

宮 崎 大 学 大 学 院

博 士 学 位 論 文

クルマエビToll受容体による
抗菌ペプチド発現調節機構の解析

2010年3月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

米加田 徹

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 クルマエビにおける Toll 受容体遺伝子の分離および 同定	9
第 1 節 目的	9
第 2 節 材料および方法	10
第 3 節 結果	21
第 4 節 考察	25
第 3 章 anti-lipopolysaccharide factor 遺伝子の分離および同 定	50
第 1 節 目的	50
第 2 節 材料および方法	51
第 3 節 結果	56
第 4 節 考察	59
第 4 章 Toll 受容体のノックダウン時における Toll シグナル 伝達経路関連因子および抗菌ペプチドの発現動態の 解析	71

第1節 目的	71
第2節 材料および方法	75
第3節 結果	79
第4節 考察	81
第5章 総合考察	92
要約	96
謝辞	97
参考文献	98

第 1 章 緒論

エビ類養殖産業は東南アジアや中南米をはじめ、世界中で急激に増加している。2007 年の世界養殖生産量は 327 万トンであるが、このうちアジアでは約 85 %以上を生産しており、世界で最も養殖が盛んな地域である[1]。エビ養殖では生産効率を上げるために、高密度でエビを飼育する集約養殖が主流であり、除草剤、抗生物質、栄養剤など様々な化学薬品が投与されている。そのため、消費者の健康や環境に対する悪影響が懸念されている。養殖池が汚染されていない時期には、生産量を多くあげることができるが、数年後には底泥には残餌や有機物が堆積し、さらには、化学物質による汚染のため、養殖池の環境が悪化し、病気が発生しやすくなり、生産量は次第に減少する。

1980 年代から、台湾、フィリピン、タイ、インドネシア、インドなど東南アジアの主要エビ生産国で、ウイルス性の疾病が流行し、1995 年にタイ王国では 1 年間に 2 億 4 千万ドルの多大な損失を出した[2]。そのなかでも、産業に甚大な被害をもたらすウイルス性疾病として、クルマエビ急性ウイルス血症原因ウイルス (PRDV)、イエローヘッド病原因ウイルス (YHV)、伝染性皮下造血器壊死症原因ウイルス (IHHNV) およびタウラ症候群原因ウイルス (TSV) などが知られている。PRDV は、日本をはじめとするアジア諸国、さらに中南米の養殖クルマエビにも発生し、大きな問題となっている。日本では、中国から購入した種苗を用いた養殖場において 1993 年に初めて発生し、翌年には西日本一帯に広がった[3]。YHV は、1990 年にタイの養殖ウシエビにおいて初めて確認され、その後感染地域を広げ、東南アジア各国およびオーストラリアにおいて多大な被害をもたらしている[4]。IHHNV は、1980 年代初期にアメリカで *Litopenaeus stylirostris* と *L. vannamei* に発生し、*L. stylirostris* の稚エビや幼若エビに大量死をもたらした[5, 6]。TSV は 1992 年にエクアドル

のタウラ川河口の *L. vannamei* 養殖場で発生して、甚大な被害を出した。その後、北米・中南米に伝播し、現在ではアジア各国に広がっている[7-9]。

ウイルス病のみならず細菌性疾病も多大な問題となっている。クルマエビ生産に被害を及ぼしている細菌感染症にビブリオ病がある。本疾病は1980年頃から山口、鹿児島、熊本の各県下で流行し始め、その後各地の養殖場に大きな被害を与えた[10]。本疾病の原因菌の1つは *Vibrio penaeicida* である。*V. penaeicida* は日本のクルマエビ養殖場に常在する条件性病原体であると考えられているが、10~100 cfu/g の筋肉注射でエビを死亡させることから、病原性は強い[10]。近年では、*V. nigripulchritudo* によるビブリオ病による被害も報告されている[11]。海外では *V. alginolyticus* や *V. harveyi* による感染症が知られている[12, 13]。日本や東南アジアで行なわれている集約的エビ養殖では、エビの成長に伴う残餌や糞の堆積による環境悪化や水温上昇などのストレスにより、体内に存在する少数の菌が増殖することで、発症が促されることが報告されている[14]。これらの細菌性疾病に対して、種々の対策が考案されているが、抗菌剤の使用、飼育環境の改善やストレスの軽減などが、基本的な対策となっている。

このように細菌性やウイルス性の疾病が多発する中で、エビの免疫力を高め病気に対する抵抗力の増強を目的として、天然物由来の免疫賦活剤投与が行なわれている。病気の発生を抑えられれば、抗生物質の投与なども減り、環境に与える影響も軽減される。しかし、免疫賦活剤の投与だけでは、疾病の完全な制御は難しいため、エビ類疾病の根本的防除のためには、感染防御機構を解明する必要がある。生体防御機構の解明は、免疫賦活効果の評価や疾病防除における有効性の評価にも繋がる。

エビ類をはじめとする無脊椎動物では、獲得免疫が欠除しており、自然免疫が生体防御の主役であるため[15]、初期免疫応答や非自己分子の認識機構の解明が重要である。さらに、これらの生体防御関連遺伝子をバイオマーカーとして用い、生体防御能やストレス応答を検査することは、病気発生を予測するだけでなく、早期診断による適切な処置を行うことが可能になり、疾病の蔓延防止の鍵にもなると考えられる。

現在、ショウジョウバエをはじめとする無脊椎動物における感染防御機構の分子レベルでの解明が進んだ結果、病原微生物を認識し、感染防御反応を誘導する分子が同定されてきた[16, 17]。ショウジョウバエでは、微生物の感染により、哺乳類での肝臓に相当する脂肪体と呼ばれる器官で、抗菌ペプチド遺伝子が活性化され、複数の抗菌ペプチドが体液中に放出される。この全身性の抗菌ペプチドの産生誘導は、Toll 経路と IMD 経路と呼ばれる 2 つの細胞内シグナル伝達系により制御されている[18, 19]。

Toll 受容体が制御する Toll 経路は、真菌とグラム陽性菌の感染で活性化し、おもに抗真菌ペプチド Drosomycin の発現を誘導する[20]。一方、IMD アダプター分子が介在する IMD 経路は、ジアミノピメリン酸 (diaminopimelic acid; DAP) を含むペプチドグリカン (PG) を有する細菌の感染により活性化され、抗菌ペプチド Diptericin の発現を誘導する[21]。Attacin などの他の抗菌ペプチドは、Toll 経路と IMD 経路の両者の制御を受ける[19]。このように、ショウジョウバエは感染した微生物を識別し、それに対応した免疫応答を誘導することが知られている[19]。近年、ショウジョウバエの Toll 受容体はウイルス感染に対しても応答することが報告されている[22]。

これらの抗菌ペプチドの発現誘導に関わる因子として同定されたのがペプ

チドグリカン認識蛋白質 (PGRP) ファミリーで、PGRP-SA、PGRP-LC および PGRP-LE などが報告されている[23]。PGRP により、多様な PG が認識され、Toll や IMD 経路を活性化し、それぞれの経路で媒介因子により核内へとシグナルが伝達され、抗菌ペプチドの産生が惹起される (Figure 1)。Toll 経路においては、PGRP によるグラム陽性菌や真菌の認識によりセリンプロテアーゼが活性化し、Spätzle を切断する。Spätzle と Toll の結合により活性化した Toll の細胞内ドメインより MyD88、Tube、Pelle、TRAF6、ECSIT、IRD6 および Cactin/Cactus/Dorsal/Dif の複合体を介し、核内へとシグナルを伝達する [24-26]。

哺乳類においても、Toll 受容体に類似した分子として Toll 様受容体 (TLR) が認められている[18]。マウスにおいて、現在まで 13 種の TLR 遺伝子がクローニングされ、ファミリーを形成している事が明らかになった[18]。グラム陰性菌由来の膜成分であるリポポリサッカライド (LPS) を TLR4 とその細胞外ドメインに会合する MD-2 が[27-30]、マイコプラズマや細菌由来リポペプチド、グラム陽性菌のペプチドグリカン を 2 量体の TLR1/TLR2 や TLR6/TLR2 が[31, 32]、鞭毛由来タンパクであるフラジェリンを TLR5 が[33]、細菌由来 DNA を TLR9 がそれぞれ認識する[34]。2 重鎖 RNA を TLR3 が、TLR7 は抗ウイルス薬として使われている薬剤に反応することから、類似したウイルス由来の構造物を認識している可能性が示唆されている[35]。このように、哺乳類における TLR ファミリーは細菌、真菌およびウイルスも含めた多様な病原体の構成成分を認識し、生体防御因子活性化シグナルを伝達する (Figure 2)。

また、TLR は臓器の上皮細胞において、抗菌ペプチド産生などを介して防

御反応を誘導する。上皮細胞やマクロファージに発現した TLR は、サイトカイン産生を誘導することで、好中球を中心とした迅速な防御反応を促す[32]。TLR を欠損したマウスでは、感染症に高い感受性を示す例が報告されている[36]。このように侵入した病原体を TLR が認識し、活性化シグナルを伝達することは、その病原体を生体全体として排除するかどうかの決定に直結しており、TLR は防御反応の誘導に大きく関与する分子である。

Toll 受容体や TLR による抗菌ペプチドの産生誘導機構は、ショウジョウバエから哺乳類に至るまで保存されており、初期免疫応答において重要な役割を担っており、感染防御機構を解明する上で重要な機構の一つである。これまでの研究により、エビ類と昆虫類の免疫システムは類似した機構を有していることが報告されている。そこで、本研究では昆虫類における免疫機構を基に、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の Toll 受容体遺伝子および抗菌ペプチドである ALF 遺伝子の同定を行った。さらに、近年盛んに利用されている遺伝子機能解析法である RNA 干渉法により、Toll 受容体 mRNA を分解することにより、コードされているタンパク質の発現をノックダウンし、Toll 受容体シグナル伝達経路関連因子および抗菌ペプチドなどの網羅的発現解析により、Toll 受容体とそれぞれの因子との関連性について解析を行うことを目的とした。

なお、本文に記載している遺伝子の正式名および省略形の一覧を Table 1 に示した。

Table 1. List of gene name

Gene notation	Gene Name
Akirin	Akirin
ALF	anti-lipopolysaccharide factor
Attacin	Attacin
BMP	bone morphogenetic protein
BPI	bactericidal/permeability increasing protein
Cactin	Cactin
Cactus	nuclear factor kappa-B inhibitor cactus
CP	clotting protein
Crustin	Crustin
Dicer	Dicer
Dif	dorsal-related immunity factor
Diptericin	Diptericin
Dorsal	Dorsal
ECSIT	evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways
Fondue	Fondue
IMD	immune deficiency
IRD	immune response deficient
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBP	LPS binding protein
LGBP	LPS-and β -1,3-glucan binding protein
lysozyme	lysozyme
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD-2	lymphocyte antigen 96
MyD88	myeloid differentiation factor 88
Pelle	serine/threonine-protein kinase pelle
Penaeidin	Penaeidin
PGRP	peptidoglycan recognition protein
PPAE	ProPO activating enzyme
ProPO	prophenoloxidase
Relish	Relish
Serpin	serine protease inhibitor
Snake	Snake
SOD	superoxide dismutase
Spätzle	Spätzle
STAT	signal transducers and activator of transcription
TGase	transglutaminase
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
Toll	Toll receptor
TRAF6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
Tube	Tube

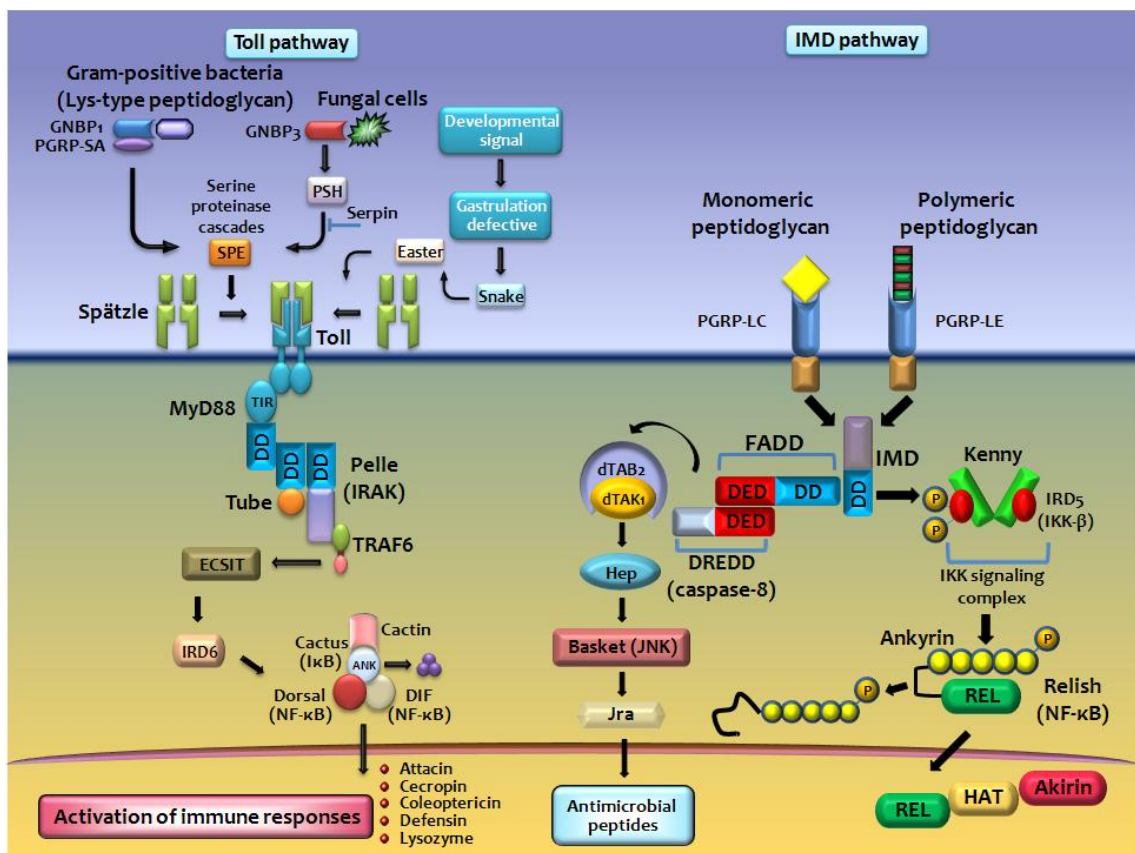


Figure 1. Pathogen recognition and signaling in the *Drosophila*

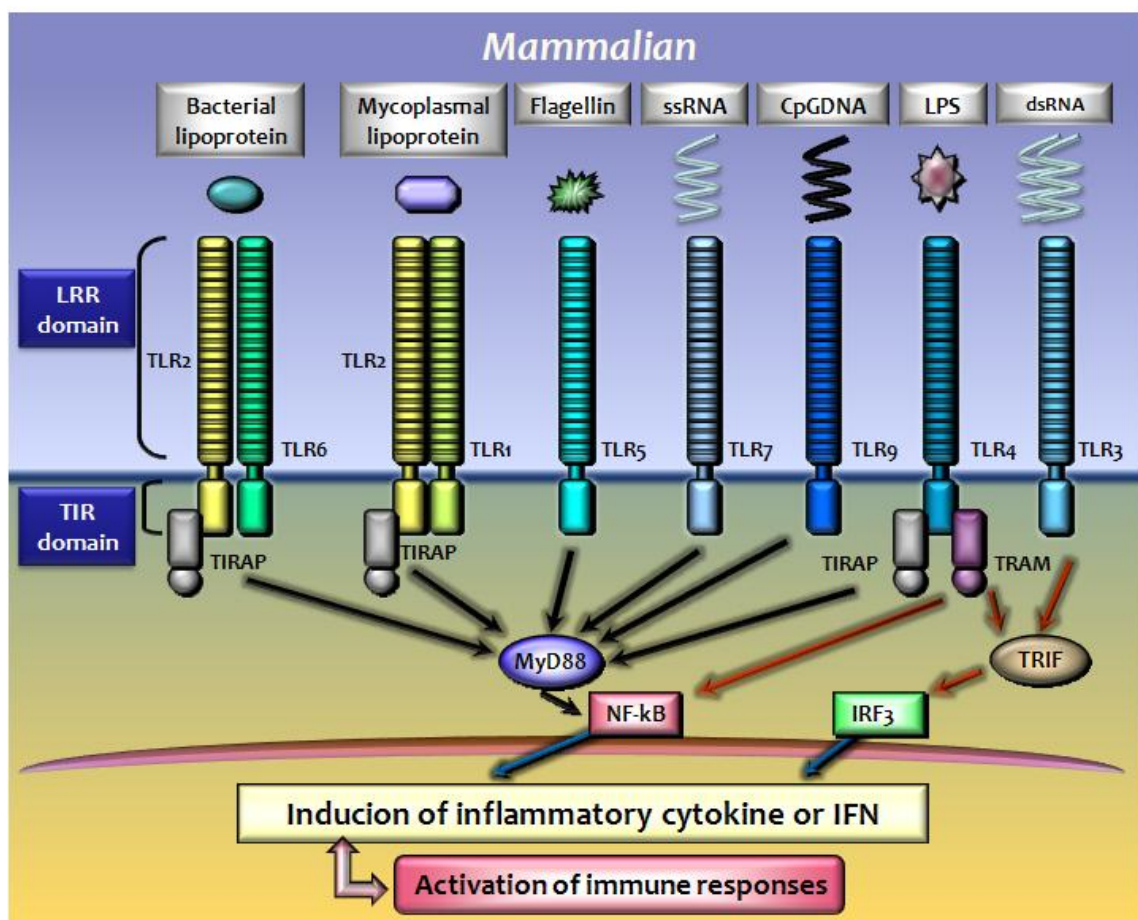


Figure 2. Pathogen recognition pattern of Toll like receptors in mammals

第2章 クルマエビにおける Toll 受容体遺伝子の分離および同定

第1節 目的

自然免疫機構の初期免疫応答（非自己分子認識機構）に関わる分子として Toll 受容体が知られている。Toll 受容体は、細菌、真菌およびウイルスなど多様な病原体の認識により活性化され、核内にシグナルを伝達させる[17, 22]。最終的に、抗菌ペプチドやサイトカインなどの生体防御関連物質の産生を誘導する[37]。無脊椎動物であるエビ類においては、自然免疫機構が発達しており、Toll 受容体により病原体を認識していると考えられる。

これまで、エビ類における Toll 受容体は *Litopenaeus vannamei*、コウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*) およびウシエビ (*Penaeus monodon*) において分離されている[38-40]。しかし、クルマエビにおける Toll 受容体は認められていない。また、エビ類における複数の Toll 受容体の存在は明らかにされていない。そこで、これまでに報告されているエビ類の Toll 受容体遺伝子および他の無脊椎動物であるショウジョウバエやカブトガニなどの Toll 受容体遺伝子を基に、クルマエビの Toll 受容体遺伝子を同定し、その発現解析を行うことにより、生体防御機構の基礎的知見を得ることを目的とした。

第2節 材料および方法

1. 供試クルマエビ

宮崎県のクルマエビ養殖場より平均体重 12.0 g のクルマエビを入手し実験に供試した。

2. Toll 受容体遺伝子増幅用縮重プライマーの設計

2.1. 昆虫類およびカブトガニ Toll 受容体遺伝子を基にした縮重プライマーの設計

無脊椎動物であるカブトガニ (*Tachypleus tridentatus*)、ヨーロッパミツバチ (*Apis mellifera*)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) およびキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の既存の Toll 受容体遺伝子の相同性解析を行い、保存性の高い領域に対し、縮重プライマーを設計した (Table 2)。

2.2. エビ類 Toll 受容体遺伝子を基にした縮重プライマーの設計

L. vannamei、コウライエビおよびウシエビにおいて分離されている Toll 受容体を基に、保存領域に対し、プライマーを設計した (Table 3)。

3. Toll 受容体遺伝子のクローニング

3.1. クルマエビのリンパ様器官の細胞培養

3.1.1. 基礎培地の調整

2倍濃度 L-15 培地 (Gibco, USA) を distilled water (D.W.) に溶解し、ラクトアルブミン (Gibco, USA)、TC-イーストレート (Gibco, USA)、グルコース (Gibco, USA)、プロリン (Gibco, USA)、タウリン (Gibco, USA)、アスコルビン酸 (Gibco, USA)、およびペニシリン・ストレプトマイシン混液 (5 mg/ml)

(Gibco, USA) を Table 4 に示す分量で混合し、濾紙で濾過したのち、1M NaOH で pH を 7.6 に調整した。クリーンベンチ内で 0.22 μm のフィルターで無菌濾過したものに、2-メルカプトエタノールを 0.5 ml 加えた。常温で一晩静置し、コンタミネーションの有無の確認後 4 °C で保存した。

3.1.2. 細胞の培養

クルマエビを 70 %アルコールで湿らせたキムタオルで包み、氷で 2~3 分間冷やし、腹側に 70 %アルコールを十分に吹きかけてから、クリーンベンチ内へ入れた。腹部の神経節を数箇所切断し、頭部からリンパ様器官を摘出した。ナイロンメッシュ PP-40n (メッシュサイズ 40 μm ・共進理工) を貼り付け、湿熱滅菌した 50 ml 遠沈官 (NUNC) のメッシュ上に摘出したリンパ様器官を置き、基礎培地を注ぎながら滅菌したヘラで磨り潰した。リンパ様器官の細胞浮遊液の入った 50 ml 遠沈官を 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し、2,000 rpm、4 °C、5 分で遠心し、上清を捨てたのち、基礎培地 500 μl に再懸濁した。この洗浄操作を 2 回行なった。細胞培養用の 48 well プレート (NUNC) に細胞懸濁液を 900 μl ずつ分注し、ここに 100 $\mu\text{g/ml}$ の LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* Serotype 0127:B8) 溶液を 100 μl 添加し、ピペッティングし、インキュベーター内 (25 °C) で培養した。

3.2. Total RNA の抽出

48 時間培養したクルマエビのリンパ様器官の初代培養細胞 25 mg を 1.5 ml エッペンドルフチューブに入れ、300 μl の ISOGEN (NIPPON GENE, Japan) を加え、よくホモジナイズし、再び 700 μl の ISOGEN を加え 1 ml シリンジ (20 G 針付) で 20 回程度攪拌し、22 °C で 5 分間静置した。次に、クロロフ

ホルム (Wako, Japan) 200 μ l を加え、転倒混和によって十分に混合したのち、22 $^{\circ}$ C で 3 分間静置し、4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った。上清を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、イソプロピルアルコール (Wako, Japan) 500 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間静置後、4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 30 分間遠心分離を行った。上清を除去し、80 % エタノール (Wako, Japan) 1 ml を加え、緩やかに混合したのち、4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を除き、5 分間風乾させたのち、ペレットを 20 μ l の diethyl pyrocarbonate (DEPC; SIGMA, Japan) 処理水に溶解して、total RNA 溶液とした。

3.3. cDNA の合成

セクション 3.2. において抽出した total RNA をテンプレートに、ReverTra Dash (TOYOBO, Japan) を用いて逆転写反応を行った。反応溶液 (Table 5) を作製し、primer に Oligo (dt) 20-P7 を用い、42 $^{\circ}$ C で 20 分間、99 $^{\circ}$ C で 5 分間、4 $^{\circ}$ C で 5 分間の反応を、サーマルサイクラー (BIO RAD, Mycycler) を用いて行った。

3.4. PCR による Toll 受容体遺伝子の増幅

クルマエビのリンパ様器官培養細胞より作製した cDNA をテンプレートとして PCR を行い、Toll 受容体遺伝子の増幅を行った。反応溶液はこの組成は Table 6 に示した。セクション 2 において設計したプライマー Toll-dgF1/Toll-dgR1 および shToll-F1/shToll-R1 を用い、95 $^{\circ}$ C で 5 分間のプレヒート後 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長反応を 45 サイクル、サーマルサイクラー (BIO RAD, Mycycler) を用いて 1st-PCR を行った。さらに、1st-PCR 産物を D.W. で 100 倍希釈し、

2nd-PCR に供した。2nd-PCR は、Toll-dgF2/Toll-dgR2 および shToll-F2/shToll-R2 を用い 1st-PCR と同様の条件で反応を行った。反応終了後、1.5 % アガロースゲルによる電気泳動を行い、増幅遺伝子の確認を行った。

3.5. ベクターへのライゲーション

T ベクター (pGEM-T Easy vector; Promega, UK) へのライゲーション反応は、4 °C で 16 時間行った。なお、反応溶液の組成を Table 7 に示した。

3.6. コンピテントセルへのトランスフォーメーション

トランスフォーメーションは、大腸菌 JM109 株 (NipponGene, Japan) を用いて行った。-80 °C に保存していたコンピテントセルを氷上で融解し、ライゲーション産物 2 µl を加えた 1.5 ml エッペンドルフチューブにコンピテントセル 50 µl を添加し、穏やかに混和し、氷上で 20 分間静置した。静置後、42 °C のウォーターバスで 50 秒加熱し、2 分間氷上に静置した。SOC 培地 (Table 8) 950 µl を加えた後、37 °C のウォーターバスで 1 時間半振盪培養した (185 rpm)。振盪培養後、0.1 % アンピシリン添加マッコンキー寒天培地 (日水製薬) に 100 µl をプレーティングし、37 °C で 15 時間培養した。形成したコロニーをレッドホワイトセレクションにより選択し、インサートの確認に用いた。

3.7. コロニーPCR によるインサートの確認

マスターミックス溶液 (NIPPON GENE, Japan) (Table 9) を 20 µl ずつ 0.5 ml チューブに分注し、滅菌爪楊枝を用いて生育したコロニーを少量掻き取り、溶液内に懸濁させた。PCR は、作製した T7 および SP6 プライマー (Table 10) を用い、94 °C で 30 秒間プレヒート後、94 °C で 30 秒の熱変性、55 °C で 30

秒間のアニーリング、72 °C で 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル、サーマルサイクラー (BIO RAD, Mycycler) を用いて行った。反応終了後、PCR 産物を 1.5 %アガロースゲルで電気泳動し、インサートの有無およびサイズの確認を行った。

3.8. プラスミド DNA の抽出

大腸菌を 100 µg/ml のアンピシリンを含む 3 ml の LB ブロース (Table 11) で 16 時間培養し、8,000 rpm で 3 分間遠心分離により集菌した。これを QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用い、マニュアルに従いプラスミド抽出を行った。250 µl の BufferP1 を加え、菌体ペレットを再懸濁した。250 µl の BufferP2 を添加後、5~6 回転倒させ完全に混和させた。350 µl の BufferN3 を添加後、5~6 回転倒させ完全に混和させ、13,000 rpm、4 °C で 10 分間遠心操作した。上清をデカントおよび、ピペッティングによりスピンカラムにアプライし、13,000 rpm、4 °C で 1 分間遠心操作後、フロースルー液を廃棄した。Buffer PB 0.5 ml を添加後、13,000 rpm、4 °C で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄した。Buffer PE 0.75 ml を添加後、13,000 rpm、4 °C で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄した。残留している洗浄バッファーを除去するために、さらに 13,000 rpm、4 °C で 1 分間遠心操作した。カラムを新しい 1.5 ml エッペンチューブにセットし、Buffer EB をカラムの中央にアプライし、1 分間放置した後、13,000 rpm、4 °C で 1 分間遠心操作した。

3.9. シークエンス

3.9.1. シークエンス PCR

Table 12 マスターミックスを連結チューブに 8 µl 分注し、プラスミド DNA

を 2 μl を混合して合計 10 μl にし、ボルテックスをした後、PCR 反応を行った。PCR 条件は、96 °C 20 秒で前処理し、96 °C 20 秒、55 °C 20 秒、60 °C 4 分を 35 回繰り返して、4 °C で保存した。反応終了後、ストップソリューション (Table 13) を加え酵素を失活させた。

3.9.2. エタノール沈澱

セクション 3.9.1. で得られたシーケンス PCR 産物を 1.5 mm チューブへ移し、99.5 % のエタノールを 60 μl 加え、15 分、14,000 rpm で遠心分離を行った。次に、上澄みを捨て 70 % のエタノールを 200 μl 加えてペレットを洗浄した後 2 分間、14,000 rpm で遠心分離を行った。この洗浄を 2 回行った後、上清を捨て、ペレットをバキュームドライで 5 分乾燥させ、sample loading solution (SLS ; ベックマンコールター, USA) 30 μl で溶解させて、シーケンス解析用サンプルとした。

3.9.3. シーケンス解析

SLS に溶解したサンプル全量をサンプルプレートに移し、バッファプレートには専用のセパレーションバッファを、サンプルを入れたポジションと同じところに 8~9 滴入れ、CEQ8000 へサンプルプレートをセットしてメソッドをスタートさせた。

3.9.4. データ解析

BLAST Program (<http://www.blast.genome.ad.jp/>) [41]を用い、dbEST を含む GenBank 上のデータベースと比較を行った。

4. 5'-および 3'-RACE 法による Toll 受容体遺伝子の全長解析

4.1. RACE 法による Toll 受容体遺伝子の 5'および 3'末端配列のクローニング

4.1.1. 5'-RACE-cDNA の合成

セクション 3.2. において抽出した mRNA をテンプレートに、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Japan) を用い、5'末端からの cDNA の合成を行った。cDNA の合成は初めに反応溶液 (Table 14) を作製し、5'-CDS primer (5'-(T)₂₅N₁N-3') を用いて、70 °C、2 分間インキュベートを行った。インキュベート後、氷上にて 2 分間静置した後、さらに反応溶液 (Table 15) を加え、42 °C で 1 時間 30 分インキュベートを行った。インキュベート後、50 μl の Tricine-EDTA buffer を加え、72 °C で 7 分間インキュベートを行った。

4.1.2. 3'-RACE-cDNA の合成

セクション 3.2. で抽出した mRNA をテンプレートに、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Japan) を用いて 3'末端からの cDNA の合成を行った。cDNA の合成は反応溶液 (Table 16) を作製し、3'-CDS primer A を用いて、70 °C、2 分間インキュベートを行った。インキュベート後、氷上にて 2 分間静置したのち、さらに反応溶液 (Table 17) を加え、42 °C で 1 時間 30 分インキュベートを行った。インキュベート後、50 μl の Tricine-EDTA buffer を加え、72 °C で 7 分間インキュベートを行った。

4.1.3. 5'-および 3'-RACE PCR

クルマエビリンパ様器官培養細胞より作製した 5'-および 3'-RACE cDNA をテンプレートに Toll 受容体遺伝子に特異的なプライマーおよび Universal Primer A Mix (UPM) を用いて 5'-および 3'-RACE-PCR を行い、Toll 受容体遺

伝子の 5'-および 3'-末端配列の増幅を行った。5'-および 3'-RACE-PCR は反応溶液 (Table 18) を作製し、反応時間は 94 °C で 5 分間のプレヒート後、94 °C で 30 秒間の熱変性、68 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 3 分間の伸長反応を 25 サイクル行い、ファイナルエクステンションを 72 °C で 5 分間行った。PCR に用いたプライマーの配列は Table 19 に示す。反応終了後、1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、遺伝子増幅の確認を行った。

4.1.4. PCR 産物のシーケンス解析

セクション 3.5. から 3.9. と同様の方法でシーケンシングを行った。

4.1.5. データ解析

セクション 3.9.4. と同様に、得られた配列のデータベースとの比較を行った。また、得られた Toll 受容体遺伝子の部分塩基配列を用い、Toll 受容体遺伝子の全長を決定した。さらに得られた全長配列を基にアライメントを作製し、相同性解析、系統解析を行った。系統解析に用いた既知の Toll 受容体遺伝子は Table 20 に示した。アミノ酸配列のアライメントは、BioEdit software (ver. 5.09) を用い clustal W プログラムによって作製した。また、アミノ酸の配列の相同性解析には、MatGAT ver2.02 を用いて解析した。系統樹は、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver. 4) software[42]を用い、近隣結合法[43]によって作製した。シグナルペプチド、細胞内および細胞外ドメイン、膜貫通領域については SMART version 4.0 (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) により予測した。さらに、細胞内ドメインは SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) により立体構造予測を行った[44]。

5. Toll 受容体遺伝子のゲノム構造解析

5.1. ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出は、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用い、マニュアルに従って行った。クルマエビの筋肉を 25 mg 摘出し、細かくカットし、1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れた。180 μ l の Buffer ATL を添加し、Proteinase K 20 μ l を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56 $^{\circ}$ C でインキュベートした。サンプルを効率的に溶解するためにインキュベーション中に時々ボルテックス操作した。4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加しボルテックス操作で混和し、室温で 2 分間インキュベートした。15 秒間ボルテックス操作し、200 μ l の Buffer AL を添加し、ボルテックス操作で十分に混和した。200 μ l のエタノール (100%) を添加し、再びボルテックス操作で十分に混和した。混合液を、新しい 2 ml コレクションチューブ中の DNeasy Mini スピнкаラムに移し、8,000 rpm で 1 分間遠心操作した後、ろ液およびコレクションチューブを廃棄した。DNeasy Mini スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、500 μ l の Buffer AW1 を添加し、8,000 rpm で 1 分間遠心分離した後、濾液およびコレクションチューブを廃棄した。DNeasy Mini スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、500 μ l の Buffer AW2 を添加し、14,000 rpm で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させ、濾液およびコレクションチューブを廃棄した。DNeasy Mini スピнкаラムを新しい 1.5 ml に移し、200 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加した。室温で 1 分間インキュベートしたのち、8,000 rpm で 1 分間遠心分離し溶出させた。

5.2. PCR による Toll 受容体遺伝子の増幅

得られた Toll 受容体遺伝子の全長の塩基配列を基に、約 1,000 bp 程の部分配列を増幅するようにプライマーを設計した。セクション 5.1. において抽出した DNA をテンプレートとして 3.4. と同様に PCR を行い、Toll 受容体遺伝子の増幅を行った。PCR に用いたプライマーの配列は Table 21 に示す。

6. Toll 受容体遺伝子の発現解析

6.1. 各臓器における Toll 受容体遺伝子の発現解析に使用する cDNA 合成

3尾のクルマエビより胃、リンパ様器官、中腸腺、鰓、腸、筋肉、脳、心臓および神経を摘出し、それぞれを 1.5 ml チューブに移し 300 μ l の ISOGEN を加え、セクション 3.2. と同様に total RNA の抽出を行った。さらに、セクション 3.3. と同様に cDNA の合成を行なった。

6.2. 免疫賦活剤で刺激したリンパ様器官における Toll 受容体遺伝子の発現解析に使用する cDNA 合成

クルマエビ 50 尾より摘出したリンパ様器官をセクション 3.1. と同様の方法を用い細胞浮遊液を作成し、48 well プレーットの 35 well に 900 μ l ずつ分注した。ここに 100 μ g/ml に調整した、LPS (*E. coli* Serotype 0127:B8, SIGMA)、CpG DNA (ATCGACTCGAACGTTCC)、flagellin (*Salmonella muenchen*, recombinant, *E. coli*, Wako)、imiquimod (LKT Laboratories, Inc)、peptidoglycan (PG from *Staphylococcus aureus*, Biochemika)、poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid) 各溶液およびコントロールとして基礎培地を 5 well に 100 μ l ずつ添加した。これを 1、4、8、12 および 16 時間、25 $^{\circ}$ C で培養し、それぞれの well の培養細胞をセクション 3.2. と同様の方法を用い

total RNA の抽出を行なった。抽出した total RNA を 3.3. と同様に cDNA の合成を行なった。

7. TaqMan リアルタイム PCR による Toll 受容体遺伝子の発現定量解析

各 cDNA を鋳型として Toll 受容体遺伝子および β -actin 遺伝子に対し、イントロンを挟むように TaqMan プローブおよびプライマーを設計し、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムによる TaqMan リアルタイム PCR 発現定量解析を行った。PCR は反応溶液 (Table 22) を作製し、94 °C で 30 秒間のプレヒート後、95 °C で 5 秒間の熱変性、60 °C で 40 秒間のアニーリングおよび伸長反応を行った。TaqMan リアルタイム PCR に用いたプライマーの配列は Table 23 に示した。

第3節 結果

8. クルマエビ Toll 受容体遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

クルマエビにおける Toll 受容体遺伝子の分離を試みたところ、2 つの Toll 受容体 (MjToll および MjToll2) 遺伝子の全長 cDNA が得られた (GenBank accession no. AB333779 および AB385869)。MjToll および MjToll2 遺伝子の cDNA のオープンリーディングフレームはそれぞれ 3,027、2,793 塩基であり、1,009、931 個のアミノ酸をコードしていた (Figure 3 および Figure 4)。また、MjToll および MjToll2 遺伝子の推定分子量はそれぞれ 116、107 kDa であった。アミノ酸ドメインの検索を行なった結果、MjToll および MjToll2 遺伝子には、ロイシンリッチリピートモチーフ、膜貫通領域 および Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain が確認された。また、MjToll および Toll2 遺伝子の N 末端のそれぞれ 32 および 31 残基のアミノ酸はシグナルペプチドであることが確認された (Figure 3 および Figure 4)。

9. MjToll および MjToll2 遺伝子の相同性解析

MjToll および MjToll2 遺伝子の相同性解析を既知のエビ類、キイロショウジョウバエおよびマウスの Toll ファミリーを用い解析を行った。解析の結果、MjToll 遺伝子のアミノ酸配列の相同性は、*L. vannamei* Toll 受容体遺伝子 (LvToll) と 42.8%、コウライエビ Toll 受容体遺伝子 (FcToll) と 43.1%、ショウジョウバエの Toll (DmToll) ファミリーと 19.1 - 29.0%、マウスの TLR (MmTLR) ファミリーと 21.3 - 23.2%の相同性を示した。一方、MjToll2 遺伝子は、LvToll と 82%、FcToll と 83.2%、DmToll ファミリーと 18.8 - 27.4%、MmTLR ファミリーと 20.7 - 23.2%の相同性を示した (Table 24)。

10. MjToll および MjToll2 遺伝子のドメイン構造解析

MjToll および MjToll2 遺伝子と LvToll、昆虫類 Toll ファミリー、カブトガニ Toll およびのイカ Toll 遺伝子とのドメイン構造の比較を行ったところ、2つのクルマエビの Toll はいずれも LvToll および DmToll と最も類似したドメイン構造を有していた (Figure 5)。

MjToll および MjToll2 遺伝子の細胞外ドメインであるロイシンリッチリピート (LRR) ドメインのアミノ酸配列と哺乳類における TLR 遺伝子のコンセンサス配列との比較を行ったところ、ほとんどの LRR は 22-26 アミノ酸残基で 2、5、7 および 15 番目に位置するロイシンおよび 10 番目に位置するアスパラギンを保存していた (Figure 6)。

また、MjToll および MjToll2 遺伝子の細胞内ドメインである TIR ドメインにおけるアライメントおよび相同性解析を行ったところ、MjToll は MjToll2 と 79.0 %、LvToll と 77.5 %、FcToll と 79.0 %、カブトガニ Toll (TtToll) と 48.6 % および昆虫類の Toll ファミリーと 37.1 - 60.1 % の相同性を示した。MjToll2 は LvToll と 98.5 %、FcToll と 99.3 %、TtToll と 46.4 % および昆虫類 Toll ファミリーと 34.5 - 60.6 % の相同性を示した (Figure 7)。

11. MjToll および MjToll2 の細胞内ドメインにおける立体構造の予測

MjToll および MjToll2 の細胞内ドメインである TIR における立体構造を予測し、DmToll と比較を行ったところ、いずれも中心部に 5 つの β シートおよびそれらを囲んだ 5 つの α ヘリックスが認められた。また、MjToll における第 1 α ヘリックス領域が MjToll2 および DmToll より短いことが確認された。さらに、下流へのシグナル伝達に重要な BB loop やその他の構造は類似していた (Figure 8)。

12. MjToll および MjToll2 遺伝子のゲノム構造

MjToll および MjToll2 遺伝子のゲノム構造の解析を行なったところ、MjToll 遺伝子は 4 つのエクソンと 3 つのイントロンより構成され、ゲノム上でのサイズは 3,691 塩基であった。MjToll2 遺伝子は 5 つのエクソンと 4 つのイントロンより構成され、ゲノム上でのサイズは 5,540 塩基であった (Figure 9)。MjToll および MjToll2 遺伝子と DmToll ファミリーとのゲノム構造には類似した構造は認められなかった。

13. MjToll および MjToll2 遺伝子の系統解析

系統解析は、哺乳類、鳥類、魚類および数種の無脊椎動物において既知の Toll 受容体ファミリーを用いた。MjToll2 は、LvToll および FcToll と最も近縁であったが、MjToll はこのグループより若干離れて位置していた。さらに、エビ類の Toll 受容体は昆虫類の Toll 受容体ファミリーとクラスターを形成したが、ウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) の Toll ファミリーとは離れて位置していた。(Figure 10)。また、DmToll9 およびガンビエハマダラカ Toll9 (AgToll9) は哺乳類の TLR と近縁であった。

14. MjToll および MjToll2 遺伝子の発現解析

14.1. 各臓器における MjToll および MjToll2 遺伝子の発現解析

MjToll および MjToll2 遺伝子は健常クルマエビの中腸線、筋肉、脳、神経、胃、腸、造血器、心臓、鰓、血リンパおよびリンパ様器官のすべてにおいて発現が認められた。MjToll は中腸線で最も発現量が低く、その他の器官では中腸線の 10 倍以上の発現量が認められた。特に、リンパ様器官、血リンパお

よび鰓においては中腸線の 100 倍以上の高い発現を示した (Figure 11a)。

MjToll2 も MjToll と同様に、中腸線の発現量は最も低い値であった。心臓および神経における MjToll2 の発現はそれぞれ中腸線の 1000 倍および 100 倍以上と、極めて高い発現量を示した (Figure 11b)。

14.2. 刺激したリンパ様器官由来細胞における MjToll 遺伝子の発現解析

in vitro において CpG DNA で刺激したリンパ様器官由来細胞は、刺激後 9 時間目において発現量は高くなったが、その後減少していた。Flagellin および LPS で刺激を行った区では顕著な発現の変化は認められなかった。Imiquimod で刺激を行った区では刺激開始から 12 時間後まで緩やかな発現量の上昇が認められた。PG で刺激した細胞では、対照区と比べ、9 時間後に 27 倍および 12 時間後に 76 倍の有意な発現量の上昇が認められた。Poly I:C で刺激した区では、刺激後 3 および 9 時間後において発現の上昇が認められた (Figure 12)。

第4節 考察

Toll 受容体は、自然免疫機構や炎症反応における異物認識機構において重要な受容体であり、線虫[45]、カブトガニ[46]、魚類[47]、鳥類[48]および哺乳類[18]など様々な生物において確認されている。エビ類では、ウシエビ[40]、コウライエビ[39]と *L. vannamei*[38]から Toll 受容体遺伝子の全長が明らかにされている。そこで本章において、クルマエビから、Toll 受容体遺伝子の分離を試み、遺伝子発現解析を行なった。

本研究で、クルマエビにおいて2つの Toll 受容体 (MjToll および MjToll2) 遺伝子が分離され、エビ類において複数の Toll 受容体遺伝子が存在していることが明らかとなった。これらは、ロイシンリッチリピート (LRR) から成る細胞外領域、細胞内領域の TIR ドメインなど Toll 受容体に特有のドメイン構造を有していた。MjToll および MjToll2 は、全長アミノ酸配列およびドメイン構造から、既知のエビ類や昆虫類 Toll 受容体遺伝子と高い相同性やドメイン構造の類似性が認められた。キイロショウジョウバエの Toll (DmToll) およびネッタイシマカの Toll (AeToll) は、抗真菌ペプチドである Drosomycin のプロモーターの転写を誘導することが報告されている[49, 50]。MjToll および MjToll2 は DmToll と非常に類似したドメイン構造を持つことから、抗真菌に対する自然免疫応答に関連したタンパク質の合成の制御に関係している可能性が考えられる。

哺乳類における TLR のロイシンリッチリピート (LRR) は PAMP (pathogen-associated microbial patterns) を認識し[51]、凹面のリガンドと結合するために、蹄鉄形構造をもつと考えられている[52]。さらに、ヒトの TLR の LRR はコンセンサス領域において 10 または 15 番目で挿入配列を有し、こ

の挿入は PAMP の相互作用に関与することが報告されている[51]。しかし、DmToll における LRR の挿入配列は確認されていないため、PRR (pattern recognition receptor) としての機能をもたず、サイトカインなどの因子と相互作用することで異物認識を行うことが報告されている[53]。同様に、カブトガニの Toll は LRR での挿入配列は確認されていないため、PAMP を認識できないことが示されている[46]。MjToll および MjToll2 の LRR には、LRR-10 で 7 残基の挿入が確認された。このことから、クルマエビ Toll 受容体は哺乳類において知られている異物認識システムと類似したリガンドとの結合様式を有する可能性が示唆された。MjToll および MjToll2 のリガンドを同定することで、それぞれのシグナル伝達経路によって誘導される標的因子の特定に繋がると考えられる。

細胞内の TIR ドメインは、動物および植物など多様な生物において、生体防御に関連するタンパク質が相互作用する領域である[54]。ヒトゲノムにおいて、TIR ドメインを有するのは、TLR ファミリー、IL-1/IL-18 レセプターおよび細胞質関連タンパク質であり、TIR は TLR またはインターロイキンレセプターの下流でのシグナル伝達経路に関連したアダプター分子として機能する[55]。細胞が TLR リガンドで刺激されると、TIR ドメイン間の同種親和性の相互作用により MyD88 のようなアダプタータンパク質が TLR の TIR ドメインに結合し、下流のシグナル伝達により炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導する[51]。TLR4 の TIR ドメインの変異型マウスは、その機能を損失し、LPS に対する感受性が高まることが知られている[27]。また、ネッタイシマカの Toll の突然変異である欠損変異体もその機能を損失することが確認されている。TIR ドメインにおいて、ネッタイシマカや哺乳類の Toll にシグ

ナル伝達の活性化に必須なプロリン残基が保存されていることが知られている[53]。DmToll において対応する位置ではバリン残基であり、AeToll においては、このプロリンがバリンへ突然変異した場合でも機能の損失は認められていない[49]。クルマエビにおいて対応する位置ではアルギニンであり、これは、甲殻類ではクルマエビにのみ特有である。今後、この MjToll におけるアルギニン残基のシグナル変換への影響について検討する必要がある。

DmToll は真菌および細菌性感染症に対する非特異的免疫反応で重要な役割をはたすことが知られている[19, 56]。Toll 経路は、Dorsal や Dif など転写制御因子に関連した NF- κ B の核転座に終始する細胞内シグナル伝達経路を通し、抗菌ペプチドや多くの炎症性サイトカインなどの免疫応答関連因子の誘導を制御している[19]。一方、Toll 経路はキイロショウジョウバエの抗ウイルス剤への反応に必要不可欠である。これはショウジョウバエ X ウイルス複製や感染拡大の抑制のために特に重要であり、Toll によって誘導された抗ウイルス反応は、血球を通じた細胞性免疫に依存していることが示唆されている[57]。エビ養殖産業で、ウイルス性疾患は最も重大な脅威である。今後の研究により、DmToll と高い相同性を持つ MjToll が抗ウイルス活性の誘導に関与しているか検討する必要がある。

MjToll は MjToll2、LvToll および FcToll と 42.8 - 43.2 %の相同性を示した。さらに、MjToll2 は LvToll および FcToll と 82.0 - 83.2 %の高い相同性を示した。また、系統解析からも MjToll2 は LvToll および FcToll と最も近縁であり、MjToll はこれらの Toll 受容体から離れた位置にあった。これらのことから、MjToll2、LvToll および FcToll は同一もしくは非常に類似した Toll ファミリーであると

考えられる。したがって、今回得られた MjToll は LvToll とは別クラスの Toll 受容体であると考えられる。このように、エビ類においても Toll はファミリーを形成し、様々な生体防御に関連している可能性が考えられる。また MjToll および MjToll2 遺伝子は昆虫類の Toll 受容体遺伝子とクラスターを形成していたが、DmToll ファミリーのいずれとも高い相同性は得られず、分離した 2 つの MjToll がどの Toll ファミリーに属するかは決定することは出来なかった。そこで、クルマエビからのさらなる Toll 受容体遺伝子の分離やリガンド結合パターンの解析を行って、それぞれの Toll 受容体の異物認識機構の解明が必要である。

MjToll と DmToll ファミリーの TIR ドメインにおけるアミノ酸相同性解析の結果、38.7-54.7%の相同性が確認され、TIR ドメインの高い保存性が示された。このような TIR ドメインの高い相同性は、今後新たな種類の Toll 遺伝子を分離する上で有用な情報となると考えられる。

しかし、MjToll2、LvToll、FcToll および昆虫 Toll ファミリーに保存されているが MjToll にのみ特有の配列が TIR ドメインの 9 番目のアスパラギン酸、11 番目のバリン、55 番目のアラニン、70 番目のアスパラギン、97 番目のロイシンおよび 116 番目のメチオニンなどに認められた。さらに、TIR ドメインにおける立体構造では MjToll の第 1 α ヘリックスは MjToll2 および DmToll と異なっていた。哺乳類 TLR では下流の MyD88 依存および非依存型のシグナル経路が認められている[51]。クルマエビの Toll 受容体においてもこのような TIR ドメインの多様な構造が存在し、下流のアダプター分子も異なっている可能性が考えられる。

MjToll および MjToll2 はともに血リンパ、リンパ様器官、鰓、心臓、脳、胃、腸、神経、筋肉、造血器および中腸線など発現解析を行った全ての組織で発現が認められた。また、MjToll および MjToll2 は、いずれも中腸線では他の組織と比較し非常に低い発現量であったが、これは LvToll の組織の発現解析と同様の結果であった[38]。中腸線は代謝や恒常性の維持に重要な因子が多く発現する傾向があるが、免疫系の因子として数種のレクチンも発現していることが確認されている[58]。レクチンは初期免疫応答において Toll と同様に重要な役割を担っており、さらに Toll 受容体とタンパク質間で相互作用することが報告されている[59]。クルマエビの中腸線におけるレクチン産生も Toll 受容体と相互作用し、生体防御能に重要であると考えられる。

また、MjToll はリンパ様器官や血リンパにおいて、MjToll2 は心臓および神経において高い発現が認められた。リンパ様器官、血リンパおよび心臓はエビ類の免疫機構において重要な器官であることはこれまでの多くの研究で報告されている[60, 61]。哺乳類の TLR4 および TLR9 は神経成長因子による発現調節を受けていることが報告されており、クルマエビ Toll のより詳細な研究により、神経系での免疫機構との関連性についても新たな知見が得られることが期待される。

in vitro において、抗ウイルス薬である imiquimod や細菌の遺伝子に特有な塩基配列である CpG DNA および真正細菌の細胞膜の外側に層を形成する細胞壁の主要物質である PG を用いて刺激したリンパ様器官由来細胞において、MjToll は PBS 区と比べ高い発現を示した。imiquimod はウイルス由来の RNA を認識する TLR7[62]、CpG DNA は細菌やウイルスからの防御で働く TLR9 [63]および PG はグラム陰性細菌や幾つかのグラム陽性細菌のリポタンパク質

に対する自然免疫応答の中心となる受容体である TLR2 [31, 64]によって認識されることが知られている。また、ショウジョウバエの Toll 受容体も PG により活性化されることが知られている[16]。MjToll は imiquimod、CpG DNA および PG 刺激区において発現が上昇したが、有意に高い発現は PG 刺激区にのみ確認されたため、今回分離された MjToll は細菌由来の PG に免疫応答を有する可能性があることが示唆された。MjToll2 においても様々なリガンドに対する反応性を解析し、標的となる異物の特定について検討する必要がある。

本研究ではクルマエビから初めて分離された Toll 遺伝子の構造および発現解析を中心に行なった。エビ類の Toll ファミリーの全容を明らかにするために、今回用いた刺激物質に加えて、現在エビ養殖産業で問題とされているウイルスや細菌由来の核酸を用いて、各 Toll 受容体の機能を検討する必要がある。

Table 2. Degenerate primers for partial MjToll cloning

Primer	Sequence (5'–3')
Toll-dgF1	CSDRMGAKCTVGAHRACAA
Toll-dgF2	TAYTSVMRCWMRGACRRWGA
Toll-dgR1	MCCAMRCVCTTTCYAVGAA
Toll-dgR2	GAHAGVAYBAMDAMDAKVKTYC

Table 3. Primers used for partial MjToll2 cloning

Primer	Sequence (5'–3')
shToll-F1	GACTTGCAATTGCGACATGA
shToll-F2	TGACTTCTTCACCTTTCTGCAA
shToll-R1	TAGTTCGACGGCTGTCCTCT
shToll-R2	ACCTGGCCATACACAATGACT

Table 4. Composition of shrimp cell culture medium

Components	Quantity (g)
L-15 Medium (Gibco)	27.4
Lactalbumin hydrolysate (Gibco)	1.0
TC-Yeastolate (Gibco)	1.0
Glucose (Gibco)	1.0
Proline (Gibco)	0.1
Taurine (Gibco)	0.1
Ascorbic acid (Gibco)	0.001
Penicillin streptomycin (5000 U/5 mg/ml)(Gibco)	0.1 ml
2-mercaptoethanol	0.5 ml

Table 5. Reaction mixture for cDNA synthesis

5×RT Buffer	4 µl
Oligo (dt) 20-P7 primer (5'- CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACT ₂₀ -3')	1 µl
dNTP Mixture (10 mM)	2 µl
RNase Inhibitor (10 U/µl)	1 µl
total RNA (50 ng/µl)	2 µl
ReverTra Ace	1 µl
RNase free H ₂ O	make up to 20 µl

Table 6. Reaction mixture for PCR

10×Buffer	5.0 µl
2.5mM dNTPs	5.0 µl
Fw-primer (5 pmol/µl)	5.0 µl
Rv-primer (5 pmol/µl)	5.0 µl
cDNA (100 ng/µl)	2.0 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 units/µl)	0.5 µl
D.W.	27.5 µl
Total	50.0 µl

Table 7. Reaction mixture for ligation

T4 DNA Ligase 10×buffer	5 µl
pGEM-T Easy vector (4 ng/µl)	1 µl
PCR products (4 ng/µl)	3 µl
T4 DNA Ligase (3 units/µl)	1 µl
Total	10 µl

Table 8. Composition of SOC medium

Bacto Tryptone (BECTON DICKINSON, USA)	20.0 g
Bacto Yeast Extract (BECTON DICKINSON, USA)	5.0 g
NaCl (WAKO, Japan)	0.5 g
D(+)-Glucose solution(1M)(WAKO, Japan)	20 ml
D.W.	make up to 1 L

Table 9. Reaction mixture for colony PCR

10×Buffer	20 µl
2.5mM dNTPs	16 µl
T7 primer (5pmol/µl)	8 µl
SP6 primer (5pmol/µl)	8 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5units/µl)	2 µl
D.W.	146 µl
Total	200 µl

Table 10. Primers used for colony PCR

Primer	Sequence (5'-3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAA

Table 11. Composition of LB medium

Bacto Tryptone (BECTON DICKINSON, USA)	10 g
Yeast Extract (BECTON DICKINSON, USA)	5 g
NaCl (WAKO, Japan)	5 g
D.W.	make up to 1 L

Table 12. Reaction mixture for sequence PCR

5×sequence buffer	2.0 µl
DTCS	2.0 µl
SP6 or T7 primer (1.6 pmol/µl)	2.0 µl
Plasmid DNA (200 ng/µl)	2.0 µl
D.W.	2.0 µl
Total	10.0 µl

Table 13. Composition of stop solution

Glycogen (20 mg/ml)	1.0 µl
3M NaOAc	2.0 µl
EDTA (100 mM)	2.0 µl
Total	5.0 µl

Table 14. Preparation of 5'-RACE-Ready cDNA

SMART II A Oligonucleotide (10 µM) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3')	1 µl
5'-CDS Primer (12 µM)	1 µl
mRNA (50 ng/ µl)	3 µl
Total	5 µl

Table 15. Reaction mixture for 1st strand 5'-RACE cDNA synthesis

5×first strand buffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
Power Script Reverse Transcriptase	1 µl
Total (already containing 5 µl)	10 µl

Table 16. Preparation of 3'-RACE-Ready cDNA

3'-CDS Primer A (12 μ M) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30V N-3')	1 μ l
mRNA (50 ng/ μ l)	3 μ l
RNase free H ₂ O	make up to 5 μ l

Table 17. Reaction mixture for 1st strand 3'-RACE cDNA synthesis

5 \times first strand buffer	2 μ l
DTT (20 mM)	1 μ l
dNTP Mix (10 mM)	1 μ l
Power Script Reverse Transcriptase	1 μ l
Total (already containing 5 μ l)	10 μ l

Table 18. Reaction mixture for 5' and 3' -RACE PCR

10 \times Advantage 2 PCR Buffer	5.0 μ l
dNTP Mix (10 mM)	1.0 μ l
Fw/Rv-Primer (5pmol/ μ l)	1.0 μ l
10 \times UPM	5.0 μ l
5' /3' RACE-cDNA	2.5 μ l
50 \times BD Advantage 2 Polymerase Mix	1.0 μ l
PCR-Grade Water	34.5 μ l
Total	50.0 μ l

Table 19. Primers used for 5' and 3' -RACE PCR

Primers	sequence (5'-3')
5'-RACE	
5'-R1	CCTTCATCTCTTGA ACTCTGAGAAAGC
5'-R2	TCAATGAGCTCGCAGTCACAGAC
5'-R3	GAGCTTTGCAATGTGCTTAGCTTGT
5'-R4	CTGCCATTAGCAAATGAGGAAAAT
5'-R5	TCCCAACACGTTCCAGTCCTTTA
5'-R6	GAGGCTGGATAACCATGTTGTTGTTG
5'-R7	CATTTGGGAAACTGCAGTCGTT
5'-R8	TTTGGCTTTATGTTGGCACTTCA
sh5'R1	GGAGCTCTCCATCACTTGCACA
sh5'R2	TCAGGGACTTGCAGAAAGGTGA
3'-RACE	
3'-F1	GCCTACATTCAGCAGCAGATTA
3'-F2	AAGCAAGTCGCAGGACCATT
3'-F3	GATGGAGAAGTACCTCAACTTGAAA
3'-F4	AACTGTGCAGGGCTCCAA
3'-F5	AAGGGCTGTTCCAGAACTTG
sh3'-F1	TGTAGAGGACAGCCGTCGAACA
sh3'-F2	GCTCACTCACAAGCTCTGCAAGAC

Table 20. Details of genes used for MjToll analysis

SPECIES	NAME	ACCESSION NUMBER	SPECIES	NAME	ACCESSION NUMBER
<i>Homo sapiens</i>	HsTLR1	NP_003254	<i>Salmo salar</i>	SsTLR	CAJ80696
	HsTLR2	NP_003255	<i>Tachypleus tridentatus</i>	TtTLR	BAD12073
	HsTLR3	NP_003256	<i>Litopenaeus vannamei</i>	LvToll	ABK58729
	HsTLR4	AAF05316	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	FcToll	ABQ59330
	HsTLR5	NP_003259	<i>Euprymna scolopes</i>	EsTLR	AAZ27971
	HsTLR6	NP_006059	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Sp1	XP_792881
	HsTLR7	NP_057646		Sp2	XP_795110.2
	HsTLR8.1	NP_057694		Sp3	XP_786057.1
	HsTLR8.2	NP_619542		Sp4	XP_784660.1
	HsTLR9A	AAF72189		Sp5	XP_001194339.1
HsTLR9B	AF259263	Sp6		XP_788609.1	
<i>Mus musculus</i>	MmTLR	NP_109607		Sp7	XP_001203182.1
	MmTLR2	NP_036035		Sp8	XP_798715.1
	MmTLR3	NP_569054		Sp9	XP_001184374.1
	MmTLR4	NP_067272		Sp10	XP_001202672.1
	MmTLR5	AAF65625	<i>Chlamys farreri</i>	CfToll	ABC73693
	MmTLR6	NP_035734	<i>Drosophila melanogaster</i>	DmToll	AAQ64938
	MmTLR7	NP_573474		Dm18W	AAA79208
	MmTLR8	NP_573475		DmToll3	AAF86229
	MmTLR9	NP_112455		DmToll4	AAF86228
	MmTLR11	NP_991388		DmToll5	AAF86227
	MmTLR12	AAS37673		DmToll6	AAF86226
	MmTLR13	NP_991389		DmToll7	AAF86225
	<i>Gallus gallus</i>	GgTLR1		NP_001007489	DmToll8
GgTLR2		NP_989609		DmToll9	NP_649214
GgTLR5		NP_001019757		Dm18	NM_057466.2
GgTLR7		CAG15146	<i>Drosophila yakuba</i>	DyToll	AAQ65064
<i>Danio rerio</i>	DrTLR2	NP_997977	<i>Drosophila simulans</i>	DsToll	AAQ64875
	DrTLR3	NP_001013287	<i>Anopheles gambiae</i>	AgToll	AAL37901
	DrTLR4b	NP_997978	<i>Aedes aegypti</i>	AaToll	EAT48962
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	OmTLR	CAF31506	<i>Apis mellifera</i>	AmToll	AAX33677
	OmTLR3	AAX68425		Am18	NP_001013379

Table 21. Primers used for genome structure analysis

Primers	sequence (5'-3')
Toll R1	CCTTCATCTCTTGA ACTCTGAGAAAGC
Toll R2	GAGCTTTGCAATGTGCTTAGCTTGT
Toll R3	TCCCAACACGTTCCAGTCCTTTA
Toll R4	CATTTGGGAAACTGCAGTCGTT
Toll R5	TTTGGCTTTATGTTGGCACTTCA
Toll F1	GCCTACATTCAGCAGCAGATTA
Toll F2	GATGGAGAAGTACCTCAACTTGAAA
Toll F3	AAGGGCTGTTCCAGA ACTTG
Toll2 F1	TACCATGTTCTCGGCCTTGT
Toll2 F2	CTGTTCTTTTAAAGGCATGAAGG
Toll2 F3	GCAACAAAAGTGCAAAAATGC
Toll2 F4	TTGTTTCATGAGTACATTGGTCTTG
Toll2 R1	AAAACAGGTCACAGCCAAGTG
Toll2 R2	CAAAGATGCCCGATGGTAAT
Toll2 R3	ACCCCATAGCAGGAAGG
Toll2 R4	ATAGAGCCGCAACTTCTCATCT

Table 22. Reaction mixture for real time RT-PCR

2X TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	25.0 µl
Forward Primer (10 µM)	4.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	4.5 µl
TaqMan [®] Probe (5µM)	2.5 µl
Template cDNA	2.0 µl
D.W.	11.5 µl
Total	50 µl

Table 23. Primers and probes used for real time RT-PCR

Primers	sequence (5'–3')
MjTollF	CTCATTCTTTCTGGTGTTTTAGCTACTGT
MjTollR	TGAGTGAAGAGCCAACTTTGATT
MjToll probe	TTTGGAATACAAGCAAG
actinF	CTCGCTCCCTCAACCATGA
actinR	CCGATCCAGACGGAGTACTTG
actin probe	ATCAAGATCATTGCC

Table 24. Amino acid identity and similarity of MjToll and MjToll2 gene with drosophila Toll and mouse TLR sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. MjToll		43.2	43.1	42.8	28.3	21.7	29	25.2	19.1	20.3	23.2	21.9	22	21.3	21.6	21.3	22.2	22.2	23.1	21.5	23.2	21.4	22.7
2. MjToll2	62.4		82	83.2	27	22.9	27.4	27.2	18.8	20.2	22.1	20.7	22.8	21.4	24.2	22.9	22.2	21.8	22.7	21.9	22.7	23	23
3. LvToll	61.6	91.3		84.2	27.8	24	27.7	26.6	18.8	20	23.8	21.6	23.3	22.6	24.1	22.3	22.5	22.2	22.7	22.4	23.5	21	23.4
4. FcToll	61.9	92.1	92.1		27.5	23.4	27.7	26.1	18.7	20.1	23.6	21.3	23.5	22.4	24.2	23.4	23.5	22	22.9	22.3	23.6	21.9	23.1
5. Dmtoll1	50.2	47.5	47.6	48.5		21.1	92.5	27.4	21.1	21.5	22.1	20.4	19.6	20.8	19.9	21	20.4	21.6	22.2	21.2	20	18.6	22.2
6. DmToll3	41.9	42.4	43.1	43.6	39.6		21.7	24.7	15.3	17.5	18.7	21.3	20.3	19.9	20.5	18.5	21.6	19.1	20.6	21.2	20.4	19.4	21.5
7. DmToll4	48	46.5	45.7	46.6	92.8	38.7		25.9	21.6	22.6	23.2	19.9	19.7	20.8	21	20.7	19.7	21	21.9	21.5	20.7	19.1	21.2
8. DmToll5	42.7	47.8	47.7	46.4	44.7	48.6	42.1		16.6	18.3	20.4	21.7	21.7	20.9	23.5	22.9	22.2	20.8	20.7	22.8	21.6	20.5	22.4
9. DmToll6	35.9	33.8	34.3	33.5	37.3	28.1	38.8	29.9		36.4	36.9	15.7	16.1	16.6	17.2	17.1	16.1	17.9	19	20.3	18.4	17.2	18.5
10. DmToll7	36.9	34.4	34.5	35	35.9	30.2	38	30.2	56.9		34.9	16.9	17.9	18.5	17.6	18.6	16.5	19	18.8	20.4	19.6	19.4	19.9
11. DmToll8	42.6	38.1	38	40.5	41.6	32.8	43.2	35.3	57.8	56.4		19	17.6	21.7	20.3	18.9	18.4	19.7	19.2	20.6	19.9	19.9	21.6
12. MmTLR1	39.9	43.5	41.6	44.1	37.6	45	36.8	46.2	28.3	30.8	33.6		30.2	23.8	23.5	23.1	64.7	21.7	22	22.3	20.6	21.4	24.2
13. MmTLR2	40.4	44.1	42	45	38.1	41.8	37.5	44	29.7	30.3	32.3	53.2		22.2	25.6	25.9	30.9	22.5	22.6	23.6	21.6	22.8	24
14. MmTLR3	40.8	44	45.7	42.9	41.5	41.5	38.8	41.8	31.6	32.3	35.5	44.1	44		25.7	24.2	24.3	26	25.5	24.4	23.4	24.1	26.5
15. MmTLR4	41.5	45.3	43.5	43.9	38.8	43.6	38.4	43.8	29.8	31.2	34	44.1	45.6	44.5		24.1	24.1	23.5	25.1	23.6	21.9	22	27
16. MmTLR5	42.5	43.6	44.5	45.6	41.1	39.5	40.1	42.5	29.6	31.7	33.3	45.2	44.2	47.2	46		22.6	24.2	23.7	22.8	24.4	23.1	24.4
17. MmTLR6	38.8	44.1	42.7	43.7	37.8	43.2	35.7	44.5	27.5	28.9	34.3	77.4	54.7	43.8	45.6	44.9		21.6	22.5	23.2	21.6	22.4	25.4
18. MmTLR7	44.5	42.6	42.7	42.5	44.4	38.6	42.9	38.9	32.9	35.1	37.1	40.5	41.1	45.5	42	42.9	40		42.2	36.1	23.1	22.1	27.2
19. MmTLR8	44.9	41.7	40.9	41.4	44.2	38	43.2	38.6	32.7	34	37.6	39.1	40.4	45.2	43.5	42.1	39.4	61.5		34.8	23.1	21.7	26.5
20. MmTLR9	42.8	41.2	41	40.6	42.6	39.2	41.9	37.8	33.8	34.4	36.2	40.7	40.8	44.9	41.7	41.3	40.7	56.7	56		22.8	23.9	25.6
21. MmTLR11	43.3	42.7	43.2	44.5	39.1	39.1	38.7	40	31.8	33.1	34.4	41.5	41.6	45.5	42.5	44.5	42.3	41.9	41.4	40.9		37.4	25.4
22. MmTLR12	41	43.5	42.4	42.5	37.8	39.6	36.4	39.6	29.8	32.3	34.2	41.1	41.7	44.7	42.6	43.6	41.4	41.4	40.9	40.1	55.2		26.6
23. MmTLR13	43.8	45.2	44.2	45	43.1	41.3	42.2	42.1	33.2	35.7	38.6	42	41.5	47.2	44	44.3	42.1	48.4	47.2	47	45.5	44.7	

Upper triangle: identity, lower triangle: similarity

MKPLWILLPC	FLVVSSIVTG	VWGFSGCGKC	VR	GVNQLICP	40
Signal peptide					
DLMSRERFDG	TRENVFHMKC	QHKAKSVNFS	LINDCSFPNV		80
EYVIFERC PK	PNVTFAEVFR	SSGIEPEKVL	TFSFVSVFTG		120
DPGDDLEEW H	FQGLSNLTS L	KLRGNNFQTL	PPNILNYTPQ		160
TDLLFNPRST	ILALS LNHS S	RIRPNSKLCT	FTKTNLLICL		200
KGLFQNLNKL	ANISLWSNDI	EQIGPKLFYN	LPSLWSLELT		240
SNKISNLD SG	VFSSLTNAGK	ILLDSNMIEN	LPEDLFWNCT		280
NLEFIHMSNN	RLTSIPSELF	KETKKVYSIE	FNNNMVSSLP		320
GNLFKGLERV	GKIKMKRNAL	RTLPAGLFSD	LSKLEVLDLQ		360
SNIEELPPG	FFDNQRIMDM	LILKNNSLAE	LPEGIFRNCA		400
GLQEYL LSHN	KLSTLQSSWF	PAPVTTLREL	DLGSNNISFS		440
SFANGQEISV	EKNFPLLSQA	SLEEISLENN	RITAVPQAFS		480
ISFVNLTILN	LSGNDIEFVD	ASDLLFKSDE	VVLHLEKNKI		520
KTVNLQHINN	IAAYKIKLF	IGENPLVDCD	NLYWVRFIFQ		560
GKHLDG EVPQ	LEIRDFKEKR	RDSKEQTCSY	TDDDTVAEKL		600
KWVRSEILTC	RLQECPE SCK	CFTRTHDSMY	IVDCAYQKLR		640
NVPQIIRLEE	QNLQNYSLTL	NLRNNSISNL	DQLQDPEYHN		680
LVNLTIPNNS	LFS LNESTLP	SSLRVLDIRG	NNFTYFEESV		720
IDYFNKTDII	LSLGENPWVC	DCELIDLQSF	LRVQEMKVLD		760
FHNIR CINFN	ETLVDVTEAD	LCPI LLPPKV	IIASTVISMF		800
Transmembrane domain					
LILSGVLATV	SFW	EYKQGIK	VWLFTHRLCL	WAVVNEEYDN	840
NKK	YDAFISY	SDKVEEFVNT	VLVPGLES GD	PKYKVCLHYR	880
DWLPGAYIQQ	QINQSVEASR	RTIVVLS SNF	IENVWGHLEF		920
KTAHYQALKD	RHNRIIVIVL	GEVPPENELD	EELKLYLSTR		960
TYLQFGDPKF	WEKLR YAMPH	PYDLIYKKQR	KRRD TDKLEL		1000
Toll - interleukin 1 – resistance (TIR) domain					
VKSDSKESK	1009				

Figure 3. Amino acid sequence of MjToll

The predicted signal peptide, transmembrane region and the TIR domain are shown in black, blue and red boxes, respectively.

MMS SWMV LPA F LLWGWAAGG VTHS LSCGLC E	GGPDGYTCP	40
Signal peptide		
HSESEEKYVL RPLPNQVLHV KCSNLVRDFS LIKDCNLTF		80
RQFEFERCPL PSVSFGEVFR RIGVPSGNVR SLSPTAGAWN		120
ASSGLQGWHL DSLTNLQTLQ LVDNNFTSFP PALLTNTPKL		160
KFFSFIGNQV DSLPHTMLAS TPDLMADLG NNGLATVPED		200
LFVNLTKL TN VSLWNNQLTD IQRNLFDPDIP NLKFLDLRDN		240
LLSAITNRQF RGMKILKRLN LGGNRLSSLN NDSFLDLRSL		280
EELHLSNLL EKLP SGIFDN QRLIKKLI LR NNSFSKLP GK		320
IFQKCESLM LDLSYNNLQY IERLQLPGPT TSLTYLDLGN		360
NNISFSEDI SESGAQFIPY DFPISNQLKL QHIFLDNRI		400
NHIPP SFNNL YLDLETIDLS GNLSYLEFR SIHF LSDSVK		440
LNLKNNKIKV INLRQLQIWP KDEKCKNVTLS LEGNPLLCN		480
CLLYIFAKIA QGKSDELSKT SFKILIDDAD KVTCTSL ENR		520
KMYVKTLD FR MLTCQLEHCL GNCTCEFRRH DEMLI VDCSF		560
KGMKEIPIPN DDIYNIKNFS VTLNLMNNI TNFDGLEHPF		600
YSKLVNLTIP YNKISHFNES DLPEHLKVL D VRGNNLTLLS		640
ATTLDYLNVT DMTLS LGDNP WTCNCELIDF FTFLQVPERK		680
VLDQNNIKCA SDGELLNIN EYTICPSFRQ PMVIVTIVLI		720
Transmembrane domain		
TVFLLFAVL GTMSF YKYKQ GIKVWLFTHR MCLWAITEDE		760
LDADK KYDAF ISYSHKDEEF VNTVLVPGLE SGDPKYRICL		800
HYRDWIPGEY IQNQILQSVE DSRRTIVVLS SNFIESVWGQ		840
Toll - interleukin 1 – resistance (TIR) domain		
LEFKAHSQA LQDR TNRIIV IVYGGVPPES ELDEKLRLYI		880
SMKTYVKWGD AKFWEKLR YI MPHP QELIQK KQKCKNADK		920
LELVKSNSKS V		931

Figure 4. Amino acid sequence of MjToll2

The predicted signal peptide, transmembrane region and the TIR domain are shown in black, blue and red boxes, respectively.

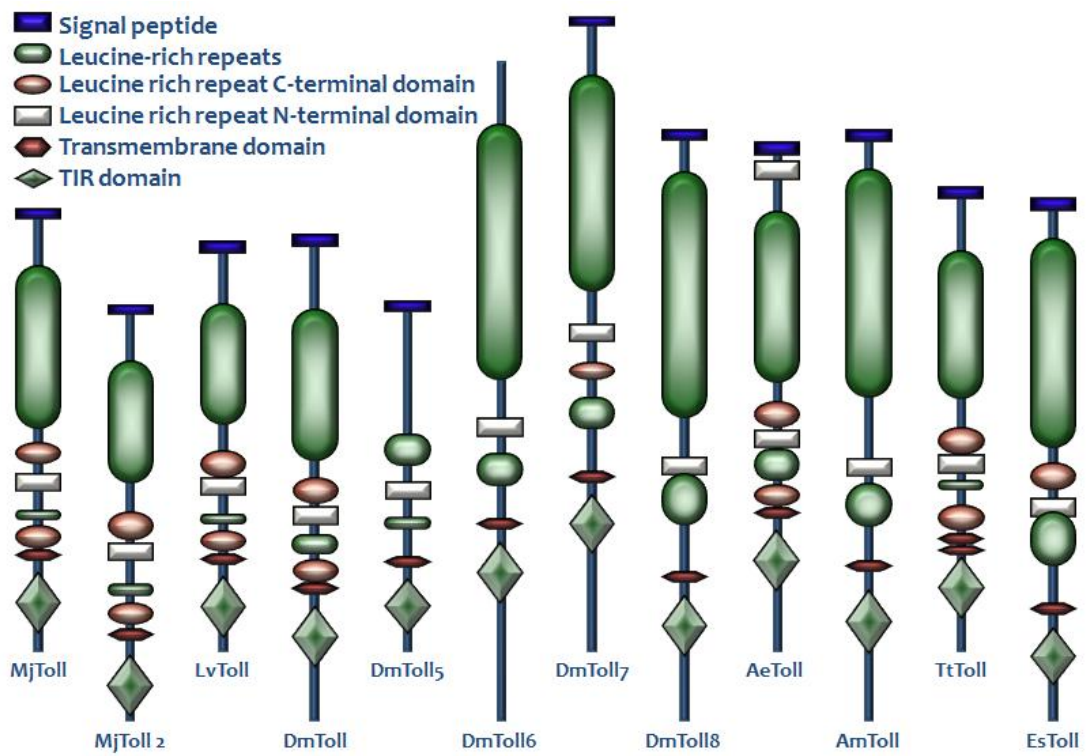
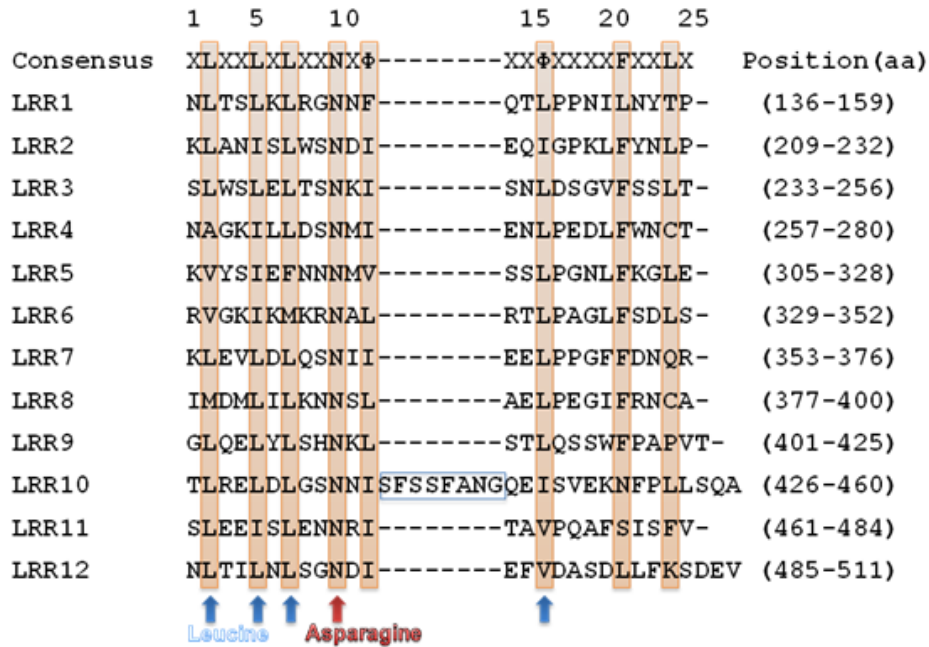


Figure 5. Comparison of secondary structures of Tolls

(a)



(b)

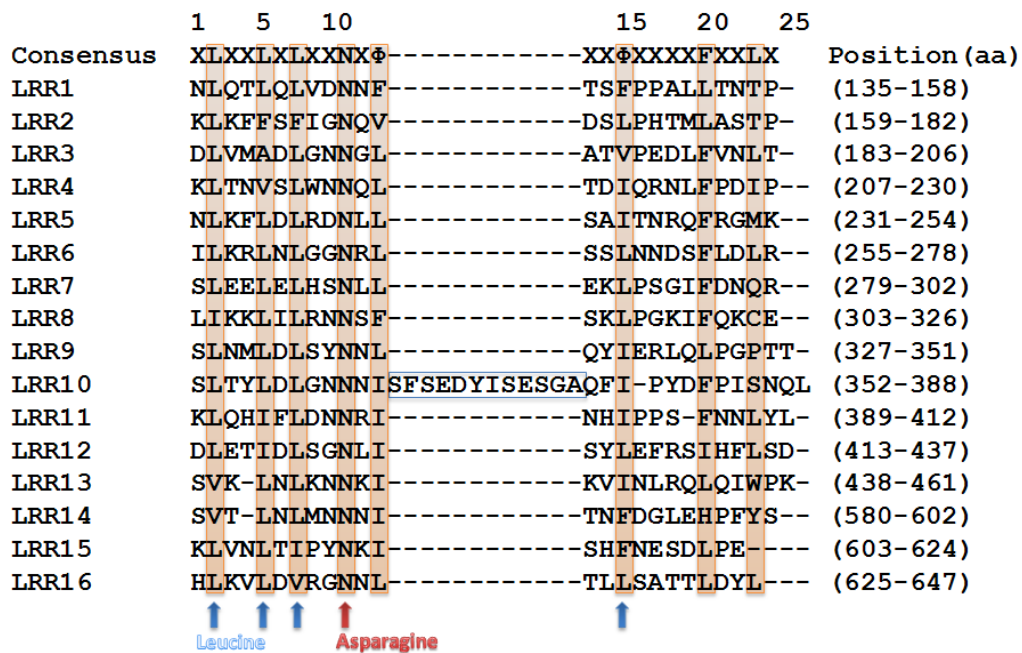


Figure 6. Alignment of Toll genes ectodomain with consensus sequences

(a) MjToll, (b) MjToll2

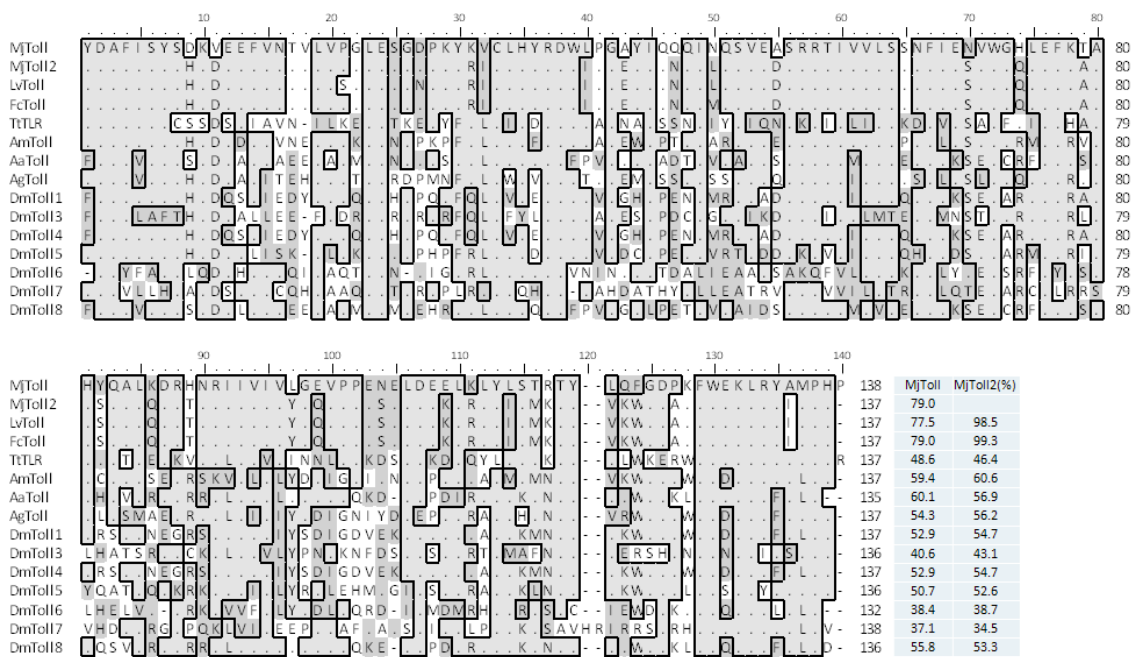


Figure 7. Alignment of the Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain
 Box and shadow indicate identity and similarity, respectively.

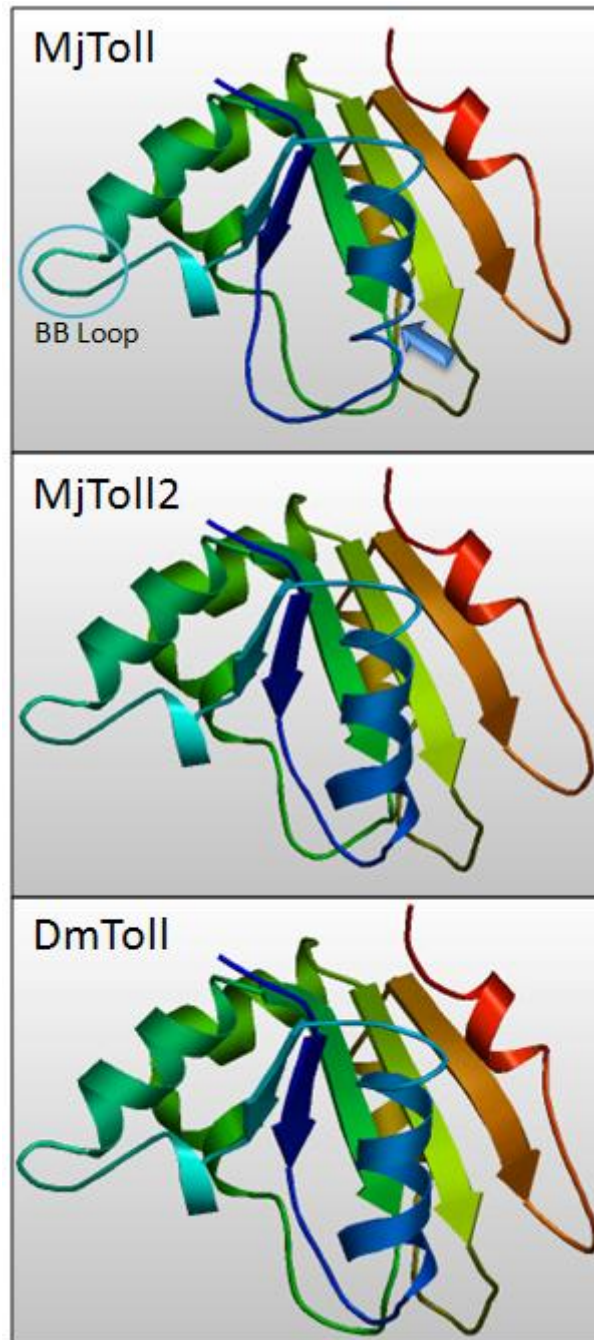


Figure 8. Protein 3D structure prediction of MjToll, MjToll2 and DmToll in TIR domain

α -helix and β -sheets are indicated by ribbons and arrows, respectively.

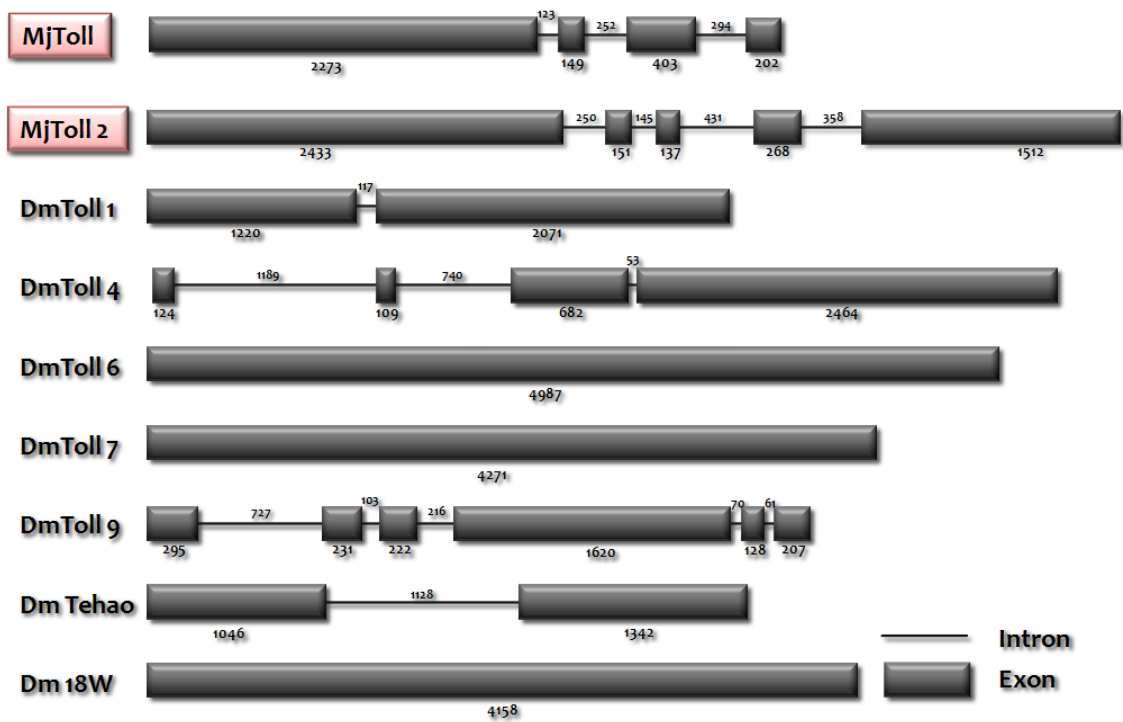


Figure 9. Genomic structure comparison of MjToll, MjToll2 and Drosophila Tolls

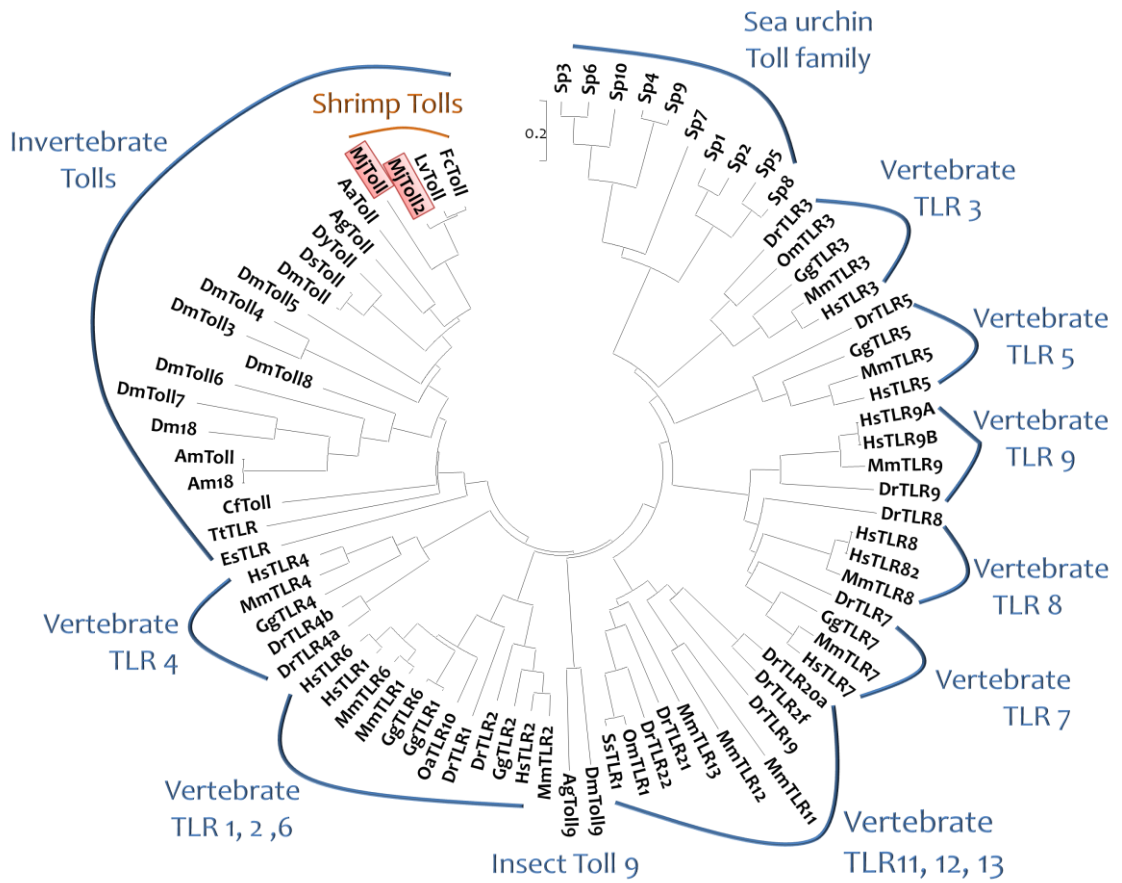


Figure 10. Phylogenetic tree of Tolls/TLRs

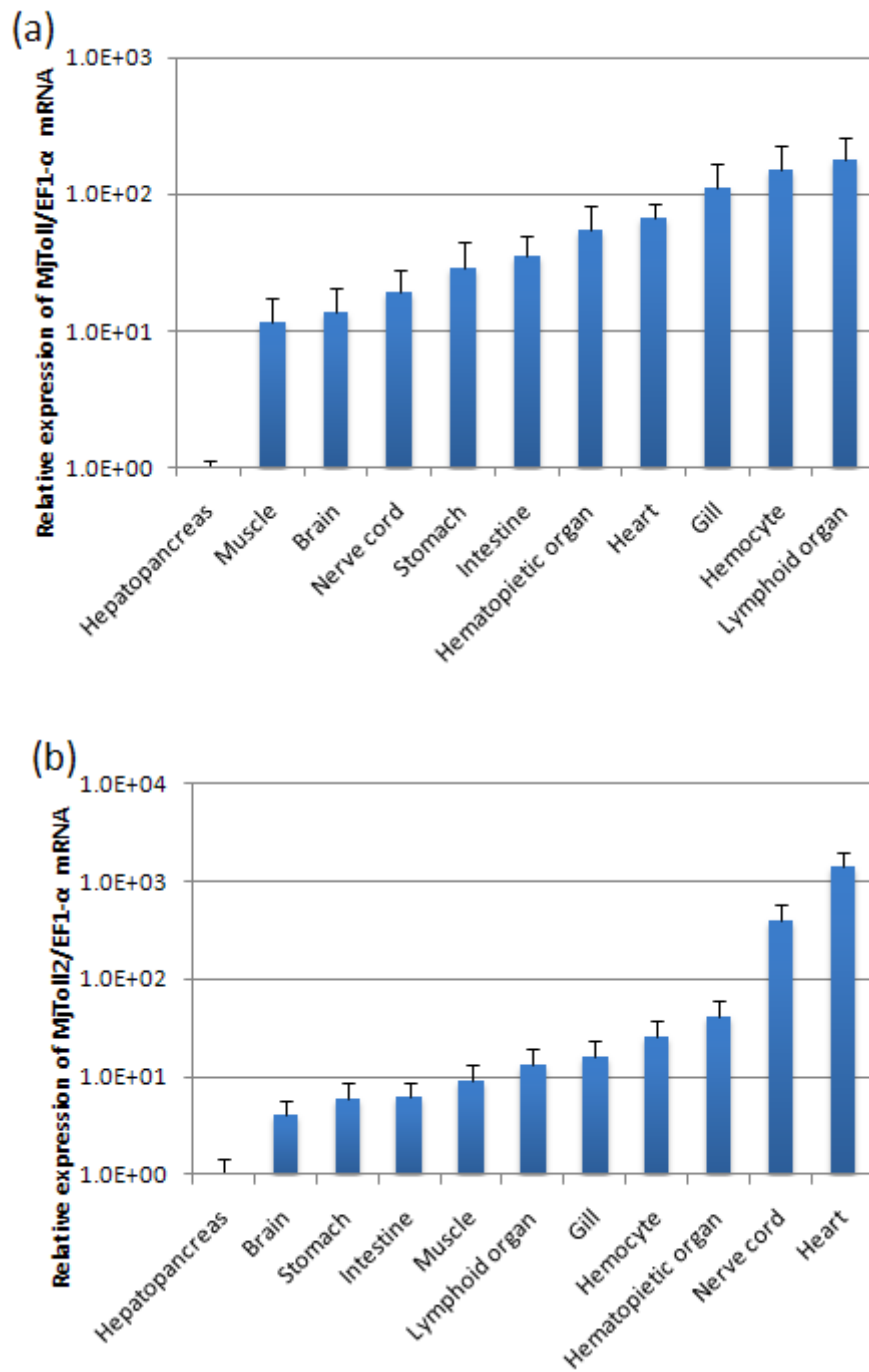


Figure 11. Expression analyses of Toll genes in tissues

(a) MjToll, (b) MjToll2

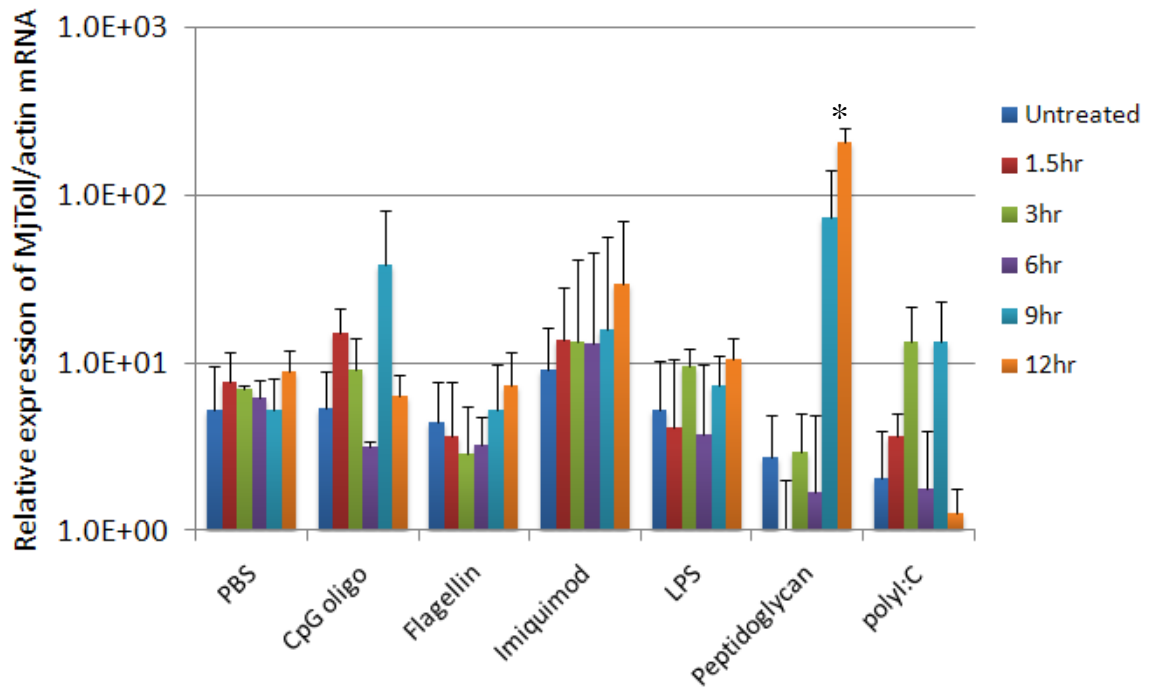


Figure 12. Quantitative real-time PCR analysis of the MjToll gene of lymphoid organ cells of their *in vitro* stimulation

Asterisk denotes significant differences vs. untreated group ($p < 0.01$)

第3章 anti-lipopolysaccharide factor 遺伝子の分離および同定

第1節 目的

グラム陰性細菌は細胞壁の外膜の主要構成成分として、内毒素の一種である LPS を含んでいる。LPS は、コア多糖と O 抗原からなる親水性の多糖部分と、lipid A と総称される疎水性の糖脂質から構成される両親媒性物質である [65]。この lipid A が宿主に対する強力な自然免疫誘導活性の本体として認識される。哺乳類では、グラム陰性細菌が体内に侵入すると、LPS の lipid A 部分が LBP と結合し、マクロファージ、好中球、リンパ球および顆粒球の細胞表面の TLR4 で認識される [27]。その後、細胞内ドメインを介してシグナル伝達経路を活性化し、種々のサイトカイン産生を過剰に誘導する。次に、血小板活性化因子、プロスタグランジン、NO などの中間媒体の放出により白血球減少、多臓器不全などの症状を呈す [30]。

近年、生体防御機構の解明が進んだ結果、LPS と結合し、毒性の中和反応を誘導する BPI と呼ばれる分子が哺乳類において同定されている [66, 67]。一方、カブトガニでは、BPI と類似した機能を有する抗菌ペプチドとして ALF が知られており、LPS の毒性中和や、菌の増殖阻害など、疾病防除に重要な役割を果たしている [68, 69]。ALF は、これまでにクルマエビ属において、*L. vannamei* で 3 種 [70]、ウシエビで 5 種 [71-73]、クルマエビで 1 種報告されている [74]。*L. vannamei* やウシエビで複数の ALF 遺伝子が同定されていることから、ALF 遺伝子はファミリーを形成すると考えられる。そこで本章では、クルマエビ新規 ALF 遺伝子を同定し、LPS および *V. penaeicida* の刺激に対する発現動態解析を行うことを目的とした。

第2節 材料および方法

1. 供試クルマエビ

宮崎県のクルマエビ養殖場より平均体重 12.0 g のクルマエビを購入し実験に供試した。

2. ALF 遺伝子増幅用プライマーの設計

クルマエビ、*L. vannamei* およびウシエビの既存の ALF 遺伝子の相同性解析を行い、保存性の高い領域に対し、プライマーを設計した (Table 25)。

3. ALF 遺伝子のクローニング

3.1. クルマエビのリンパ様器官の細胞培養

第2章 3.1.と同様の方法でクルマエビのリンパ様器官の細胞培養を行った。

3.2. Total RNA の抽出

第2章 3.2.と同様の方法で totalRNA の抽出を行った。

3.3. cDNA の合成

セクション 3.2. において抽出した total RNA をテンプレートに、ReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO, Japan) を用いて逆転写反応を行った。Table 26 の cDNA 合成用反応溶液を作製し、37 °C で 15 分間、98 °C で 5 分間、4 °C で 5 分間の反応を、サーマルサイクラー (BIO RAD, Mycycler) を用いて行った。

3.4. PCR による ALF 遺伝子の増幅

クルマエビのリンパ様器官から抽出した mRNA を用いて作製した cDNA を

テンプレートとして PCR を行い、ALF 遺伝子の増幅を行った。反応溶液の組成を表 4 に示した。1st-PCR は ALF-F1/R1 プライマーを 2nd-PCR に ALF-F2/ALF-R2 を用い、95 °C で 5 分間のプレヒート後 95 °C で 30 秒間の熱変性、55 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 1 分間の伸長反応を 45 サイクル、サーマルサイクラー (BIO RAD, Mycycler) を用いて行った。反応終了後、1.5 %アガロースゲルによる電気泳動を行い、増幅の確認を行った。

3.5. ベクターへのライゲーション

T ベクターへのライゲーション反応は、第 2 章 3.5.と同様の方法で行った。

3.6. コンピテントセルへのトランスフォーメーション

トランスフォーメーションは、第 2 章 3.6.と同様の方法で行った。

3.7. コロニーPCR によるインサートの確認

コロニーPCR によるインサートの確認は、第 2 章 3.7.と同様の方法で行った。

3.8. プラスミド DNA の抽出

プラスミド DNA の抽出は、第 2 章 3.8.と同様の方法で行った。

3.9. シークエンス

シークエンスは、第 2 章 3.9.と同様の方法で行った。

3.10. データ解析

BLAST Program (<http://www.blast.genome.ad.jp/>)を用い、GenBank 上のデータ

ベースと比較を行った[41]。

4. 5'-および3'-RACE 法による ALF 遺伝子の全長解析

5'-および3'-RACE 法による ALF 遺伝子の全長解析は、第2章4.と同様の方法で行った。なお、5'-および3'-RACE 法に用いたプライマーは、Table 27 に示した。

5. 相同性解析

得られた ALF 遺伝子の部分塩基配列を用い、ALF 遺伝子の全長を決定した。また、全長配列を基にアライメントを作製し、相同性解析、系統解析を行った。アミノ酸配列のアライメントは、BioEdit software (ver. 5.09) を用い clustal W プログラムによって作製した。また、アミノ酸の配列の相同性解析には、MatGAT ver2.02 を用いて解析した。系統樹は、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver. 4) software[42]を用い、近隣結合法[43]によって作製した。シグナルペプチドは SMART version 4.0 (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) により予測した。さらに、細胞内ドメインは SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) により立体構造予測を行った[44]。

6. ALF 遺伝子の発現解析

6.1. 各臓器における ALF 遺伝子の発現解析に使用する cDNA の作製

3 尾のクルマエビより脳、鰓、心臓、血リンパ、中腸腺、造血器、腸、筋肉、神経および胃を摘出し、それぞれを 1.5 ml チューブに移し 300 μ l の ISOGEN を加え、第2章3.2.と同様の方法で total RNA の抽出を行った。抽出した RNA を鋳型とし、セクション3.3.と同様に cDNA の合成を行なった。

6.2. リンパ様器官由来細胞の LPS による刺激および cDNA 作製

20 尾より摘出したリンパ様器官を第 2 章 3.1. と同様の方法を用い細胞浮遊液を作製し、48 well プレーットの 15 well に 900 μ l ずつ分注した。ここに 1、10 および 100 μ g/ml に調整した、LPS (*E. coli* serotype 0127:B8, SIGMA) 溶液およびコントロールとして基礎培地を 5 well に 100 μ l ずつ添加した。これを 1、4、8、12、24 および 48 時間、25 °C の CO₂ インキュベーターで培養し、それぞれの well の培養細胞を第 2 章 3.2. と同様の方法で totalRNA の抽出を行った。セクション 3.3. と同様に cDNA の合成を行なった。

6.3. LPS および *Vibrio penaeicida* 接種後のクルマエビからの cDNA 作製

平均体重 12.0 g のクルマエビに *V. penaeicida* (1×10^5 CFU/ml) の生菌および LPS (*E. coli* serotype 0127: B8, SIGMA) (200 μ g/shrimp) を接種し、1、2、4、6、8、12 および 24 時間後に各区 3 尾からリンパ様器官を摘出し、それぞれを 1.5 ml チューブに移し 300 μ l の ISOGEN を加え、第 2 章 3.2. と同様の方法で totalRNA の抽出を行った。抽出した RNA を鋳型とし、セクション 3.3. と同様に cDNA の合成を行なった。

6.4. PCR による ALF 遺伝子の半定量発現解析

各 cDNA を鋳型として ALF 遺伝子および EF1- α 遺伝子のエクソンを挟んで設計したプライマーを用い PCR を行った。PCR は Table 28 の反応溶液を作製し、94 °C で 30 秒間のプレヒート後、94 °C で 30 秒間の熱変性、55 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 30 秒間の伸長反応を決定サイクル数 (EF1- α 遺伝子 25 サイクル、ALF 遺伝子 40 サイクル) で行った。PCR に用いたプラ

イマー配列は Table 29 に示した。PCR 終了後、1.5 %アガロースゲルにて電気泳動を行い、バンドを画像として保存し、バンドの蛍光強度を、Image Gauge 3.4 (FUJIFILM Science Lab) を用いて数値化した。

第3節 結果

7. クルマエビ ALF 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

クルマエビにおける ALF 遺伝子の分離を試みたところ、全長 558 bp のクルマエビ ALF 遺伝子アイソフォーム 2 (MjALF2) が得られ (GenBank accession no. AB453738)、120 アミノ酸残基をコードしていた (Figure 13)。また、MjALF2 遺伝子の N 末端の 22 残基のアミノ酸はシグナルペプチドであることが確認された (Figure 13)。さらに、タンパク質の予想分子量は 13.8 kDa であった。

8. MjALF2 遺伝子との相同性解析

分離を行った MjALF2 遺伝子と、既に GenBank に登録されている甲殻類の ALF 遺伝子との相同性解析を行なった結果、MjALF 遺伝子と既に報告されているクルマエビ ALF (MjALF) とのアミノ酸配列の相同性は 43.1 %、ウシエビ ALF2 (PmALF2) と 83.3 %、PmALF と 56.7 % であり、さらに、その他の ALF 遺伝子とは 32.5 ~ 47.2 % であった (Table 30)。また、MjALF2 と既知の ALF とのアライメントを作製したところ 58 と 79 番目のシステインの保存が確認された (Figure 14)。

9. MjALF2 の立体構造の予測

PmALF3 を基にしたホモロジーモデリングにおける相同性は MjALF が 57.8 % で MjALF2 が 38.6 % であった。また、MjALF2、MjALF および PmALF3 の全長アミノ酸配列をもとに予測した立体構造を比較したところ、いずれも 3 つの β シートおよび 3 つの α ヘリックス構造が認められた。また、PmALF3 において LPS 結合領域と予測されている β シートの構造は MjALF および

MjALF2 において非常に類似していた (Figure 15)。

10. MjALF2 遺伝子の系統解析

系統解析は、既知の GenBank に登録されている甲殻類の ALF 遺伝子の全長アミノ酸配列を用いた。MjALF2 は、PmALF1 および PmALF3 と最も近縁であったが、MjALF はこのクラスターとは離れて位置していた (Figure 16)。

11. MjALF2 遺伝子の半定量発現解析

11.1. 各臓器における MjALF および MjALF2 遺伝子の発現解析

脳、神経、造血器、血リンパ、胃、中腸腺、心臓、腸管、鰓および筋肉の全ての器官で、MjALF および MjALF2 遺伝子の発現が認められた (Figure 17)。また、血リンパを除くすべての器官において MjALF2 は MjALF よりも高い発現量を示した。MjALF は中腸腺で最も発現量が低く、血リンパにおいて 11.5 倍の最も高い発現が認められた。MjALF2 は MjALF の中腸腺の発現量と比較し、すべての器官において 6 倍以上の発現量が認められた。特に、心臓で 42.9 倍、鰓 25 倍の高い発現を示した。

11.2. リンパ様器官培養細胞を用いた LPS 刺激後の MjALF 遺伝子の発現解析

LPS 刺激後のリンパ様器官培養細胞の MjALF2 遺伝子の発現は無処理区での発現と比べ、1 $\mu\text{g/ml}$ 刺激区で 48 時間目に 1.4 倍、10 $\mu\text{g/ml}$ 刺激区で 8 時間目に 1.6 倍および 100 $\mu\text{g/ml}$ 刺激区で 12 時間目に 1.8 倍のそれぞれ最も高い発現が認められた。また、ほとんどの区で無処理区を上回る MjALF2 の発現が認められた (Figure 18)。

11.3. *V. penaeicida* および LPS 接種後のクルマエビリンパ様器官における MjALF および MjALF2 遺伝子の発現解析

V. penaeicida を接種したクルマエビのリンパ様器官における MjALF および MjALF2 遺伝子の発現量は、接種後 24 時間後の MjALF2 の発現量 (1.1 倍) を除き、すべて無処理区を下回る値であった。一方、LPS を接種したクルマエビのリンパ様器官における MjALF および MjALF2 遺伝子の発現量は、接種後 6 時間後にそれぞれ無処理区と比べ、5.4 および 2.7 倍と最も高い発現量を示し、その後減少する傾向が認められた (Figure 19)。

第4節 考察

クルマエビにおける免疫因子の分離や機能解析による免役機構の解明はエビ養殖における疾病防除のためにも非常に重要である。そこで本章では、クルマエビにおける新規 ALF 遺伝子の同定ならびに LPS や *V. penaeicida* に対する発現動態の解析を行うことで新規 ALF 遺伝子の基礎的知見を得ることを目的とした。

本研究にて得られたクルマエビの新規 ALF 遺伝子 (MjALF2) の全長 cDNA は 558 bp で 120 アミノ酸残基をコードしていた。また、MjALF2 遺伝子の N 末端の 22 残基のアミノ酸はシグナルペプチドであり、既報の甲殻類 ALF における構造と類似していた。MjALF2 遺伝子と既報のクルマエビ ALF 遺伝子 (MjALF) とのアミノ酸配列の相同性は、43.1 %、またウシエビの ALF アイソフォーム 2 (PmALF2) と 83.3 % の相同性を示した。したがって、MjALF2 遺伝子はクルマエビにおける新規の ALF 遺伝子であり、PmALF2 と同一か非常に類似したアイソフォームであることが認められた。

MjALF2 遺伝子と既報の甲殻類 ALF とのアライメントから 2 つのシステイン残基 (Cys⁵⁸ および Cys⁷⁹) の保存が認められた。このシステイン残基によるジスルフィド結合は両親媒性ループ構造を形成し、LPS の lipid A におけるリン酸基が結合したグルコサミン 2 分子がグリコシド結合した脂肪酸鎖に結合すると考えられている[75]。多くの抗菌ペプチドはシステイン残基を有しておりジスルフィド結合の形成に伴う酸化的フォールディングが起こることが報告されている[37]。また、ALF はグラム陰性菌の LPS と結合し、LPS による血リンパ凝固作用を抑制することや[76, 77]、カブトガニ ALF (TtALF) において LPS 中和活

性能を有することが認められている[78-80]。さらに、ALFにより誘導されたタンパク質のLPS結合様式や毒性の中和作用に関する研究も報告されている[77, 81]。既報のMjALFもまた、2つのシステイン残基によるジスルフィド結合がLPSとの結合であり、また高いLPSの毒性中和能や溶血活性を有していることが報告されている[74]。このようにMjALF2も同様に両親媒性ループ構造によりLPSと結合し、毒性の中和に働いていることが予測される。

タンパク質立体構造予測から、MjALF2とPmALF3は類似した構造であることが認められた。PmALF3は核磁気共鳴分光法によるタンパク質立体構造が解析され、LPSのlipid Aとの詳細な結合様式について報告されている[82]。LPSとの結合には β シートの10の荷電残基が関係しているということが報告されている (Figure 14)。しかし、クルマエビにおけるこれらの残基のうち43番目のバリン、45番目のロイシン、46番目のトリプシンおよび64番目のプロリンにのみアミノ酸残基の保存が認められた。LPSのlipid A中に含まれる脂肪酸鎖は細菌種によって異なるため、このようなアミノ酸残基の多様化により、様々な病原微生物に対応できる多様性を生み出している可能性が考えられる。

脳、神経、造血器、血リンパ、胃、中腸腺、心臓、腸、鰓および筋肉の全ての器官(細胞)で、MjALFおよびMjALF2の発現が認められ、MjALFは血リンパにおいて、MjALF2は心臓で高い発現を示した。また、MjALFとエビ類の抗真菌ペプチドであるPenaeidinとの発現様式は類似していた[74, 83, 84]。ノーザンブロットによるPenaeidin3の発現は血リンパにおいて最も顕著であり、リンパ様器官、心臓、腸、鰓でも発現が認められている。リンパ様器官、血リン

パおよび心臓はエビ類の免疫機構において重要な器官であることはこれまでの研究で報告されている[60, 61]。また、クルマエビの血球は異物を貪食し、活性酸素中間体を産生する[85]。腸や鰓は細胞表面の粘膜が環境中に晒されており、このような防御機構が働いていることが考えられる。このように、MjALF および MjALF2 は全身性の免疫系で働き、病原微生物の防除を果たしている可能性が考えられる。

リンパ様器官培養細胞における MjALF2 遺伝子の LPS 刺激に対する発現動態の解析を行ったところ、ほぼ全ての LPS 刺激区において無処理区より高い発現量を示した。また、*V. penaeicida* の生菌および LPS のクルマエビへの接種後のリンパ様器官における MjToll および MjToll2 遺伝子の発現動態を解析したところ、*V. penaeicida* 接種区は MjALF および MjALF2 遺伝子の発現量の増加は認められなかったが、LPS 接種区では無処理区と比べ、接種 6 時間後に MjToll および MjToll2 遺伝子の高い発現が認められた。既報の MjALF 遺伝子も LPS 接種により遺伝子発現が上昇することが認められている[74]。このように、MjALF および MjALF2 は LPS に対して迅速に応答することが予測される。

ALF は抗真菌の増殖抑制能を有しており、抗生物質にとって代わる抗菌物質として応用されることが期待される[70]。ザリガニにおいては ALF の組換えタンパク質がエビ類急性ウイルス血症原因ウイルス (PRDV) の増幅を抑制することが *in vitro* および *in vivo* で報告されており[86]、抗真菌以外の病原微生物に対する防御能も有している可能性がある。今後のさらなる研究により、ALF 遺伝子の病原体に対する詳細な防除機構の解明が期待される。

Table 25. Degenerate primers for partial MjALF2 cloning

ALF-R1	CATGAACTCCACTTCATCCGAGTG
ALF-R2	ACAACCTCAACGATCCTTTGGACAAG
ALF-F1	CATACGGACATATCCTTGGCTTCAG
ALF-F2	GGAGGACTCAAGAGGATGCGTTT

Table 26. Reaction mixture for cDNA synthesis

5×RT Buffer	2.0 µl
Primer Mix	0.5 µl
RT Enzyme Mix	0.5 µl
total RNA (250 ng/µl)	4 µl
RNase free H ₂ O	Make up to 10 µl

Table 27. Primers used for 5' and 3' -RACE PCR

5'RACE-Rv1	CATGAACTCCACTTCATCCGAGTG
5'RACE-Rv2	ACAAGTGCGGGAATCAAGTC
3'RACE-Fw1	ACTCAGCCTGATTGCACTTGT
3'RACE-Fw2	TTGATTCCCGCACTTGTCCA

Table 28. Reaction mixture for PCR

10× Ex Buffer	2.0 µl
2.5mM dNTP	2.0 µl
Fw-primer (5 pmol/µl)	2.0 µl
Rv-primer (5 pmol/µl)	2.0 µl
cDNA (100 ng/µl)	1.0 µl
TaKaRa Ex <i>Taq</i> (5 units/µl)	0.5 µl
D.W.	10.5 µl
Total	20.0 µl

Table 29. Primers used for RT-PCR

EF1-a exF	GTCTTCCCCTTCAGGACGTA
EF1-a exR	GAACTTGCAGGCAATGTGAG
Mj ALF2 exF	AAGGATCGTTGGGTTGTGG
Mj ALF2 exR	CCAGATCCTTGCATCATCCT
Mj ALF exF	GTCAGTAACGAGCATGATCC
Mj ALF exR	GAGCATCTGATACCACGACC

Table 30. Amino acid identity and similarity of MjALF2 gene with other known ALF sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. MjALF2		43.1	42.1	56.7	83.3	40.7	44.7	44.7	43.9	47.2	46.0	45.5	46.3	43.9	45.2	40.7	41.1	39.2	35.2	32.5
2. MjALF1	62.6		59.3	30.9	46.3	59.7	57.3	57.3	58.1	56.1	59.7	41.9	58.1	57.3	41.1	59.7	56.0	41.6	34.4	41.3
3. PmALF	65.8	75.6		29.8	43.0	95.9	74.8	74.8	75.6	67.5	58.9	40.0	75.6	74.8	41.1	88.6	55.6	39.2	32.5	39.0
4. PmALF1	64.2	44.7	47.5		68.3	30.9	32.0	32.0	31.1	30.1	28.2	28.1	33.3	31.7	28.2	30.9	31.5	23.4	21.3	18.7
5. PmALF2	92.5	65.0	66.7	68.3		43.9	47.2	47.2	46.3	48.0	41.9	45.5	49.6	47.2	45.2	43.9	45.2	38.4	35.2	30.9
6. PmALF3	65.9	78.0	95.9	48.8	68.3		77.2	75.6	78.0	66.7	58.9	39.8	78.0	78.0	38.7	91.9	56.5	40.8	31.2	38.1
7. LvALFAV-R	64.8	75.6	89.3	45.1	67.2	91.9		98.4	99.2	63.4	57.3	40.7	93.5	91.9	38.7	79.7	55.6	39.5	32.0	36.3
8. LvALFAA-K	63.9	74.8	91.0	44.3	66.4	91.1	99.2		97.5	62.6	56.5	41.5	92.7	90.2	38.7	78.0	54.8	37.9	32.0	35.5
9. LvALFVV-R	63.9	76.4	90.2	44.3	66.4	92.7	99.2	98.4		64.2	58.1	41.5	92.7	91.1	37.9	80.5	56.5	40.3	32.0	35.5
10. HaALF1	62.6	73.2	80.5	43.9	65.9	82.1	81.3	82.1	82.1		62.9	46.3	63.4	61.8	40.3	65.9	58.1	40.8	36.0	41.9
11. HaALF2	62.1	73.4	74.2	42.7	65.3	75.0	71.8	71.8	72.6	79.0		42.7	54.8	58.9	40.8	59.7	47.2	42.4	31.0	41.1
12. PIALF	70.8	58.5	63.3	47.5	70.8	63.4	58.2	59.8	59.0	63.4	61.3		40.7	41.5	49.2	43.9	37.1	34.4	32.8	30.1
13. LscALF	66.7	75.6	91.1	47.2	68.3	94.3	95.9	95.1	95.1	80.5	71.8	61.8		91.1	38.7	78.9	55.6	38.4	33.6	34.7
14. FpALF1	65.0	75.6	90.2	46.3	66.7	93.5	95.9	95.1	95.1	79.7	73.4	59.3	95.9		37.9	79.7	54.8	40.8	30.4	37.9
15. SpALF	65.9	61.8	65.0	47.2	69.1	65.9	66.7	66.7	65.9	61.8	62.1	65.9	66.7	64.2		41.1	37.6	38.3	31.2	32.3
16. FcALF	63.4	77.2	94.3	48.0	66.7	97.6	90.2	89.4	91.1	80.5	74.2	62.6	92.7	90.2	66.7		59.7	40.8	30.4	42.9
17. MoALF	60.5	75.8	76.6	44.4	64.5	79.8	74.2	74.2	75.0	79.8	71.0	62.1	75.8	76.6	64.5	79.8		38.1	32.8	39.7
18. LstALF	63.7	66.9	63.7	45.2	66.9	66.1	63.7	62.9	64.5	63.7	66.9	58.1	62.9	64.5	55.6	64.5	64.5		29.1	44.0
19. TtALF	50.0	53.7	53.4	36.9	53.3	51.2	51.6	51.6	51.6	52.8	51.6	50.8	51.2	51.2	48.0	50.4	53.2	49.2		24.6
20. EsALF	52.5	62.6	65.8	37.5	55.8	63.4	60.7	59.8	59.8	65.9	60.5	51.7	61.0	61.8	56.1	61.0	62.9	61.3	48.3	

Upper triangle: identity, lower triangle: similarity

```

AGTCAGCGGCGGAGAAGCACTCAGGCAGCATCGCATACGGACATATCCTTGGCTTCAGGAGGACTCAAGA 70
GGATGCGTTTTCTGGTCGGTTTTCTGGTGGCACTCAGCCTGATTGCACTTGCCCCGAATGCACTGGGCA 140
M R F L V G F L V A L S L I A L V P Q C T G Q
GGGAGTGCAGGACTTGATTCCCGCACTTGTCCAAAGGATCGTTGGGTTGTGGCACTCGGATGAAGTGGAG 210
G V Q D L I P A L V Q R I V G L W H S D E V E
TTCATGGGGCACAGCTGCAGGTACAGCCAACGCCAACCTTCTACAGGTGGGAGCTGTACTTCCGGGGCA 280
F M G H S C R Y S Q R P T F Y R W E L Y F R G
GTATGTGGTGGCCAGGTTGGGCTCCTTTCACCGGCAGATCTATGACCCGCAGCCCCTCCGGCGCCGTAGA 350
S M W C P G W A P F T G R S M T R S P S G A V E
GCACGCAACGAGGGACTTCGTGGAAAAAGCCCTGCAAAGAAACCTTATCACCGAGGATGATGCAAGGATC 420
H A T R D F V E K A L Q R N L I T E D D A R I
TGGCTGGAAGATTGAATCCTCTGAGAGAGTGTATGTGGAATTCAGTCTCTAAGGGGATTCATTCAGCA 490
W L E D *
CCGGGTGTTTGTGTTTACGCAGCACAATAAAGAAATTTATCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 558

```

Figure 13. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of MjALF2 from *Marsupenaeus japonicus*. Shaded letters indicate the start site and the asterisk represents the stop codon. The putative sequence of signal peptide is boxed. The two cysteine residues involved in the formation of the disulfide loop are underlined with double lines. The poly-adenylation signal sequence is underlined with a single line.

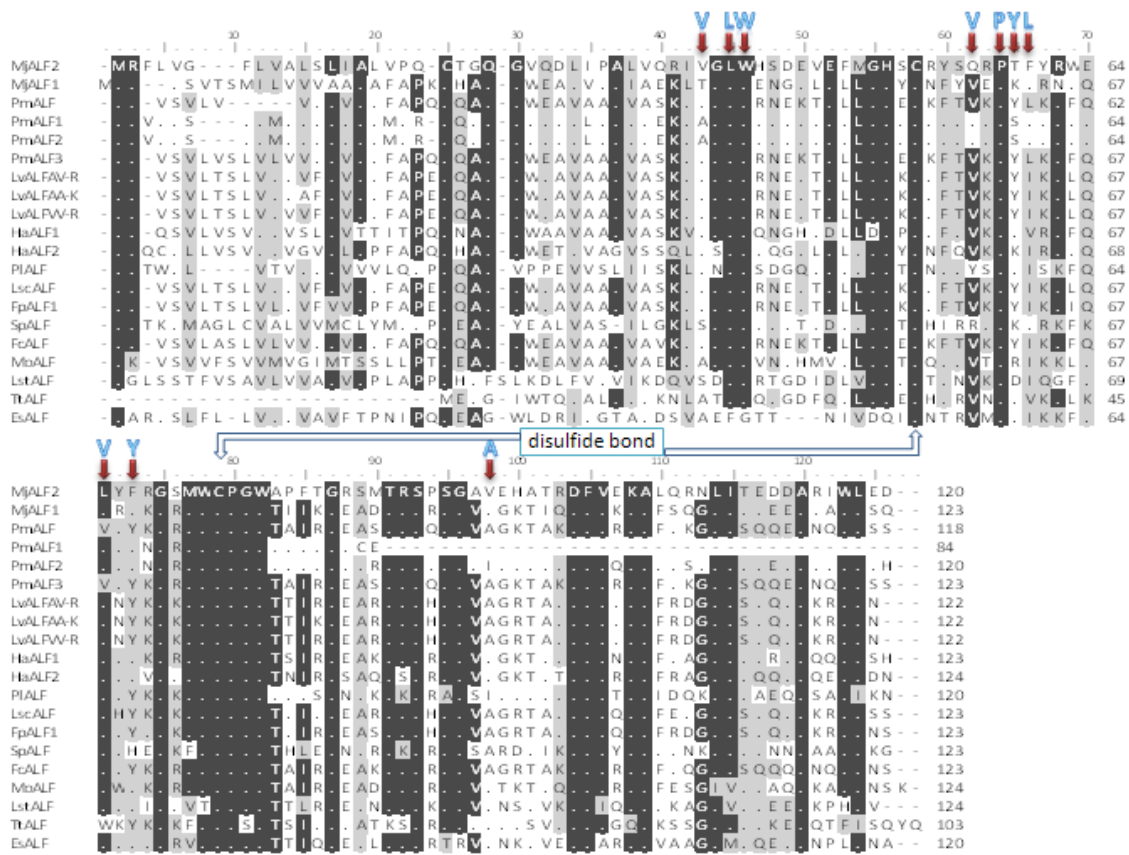


Figure 14. Multiple alignment of amino acid sequences of MjALF2 from *Marsupenaeus japonicus* with those of other ALFs from *M. japonicus* (MjALF1), *Penaeus monodon* (PmALF, PmALF1, PmALF2, PmALF3), *Litopenaeus vannamei* (LvALFAV-R, LvALFAA-K, LvALFVV-R), *Homarus americanus* (HaALF1, HaALF2), *Pacifastacus leniusculus* (PIALF), *L. schmitti* (LscALF), *Farfantepenaeus paulensis* (FpALF1), *Scylla paramamosain* (SpALF), *Fenneropenaeus chinensis* (FcALF), *Macrobrachium olfersii* (MoALF), *L. stylirostris* (LstALF), *Tachypleus tridentatus* (ALFTt) and *Eriocheir sinensis* (EsALF). The accession numbers of ALF genes from different species in GenBank are as follows: MjALF2 (AB453738), MjALF1 (BAE92940), PmALF (ACC86067), PmALF1 (ABP73290), PmALF2 (ABP73291), PmALF3 (ABP73289), LvALFAV-R (ABB22832), LvALFAA-K (ABB22833), LvALFVV-R (ABB22831), HaALF1 (ACC94268), HaALF2 (ACC94269), PIALF (ABQ12866), LscALF (ABJ90465), FpALF1 (ABQ96193), SpALF (ABP96981), FcALF (AAX63831), MoALF (ABY20736), LstALF (IAAY33769), ALFTt (AAK00651) and EsALF (ABG82027). Identical or highly conserved residues are shaded in black, while similar residues are shaded in grey. Blue letters show amino acid residue of PmALF3 gene related to binding with LPS.

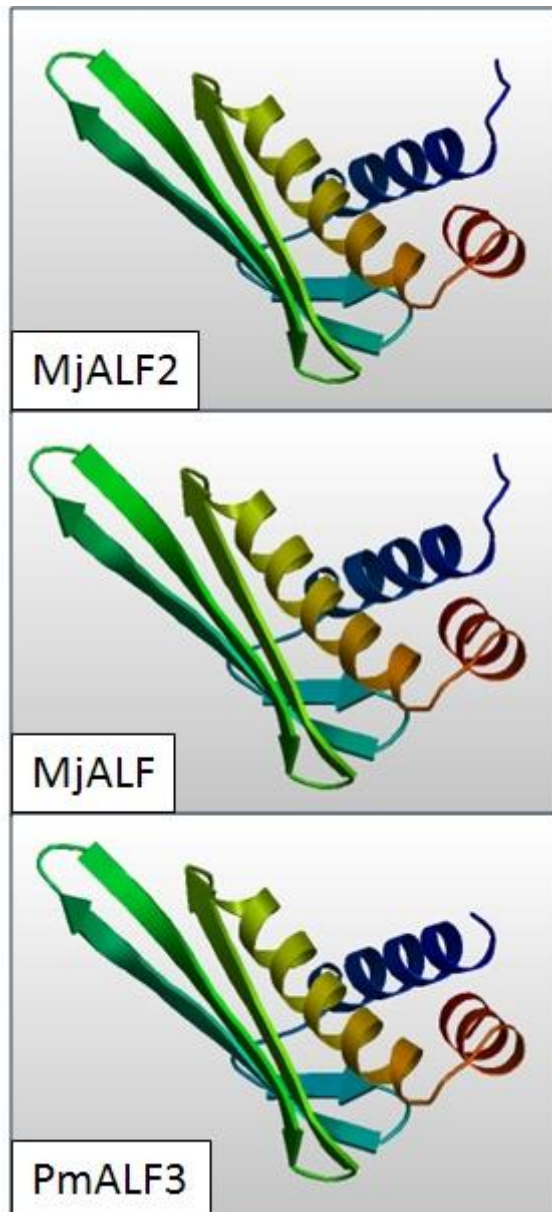


Figure 15. Protein 3D structure prediction of MjALF2, MjALF and PmALF3
 α -helix and β -sheets are indicated by ribbons and arrows, respectively.

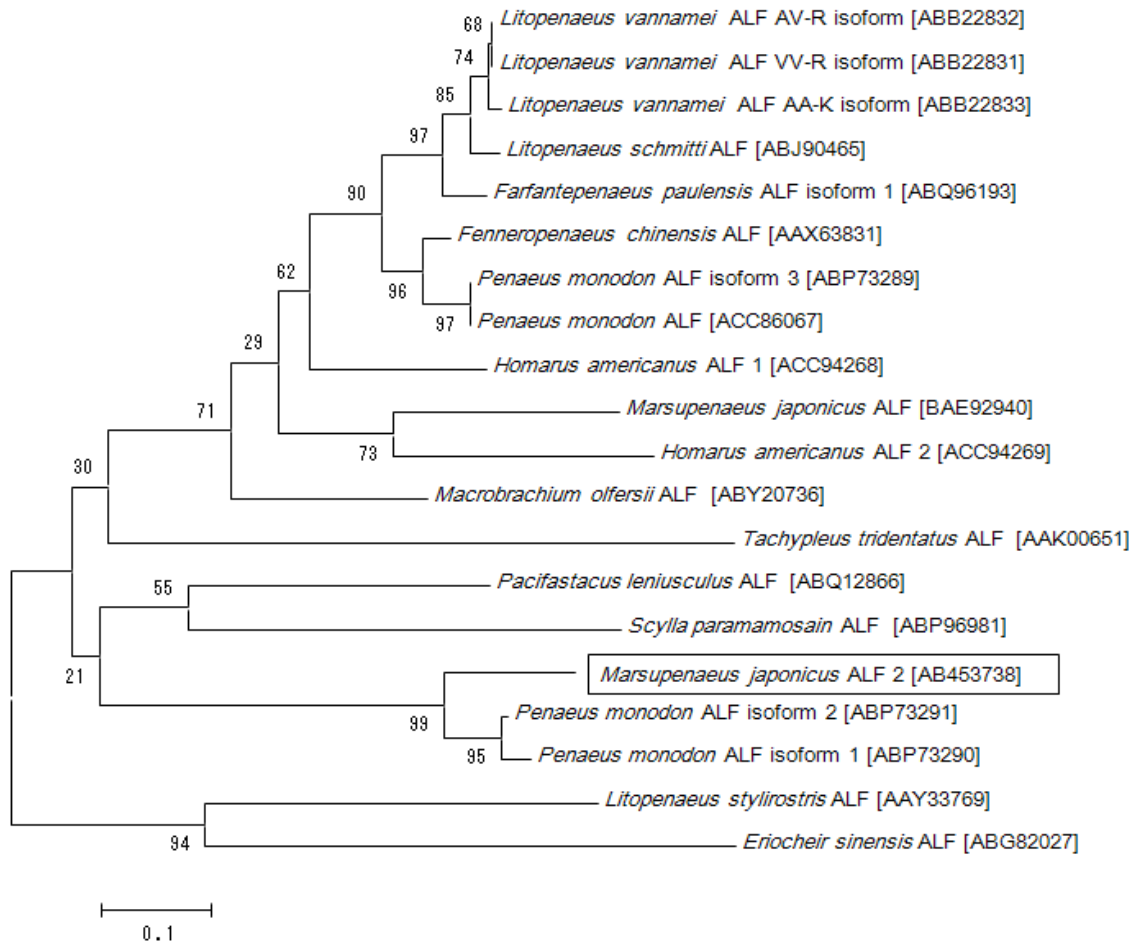


Figure 16. A boot-strapped neighbor-joining tree summarized relationships of the known ALFs from various organisms. The scale bar indicates a branch length of 0.1. Amino acid sequences are obtained from the GenBank.

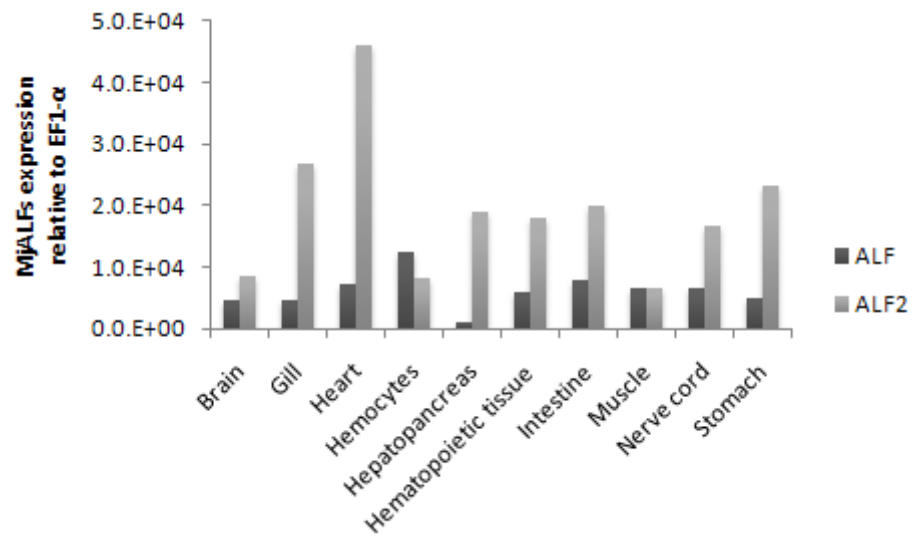


Figure 17. Transcriptional analysis of MjALF and MjALF2 genes in various tissues of healthy kuruma shrimp. Semi-quantitative RT-PCR was performed using primers specific for MjALF, MjALF2 and EF1- α .

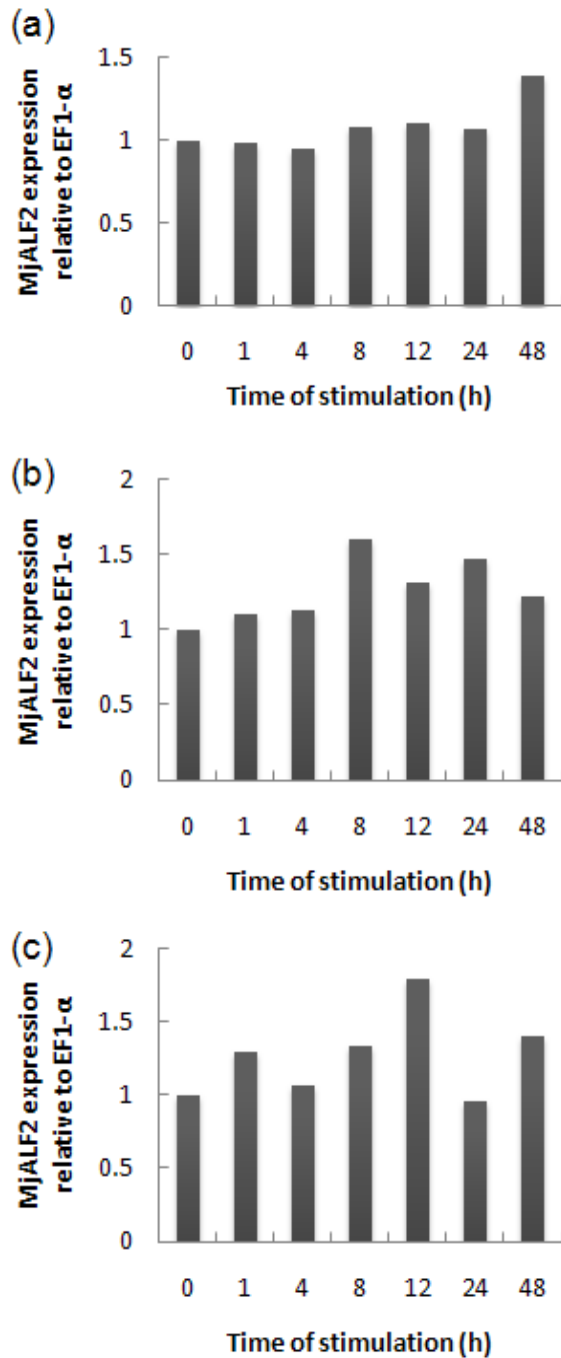


Figure 18. Transcriptional analysis of MjALF2 gene in lymphoid organ on *in vitro* immunostimulation with LPS at different time intervals (0, 1, 4, 8, 12, 24 and 48 h). Semi-quantitative RT-PCR for MjALF2 gene was performed with cDNA obtained from lymphoid organ cells stimulated with lipopolysaccharide, LPS (a) 1 µg/ml (b) 10 µg/ml and (c) 100 µg/ml prior to isolation of the total RNA. Data are presented as MjALF2 PCR products after normalizing against EF1-α products.

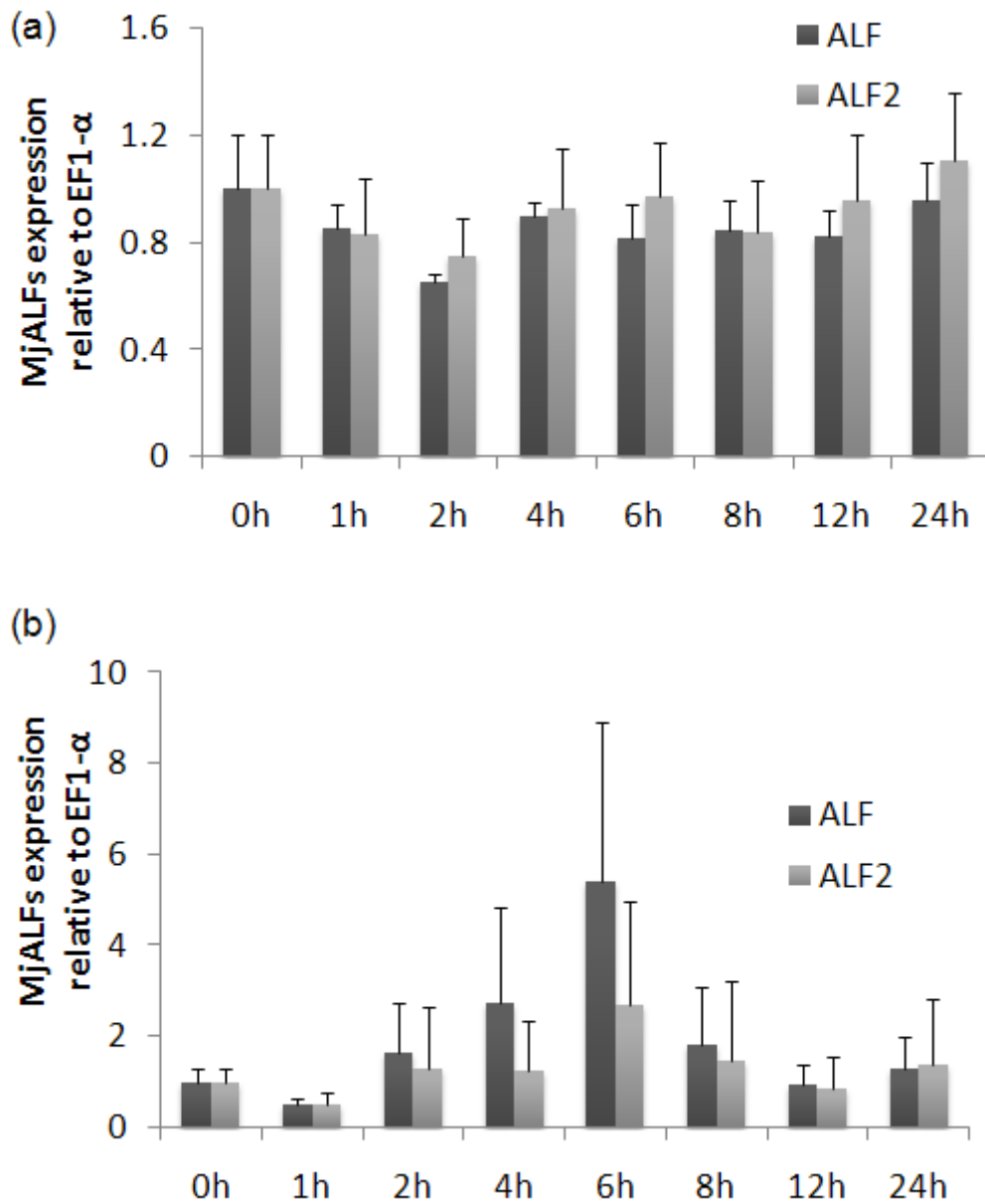


Figure 19. Transcriptional analysis of MjALF and MjALF2 genes in lymphoid organ on *in vivo* immunostimulation with *V. penaeicida* and LPS at different time intervals (0, 1, 4, 6, 8, 12 and 24h). Semi-quantitative RT-PCR was performed with cDNA obtained from lymphoid organ tissue followed by *V. penaeicida* and LPS injection. (a) live *V. penaeicida* injection, (b) LPS injection

第4章 Toll 受容体のノックダウン時における Toll シグナル伝達経路関連因子および抗菌ペプチドの発現動態の解析

第1節 目的

クルマエビの生体防御能の指標として、総血球数測定、貪食活性、リゾチーム活性、プロフェノール酸化酵素（ProPO）活性および抗酸化酵素（SOD）活性測定などがあり、プロバイオティクスや免疫賦活剤の評価などに用いられている。しかし、クルマエビの脱皮、成熟などの生理活性がこれらの評価法に影響するため、安定した生体防御能の測定は困難である。また、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子応答の解析も試みられているが、不明因子も多く、再現性や検出感度の点からも基盤的研究の詳細な検討が必要である。

無脊椎動物の中でも昆虫類であるショウジョウバエやカイコなどにおいて、異物に対する免疫応答はよく研究されており、Toll 受容体やIMD シグナル伝達経路による細菌の構成成分の認識機構が数多く報告されている[24]。さらに、微生物の感染により最も迅速に活性化されるフェノール酸化酵素系も Toll やIMD 経路に関わっていることが報告されている[87-89]。哺乳類においては Toll 受容体のアンタゴニストの開発やバイオマーカーとしての検討も行われている[90]。

近年、エビ類においても多くの自然免疫関連因子の同定が報告されている。これまでに、異物認識機構関連因子として、Toll受容体[38-40, 91]、Serpin [92]、Snake（セリンプロテアーゼ）[93, 94]、Spätzle [95]、MAPK、ECSIT、TRAF6、

Cactin、IMD [96]、Akirin、Relish[97, 98]、LGBP[99, 100]および JNK、サイトカインとして TNF、サイトカインシグナル伝達経路に関わる因子として、STAT[101]などが分離されている。また、抗菌ペプチドとして ALF[70-72, 102, 103]、Penaeidin[84, 104-106]、Crustin[107-109]および lysozyme[110-112]などが分離されている。これらの抗菌ペプチドは、アイソフォームを持ち、多様な異物に対して働いていると考えられる。また、細菌やウイルスに対する防除効果も報告されており、分子基盤での活性化機構を解明することで疾病防除に対する有効な知見が得られると考えられる。

しかし、これらの因子に関する研究は構造や発現解析に留まっており、詳細な相互作用やネットワーク経路などは分かっておらず、各因子に対するターゲットとなる病原体や異物の特定には至っていない。

そこで、これらの遺伝子の RNA 干渉法によるノックダウンや網羅的な発現定量解析などによるシグナル伝達経路や相互ネットワークの解明はクルマエビの免疫機構を把握するためにも重要である。また、これまで有効とされてきた免疫賦活剤等に対する免疫応答システムや非特異的生体防御能の向上などの機構解明にも重要な鍵になる。さらに、各免疫系に対する標的因子の特定やバイオマーカーの探索、選抜育種の評価などが可能になると考えられる。

近年では、エビ類においても RNA 干渉法による遺伝子の機能解析に関する研究が報告されている[113, 114]。RNA 干渉法とは、相補的な二本鎖 RNA により、細胞や生体内の特異的な標的 mRNA を分解することにより、タンパク質の発現を抑制できる方法である。

当初、植物においてウイルス由来 RNA を分解の特異的標的とすることにより RNA ウイルスの感染に応答することが発見され[115-117]、転写後遺伝子

サイレンシングあるいは ウイルス誘発性遺伝子サイレンシングと提唱された[118, 119]。その後、RNA 干渉は、線虫[120]、ゼブラフィッシュ[121]、真菌[122]、ショウジョウバエ[123]、マウス[124]など様々な生物で報告されている。

RNA 干渉のメカニズムは、複数の段階から構成されている (Figure 20)。まず、二本鎖 RNA は Dicer (二本鎖 RNA 分解酵素) によって認識され、21~23 塩基対の siRNA (small interfering RNA) に分解される。次に、siRNA は RISC (RNA 干渉標的複合体) に組み込まれる。この RISC によって、組み込まれた siRNA に相同的な mRNA が破壊される。標的 mRNA は、siRNA に相補的な領域の中央で切断され、最終的に標的 mRNA が分解され、タンパク発現量が低下する。

本章では、昆虫類でのパターン認識による自然免疫応答のシグナル伝達経路を基盤とし、RNA 干渉法による Toll 受容体ノックダウン後の Toll 受容体シグナル伝達経路関連因子やこれらの因子によって誘導される抗菌ペプチド等の発現解析により、Toll 受容体と各因子の関連性の解明を目的とした。

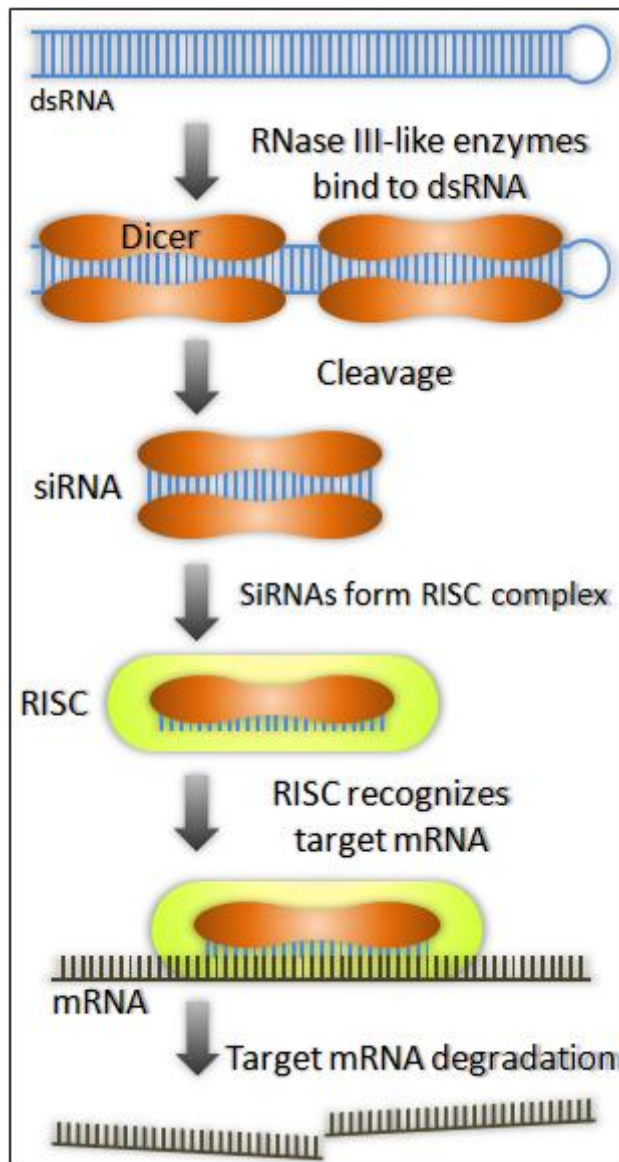


Figure 20. The mechanism of RNA interference

第2節 材料および方法

1. クルマエビにおける RNA 干渉法による Toll 受容体のノックダウン

第1章において、クルマエビからの2タイプの Toll 受容体 (MjToll および MjToll2) 遺伝子の分離を行った、これらの Toll 受容体は細胞内の Toll/インターロイキン-1 受容体 (TIR) ドメインの相同性が高く、非常に類似した構造を持つため、この領域で dsRNA を設計すると非特異的反応が起こる可能性が高いことが予測される。そこで、細胞外ドメインであるロイシンリッチリピートドメイン (LRR) をターゲットとし、それぞれの Toll 受容体に対し2本鎖 RNA (dsRNA) の作製を行った。

1.1. dsRNA 作製用の鋳型となるプラスミド DNA の作製

高純度の dsRNA を作製するためには、非特異的な遺伝子増幅産物の混入をできる限り避ける必要がある。そこで、dsRNA を作製するための鋳型には、クルマエビ由来の cDNA ではなく、目的の遺伝子を挿入したプラスミド DNA を鋳型として用いた。そこで、MjToll および MjToll2 の全長をクローニングおよびプラスミドの精製を第1章セクション 3.と同様の方法により行った。MjToll および MjToll2 の遺伝子の全長遺伝子配列を増幅するためのプライマーは Table 31 に示した。

1.2. dsRNA 作製用プライマーの設計および PCR による遺伝子増幅

MjToll および MjToll2 遺伝子のアライメントから相同性の低い領域を検索し、標的とする領域を決定後、dsRNA 作製用プライマーの設計を行った (Table 32)。設計したプライマーを用い、セクション 1.1.で作製したプラスミドを鋳型とし、PCR により MjToll および MjToll2 の dsRNA 作製用標的領域の遺伝子

増幅を行った。MjTolldsF/T7-MjTolldsR、T7-MjTolldsF/MjTolldsR、MjToll2dsF/T7-MjToll2dsR および T7-MjToll2dsF/ MjToll2dsR のプライマーセットで GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) を用い (Table 33)、サーマルサイクラー (BIO RAD, Mycycler) により、95 °C で 5 分間のプレヒート後、95 °C で 30 秒間の熱変性、55 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 1 分間の伸長反応を 45 サイクルの反応条件で PCR を行った。反応終了後、1.5 % アガロースゲルによる電気泳動を行い、増幅遺伝子の確認を行った。

1.3. dsRNA 作製用 PCR 産物の精製

PCR 産物を illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) を用い、マニュアルに従い精製を行なった。1.5 ml の滅菌チューブに 100 µl の PCR 産物および 500 µl の Capture buffer type 2 を加えよく混和し、GFX MicroSin column に混合液を全量アプライし、16,000 × g で 30 秒間遠心し、フロースルー液を廃棄した。GFX MicroSin column に 500 µl の Wash buffer type 1 を添加後、16,000 × g で 30 秒間遠心し、フロースルー液を廃棄した。GFX MicroSin column を新しい 1.5 ml エッペンチューブにセットし、Elution buffer type 4 をカラムの中央にアプライし、室温で 1 分間静置した後、16,000 × g で 30 秒間遠心操作し、DNA の溶出を行った。精製した産物は NanoDrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific USA) により濃度の測定を行った。

1.4. MjToll および MjToll2 の dsRNA の合成

精製した PCR 産物を用い、T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega, USA) によりマニュアルに従って dsRNA の合成を行った。RiboMAX™ Express T7 2X Buffer は沈殿が溶解するまで 37 °C で加温した。1 本鎖 RNA (ssRNA)

合成反応溶液を室温で調整し (Table 34)、37 °C で 2 ~ 6 時間反応を行った。合成した ssRNA を混合し、70 °C で 10 分間加温した後、20 分間かけて室温まで冷まし ssRNA をアニーリングさせることで dsRNA を作製した。dsRNA に Nuclease-Free Water により 200 倍に希釈した RNase Solution を 1µl および RQ1 RNase-Free DNase を 1µl それぞれ添加し、37 °C で 30 分間 RNase および DNase 処理を行った。処理後、3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 0.4 µl およびイソプロパノールを 40 µl を添加した後、良く混和させ、15,000 rpm で 10 分間遠心操作を行った。上清を丁寧に除き、0.5 ml の冷 70 % エタノールを加え沈殿を洗浄し、15,000 rpm で 30 秒間遠心操作を行った。その後、エタノールを丁寧に除き、沈殿を 15 分間風乾した。80 µl の Nuclease-Free Water に沈殿を溶解させた。

2. dsRNA による遺伝子ノックダウンの最適条件の検討

14 尾のクルマエビに MjToll dsRNA 5 µg/g shrimp を接種し、1、2、3、4、6、8 および 10 日後に 2 尾ずつ血リンパを採取し、第 2 章 3. と同様の方法で totalRNA の抽出および cDNA の合成を行なった。各 cDNA を鋳型として MjToll 遺伝子および EF1- α 遺伝子のプライマーを用い PCR による発現解析を行った。PCR はセクション 1.2. と同様の方法で、プライマーは MjToll full 1stF/MjToll full 1stR (Table 31) および EF1-a exF/ EF1-a exR (Table 29) を用いた。

さらに、Mj Toll dsRNA のノックダウン最適条件と同様の条件下で、クルマエビに MjToll2 dsRNA の接種を行い、同様に発現解析を行った。

3. MjToll および MjToll2 遺伝子ノックダウン後の免疫関連因子の発現解析

3.1. クルマエビ免疫関連因子の発現解析用プライマー設計

クルマエビの免疫関連因子の発現解析は、ProPO、LGBP、Snake、Serpine、TRAF6、ECSIT、Cactin、Spätzle および CP、抗菌ペプチドとして ALF、ALF2、Crustin、Penaeidin および lysozyme を標的とした。それぞれの遺伝子の発現解析用プライマーは Table 35 に示した。

3.2. SYBR Green リアルタイム PCR による発現解析

MjToll および MjToll2 をノックダウンしたクルマエビの血リンパより作製した cDNA を鋳型として免疫関連遺伝子および EF1- α 遺伝子の発現解析用プライマーを用い、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムによる SYBR Green リアルタイム PCR 発現定量解析を行った。コントロールには PBS を接種したクルマエビの血リンパより作製した cDNA を用いた。SYBR Green リアルタイム PCR は THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO, Japan) を用い、反応溶液 (Table 36) を作製し、95 °C で 30 秒間のプレヒート後、95 °C で 5 秒間の熱変性、55 °C で 20 秒間のアニーリング、60 °C で 40 秒間の伸長反応を 45 サイクル行った。

第3節 結果

4. MjToll および MjToll2 の dsRNA の作製

dsRNA 作製用プライマーによる PCR の結果、約 400 bp 付近に目的のサイズの MjToll および MjToll2 のバンドが認められた。また、これらの PCR 産物を基に合成した dsRNA のバンドも約 400 bp 付近に認められた (Figure 21)。

5. dsRNA による遺伝子ノックダウンの最適条件の検討

MjToll dsRNA を接種したクルマエビの血リンパでの MjToll の発現解析の結果、接種後 2 日目では 1 尾、接種後 3 日目では 2 尾で発現が認められなかった。接種後 4 日目の 1 尾には低い発現が認められたが、それ以降は高い発現が確認された (Figure 22)。この結果より、MjToll dsRNA 5 µg/g shrimp での接種では 3 日目に最もノックダウン効果が高いことが示唆された。

そこで、MjToll2 dsRNA を同様の濃度でクルマエビに接種し、3 日目に発現解析を行ったところ、MjToll2 dsRNA を接種した全てのクルマエビで MjToll2 の発現抑制が認められた (Figure 23)。

また、MjToll および MjToll2 dsRNA の接種によるクルマエビの死亡は認められなかった。

6. MjToll および MjToll2 遺伝子ノックダウン後の免疫関連因子の発現解析

MjToll をノックダウンした cDNA を用いて解析を行った結果、PBS を接種したクルマエビと比べ、ProPO で 73 倍および LGBP で 70 倍の高い発現上昇が認められ、lysozyme で 10 %、CP および Spätzle で 0.1 % 以下の発現が認められた。また、ALF2、Crustin、Penaeidin および TRAF6 においては 3.1 ~ 5.6 倍の発現上昇が認められ、ECSIT、Cactin および ALF は 50 % 以下の発現量で

あった。

一方、MjToll2 をノックダウンした cDNA を用いて解析を行った結果、PBS を接種したクルマエビと比べ、ProPO で 168 倍および ALF2 で 510 倍の発現上昇が認められ、lysozyme および CP で 10 % 以下、Spätzle で 0.1 % 以下の発現が認められた。また、LGBP、Crustin、Penaedin、Snake および Serpin においては 1.4 ~ 5.9 倍の発現上昇が認められ、TRAF6、ECSIT、Cactin および ALF は 50 % 以下の発現量であった。

第4節 考察

本章では、RNA 干渉法によるクルマエビの MjToll および MJToll2 遺伝子のノックダウンを行い、様々な免疫関連因子の発現解析を行った。

MjToll dsRNA におけるノックダウンの最適条件の検討により、MjToll および MjToll2 の効果的な遺伝子の発現抑制が認められた。*L. vannamei* では Toll 遺伝子 dsRNA を 1 $\mu\text{g/g}$ shrimp 濃度で接種し、接種後 1 日目からノックダウン効果が認められ 3 日目および 7 日目までノックダウン効果の持続が認められている[113]。また、ウシエビでは PPAE dsRNA を 2.5 $\mu\text{g/g}$ shrimp で接種し、2 日目に発現抑制が認められている[114]。本研究では MjToll 遺伝子 dsRNA を 5 $\mu\text{g/g}$ shrimp 濃度で接種し、接種後 2 日目からノックダウン効果が認められ 4 日目までノックダウン効果の持続が認められた。このように、dsRNA の接種濃度や dsRNA の標的遺伝子配列の違いにより、ノックダウン効果も異なってくるが、エビ類における dsRNA による遺伝子ノックダウンは効果的に働くため、今後の遺伝子の機能解析において非常に有効な手法である。

MjToll および MjToll2 をノックダウンした cDNA では、いずれにおいても ProPO の高い発現が、MjToll ノックダウンでは LGBP の高い発現上昇が認められた。ザリガニの LGBP やカイコの PGRP は血リンパにおいて ProPO を活性化することが知られている[125, 126]。この ProPO カスケードはメラニン合成のみに働くのではなく、真菌や細菌を非自己として認識し、その認識シグナルを増幅し、生体防御機構を活性化する[127, 128]。MjToll のノックダウンにより ProPO や LGBP の発現が上昇したのは、Toll シグナル伝達経路が異物認識機構として機能しなくなったために、ProPO カスケードが生体防御能を補完しようとして活性化したことが要因である可能性が考えられる。今後、

Toll 経路と PO 活性の関連性について検討することで、より詳細な異物認識機構の解明が期待される。

ショウジョウバエにおける Toll 経路の研究において、Spätzle はセリンプロテアーゼにより分解されて結合型となり、Toll 受容体と結合することでシグナル経路を活性化することが報告されている[129]。このように、Spätzle は Toll 経路の活性化に必須の分子である[130]。MjToll および MjToll2 のノックダウンはいずれも Spätzle の顕著な発現抑制が認められた。ネッタイシマカにおいても Toll5A 遺伝子のノックダウンにより Spätzle A の mRNA の発現量の減少が認められている[131]。このように、Toll 受容体によって、Spätzle の発現が制御されている可能性が考えられる。

また、Toll 経路の構成因子である ECSIT、TRAF6 および Cactin さらに抗菌ペプチドの MjALF においては、MjToll2 ノックダウン時に全遺伝子で発現が減少する傾向がみられ、MjToll ノックダウンにおいても TRAF6 を除いて発現の減少傾向がみられた。ショウジョウバエでは ECSIT は Toll 経路だけでなく BMP シグナル伝達経路にも関与していることが報告されている[132]。TRAF6 もまた、様々なシグナル伝達経路の制御を担っている[133]。このように、クルマエビにおいてこれらの各因子は Toll 経路に関与はしているものの、別のシグナル経路を制御している可能性が考えられる。

エビ類における血リンパ凝固反応は TGase の放出による CP の重合反応により引き起こされる[134]。TGase はウイルス感染時に活性能が減少し、血リンパ凝固能が低下することが報告されている[135, 136]。また、クルマエビに

対する細菌の接種時には一時的な TGase の発現上昇が認められている[137]。さらに、ショウジョウバエにおいては血リンパ凝集反応を引き起こす因子である Fondue が Toll 受容体経路により制御されていることが示唆されている[138]。ヒトにおいても、血小板で発現する TLR ファミリーが敗血症に合併した播種性血管内凝固症候群に関わっている可能性があることが報告されている[139, 140]。MjToll および MjToll2 のノックダウンでは、いずれも CP の顕著な発現抑制が認められた。このことから、Toll 受容体シグナル伝達経路により CP の発現や TGase の産生が制御されている可能性があることが示唆された。今後、Toll 受容体と血リンパ凝固作用との関連性の解明が更なる課題である。

MjToll2 ノックダウンにより MjALF2 の 100 倍以上の遺伝子発現が認められた。第 2 章において MjALF2 は LPS の刺激に対し、迅速に応答することが明らかとなっている。また、*L. vannamei* の ALF の組換えタンパク質は、抗真菌、抗細菌能を有しており生体防御機構において非常に重要な役割を果たしていることが報告されている[70]。MjToll2 ノックダウン時の MjALF2 の顕著な発現上昇は、MjToll2 経路の不活化により、MjALF2 が活性化し、免疫能を補完した可能性が考えられる。MjToll2 経路と MjALF2 の関連性のさらなる検討が必要である。

Crustin はウシエビや *L. vannamei* において *V. harveyi* 接種に対し、発現の上昇が認められている[141, 142]。さらに、*L. vannamei* において、IMD 異物認識経路の構成因子である IMD が Penaeidin の発現を調節していることやコウライエビにおいて IMD 経路の Relish のノックダウンにより Penaeidin の発現が

減少することが報告されている[96, 97]。このように、Penaeidin 産生には IMD 経路が関与していると考えられる。抗菌ペプチドである Crustin および Penaeidin は MjToll および MjToll2 ノックダウン時にいずれも発現が上昇していた。この原因については明らかではないが、いずれかの Toll 遺伝子をノックダウンした場合に、この経路の欠落を補完するために別の経路が活性化した結果、これらの抗菌ペプチドの発現が上昇した可能性が考えられる。

lysozyme はエビ類においておもにグラム陽性菌に対して溶菌作用を示し [143, 144]、昆虫類では Toll シグナル経路により活性化されることが報告されている[145]。MjToll および MjToll2 のノックダウンにより抗菌ペプチドである lysozyme の顕著な発現抑制が認められた。このように、クルマエビにおいても lysozyme が Toll 受容体を介したシグナル伝達経路により発現が制御されている可能性が高いことが示唆された。

Table 31. Primers used for full length cloning of MjToll and MjToll2

Primer	sequence (5'–3')
MjToll full 1stF	TCGGTACCGTTCATCAACAA
MjToll full 1stR	TTCCATTAGGTTCTCTTTCAGGA
MjToll full 2ndF	ATGAAGCCTTTATGGATCCTCC
MjToll full 2ndR	CTCTCCTTTGAATCTGATTTGAC
MjToll2 full 1stF	GCATCAAGAGTCGCTGTCAA
MjToll2 full 1stR	TCCAGCTACTCATGCACACA
MjToll2 full 2ndF	CGAGACGAGTTCGTGGAAAT
MjToll2 full 2ndR	CTCTTGCGAGAAACCAGGTC

Table 32. Primers used for dsRNA construction

Primer	sequence (5'–3')
MjTolldsF	CCCATCCTTCTGCCACCTAA
MjTolldsR	ATGACCCCAGACATTCTCTATGAA
T7-MjTolldsF	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCC CATCCTTCTGCCACCTAA
T7-MjTolldsR	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATG ACCCAGACATTCTCTATGAA
MjToll2dsF	CTGTTCTTTTAAAGGCATGAAGG
MjToll2dsR	TTGGTCCAGTACCTTCCTTTCAG
T7-MjToll2dsF	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCT GTTCTTTTAAAGGCATGAAGG
T7-MjToll2dsR	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTG GTCCAGTACCTTCCTTTCAG

Table 33. Reaction mixture for PCR

2x GoTaq® Green Master Mix	50 µl
upstream primer, 10µM	10 µl
downstream primer, 10µM	10 µl
plasmid DNA (50 ng)	5 µl
Nuclease-Free Water	25 µl
<hr/>	
Total	100 µl

Table 34. Reaction mixture for ssRNA synthesis

RiboMAX™ Express T7 2X Buffer	10 µl
Enzyme Mix, T7 Express	2 µl
DNA template (200 µg)	5 µl
Nuclease-Free Water	3 µl
<hr/>	
Total	20 µl

Table 35. Primers used for expression analysis of shrimp immune related genes

Primer	sequence (5'-3')
ProPO exF	GGGAGTTCGTGGACATCACT
ProPO exR	CTGGAACAAGTCATCCACGA
LGBP exF	AACCAGTACGGAGGAACGAC
LGBP exR	CGTTCCAGAAGTCGAGGAAG
Snake exF	CATCATCAAGCTGCAAGGAA
Snake exR	CGCACAGCTGTTTGTTCGATGATGT
Serpin exF	TGTCGACGTAAAGTTGCCCAAG
Serpin exR	GACGAAAGCTTTGTGGATGA
TRAF6 exF	ATGAGTGAGAGCAGCAGTCGTTG
TRAF6 exR	GCTCCACACATTTACATGG
ECSIT exF	GTCCGCAAATATGGCAGAAT
ECSIT exR	GGAGGCCTAGCTTCAGCTCT
Cactin exF	CCCACCCAAGATTGTACAGGGTTA
Cactin exR	GCCGTGAACTTGAGGATAGCAAAG
Spätzle exF	AGAACACCGAGGGTAAATGG
Spätzle exR	ACGAGGAAGCGGTGGTAGAT
Clott exF	AGACTGAAGCCCATGTCGT
Clott exR	ATCGCCGAGTTACAGGGCCA
ALF exF	GTCAGTAACGAGCATGATCC
ALF exR	GAGCATCTGATACCACGACC
ALF2 exF	AAGGATCGTTGGGTTGTGG
ALF2 exR	CCAGATCCTTGCATATCCT
Crustin exF	GACTGCAGGTACTGGTGCAAGA
Crustin exR	CCTGCTCCAACGACTACAAGTG
Penaeidin exF	CCCCACCTGTAGAGTCC
Penaeidin exR	GCATCACAACAACGTCC
Lysozyme exF	TCCTAATCTAGTCTGCAGGGA
Lysozyme exR	CTAGAATGGGTAGATGGAATTGGA
EF1-a exF	GTCTTCCCCTTCAGGACGTA
EF1-a exR	GAACTTGCAGGCAATGTGAG

Table 36. Reaction mixture for SYBR Green real time RT-PCR

THUNDERBIRDTMSYBR® qPCR Mix	10 µl
Forward Primer (3 pmol)	2.0 µl
Reverse Primer (3 pmol)	2.0 µl
50X ROX reference dye	0.4 µl
Template cDNA (100 ng)	2.0 µl
Nuclease-Free Water	3.6 µl
Total	20 µl

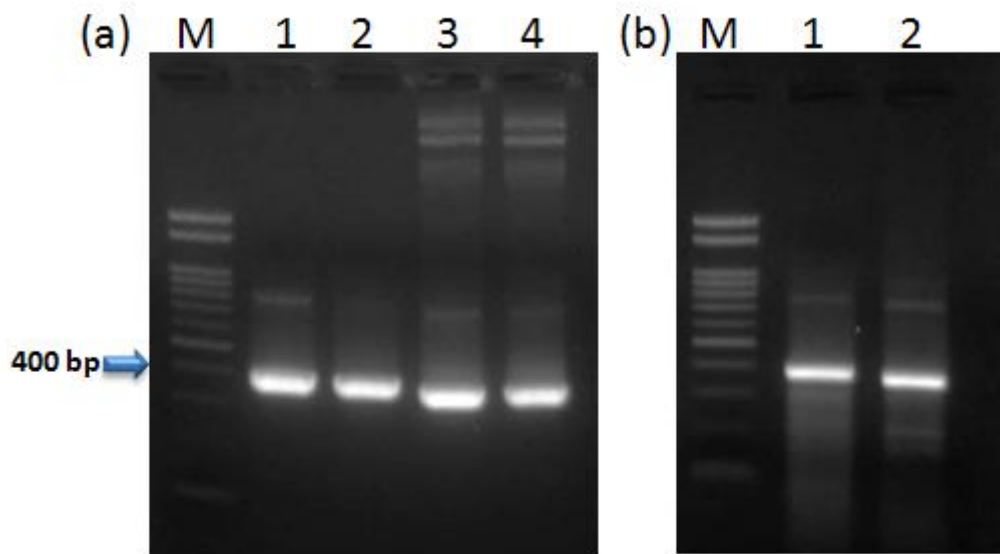


Figure 21. dsRNA construction of MjToll and MjToll2

(a) Confirmation of MjToll and MjToll2 PCR products for dsRNA construction

M ; Gene Ladder 100 (NIPPON GENE, Japan)

Lane1; MjTolldsF/T7-MjTolldsR, Lane 2; T7-MjTolldsF/MjTolldsR

Lane 3; MjToll2dsF/T7-MjToll2dsR, Lane 4; T7-MjToll2dsF/ MjToll2dsR

(b) Confirmation of MjToll and MjToll2 dsRNA

M ; Gene Ladder 100 (NIPPON GENE, Japan)

Lane1; MjToll dsRNA, Lane2; MjToll2 dsRNA

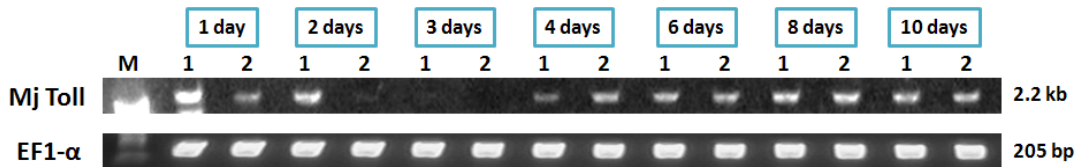


Figure 22. Evaluation of MjToll dsRNA effective period

M ; Gene Ladder 100 (NIPPON GENE, Japan) Blue boxes indicate lapsed days after MjToll dsRNA injection. The gene expression was confirmed using two individuals in each day.



Figure 23. Evaluation of MjToll2 dsRNA

PBS or MjToll2 dsRNA was injected into four kuruma shrimp and gene expression analysis was performed three days after dsRNA injection.

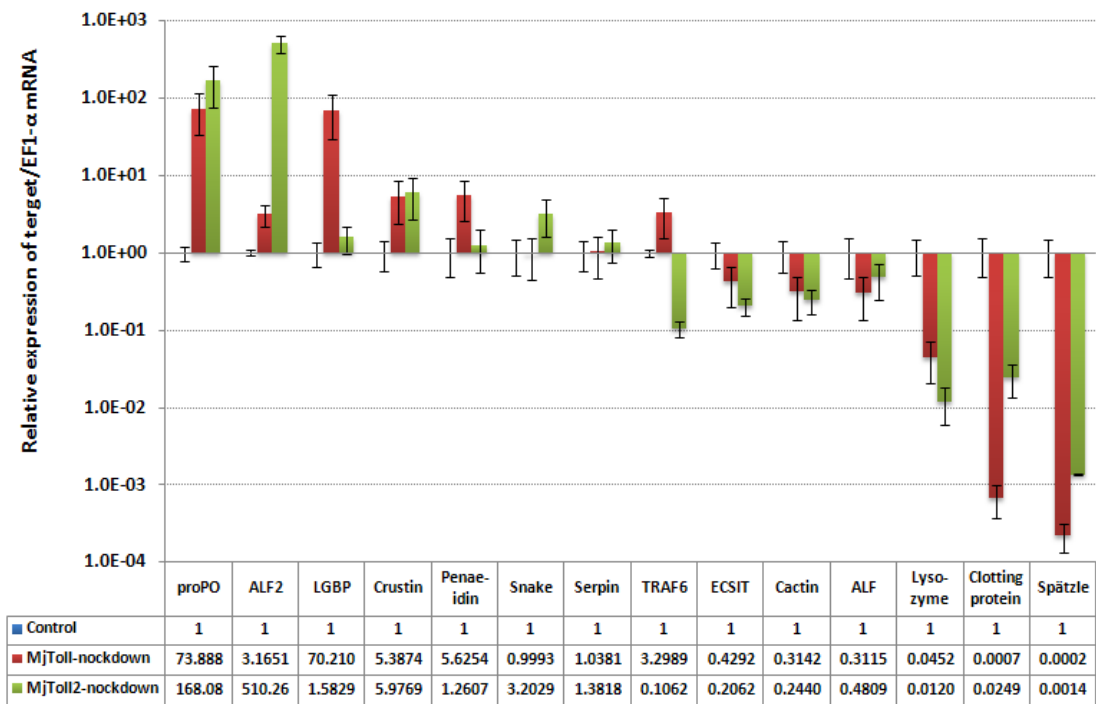


Figure 24. Expression analyses of immune related genes after PBS, MjToll and MjToll2 dsRNAs injection.

第5章 総合考察

ショウジョウバエでは、真菌やグラム陽性菌に感染すると PGRP ファミリーにより PG 認識され、Toll 受容体シグナル伝達経路の様々な因子が活性化し、核内へとシグナルが伝達され、抗真菌ペプチドの産生を誘導する[20]。

これまでにエビ類における Toll 受容体は、*L. vannamei*、コウライエビおよびウシエビにおいて分離されている[38-40]。しかし、クルマエビにおける Toll 受容体は認められていない。また、エビ類における複数の Toll 受容体の存在は明らかにされていない。エビ類の抗菌ペプチドとして、ALF[70-72, 102, 103]、Penaeidin[84, 104-106]、Crustin[107-109]および lysozyme[110-112]などが分離されている。ALF は、*L. vannamei* で 3 種[70]、ウシエビで 5 種[71-73]、クルマエビで 1 種[74]報告されており、遺伝子ファミリーを形成していると考えられる。

エビ類における Toll 受容体や抗菌ペプチドに関する研究は遺伝子構造や発現解析に留まっており、相互作用やシグナルネットワークなどは分かっておらず、またターゲットとなる病原体や異物の特定には至っていない。そこで本研究ではクルマエビの Toll 受容体および新規 ALF 遺伝子の同定を行うとともに、RNA 干渉法により Toll 受容体遺伝子をノックダウンし、Toll 受容体シグナル伝達経路関連因子および抗菌ペプチドの網羅的発現解析を行うことで、Toll 受容体とそれぞれの因子との関連性について解析した。さらに、クルマエビの生体防御関連因子として報告されている ProPO、LGBP および血リンパ凝固因子である CP の発現解析を行い、それぞれの遺伝子と Toll 受容体との関連性についても検討を行った。

第2章における Toll 受容体遺伝子の分離の結果、クルマエビから 2 つの Toll

受容体 (MjToll および MjToll2) 遺伝子が分離され、エビ類において複数の Toll 受容体遺伝子が存在し、ファミリーを形成していることが示唆された。ショウジョウバエでは 9 つの Toll 受容体遺伝子が報告されていることから [50]、エビ類においてもさらなる Toll 受容体遺伝子ファミリーが存在し、様々な異物に対応した生体防御機構を形成していると考えられる。相同性および系統解析より、MjToll はエビ類における新規の Toll ファミリーであり、MjToll2 はこれまでに分離されている *L. vannamei*、コウライエビおよびウシエビの Toll 受容体と同一、もしくは非常に類似したファミリーであることが明らかとなった。また、*in vitro* において PG で刺激したリンパ様器官培養細胞では、対照区と比べ、12 時間後に 76 倍の MjToll 遺伝子の発現量の上昇が認められ、MjToll はグラム陽性菌由来の PG に応答することが示唆された。コウライエビのリンパ様器官において Toll 受容体 (FcToll) 遺伝子は、グラム陰性菌である *V. anguillarum* の接種により、対照区と比べ、23 時間後に 10 倍の有意な発現量の上昇が認められている [39]。MjToll2 は FcToll と極めて高い相同性を示すため、MjToll2 のグラム陰性菌に対する免疫応答を解析する必要がある。

第 3 章ではクルマエビにおける新規抗菌ペプチドとして MjALF2 遺伝子を分離した。MjALF2 遺伝子は既報のウシエビ ALF アイソフォーム 2 (PmALF2) 遺伝子と非常に高い相同性を示した。また、*in vitro* および *in vivo* において LPS 刺激に対して MjALF2 遺伝子の発現上昇が認められた。PmALF2 遺伝子は血リンパにおいて *V. harveyi* 接種により、対照区と比べ、6 時間後に有意な発現量の上昇が認められている [72]。本研究では、*V. penaeicida* 接種に対して、リンパ様器官における MjALF2 遺伝子の顕著な発現量の変化は認められなかった。PmALF3 の組換えタンパク質は、多くのグラム陰性菌や真菌に対して

抗菌・抗真菌活性を有することが報告されている[71]。MjALF2においても血リンパでの発現解析や組換えタンパク質の抗真菌活性を測定し、病原微生物に対する防御能を解析する必要がある。

第4章において Toll 受容体遺伝子をノックダウンし、Toll 受容体シグナル伝達経路関連因子、抗菌ペプチドおよび他の生体防御関連因子の網羅的発現解析を行った。その結果、MjToll および MjToll2 遺伝子をそれぞれノックダウンすることにより、ProPO の高い発現上昇が、また、Spätzle、CP および lysozyme の顕著な発現抑制がいずれも認められた。また、MjToll ノックダウンでは LGBP の高い発現上昇が認められた。ザリガニの LGBP は血リンパにおいて ProPO を活性化することが知られている[125]。ショウジョウバエでは PGRP が真菌や細菌を認識し、ProPO カスケードにより認識シグナルを増幅し、生体防御機構を活性化することが知られている[127, 128]。今回の実験で、MjToll のノックダウンにより、ProPO や LGBP の発現が上昇した原因は、Toll シグナル伝達経路が機能しなくなったために、ProPO カスケードが生体防御能を補完しようとして活性化した可能性が考えられる。Toll 経路と PO 活性の関連性について検討することで、より詳細な異物認識機構の解明が期待される。

ネッタイシマカにおいては Toll5A 遺伝子のノックダウンにより Spätzle A の mRNA の発現量の減少が認められている[131]。ショウジョウバエでは血リンパ凝集反応の誘導因子である Fondue が Toll 受容体経路により制御されていることが報告されている[138]。また、昆虫類において lysozyme は、Toll シグナル経路により活性化されることが報告されている[145]。このように昆虫類でも報告されているように、Toll 受容体によって、Spätzle、CP および lysozyme

の発現が調節されている可能性が考えられる。しかし、その他の抗菌ペプチドである Crustin や Penaeidin は MjToll および MjToll2 経路とは別の生体防御機構により制御されていると予測された。

MjToll2 のノックダウンにより第2章において同定した MjALF2 の顕著な発現上昇が認められた。この発現上昇は、Toll 受容体シグナル伝達経路の不活化により、その機能を補うために MjALF2 が活性化された可能性が考えられる。このような異なる免疫応答の活性化メカニズムの解明はさらなる生体防御機構の解明に繋がることが期待される。

Toll シグナル伝達経路の構成因子として知られる ECSIT、TRAF6 および Cactin においては、MjToll2 ノックダウンにより全遺伝子の発現が減少する傾向がみられ、また MjToll ノックダウンにおいても TRAF6 を除いて発現の減少傾向がみられた。ECSIT や TRAF6 は Toll 経路だけでなく他のシグナル伝達経路にも関与していることが報告されている[132, 133]。そのため、クルマエビにおいてこれらの各因子は Toll 経路に関与はしているものの、別のシグナル経路も制御している可能性が考えられる。

このように、本研究では MjToll および MjToll2 が ECSIT、TRAF6 および Cactinなどを介し、lysozyme や CP の発現を調節している可能性が高いことを明らかにした。今後、さらなる遺伝子ノックダウンや網羅的発現解析により、詳細な生体防御機構におけるシグナルネットワークの解明が期待される。

要約

クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) において 2 つの Toll 受容体 (MjToll および MjToll2) 遺伝子が分離されたことにより、エビ類において複数の Toll 受容体遺伝子が存在していることが明らかとなった。また、MjToll は細菌由来の PG に対して高い応答を示すことが示唆された。

次に、クルマエビにおける新規抗菌ペプチドとして MjALF2 遺伝子を分離した。MjALF2 は既報のウシエビ ALF アイソフォーム 2 と高い相同性を示した。また、MjALF2 の LPS 刺激に対する迅速な遺伝子の発現上昇が認められた。

RNA 干渉法により、Toll 受容体をノックダウンし、Toll 受容体シグナル伝達経路関連因子および抗菌ペプチドなどの網羅的発現解析により、Toll 受容体とそれぞれの因子との関連性について解析を行った。

解析の結果、MjToll および MjToll2 の両者のノックダウンにおいて、ProPO の高い発現上昇が、CP、Spätzle および lysozyme の顕著な発現抑制が認められた。したがって、クルマエビにおける MjToll および MjToll2 の両者のシグナル伝達経路が様々な生体防御機構と連携し重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、強い溶菌作用を有する lysozyme の発現は Toll 受容体を介したシグナル伝達経路により制御されている可能性が高いことが示唆された。

このように、RNA 干渉や網羅的発現定量解析によるシグナル伝達経路や相互ネットワークの解明はクルマエビの免疫機構の把握のためにも非常に重要である。

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始多大なる御指導、御鞭撻を賜った宮崎大学農学部生物環境科学科の伊丹利明教授、吉田照豊准教授、応用生物科学科の酒井正博教授ならびに河野智哉氏に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] FAO. Food and Agriculture Organization statistics 2007.
- [2] Flegel TW, Boonyaratpalin S, Withyachumnarnkul B. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In "Diseases in Asian aquaculture III" Asian Fisheries Society, Manila. 1998:285-95.
- [3] Takahashi Y, Itami T, Kondo M, Maeda M, Fujii R, Tomonaga S, et al. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathol. 1998 29:121-5.
- [4] Wongteerasupaya C, Sriurairatana S, Vickers JE, Akrajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, et al. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Dis Aquat Org. 1995 22:45-50.
- [5] Lightner DV, Redman RM, Bell TA. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J Invertebr Pathol. 1983 42:62-70.
- [6] Lightner DV. A Hand Book of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aqua Soc Baton Rouge, LA. 1996.
- [7] Tu C, Huang HT, Chuang SH, Hsu JP, Kuo ST, Li NJ, et al. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. Dis Aquat Org. 1999 38:159-61.
- [8] Nielsen L, Sang-oum W, Cheevadhanarak S, Flegel TW. Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. Dis Aquat Org. 2005 63:101-6.
- [9] Lien TW, Hsiung HC, Huang CC, Song Y. Genomic similarity of Taura syndrome virus (TSV) between Taiwan and Western Hemisphere isolates. Fish Pathol. 2002 37:71-5.
- [10] Takahashi Y, Shimoyama Y, Momoyama K. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured kuruma *Penaeus japonicus* Bate. Bull Jpn Soc Sci Fish. 1985 51:1639-43.
- [11] Sakai T, Hirae T, Yuasa K, Kamaishi T, Matsuyama T, Miwa S, et al. Mass mortality of cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by *Vibrio nigripulchritudo*. Fish Pathol. 2007 42:141-7.
- [12] Liu CH, Cheng W, Hsu JP, Chen JC. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis Aquat Organ. 2004 61:169-74.

- [13] Lightner DV, Bell TA, Redman RM, Mohny LL, Natividad JM, Rukyani A, et al. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the americas and indopacific. *Diseases in Asian Aquaculture*. 1992:57-80.
- [14] Takahashi Y, Itami T, Maeda M, Kondo M. Bacterial and viral diseases of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) in Japan. *Fish Pathol*. 1998 33:357-64.
- [15] Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*. 2001 2:256-67.
- [16] Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*. 2001 414:756-9.
- [17] Brennan CA, Anderson KV. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol*. 2004 22:457-83.
- [18] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 4:499-511.
- [19] De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*. 2002 21:2568-79.
- [20] Ferrandon D, Jung AC, Cricqui M, Lemaitre B, Uttenweiler-Joseph S, Michaut L, et al. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J*. 1998 17:1217-27.
- [21] Takehana A, Katsuyama T, Yano T, Oshima Y, Takada H, Aigaki T, et al. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 99:13705-10.
- [22] Zambon RA, Nandakumar M, Vakharia VN, Wu LP. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 102:7257-62.
- [23] Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 97:13772-7.
- [24] Tanji T, Ip YT. Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends Immunol*. 2005 26:193-8.
- [25] Lin P, Huang LH, Steward R. Cactin, a conserved protein that interacts with

- the *Drosophila* IkappaB protein cactus and modulates its function. *Mech Dev.* 2000 94:57-65.
- [26] Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, Douglas I, Janeway CA, et al. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* 1999 13:2059-71.
- [27] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998 282:2085-8.
- [28] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999 162:3749-52.
- [29] Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med.* 1999 189:615-25.
- [30] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999 189:1777-82.
- [31] Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999 11:443-51.
- [32] Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 97:13766-71.
- [33] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001 410:1099-103.
- [34] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 408:740-5.
- [35] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003 21:335-76.
- [36] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002 3:667-72.
- [37] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to

- vertebrates. *Immunol Rev.* 2004 198:169-84.
- [38] Yang LS, Yin ZX, Liao JX, Huang XD, Guo CJ, Weng SP, et al. A Toll receptor in shrimp. *Mol Immunol.* 2007 44:1999-2008.
- [39] Yang C, Zhang J, Li F, Ma H, Zhang Q, Jose Priya TA, et al. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2008 24:564-74.
- [40] Arts JA, Cornelissen FH, Cijssouw T, Hermsen T, Savelkoul HF, Stet RJ. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 2007 23:504-13.
- [41] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 215:403-10.
- [42] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 24:1596-9.
- [43] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 4:406-25.
- [44] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006 22:195-201.
- [45] Pujol N, Link EM, Liu LX, Kurz CL, Alloing G, Tan MW, et al. A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 2001 11:809-21.
- [46] Inamori K, Ariki S, Kawabata S. A Toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol Rev.* 2004 198:106-15.
- [47] Meijer AH, Gabby Krens SF, Medina Rodriguez IA, He S, Bitter W, Ewa Snaar-Jagalska B, et al. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol Immunol.* 2004 40:773-83.
- [48] Fukui A, Inoue N, Matsumoto M, Nomura M, Yamada K, Matsuda Y, et al. Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem.* 2001 276:47143-9.
- [49] Luna C, Hoa NT, Zhang J, Kanzok SM, Brown SE, Imler JL, et al. Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2003 12:67-74.
- [50] Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 2000 97:10520-5.

- [51] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 124:783-801.
- [52] Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*. 2003 24:528-33.
- [53] Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*. 1999 285:1917-9.
- [54] Jebanathirajah JA, Peri S, Pandey A. Toll and interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. *Trends Plant Sci*. 2002 7:388-91.
- [55] O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*. 2003 24:286-90.
- [56] Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol*. 2002 168:1542-6.
- [57] Qiu P, Pan PC, Govind S. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development*. 1998 125:1909-20.
- [58] Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol*. 2001 25:565-77.
- [59] van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, et al. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol*. 2007 44:2605-15.
- [60] van de Braak CB, Botterblom MH, Taverne N, van Muiswinkel WB, Rombout JH, van der Knaap WP. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish Shellfish Immunol*. 2002 13:293-309.
- [61] Wang YC, Chang PS, Chen HY. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2006 20:414-8.
- [62] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small

- anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002 3:196-200.
- [63] Akira S. [Bacterial infections and toll-like receptors]. *Kekkaku*. 2001 76:593-600.
- [64] Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999 274:17406-9.
- [65] Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem*. 1985 148:1-5.
- [66] Weiss J, Muello K, Victor M, Elsbach P. The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope. *J Immunol*. 1984 132:3109-15.
- [67] Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB, Scott RW. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J Immunol*. 1992 148:532-7.
- [68] Ohashi K, Niwa M, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. Anti-LPS factor in the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. Its hemolytic activity on the red blood cell sensitized with lipopolysaccharide. *FEBS Lett*. 1984 176:207-10.
- [69] Desch CE, O'Hara P, Harlan JM. Antilipopolysaccharide factor from horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, inhibits lipopolysaccharide activation of cultured human endothelial cells. *Infect Immun*. 1989 57:1612-4.
- [70] de la Vega E, O'Leary NA, Shockey JE, Robalino J, Payne C, Browdy CL, et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. *Mol Immunol*. 2008 45:1916-25.
- [71] Somboonwiwat K, Marcos M, Tassanakajon A, Klinbunga S, Aumelas A, Romestand B, et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*. 2005 29:841-51.
- [72] Tharntada S, Somboonwiwat K, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A. Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. *Fish Shellfish Immunol*. 2008 24:46-54.
- [73] Pan CY, Chao TT, Chen JC, Chen JY, Liu WC, Lin CH, et al. Shrimp (*Penaeus monodon*) anti-lipopolysaccharide factor reduces the lethality of

- Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2007 7:687-700.
- [74] Nagoshi H, Inagawa H, Morii K, Harada H, Kohchi C, Nishizawa T, et al. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Mol Immunol.* 2006 43:2061-9.
- [75] Hoess A, Watson S, Siber GR, Liddington R. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus anti-LPS factor*, at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* 1993 12:3351-6.
- [76] Wang DN, Liu JW, Yang GZ, Zhang WJ, Wu XF. Cloning of anti-LPS factor cDNA from *Tachypleus tridentatus*, expression in *Bombyx mori* larvae and its biological activity *in vitro*. *Mol Biotechnol.* 2002 21:1-7.
- [77] Andra J, Lamata M, Martinez de Tejada G, Bartels R, Koch MH, Brandenburg K. Cyclic antimicrobial peptides based on *Limulus anti-lipopolysaccharide factor* for neutralization of lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol.* 2004 68:1297-307.
- [78] Kloczewiak M, Black KM, Loiseau P, Cavaillon JM, Wainwright N, Warren HS. Synthetic peptides that mimic the binding site of horseshoe crab antilipopolysaccharide factor. *J Infect Dis.* 1994 170:1490-7.
- [79] Weiss CA, 3rd, Wasiluk KR, Kellogg TA, Dunn DL. Bactericidal and endotoxin neutralizing activity of a peptide derived from *Limulus antilipopolysaccharide factor*. *Surgery.* 2000 128:339-44.
- [80] Ried C, Wahl C, Miethke T, Wellnhofer G, Landgraf C, Schneider-Mergener J, et al. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus anti-lipopolysaccharide factor*. *J Biol Chem.* 1996 271:28120-7.
- [81] Vallespi MG, Alvarez-Obregon JC, Rodriguez-Alonso I, Montero T, Garay H, Reyes O, et al. A *Limulus anti-LPS factor*-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. *Int Immunopharmacol.* 2003 3:247-56.
- [82] Yang Y, Boze H, Chemardin P, Padilla A, Moulin G, Tassanakajon A, et al. NMR structure of rALF-Pm3, an anti-lipopolysaccharide factor from shrimp: model of the possible lipid A-binding site. *Biopolymers.* 2009 91:207-20.
- [83] Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachere E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem.* 1997 272:28398-406.

- [84] Kang CJ, Wang JX, Zhao XF, Yang XM, Shao HL, Xiang JH. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2004 16:513-25.
- [85] Campa-Cordova AI, Hernandez-Saavedra NY, De Philippis R, Ascencio F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 2002 12:353-66.
- [86] Liu H, Jiravanichpaisal P, Soderhall I, Cerenius L, Soderhall K. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *in vitro* and *in vivo* in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Virol.* 2006 80:10365-71.
- [87] Ashida M. [Activation of prophenoloxidase cascade with peptidoglycan]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2004 49:1168-73.
- [88] Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol.* 2004 40:877-86.
- [89] Michel K, Budd A, Pinto S, Gibson TJ, Kafatos FC. Anopheles gambiae SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep.* 2005 6:891-7.
- [90] Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Roelofs MF, Radstake TR, Matera G, Popa C, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 56:2957-67.
- [91] Mekata T, Kono T, Yoshida T, Sakai M, Itami T. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2008 24:122-33.
- [92] Liu Y, Li F, Wang B, Dong B, Zhang X, Xiang J. A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2009 26:345-51.
- [93] Ren Q, Xu ZL, Wang XW, Zhao XF, Wang JX. Clip domain serine protease and its homolog respond to *Vibrio* challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2009 26:787-98.
- [94] Sriphajit T, Flegel TW, Senapin S. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. *Dev Comp Immunol.* 2007 31:1145-58.
- [95] Shi XZ, Zhang RR, Jia YP, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX. Identification and

- molecular characterization of a Spatzle-like protein from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 2009 27:610-7.
- [96] Wang PH, Gu ZH, Huang XD, Liu BD, Deng XX, Ai HS, et al. An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes. *Mol Immunol.* 2009 46:1897-904.
- [97] Li F, Yan H, Wang D, Priya TA, Li S, Wang B, et al. Identification of a novel relish homolog in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and its function in regulating the transcription of antimicrobial peptides. *Dev Comp Immunol.* 2009 33:1093-101.
- [98] Huang XD, Yin ZX, Liao JX, Wang PH, Yang LS, Ai HS, et al. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue. *Fish Shellfish Immunol.* 2009 27:230-8.
- [99] Lin YC, Vaseeharan B, Chen JC. Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol.* 2008 32:1260-9.
- [100] Sritunyalucksana K, Lee SY, Soderhall K. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 2002 26:237-45.
- [101] Chen WY, Ho KC, Leu JH, Liu KF, Wang HC, Kou GH, et al. WSSV infection activates STAT in shrimp. *Dev Comp Immunol.* 2008 32:1142-50.
- [102] Liu F, Liu Y, Li F, Dong B, Xiang J. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar Biotechnol (NY).* 2005 7:600-8.
- [103] Mekata T, Sudhakaran R, Okugawa S, Kono T, Sakai M, Itami T. Molecular cloning and transcriptional analysis of a newly identified anti-lipopolysaccharide factor gene in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Lett Appl Microbiol.* 2009.
- [104] Ho SH, Song YL. Cloning of penaeidin gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol.* 2009 27:73-7.
- [105] Padhi A, Verghese B, Otta SK, Varghese B, Ramu K. Adaptive evolution after duplication of penaeidin antimicrobial peptides. *Fish Shellfish Immunol.* 2007 23:553-66.
- [106] Kang CJ, Xue JF, Liu N, Zhao XF, Wang JX. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol.* 2007 44:1535-43.
- [107] Zhang J, Li F, Wang Z, Xiang J. Cloning and recombinant expression of a

- crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. J Biotechnol. 2007 127:605-14.
- [108] Sperstad SV, Haug T, Paulsen V, Rode TM, Strandskog G, Solem ST, et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. Dev Comp Immunol. 2009 33:583-91.
- [109] Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, Rimphanitchayakit V, Hirono I, Aoki T, et al. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol. 2008 32:61-70.
- [110] Bu X, Du X, Zhou W, Zhao X, Wang J. [Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*]. Chinese journal of biotechnology. 2008 24:723-32.
- [111] Mai WJ, Hu CQ. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. Mol Biol Rep. 2009 36:1587-95.
- [112] Ye X, Gao FY, Zheng QM, Bai JJ, Wang H, Lao HH, et al. Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme. Mol Biol Rep. 2009 36:1239-46.
- [113] Han-Ching Wang K, Tseng CW, Lin HY, Chen IT, Chen YH, Chen YM, et al. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. Dev Comp Immunol. 2009 34:49-58.
- [114] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. Dev Comp Immunol. 2009 33:811-20.
- [115] Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell. 1998 10:937-46.
- [116] Angell SM, Baulcombe DC. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. EMBO J. 1997 16:3675-84.
- [117] Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S, Proebsting WM. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. Mol Plant Microbe Interact. 1994 7:544-52.

- [118] Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol.* 2001 8:746-50.
- [119] Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* 2001 2:110-9.
- [120] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998 391:806-11.
- [121] Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 263:156-61.
- [122] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* 1992 6:3343-53.
- [123] Misquitta L, Paterson BM. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 96:1451-6.
- [124] Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.* 2000 2:70-5.
- [125] Lee SY, Wang R, Soderhall K. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem.* 2000 275:1337-43.
- [126] Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem.* 1996 271:13854-60.
- [127] Asano T, Ashida M. Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *J Biol Chem.* 2001 276:11100-12.
- [128] Asano T, Ashida M. Transepithelially transported pro-phenoloxidase in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. Identification of its methionyl residues oxidized to methionine sulfoxides. *J Biol Chem.* 2001 276:11113-25.
- [129] Kambris Z, Brun S, Jang IH, Nam HJ, Romeo Y, Takahashi K, et al. *Drosophila* immunity: a large-scale *in vivo* RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr Biol.* 2006 16:808-13.
- [130] Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature.* 2003 426:33-8.

- [131] Shin SW, Bian G, Raikhel AS. A toll receptor and a cytokine, Toll5A and Spz1C, are involved in toll antifungal immune signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem*. 2006 281:39388-95.
- [132] Moustakas A, Heldin CH. Ecsit-ement on the crossroads of Toll and BMP signal transduction. *Genes Dev*. 2003 17:2855-9.
- [133] Davies CC, Mak TW, Young LS, Eliopoulos AG. TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells. *Mol Cell Biol*. 2005 25:9806-19.
- [134] Yeh MS, Kao LR, Huang CJ, Tsai IH. Biochemical characterization and cloning of transglutaminases responsible for hemolymph clotting in *Penaeus monodon* and *Marsupenaeus japonicus*. *Biochim Biophys Acta*. 2006 1764:1167-78.
- [135] Song YL, Yu CI, Lien TW, Huang CC, Lin MN. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*. 2003 14:317-31.
- [136] Liu YC, Li FH, Wang B, Dong B, Zhang QL, Luan W, et al. A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2007 22:576-88.
- [137] Yeh MS, Liu CH, Hung CW, Cheng W. cDNA cloning, identification, tissue localisation, and transcription profile of a transglutaminase from white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection by *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2009 27:748-56.
- [138] Scherfer C, Qazi MR, Takahashi K, Ueda R, Dushay MS, Theopold U, et al. The Toll immune-regulated Drosophila protein Fondue is involved in hemolymph clotting and puparium formation. *Dev Biol*. 2006 295:156-63.
- [139] Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res*. 2004 113:379-85.
- [140] Alves-Filho JC. Toll-like receptors on platelets: the key for disseminated intravascular coagulation in sepsis? *Thromb Res*. 2005 115:537-8.
- [141] Amparyup P, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol Immunol*. 2008 45:1085-93.
- [142] Han-Ching Wang K, Tseng CW, Lin HY, Chen IT, Chen YH, Chen YM, et al.

- RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Dev Comp Immunol*. 2010 34:49-58.
- [143] Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, Hirono I, Aoki T. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*. 2003 316:187-95.
- [144] de-la-Re-Vega E, Garcia-Galaz A, Diaz-Cinco ME, Sotelo-Mundo RR. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish Shellfish Immunol*. 2006 20:405-8.
- [145] Park JW, Kim CH, Kim JH, Je BR, Roh KB, Kim SJ, et al. Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 104:6602-7.