを貪食したのち、貪食胞内が急速に酸性化して殺菌・分解に寄与することが知られています。二枚貝においても、アメリカガキ、シドニーイワガキ、そしてヨーロッパイガイの血球で貪食胞内の酸性化は観察されていますが、その酸性化のしくみは明らかではありません。そこで私の研究では、蛍光標識した異物粒子をマガキ血球と合わせて貪食胞を形成させてから、経時的に貪食胞内の酸性化の過程を観察しました。この時標識に用いたのは pH によって蛍光の光り方と強度が変化する pH rodo という蛍光色素です。pH rodo は赤色の蛍光を発しますが、中性の pH 7 よりも高いと光りません。逆に低い pH、つまり酸性になるほど強く鮮やかに光ります。血球と異物粒子は最初 pH 8 に近い平衡塩類溶液の中に置かれるので蛍光は発しません。しかし、血球が異物粒子を取り込んで貪食胞を形成し、その貪食胞内に赤色蛍光が見えるようになれば酸性化されたことがわかります。決めた時間ごとに顕微鏡下で血球を観察し赤色の蛍光が出ていることを確認するとともに血球の画像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトを用いて蛍光強度を測定しました。また、貪食胞の酸性化率を算出するため、pH にあまり関係なく緑色蛍光を発する FITC という別の蛍光色素を標識した異物粒子を pH rodo 標識粒子と同様にマガキの血球に貪食させました。つまり、一定面積内にある血球を観察し、FITC の蛍光を発している貪食胞の数を全貪食胞数とし、同じ面積内にある血球において pH rodo の蛍光を発している貪食胞の数を酸性貪食胞数として計数しました。そして両者の数を比較して貪食胞の酸性化率をもとめました。もし、両者の数が同じならば酸性化率は 100%、酸性貪食胞数が半分ならば酸性化率は 50%となります。このようにして実験のデータを得ていきました。

その結果、マガキ血球に貪食された pH rodo 標識粒子は強い蛍光を発し、貪食胞内の酸性化が認められました。経時的な変化についてみると、形成された貪食胞の多くは 30 分以内の短い時間で蛍光が強くなり、酸性化していると考えられましたが、一部の貪食胞は観察した時間（120 分間）の最後まで明らかな赤色蛍光を示しませんでした。すなわち、すべての貪食胞が酸性化をするのではないと考えられました。酸性化率を算出すると 61.4%でした。この酸性化するかしらないかとい

う違いは何に起因するのかを調べました。1つでも貪食胞を有する血球の割合を FITC 標識粒子投与区、pH rodo 標識粒子投与区のそれぞれについて測定した結果、両者に有意差はありませんでした。一方、貪食によって蛍光陽性を示す血球 1 細胞あたりの蛍光ビーズ数は、FITC 標識粒子投与区が 3.5、pH rodo 標識粒子投与区が 2.2 と FITC 標識粒子投与区の方が高くなりました。すなわち、貪食を行う血球では基本的に貪食胞の酸性化が起こりますが、複数の貪食胞を形成した場合、必ずしもすべての貪食胞が酸性化されるのではないようです。つまり、1つの血球の中に酸性化した貪食胞とそうでない貪食胞が共存しているわけで、非常に興味深い結果です。おそらく世界で初めての知見ではないかと思われます。

● どういうしくみで貪食胞は酸性化するのか？

ヒト白血球では貪食胞が形成されると、複合酵素である液胞型水素イオン-ATPase (V-ATPase) が貪食胞の膜上で活性化し、貪食胞の外にある水素イオンを次々と貪食胞内に汲み入れます。プロトンポンプと呼ばれる能動輸送の 1 種です。たくさん水素イオンが貪食胞のような狭い空間に入るので、中は酸性に傾きます。私は修士論文の研究で、このような反応がマガキ血球でも起こっているのか、すなわち酸性化に働く V-ATPase がマガキ血球でも活性を持っているのかについても検討しました。まず、マガキ血球における V-ATPase を測定しました。血球全体の活性を調べただけでは貪食胞でプロトンポンプが働いているか明らかではないため、マグネティックセパレーション法を行いました。それは異物として磁気ビーズを貪食させたのち、血球を緩やかに壊して貪食胞を含む細胞小器官を集めます。それらの懸濁液を磁石つきのカラムに通しました。そうすると、磁気ビーズを含む貪食胞だけがカラム内に留まり、他の小器官は素通りします。カラムの中をよく洗ってから、磁石を離して貪食胞を回収し、その ATPase 活性を測定しました。次に、先に調べた貪食胞酸性化の時に ATPase が働いていることを確かめるため、V-ATPase 特異阻害剤であるコンカナマイシン A を添加した状態で pH rodo 標識粒子の貪食実験を行い、蛍光強度の変化を観察しました。

これらの実験の結果をみると、V-ATPase 特異阻害剤の添加により、蛍光強度、蛍光陽性細胞率が低下しました。また、分離した貪食胞画分に高い比活性の V-ATPase 活性が認められました。これらのことから、マガキ血球の貪食胞においても酸性化には V-ATPase が関与すると考えられました。

● 平成 24 年度日本水産学会秋季大会への参加

平成 24 年 9 月に山口県下関市の水産大学校において開催された上記の学会で、今回の研究成果を口頭発表しました。講演題目は「マガキ血球における貪食胞内酸性化」です。発表後の質疑でも活発な討論があり、一定の評価は得られたと考えています。指導教員の高橋先生と相談しながらこれらの成果を研究論文にまとめたいと思います。今回のご支援に厚く御礼申し上げます。