

# 免疫賦活剤投与魚で発現する 生体防御関連遺伝子の解析

(研究課題番号：11660191)

平成11, 12年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)(2))  
研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者：酒 井 正 博  
(宮崎大学農学部助教授)

## は し が き

魚類はその他の脊椎動物と異なり免疫系の中でも非特異的免疫機構の占める割合が大きいと考えられている。そのために非特異的免疫機構を増強させ、病気を予防するために免疫賦活剤が開発され実用化されてきている。現在多くの免疫賦活剤が水産養殖の現場で使用されている。免疫賦活剤で活性化する免疫機構は主としてリンパ球と食細胞である。特に食細胞が重要であり、研究されている免疫賦活剤はほとんどの場合、この食細胞の機能を活性化する働きがある。しかし、その免疫機能を活性化するメカニズムについては、十分に解明されていない。本研究は、免疫賦活剤の免疫機構を活性化するメカニズムを遺伝子の側面から検討することを目的としたものであり、平成11と12年度の2年間にわたり研究を実施した。本報告書はその成果をとりまとめたものである。

### 研 究 組 織

研究代表者      酒井 正博      (宮崎大学農学部・助教授)

### 研 究 経 費

平成11年度	2, 100	千円
平成12年度	1, 400	千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Kono T., M. Sakai and S.E. LaPatra. Expressed sequence tag analysis of kidney and gill tissues from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Marine Biotechnology* 2, 493-498, 2000.

Kono, T., Oshikawa, T and M. Sakai. The analysis of expressed genes in kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with immunostimulant peptidoglycan. *Fish and Shellfish Immunology* 11 (Accepted).

### (2) 口頭発表

Kono T., M. Sakai, T. Aoki and S.E. LaPatra. Expressed sequence tag analysis of kidney and gill tissues from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious hematopoietic necrosis virus. 9<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" (ロードス島、ギリシャ、1999年9月14日)。

河野智哉、中尾実樹、藤木和浩、矢野友紀、酒井正博 Interleukin 1 beta 遺伝子導入魚における免疫応答の活性化 平成12年日本魚病学会春期大会 (東京、平成12年3月30日)。

Kono, T. and M. Sakai. The analysis of expressed genes in kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with  $\beta$ -glucan. The 8<sup>th</sup> Congress of the International Society of Development and Comparative Immunology. (ケアンズ、オーストラリ

ア、2000年7月4日)。

Kono, T. and M. Sakai. Molecular analysis of a CC-chemokine gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. The International Conference of Aquatic Genomics "A Step toward the Great Future of Aquatic Genomics" (東京、2000年11月10日)。

### (3) 印刷物

酒井正博：魚類の免疫と遺伝子 “次世代の水産バイオテクノロジー” (隆島文夫編) 成山堂書店 (東京)、pp.54-71 2000

## 要 約

(目的) 活性化した白血球は、多くのサイトカイン類や生体防御関連物質を産生することが知られている。そこで、これらの遺伝子をクローニングするために、活性化した白血球から、cDNA ライブラリーを作製し、そのクローンの解析を行った。

(方法) グルカンを注射したヒラメの白血球から、mRNA を分離し、cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーから無作為に 198 クローンを抽出し、その遺伝子の配列を決定した。

(結果) 今回解析した 198 クローンのうち、生体防御に関連する物として、免疫グロブリンの L 鎖と H 鎖、リゾチーム、 $\beta$ 2ミクログロブリン、チモシンおよび CC ケモカインの遺伝子をクローニングすることができた。これらの遺伝子の相同性を検討した結果、免疫グロブリンの L 鎖と H 鎖および $\beta$ 2ミクログロブリンは、これまで発表されたものと異なっていた。CC ケモカインは、ほ乳類の macrophage inflammatory protein に最も構造が類似していた。

## 目 的

魚類の免疫賦活剤の研究は、ワクチンのアジュバントとして古くから研究されてきた。しかし、一般に注目されるようになったのは、Olivier ら(1985)が、フロイント完全アジュバントの単独接種で、せっそう病やビブリオ病に対して高い防御能を示した論文を発表してからである。その後、多くの研究者によって、ほ乳類で使われている免疫賦活作用のある多くの物質が魚類やエビで試験され、その有効性が確認された。現在では、レバミゾール等の合成化合物、イーストグルカン等の菌体成分、チキン等の多糖体、動植物由来の成分、ビタミン等の栄養素、ラクトフェリンやリゾチウム等の生体防御因子およびホルモン等で免疫賦活作用が報告されている。このように一口に免疫賦活剤と言っても様々な物質が研究されており、その作用、有効性、持続性等が個々に異なる。

免疫賦活剤で、活性化する免疫因子として食細胞（好中球やマクロファージ）、補体系、ナチュラルキラー細胞、リゾチーム等が知られている。しかし、免疫賦活剤が免疫機能を活性化するメカニズムについてはまだ十分にわかっていない。本研究において、免疫賦活剤投与魚の腎臓から cDNA ライブラリーを作製し、発現している遺伝子を解析することによって、免疫系が活性化するメカニズムを検討した。

## 材料および方法

### 1 免疫賦活剤

免疫賦活剤としてペプチドグリカン（協和発酵社製）を用いた。

### 2 供試魚

供試魚として平均体重 120 g のヒラメを用いた。このヒラメを水温 16℃ の円形水槽で飼育した。

### 3 賦活剤の投与

ペプチドグリカンを生食塩水に溶解させ、 $1\text{mg}/0.1\text{ml}/\text{fish}$  の濃度を魚の腹腔内に接種した。その 5 日後、腎臓を取りだし、cDNA ライブラリーの作製に用いた。さらに、免疫系の活性化を調べるために、活性酸素の産生を NBT 法を用いて測定した。

### 4 cDNA ライブラリーを用いての免疫系遺伝子のスクリーニング

#### 4-1 Total RNA の粗抽出

ヒラメの頭腎(20  $\mu\text{g}$  程度)を 1ml の ISOGEN(ニッポンジーン)中でホモジナイズし、室温で 5 分間放置した。次に、Chloroform(和光純薬、特級) 200  $\mu\text{l}$  を加え、十分に混合した後、室温で 3 分間放置し、4℃、14000rpm で 15 分間遠心分離を行った。上清を新しいマイクロチューブに移し、Isopropyl Alcohol(和光純薬、精密分析用)500  $\mu\text{l}$  を加え、4℃で 30 分間放置後、4℃、14000rpm、30 分間遠心分離を行った。そして、上清を除去し、80% Ethyl

Alcohol(和光純薬、一級)1ml を加え、緩やかに混合した後、4℃、7500rpm で 5 分間遠心分離を行った。最後に風乾により、Ethyl Alcohol を除去した。残ったペレットは、10  $\mu$ l の Diethyl Pyrocarbonate(SIGMA)処理水に溶解させ、Total RNA 溶液とした。

ここで、Total RNA 溶液の 260nm および 280nm における吸光度を測定し、Total RNA 溶液の濃度および純度を算出した。純度は、 $O.D._{260}/O.D._{280}$  で算出し、この値が 1.6 以上のものを次のステップでサンプルとして使用した。

#### 4-2 mRNA の調製

mRNA の調製は、QuickPrep Micro mRNA Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して行った。

Total RNA 溶液 10  $\mu$ l に、Extraction Buffer 400  $\mu$ l、Elution Buffer 800  $\mu$ l を加え、十分に混合した。ここで、別の新しいマイクロチューブに Oligo (dT)-Cellulose 1ml を用意した。希釈した Total RNA 溶液および Oligo (dT)-Cellulose を 4℃、14000rpm で 1 分間遠心分離を行った。そして、Oligo (dT)-Cellulose の上清を入念に除去し、残ったペレットに Total RNA 溶液の上清 1.2ml を加え、十分に混合し、4℃、14000rpm で 10 秒間遠心分離を行った。

次に、High-Salt Buffer 1ml を加え、十分に混合した後、4℃、14000rpm で 10 秒間遠心分離を行い、上清を除去した。この High-Salt Buffer による洗浄を 5 回繰り返した。さらに、Low-Salt Buffer 1ml を加え、十分に混合した後、4℃、14000rpm で 10 秒間遠心分離を行い、上清を除去した。この Low-



Salt Buffer による洗浄を 2 回繰り返した。残ったペレットに Low-Salt Buffer 300  $\mu$ l を加え、十分に混合した。次に、マイクロチューブに MicroSpin Column 内にサンプル溶液を移した。これに、Low-Salt Buffer 500  $\mu$ l を加え、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 5 秒間遠心分離を行い、濾液を除去した。この Low-Salt Buffer による洗浄を 3 回繰り返した。

洗浄後、あらかじめ 65 $^{\circ}$ C で保温しておいた Elution Buffer 200  $\mu$ l を加え、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 5 秒間遠心分離を行った。さらに、この操作をもう 1 度繰り返して、得られた濾液に、3M Sodium Acetate 13  $\mu$ l、Ethachinmate 4  $\mu$ l、Isopropyl Alcohol 500  $\mu$ l を加え、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間放置後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 30 分間遠心分離を行った。そして、上清を除去し、80% Ethyl Alcohol 1ml を加え、緩やかに混合した後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 10 分間遠心分離を行った。最後に風乾により、Ethyl Alcohol を除去した。残ったペレットは、5  $\mu$ l の DEPC 処理水に溶解させ、mRNA 溶液とした。

ここで、mRNA 溶液の 260nm および 280nm における吸光度を測定し、mRNA 溶液の濃度および純度を算出した。純度は、 $O.D._{260}/O.D._{280}$  で算出し、この値が 1.8 以上のものを次のステップでサンプルとして使用した。また、濃度は、DEPC 処理水を用いて 1  $\mu$ g/ $\mu$ l に調節した。

#### 4-3 ライブラリーの作製

ライブラリーの作製は、ZAP cDNA SYNTHESIS KIT(STRATAGENE)および Gigapack $\cdot$  Gold Packaging Extract(STRATAGENE)を使用して行った。

### 1) 第1鎖 cDNA 合成

10×First Strand Buffer 5  $\mu$ l、10mM First Strand Methyl Nucleotide Mixture 3  $\mu$ l、Linker-Primer 2  $\mu$ l、RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40units/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l を十分に混合した。これに、mRNA 溶液(0.15  $\mu$ g/ $\mu$ l)36.5  $\mu$ l 加え、十分に混合し、室温で10分間放置した。次に、StrataScript RNase H-Reverse Transcriptase(100units/ $\mu$ l) 2.5  $\mu$ l を加え、十分に混合し、37℃で1時間インキュベートした後、氷上に放置した。

### 2) 第2鎖 cDNA 合成

前ステップで調製したサンプル 45  $\mu$ l に、10×second strand buffer 40  $\mu$ l、10mM Second Strand Nucleotide Mixture 6  $\mu$ l、滅菌蒸留水 293.5  $\mu$ l を加え、十分に混合した。さらに、RNase H(1.1units/ $\mu$ l) 4.5  $\mu$ l、DNA Polymerase I (11units/ $\mu$ l) 9  $\mu$ l を加え、十分に混合した後、16℃で2.5時間インキュベートし、氷上に放置した。次に、Phenol:Chloroform[1:1(v/v)] 400  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4℃、14000rpm で2分間遠心分離を行った。さらに、上清を新しいマイクロチューブに移し、Chloroform 400  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4℃、14000rpm で2分間遠心分離を行った。上清を新しいマイクロチューブに移し、100% Ethyl Alcohol 1ml、3M Sodium Acetate 40  $\mu$ l を加え、-20℃で30分間放置後、4℃、14000rpm で60分間遠心分離を行った。そして、上清を除去し、80% Ethyl Alcohol 1ml を加え、緩やかに混合した後、4℃、14000rpm で10分間遠心分離を行った。上清を除去した後、風乾させ、滅菌蒸留水 45  $\mu$ l に溶解させた。

ここで調製した cDNA をテンプレートとした PCR を行い、actin 遺伝子の

存在を確認することにより、cDNA 合成操作の確認を行った。

### 3) 平滑末端化

サンプル 42  $\mu$ l に 10 $\times$ Buffer#3 5  $\mu$ l、2.5mM dNTP Mix 2.5  $\mu$ l、Klenow Fragment(1unit/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後、滅菌蒸留水 50  $\mu$ l を加えた。次に、Phenol:Chloroform[1:1(v/v)] 400  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 2 分間遠心分離を行った。さらに、上清を新しいマイクロチューブに移し、Chloroform 400  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 2 分間遠心分離を行った。上清を新しいマイクロチューブに移し、100% Ethyl Alcohol 1ml、3M Sodium Acetate 40  $\mu$ l を加え、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間放置後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 60 分間遠心分離を行った。そして、上清を除去し、80% Ethyl Alcohol 1ml を加え、緩やかに混合した後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 10 分間遠心分離を行った。上清を除去した後、風乾させた。

### 4) EcoR I アダプター付加

3-3 で残ったペレットに、EcoR I 7  $\mu$ l を加え、ペレットを完全に溶解させた。さらに、10 $\times$ Buffer#3 1  $\mu$ l、10mM rATP 1  $\mu$ l、T4 DNA Ligase(4units/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l を加え、6 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベートした後、70 $^{\circ}$ C のウォーターバス内に 30 分間放置した。

### 5) EcoR I 末端のリン酸化

3-4 で調製したサンプルを室温で 5 分間放置し、10 $\times$ Buffer#3 1  $\mu$ l、10mM rATP 2  $\mu$ l、滅菌蒸留水 6  $\mu$ l、T4 Polynucleotide Kinase(10units/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l を十分に混合し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間、70 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、室温で 5 分間放置した。

#### 6) Xho I 切断

3-5 で調製したサンプルに、Xho I Buffer Supplement 28  $\mu$ l、Xho I (40units/ $\mu$ l) 3  $\mu$ l を加え、十分に 37°C で 1.5 時間インキュベートした後、室温に戻した。さらに、10×STE Buffer 5  $\mu$ l を加えた。

#### 7) UNI-ZAP XR vector arm 内への cDNA ライゲーション

Xho I 切断済みの cDNA の濃度を、滅菌蒸留水を用いて、100ng/ $\mu$ l に調節した。希釈した cDNA 2.5  $\mu$ l に、10×Buffer#3 0.5  $\mu$ l、10mM rATP 0.5  $\mu$ l、Uni-ZAP XR Vector(1  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l を加え、十分に混合した。さらに、T4 DNA Ligase(4Weiss units/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l を加え、十分に混合した後、4°C で 2 日間インキュベートした。

#### 8) パッケージング

Sonic Extract および Freeze-Thaw Extract を氷上で融解した。Freeze-Thaw Extract 30  $\mu$ l に、前ステップまでに調製した cDNA 1  $\mu$ l、Sonic Extract 15  $\mu$ l を加え、十分に混合した後、22°C で 2 時間インキュベートした。次に、Chloroform 20  $\mu$ l を加え、十分に混合した後、軽く遠心分離し、上清をファージ溶液とし、4°C で保存した。

#### 9) タイタリング

XL 1-Blue MRF' Strain を、12.5  $\mu$ g/ml Tetracycline を含む LB プレート上で培養し、続けて 0.2%(v/v) Maltose および 10mM MgSO<sub>4</sub> を含む LB Medium 中で培養した。この培養液を 2000rpm で 10 分間遠心分離を行い、培地を除去した後、10mM MgSO<sub>4</sub> 200  $\mu$ l 中に溶解した。さらに、10mM MgSO<sub>4</sub> を用いて O.D.600=0.5 になるまで希釈した。これを XL 1-Blue MRF' Solution

とした。

SM Buffer(NaCl 5.8g、MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 2g、1M Tris-HCl 50ml、2%(w/v) Gelatin 5ml)を用いて、10<sup>2</sup>倍、10<sup>3</sup>倍、10<sup>4</sup>倍に希釈したサンプルを用意した。XL 1-Blue MRF' Solution 250 μlにそれぞれの濃度のサンプルを1 μlずつ加え、37℃でインキュベートし、20% IPTG 7.5 μl、250mg/ml X-gal 50 μl を加えた NZY Top Agar(NaCl 5g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2g、Yeast Extract 5g、NZ Amine 10g、Agar 7g を1Lの蒸留水に溶解したもの) 3mlに加えて、NZY プレート(NaCl 5g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2g、Yeast Extract 5g、NZ Amine 10g、Agar 15g を1Lの蒸留水に溶解し、オートクレーブ後固化させたもの) に塗布した。これを37℃で一晩培養した。

#### 4-4 プラスミドベクターへの転換

SOLR Strain を、50 μg/ml Kanamycin を含む LB プレート上で培養し、続けて LB Medium 中で、O.D.600=1.0 になるまで培養し、SOLR Solution とした。XL 1-Blue MRF'のコロニーをプレートから拾い、0.2%(v/v) Maltose および 10mM MgSO<sub>4</sub>を含む LB broth 中で O.D.600=1.0 になるまで培養した。この培養液 200 μl にファージ溶液 100 μl および M13K07 Helper Phage(Amersham Pharmacia Biotech) 1 μlを加え、室温で15分間放置した。これを2×YT medium 4mlに加え、37℃で3時間培養した。その後、1mlをマイクロチューブに移し、70℃のウォーターバスで20分間インキュベートし、4℃、5000rpm で20分間遠心分離した。この上清をファージミド溶液として4℃で保存した。

このファージミド溶液 10  $\mu$ l に、SOLR solution 100  $\mu$ l を加え、室温で 15 分間放置した。50  $\mu$ g/ml Ampicillin を含む LB プレート上に 20% IPTG 25  $\mu$ l、20mg/ml X-gal 25  $\mu$ l を塗布した後、サンプル 50  $\mu$ l を塗布した。

#### 4-5 インサートの確認(プラスミド DNA の抽出)

LB プレート上で生育した白コロニーを Ampicillin(最終濃度 50  $\mu$ g/ml)を含む 2 $\times$ YT Medium(Bacto Tryptone 16g, Bacto Yeast Extract 10g を 1L の蒸留水に溶解したもので 16 時間培養し、8000rpm で 5 分間遠心分離を行い、集菌した。さらに、ペレットを 1ml の滅菌蒸留水で洗浄し、8000rpm で 5 分間遠心分離を行った。

次に Solution I (50mM Glucose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA) 100  $\mu$ l を加え、ペレットを緩やかに懸濁させた後、Solution II-A(0.2N NaOH) 100  $\mu$ l および Solution II-B(1% SDS) 100  $\mu$ l を加え十分に混合後、氷中で 5 分間静置した。さらに、Solution III(5M Potassium Acetate) 150  $\mu$ l を加え、十分に混合し、氷中で 15 分間静置した。そして、Chloroform 10  $\mu$ l を加え、十分に混合した後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 10 分間遠心分離を行った。次に、TE Saturated Phenol 400  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 10 分間遠心分離を行った。さらに、上清を新しいマイクロチューブに移し、Chloroform 400  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を新しいマイクロチューブに移し、100% Ethyl Alcohol 1ml、3M Sodium Acetate 40  $\mu$ l を加え、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間放置後、4 $^{\circ}$ C、14000rpm で 20 分間遠心分離を行った。そして、上清を除去し、80% Ethyl Alcohol 1ml を加え、緩

やかに混合した後、4℃、14000rpm で 10 分間遠心分離を行った。最後に風乾により、Ethyl Alcohol を除去した。残ったペレットは、100  $\mu$ l の TE Solution に溶解させた。

次に、10mg/ml Ribonuclease(RNase)(Nippon Gene Co.,LTD) 1  $\mu$ l を加え、十分に混合した後、37℃で 1 時間反応させた。そして、Chloroform 100  $\mu$ l を加え、十分に混合し、4℃、14000rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を新しいマイクロチューブに移し、100% Ethyl Alcohol 250  $\mu$ l、3M Sodium Acetate 10  $\mu$ l を加え、-20℃で 30 分間冷却した。そして、4℃、14000rpm で 20 分間遠心分離を行い、上清を除去した後、80% Ethyl Alcohol 500  $\mu$ l を加え、沈殿を洗浄した後、再び 4℃、14000rpm で 10 分間遠心分離を行った。

上清を除去した後、風乾させ、滅菌蒸留水に溶解させた。これをプラスミド DNA 溶液とした。プラスミド DNA 溶液 1  $\mu$ l、20units/ $\mu$ l EcoR I (Nippon Gene Co.,LTD) 1  $\mu$ l、10×High Salt Buffer 1  $\mu$ l、滅菌蒸留水 7  $\mu$ l を混合し、37℃で 1.5 時間反応させた。反応後、65℃で 5 分間インキュベートし、制限酵素を不活化させた。これを 1.5% Agarose Gel(Agarose S)を使用して、インサートの確認を行った。

#### 4-6 シークエンシング

シークエンスは、AutoCycle Sequencing Kit(Amersham Pharmacia Biotec)を使用し、サイクルシークエンシング法で行った。1  $\mu$ g/ $\mu$ l テンプレート DNA 5  $\mu$ l、蛍光標識 T7 Primer 2  $\mu$ l、Reaction Buffer 2  $\mu$ l、dNTP Solution 5  $\mu$ l、Dimethyl Sulfoxide(DMSO) 2  $\mu$ l、Taq DNA Polymerase 2

$\mu\text{l}$ を混合し、Master Mixとした。次に、あらかじめ氷冷しておいた ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP それぞれ  $2.5\mu\text{l}$  ずつに Master Mix を  $4\mu\text{l}$  ずつ分注し、sequencing sample とした。まず、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 36$  秒間、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 36$  秒間、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 84$  秒間を 5 サイクル、次に、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 36$  秒間、 $50^{\circ}\text{C} \cdot 36$  秒間、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 84$  秒間を 17 サイクル行った。さらに、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 36$  秒間、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 84$  秒間を 14 サイクル行い、最後に  $72^{\circ}\text{C}$  で 5 分間インキュベートした後、氷冷した。その後、Stop Solution  $4\mu\text{l}$  を加え  $95^{\circ}\text{C}$  で 3 分間加熱し、このうち、 $5\mu\text{l}$  をゲルに注入した。

シーケンス用ゲルは、6%(W/V) Polyacrylamide Gel[Amersham Pharmacia Biotech, Ready Mix Gel; 5.7%(w/v) Acrylamide、0.3%(w/v) N,N'-Methylenebisacrylamide、7M Urea、0.1M Tris-borate(pH8.3)、1mM Na<sub>2</sub>EDTA、3mM N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)を使用した。凍結したゲルは、 $4^{\circ}\text{C}$  で 48 時間かけて解凍し、室温に 1 時間置いた。10% AmmoniumPersulfate(APS) Solution  $450\mu\text{l}$  を加え、穏やかに混合し、4 時間ゲルを重合させた。

電気泳動装置は、ALF · DNA Sequencer(Amersham Pharmacia Biotec) を使用し、泳動条件は、以下のように設定した。ゲル板は、0.5mm を使用し、Running Buffer  $0.6 \times \text{TBE}$ 、Voltage 1500V、Current 38mA、Power 34W、Sampling interval 2sec、Running Time 600min、Laser Power 3mA、Temperature  $45^{\circ}\text{C}$  とした。

## 5 データ解析

BLAST Program(<http://www.blast.genome.ad.jp/>)を用いて、dbEST を



含む Genbank 上のデータベースと比較を行った。

## 6 DDBJ(DNA Data Bank of Japan)への EST データの登録

DDBJ の登録規定フォームにのっとり、Annotation File、Sequence File、Definition File の 3 つを作製し、それぞれの遺伝子を登録しアクセッションナンバーを付けた。

## 結果および考察

本研究で、ペプチドグリカン投与魚の腎臓で発現する遺伝子の 198 クローンの解析を行った。そのうちデータベース上で登録されている遺伝子と相同性が確認できたものは 91 クローンで、既知の遺伝子との相同性が見られなかったのは 107 クローンであった。その遺伝子を機能別に Table 1 に示した。

その中で、細胞構造や細胞運動に関与する遺伝子として、 $\alpha$ -tubulin、cytochrome C oxidase subunit、cytochrome oxidase 1、kinesin light chain、myosin alkali light chain がクローニングされた。

細胞表面伝達シグナルに関与する遺伝子として、activated protein kinase C receptor の遺伝子がクローニングされた。

遺伝子およびタンパク質の発現に関与する遺伝子として、さまざまなタイプの ribosomal protein (合計 15 種類)、translation initiation factor 3、ubiquitin like S30 protein、replication factor C 37k chain、20S proteasome subunit C2、actin-related protein、cellular nucleic acid binding protein、high choriolytic proteinase 等の遺伝子がクローニングされた。

代謝系に関与する遺伝子として、 $\alpha$ -adaplin、 $\alpha$ -および  $\beta$ -globin、cysteine proteinase inhibitor、ferritin heavy chain subunit 等の遺伝子がクローニングされた。

免疫系に関与する遺伝子として以下の遺伝子がクローニングされた。

## $\beta_2$ microglobulin

$\beta_2$  microglobulin は、MHC クラス 1  $\alpha$  鎖分子と結合し、すべての細胞表面に存在する分子である。すでに、多くの魚からこの遺伝子は分離されている。今回分離した遺伝子は、コイと最も高い相同性 (83 %) を示した (Fig. 1)。さらに、系統樹を用いて類縁関係を検討したところ、今回クローニングした遺伝子は、ニジマスとコイのアウトグループに位置し、哺乳動物とは、明らかに異なる位置に存在した (Fig. 2)。

## CC-chemokine

ケモカインは、さまざまな生理活性を持つサイトカインの一種である。特に、免疫学的には、食細胞の遊走能を引き起こすことが知られている。このケモカインは、その構造から主に、CC と CXC に分類される。今回、ヒラメより分離されたケモカインは、システインが 2 つ連続することから CC に同定することが出来た。このケモカインの構造を Fig. 3 に示した。今回クローニングされた CC ケモカインは、魚類や哺乳類で報告されている分子とは異なり新しいものである可能性が系統樹より推測された (Fig. 4)。今後は、この遺伝子の機能についての詳しい検討が必要である。

## Immunoglobulin heavy chain (IgH) と Immunoglobulin light chain (IgL)

免疫グロブリンは、抗体分子である免疫系の中心的な役割を担うことが知られている。免疫グロブリンは、L 鎖と H 鎖からなることが知られている。本研究において、この両方の鎖をクローニングし、その構造を明らかにすることが

できた。

今回クローニングできたヒラメの IgH 鎖は、C4 ドメインすべてと部分的な C3 ドメインのみであった。この C4 ドメインの構造を、その他の魚種と比較したところキャットフィッシュと 84% の相同性が確認された (Fig. 5)。さらに、系統樹を作成した結果、コイとキャットフィッシュのアウトグループにヒラメの遺伝子は位置つけられた (Fig. 6)。

さらに、今回分離されたヒラメの IgL 鎖の構造を解析した結果、ニジマスの IgL2 と最も高い相同性を示した (Fig. 7 と 8)。

### Lysozyme

リゾチームは、体液や粘液中に存在する殺菌タンパク質の一種である。リゾチームは、無脊椎動物から脊椎動物まで広く存在することが知られている。魚類でも、すでに数種からこの遺伝子のクローニングが行われている。今回クローニングした遺伝子は、すでにヒラメで報告されているものと、ほとんど同じ配列であった (Fig. 9 と Fig. 10)。

### Thymosin $\beta$

Thymosin は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのタイプがあることが知られており、さまざまな機能を持っている。免疫系に与える作用としては、サイトカインの産生や抗体産生の促進等が知られている。魚類においては、すでにニジマスやゼブラフィッシュでこの遺伝子のクローニングが行われている。今回クローニングした遺伝子は、その構造から  $\beta$  型であることが示された。このヒラメの

Thymosin  $\beta$  の構造を Fig. 11 に示した。今回分離した遺伝子は、ニジマスの Thymosin  $\beta$  11 と最も高い相同性を示した (Fig. 12)。

Table 1. List of identified ESTs from the head kidney cDNA library of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* stimulated by Peptidoglycan.

clone no.	Accession no.	genes	closest species	identities (%)	length	Homolog of Flounder(%)
<b>Cell structure/Mortality</b>						
M-082	AU090310	$\alpha$ -tubulin	Chicken	252/292(82)	373	259/272(95)
M-170	AU090385	cytochrome C oxidase subunit III	Carp	223/281(79)	316	285/286(99)
M-071	AU090303	cytochrome oxidase 1	Prairie warble	111/129(86)	400	349/355(98)
M-030	AU090275	kinesin light chain	Chicken	76/85(89)	192	150/164(91)
M-222	AU090431	myosin alkali light chain	Chicken	229/287(79)	396	208/246(84)
<b>Cell signal/Cell communication</b>						
M-055(2)	AU090290	activated protein kinase C receptor	Nile tilapia	402/437(92)	486	410/411(99)
<b>Cell/organ defence</b>						
M-038(2)	AU090280	$\beta$ -2 microglobulin	Carp	67/80(83)	482	369/373(98)
M-158	AU090374	heat shock protein 90 $\beta$	Salmon	307/347(88)	372	357/358(99)
M-232	AU090439	hepatic lectin	Chicken	17/47(36)	462	-
M-056	AU090291	Ig heavy-chain precursor (IgH)	Antarctic fish	74/89(83)	477	334/338(98)
M-134	AU090352	immunoglobulin light chain L2	Rainbow trout	115/143(80)	467	-
M-099	AU090322	lysozyme	Chicken	33/35(94)	396	357/360(99)
M-160	AU090535	macrophage inflammatory protein 1- $\alpha$ precursor	Human	33/76(43)	312	-
M-226	AU090435	MHC class II $\alpha$	Striped bass	98/109(89)	387	322/325(99)
M-176	AU090391	thymosin $\beta$ -10	Human	46/51(90)	313	300/304(98)
<b>Gene/protein expression</b>						
M-202	AU090414	16S large subunit ribosomal gene	European flounder	401/442(90)	479	434/441(98)
M-017	AU090268	18S ribosomal RNA	Carp	137/140(97)	155	-
M-190	AU090403	20S proteasome subunit C2	Chicken	225/270(83)	457	-
M-112	AU090336	28S ribosomal RNA	Kenyan clawed frog	220/225(97)	241	227/228(99)
M-208	AU090419	acidic ribosomal protein P0	Zebra fish	354/416(85)	419	404/412(98)
M-183	AU090398	actin-related protein	Human	273/335(81)	469	-
M-009	AU090261	cellular nucleic acid binding protein	Japanese medaka	205/219(93)	234	-
M-161	AU090376	high choriolytic hatching proteinase	Japanese medaka	65/113(57%)	354	175/176(99)
M-101	AU090324	mitochondrial processing peptidase $\beta$ -subunit	Rat	66/79(83)	392	-
M-237	AU090444	mitochondrial DNA Cyt-b region	Left eye flounder	71/75(94)	88	71/75(94)
M-128(2)	AU090346	mitochondrion genome	Arotic char	120/145(82)	320	310/312(99)
M-174	AU090389	partial 40S ribosomal protein S30	Japanese medaka	188/218(86)	316	307/309(99)
M-148(2)	AU090365	ribosomal protein L9	House mouse	181/216(83)	450	-
M-238	AU090445	ribosomal protein L10a	Rat	286/336(85)	372	344/359(95)
M-159	AU090375	ribosomal protein L12	Rat	167/231(86)	375	337/365(92)
M-162	AU090377	ribosomal protein L17	European sea bass	310/326(95)	346	330/330(100)
M-011(2)	AU090263	ribosomal protein L18a	Salmon	283/321(88)	467	227/242(93)
M-066	AU090299	ribosomal protein L21	Rat	187/219(85)	389	265/279(94)
M-167	AU090382	ribosomal protein L30	Mouse	190/227(83)	279	-

M-133	AU090351	ribosomal protein L41	House mouse	22/22(100)	315	304/308(98)
M-225(2)	AU090434	ribosomal protein S2	Rat	110/127(86)	212	183/205(89)
M-029(3)	AU090274	ribosomal protein S8	African clawed frog	233/276(84)	486	412/444(92)
M-094	AU090318	ribosomal protein S14	House mouse	292/353(82)	405	376/380(98)
M-233	AU090440	ribosomal protein 18S	Tarpon	227/244(93)	253	244/245(99)
M-060	AU090294	ribosomal protein S21	Human	145/182(79)	299	-
M-231	AU090438	replication factor C 37k chain	Human	70/106(66)	464	-
M-052	AU090289	translation initiation factor eIF3 p40 subunit	Human	149/178(83)	362	-
M-213	AU090423	translation initiation factor eIF4AI	African clawed frog	164/200(82)	223	-
M-087	AU090314	ubiquitin like S30 protein	Rat	111/129(86)	448	394/402(98)
<b>Metabolism</b> M-097	AU090320	aflatoxin B1 aldehyde reductase	Norway rat	33/37(89)	406	-
M-147	AU090364	$\alpha$ -adaptn(A)	Mouse	25/26(96)	447	-
M-050(17)	AU090287	$\alpha$ -globin	Rainbow trout	50/57(87)	478	342/350(97)
M-240(5)	AU090446	$\alpha$ globin I	Rainbow trout	56/64(87)	452	406/415(97)
M-180	AU090395	$\alpha$ -globin A	Yellow tail	124/142(87)	314	278/283(98)
M-141(3)	AU090359	$\beta$ -globin	Carp	116/142(81)	461	423/431(98)
M-157	AU090373	cysteine proteinase inhibitor	Atlantic halibut	165/186(88)	368	-
M-124(2)	AU09344	embryonic $\alpha$ -type globin	Japanease medaka	49/57(85)	338	317/325(97)
M-149	AU090366	ferritin heavy subunit	Salmon	142/157(90)	448	301/303(99)
M-203	AU090415	mitochondrial isocitrate dehydrogenase	Bovine	315/380(82)	482	-
M-119	AU090340	T79a mitochondrion NADH dehydrogenase subunit2	African cichlid fish	208/251(82)	357	313/317(98)
M-077	AU090307	uridine phosphorylase	Mouse	32/35(91)	384	-
<b>Unclassified</b> M-147	AU090364	$\alpha$ -adaptn(A)	Mouse	25/26(96)	447	-
M-137	AU090355	myristoylated alanine-rich C kinase substorate	African clawed frog	114/121(94)	139	-
M-199	AU090411	sec61 homolog gene	Human	61/69(88)	474	-
M-081	AU090309	sec61 protein complex $\gamma$ subunit	House mouse	145/169(85)	282	-
M-206	AU090417	small nuclear RNA U2	Human	130/138(94)	150	-

**Table 2. The Number of analyzed cDNA clones and sequences.**

Tissues	Homologues of known genes		No database match		Total
	No. of clones		No. of clones		No. of clones
Kidney	92(46.5%)		106(53.5%)		198
	Homolog of Flounder in matching of known genes(%)		Homolog of Flounder in no database match(%)		Total
Tissues	No. of clones(Flounder/No Flounder)		No. of clones(Flounder/No Flounder)		The number of Homolog of Flounder
Kidney	66(72.5%)		27(19.6%)		93



M108	1: QARIVLCALALYCCVNA <sup>Y</sup> ISPKVQVYSRMKQGFGE <sup>NT</sup> LI <sup>C</sup> NVKDFHPPDITVELL	60
Carp	1: MR <sup>A</sup> ITFALFCVLYVT-VQ <sup>G</sup> KTSSPKVQVYSH <sup>F</sup> PG <sup>E</sup> Y <sup>G</sup> KE <sup>N</sup> TLI <sup>C</sup> HVSGFHPDITIELL	59
Human	1: M <sup>R</sup> SVALAVLALLSLSGLEA <sup>I</sup> QRT <sup>P</sup> K <sup>I</sup> QVYSRHPAENGKSNFLN <sup>C</sup> YVSGFHS <sup>D</sup> IEVDLL	60
Mouse	1: M <sup>A</sup> RSVTLVFLVLSLTGLYA <sup>I</sup> QKT <sup>P</sup> Q <sup>I</sup> QVYSRHPPE <sup>N</sup> GKPNILN <sup>C</sup> YVTFHPPH <sup>I</sup> EIQML	60
Rabbit	1: -----VQR <sup>A</sup> PN <sup>V</sup> QVYSRHPAENGKPNFLN <sup>C</sup> YVSGFHP <sup>P</sup> QIDIELL	40
Rainbow trout (Jb12)	1: M-KTVLSVIAFCVFLGINAKESPPK <sup>V</sup> QVYSRNP <sup>G</sup> QH <sup>G</sup> KDNTLI <sup>C</sup> HVSGFHP <sup>P</sup> DISIQLL	59
Rainbow trout (Jb5)	1: M-KYILSIVVLGLIYSAVEAKESPPK <sup>V</sup> QVYSRNP <sup>G</sup> N <sup>F</sup> GDKNTLI <sup>C</sup> HVSGFHP <sup>P</sup> DISIQLL	59
Rat	1: M <sup>A</sup> RSVTVIFLVLVSLAVLAIQKT <sup>P</sup> Q <sup>I</sup> QVYSRHPPE <sup>N</sup> GKPNFLN <sup>C</sup> YVSGFHP <sup>P</sup> QIEIELL	60
Turkey	1: -----DLT <sup>P</sup> KVQVYSRFPASAGT <sup>K</sup> NV <sup>L</sup> NCF <sup>A</sup> AGFHP <sup>P</sup> KISITLM	39
Zebrafish	1: M-RALITFALLCLLYITVQGVST <sup>P</sup> KV <sup>H</sup> VYSH <sup>F</sup> PG <sup>E</sup> Y <sup>G</sup> KPN <sup>T</sup> LIC <sup>Y</sup> V <sup>S</sup> SH <sup>F</sup> HP <sup>P</sup> DISIELL	59
M108	61: K <sup>D</sup> G <sup>E</sup> I <sup>L</sup> P <sup>R</sup> V <sup>M</sup> Q <sup>T</sup> D <sup>L</sup> A <sup>F</sup> K <sup>P</sup> S <sup>M</sup> Q <sup>F</sup> H <sup>L</sup> T <sup>Y</sup> F <sup>V</sup> P <sup>F</sup> T <sup>P</sup> A <sup>A</sup> D <sup>H</sup> K <sup>Y</sup> S <sup>C</sup> R <sup>V</sup> T <sup>H</sup> -G <sup>S</sup> T <sup>V</sup> K <sup>N</sup> Y <sup>A</sup> W <sup>E</sup> P <sup>N</sup> M	117
Carp	60: K <sup>D</sup> G <sup>E</sup> I <sup>L</sup> P <sup>N</sup> T <sup>Q</sup> Q <sup>T</sup> D <sup>L</sup> A <sup>F</sup> E <sup>K</sup> G <sup>W</sup> Q <sup>F</sup> H <sup>L</sup> T <sup>K</sup> S <sup>V</sup> T <sup>F</sup> K <sup>P</sup> E <sup>R</sup> G <sup>O</sup> N <sup>Y</sup> A <sup>C</sup> S <sup>V</sup> R <sup>H</sup> --M <sup>N</sup> N <sup>K</sup> N <sup>I</sup> Y <sup>S</sup> W <sup>E</sup> P <sup>N</sup> M	116
Human	61: K <sup>N</sup> G <sup>E</sup> R <sup>I</sup> E <sup>K</sup> V <sup>E</sup> H <sup>S</sup> D <sup>L</sup> S <sup>F</sup> S <sup>K</sup> D <sup>W</sup> S <sup>F</sup> Y <sup>L</sup> L <sup>Y</sup> Y <sup>T</sup> E <sup>F</sup> T <sup>P</sup> T <sup>E</sup> K <sup>D</sup> E <sup>Y</sup> A <sup>C</sup> R <sup>V</sup> N <sup>H</sup> V <sup>T</sup> L <sup>S</sup> O <sup>P</sup> K <sup>I</sup> V <sup>K</sup> W <sup>D</sup> R <sup>D</sup> M	119
Mouse	61: K <sup>N</sup> G <sup>K</sup> K <sup>I</sup> P <sup>K</sup> V <sup>E</sup> M <sup>S</sup> D <sup>M</sup> S <sup>F</sup> S <sup>K</sup> D <sup>W</sup> S <sup>F</sup> Y <sup>I</sup> L <sup>A</sup> H <sup>T</sup> E <sup>F</sup> T <sup>P</sup> T <sup>E</sup> T <sup>D</sup> T <sup>Y</sup> A <sup>C</sup> R <sup>V</sup> K <sup>H</sup> D <sup>S</sup> M <sup>A</sup> E <sup>P</sup> K <sup>T</sup> V <sup>Y</sup> W <sup>D</sup> R <sup>D</sup> M	119
Rabbit	41: K <sup>N</sup> G <sup>V</sup> K <sup>I</sup> E <sup>N</sup> V <sup>E</sup> Q <sup>S</sup> D <sup>L</sup> S <sup>F</sup> N <sup>K</sup> D <sup>W</sup> S <sup>F</sup> Y <sup>L</sup> L <sup>V</sup> H <sup>T</sup> E <sup>F</sup> T <sup>P</sup> N <sup>N</sup> K <sup>N</sup> E <sup>Y</sup> S <sup>C</sup> R <sup>V</sup> K <sup>H</sup> V <sup>T</sup> L <sup>K</sup> E <sup>P</sup> M <sup>T</sup> V <sup>K</sup> W <sup>D</sup> R <sup>D</sup> Y	99
Rainbow trout (Jb12)	60: E <sup>N</sup> G <sup>V</sup> E <sup>I</sup> P <sup>D</sup> A <sup>K</sup> Q <sup>T</sup> D <sup>L</sup> A <sup>F</sup> E <sup>Q</sup> G <sup>W</sup> Q <sup>F</sup> H <sup>L</sup> T <sup>K</sup> S <sup>V</sup> G <sup>F</sup> T <sup>P</sup> A <sup>S</sup> G <sup>E</sup> E <sup>Y</sup> T <sup>C</sup> R <sup>V</sup> R <sup>H</sup> --L <sup>K</sup> N <sup>L</sup> K <sup>T</sup> Y <sup>T</sup> W <sup>E</sup> A <sup>D</sup> M	116
Rainbow trout (Jb5)	60: K <sup>N</sup> G <sup>V</sup> E <sup>I</sup> P <sup>D</sup> A <sup>K</sup> Q <sup>T</sup> D <sup>L</sup> A <sup>F</sup> E <sup>Q</sup> G <sup>W</sup> Q <sup>F</sup> H <sup>L</sup> T <sup>K</sup> S <sup>V</sup> G <sup>F</sup> T <sup>P</sup> A <sup>S</sup> G <sup>E</sup> E <sup>Y</sup> T <sup>C</sup> R <sup>V</sup> R <sup>H</sup> --L <sup>K</sup> N <sup>L</sup> K <sup>T</sup> Y <sup>T</sup> W <sup>E</sup> A <sup>D</sup> M	116
Rat	61: K <sup>N</sup> G <sup>K</sup> K <sup>I</sup> P <sup>N</sup> I <sup>E</sup> M <sup>S</sup> D <sup>L</sup> S <sup>F</sup> S <sup>K</sup> D <sup>W</sup> S <sup>F</sup> Y <sup>I</sup> L <sup>A</sup> H <sup>T</sup> E <sup>F</sup> T <sup>P</sup> T <sup>E</sup> T <sup>D</sup> V <sup>Y</sup> A <sup>C</sup> R <sup>V</sup> K <sup>H</sup> V <sup>T</sup> L <sup>K</sup> E <sup>P</sup> K <sup>T</sup> V <sup>T</sup> W <sup>D</sup> R <sup>D</sup> M	119
Turkey	40: K <sup>D</sup> G <sup>V</sup> P <sup>M</sup> E <sup>G</sup> A <sup>Q</sup> Y <sup>S</sup> D <sup>M</sup> S <sup>F</sup> N <sup>D</sup> D <sup>W</sup> S <sup>F</sup> Q <sup>R</sup> L <sup>V</sup> Y <sup>A</sup> D <sup>F</sup> T <sup>P</sup> S <sup>S</sup> D <sup>A</sup> V <sup>T</sup> C <sup>K</sup> V <sup>D</sup> H <sup>E</sup> T <sup>L</sup> K <sup>E</sup> P <sup>Q</sup> V <sup>Y</sup> K <sup>W</sup> D <sup>P</sup> E <sup>F</sup>	98
Zebrafish	60: K <sup>N</sup> G <sup>Q</sup> V <sup>M</sup> S <sup>D</sup> T <sup>K</sup> Q <sup>T</sup> D <sup>L</sup> A <sup>F</sup> E <sup>K</sup> G <sup>W</sup> Q <sup>F</sup> H <sup>L</sup> T <sup>K</sup> S <sup>V</sup> A <sup>F</sup> T <sup>P</sup> E <sup>K</sup> G <sup>D</sup> E <sup>Y</sup> T <sup>C</sup> S <sup>V</sup> R <sup>H</sup> --M <sup>K</sup> E <sup>T</sup> K <sup>K</sup> F <sup>S</sup> W <sup>E</sup> P <sup>N</sup> M	116

Figure 1. Alignment of amino acid sequence of M108 with  $\beta$ 2-microglobulin of different vertebrate.

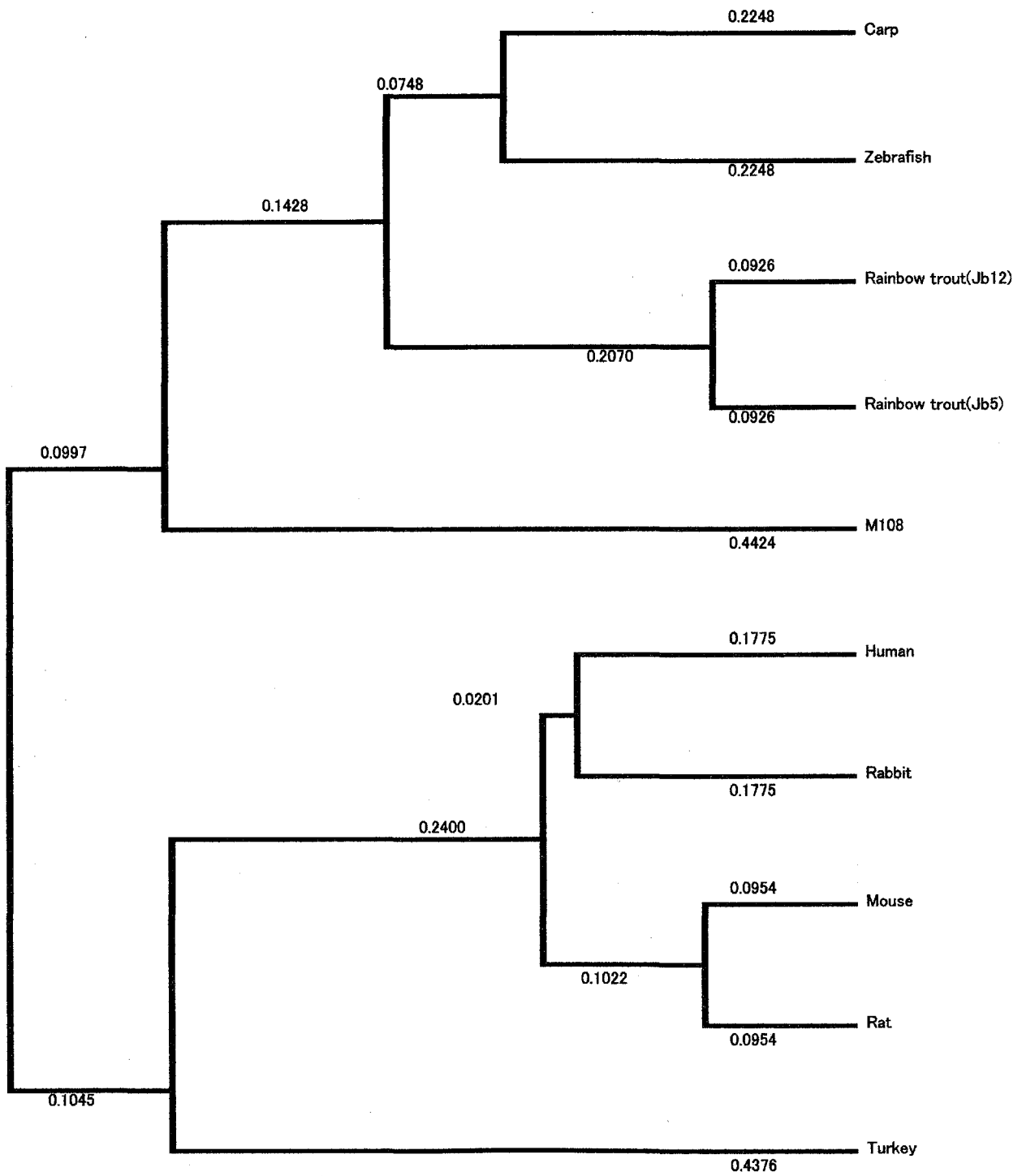


Figure 2. Phylogenetic trees of an alignment of M108 and  $\beta$  2-microglobulin in vertebrate.

M-160	1:-----MRPLQVLLLCILGAALLAPVLCNNA-----LGPDDCCFNFYSRVRVKKTKLS-Y--Y 48
Chicken MIP	1:-----MKVSAALAVLL--IAICYQTSAA-APVGSDDPTSCCFTYISRLQFFSFVADY--Y 50
human eotaxin	1:-----MKVSAALLWLLIAAAAFSPQGLA---GPASVPTCCFNLANRKIFLQRLSYR-R 51
Human MCP-1	1:-----MKVSAALLCLLLIAATFIPOGLA-QEDAINAVTCCYNFNTRKISVQRLASR-R 53
Human MIP-alpha	1:-----MQVSTAALAVLLCTMALCNQFSA--SLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFADY--F 51
Human MIP-beta	1:-----MKLCVTVLSLLMLVAAFCSPALSA-PMGSDPTACCFSYTARKLFRNFVVDY--Y 52
Human RANTES	1:-----MKVSAALAVLLIATALCAPASA-SPYSSDT-TPCCFAIARPLPRAHIKEY--F 51
mouse eotaxin	1:-----MQSSTALLFLLLVTSFTSQVLA---HPSIPTSCCFIMTSKKIIPNTLLKSYK-R 51
mouse MIP1 alpha	1:-----MKVSTTALAVLLCTMTLCNQVFS-APYGADTPTACCFSYS-RKIIPRQFIVDY--F 51
mouse MIP1 beta	1:-----MKLCVSALLSLLLVAAFCAPGESA-PMGSDPTSCCFSYTSRQLHRSFVMDY--Y 52
mouse RANTES	1:-----MKISAAALTIILTAALCTPAPA-SPYGSDT-TPCCFAIYLSLELPRAHVKEY--F 51
Rainbow Trout CK1	1:MISRCVLAALFSLIITLIPTTQSA-----DCCLKFTRRPVHCRWLKGYTFQ 49
S-84	1:--METRRILMRSLAVAVVIAIVITTTA---ADTAVVYSCCTKVTTAETVDPILNIRL-Q 54
M-160	49:MTDRCCKMGVILVTQKSHHICADPDVQWVQGIMKFLDEKNF----- 90
Chicken MIP	51:ETNSQCPHAGVVFITIRKGRFVCANPENDWVQDYMNKLFN----- 90
human eotaxin	52:ITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKKWQDSMKYLDQKS-----PTPKP--- 97
Human MCP-1	54:ITSSKCPKEAVIFKTIIVAKFICADPKQKQWQDSMDHLDKQT-----QTPKT--- 99
Human MIP-alpha	52:ETSSQCKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLFLSA----- 92
Human MIP-beta	53:ETSSLCSPAVVFTKRSKQVCADPSESQVQYVYDLEFLN----- 92
Human RANTES	52:YTSKCSNPVAVVFTRNKRVQVCANPEKKWVREYINSLFMS----- 91
mouse eotaxin	52:ITNNRCTLKAVIFKTRLGKEICADPKKKWQDATKHLQDKL-----QTPKP--- 97
mouse MIP1 alpha	52:ETSSLCSPQGVIFLTKRNRQICADSKETWVQYITDLELNA----- 92
mouse MIP1 beta	53:ETSSLCSPAVVFTKRGRIICANPSEFPVWTEYMSDLELN----- 92
mouse RANTES	52:YTSSKCSNLAIVVFTRNKRVQVCANPEKKWVQYINYLEMS----- 91
Rainbow Trout CK1	50:DISSCDLNAVIFQNLRNKVFVADPSQDWTK-RVQRCLRKRQEKKSQSLKRRV 100
S-84	55:RESLPCVK-AVIFKTKQG-EFCSDPKLRWVKEKVKQFFKKTPAASS-ISD--- 101

Figure 3. Alignment of the deduced amino acid sequence of M-160 with other vertebrate CC chemokine sequences.

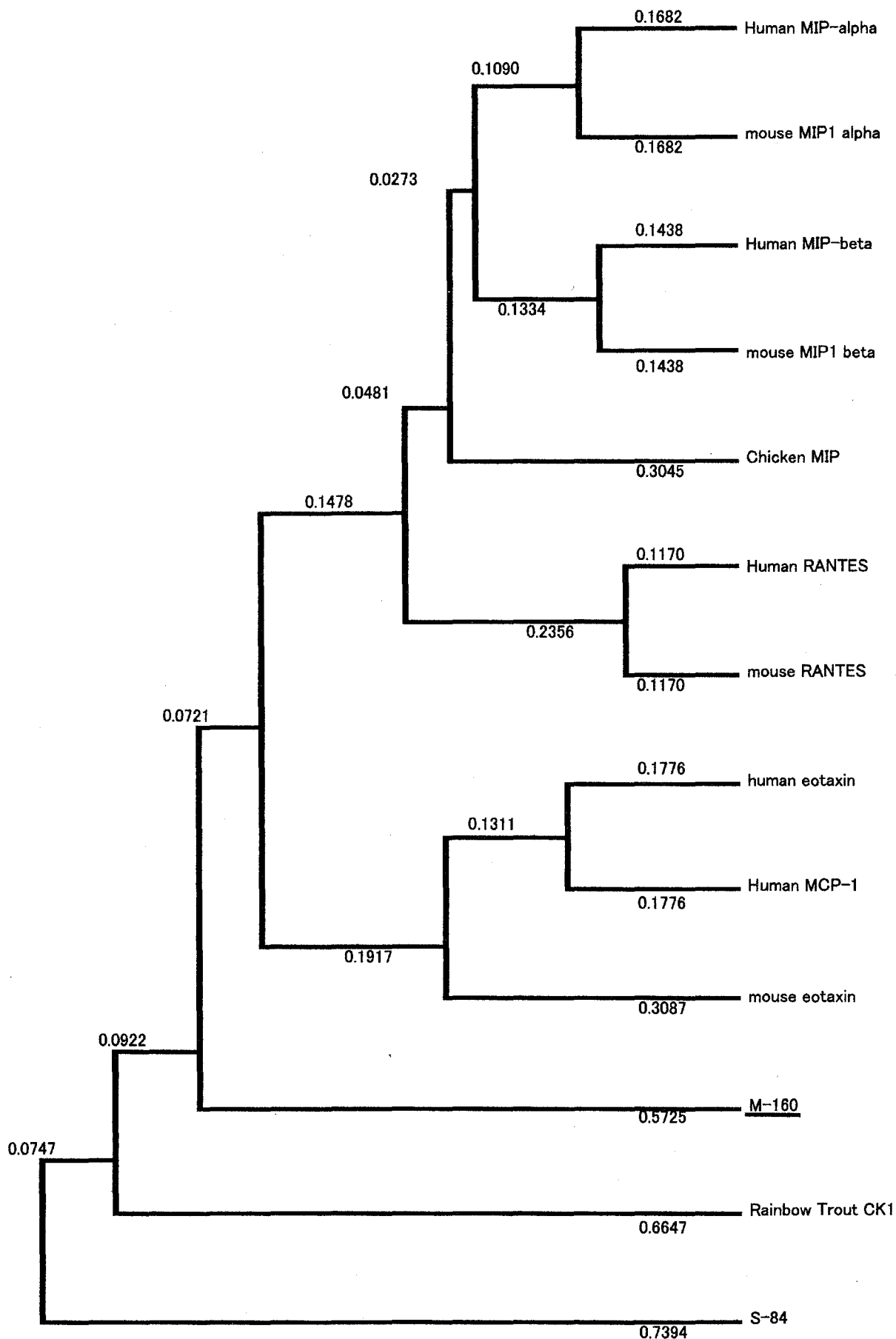


Figure 4. Phylogenetic trees of an alignment of M-160 and CC chemokine in vertebrate.

```

M56      1: TGVQTRPSVFMMPVEHVKKDVTLLTCYVKDFSPPEVFSWLVDDDE-----YPSGYKF 54
Catfish  1: NGN-PEFPKVYLLAPPESS-GESVTLTCYVKDFYPKEVAVSWLVNDK---QVEEVVGYEQ 55
Cod      1: NGRNRVPPSVYLLPPVDDLSCTNMTLTCFVKDFYPADILVHWLVDN---LTIDGNALYSH 57
Cp1     1: NGKKPKKPTVFLAPPEHKKGEPMTLTCYVKDFYPKEVFVSWLADD-----EPVTSKY 53
Lady fish 1: CGGKWQSPTVFI LAPAEQRNLSTVLLICYAKDFYPEQVLISWLVDD-----QPVETDV 53
Salmon  1: TGGDPQRPSVFL LAPAEKTSDNTVTLTCYVKDFYPKEVLVAVLIDDDEPVERTSSALYQF 60

M56      55: NTTNPIESNGSYSAYGQLSLDLEQWKKEGVMYSCVVYPQSVVN-NTKAIVRSIGPKTFET 113
Catfish  56: NTTAVIDRNNLFSVYSQLIIKTADWNSG-SVFSCLVYHESIKD-CVRHISRSIAKDSK-T 112
Cod      58: KTTNVIENGDLFSTYGQLTFSSDGWKDG-RVFRCEVYHMSMDS-KNQPIVKLITEKSSGN 115
Cp1     54: STSLPIQKDQTFSVYSQLTVNDSKWTNG-TVFSCVVYHEAIDE-KMRVLTRSITDNIE-K 110
Lady fish 54: PTTEVVKTEGTYSVFSQLTIPASDWDSG-VVYSCAVHHETVMESVVKTIVRTTDSVSK-K 111
Salmon  61: NTTSQIQTGRTYSVYSQLTFSNDLWKNKEVYSCVVYHESMIK-STKILMRTIDRTSN-Q 118

M56      114: TNLVNLNMNIP--CKAQ-- 128
Catfish  113: PTLVNLTLTNPQSCSCSTY 131
Cod      116: VNIINMNLG-PSTCLPQ-- 131
Cp1     111: AGVINLSMNTPAFCK-P-- 126
Lady fish 112: PTTVSLDLNVPQTCKV--- 127
Salmon  119: PVLVNLSLNVPQSCRAQ-- 135

```

Figure 5. Alignment of amino acid sequence of M56 with Igh of different vertebrate.

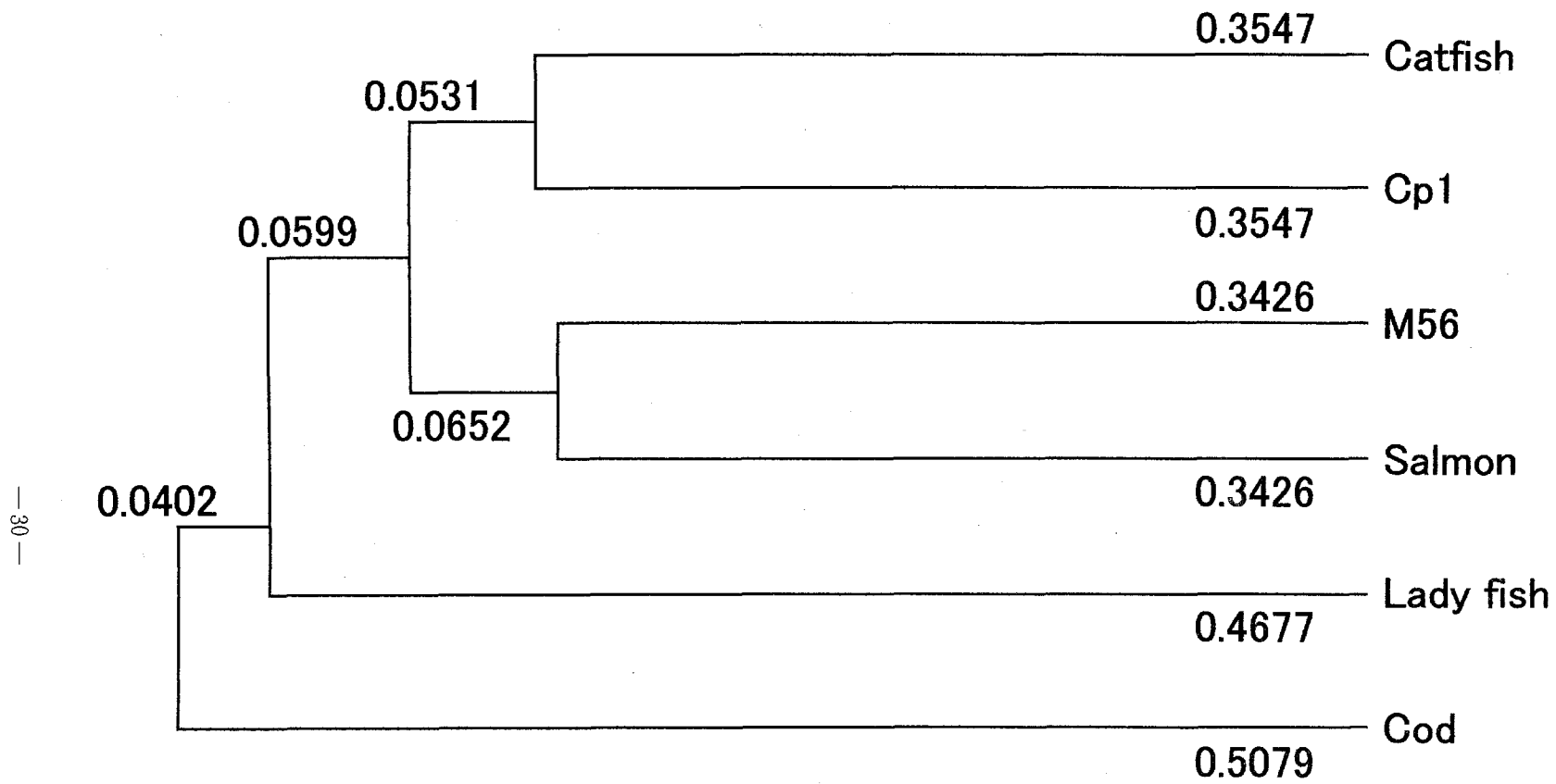


Figure 6. Phylogenetic trees of an alignment of M56 and IgH in vertebrate.

Catfish F	1: TGPTVKPSVSLLPSSSLQLS-EGSASLLCLLSAYSPOGALVSWTVDGSEVKDGVLTSAEE	59
Catfish G	1: --RLTQPSVTVLPPSSVELQ-QEKVTLVCVAYKGFPSDWRLSWKVDGSSWSSGESRSSAV	57
Cod	1: --GVVQPTLSVLPPSRVELE-QGSATLLCVASGGFPSDWKLGWKVGGSSRSGGVSDSLGV	57
Horse kappa	1: --DDAKPSAFIFPPSSEELS-SGSASVVCLVYGFYPSGATINWKVDGLAKTSSFHSSLTE	57
Horse ramda	1: --PTSAPSVSLFPPSSEELS-ANKATVVCLISDFSPSDLTVSWKVNAAISQGVQTTKPS	57
Human kappa	1: --ADAAPTIVSIFPPSSEQLT-SGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTD	57
Human ramda	1: --PKANPTVTVLFPSSSEELQ-ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPS	57
Mouse kappa	1: --ADVAPTIVSIFPPSSEQLT-SGGASVVCFLNNFYPRDINVWKIDGSERQGGVLNSWTD	57
Mouse ramda	1: --PKSSPSVTVLFPSSSEELE-TNKATLVCTITDFYPGVTVVDWKVDGTPVTQGMETTQPS	57
Sheep kappa	1: --SDAQPSVFLFKPSEEQLR-TGTVSVVCLVNDFYPKDINVWKVDGVTQNSNFQNSFTD	57
Sheep ramda	1: --PKSAPSVTVLFPSSKEELD-TNKATVVCLISDFYPGSVNVVWKADGSIINQNVKTTQAS	57
Trout IgL1	1: --SNSAPTTLTVLPPSSEELSSTTTTATLMCLANKGFPSDWTLVSWKVDGTSQK--QETSSTV	56
Trout IgL2	1: DSTLPPPVLTVLPPSSDELKSS-KVTLVCLASQAMGYADVSWTAGGTPVTGGIATSGPV	59
Cpb4	1: --SVTRPKVSVLPPSSAEISSKKTATLMCVASEGFPSDWLSLWVVDGSSRSQ--ESSAGL	56
Cpc1	1: --TATRPALTIVLPPSRDELQ-QGKATVLCVASKGFPSDWKLSWKVDGSSRSSGVNLSPSQ	57
Cpd1	1: TGPVAVKPSVSLLPSSSLQIS-GDSAALLCLLSSYSPPQGAQVSWRLDGSEVTEGVQTSAES	59
M-134	1: GSSLSPPVLTIVFPSSAELR-SNKATLLCLSSQVSP-FAEVTWLVGGSPVSSGISTSTAS	58

Catfish F	60: RKK-DG-YTHSSTLTLTKALWEKGEEFVCKVSHDN--VDHPVTF-RKSQCEV--	106
Catfish G	58: LQA-DGLYSWSSTLTLHPEQWRNK-VVTCEASKDNQ-PPVVSTVNTEQC----	103
Cod	58: LGK-DGHYSWSSTLTLPADQWRKAGSVSCEASKNGQTQPVTQTLNPGECSE-	107
Horse kappa	58: QDSKDNTYLSSTLTLPKADYEAHNVYACEVSHKTLSSPLVKSFNREDC---	106
Horse ramda	58: KQS-NGKYAASSYLTLTPAQWKSSSSVSCQVTHQG--KTVEKKLSPSECS---	104
Human kappa	58: QDSKDSTYMSSTLTLTEDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRNEC---	106
Human ramda	58: KQS-NNKYAASSYLSLTPAQWKSHRSYSCQVTHEG--STVEKTVAPECS---	104
Mouse kappa	58: QDSKDSTYMSSTLTLTKAEYEQHNSYTCETHRTSASPVKSFNRNEC---	106
Mouse ramda	58: KQS-NNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEG--HTVEKSLSRADCS---	104
Sheep kappa	58: QDSKKSTYLSSTLTLSSSEYQSHNAYACEVSHKSLPTALVKSFNKNEC---	106
Sheep ramda	58: KQS-NSKYAASSYLTLTGSEWKSYSYTCVTHEG--STVTKTVKPSSECS---	104
Trout IgL1	57: LEK-DGLYSWSSTLTLTQEWTKAGEVTCEAQQKSQ-TPVTKTLRRADCSG--	105
Trout IgL2	60: PQA-DKTFQLSSCLTVDTSEWNQDKVFSCKVT-VGS-KFAEKDIKKSECSTE--	108
Cpb4	57: LEK-DGLYSWSSTLTLSEQEWMSVSVSCEATRSGQ-PALTGHVTRQOCSE--	105
Cpc1	58: LQK-DGLYSWSSTLTLTESEWSRATTVSCDATHPS-HNAVTVNSLNTKQCNDQ	108
Cpd1	60: ER--DGRYSRSSVLSLSKARWEAGERFVCRVTHDG-AAQETSFLKSSEC----	105
M-134	59: TDRTRLPNKQLSGL-QT-SDWNVDKIYTCVSH-GSQTSEKNINKSVCTTEE-	107

**Figure 7. Alignment of amino acid sequence of M134 with IgL of different vertebrate.**

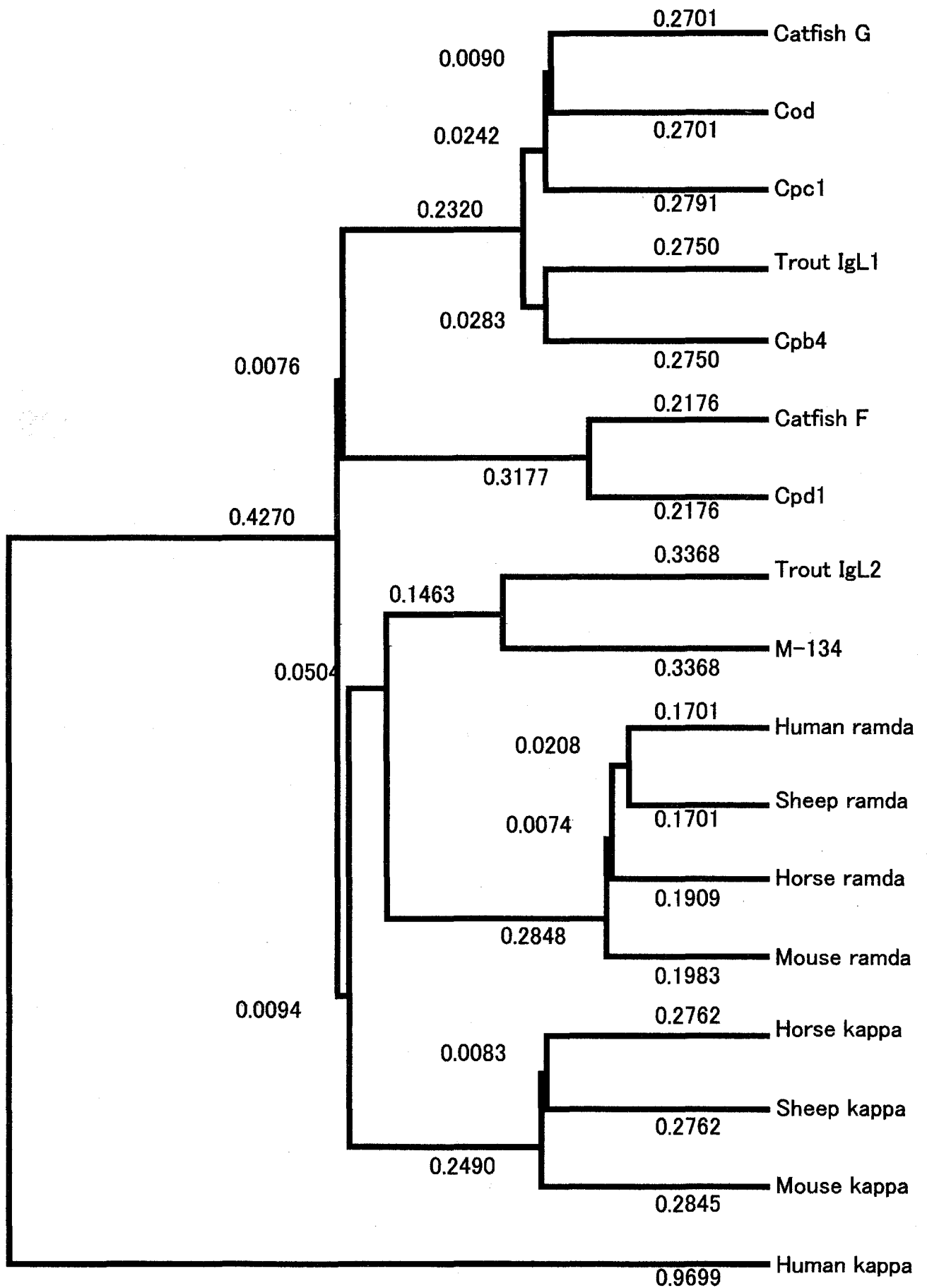


Figure 8. Phylogenetic trees of an alignment of M-134 and IgL in vertebrate.



M99	1: ---R---A---R--A--A-----RA--EF---G-TS-GIFQIN	18
Bovin	1:KVFERCELARTLKKLGLDGYKGVSLAMWLCLTKWESSYNTKATNYPSESTDYGIFQIN	60
Chicken	1:KVFGRCELAAAMKREGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRN-TDGSTDYGILQIN	59
Dock	1:KVYSRCEL-AAMKRLGLDNYRGYSLGNWVCAANYESGFNTQATNRN-TDGSTDYGILQIN	58
H.Langur	1:KIFERCELARTLKKLGLDGYKGVSLANWVCLAKWESGYNTEATNYPGDESTDYGIFQIN	60
Human	1:KVFERCELARTLKRGLMDGYRGISLANWVCLAKWESGYNTRATNYPAGDRSTDYGIFQIN	60
J. Flounder	1:RVYERCEWARLLRNQGMGYRGISLANWVCLTEWESHYNTRATNEN-TDGSTDYGIFQIN	59
Mouse	1:KVYERCEFARTLKRNGMAGYYGVSLADWVCLAQHESNYNTRATNYPNGDQSTDYGIFQIN	60
R. trout	1:KVYDRCELARALKASGMDGYAGNSLPNWWVCLSKWESSYNTQATNRN-TDGSTDYGIFQIN	59
Rat	1:KIYERCQFARTLKRNGMSGYYGVSLADWVCLAQEEESNYNTQARNYPGDQSTDYGIFQIN	60
Sheep	1:KVFERCELARTLKEGLDGYLGVSLANWVCLTKWESSYNTKATNYPGSESTDYGIFQIN	60
M99	19:SRWWCNDSQTP-TSNACNIRCSSELLTDDVIVAIAKCAKRVVRDPNGIGAWVAWR-QHCQGG	76
Bovin	61:SKWWCNDGKTPNAVDGCHVSCRELMENDIAKAVACAKHIVSE-QGITAWVAWK-SHCRDH	118
Chicken	60:SRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAWVAWR-NRCKGT	118
Dock	59:SRWWCNDGKTPRSKNACGIPCSVLLRSDITEAVRCAKRIVSDGDGMNAWVAWR-NRCRGT	117
H.Langur	61:SRYWCNNGKTPGAVDACHISCSALLQNNIADAVACAKRVVSDPQGI RAWVAWRN-HCQNK	119
Human	61:SRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAKRVVRDPQGI RAWVAWRNRHC-NR	119
J. Flounder	60:SRWWCNDSQTP-TSNACNIRCSSELLTDDVIVAIAKCAKRVVRDPNGIGAWVAWR-QHCQGG	117
Mouse	61:SRYWCNDGKTPRAVNACGINCSALLQDDITAIAIQCAKRVVRDPQGI RAWVAW-RAHCQNR	119
R. trout	60:SRYWCDDGRTPGAKNVCGIRCSQLLTADLTVAIRCAKRVVLDPNIGIGAWVAWR-LHCQNQ	118
Rat	61:SRYWCNDGKTPRAKNACGIPCSALLQDDITQAIQCAKRVVRDPQGI RAWVAW-QRHCKNR	119
Sheep	61:SKWWCNDGKTPNAVKGNGVSSSELLMENNIKAVACAKHIVSE-QGITAWVAWK-SHCRDF	118
M99	77:DLSSYLAGCGL	87
Bovin	119:DVSSYVEGCTL	129
Chicken	119:DVQAWIRGCRL	129
Dock	118:DVSKWIRGCRL	128
H.Langur	120:DVSQYVKGCGV	130
Human	120:DVRQYVQGCGV	130
J. Flounder	118:DLSSYLAGCGL	128
Mouse	120:DLSQYIRNCGV	130
R. trout	119:DLRSYVAGCGV	129
Rat	120:DLSGYIRNCGV	130
Sheep	119:DVSSYVEGCSL	129

Figure 9. Alignment of amino acid sequence of M99 with lysozyme of different vertebrate.

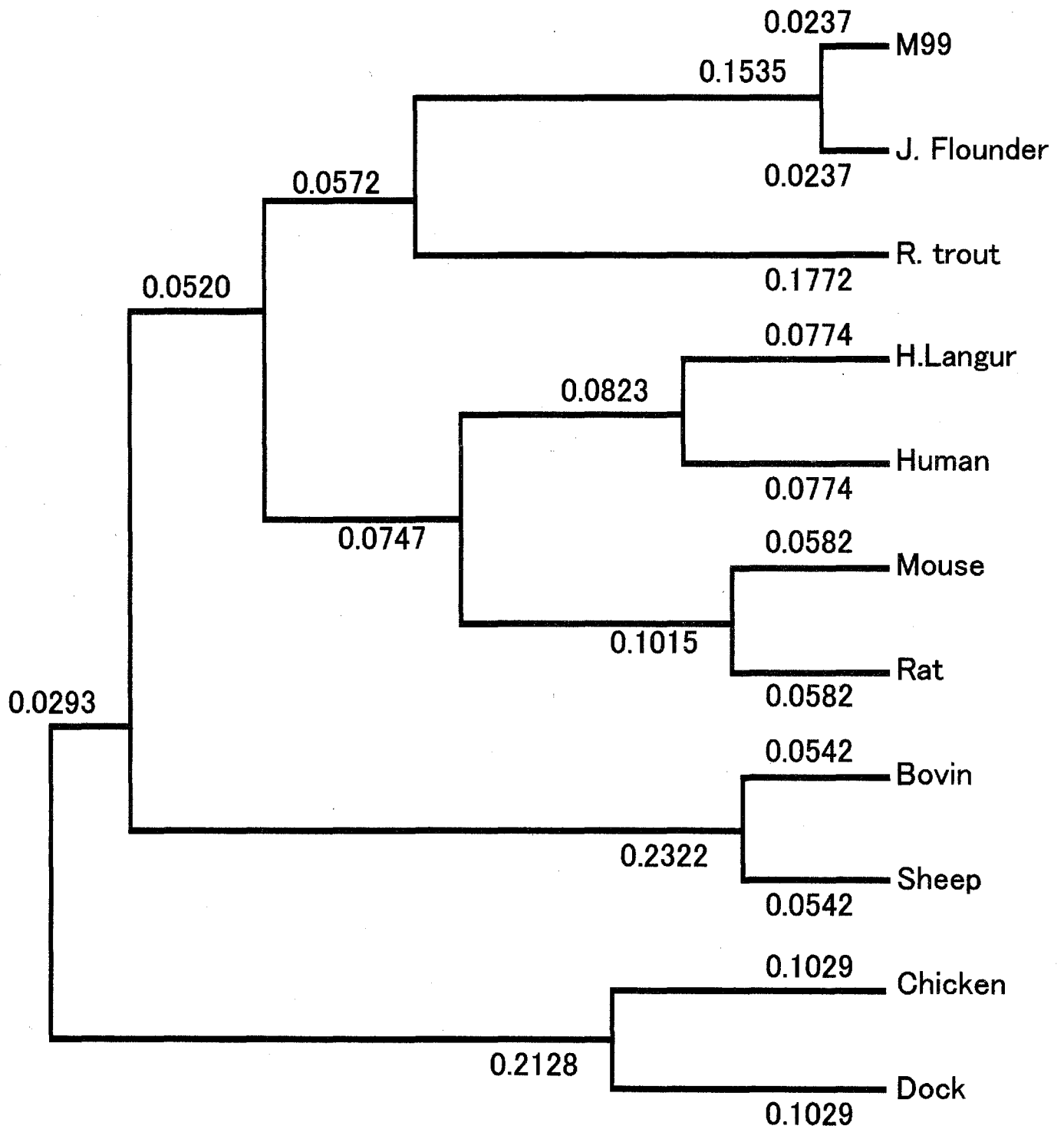


Figure 10. Phylogenetic trees of an alignment of M99 and lysozyme in vertebrate.

Kc-3	1:-----MSDKPNLEEVASFDKTKLKKTTETQEKNPPLPTKETIEQEQQAS---	42
M176	1:-----MSDKPDISEVFNFDRTKLKKTETDEKNTLPTKVVTEIEQEKSG--	43
Thymosin beta(Zebra fish)	1:-----MADKPNMTEITSFDKTKLRKTTETQEKNPPLPTKETIEQEQGESTP	45
Thymosin beta10(Human)	1:-----MSDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPPLPSKETIEQEQQAGES-	44
Thymosin beta11(Rainbow trout)	1:-----ACSDKPNLEEVASFDKTKLKKTTETQEKNPPLPTKETIEQEQQAS---	43
Thymosin beta12(Japanese seaperch)	1:-----SDKPDISEVTSFDKTKLKKTTETQEKNPPLPSKETIEQEQKAAATS-	43
Thymosin beta12(Rainbow trout)	1:-----ACSDKPDLAEVSNFDKTKLKKTTETQEKNPPLPTKETIEQEQQATA--	44
Thymosin beta4(Rat)	1:LFAQLAQLLPATMSDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPPLPSKETIEQEQQAGES-	56

**Figure 11. Alignment of amino acid sequence of M176 with thymosin beta of different vertebrate.**

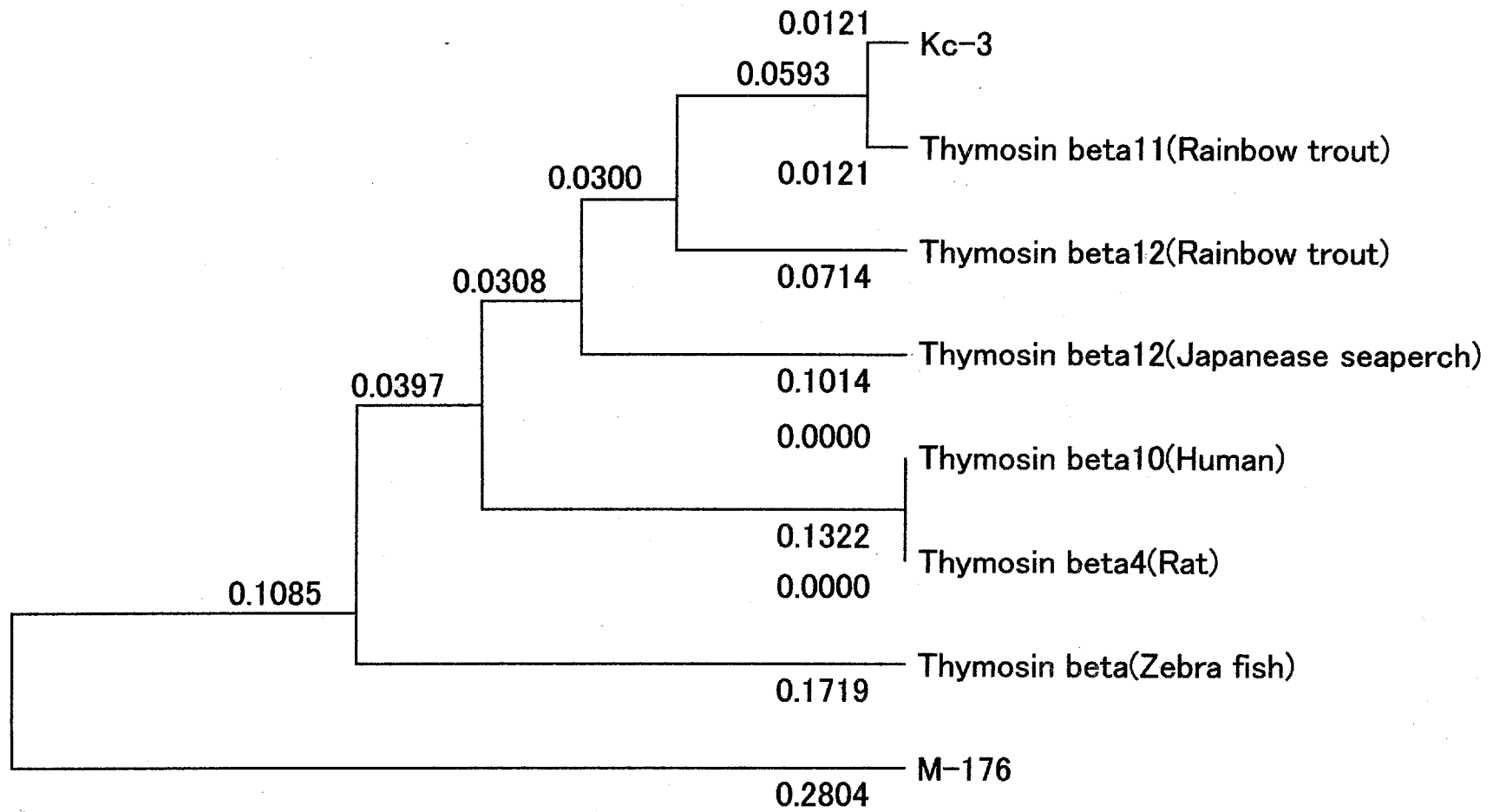


Figure 12. Phylogenetic trees of an alignment of M176 and thymosin beta in vertebrate.