

魚類における細菌感染症に対する炎症誘導機構の解明

およびその役割

**Elucidation and the role of inflammation mechanisms during bacterial infection in
teleosts**

宮崎大学農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

森本 和月

2021年3月

目次

第1章 序論	7-22
第1節 魚類における細菌感染症	7
1. 魚類における細菌感染症の概要	7
2. エドワジエラ症	7
3. 運動性エロモナス症	8
第2節 パターン認識機構と炎症誘導	9
第3節 Toll様受容体 (TLR)	10
1. TLRファミリーと炎症誘導	10
2. TLR5のフラジェリン認識機構	11
3. TLR5を介したシグナル伝達経路	12
第4節 インフラマソーム	13
1. インフラマソームの種類とその構造	13
2. インフラマソームを介したシグナル伝達経路	13
3. アポトーシス関連スペック様カード含有タンパク質 (ASC)	14
第5節 インターロイキン(IL)-1ファミリー	14
1. IL-1ファミリーの種類	14
2. IL-1ファミリーによる炎症誘導機構	15
第6節 研究の目的	15
第2章 <i>Edwardsiella piscicida</i> フラジェリン(<i>EpiFlhC</i>)によるヒラメ分泌型 TLR5 (PoTLR5S)を介した炎症誘導機構の解明	23-52
第1節 緒言	23

第2節	材料および方法	23
2.2.1.	<i>Potlr5m</i> 、変異 <i>EpiFliC</i> および変異 <i>Potlr5s</i> 発現プラスミドの構築	23
2.2.2.	使用した培養細胞	30
2.2.3.	トランスフェクション	30
2.2.4.	遺伝子発現解析	31
第3節	結果	33
2.3.1.	91 番目アスパラギン残基→アルギニン残基置換 <i>EpiFliC</i> による <i>Potlr5s</i> を介した <i>illb</i> および <i>nfkbp65</i> の発現誘導	33
2.3.2.	<i>EpiFliC</i> 、 <i>Potlr5s</i> および <i>Potlr5m</i> 同時過剰発現による <i>illb</i> の発現上昇	34
2.3.3.	フラジェリン刺激下における <i>Potlr5s</i> および <i>Potlr5m</i> 過剰発現による <i>illb</i> の発現誘導	35
2.3.4.	620 番目システイン残基→アラニン残基置換 <i>PoTLR5S</i> による、 <i>PoTLR5S</i> および <i>PoTLR5M</i> を介した <i>illb</i> 発現の誘導抑制	36
第4節	考察	38
第3章	メダカにおける3種類の <i>asc</i> の同定およびその機能の解明	53-88
第1節	緒言	53
第2節	材料および方法	53
3.2.1.	実験動物	53
3.2.2.	3種類のメダカ <i>asc</i> のクローニング	54
3.2.3.	<i>in silico</i> 解析	56
3.2.4.	遺伝子発現解析	57

3.2.5.	細菌感染による刺激を与えたメダカにおける遺伝子発現解析	58
3.2.6.	刺激剤で刺激した培養細胞における遺伝子発現解析	59
3.2.7.	統計解析	60
第3節	結果	60
3.3.1.	メダカ Cab 系統における3種類の asc の同定	60
3.3.2.	シンテニーおよびゲノム構造解析	61
3.3.3.	asc のクローニングおよびシーケンス解析	62
3.3.4.	メダカの組織における3種類の asc の発現	64
3.3.5.	メダカの <i>A. hydrophila</i> および <i>E. piscicida</i> 感染時における3種類の asc の発現動態	65
3.3.6.	インフラマソーム刺激剤で刺激したメダカ培養細胞における3種類の asc の発現	65
第4節	考察	66
第4章	<i>A. hydrophila</i> 感染時におけるメダカ asc1 を介した炎症および細胞死誘導機構の解明	89-114
第1節	緒言	89
第2節	材料および方法	89
4.2.1.	実験動物	89
4.2.2.	遺伝子発現解析	89
4.2.3.	ASC-1 変異メダカの構築	90
4.2.4.	細菌感染試験	93
4.2.5.	メダカ組織内における菌数の測定	93

4.2.6.	メダカ腎臓細胞における活性酸素種の測定	94
4.2.7.	メダカ腎臓細胞における細胞傷害活性の測定	95
第3節	結果	96
4.3.1.	ASC-1 変異メダカの構築	96
4.3.2.	ASC-1 変異メダカの <i>A. hydrophila</i> 感染に対する感受性	97
4.3.3.	<i>A. hydrophila</i> 感染 ASC-1 変異メダカの表皮細胞における <i>asc2</i> および <i>asc3</i> の発現誘導	97
4.3.4.	<i>A. hydrophila</i> 感染 ASC-1 変異メダカの腎臓における NF- κ B 関連遺伝子の発現動態	98
4.3.5.	ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における <i>A. hydrophila</i> 感染後の活性酸素種産生、細胞障害活性および組織内生菌数の変化	99
第4節	考察	100
第5章 メダカにおける <i>E. piscicida</i> 感染時の <i>asc1</i> を介した炎症応答および細胞死誘導機構とその役割		115-127
第1節	緒言	115
第2節	材料および方法	115
5.2.1.	実験動物	115
5.2.2.	細菌感染試験	116
5.2.3.	メダカ組織内における菌数の測定	116
5.2.4.	メダカ腎臓細胞における活性酸素種の測定	116
5.2.5.	メダカ腎臓細胞における細胞傷害活性	116
第3節	結果	116

5.3.1.	ASC-1 変異メダカにおける <i>E. piscicida</i> 感染に対する感受性	116
5.3.2.	<i>E. piscicida</i> 感染 ASC-1 変異メダカの腎臓における NF- κ B 関連遺伝子の発現動体および組織内生菌数の変化	117
5.3.3.	<i>E. piscicida</i> に感染した ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における活性酸素種(ROS)産生および細胞障害活性	118
第4節	考察	118
第6章	メダカにおける新規 <i>illb</i> の同定およびその遺伝子発現解析	128-145
第1節	緒言	128
第2節	材料および方法	128
6.2.1.	実験動物	128
6.2.2.	メダカ <i>illb1</i> および <i>illb2</i> のクローニング	128
6.2.3.	<i>in silico</i> 解析	130
6.2.4.	遺伝子発現解析	130
6.2.5.	細菌感染による刺激を与えたメダカにおける遺伝子発現解析	130
6.2.6.	統計解析	130
第3節	結果	130
6.3.1.	メダカ Cab 系統における <i>illb1</i> および <i>illb2</i> のクローニングおよびシーケンス解析	130
6.3.2.	系統樹解析	132
6.3.3.	シンテニー解析	132
6.3.4.	メダカの組織における <i>illb1</i> および <i>illb2</i> の発現	133

6.3.5. メダカの <i>A. hydrophila</i> および <i>E. piscicida</i> 感染時における <i>illb1</i> および <i>illb2</i> の発現動態	133
第4節 考察	134
謝辞	146-147
引用文献	148-165

第1章 序論

第1節 魚類における細菌感染症

1. 魚類における細菌感染症の概要

近年、国内における水産養殖産出額は増加傾向にあるが、魚病による被害は後を断たず、その被害額は産出額の3%程度を占めている。その中でも、主要養殖魚種における被害は、細菌性疾患によるものが多く、治療のために抗生物質などの薬剤が多く使用されてきた。しかし、その影響により薬剤耐性菌の増加や薬剤の魚体への残留の懸念など、様々な問題が発生しており、近年では、薬剤を用いた治療よりもワクチンを使用した予防を中心とした防疫対策が主流となっている (Santos and Ramos, 2018)。現在、ブリ類の連鎖球菌症やサケ科魚類のピブリオ病などのワクチンが市販されており、それらにより魚病による被害は減少傾向にあるが、未だに疾患の発生を防ぎきれていない現状がある (Håstein et al., 2005)。特に、細胞内寄生細菌による経済的被害は未だに大きく、通常の不活化ワクチンのみでは有効性がないことから、アジュバント添加ワクチンが用いられている (Munang'andu, 2018)。

細胞内寄生細菌は細胞外寄生細菌に比べて、細胞内に感染し、増殖するため、抗体などの液性因子が機能しないため、効果的なワクチン開発が困難である (Munang'andu, 2018)。細胞内寄生細菌に限らず、細菌性疾患への対策として抗菌剤が用いられているが、薬剤耐性菌出現への懸念から、効果的なワクチンおよびアジュバントの開発が期待されている。そこで、本研究では、細胞内寄生細菌が原因として起こるエドワジエラ症および魚類の日和見感染症である運動性エロモナス症に着目した。

2. エドワジエラ症

エドワジエラ症は、*Edwardsiella* 属細菌により引き起こされる疾患の総称であり、ヒ

ラメ (*Paralichthys olivaceus*)やウナギ (*Anguilla japonica*)、マダイ (*Pagrus major*)をはじめ、様々な養殖対象魚種で被害を出している (Mohanty and Sahoo, 2007)。エドワジエラ症の原因菌として、*E. tarda* が挙げられるが、近年、哺乳類由来の種を *E. tarda*、ヒラメなどから分離された運動性を有する種を *E. piscicida*、マダイから分離された運動性を有しない種を *E. anguillarum* として再同定された (Buján et al., 2018)。本項においては、ヒラメやウナギで甚大な被害を出している *E. piscicida* について詳細に説明する。*Edwardsiella piscicida* は腸内細菌科のグラム陰性通性嫌気性短桿菌であり、鞭毛をもち、運動性を有する。発育可能温度は 15~42 °C、至適発育温度が 30 °C であり、エドワジエラ症は夏から秋を中心とした高水温期に発生することが知られている (Mohanty and Sahoo, 2007)。また、*E. piscicida* は細胞内寄生性細菌であり、宿主の食細胞中において生存・増殖し(Qin et al., 2017)、最終的には敗血症により宿主が死亡する。エドワジエラ症の主な症状として、ヒラメでは腹部膨満、脱腸および出血性の腹水(Han et al., 2006)、ウナギでは肛門周辺の発赤、腎臓および肝臓の膿瘍や潰瘍などが主に現れる(Joh et al., 2011)。

3. 運動性エロモナス症

Aeromonas 属細菌により引き起こされる魚類の疾病の代表として、運動性エロモナス症やサケ科魚類のせっそう病が挙げられる。*Aeromonas* 属細菌は、河川や湖沼などの様々な水環境において常在菌として知られ、魚類から哺乳類にかけて幅広い生物種に対して日和見感染症を引き起こす (Praveen et al., 2016)。運動性エロモナス症を引き起こす原因菌として、運動性を有する *A. hydrophila*、*A. veronii*、*A. sobria* が挙げられ、サケ科魚類のせっそう病の原因菌としては、非運動性である *A. salmonicida* が挙げられる。運動性エロモナス症の原因菌の代表である *A. hydrophila* はグラム陰性通性嫌気性桿菌である。発育可能温度は 15~40 °C で、25~30 °C の高水温期に発生することが知られてい

る(Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013)。症状として、立鱗が見られることから、「松かさ病」とも呼ばれ、その他にも皮膚や鱗に皮下出血性の赤斑や眼球突出、腹部膨満などの症状が見られる(Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013)。

第2節 パターン認識機構と炎症誘導

パターン認識機構は細菌やウイルスなどの病原体が生体内に侵入した際に、速やかに炎症を誘導し、病原体を排除するために重要な機構である。パターン認識機構を介した炎症の誘導は、シグナル伝達型のパターン認識受容体(pattern-recognition receptors; PRRs)が病原体の構成分子である病原関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)や生体が病原体によりダメージを受けた細胞から放出されるダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns; DAMPs)などのリガンドを認識することで惹起される。PRRsは細胞膜に発現する Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs)および C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors; CLR)、細胞質内に発現する Nod 様受容体 (Nod-like receptors; NLRs)、RIG-I 様受容体(retinoic acid-inducible gene-I-like receptors; RLRs) および AIM2 様受容体(AIM2-like receptors; ALRs)の 5 種類のファミリーに大別され、これらの PRRs は免疫関連細胞に広く発現している (Brubaker et al., 2015; Takeuchi and Akira, 2010)。それぞれの PRRs は、特異的なリガンドを認識すると、シグナルを伝達し、インターロイキン(IL)-1 β やケモカインなどを含む炎症性サイトカインおよび I 型インターフェロン(IFN)遺伝子の発現を誘導し、炎症を誘起することで微生物の排除に関わる (Lee and Kim, 2007; Takeuchi and Akira, 2010)。炎症を誘導する PAMPs として、細菌の構成分子であるフラジェリンやリポ多糖 (LPS)などが挙げられる。哺乳類において、これらの PAMPs は細胞膜上に局在する TLR5 または TLR4 により認識され、炎症を誘導する(Takeuchi and Akira, 2010)。また、細胞質においては、NLR ファミリー分子や caspase-4/5/11 により認識され、タンパク質複合体であるインフラマソームを形成する

ことで炎症を誘導する(Takeuchi and Akira, 2010)。さらに、細胞質においては、これらの PAMPs によりスペックを形成することで強力な炎症を誘導することが知られている(Fernandes-Alnemri et al., 2007)。以上で示した通り、炎症を誘導する PAMPs の認識には、TLR ファミリー、インフラマソームおよびスペック形成が重要な役割を果たしている。これらの炎症における役割について、第 3 節および第 4 節で説明する。

第3節 Toll 様受容体 (TLR)

1. TLR ファミリーと炎症誘導

Toll 様受容体 (Toll-like receptors: TLRs) ファミリーはヒトでは 10 種類、マウスでは 13 種類、魚類では 21 種類存在し、それぞれ異なるリガンドを認識する(Baoprasertkul et al., 2007; Matsuo et al., 2008; Meijer et al., 2004; Roach et al., 2005; Takeuchi and Akira, 2010) (Table 1)。哺乳類の TLRs は、細胞外あるいはエンドソーム内に存在するリガンドを認識するロイシンリッチリピート(leucine rich repeat: LRR)領域、細胞内にはシグナルを伝達するために重要な toll-interleukin receptor (TIR)ドメインを含む領域、そして、細胞外領域と細胞内領域をつなげる膜貫通ドメインから構成されている(O'Neill and Dinarello, 2000)。それぞれの TLR は、特異的なリガンドを認識すると、TIR ドメインを介して myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88)との結合が起こり、nuclear factor-kappaB (NF- κ B)や mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化を介した炎症性サイトカインやケモカイン遺伝子の発現を誘導する(Brubaker et al., 2015; O'Neill and Dinarello, 2000)。また、TLR7, -8, および -9 の下流においては、tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) によるシグナル伝達が起こり、IFN regulatory factor (IRF)-3 および IRF-7 の活性化を介した I 型 IFN 遺伝子の発現が誘導される(Brubaker et al., 2015)。哺乳類において、細菌感染時に炎症を誘導する代表的な TLR として、TLR4 および TLR5 が挙げられる(Fernandes-Alnemri et al., 2007)。TLR4 は細胞外のグラム陰性

細菌の細胞膜を構成するリポ多糖 (LPS)を認識し、強力な炎症を誘導する。一方で、魚類ではコイ科魚類しか TLR4 を有さず、LPS により炎症が誘導されない(Sepulcre et al., 2009)。また、哺乳類の TLR5 は細胞膜上において細胞外の細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンを認識し、炎症を惹起する。魚類においても同様に TLR5 は細胞膜上に発現し、リガンドとしてフラジェリンを認識することで炎症を誘導する。そこで、魚類においては TLR5 が細菌感染時ににおける炎症の誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、TLR5 を含むすべての TLR は膜貫通ドメインを有するが、魚類には膜貫通ドメインを有する膜型 TLR5 (TLR5M)に加えて、膜貫通ドメインを有しない可溶型の TLR5 (TLR5S) が存在している。この TLR5S は、これまでにニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) (Tsuji et al., 2004)、大西洋サケ (*Salmo salar*) (Tsoi et al., 2006)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) (Hwang et al., 2010)およびヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) (Muñoz et al., 2013)を含む様々な魚種で同定されている。以下の項に TLR5 のフラジェリン認識機構および TLR5 を介したシグナル伝達経路を示す。

2. TLR5 のフラジェリン認識機構

フラジェリンは細菌の鞭毛構成タンパク質のうち、鞭毛繊維を構成し、細菌の運動性および病原性に重要であるとされている。フラジェリンは、そのタンパク質の立体構造から D0、D1、D2、および D3 と呼ばれる 4 つのドメインから構成され、D0、D1 ドメインは細菌種間で高い保存性を有し、D2、D3 ドメインは高い多様性を有する(Beatson et al., 2006)。これらのドメインの中でも N および C 末端領域にある α ヘリックス構造により形成されている D1 ドメインが哺乳類における TLR5 に認識され (Beatson et al., 2006)、ヒトの TLR5 では、*Salmonella Typhimurium* 由来のフラジェリンの D1 ドメインが、TLR5-LRR と結合する(Yoon et al., 2012)。特に、*Salmonella Typhimurium* 由来のフラジェリンにおける 90 番目のアルギニン残基が、マウス TLR5 の発現を誘導することに

重要であり (Yoon et al., 2012)、*Bacillus subtilis* 由来フラジェリンにおける 89 番目のアルギニン残基が、ゼブラフィッシュ TLR5M の 9 番目の LRR に結合することで NF- κ B が最も強く活性化される (Song et al., 2017)。また、ヒト TLR5 とウシ TLR5 ではフラジェリンの由来となる細菌の種類によって TLR5 シグナル経路の下流に当たる CXCL8 の分泌量が異なる (Tahoun et al., 2017)。ゼブラフィッシュの TLR5M がヒトの TLR5 と同様に、*Salmonella Typhimurium* 由来のフラジェリンの D1 ドメインと TLR5-LRR が結合することが明らかになっている。しかし、未だ魚病細菌由来のフラジェリンについては検討されておらず、魚類における実際の TLR5 を介した細菌認識メカニズムは不明である。

3. TLR5 を介したシグナル伝達経路

ヒトの TLR5 は膜型 (TLR5M) であり、マクロファージなどの免疫担当細胞の膜上に発現し、細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンを認識し、そのシグナルを細胞内のアダプター分子であり、Myd88 を介して、転写因子である NF- κ B を活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導する (Hayashi et al., 2001)(Fig. 1)。ニジマスの TLR5M も哺乳類と同様の機構を有している (Tsujita et al., 2006, 2004; Tsukada et al., 2005)。一方で、膜貫通ドメインを有しない可溶型 TLR5 (TLR5S) は、魚類特有の分子として知られており、フラジェリンの認識に関わる LRR 領域のみで構成されている。TLR5S は、細胞膜の内部への接触はない構造を取っているのにもかかわらず、フラジェリン存在下で TLR5M と同様に NF- κ B を活性化する (Tsujita et al., 2006, 2004; Tsukada et al., 2005)。さらに、ニジマス TLR5S はヒト TLR5M と結合することが明らかになっている (Tsujita et al., 2004; Tsukada et al., 2005)。しかしながら、魚類特有の TLR5S がどのようにして細胞内にシグナルを伝達するのかについては解明されていない。

第4節 インフラマソーム

1. インフラマソームの種類とその構造

インフラマソームは、PAMPsなどを認識するセンサー分子、その下流の炎症を誘導する炎症性カスパーゼ前駆体、およびセンサー分子とカスパーゼ前駆体を繋ぐアダプター分子で構成されるタンパク質複合体である(Broz and Dixit, 2016)。インフラマソームを構成するセンサー分子として、NLRsやALRsが挙げられ、それぞれ異なるリガンドを認識する(Broz et al., 2010; Lu and Wu, 2015; Pierini et al., 2012; Takeuchi and Akira, 2010)(Table 2)。インフラマソームを構成するNLRsやALRsは、pyrin domain (PYD)またはcaspase-recruitment domain (CARD)領域を有し、それらの領域がアダプター分子や炎症性カスパーゼ前駆体と結合する(de Alba, 2019)。アダプター分子としては、アポトーシス関連スペック様カード含有タンパク質(ASC)が挙げられ、ASCはPYDおよびCARD領域から構成されている。これらの領域によりセンサー分子とカスパーゼ前駆体を繋ぐ役割を果たす(de Alba, 2019)。また、センサー分子はASCを介さず下流のカスパーゼと直接結合する場合もある(Guo et al., 2015)。炎症性カスパーゼとしてカスパーゼ-1 (Casp-1)が挙げられ、Casp-1前駆体はASCまたはセンサー分子と結合するCARD領域および活性型Casp-1として機能するcaspase consensus (CASC)ドメインにより構成される(Devi et al., 2020)。このタンパク質複合体がさらに多量体を形成することで、インフラマソームが活性化されシグナルの伝達が起こる。

2. インフラマソームを介したシグナル伝達経路

インフラマソームを介したシグナル伝達は、細胞質内のPAMPsやDAMPsをセンサー分子が認識し、活性化することから始まる。活性化したセンサー分子は、アダプター分子であるASCを介してCasp-1前駆体と会合し、インフラマソームを形成する。インフラマソームの形成に伴い、Casp-1前駆体は自己消化により活性型Casp-1となる

(Srinivasula et al., 2002; Stehlik et al., 2003)。この Casp-1 はプロテアーゼ活性を有しており、炎症性サイトカインである IL-1 β および IL-18 前駆体を切断し、活性型 IL-1 β および IL-18 へと成熟させる(Coll et al., 2015; Davis et al., 2011)。また、哺乳類では、活性型 Casp-1 はガスダーミン (gasdermin; GSDM) D を切断し、その N 末端領域が細胞質膜に小孔を形成することで細胞質内に水分の流入が起こり、パイロトーシスと呼ばれるネクロトーシス様の炎症性細胞死を引き起こす(Schroder and Tschopp, 2010; Vande Walle and Lamkanfi, 2016)。一方で、魚類は GSDMD を有さず、GSDME が活性型 Casp-1 により切断され、パイロトーシスが起こるとされている(Jiang et al., 2019; Li et al., 2019)。このパイロトーシスにより、活性型 IL-1 β および IL-18 は細胞外に分泌され、後述する IL-1 β による炎症応答が誘起される (Fig. 2)。

3. アポトーシス関連スペック様カード含有タンパク質 (ASC)

ASC はインフラマソームのアダプター分子として知られており、インフラマソームの形成に重要な分子である。一方で、ASC は単体でも凝集し、ASC スペックを形成することで Casp-1 と結合し、Casp-1 の活性化を誘導する(Fernandes-Alnemri et al., 2007; Masumoto et al., 1999) (Fig. 2)。一方で、ASC は receptor-interacting serine/threonine-protein kinase (RIPK) 2 と結合することで、RIPK2 と Casp-1 を介した NF- κ B の活性化を阻害する (Sarkar et al., 2006; Xie and Belosevic, 2016) (Fig. 3)。さらに、ASC はインフラマソームおよび ASC スペックを介した Casp-1 の活性化によるパイロトーシス誘導に関与しているだけでなく、様々な細胞死に関与している。ASC スペックは Casp-1 前駆体のみならず、Casp-8 前駆体の活性化も誘導することが知られている (Lee et al., 2018)(Fig. 3)。活性型 Casp-8 は、Casp-3 を介したアポトーシスを誘導する(Lee et al., 2018)。一方で、活性型 Casp-8 は RIPK1 および RIPK3 と結合することでネクロブトーシスと呼ばれる別のネクロトーシス様細胞死を阻害する (Lee et al., 2018) (Fig. 3)。さらに、ASC は Bcl-2 結

合 X タンパク質 (Bax) と結合することでミトコンドリアからのチトクロム c の漏出を促進し、Casp-9 を介したアポトーシスを誘導する (Lee et al., 2018)(Fig. 3)。

第5節 インターロイキン(IL)-1 ファミリー

1. IL-1 ファミリーの種類

IL-1 ファミリーは構造的に類似したリガンドおよび受容体の拮抗分子を含む 11 種類の分子から構成されており、炎症性サイトカインとして IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33、IL-36 α 、IL-36 β および IL-36 γ が、抗炎症性サイトカインとして IL-37 が、受容体の拮抗分子として IL-1Ra、IL-36Ra および IL-38 が同定されている(Dinarello, 2018)。これらの全ての分子は酵素により切断され、活性型となることが知られている(Dinarello, 2018)。

2. IL-1 β による炎症誘導機構

IL-1 β は炎症性サイトカインの一種であり、様々な疾病の炎症時において誘導される分子として知られている(Dinarello, 2018)。IL-1 β は前駆体として産生され、上述したようにインフラマソームを介して、活性型 Casp-1 により切断されて活性型 IL-1 β となる (Coll et al., 2015; Dinarello, 2018) (Fig. 2)。活性型 IL-1 β は、Casp-1 の活性化により引き起こされるパイロトーシスにより細胞外に分泌され、他の細胞へとシグナルを伝達する (Vande Walle and Lamkanfi, 2016)。細胞外に分泌された IL-1 β は、他の細胞に発現している IL-1 受容体(IL-1R)によって認識され、Myd88 を介した炎症性サイトカイン遺伝子の発現を誘導することで炎症を助長する(Dinarello, 2018)。

第6節 研究の目的

哺乳類において、細菌感染時の炎症誘導機構として、細胞膜上においては TLR4 および TLR5 が、細胞質内においてはインフラマソームおよび ASC スペックが重要な役割

を果たしている。TLR シグナル経路により遺伝子発現が誘導され、インフラマソームおよび ASC スペックを介して活性化された IL-1 β は、炎症を助長する重要な分子である。魚類においては TLR4 が機能せず、TLR5 に関しては哺乳類と同様の細胞膜上に発現している TLR5M に加えて、細胞外に分泌される TLR5S が存在することが報告されており、細菌感染時において TLR5 が細胞膜上において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、細菌感染時の魚類におけるインフラマソームおよび ASC スペックの役割についても不明な点が多い。さらに、魚類において、炎症を助長する分子である IL-1 β は複数存在するが、それらの同定は未だに不十分である。そこで本学位論文研究では、以下の 1)~3)について解明することを目的とした。

- 1) 魚病細菌である *E. piscicida* 由来フラジェリンによる TLR5S を介した炎症誘導機構について解明する。
- 2) 魚類における *asc* および *il1b* 遺伝子を同定し、細菌感染時における遺伝子発現動態について解明する。
- 3) 細菌感染時における魚類の ASC を介した炎症誘導機構について解明する。

本学位論文研究では、1)の目的を解明するために、ヒラメ培養細胞を用いて *E. piscicida* 由来フラジェリン遺伝子およびヒラメ *tlr5s* および *tlr5m* の一過性過剰発現実験により、炎症関連遺伝子の発現誘導を明らかにした。次に、2)の目的を明らかにするために、小型魚モデル生物であるメダカにおける各遺伝子のクローン化を試みた。さらに、3)の目的を解明するために、ゲノム編集技術を用いて、メダカ ASC 変異メダカを作製した。このメダカを用いて、魚病細菌感染時の炎症応答における ASC の役割について検討を行なった。

Table 1. TLRs and their ligands.

受容体	リガンド	
	哺乳類	魚類
TLR1	トリアシルリポペプチド	不明
TLR2	リポペプチド/リポタンパク質	リポペプチド/リポタンパク質
TLR3	二本鎖 RNA/polyI:C	二本鎖 RNA/polyI:C
TLR4	LPS	不明 (コイ科魚類のみ)
TLR5(M)	フラジェリン	フラジェリン
TLR5S	-	フラジェリン
TLR6	ジアシルリポペプチド	-
TLR7	一本鎖 RNA	不明
TLR8	一本鎖 RNA	不明
TLR9	非メチル化 CpG DNA	非メチル化 CpG DNA
TLR10	プロフィリン様分子	-
TLR11	プロフィリン様分子	-
TLR12	不明	-
TLR13	23S rRNA/ssRNA	-
TLR14	-	不明
TLR18	-	不明
TLR19	-	不明
TLR20	-	不明
TLR21	-	非メチル化 CpG DNA
TLR22	-	二本鎖 RNA/polyI:C
TLR23	-	不明

TLR24	-	不明
TLR25	-	不明
TLR26	-	不明
TLR27	-	不明
TLR28	-	LPS/polyI:C

Table 2. Inflammasome sensor molecules and their activators.

センサー分子	活性化因子	
NLRP1	PAMPs	ムラミルジペプチド (MDP) リーサルトキシシン (LT)
NLRP3	PAMPs	ウイルス核酸 真菌 細菌類/毒素
	DAMPs	ATP 尿酸ナトリウム結晶 二酸化珪素 水酸化アルミニウム ナイジェリシン
NLRC4	PAMPs	フラジェリン
AIM2	PAMPs	二本鎖 DNA
NLRP6	PAMPs	バクテロイデス

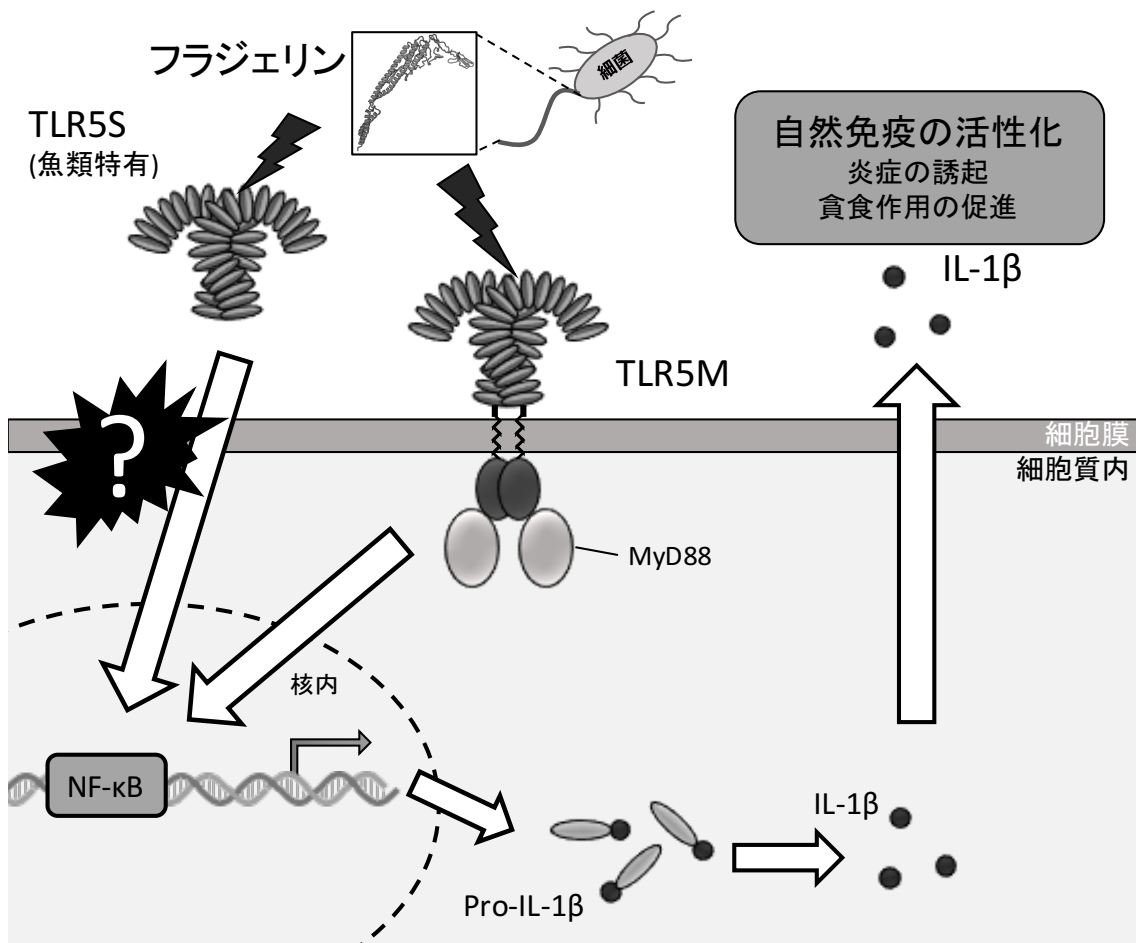


Fig. 1. TLR5 signaling pathway in teleosts

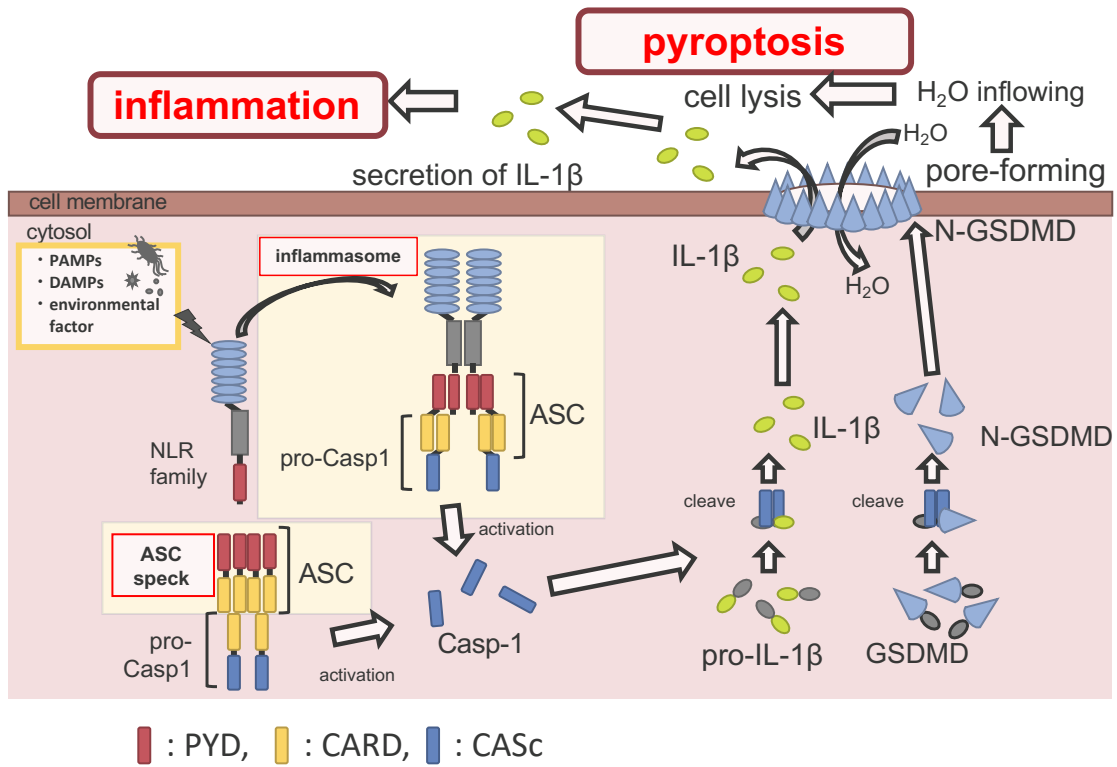


Fig. 2. Inflammasome signaling pathway in mammals

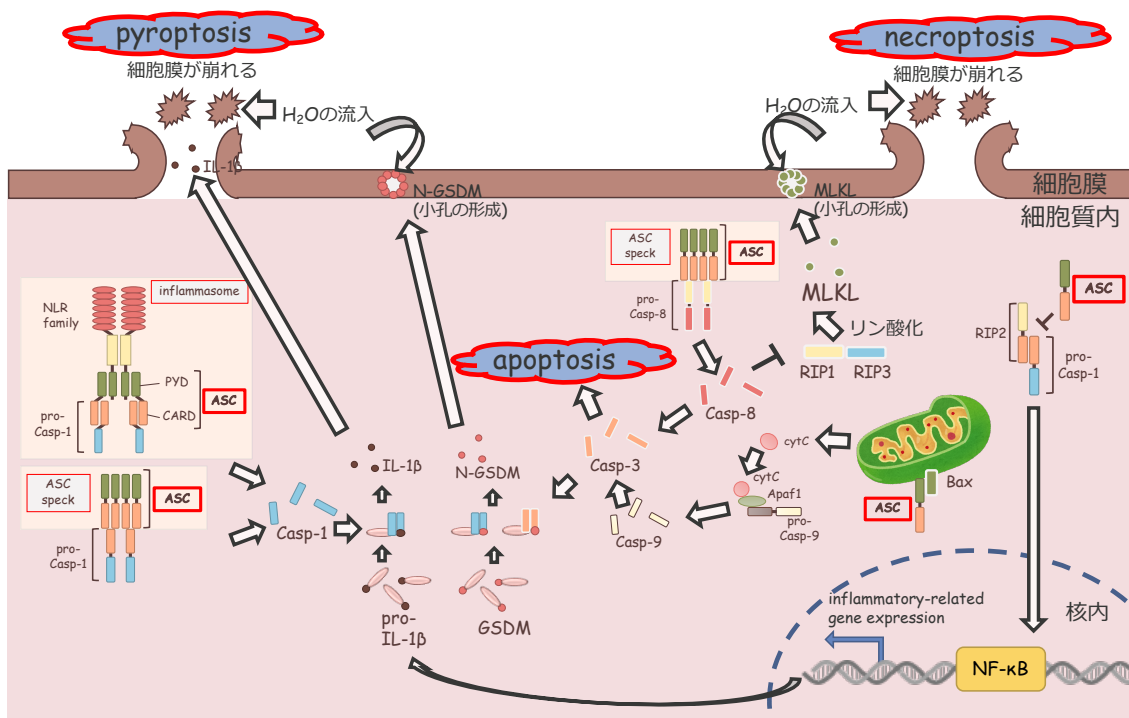


Fig. 3. The role of ASC in the immune response and the cell death.

第2章 *Edwardsiella piscicida* フラジェリン(*EpiFliC*)によるヒラメ分泌型 TLR5 (*PoTLR5S*)を介した炎症誘導機構の解明

第1節 緒言

本研究室では、これまでに *EpiFliC* および *PoTLR5S* 発現プラスミド (p*EpiFliC* および p*PoTLR5S*) を構築し、これらをヒラメ胚細胞由来培養細胞において過剰発現させた際、*il1b* の発現が誘導されることを明らかにした(Morimoto et al., 2019)。また、フラジェリンのアミノ酸配列を解析した結果、哺乳類の TLR5 の活性化に重要である 91 番目のアルギニン残基が *EpiFliC* には保存されていないことが明らかになった(Morimoto et al., 2019)。しかし、魚類の TLR5S を介したフラジェリン認識機構は未だに不明であり、魚類の病原細菌由来のフラジェリンの TLR5 活性化部位に関しても不明である。また、魚類の TLR5 は生体外に分泌されているにも関わらず、細胞質内にシグナルを伝達し、NF- κ B の活性化を誘導することが報告されている(Tsujita et al., 2004)。さらに、ニジマスのリコンビナント TLR5S の濃度依存的に NF- κ B の活性は増幅する(Tsujita et al., 2006)。一方で、魚類における TLR5S がどのようにして細胞内にシグナルを伝達しているのか、未だに明らかになっていない。本章においては TLR5S および TLR5M を介した炎症誘導機構に着目し、以下の実験を行った。

第2節 材料および方法

2.2.1. *PoTLR5M*、変異 *EpiFliC* および変異 *PoTLR5S* 発現プラスミドの構築

2.2.1.1. *Potlr5m* の PCR による増幅

GenBank よりヒラメ *tlr5m* (*Potlr5m*)遺伝子配列を入手し、この配列を用いて *Potlr5m* の ORF 領域を増幅するためのプライマーの設計を行った。ヒラメの末梢血リンパ球由来の cDNA を鋳型とし、設計したプライマーを用いて PCR で増幅を行った。DNA ポリ

メラーゼは KAPA™ HiFi HotStart Ready Mix (Nippon Genetics Co, Ltd., Tokyo, Japan)を用い、方法は製品のプロトコルに従った。PCR 反応は、KAPA HiFi HotStart Ready Mix 7.5 μ l、Forward Primer (5 μ M) 1.5 μ l、Reverse Primer (5 μ M) 1.5 μ l、cDNA template 1 μ l および Nuclease-Free Water 4.5 μ l を混合し、サーマルサイクラーでプレヒーティング 95°C で 5 分間、熱変性 98 °C で 20 秒間、アニーリング 56 °C で 15 秒間、伸長反応 72 °C で 1 分間/ kbp の反応を 35 サイクル行い、さらに再伸長反応 72 °C で 5 分間の条件で PCR を行った。使用したプライマーは Table 3 に示す。反応終了後、1.5%アガロースゲルを用いて、電気泳動を行い、増幅した DNA 断片の確認を行った。

2.2.1.2. クローニングベクターへのライゲーション

クローニングには DynaExpress TA PCR Cloning Kit (pTAC-2) (BioDynamics Laboratory Inc., Kumamoto, Japan)を用いた。PCR 産物からの DNA の精製には NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Takara, Shiga, Japan)を用いた。精製した DNA 断片の末端にアデニン塩基を付加するために、精製した DNA 5 μ L と Go Taq Green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA) 5 μ L を混合し、72 °C で 10 分間インキュベートし、この産物をインサート DNA とした。ライゲーション反応は、2 \times Ligation Buffer 2.5 μ l、Ligase Mixture 0.5 μ l、pTAC-2 vector (50 ng/ μ L) 0.5 μ L、インサート DNA 1.5 μ L を混合し、16 °C で 30 分間インキュベートした。

2.2.1.3. コンピテントセルへのトランスフォーメーション

ライゲーション産物を導入するコンピテントセルは、*Escherichia coli* DH5 α 株を培養し、塩化カルシウム (CaCl₂)法により作成し、-80 °C に保存していたものを用いた。また、ライゲーション産物のコンピテントセルへの形質転換は、ヒートショック法により行った。-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

を 2 μL 添加し、氷上で 30 分間静置した。その後、42 $^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスで 45 秒間加熱し、氷上で 2 分間静置した。静置後、Luria-Bertani (LB) 液体培地 [1% (w/v) Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), 0.5% (w/v) Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), 0.5% (w/v) sodium chloride (NaCl) (Wako, Osaka, Japan)] を 500 μL 添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養した。培養後、アンピシリンナトリウム (Wako, Osaka, Japan) を終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した MacConkey 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) に 150 μL 植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。

2.2.1.4. コロニーPCR によるインサート DNA の確認

MacConkey 寒天培地上に生えてきたコロニーの中から白コロニーを選抜し、コロニーPCR によりインサート DNA の確認を行った。選抜したコロニーを滅菌した爪楊枝で少量掻き取り 8 連チューブに塗布し、Go Taq Green Master Mix 5 μL , Forward primer (5 μM) 1 μL , Reverse primer (5 μM) 1 μL , nuclease-free water 3 μL の PCR 反応液を加え、サーマルサイクラーを用いて 95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間のプレヒーティング後、95 $^{\circ}\text{C}$ で 40 秒間の熱変性、56 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間の伸長反応を 25 サイクル、72 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間の再伸長反応を行った。使用したプライマーは Table 3 に示す。反応終了後、1.5%アガロースゲルを用いて、電気泳動を行い、増幅した DNA 断片の確認を行った。インサート DNA が入っていることを確認したコロニーはアンピシリンナトリウムを終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した LB 液体培地に植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩振盪培養した。

2.2.1.5. プラスミド DNA 抽出

プラスミド DNA の抽出は、GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を用い、製品のプロトコルに従って行った。プラスミドが導入された菌の培養液を、4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 $\times g$ 、1 分間の遠心を行い、菌を沈殿させた。上清を除去し、もう一度培

養液を 1.5 ml 加え、さらに 4 °C、8000 ×g、1 分間の遠心を行い、上清を除去し、菌を回収した。そして、菌に Resuspension Buffer 200 μl を添加し、ボルテックスで攪拌した。この菌液に Lysis Buffer 200 μl を添加し、室温で 5 分間静置することによって菌を溶解した。さらに、この液に Neutrization Buffer 350 μl を添加し、中和することで夾雑物をデブリスとした。この液を 4 °C、12000 ×g、10 分間遠心することで、上清にプラスミドを含む溶液を得た。この上清を Column Preparation Buffer 500 μl を通過させたカラムに添加し、4 °C、12000 ×g、1 分間遠心を行い、カラムにプラスミドを吸着させた。夾雑物の洗浄のために、Washing Buffer 500 μl をカラムに添加し、4 °C、12000 ×g、1 分間遠心を行い、カラムの洗浄を行い、さらに 4 °C、12000 ×g、2 分間の遠心を行うことによって、Washing Buffer に含まれるエタノールを除去した。最後に、Nuclease-Free Water 40 μl をカラムに添加し、1 分間室温で静置したのちに、4 °C、12000 ×g、1 分間遠心を行うことで、プラスミド溶液の回収を行った。抽出したプラスミド DNA の濃度は、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)を用いて測定した。

2.2.1.6. *EpiFliC* および *PoTLR5S* への変異の導入

変異の導入には、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara, Shiga, Japan)を用いた。方法はキットのプロトコルに従い、pGEM_*EpiFliC* に組み込まれている *EpiFliC* 塩基配列の 91 番目のアスパラギン残基をコードしている “AAC” を、アルギニン残基をコードする ”CGT” に 3 塩基置換するためのプライマーを設計した。また、pGEM_*PoTLR5S* に組み込まれている *Potlr5s* 塩基配列の 593 番目のシステイン残基をコードしている “TGA” からアラニン残基をコードしている “GCA” に、または 620 番目のシステイン残基をコードしている “TGT” からアラニン残基をコードしている “GCA” に、それぞれ 3 塩基置換するためのプライマーを設計した (Table 3)。反応は、pGEM_*EpiFliC* または

pGEM_PoTLR5S を鋳型とし、PrimeSTAR Master Premix 25 μ L、Forward Primer (5 μ M) 2 μ l、Reverse Primer (5 μ M) 2 μ l、プラスミド (< 10 pmol/ μ l) 1 μ l、Nuclease Free Water 20 μ l を混合し、サーマルサイクラーを用いて 98 °C で 10 秒間、55 °C で 15 秒間、72 °C で 10 秒間の反応を 30 サイクルの反応を行った。この反応液を 2.2.1.3.-5.と同様の方法でトランスフォーメーション、コロニーPCR およびプラスミド抽出を行った。

2.2.1.7. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、マクロジェン・ジャパン株式会社 (Kyoto, Japan) の DNA シークエンス受託サービスにより行った。

2.2.1.8. シーケンスデータの解析

シーケンスデータの解析は BioEdit を用いて行った。まず、pTAC-2 vector に導入した *Potlr5m* の塩基配列と既知のヒラメ *tlr5m* の塩基配列とのアライメントを作成し、本研究で用いる遺伝子の塩基配列の確認を行った。塩基配列を確認したプラスミドを pTAC-2_PoTLR5M とした。次に、pGEM_EpiFliC および pGEM_PoTLR5S の変異配列を確認するために、シーケンスで決定した塩基配列と鋳型としたプラスミドの塩基配列を用いてアライメントを作成した。変異を確認したプラスミドを、それぞれ pGEM_EpiFliC_N91R、pGEM_PoTLR5S_C593A、pGEM_PoTLR5S_C620A および pGEM_PoTLR5S_C593A_C620A とした。

2.2.1.9. 発現ベクター導入用の目的遺伝子配列の PCR による増幅

2.2.1.9. においてクローン化したプラスミド (pTAC-2_PoTLR5M、pGEM_EpiFliC_N91R、pGEM_PoTLR5S_C593A、pGEM_PoTLR5S_C620A および pGEM_PoTLR5S_C593A_C620A) の塩基配列を参考にし、各遺伝子全長塩基配列を PCR

で増幅し、発現ベクターである pcDNA4-HisMaxA vector (Promega, Wisconsin, USA)に組み込むためのプライマーの設計を行った (Table 3)。PCR は、KAPA HiFi HotStart Ready Mix 7.5 μ l、Forward Primer (5 μ M) 1.5 μ l、Reverse Primer (5 μ M) 1.5 μ l、cDNA template 1 μ l および Nuclease-Free Water 4.5 μ l を混合し、サーマルサイクラーでプレヒーティング 95 $^{\circ}$ C で 5 分間、熱変性 98 $^{\circ}$ C で 20 秒間、アニーリング 56 $^{\circ}$ C で 15 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C で 1 分間/ kbp の反応を 30 サイクル行い、さらに再伸長反応 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の条件で反応を行った。反応終了後、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅した DNA 断片を確認した。

2.2.1.10. 制限酵素処理

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit を用いて PCR 産物から DNA を精製し、DNA の末端を *EcoRI* (Nippon Genetics Co, Ltd., Tokyo, Japan)、*XhoI* (Nippon Genetics Co, Ltd., Tokyo, Japan) または *XbaI* (Takara, Shiga, Japan) を使用し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間処理を行った。その後、さらに DNA の精製を行い、これをインサート DNA とした。また、pcDNA4-HisMaxA vector も同様に制限酵素処理後、DNA の精製を行い、これをベクターDNA とした。精製した DNA の濃度は NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 を用いて測定した。

2.2.1.11. 発現ベクターへのライゲーション

2.2.1.10. で得たインサートおよびベクターDNA のライゲーションには、Ligation high ver. 2 (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。ライゲーション反応は、Ligation high ver. 2 を 2.5 μ L、ベクターDNA を 25 ng およびインサート DNA を >50 ng を混合し、nuclease-free water で全量を 5 μ L に調整し、混合したものを 16 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。

2.2.1.12. コンピテントセルへのトランスフォーメーション

コンピテントセルへのトランスフォーメーションは 2.2.1.3.と同様の方法で行った。トランスフォーメーション後、アンピシリンナトリウム (Wako, Osaka, Japan)を終濃度 100 µg/ml で添加した LB 寒天培地 [1% (w/v) Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), 0.5% (w/v) Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), 0.5% (w/v) sodium chloride (NaCl) (Wako, Osaka, Japan), 1.5% (w/v) Agar Powder (Wako, Osaka, Japan)]に 100 µL 植菌し、37 °C で一晩培養した。

2.2.1.13. コロニーPCR によるインサート DNA の確認、プラスミド DNA 抽出および塩基配列の確認

LB 寒天培地上に生えてきたコロニーを選抜し、コロニーPCR によりインサート DNA の確認を行った。選抜したコロニーを滅菌した爪楊枝で少量掻き取り 8 連チューブに塗布し、DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 5 µL, T7 forward primer (5 µM) 1 µL, BGH reverse primer (5 µM) 1 µL, nuclease-free water 3 µL の PCR 反応液を加え、サーマルサイクラーを用いて 95 °C で 5 分間のプレヒーティング後、95 °C で 40 秒間の熱変性、56 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 1 分間の伸長反応を 25 サイクル、72 °C で 5 分間の再伸長反応を行った。使用したプライマーは Table 3 に示す。反応終了後、1.5%アガロースゲルを用いて、電気泳動を行い、増幅した DNA 断片の確認を行った。インサート DNA が入っていることを確認したコロニーはアンピシリンナトリウムを終濃度 100 µg/ml で添加した LB 液体培地に植菌し、37 °C で一晩振盪培養した。プラスミド DNA 抽出は、2.2.1.5.と同様の方法で行い、塩基配列の確認は 2.2.1.6.および 2.2.1.7.と同様の方法で行った。シーケンスを確認したプラスミドをそれぞれ pPoTLR5M、pEpiFliC_N91R、pPoTLR5S_C593A、pPoTLR5S_C620A および pPoTLR5S_C593A_C620A とした。

2.2.1.14. トランスフェクション用プラスミド DNA の大量抽出

2.2.1.13. で塩基配列を確認したプラスミド (pPoTLR5M、pEpiFliC_N91R、pPoTLR5S_C593A、pPoTLR5S_C620A および pPoTLR5S_C593A_C620A) に加え、以前作製を行った pEpiFliC および pPoTLR5S、および pcDNA4-HisMaxA vector (empty vector) をトランスフェクション用にプラスミド DNA の大量抽出を行った。プラスミド DNA の大量抽出は、PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて行った。抽出したプラスミド DNA の濃度は、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 を用いて測定した。

2.2.2. 使用した培養細胞

ヒラメ胚細胞由来株 (Hirame Natural Embryo cells: HINAE 細胞) は、10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen, California, USA) および 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を添加した Leibovitz's L-15 Medium (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で、20 °C で培養した。

2.2.3. トランスフェクション

HINAE 細胞を Nuncolon™ Delta Surface 24-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) に 1×10^5 cells/well 播種し、24 時間後に Lipofectamine 3000 Reagent (Invitrogen, USA) を用いて細胞に発現ベクターをトランスフェクションした。24 穴プレートに播種した細胞を PBS で 2 回洗浄し、Opti-MEM (Gibco, USA) 450 μ l に培地を置換した。次に、Opti-MEM 25 μ l に Lipofectamine 3000 Reagent 1 μ l を添加し、ボルテックスで 2-3 秒攪拌した反応液 (反応液 A) および Opti-MEM 25 μ l に発現ベクター 0.5 μ g を添加した反応液 (反応液 B) を用意し、反応液 A と B を 1:1 の割合で混合し、5 分間室温

で静置した。この反応液を各ウェル 50 μ l 添加し、20 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベート後、元の L-15 培地に置換し、24 時間後にサンプリングを行い、遺伝子発現解析を行った。

2.2.4. 遺伝子発現解析

2.2.4.1. Total RNA 抽出

Total RNA 抽出は、RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて行った。トランスフェクション後、24 時間インキュベートした H1NAE 細胞の培地を除去し、PBS で洗浄した。洗浄した細胞に、RNAiso Plus を 300 μ L 入れ、室温で 5 分間静置し、よくピペッティングをしたのちに、1.5 ml チューブに回収した。その後、さらに室温で 5 分間静置し、クロロホルム (Wako, Osaka, Japan) 60 μ L を添加し、激しく攪拌し、室温で 5 分間静置した。静置後に、4 $^{\circ}$ C、12000 \times g で 15 分間遠心し、RNA を含む水層とゲノム DNA およびタンパク質の層に分離した。RNA を含む水層を回収し、イソプロパノール (Wako, Osaka, Japan) 300 μ L を添加し、転倒混和後、室温で 10 分間静置し、4 $^{\circ}$ C、12000 \times g で 10 分間の遠心を行い、RNA を沈殿させた。遠心後、上清を除去し、氷冷した 75%エタノール (Wako, Osaka, Japan) を 500 μ L 添加し、転倒混和後、4 $^{\circ}$ C、7600 \times g で 5 分間遠心し、洗浄した。その後、上清を除去し、室温で乾燥させ、nuclease-free water 13 μ L に溶解し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 で濃度を測定したものを total RNA 溶液とした。

2.2.4.2. cDNA 合成

抽出した total RNA 溶液は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた逆転写による cDNA 合成に用いた。Total RNA 溶液を 65 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベート後、氷上で急冷し、RNA を編成させた。その後、total RNA 溶液 300 μ g および 4 \times DN Master Mix (gDNA Remover 添加) を混合し、nuclease-free water

で全量 8 μL に調節した混合液を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートし、ゲノム DNA を除去した。その後、この反応液に 5 \times RT Master Mix II を 2 μL 添加し、ピペッティングでよく混和後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間、50 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間の逆転写反応および 98 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間の酵素失活反応を行い、cDNA を合成した。以降の実験では、合成した cDNA を nuclease-free water で 20 倍希釈したものを cDNA template として用いた。

2.2.4.3. 定量リアルタイム PCR (qPCR)

qPCR は、cDNA template を鋳型とし、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes (Agilent Technologies, California, USA) を用いて行った。1 サンプルあたり、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mixes 7.5 μL 、Forward Primer (5 μM) 1 μL 、Reverse Primer (5 μM) 1 μL および cDNA template 4.5 μL および nuclease-free water 1 μL の混合液を PCR 用 96 ウェルプレート (Ina・Optica Co., Ltd., Osaka, Japan) に添加し、プレートシール (Shinkouseiki Co., Ltd., Fukuoka, Japan) で蓋をした。このプレートを CFX Connect 185 (Bio-Rad, California, USA) を用いて、95 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間の初期変性を行った後に、95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒間の反応を 40 サイクル行った。また、プライマーの特異性を判断するための融解曲線解析のために、65 $^{\circ}\text{C}$ から 95 $^{\circ}\text{C}$ まで、0.5 $^{\circ}\text{C}$ ずつ温度を上昇させ、各温度帯で 5 s の反応を行った。得られたデータは $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて行った(計算式: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Sample}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Control}}$ 、発現量比 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)。内部標準遺伝子として、メダカの細胞骨格遺伝子である β -actin (*actb*) を用い、各遺伝子の発現量を定量した。使用したプライマーは Table 3 に示す。

2.2.4.4. 統計解析

統計解析は Tukey-Kramer 法による一元配置分散分析を使用した。また、Student's *t* 検定を用いて両側検定することにより求めた。

第3節 結果

2.3.1. 91番目アスパラギン残基→アルギニン残基置換 *EpiFliC* による *Potlr5s* を介した *il1b* および *nfkbp65* の発現誘導

まず、HINAE 細胞に pPoTLR5S、p*EpiFliC* および p*EpiFliC*_N91R をトランスフェクションしたのちに、それぞれの遺伝子が発現しているのか確認を行った。その結果、各プラスミドをトランスフェクション後に、それぞれの遺伝子が過剰に発現していた (Fig. 3)。次に、HINAE 細胞でそれぞれの遺伝子を発現させた際の *il1b* および *p65* の発現を解析した。*EpiFliC* のみを過剰発現させた場合、空ベクターを導入した対照区と比べて *il1b* および *p65* の発現量は増加する傾向は見られたが、有意な増加は見られなかった (Fig. 4)。また、*Potlr5s* および *EpiFliC* を同時に発現させた場合においては *EpiFliC* のみ発現させた場合より増加する傾向は見られたが、有意な増加は見られなかった (Fig. 3)。しかし、*EpiFliC*_N91R を発現させた場合、対照区より *il1b* および *p65* の発現は有意に増加した (Fig. 4)。さらに、*EpiFliC*_N91R のみを発現させた場合と *EpiFliC* のみを発現させた場合で *il1b* および *p65* の発現量を比較すると、有意な遺伝子発現量の増加が見られた (Fig. 4)。それに加えて、*Potlr5s* と *EpiFliC*_N91R を同時に発現させると、*Potlr5s* と *EpiFliC* を同時に発現させた場合に比べて *p65* 遺伝子の発現が有意に増加した (Fig. 4)。これらの結果から、PoTLR5S を介した *EpiFliC* による炎症誘導において、*EpiFliC* には PoTLR5S 活性化する残基が保存されておらず、哺乳類における TLR5 活性化残基に置換することで *Potlr5s* を介した炎症が誘導されることが示唆された。一方で、*Potlr5s* のみを発現させた場合において、対照区よりも *il1b* の発現量は有意に増加した (Fig. 4)。このことから、*Potlr5s* が発現することが炎症を誘導するために重要であるのではないかと考えた。

2.3.2. *EpiFliC*、*Potlr5s* および *Potlr5m* 同時過剰発現による *illb* の発現上昇

2.3.1.において、*Potlr5s* を発現させると、*illb* の発現が誘導することが示唆された。PoTLR5S のアミノ酸配列を解析すると、N 末端には細胞外にタンパク質を分泌するためのシグナルペプチドが見られ、C 末端には膜貫通ドメインが存在しない(Hwang et al., 2010)。よって、PoTLR5S は細胞外に分泌されることが示唆されている。一方で、PoTLR5S は細胞外に分泌されているにも関わらず、細胞質内にシグナルを伝達し、*illb* の発現を誘導している。哺乳類において、TLR5 はホモ二量体を形成することで下流にシグナルを伝達することが知られている(Lu and Sun, 2012)。また、TLR5S を有さず、2 種類の TLR5M を有することが知られているゼブラフィッシュにおいては、その 2 種類の TLR5M が相互作用することにより下流にシグナルを伝達することが示唆されている(Lu and Sun, 2012)。そこで、PoTLR5S および PoTLR5M が相互作用するという仮説を立て、PoTLR5S および PoTLR5M を介した *EpiFliC* による炎症誘導機構を *illb* の発現量を調べることによって解析した。

まず、HINAE 細胞に pPoTLR5S、pPoTLR5M および p*EpiFliC* をトランスフェクションしたのちに、それぞれの遺伝子が発現しているのか確認を行った。その結果、各プラスミドをトランスフェクション後に、それぞれの遺伝子が過剰に発現していた (Fig. 5)。興味深いことに、*Potlr5s* を発現させた場合に *Potlr5m* の発現が、*Potlr5m* を発現させた場合に *Potlr5s* の発現が誘導されていた (Fig. 5)。次に、HINAE 細胞でそれぞれの遺伝子を発現させた際の *illb* の発現を解析した。*EpiFliC* のみ発現させた場合および *EpiFliC* と *Potlr5s* を同時に発現させた場合においては、*illb* の有意な発現誘導が見られなかった (Fig. 6)。同様に、*Potlr5s* のみ、*Potlr5m* のみまたは *Potlr5s* および *Potlr5m* を同時に発現させた場合においても有意な *illb* の発現の増加は見られなかった (Fig. 6)。しかし、*Potlr5m* と *EpiFliC* を同時に発現させた場合において、*illb* の発現量は有意に増加し、*Potlr5s*、*Potlr5m* および *EpiFliC* を同時に発現させると *illb* の発現量はさらに増加した

(Fig. 6)。

2.3.3. フラジェリン刺激下の *Potlr5s* および *Potlr5m* 過剰発現による *il1b* の発現誘導

2.2.2.において、*Potlr5s*、*Potlr5m* および *EpiFliC* を同時に発現させると、*il1b* の発現量が増加することを示した。しかし、*EpiFliC* には TLR5S の活性化残基が保存されておらず、魚類における TLR5S を介した炎症誘導機構は不明なままである。そこで、*Potlr5s* および *Potlr5m* を発現させたのちに、ゼブラフィッシュの TLR5M の刺激剤として用いられていた *Salmonella* 由来の組換えフラジェリンにより刺激することで TLR5S および TLR5M を介した炎症誘導機構について調べた。最初に、刺激するフラジェリンの濃度および刺激時間の条件検討を行った。HINAE 細胞にフラジェリンを 0、10、50 および 100 ng/ml の濃度で添加すると、100 ng/ml 添加後 12 時間で対照区に比べて有意に *il1b* の発現は誘導され、100 ng/ml 添加後 24 時間においても *il1b* の発現が誘導された (Fig. 7)。さらに、フラジェリン 100 ng/ml で 12 時間刺激後に、炎症関連遺伝子である *p65* および *tnfa* の発現も有意に上昇した (Fig. 7)。この結果から、フラジェリン 100 ng/ml で 12 時間刺激を行った場合に炎症関連遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。以降の試験において、各プラスミドをトランスフェクション後、100 ng/ml の濃度で 12 時間のフラジェリン刺激を行い、遺伝子の発現を解析した。まず、トランスフェクションする pPoTLR5M のプラスミド量を一定にし、pPoTLR5S の量を変化させた。その結果、トランスフェクションした pPoTLR5S の量依存的に *Potlr5s* の発現量が増加した (Fig. 8)。また、トランスフェクションする pPoTLR5S のプラスミド量を一定にし、pPoTLR5M の量を変化させた場合にも同様に、pPoTLR5M の濃度依存的に *Potlr5m* の発現量が増加した。次に、上記条件における *il1b* の発現を解析した。その結果、pPoTLR5M のトランスフェクションしたプラスミド量依存的に *il1b* の発現が上昇した (Fig. 8)。また、pPoTLR5S の濃度を変化させた場合においても、トランスフェクションするプラスミド

量が多いほど、*illb* の発現量が増加した (Fig. 8)。

2.3.4. 620 番目システイン残基→アラニン残基置換 *PoTLR5S* による、*PoTLR5S* および *PoTLR5M* を介した *illb* 発現の誘導抑制

脊椎動物の TLR には、LRR 領域、TM 領域および TIR 領域が存在し、その中でも LRR 領域がリガンドを認識する際に重要である。しかし、*tlr5s* は LRR 領域しか存在しない。TLR5 の LRR 領域は N 末端および C 末端にシステイン残基が多く含まれる領域(LRR-NT および LRR-CT)を持ち、これらの領域が TLR5 の LRR 領域の立体構造に重要であることが示唆されている(Bell et al., 2003)。魚類の TLR5M の LRR-CT には、哺乳類の TLR5 の LRR-CT と同様にシステイン残基が 4 つ存在するが、TLR5S には 2 つしか存在しない(Hwang et al., 2010)。これらのシステイン残基が TLR5S および TLR5M を介した *illb* の発現の誘導に影響を与えるかどうかを明らかにするために、実際に *Potlr5s* または変異 *Potlr5s* (*Potlr5s_C593A*、*Potlr5s_C620A* および *Potlr5s_C593A_C620A*)を *Potlr5m* と同時に HINAE 細胞において過剰発現させたのちにフラジェリン刺激した場合の炎症の誘導について、*illb* の発現を調べることで解析した。

まず、p*PoTLR5S* 中に含まれる 593 番目のシステイン残基をコードしている “TGA” からアラニン残基をコードしている “GCA” に、または 620 番目のシステイン残基をコードしている “TGT” からアラニン残基をコードしている “GCA” に、それぞれ 3 塩基置換し、変異 *PoTLR5S* 発現ベクターを得た (p*PoTLR5S_C593A* および p*PoTLR5S_C620A*) (Fig. 9)。また、それらを基に、593 番目および 620 番目のシステイン残基両方をアラニン残基に置換した発現ベクターの作製も行った (p*PoTLR5S_C593A_C620A*) (Fig. 9)。

これらのプラスミドを用いて、*Potlr5s* または変異 *Potlr5s* (*Potlr5s_C593A*、*Potlr5s_C620A* および *Potlr5s_C593A_C620A*)を *Potlr5m* と同時に HINAE 細胞において

過剰発現させた。HINAE 細胞に各発現ベクターをトランスフェクションしたのちに、それぞれの遺伝子が発現しているのか確認を行った。その結果、各発現ベクターをトランスフェクション後に、それぞれの遺伝子が過剰に発現していた (Fig. 10)。次に、各発現ベクターをトランスフェクション後、フラジェリン刺激を与えた場合における *il1b* の発現を解析した。*Potlr5s* と *Potlr5m* を同時に発現させ、フラジェリン刺激を与えた場合の *il1b* の発現量は、対照区と比較して有意に高かった (Fig. 11)。また、*Potlr5s_C593A* と *Potlr5m* を同時に発現させたにおいても同様の結果が得られた (Fig. 11)。一方で、*Potlr5s_C620A* または *Potlr5s_C593A_C620A* と *Potlr5m* を同時に発現させ、フラジェリン刺激を与えても *il1b* の発現量は対照区と比較して増加しなかった (Fig. 11)。さらに、*Potlr5m* のみを発現させた場合と比較すると、*Potlr5s_C620A* または *Potlr5s_C593A_C620A* と *Potlr5m* を同時に発現させた場合には、*il1b* の発現量は減少する傾向が見られた (Fig. 11)。

第4節 考察

哺乳類において、TLR5は細菌の鞭毛厚生タンパク質であるフラジェリンを認識することで細胞質内のMyD88経路を介した炎症の誘導を行う。哺乳類におけるTLR5は膜貫通ドメインを有することで細胞膜状に発現しているが、魚類においては哺乳類と同様のTLR5Mに加えて膜貫通ドメインを有さず細胞外に分泌するTLR5Sが存在する。しかし、TLR5Sを介した炎症誘導機構については未だに不明な点が多い。そこで、本章において、TLR5Sを介した炎症誘導機構を詳細に明らかにした。

筆者らは、フラジェリンのアミノ酸配列を解析した結果、哺乳類のTLR5の活性化に重要である91番目のアルギニン残基がEpiFliCには保存されていないことを明らかにした (Morimoto et al., 2019)。哺乳類のTLR5の活性化に重要であるアルギニン残基がフラジェリン内に保存されていない細菌として *Campylobacter jejuni* および *Helicobacter pylori* が挙げられ、これらの細菌においてTLR5を介した炎症誘導が見られない (De Zoete et al., 2010) (Kim et al., 2018)。本章において、実際にEpiFliCに保存されている91番目のアスパラギン残基をアルギニン残基に置換を行い (EpiFliC_N91R)、Potlr5sと同時にHINAE細胞において過剰発現させた場合の炎症の誘導について、*illb* および *p65* 遺伝子の発現を調べた結果、EpiFliC_N91Rを発現させた場合、*illb* および *p65* の発現はEpiFliCを発現させた場合と比較して有意に上昇した。さらに、EpiFliC_N91RとPotlr5sを同時に発現させた場合、さらに*illb* および *p65* の発現は上昇した。このことから、EpiFliCの91番目のアスパラギン酸残基はPoTLR5Sを介した炎症を誘導しないが、アルギニン残基への置換によりPoTLR5Sを介した炎症を誘導することが明らかになった。一方で、EpiFliCとEpiFliC_N91Rの予測された立体構造比較した場合、変異を加えた部位における構造の変化は見られなかった (Morimoto et al., 2019)。また、アスパラギン酸残基およびアルギニン残基ともに極性のアミノ酸であるが、アス

パラギン酸残基は負の電荷を有し、アルギニン残基は正の電荷を有している。これらの違いが EpiFliC と EpiFliC_N91R の PoTLR5S を介した *illb* および *p65* の発現誘導に関与したことが示唆された。

哺乳類培養細胞において、ニジマス(rt)TLR5S とヒトの TLR5 を同時に発現させ、フラジェリン刺激を与えた場合に NF- κ B の活性が増幅する報告がある(Tsujita et al., 2004)。また、rtTLR5M の細胞外領域をヒトの TLR5 の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインと結合させたキメラ(S-キメラ)を哺乳類培養細胞で発現させ、rtTLR5S の添加およびフラジェリン刺激を与えた場合、NF- κ B の活性が増幅した(Tsujita et al., 2006)。これらのことから、魚類において TLR5S と TLR5M が相互作用し、細胞質内にシグナルを伝達しているのではないかと考え、フラジェリン刺激時の PoTLR5S および PoTLR5M を介した炎症誘導機構に着目した。ニジマスにおいては哺乳類培養細胞において TLR5S および TLR5M を介した炎症誘導が見られたが、本章においてはヒラメ培養細胞を用いて *EpiFliC*、*Potlr5s* および *Potlr5m* を発現させた場合における炎症誘導の確認を *illb* の発現を調べることにより行った。その結果、*Potlr5s*、*Potlr5m* および *EpiFliC* を同時に発現させると *illb* の発現量は有意に増加した。これらのことから、魚類培養細胞においても、哺乳類培養細胞と同様に TLR5S と TLR5M を介したフラジェリンによる炎症誘導が起こることが示唆された。一方で、*EpiFliC* と *Potlr5s* を同時に発現させても *illb* の発現量は有意に増加しなかったが、*Potlr5m* と *EpiFliC* を同時に発現させた場合においては *illb* の発現量は有意に増加した。このことから、*EpiFliC* は PoTLR5S には認識されないが、PoTLR5M には認識され、炎症が誘導されることが示唆された。また、トランスフェクションに用いる DNA 量を変化させ、フラジェリン刺激を与えた場合、*Potlr5m* の発現量依存的に *illb* の発現が上昇した。このことから、PoTLR5M は PoTLR5S を介したフラジェリンによる *illb* の発現誘導に必要であることが示唆された。

脊椎動物の TLR は、TM 領域および TIR 領域を有することで細胞膜状に発現

し、細胞外の LRR 領域によりリガンドを認識し、細胞質内にシグナルを伝達する(O'Neill and Dinarello, 2000)。哺乳類において、TLR5 はホモ二量体を形成し、フラジェリン刺激のシグナルを細胞質内に伝達する(Lu and Sun, 2012)。しかし、魚類における TLR5S は LRR 領域しか存在しない。TLR5 の LRR 領域は N 末端および C 末端にシステイン残基が多く含まれる領域(LRR-NT および LRR-CT)を持ち、これらの領域が TLR5 の LRR 領域の立体構造に重要であることが示唆されている(Bell et al., 2003)。また、ゼブラフィッシュにおいては、LRR 領域の C 末端領域およびその下流の領域において 2 種類の *tlr5m* が相互作用し、下流の NF- κ B を活性化することが示唆されている(Voogdt et al., 2018)。魚類の TLR5M の LRR-CT は、哺乳類の TLR5 と同様にシステイン残基が 4 つ存在し、これらのシステイン残基がジスルフィド結合をすることにより、細胞膜上での構造を維持している(Bell et al., 2003)。一方で、魚類の TLR5S の LRR-CT にはシステイン残基が 2 つしか存在せず、立体構造やシグナル伝達への影響は不明である。また、哺乳類の TLR5 の細胞外領域がフラジェリンを認識する際の立体構造の予測において、LRR の C 末端領域が二量体の形成に関与することが示唆されている(Lu and Sun, 2012)。哺乳類の TLR3 においては LRR-CT は二量体形成に重要な領域であるとされている(Liu et al., 2008)。ヒラメ培養細胞において、*Potlr5s* または変異 *Potlr5s* (*Potlr5s_C593A*、*Potlr5s_C620A* および *Potlr5s_C593A_C620A*)を *Potlr5m* と同時に HINA E 細胞において過剰発現させ、フラジェリン刺激を与えた場合、*Potlr5s* または *Potlr5s_C593A* と *Potlr5m* を同時に発現させ、フラジェリン刺激を与えた場合の *il1b* の発現量は、対照区と比較して有意に高かった。一方で、*Potlr5s_C620A* または *Potlr5s_C593A_C620A* と *Potlr5m* を同時に発現させ、フラジェリン刺激を与えても *il1b* の発現量は対照区と比較して増加しなかった。さらに、*Potlr5m* のみを発現させた場合と比較すると、*Potlr5s_C620A* または *Potlr5s_C593A_C620A* と *Potlr5m* を同時に発現させた場合には、*il1b* の発現量は減少する傾向が見られた。これらのことにより、PoTLR5S の 593 番目のシステイン残基は

PoTLR5M を介したフラジェリンによる炎症誘導機構に影響を与えないが、620 番目のシステイン残基は PoTLR5M を介した炎症誘導を抑制することが示唆された。また、PoTLR5S の LRR-CT 領域におけるジスルフィド結合が起こっており、その立体構造が下流のシグナルに影響する場合、どちらか片方のシステイン残基が存在しなければ、下流の *il1b* の発現の誘導は起こらない。しかし、PoTLR5S の 593 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換しても、野生型の *Potlr5s* を発現させ、フラジェリン刺激を与えた場合と *il1b* の発現量に差は見られなかった。したがって、PoTLR5S の LRR-CT 領域において、システイン残基によるジスルフィド結合が起こっていない可能性がある。しかし、PoTLR5S と PoTLR5M が物理的な相互作用により炎症の誘導をしているのかについては未だに不明である。したがって、PoTLR5S および PoTLR5M 間におけるタンパク質間相互作用の解析が必要である。

Table 3. Oligonucleotide sequences used in this study

Name	Primer #	Sequences (5' - 3')	Mer
<i>Primers for cloning into pTAC-2 vector:</i>			
PoTLR5M-F2	P#921	ATGTGGACACTGGCCCCT	18
PoTLR5M-R3	P#924	TCACATGGCAACAGCTCTG	19
<i>Primers for cloning into pcDNA4-HisMaxA vector:</i>			
PoTLR5M-EcoRI-F2	P#1055	CATGAATTCCAGCATGTGGACACTGGC	27
PoTLR5M-XhoI-R2	P#1056	ATACTCGAGTCCATGGCAACAGCTCTG	28
<i>Primers for site-directed mutagenesis:</i>			
EtFliC-mut-F1	P#1129	CTGCAGCGTATCCGTCGTACCGTACAG	27
EtFliC-mut-R2	P#1159	ACGGATACGCTGCAGGTTGTCGTTGAC	27
PoTLR5S_C593A_mut_F1	P#1320	TTCCACGCAGACGTCGACCTGAAGAGT	27
PoTLR5S_C593A_mut_R1	P#1321	GACGTCTGCGTGGAATCGGTTTCATTTT	27
PoTLR5S_C620A_mut_F1	P#1322	CTCAGGGCAGAGTTTCCCTCTCGTTTT	27
PoTLR5S_C620A_mut_R1	P#1323	AAACTCTGCCCTGAGCTCCTGAACCGG	27
<i>Primers for qPCR analyses:</i>			
PoIL-1 β _rt_F3	P#1174	CCTCCTCTCCACTGACTACCA	21
PoIL-1 β _rt_R3	P#1175	CTCCACATCTGGCTCACGTT	20
PoNF- κ B-p65_rt_F1	P#814	AAGCACAGCACGGAGAACAGT	21
PoNF- κ B-p65_rt_R1	P#815	GCAACTTGCGCGTTCATAGA	20
PoTLR5S_rt_F1	P#1143	ATCTGTGTGTTCCCTGCAGATG	21
PoTLR5S_rt_R1	P#1144	TGGAGTTAATCTCCCCGATG	20

PoTLR5M_rt_F1	P#1178	ATTCCGACACCTTCGCCAAT	20
PoTLR5M_rt_R1	P#1179	CCCAGGTCTCGCAATGAGTT	20
EtFliC_rt_F1	P#1141	GCTGAACGAAGTCAACGACA	20
EtFliC_rt_R1	P#1142	AGTCGGTCTGCTGGGAGATA	20
Po β -actin_rt_F1	P#1147	CTGGACTTCGAGCAGGAGAT	20
Po β -actin_rt_R1	P#1148	TTCCACAGGACTCCATACCG	20

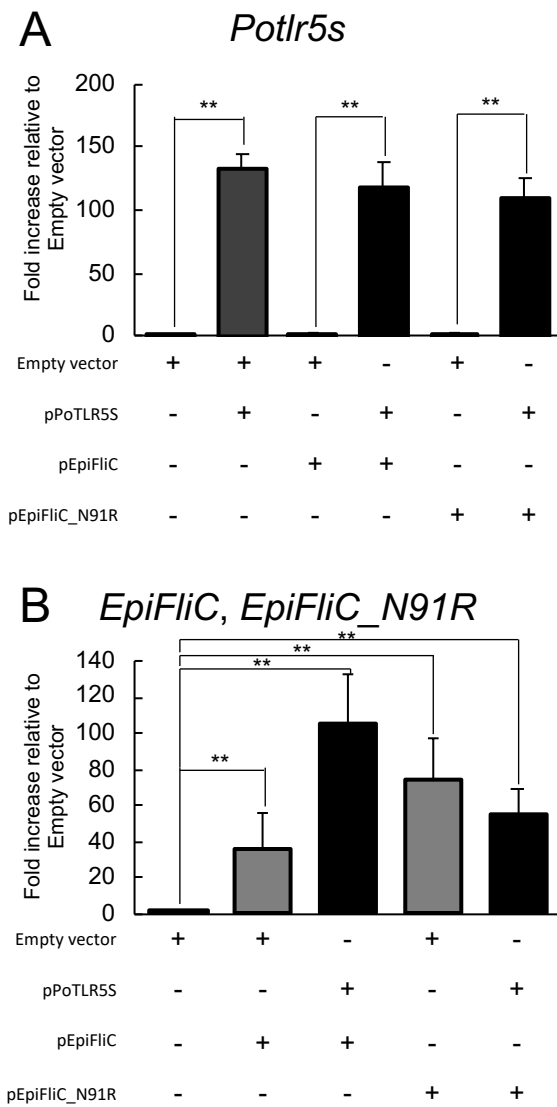


Fig. 3. Confirmation of overexpressing genes *Potlr5s*, *EpiFliC* and *EpiFliC_N91R* in HINAE cells. Expression of *Potlr5s* (A), *EpiFliC*, and *EpiFliC_N91R* (B) at 24 h post-transfection. Expression levels of all genes were normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n = 4, ** p<0.01).

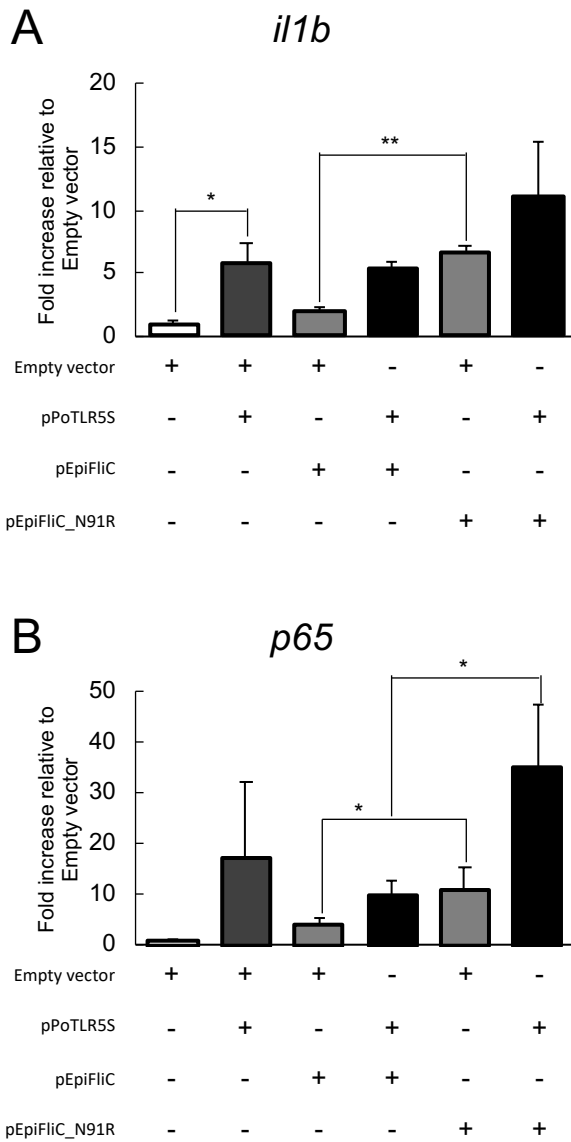


Fig. 4. Expression of inflammation-related genes in HINAE cells transfected with the expression vectors of *EpiFliC*, *EpiFliC_N91R*, and *Potlr5s*. The expression of the *il1b* (A) and *p65* (B) genes in HINAE cells transfected with pEpiFliC, pEpiFliC_M91R, and/or pPotlr5s. Expression levels of all genes were normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n = 4, * p<0.05, ** p<0.01).

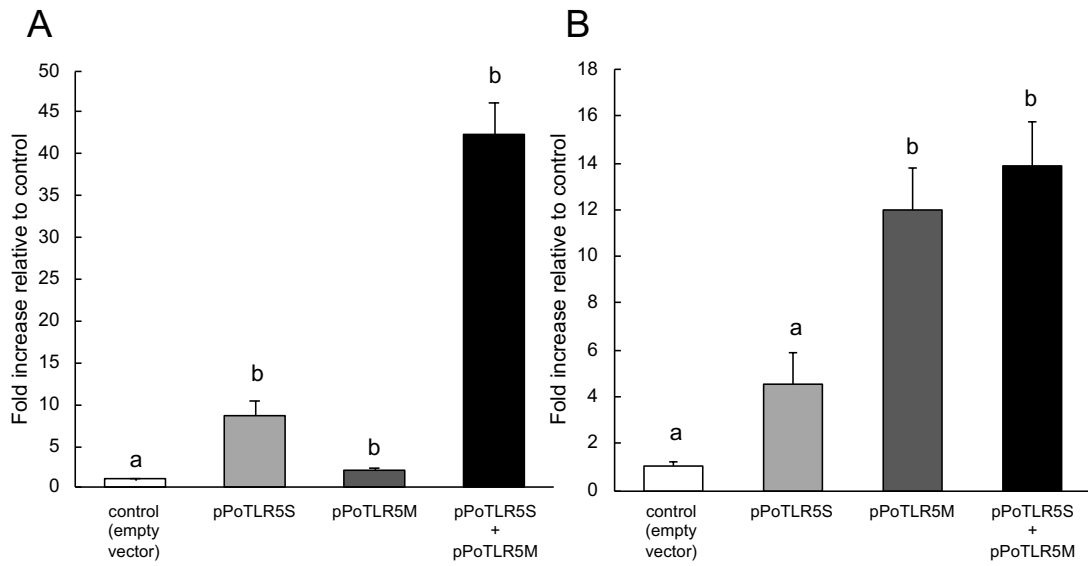


Fig. 5. Expression of *tlr5s* and *tlr5m* genes in HINAE cells transfected with expression vectors of two-types of TLR5. The expression levels of *Potlr5s* (A) and *Potlr5m* (B) in HINAE cells. Expression levels of these genes were normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n= 3). Symbols with different letters are significantly different at $p < 0.05$ with Dunnett test compared with control.

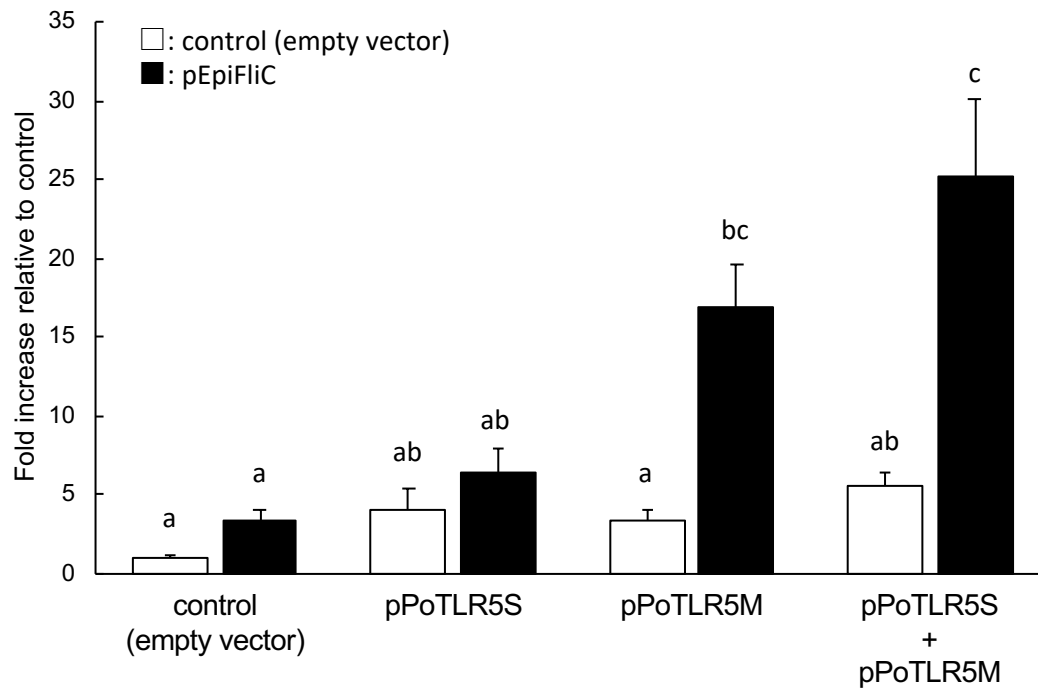


Fig. 6. Expression of *il1b* gene in HINAE cells transfected with expression vectors of *EpiFliC* or two-types of *tlr5*. Expression levels of *il1b* gene was normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n= 6). Symbols with different letters are significantly different at $p < 0.05$ with Tukey Kramer's multiple comparison test after a one-way ANOVA.

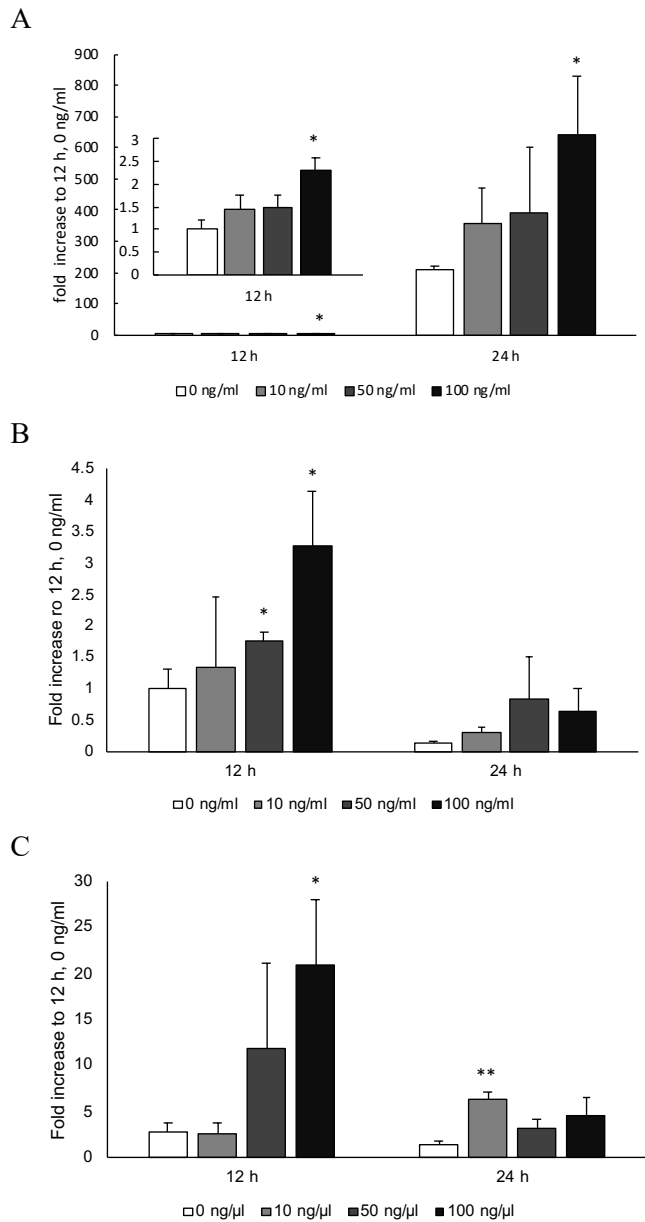


Fig. 7. Expression of inflammatory-related genes in HINAE cells stimulated with recombinant flagellin. The expression levels of *il1b* (A), *p65* (B) and *tnfa* (C) were normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs. Tukey Kramer's multiple comparison test after a one-way ANOVA was used for statistical analysis (n = 4, * p<0.05, ** p<0.01).

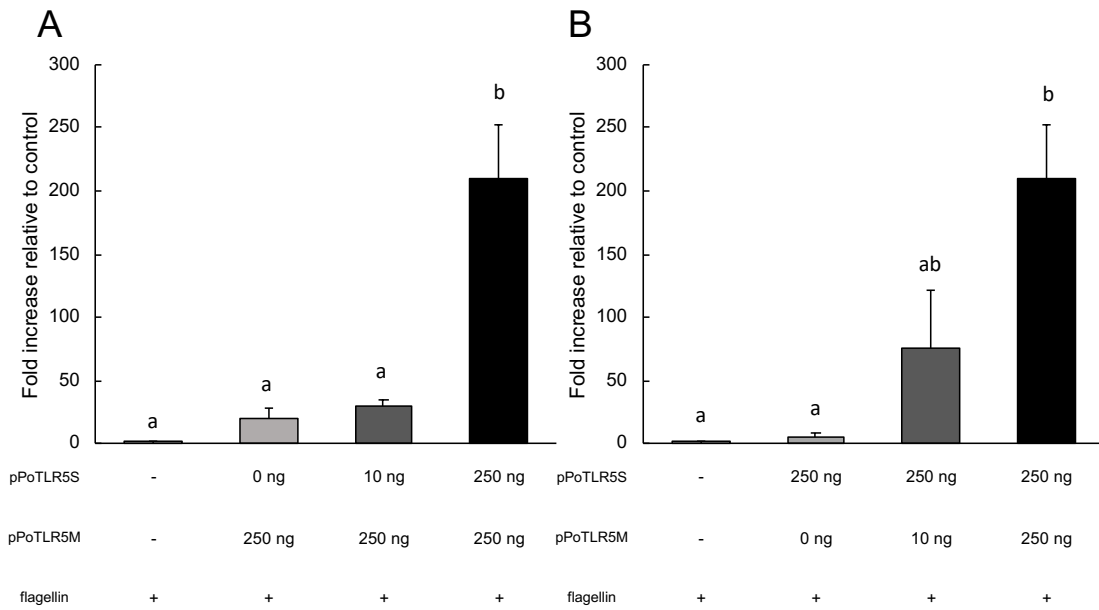


Fig. 8. Expression of *illb* gene in HINAE cells transfected with expression vectors of two-types of *tlr5* and stimulated with recombinant flagellin. Expression levels of *illb* gene was normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n= 3). Symbols with different letters are significantly different at $p < 0.05$ with Tukey Kramer's multiple comparison test after a one-way ANOVA.

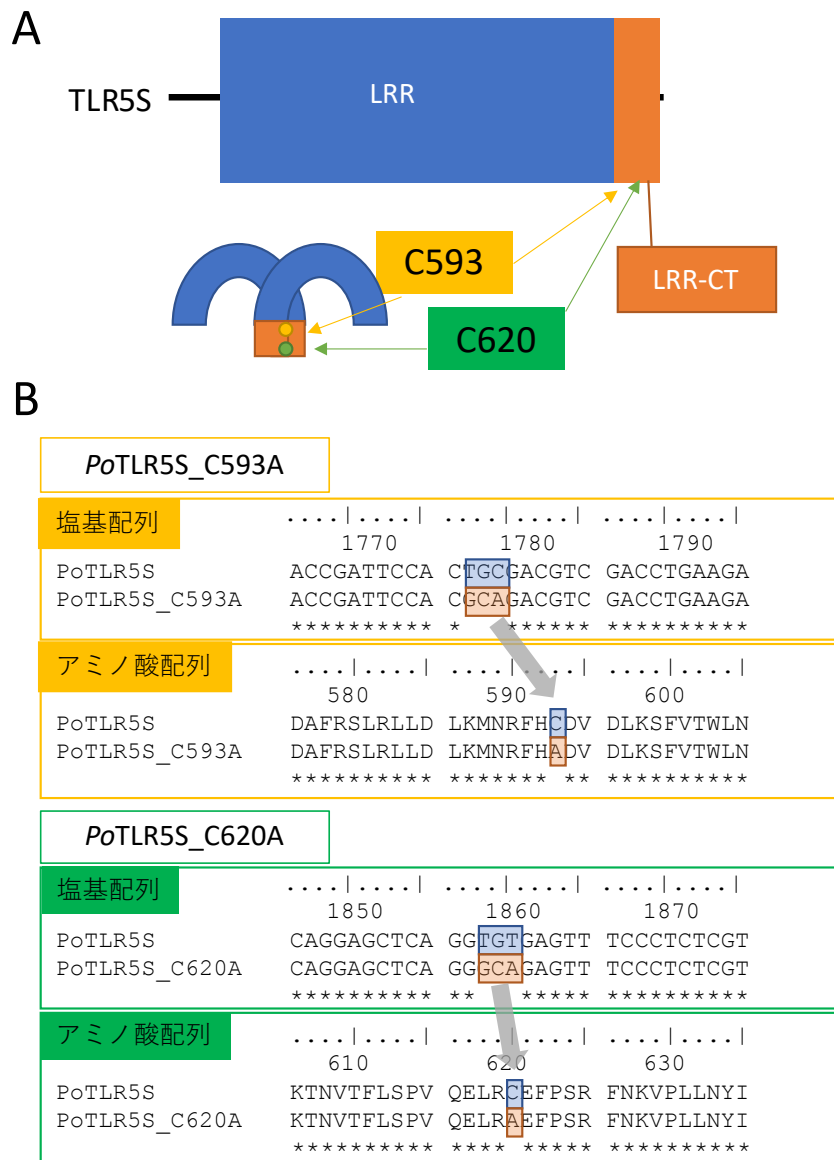


Fig. 9. Construction of mutated-Potlr5s expression vector. (A) The domain structure of Potlr5s. The orange box indicates LRR-CT region, and the yellow and green lines show the position of the 593rd and 620th cysteine residue (C593 and C620) in the PoTLR5S LRR-CT region. The amino acids are indicated in bold letters, and the arrow shows the position of the 593rd and 620th cysteine residue (C593 and C620) in the PoTLR5S LRR-CT region. (B) Mutated Potlr5s sequences. Based on pGEM_PoTLR5S plasmid, the triplet codon of “TGC” or “TGT” encoding cysteine (C593 or C620) in Potlr5s was mutated to “GCA” encoding alanine (A593 or A620).

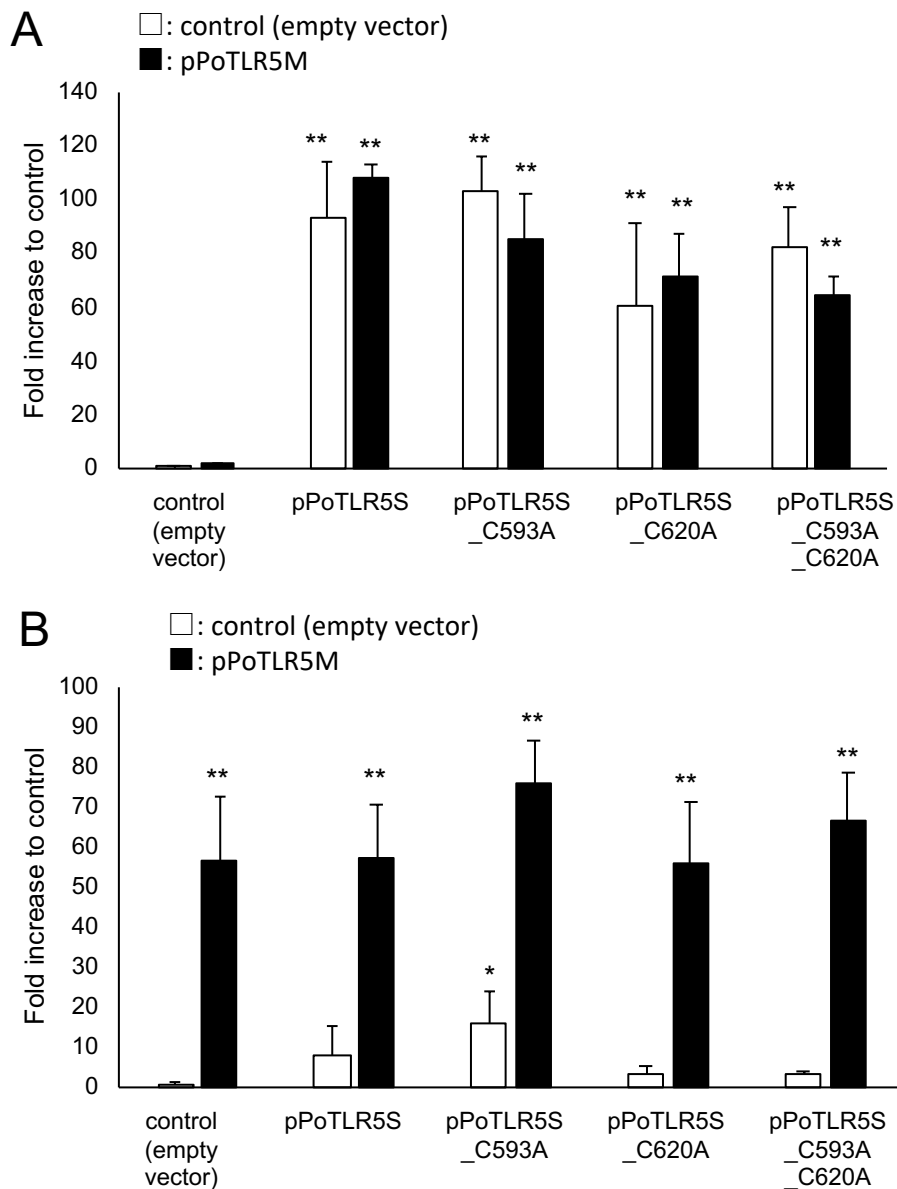


Fig. 10. Confirmation of overexpressing genes *Potlr5s*, mutated-*Potlr5s* and *Potlr5m* in HINAE cells. Expression of *Potlr5s* and mutated-*Potlr5s* (A) and *Potlr5m* (B) at 24 h post-transfection. Expression levels of all genes were normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n = 4, * p<0.05, ** p<0.01).

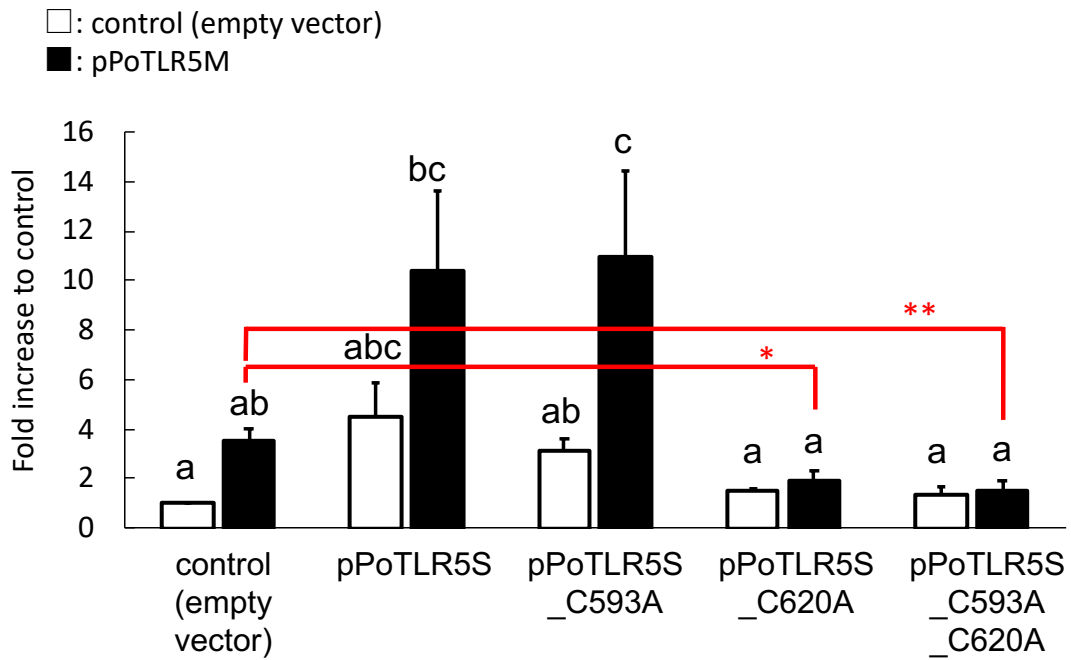


Fig. 11. Expression of *illb* gene in HINAE cells transfected with expression vectors of *Potlr5s* or mutated-*Potlr5s* and *Potlr5m*, and stimulated with recombinant flagellin. Expression levels of *illb* gene was normalized with *actb* and shown as fold increase values relative to the empty vector control. Error bars indicate mean \pm SEMs (n= 3). Symbols with different letters are significantly different at $p < 0.05$ with Tukey Kramer's multiple comparison test after a one-way ANOVA.

第3章 メダカにおける3種類の asc の同定およびその機能の解析

第1節 緒言

哺乳類において、ASC はインフラマソームの主要なアダプター分子として知られており、細胞質内における炎症の誘導に重要な役割を持っている。これまでに、ゼブラフィッシュ(Li et al., 2018)、ニシキテグリ(*Synchiropus splendidus*) (Sun et al., 2008)、ヒラメ(S. Li et al., 2016)、キンギョ(*Carassius auratus* L.) (Xie and Belosevic, 2016)、チャイロマルハタ (*Epinephelus coioides*) (Zhang et al., 2020)およびターボット (*Scophthalmus maximus*) (Wang et al., 2020)を含む魚類において asc の同定が行われた。しかし、メダカ (*Oryzias latipes*)において、asc の同定は行われていない。

メダカは、免疫学、毒物学およびゲノム解析を含む様々な分野において実験動物として用いられる淡水魚である。また、近交系統、トランスジェニック系統およびメダカのゲノム編集技術が既に確立されている。そこで、細菌感染時におけるメダカの ASC の機能を明らかにするために、ゲノム編集を用いた ASC 変異メダカの構築を行いたいと考えた。ゲノム編集を用いた ASC 変異メダカの構築を行うための基礎的知見として、本章においてメダカにおける asc の同定およびその遺伝子発現解析を行った。

第2節 材料および方法

3.2.1. 実験動物

メダカ Cab 系統は、本研究室で累代飼育したものを扱い、実験に用いる直前まで小型魚類飼育システム (株式会社名東水園, 愛知, 日本)内のプラスチック水槽において、水温 26 °C、明期 14 時間-暗期 10 時間の条件で飼育した。飼育時の給餌は、1 日に 2 回、孵化した *Artemia nauplii* (Brine shrimp eggs, Goldfish-ki, Fukuoka, Japan)および市販の粉末状の餌 (おとひめ B1, Marubeni Nisshin Feed Co., Ltd., Tokyo, Japan)を与えた。本試験は、

国内および国際ガイドライン (動物の愛護および管理に関する法律, 環境省) に従って実施した。

3.2.2. 3 種類のメダカ *asc* のクローニング

3.2.2.1. 3 種類のメダカ *asc* のプライマーの設計

Ensembl genome browser (<https://asia.ensembl.org/index.html>) を用いて、メダカ Hd-rR 系統における 3 種類の *asc* のオープンリーディングフレーム (ORF) 領域の全長塩基配列 (Ensembl ID. ENSORLT00000039664, ENSORLT00000041025 および ENSORLT00000030561) を入手した (Table 4)。これらの配列を参考にし、各遺伝子全長塩基配列を PCR で増幅し、pcDNA4-HisMaxA vector にクローニングするためのプライマーの設計を行った (Table 4)。

3.2.2.2. PCR による 3 種類のメダカ *asc* の増幅

PCR は、Cab 系統のメダカの腸管および腎臓由来の cDNA を鋳型とし、KOD One™ PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて各遺伝子を増幅した。PCR は、KOD One™ PCR Master Mix -Blue- 7.5 μ L、Forward Primer (5 μ M) 1 μ L、Reverse Primer (5 μ M) 1 μ L、cDNA template 1 μ L および nuclease-free water (Qiagen, Hulsterweg, Netherlands) 4.5 μ L を混合し、サーマルサイクラーを用いて 98 °C で 10 秒間の熱変性、55 °C で 15 秒間のアニーリング、68 °C で 5 秒間の伸長反応を 40 サイクル繰り返した。反応終了後、PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動 (100 V, 30 分間) し、増幅した DNA 断片の確認を行った。

3.2.2.3. DNA の精製および制限酵素処理

増幅した DNA は、Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 μ g) (NEW ENGLAND BioLabs

Inc., Massachusetts, USA) を用いて精製を行った。精製した DNA の末端を *EcoRI* (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Massachusetts, USA)、*XhoI* (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Massachusetts, USA) または *BamHI* (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用し、37 °C で 2 時間処理を行った。その後、さらに DNA の精製を行い、これをインサート DNA とした。また、pcDNA4-HisMaxA vector も同様に制限酵素処理後、DNA の精製を行い、これをベクターDNA とした。精製した DNA の濃度は NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 を用いて測定した。

3.2.2.4. ライゲーション

第 2 章-2.2.1.11.と同様の方法で行った。

3.2.2.5. コンピテントセルへのトランスフォーメーション

コンピテントセルへのトランスフォーメーションは第 2 章-2.2.1.3.と同様の方法で行った。トランスフォーメーション後、ampicillin (Wako, Osaka, Japan) を終濃度 100 µg/ml で添加した LB 寒天培地に 150 µL 植菌し、37 °C で一晩培養した。

3.2.2.6. コロニーPCR によるインサート DNA の確認

第 2 章-2.2.1.13.と同様の方法で行った。

3.2.2.7. プラスミド DNA 抽出

プラスミド DNA 抽出は、Monarch® Plasmid Miniprep Kit (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Massachusetts, USA) を用いて行った。プラスミドが導入された菌の培養液を 4 °C、8000 ×g、1 分間の遠心を行い、上清を除去し、菌を回収した。そして、菌に Resuspension Buffer 200 µl を添加し、ボルテックスで攪拌した。この菌液に Lysis Buffer 200 µl を添加し、転

倒混和後、室温で 5 分間静置することによって菌を溶解した。さらに、この液に Neutrization Buffer 400 μ l を添加し、転倒混和し、中和することで夾雑物をデブリスとした。この液を 4 °C、12000 \times g、10 分間遠心することで、上清にプラスミドを含む溶液を得た。この上清をカラムに添加し、4 °C、12000 \times g、1 分間遠心を行い、カラムにプラスミドを吸着させた。夾雑物の洗浄のために、Plasmid Wash Buffer 1 200 μ l をカラムに添加し、4 °C、12000 \times g、1 分間遠心を行った。さらに、Plasmid Wash Buffer 2 400 μ l をカラムに添加し、4 °C、12000 \times g、1 分間遠心を行カラムの洗浄を行い、さらに 4 °C、12000 \times g、2 分間の遠心を行うことによって、Washing Buffer に含まれるエタノールを除去した。最後に、nuclease-free water 50 μ l をカラムに添加し、1 分間室温で静置したのちに、4 °C、12000 \times g、1 分間遠心をするこで、プラスミド溶液の回収を行った。抽出したプラスミド DNA の濃度は、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 を用いて測定した。

3.2.2.8. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (Tokyo, Japan) の DNA シークエンスサービスにより行った。

3.2.3. *in silico* 解析

ドメイン構造解析および二次構造予測は Simple Molecular Architecture Research Tool (SMART version 7.0) (<http://smart.embl-heidelberg.de>) および PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) を用いて行った。また、塩基配列およびアミノ酸配列のアライメントは BioEdit v7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) を用い、系統樹解析は MEGAX (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて行った。タンパク質の立体構造解析は SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いて予測した。使用した全

ての配列の情報を Table 5 に示す。

3.2.4. 遺伝子発現解析

3.2.4.1. サンプルリング

実験魚は、Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt analytical standard (MS-222) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)を 4 mg/ml に蒸留水で調整後、飼育水で 20 倍希釈したものの (終濃度 0.2 mg/ml)に浸漬し、麻酔した後に組織のサンプルリングを行った。

3.2.4.2. Total RNA 抽出

Total RNA 抽出は、RNAiso Plus を用いて行った。サンプルリングしたメダカの組織を RNAiso Plus 600 μ L に入れ、Micro SmashTM MS-100 (TOMY, Tokyo, Japan) を用いて組織を粉砕し、室温で 5 分間静置した。その後、クロロホルム 200 μ L を添加し、激しく攪拌し、室温で 5 分間静置後、4 $^{\circ}$ C、12000 \times g で 15 分間遠心し、RNA を含む水層とゲノム DNA およびタンパク質の層に分離した。RNA を含む水層を回収し、イソプロパノール 300 μ L を添加し、転倒混和後、室温で 10 分間静置し、4 $^{\circ}$ C、12000 \times g で 10 分間の遠心を行い、RNA を沈殿させた。遠心後、上清を除去し、氷冷した 75%エタノールを 500 μ L 添加し、転倒混和後、4 $^{\circ}$ C、7600 \times g で 5 分間遠心し、洗浄した。もう一度、氷冷した 75%エタノールによる洗浄を行ったのちに、上清を除去し、室温で乾燥させ、nuclease-free water 13 μ L に溶解し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 で濃度を測定したものを total RNA 溶液とした。

3.2.4.3. cDNA 合成

抽出した total RNA 溶液を用いた cDNA 合成は第 2 章-2.2.4.2.と同様の方法で行った。以降の実験では、合成した cDNA を nuclease-free water で 10 倍希釈したものを cDNA

template として用いた。

3.2.4.4. qPCR

qPCR は、第 2 章-2.2.4.3.と同様の方法で行った。1 サンプルあたり、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mixes 7.5 μ L、Forward Primer (5 μ M) 1 μ L、Reverse Primer (5 μ M) 1 μ L、cDNA template 1 μ L および nuclease-free water 4.5 μ L の混合液を PCR 用 96 ウェルプレートに添加し、プレートシールで蓋をした。このプレートを CFX Connect 185 (Bio-Rad, California, USA)を用いて、95 $^{\circ}$ C で 3 分間の初期変性を行った後に、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、60 $^{\circ}$ C で 10 秒間の反応を 40 サイクル行った。また、プライマーの特異性を判断するための融解曲線解析のために、65 $^{\circ}$ C から 95 $^{\circ}$ C まで、0.5 $^{\circ}$ C ずつ温度を上昇させ、各温度帯で 5 秒間の反応を行った。得られたデータは $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行った(計算式: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{Sample}} - \Delta C_{t\text{Control}}$ 、発現量比 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$)(Schmittgen and Livak, 2008)。内部標準遺伝子として、メダカの細胞骨格遺伝子である β -actin (*actb*)を用い、各遺伝子の発現量を定量した。使用したプライマーは Table 4 に示す。

3.2.5. 細菌感染による刺激を与えたメダカにおける遺伝子発現解析

3.2.5.1. 使用した菌株および培養条件

Aeromonas hydrophila FPC-0866 株は、ウナギ病魚から単離された株であり、ストックは 20%グリセロール入り HI 液体培地で-80 $^{\circ}$ C 保存した。HI 寒天培地で 25 $^{\circ}$ C で 24 時間培養を行い、HI 液体培地にシングルコロニーを植菌後、24 時間培養したものを実験に用いた。*Edwardsiella piscicida* E381 株は、ティラピア病魚の腎臓から単離された株であり、ストックは 20%グリセロール (Wako, Osaka, Japan)入り Heart Infusion (HI) (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) 液体培地で-80 $^{\circ}$ C 保存した。使用する際に、HI 寒天培地で 25 $^{\circ}$ C で 48 時間培養を行い、HI 液体培地にシングルコロニーを植菌後、

48 時間培養したものを実験に用いた。

3.2.5.2. 感染方法

メダカへの感染は *A. hydrophila* (4.3×10^7 CFU/ml) または *E. piscicida* (2.5×10^6 CFU/ml) を含む飼育水に浸漬することで行った。両細菌を上記条件で培養後、 $3000 \times g$ で 10 分間遠心し、phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、PBS に懸濁した。その後、PICOSCOPE (Ushio Inc., Tokyo, Japan) を用いて吸光度の測定を行い、菌の濃度を調整し、感染させる水槽の飼育水中に菌懸濁液を加えた。感染試験中、1 日に水槽の 5 分の 1 量を新しい飼育水に換水した。また、細菌感染時の実際の菌濃度はプレートカウント法により、希釈菌液を HI 寒天培地に植菌した際のコロニーをカウントして算出した。さらに、*A. hydrophila* または *E. piscicida* 感染の確認のために、感染魚の頭腎および肝臓から菌を分離し、分離された菌のコロニーを *A. hydrophila* または *E. piscicida* 特異的なプライマー (Table 4) で PCR することにより確認した。

3.2.5.3. 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には、各時間において無作為に 5 匹を取り出し、第 2 節-4 と同様の方法で麻酔後、鰓、腸管、腎臓、表皮および脾臓のサンプリングを行い、qPCR による遺伝子発現解析を行った。方法は 3.2.4. に従った。さらに、細菌感染の組織における影響を確認するために *il8* の発現を解析した。使用したプライマーは Table 4 に示す。

3.2.6. 刺激剤で刺激した培養細胞における遺伝子発現解析

3.2.6.1. 使用した培養細胞および培養条件

メダカ HNI 系統の尾鰭由来の培養細胞である OLHNI-2 細胞 (Hirayama et al., 2006) は、20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France) および 1% penicillin/streptomycin を

添加した Leibovitz's L-15 Medium で、33 °C で培養した。

3.2.6.2. 培養細胞の刺激

OLHNI-2 細胞を Nuncolon™ Delta Surface 24-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) に 5×10^5 cells/well 播種し、24 時間後に Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 25 µg/ml、Nigericin Sodium Salt (Wako, Osaka, Japan) 20 µM または Adenosine-5'-triphosphate (ATP) (Roche, Basel, Switzerland) 1 mM で刺激を与え、刺激後 12 および 24 時間でサンプリングを行った。

3.2.6.3. 遺伝子発現解析

3.2.4. と同様の方法で qPCR による遺伝子発現解析を行った。使用したプライマーは Table 4 に示す。

3.2.7. 統計解析

統計解析は Tukey-Kramer 法による一元配置分散分析を使用した。また、細胞刺激における遺伝子発現解析における有意差は、Student's *t* 検定を用いて両側検定することにより求めた。

第3節 結果

3.3.1. メダカ Cab 系統における 3 種類の *asc* の同定

メダカ Cab 系統から *asc* をクローニングするために、Ensembl genome database を探索した結果、ゼブラフィッシュの *pycard* (*asc*) の相同遺伝子としてメダカ Hd-rR 系統には 3 種類の *asc* が存在することが明らかになった。また、その他のメダカの HNI および HSOK 系統にも *asc* が 3 種類存在した。これらの 3 種類の *asc* をそれぞれ *asc1* (Hd-rR 系

統 : ENSORLG00000025688, HNI 系統 : ENSORLG00020010801, HSOK 系統 : ENSORLG00015016623)、*asc2* (Hd-rR 系統 : ENSORLG00000026281, HNI 系統 : ENSORLG00020010819, HSOK 系統: ENSORLG00015016700)および *asc3* (Hd-rR 系統: ENSORLG00000024983, HNI 系統 : ENSORLG00020010756, HSOK 系統 : ENSORLG00015016594)とした (Table 5)。さらに、メダカの *asc* とその他の生物の *ASC* 遺伝子を比較するために、データベース上で探索を行った。ヒトおよびマウスにおいて、1つの *ASC* がゲノム上に存在した (Table 5)。一方で、ヒトやマウス以外の哺乳類、爬虫類、両生類および魚類の複数種において、複数の *ASC* がゲノム上に存在した (Table 5)。また、メダカのすべての系統において、3種類の *asc* 遺伝子は16番目の染色体上に並列して存在していた (Table 5)。ネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*)およびフウセイ (*Larimichthys crocea*)などの生物種においても同様に *asc* が同じ染色体またはスキファールド上で並列して存在していたが、キンギョやニジマスなどの生物種においては異なる染色体またはスキファールド上に複数の *asc* が存在していた (Table 5)。また、ゼブラフィッシュ、ターボット、フグ (*Takifugu rubripes*)およびヨーロッパヘダイなどの生物種においては、1つの *asc* のみを有した (Table 5)。

3.3.2. シンテニーおよびゲノム構造解析

ASC のゲノム上における位置や方向について、Ensembl Genome Database を用いて解析した。シンテニー解析において、メダカ Hd-rR 系統の3種類の *asc* は並列して存在し、*si:ch211-225p5.8*、*gramd1a*、*scn1ba*、*psmc4*、*si:dkey-199f5.8*、*tbx20*、*herpud2* および *pkdc* が周辺遺伝子として存在した (Fig. 12)。これらの周辺遺伝子のうち、いくつかはターボット、フグおよびゼブラフィッシュにおいても保存されていたが、ヒト、マウス、ネッタイツメガエルおよびフウセイにおいては保存されていなかった (Fig. 12)。さらに、メダカ以外の魚種においては *fli1b*、*etv2*、*lsr*、*mag* および *zp3d.2* が *asc* の周辺遺伝子と

して存在していたが、メダカ、ヒト、マウスおよびネツタイツメガエルにおいては存在しなかった (Fig. 12)。また、周辺遺伝子はヒト、マウスおよびネツタイツメガエル間で類似していたのにも関わらず、哺乳類と魚類間では完全に異なっていた。

メダカ Hd-rR 系統の *asc1*、*asc2* および *asc3* は、それぞれ 5 エキソン/4 イントロン、3 エキソン/2 イントロンおよび 2 エキソン/1 イントロンで構成されていた (Fig. 13)。魚類、両生類および鳥類においては様々なエキソン/イントロン構造が存在したが、哺乳類においては 3 エキソン/2 イントロンであった (Fig. 13)。

3.3.3. *asc* のクローニングおよびシーケンス解析

本章において、メダカ Cab 系統の 3 種類の *asc* のクローニングを行い、配列を決定した (GenBank acc. No. LC530061, LC568547 および LC568548)。メダカ Cab 系統の *asc1*、*asc2* および *asc3* の cDNA の ORF 領域の塩基配列はそれぞれ 555-、660-および 618-塩基対 (bp)であり、184-、219-および 205-残基 (aa)のアミノ酸をコードしていることが予測された。また、ASC-1、ASC-2 および ASC-3 のタンパク質の質量は、それぞれ 20.91、23.47 および 22.35 kDa と推定された。メダカ Cab 系統の *asc1* の ORF 領域の塩基配列は Hd-rR 系統の *asc1* とほぼ一致しており、塩基配列および演繹されたアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 99.8 および 99.4%であった (Fig. 14)。メダカ Cab 系統の *asc1* 塩基配列において 291 番目がアデニン(A)であったのに対し、Hd-rR 系統ではチミン(T)であった (Fig. 14)。そのことにより、演繹されたアミノ酸配列において、Hd-rR 系統では 99 番目にセリン残基(S)がコードされていたのに対し、Cab 系統ではチロシン残基(T)に置換されていた (Fig. 14)。メダカ Cab 系統の *asc1* と HNI 系統および HSOK 系統の *asc1* の塩基配列の相同性はそれぞれ 98.9 および 97.6 %であり、演繹されたアミノ酸配列の相同性は 97.8 および 96.1 %であった (Fig. 14)。また、メダカ Cab 系統の *asc2* の ORF 塩基配列は 660-bp であったのに対し、Hd-rR 系統、HNI 系統、HSOK 系統でそれぞれ

537-、573-および 573-bp であり、Cab 系統と比較した相同性はそれぞれ 77.5、75.0 および 71.8%と *asc1* に比べて低かった (Fig. 15)。メダカ Cab 系統の *asc2* の演繹されたアミノ酸配列は 219-aa であったのに対し、Hd-rR 系統、HNI 系統および HSOK 系統でそれぞれ 178-、190-、190-aa がコードされており、Cab 系統の ASC-2 と比較したアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 75.3、69.8 および 66.9 %であった (Fig. 15)。メダカ Cab 系統の *asc3* の ORF 塩基配列および演繹されたアミノ酸配列は 618-bp および 205-aa であったのに対し、Hd-rR 系統、HNI 系統および HSOK 系統でそれぞれ 600-、606-および 315-bp、199-、201-および 104-aa であった (Fig. 16)。Cab 系統の *asc3* 塩基配列と Hd-rR および HNI 系統の *asc3* の配列を比較すると、塩基配列で 96.1 および 81.9%、アミノ酸配列で 96.5 および 77.6%であり、高い相同性を示した (Fig. 16)。一方で、Cab 系統と HSOK 系統間では塩基配列で 44.4%、アミノ酸配列では 44.3%であり、相同性は低かった (Fig. 16)。これらのことから、*asc2* および *asc3* はメダカの系統間で多様な遺伝子配列を有することが示唆された。

メダカ Cab 系統の *asc1*、*asc2* および *asc3* の演繹されたアミノ酸配列は、PYD (それぞれ 6-86、3-83 および 3-83 aa の位置する)および CARD (それぞれ 100-183、136-219 および 121-205 aa に位置する)の 2 つの機能ドメインを有した (Fig. 17A)。これらの 2 つのドメインはメダカの 3 種類の ASC とその他の生物種の ASC に高く保存されていた (Fig. 17A)。さらに、哺乳類の PYD および CARD ドメインで繊維状構造を形成するために重要な電荷を持っている残基のうち、PYD ドメインの E13、R38、R41、D54、Q83 および CARD ドメインの E130、D134、Y146、R150、D191 がメダカの ASC-1 で高く保存されていた (Fig. 17A)。一方で、メダカの ASC-2 および ASC-3 では、特に CARD ドメインで ASC-1 と比較して保存性は低かった (Fig. 17A)。メダカの ASC-1 アミノ酸配列の全長の相同性および類似性は、その他の魚種と比較するとそれぞれ 28.2-44.8% および 42.6-63.8%であったのに対し、メダカ ASC-2 では 19.2-28.6% および 32.2-45.7%、メ

メダカ ASC-3 では 21.0-31.1% および 35.5-51.2% であり、メダカ ASC-2 および ASC-3 の他の魚種との相同性および類似性はメダカ ASC-1 と比較して低かった (Table 3)。また、タンパク質の 2 次構造については、メダカの 3 種類の ASC は、両ドメインが 6 つの α -ヘリックス構造で構成され、ヒトの ASC と類似していた (Fig. 17A)。さらに、3 種類のメダカの ASC とその他の生物種のタンパク質の立体構造を比較するために、ヒトの ASC を基に立体構造の予測を行った。その結果、すべての生物種で PYD と CARD 領域は類似した構造を示したが、PYD と CARD の間の接続領域は多様な構造を示した (Fig. 17B)。

分子系統解析は、近隣接合法を用いて、ブートストラップ値 1000 回で行った。シーラカンス (*Latimeria chalumnae*) を除くすべての魚類の ASC は、哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類を含むその他の ASC とは異なるクラスターを形成した (Fig. 18)。メダカ Cab 系統の ASC-1 はフウセイ、フグおよびターボットの ASC と同じクラスターに属し、ASC-2 および ASC-3 はプラティ (*Xiphophorus maculatus*) の ASC と同じクラスターに属していた (Fig. 18)。

3.3.4. メダカの組織における 3 種類の *asc* の発現

メダカの *asc1*、*asc2* および *asc3* の脳、鰓、腸管、肝臓、筋肉、表皮、脾臓および腎臓を含む様々な組織における相対的な遺伝子の発現量を定量するために、qPCR を行った。すべての *asc* の mRNA はすべての組織で発現しており、*asc1* の発現量は、表皮、鰓、腸管、腎臓および肝臓において *asc2* および *asc3* の発現量より有意に高かった (Fig. 19)。特に、鰓および表皮における *asc1* および *asc2* の発現は他の組織より高かった (Fig. 19)。

3.3.5. メダカの *A. hydrophila* および *E. piscicida* 感染時における 3 種類の *asc* の発現動態

細菌感染時の 3 種類の *asc* の発現パターンを明らかにするために、細胞外増殖性細菌である *A. hydrophila* および細胞内寄生性細菌である *E. piscicida* を感染させたメダカの鰓、腸管、腎臓、表皮および脾臓における 3 種類の *asc* の発現量を qPCR で解析した。*A. hydrophila* 感染時の腸管、腎臓および脾臓におけるすべての *asc* の発現に変化は見られなかった (Fig. 20)。一方で、*A. hydrophila* 感染時の表皮において、*asc1* の発現は感染後 12 時間で有意に上昇した (Fig. 20)。さらに、*A. hydrophila* 感染時の鰓においては、*asc1* および *asc2* の発現は感染後 12 時間から 24 時間にかけて有意に減少した (Fig. 20)。*E. piscicida* 感染時には、腎臓、表皮および脾臓におけるすべての *asc* の発現に変化は見られなかった (Fig. 21)。しかし、*E. piscicida* 感染時の鰓において、*asc2* および *asc3* の発現は有意に減少した (Fig. 21)。加えて、*E. piscicida* 感染時の腸管においても、*asc2* の発現量は有意に減少した (Fig. 21)。また、細菌感染の影響を調べるために、*il8* の発現量の解析も行った。その結果、*A. hydrophila* 感染後 24 時間の腎臓および 72 時間の脾臓において、*il8* の発現は有意に上昇した (Fig. 20)。一方で、*E. piscicida* 感染時の表皮においては感染後 12 時間から 24 時間にかけて有意に上昇したが、感染後 24 時間から 48 時間にかけて有意に減少した (Fig. 21)。

3.3.6. インフラマソーム刺激剤で刺激したメダカ培養細胞における 3 種類の *asc* の発現

ASC はインフラマソームのセンサー分子と下流の Casp-1 を接続し、炎症を誘導するための重要なアダプター分子である。そこで、インフラマソーム刺激剤で刺激した際の 3 種類の *asc* の発現動態を比較するために、メダカの尾鰭由来の培養細胞である OLHNI-2 細胞を LPS、ATP、およびナイジェリシンで 12 または 24 時間刺激した場合における

3種類の *asc* の発現量を qPCR で解析した。最初に、無刺激状態の OLHNI-2 細胞における *asc1*、*asc2* および *asc3* の発現量を比較すると、*asc1* の発現は *asc2* および *asc3* よりも有意に高かった (Fig. 22)。次に、インフラマソーム刺激剤で刺激した際の *asc* の発現動態を見てみると、3種類の *asc* は LPS 刺激後に有意な発現変動が見られなかった (Fig. 22)。一方で、ATP 刺激時の *asc1* の発現は、刺激後 12 時間で有意に減少し、24 時間で上昇する傾向が見られた (Fig. 22)。それに加えて、ATP 刺激後 12 時間における *asc2* および *asc3* の発現も有意に減少した (Fig. 22)。しかし、ナイジェリシン刺激後 24 時間の *asc2* の発現は有意に上昇した (Fig. 22)。

第4節 考察

ASC は細胞質で炎症応答を活性化するために重要なインフラマソームの中心となるアダプター分子である。さらに、ASC は ASC スペックを介して Casp-1 を活性化する (Schroder and Tschopp, 2010)。本章において、メダカ Cab 系統において存在する 3種類の *asc* の ORF 領域の塩基配列を決定し、細菌感染およびインフラマソームの刺激剤により刺激した場合における 3種類の *asc* の遺伝子発現動態を明らかにした。

哺乳類において、ASC はインフラマソームのセンサー分子と下流の Casp-1 と結合するために重要な 2つの機能ドメインである PYD および CARD を有する (Lu and Wu, 2015)。本章において、3種類のメダカ ASC すべてが PYD および CARD を有することを明らかにした。一方で、3種類の ASC における PYD と CARD の間の接続領域の配列および予測された立体構造は保存性が低く、特に ASC-2 の接続領域は他の ASC と比べて長かった。この領域は、その他の生物種間においても PYD および CARD 領域と比較して保存性が低かった。ヒト ASC において、2つのドメインの接続領域は、ASC の立体構造において PYD と CARD が結合することを防ぐ働きを持つことが知られており、この構造は ASC 以外の分子との PYD-PYD および CARD-CARD 相互作用による結合に

は影響しない (de Alba, 2019; Li et al., 2018)。確かに、3 種類のメダカ ASC の立体構造は PYD と CARD が離れており、他の生物種と同様の立体構造を示した (Fig. 17B)。これらのことから、メダカの 3 種類の ASC の PYD と CARD の接続領域は領域の長さおよび保存性に関わらず、他の生物種と同様の役割を持つことが示唆された。また、ASC-2 および ASC-3 は ASC-1 と比較して、PYD-PYD および CARD-CARD 相互作用を引き起こすために重要な残基の保存性が低かった。これらの重要な残基は ASC の立体構造において表面上に存在し、電荷を有することで PYD または CARD の相互作用による ASC の繊維状化を引き起こす (Moriya et al., 2005)。メダカにおいて、ASC-1 には両ドメインの電荷を有する残基が十分に保存されていた。一方で、ASC-2 および ASC-3 には保存されている残基が少なく、特に CARD ドメインにおいて保存されている残基が少なかった。これらのことから、ASC-2 および ASC-3 は CARD-CARD 相互作用が弱い、または全く機能しないことが示唆された。したがって、3 種類のメダカ ASC の機能および役割をより詳細に解明するためには、ASC スペックの形成や Casp-1 の活性化の確認を行う必要がある。

哺乳類および複数の魚種において、ASC は様々な組織で発現することが知られている (S. Li et al., 2016; Li et al., 2018; Junya Masumoto et al., 2001; Masumoto et al., 1999; Sun et al., 2008; Xie and Belosevic, 2016; Zhang et al., 2020)。メダカにおいても同様に、脳、肝臓、脾臓、腎臓、腸管、筋肉、鰓および表皮を含む様々な組織で 3 種類の *asc* mRNA が検出された。メダカにおいては、特に表皮および鰓における 3 種類の *asc* の発現量が高かった。鰓と表皮における *asc* の発現量が高いことが他の魚種においても報告されている (S. Li et al., 2016; Li et al., 2018; Sun et al., 2008; Xie and Belosevic, 2016; Zhang et al., 2020)。これらの結果から、*asc* は外界の環境に面している組織において高く発現していることが示唆された。さらに、それぞれの組織における 3 種類の *asc* 間で発現量を比較すると、*asc1* の発現量は、脳以外のすべての組織で高く、特に、表皮、鰓、腸管、腎臓および肝

臓において *asc2* および *asc3* よりも有意に高かった。このことから、メダカにおいて、*asc1* が優勢的な *asc* として発現していることが示唆された。哺乳類において、ASC は脾臓などの免疫関連組織において高い発現が見られ (J. Masumoto et al., 2001)、同様の傾向がキンギョおよびゼブラフィッシュの組織においても示されている (Li et al., 2018; Xie and Belosevic, 2016)。さらに、ニシキテグリにおいても *asc* の発現は、魚類の免疫関連組織である頭腎、脾臓および体腎で高い発現が見られた (Sun et al., 2008)。ヒトにおいて、ASC mRNA は多量のリンパ球を含む脾臓において発現量が高いが、CD3 陽性 T リンパ球および CD20 陽性 T リンパ球では ASC mRNA の発現は検出されない (J. Masumoto et al., 2001)。一方で、ヒトの ASC は末梢血白血球 (PBLs) 中の CD14 陽性単球ににおいて発現している (J. Masumoto et al., 2001)。さらに、ヒラメおよびキンギョにおける *asc* の発現は、マクロファージおよび PBLs で高い (S. Li et al., 2016; Xie and Belosevic, 2016)。メダカの仔魚において、マクロファージは全身、特に腸管、鰭および表皮に広がる (S. Li et al., 2016)。さらに、メダカの成魚において、マクロファージは腎臓にも存在する (S. Li et al., 2016)。3 種類の *asc* の発現量が表皮で高かった原因として、表皮のマクロファージの存在量が多かった可能性が考えられ、他の魚種と同様にメダカの 3 種類の *asc* もマクロファージでの発現が高いことが示唆された。

哺乳類において、インフラマソームが複数種の病原細菌感染に対して生体防御に貢献しすることが報告されている (Mariathasan et al., 2005; McElvania Tekippe et al., 2010)。また、ターボットにおいては、ASC の発現によって肝臓、脾臓、腎臓および腸管における *E. piscicida* 感染時の細菌数が抑制されたという報告がある (Wang et al., 2020)。*A. hydrophila* 感染時のメダカの腸管、腎臓および脾臓において、3 種類すべての *asc* の発現動態に変化が見られなかったが、*il8* の発現は有意な変動が見られた。*Staphylococcus aureus* 感染時のゼブラフィッシュの仔魚においても同様に *asc* の発現動態に変化は見られなかったが、*il1b* の発現は有意に上昇している (Li et al., 2018)。一方で、メダカの表皮

において *A. hydrophila* 感染 12 時間において *asc1* の発現は他の時間に比べて有意に上昇し、*asc2* および *asc3* についても同様な傾向が見られたが、*il8* の発現は有意な変動が見られなかった。哺乳類において、*IL-1 β* および *IL-8* の発現は、転写因子である NF- κ B により制御されているが (Liu et al., 2017)、ASC の発現はアポトーシス関連分子であると同時に転写因子でもある p53 により制御されている (Protti and De Monte, 2020)。これらのことから、メダカの 3 種類の *asc* の発現は *il8* の発現とは異なる転写因子により制御されていることが示唆された。また、メダカの鰓および腸管において、*E. piscicida* 感染時に *asc2* の発現量は有意に減少し、鰓において *asc3* の発現量も有意に減少した。ヒラメの鰓においても、*E. piscicida* 感染時の鰓において、感染後 8 および 12 時間で *asc* の発現が有意に減少しており、ターボットにおいても *E. piscicida* 感染後に鰓での *asc* の発現が有意に減少している。*E. piscicida* は病原関連因子として III 型および VI 型分泌装置 (T3SS および T6SS) を有するという報告がある (Protti and De Monte, 2020)。哺乳類において、T3SS は NLRP3 および NLRC4 インフラマソームを活性化するが、T6SS は ASC の多量体化を阻害することで、NLRP3 インフラマソームを抑制する (Protti and De Monte, 2020)。しかし、*E. piscicida* による ASC の転写制御については哺乳類においても明らかになっていない。これらのことから、メダカにおいて *E. piscicida* の T6SS はこれらの *asc* の発現を抑制することが推察された。ターボットにおいて、肝臓、脾臓、腎臓および腸管を含む様々な組織における *asc* の発現によって細菌を排除する効果があることが示唆された (Protti and De Monte, 2020)。細菌感染と *asc* の関連性を明らかにするためには、将来的にその下流のシグナルをより詳細に調査する必要があると考える。

哺乳類において、LPS、ATP およびナイジェリシンはインフラマソームを活性化し、Casp-1 を活性化するために ASC を誘導することが知られている。フグの頭腎および頭腎から単離した白血球において、ナイジェリシンまたはナイジェリシン+LPS で刺激をすると *asc* の発現が有意に上昇した (Biswas et al., 2016)。また、ヒラメにおいて、LPS

刺激後 24 時間の頭腎由来のマクロファージ (HKMs) および PBLs、ATP 刺激後 12 時間の HKMs において *asc* の発現は有意に上昇した (S. Li et al., 2016)。さらに、チャイロマルハタの脾臓細胞において、ATP 刺激後 12 および 24 時間で *asc* の発現が上昇した (Zhang et al., 2020)。一方で、キングョのマクロファージを ATP および LPS で刺激しても *asc* の発現には変化が見られず、ナイジェリシン刺激後 6 および 12 時間においては *asc* の発現が有意に上昇した (Xie and Belosevic, 2016)。メダカの 3 種類の *asc* の発現は ATP 刺激後 12 時間で有意に減少し、刺激後 24 時間で上昇する傾向が見られた。さらに、メダカの *asc2* の発現量はナイジェリシン刺激後 12 時間で上昇傾向が見られ、刺激後 24 時間で有意に上昇した。これらの結果から、刺激剤により誘導される *asc* の発現動態は生物種およびメダカにおけるそれぞれの *asc* によって異なることが示唆された。

Table 4. Oligonucleotide sequences used in this study.

name	sequences (5' -> 3')	mer (bp)
<i>Primers for cloning into pcDNA4-HisMax A vector:</i>		
P#1730_Ol_ASC-1_EcoRI_cl-F1	CATGAATTCTGGAGTCCAAAACCCCCAG	28
P#1731_Ol_ASC-1_XhoI_cl-R1	CAGCTCGAGTAACTGTTTCCTTCAAGGTC	30
P#1732_Ol_ASC-2_EcoRI_cl-F1	CATGAATTCTGTGCGCCAAAAAAGCTCT	28
P#1733_Ol_ASC-2_XhoI_cl-R1	CATCTCGAGTAACTCCTCTCCAGTCTGG	29
P#1734_Ol_ASC-3_BamHI_cl-F1	CATGGATCCTGTGCGCCAAAAAAGCTCTG	29
P#1735_Ol_ASC-3_XhoI_cl-R1	GCTCTCGAGTCAGTTTTCCAAAAGCTCATC	30
<i>Primers for qPCR analysis:</i>		
P#1328_ol_ASC_qPCR_Fw_5	GTGGTCGCAGATGTGATG	18
P#1226_ol_ASC_qPCR_1_Rv	CGCCTCATT CAGGAGCTGCT	20
P#1820_Ol_ASC-1_rt_F7	GAGACGCTGGAGGATCTGAC	20
P#1821_Ol_ASC-1_rt_R7	TTTTCTCCGTGAAGGTGGAG	20
P#1724_Ol_ASC-2_rt_F2	CAGGGAGCTGATTCAGGAAG	20
P#1725_Ol_ASC-2_rt_R2	CTGCAGGTCATCACAGAGGA	20
P#1726_Ol_ASC-3_rt_F1	TGACCGACACTGATCCTCTG	20
P#1727_Ol_ASC-3_rt_R1	ATCTCACAGGTGGCTTTGCT	20
P#1403_Ol_IL-8_rt_F1	GGACCCTGGTTGTCCTCATT	20
P#1404_Ol_IL-8_rt_R1	CCCGCTATGACTTCAGTCTCTG	22
P#1151_ol_b-actin_2F	CCACCATGTACCCTGGAATC	20
P#1152_ol_b-actin_2R	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	20

Table 5. ASC genes from various species on Ensembl genome database.

(family)	species	gene name	Ensembl gene ID	chromosome (scaffold)	location	replication	
Mammals	Beluga whale (<i>Delphinapterus leucas</i>)	PYCARD (ASC-1)	ENSDLEG 00000015873	ML702058.1	33,429,877- 33,432,053	tandem	
		ASC-2	ENSDLEG 00000020364	ML702058.1	26,984,115- 26,985,292		
	Dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>)	PYCARD (ASC)	ENSTTRG 00000017403	scaffold_ 82233	1,552- 2,729	no	
	Human (<i>Homo sapiens</i>)	PYCARD (ASC)	ENSG 00000103490	16	31,201,486- 31,203,450	no	
	Mouse (<i>Mus musculus</i>)	Pycard (ASC)	ENSMUSG 00000030793	7	127,989,708- 127,993,867	no	
	Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	PYCARD (ASC)	ENSOCUG 00000004495	GL018752	1,101,459- 1,102,532	no	
	Sperm whale (<i>Physeter catodon</i>)	ASC-1	ENSPCTG 00005005590	14	62,364,611- 62,365,915	different scaffold	
		ASC-2	ENSPCTG 00005012637	ML160739.1	30,282- 31,457		
	Bird	Turkey (<i>Meleagris gallopavo</i>)	ASC	ENSMGAG 00000007141	GL426153.1	5,790- 10,695	no
	Reptiles	Abingdon island giant tortoise (<i>Chelonoidis abingdonii</i>)	ASC-1	ENSCABG 00000010282	PKMU 01001808.1	32,955- 58,174	tandem
ASC-2			ENSCABG 00000010294	PKMU 01001808.1	70,673- 121,973		
ASC-3			ENSCABG 00000010318	PKMU 01001808.1	93,338- 111,918		
ASC-4			ENSCABG 00000010319	PKMU 01001808.1	130,545- 296,046		
ASC-5			ENSCABG 00000010322	PKMU 01001808.1	178,243- 182,537		
ASC-6			ENSCABG 00000013216	PKMU 01001695.1	135,588- 204,109		
Agassiz's desert tortoise (<i>Gopherus agassizii</i>)		ASC	ENSGAGG 00000012688	PPEB 01009166.1	2,859- 23,330	no	
Anole lizard (<i>Anolis carolinensis</i>)		PYCARD (ASC)	ENSACAG 00000006690	GL343220.1	2,341,931- 2,344,972	no	
Central bearded dragon (<i>Pogona vitticeps</i>)		PYCARD (ASC)	ENSPVIG 00000004975	CEMB 01009668.1	878,723- 883,136	no	
Chinese softshell turtle (<i>Pelodiscus sinensis</i>)		ASC-1	ENSPSIG 00000006688	JH205536.1	49,272- 52,886	different scaffold	
		ASC-2	ENSPSIG 00000013653	JH208255.1	314,384- 320,448		
Common snapping turtle (<i>Chelydra serpentina</i>)		ASC-1	ENSCSRG 00000011556	ML693677.1	9,671- 21,040	tandem	different scaffold
		ASC-2	ENSCSRG 00000016086	ML689274.1	245,650- 251,302		
		ASC-3	ENSCSRG 00000016103	ML689274.1	294,640- 332,745		
		ASC-4	ENSCSRG 00000016163	ML689274.1	360,081- 399,566		
		ASC-5	ENSCSRG 00000016340	ML689274.1	410,918- 432,546		
		ASC-6	ENSCSRG 00000016366	ML689274.1	434,438- 450,710		
Common wall lizard (<i>Podarcis muralis</i>)		ASC-1	ENSPMRG 00000015563	13	40,194,011- 40,197,397	tandem	
		ASC-2	ENSPMRG 00000015586	13	40,338,953- 40,363,152		
		ASC-3	ENSPMRG 00000015615	13	40,408,428- 40,423,988		
	ASC-4	ENSPMRG 00000015560	13	40,165,959- 40,170,021			
Eastern brown snake (<i>Pseudonaja textilis</i>)	ASC	ENSPTXG 00000014552	ULFR 01001175.1	13,740- 16,211	no		
Komodo dragon (<i>Varanus komodoensis</i>)	ASC-1	ENSVKKG 00000016530	SJPD 01000064.1	162,180- 196,099	tandem		
	ASC-2	ENSVKKG 00000016535	SJPD 01000064.1	198,861- 201,535			
West African mud turtle (<i>Pelusios castaneus</i>)	ASC-1	ENSPCEG 00000009445	ML688398.1	50,643- 56,679	different scaffold		
	ASC-2	ENSPCEG 00000017373	ML686177.1	1,727,797- 1,772,487			
	ASC-3	ENSPCEG 00000017391	ML688334.1	55,526- 93,694			

Table 5. (continued)

Amphibian	Tropical clawed frog (<i>Xenopus tropicalis</i>)	pycard (ASC-1)	NC_030685.2	9	5,642,517- 5,645,312	tandem	
		ASC-2	LOC101732196	9	5,662,416- 5,683,543		
		ASC-3	LOC100486968	9	5,698,179- 5,702,429		
Fish	Adrianichthyidae	Chinese medaka (<i>Oryzias sinensis</i>)	ASC-1	ENSOSIG 0000001932	VHIC 01041396.1	382- 6,047	different scaffold
			ASC-2	ENSOSIG 00000010449	VHIC 01056722.1	699- 2,987	
	Indian medaka (<i>Oryzias melastigma</i>)	ASC-1	ENSOMEG 00000004925	NVQA 01000034.1	611,484- 616,192	tandem	
		ASC-2	ENSOMEG 00000004943	NVQA 01000034.1	605,554- 610,560		
		ASC-3	ENSOMEG 00000005006	NVQA 01000034.1	587,834- 594,357		
		ASC-4	ENSOMEG 00000020710	NVQA 01000034.1	4,156,479- 4,163,135		
	Japanese medaka HdrR (<i>Oryzias latipes</i>)	ASC-1	ENSORLG 00000024983	16	31,512,863- 31,519,152	tandem	
		ASC-2	ENSORLG 00000025688	16	31,493,844- 31,496,936		
		ASC-3	ENSORLG 00000026281	16	31,490,780- 31,492,832		
	Japanese medaka HNI (<i>Oryzias latipes</i>)	ASC-1	ENSORLG 00020010756	16	29,739,014- 29,743,416	tandem	
		ASC-2	ENSORLG 00020010801	16	29,726,125- 29,729,098		
		ASC-3	ENSORLG 00020010819	16	29,722,356- 29,724,663		
	Japanese medaka HSOK (<i>Oryzias latipes</i>)	pycard (ASC-1)	ENSORLG 00015016623	16	32,361,720- 32,364,362	tandem	
		ASC-2	ENSORLG 00015016718	16	32,347,272- 32,353,708		
		ASC-3	ENSORLG 00015016594	16	32,373,282- 32,377,729		
	Javanese ricefish (<i>Oryzias javanicus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSJAG 00000019756	16	31,256,251- 31,259,868	tandem	
		ASC-2	ENSJAG 00000019702	16	31,242,035- 31,287,665		
	Ambassidae	Indian glassy fish (<i>Parambassis ranga</i>)	pycard (ASC-1)	ENSPRNG 00000008662	16	59,448- 61,235	tandem
			pycard (ASC-2)	ENSPRNG 00000010375	16	257,331- 259,096	
	Apogonidae	Orbiculate cardinalfish (<i>Sphaeramia orbicularis</i>)	ASC-1	ENSSORG 00005011211	16	19,767,000- 19,772,324	tandem
			ASC-2	ENSSORG 00005011212	16	19,775,279- 19,779,583	
	Arapaimidae	Asian bonytongue (<i>Scleropages formosus</i>)	pycard (ASC)	ENSSFOG 00015019530	18	23,502,035- 23,506,142	no
	Barbinae	Golden-line barbel (<i>Sinocyclocheilus grahami</i>)	pycard (ASC-1)	ENSSGRG 00000007744	LCYQ 01S000009.1	2,947,747- 2,948,887	different scaffold
			pycard (ASC-2)	ENSSGRG 00000019094	LCYQ 01S000285.1	334,837- 336,820	
Horned golden-line barbel (<i>Sinocyclocheilus rhinocerosus</i>)		pycard (ASC-1)	ENSSRHG 00000000222	LAVF 01S005357.1	406,924- 410,107	different scaffold	
		pycard (ASC-2)	ENSSRHG 00000043799	LAVF 01S032947.1	94,657- 96,989		
Blenniidae	Jewelled blenny (<i>Salarias fasciatus</i>)	pycard (ASC)	ENSSFAG 00005017553	11	34,516,293- 34,518,426	no	
Bovichtidae	Channel bull blenny (<i>Cottoperca gobio</i>)	pycard (ASC)	ENSCGOG 00000001860	16	6,688,209- 6,693,100	no	
Carangidae	Greater amberjack (<i>Seriola dumerili</i>)	pycard (ASC-1)	ENSSDUG 00000011752	BDQW 01000533.1	3,009,356- 3,015,311	different scaffold	
		ASC-2	ENSSDUG 00000021374	BDQW 01000415.1	882,781- 885,872		
	Mexican tetra (<i>Astyanax mexicanus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSAMXG 00000040935	APWO 02001270.1	388,482- 393,970	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSAMXG 00000043202	APWO 02001270.1	346,427- 377,164		

Table 5. (continued)

Cichlidae	Blue tilapia (<i>Oreochromis aureus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSOABG 00000011468	VASH 01010190.1	409,841- 414,096	different scaffold	
		ASC-2	ENSOABG 00000011902	VASH 01010862.1	43,817- 44,559		
	Burton's mouthbrooder (<i>Haplochromis burtoni</i>)	pycard (ASC-1)	ENSHBUG 00000010055	JH425379.1	5,453- 9,144	tandem	
		ASC-2	ENSHBUG 00000017756	JH426525.1	63,047- 70,190		
		ASC-3	ENSHBUG 00000020597	JH426273.1	107,324- 122,585		
	Eastern happy (<i>Astatotilapia calliptera</i>)	pycard (ASC-1)	ENSACLG 00000011248	11	34,291,173- 34,295,682	tandem	different chromosome
		ASC-2	ENSACLG 00000011267	11	34,333,390- 34,339,345		
		ASC-3	ENSACLG 00000011538	11	34,347,227- 34,355,160		
		ASC-4	ENSACLG 00000011577	11	34,462,756- 34,474,024		
		ASC-5	ENSACLG 00000027061	10	32,724,718- 32,769,838		
	Lyretail cichlid (<i>Neolamprologus brichardi</i>)	pycard (ASC-1)	ENSNBRG 00000005938	JH422356.1	2,711,309- 2,721,689	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSNBRG 00000006064	JH422356.1	2,771,980- 2,784,657		
	Midas cichlid (<i>Amphilophus citrinellus</i>)	pycard (ASC)	ENSACIG 00000022007	CCOE 01001626.1	1,650,982- 1,657,030	no	
	Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSONIG 00000002216	LG11	36,505,199- 36,516,128	tandem	different scaffold
		ASC-2	ENSONIG 00000035600	LG11	38,921,740- 38,924,004		
ASC-3		ENSONIG 00000004169	LG10	31,272,979- 31,273,721			
Zebra mbuna (<i>Maylandia zebra</i>)	pycard (ASC-1)	ENSMZEG 00005027767	AGTA 05000142.1	173,756- 178,334	tandem	different scaffold	
	ASC-2	ENSMZEG 00005009901	AGTA 05000245.1	106,612- 114,598			
	ASC-3	ENSMZEG 00005009918	AGTA 05000245.1	146,729- 158,667			
	ASC-4	ENSMZEG 00005009935	AGTA 05000245.1	172,378- 185,035			
	ASC-5	ENSMZEG 00005025854	AGTA 05000358.1	124,299- 127,622			
	ASC-6	ENSMZEG 00005025999	AGTA 05000382.1	36,522- 51,965			
Clupeidae	Atlantic herring (<i>Clupea harengus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSCHAG 00000016298	11	7,726,022- 7,728,765	different chromosome	
		ASC-2	ENSCHAG 00000001056	18	23,441,417- 23,443,847		
	Denticle herring (<i>Denticeps clupeioides</i>)	pycard (ASC)	ENSDCDG 00000021488	5	28,671,003- 28,671,986	no	
Coelacanthidae	Coelacanth (<i>Latimeria chalumnae</i>)	ASC	ENSLACG 00000008873	JH127334.1	375,164- 380,221	no	
Cynoglossidae	Tongue sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	ASC	ENSCSEG 00000012268	13	18,058,676- 18,060,953	no	
Cyprinidae	Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	pycard (ASC)	ENSCCRG 00000049408	LN596226.1	84,180- 85,943	no	
		pycard (ASC-1)	ENSCCRG 00010033891	SAUK 01000046.1	1,332,326- 1,333,339	different scaffold	
	pycard (ASC-2)	ENSCCRG 00010043731	SAUK 01000161.1	5,083,240- 5,085,005			
	Common carp hebao red (<i>Cyprinus carpio</i>)	pycard (ASC)	ENSCCRG 00020040171	SAUJ 01030965.1	44,150- 45,163	no	
	Common carp huanghe (<i>Cyprinus carpio</i>)	pycard (ASC-1)	ENSCCRG 00015019965	SAUI 01047530.1	3,303,273- 3,304,286	different scaffold	
		pycard (ASC-2)	ENSCCRG 00015043566	SAUI 01039092.1	1,317,458- 1,319,223		
		ASC-3	ENSCCRG 00015023956	SAUI 01059204.1	519- 2,142		
	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSCARG 00000008215	41	2,076,517- 2,077,705	different chromosome	
		pycard (ASC-2)	ENSCARG 00000025156	16	5,732,715- 5,734,972		
	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	pycard (ASC)	ENSDARG 00000040076	16	41,984,032- 41,990,421	no	

Table 5. (continued)

Echeneidae	Live sharksucker (<i>Echeneis naucrates</i>)	pycard (ASC-1)	ENSENLG 00000003565	6	20,248,863- 20,251,394	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSENLG 00000003594	6	20,252,180- 20,256,041		
Esocidae	Northern pike (<i>Esox lucius</i>)	pycard (ASC)	ENSELUG 00000015935	LG20	34,412,012- 34,424,495	no	
Fundulidae	Mummichog (<i>Fundulus heteroclitus</i>)	ASC	ENSFHEG 00000011870	KN806240.1	6,668- 9,870	no	
Gasterosteiformes	Stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSGACG 00000012348	groupXX	13,513,402- 13,517,536	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSGACG 00000012351	groupXX	13,525,610- 13,528,280		
		ASC-3	ENSGACG 00000012356	groupXX	13,545,828- 13,546,986		
		ASC-4	ENSGACG 00000012358	groupXX	13,555,739- 13,560,232		
Gobiesocidae	Blunt-snouted clingfish (<i>Gouania willdenowi</i>)	pycard (ASC)	ENSGWIG 00000007161	16	834,273- 837,118	no	
Gobiidae	Round goby (<i>Neogobius melanostomus</i>)	ASC-1	ENSNMLG 00000006225	VHKM 01000811.1	61,126- 223,035	tandem	
		ASC-2	ENSNMLG 00000006255	VHKM 01000811.1	153,396- 171,838		
		ASC-3	ENSNMLG 00000006443	VHKM 0100082.1	44,145- 53,028	tandem	different scaffold
		ASC-4	ENSNMLG 00000006450	VHKM 0100082.1	75,410- 96,033		
		ASC-5	ENSNMLG 00000022929	VHKM 0100080.1	45,250- 50,822		
Gymnotidae	Electric eel (<i>Electrophorus electricus</i>)	pycard (ASC)	ENSEEEG 00000011555	RBHW 02000089.1	536,078- 538,829	no	
Holocentridae	Pinecone soldierfish (<i>Myripristis murdjan</i>)	pycard (ASC-1)	ENSMDMG 00005001916	16	25,850,366- 25,853,978	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSMDMG 00005002096	16	25,902,193- 25,909,955		
		pycard (ASC-3)	ENSMDMG 00005002104	16	25,913,081- 25,928,559		
		ASC-4	ENSMDMG 00005002047	16	25,886,608- 25,891,247		
Labridae	Ballan wrasse (<i>Labrus bergylla</i>)	ASC-1	ENSLBEG 00000008553	FKLU 01001557.1	26,410- 36,695	different scaffold	
		ASC-2	ENSLBEG 00000012240	FKLU 01008160.1	2,155- 9,374		
		ASC-3	ENSLBEG 00000016407	FKLU 01001290.1	3,299- 44,178		
		ASC-4	ENSLBEG 00000016946	FKLU 01001295.1	27,828- 32,768		
		ASC-5	ENSLBEG 00000018193	FKLU 01002011.1	21,975- 25,262		
		ASC-6	ENSLBEG 00000022501	FKLU 01001149.1	22,040- 36,178		
		ASC-7	ENSLBEG 00000022524	FKLU 01001149.1	50,563- 61,081		tandem
Lepisosteidae	Spotted gar (<i>Lepisosteus oculatus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSLOCG 00000004898	LG24	2,470,823- 2,476,610	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSLOCG 00000004909	LG24	2,477,690- 2,481,118		
Mormyridae	Paramormyrops kingsleyae (<i>Paramormyrops kingsleyae</i>)	pycard (ASC-1)	ENSPKIG 00000024762	PGUA 01000318.1	16,523- 24,618	different scaffold	
		ASC-2	ENSPKIG 00000013447	PGUA 01000133.1	1,181,385- 1,184,116		
Oxudercidae	Periophthalmus magnuspinnatus (<i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>)	ASC	ENSPMGG 00000006648	KN465490.1	3,198- 11,556	no	
Percidae	Barramundi perch (<i>Lates calcarifer</i>)	pycard (ASC)	ENSLCAG 00010001963	CYIF 01000105.1	1,604,866- 1,608,045	no	
		pycard (ASC-1)	ENSATEG 00000006988	OHO 01000006.1	25,518,727- 25,521,126	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSATEG 00000007006	OHO 01000006.1	25,531,555- 25,533,995		

Table 5. (continued)

Poeciliidae	Amazon molly (<i>Poecilia formosa</i>)	pycard (ASC-1)	ENSPFOG 00000003456	KI520004.1	442,953- 446,728	tandem
		ASC-2	ENSPFOG 00000003485	KI520004.1	454,922- 460,393	
	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	pycard (ASC-1)	ENSPREG 00000002741	LG16	6,490,772- 6,497,631	tandem
		ASC-2	ENSPREG 00000002730	LG16	6,478,349- 6,484,859	
	Monterrey platyfish (<i>Xiphophorus couchianus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSXCOG 00000000239	KQ557218.1	1,272,810- 1,275,820	tandem
		ASC-2	ENSXCOG 00000000219	KQ557218.1	1,262,869- 1,274,613	
	Platyfish (<i>Xiphophorus maculatus</i>)	pycard (ASC-1)	ENSXMAG 00000013282	3	12,849,790- 12,853,506	tandem
		ASC-2	ENSXMAG 00000013280	3	12,855,199- 12,859,682	
	Sailfin molly (<i>Poecilia latipinna</i>)	ASC	ENSPLAG 00000013719	KQ545700.1	322,687- 327,067	no
	Shortfin molly (<i>Poecilia mexicana</i>)	pycard (ASC-1)	ENSPMEG 00000006324	KQ551405.1	818,572- 822,008	tandem
		ASC-2	ENSPMEG 00000006317	KQ551405.1	834,270- 840,559	
	Western mosquitofish (<i>Gambusia affinis</i>)	pycard (ASC)	ENSGAFG 00000014514	NHOQ 01000885.1	285,212- 289,515	no
Polypteridae	Reedfish (<i>Erpetoichthys calabaricus</i>)	ASC	ENSECRG 00000016447	17 4,532,294- 4,545,994	no	
Pomacentridae	Bicolor damselfish (<i>Stegastes partitus</i>)	pycard (ASC)	ENSSPAG 00000015395	KK581756.1 1,849- 7,629	no	
	Clown anemonefish (<i>Amphiprion ocellaris</i>)	pycard (ASC)	ENSAOCG 00000016034	NXFZ 01003282.1 122,412- 127,946	no	
	Orange clownfish (<i>Amphiprion percula</i>)	pycard (ASC)	ENSAPEG 00000021864	7 11,918,736- 11,925,161	no	
	Spiny chromis (<i>Acanthochromis polyacanthus</i>)	pycard (ASC)	ENSAPOG 00000003345	MVNR 01002194.1 17,305- 22,375	no	
Salmonidae	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	pycard (ASC-1)	ENSSSAG 00000053852	ssa05 54,114,911- 54,116,744	different scaffold	
		ASC (ASC-2)	ENSSSAG 00000067940	ssa02 26,718,267- 26,720,563		
		ASC-3	ENSSSAG 00000068090	ssa14 9,931,010- 9,936,448		
	Chinook salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	pycard (ASC-1)	ENSOTSG 00005005755	3 20,498,129- 20,499,846	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSOTSG 00005021164	3 17,563,716- 17,565,565		
	Huchen (<i>Hucho hucho</i>)	pycard (ASC-1)	ENSHHUG 00000026364	QNTS 01003341.1 68,725- 71,128	different scaffold	
		ASC-2	ENSHHUG 00000038209	QNTS 01000074.1 980,951- 983,712		
	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	pycard (ASC-1)	ENSOMYG 00000029437	2 20,026,950- 20,030,416	different chromosome	
		ASC (ASC-2)	ENSOMYG 00000021087	3 29,990,560- 29,992,383		
		ASC-3	ENSOMYG 00000001315	8 47,005,880- 47,007,559		
	River trout (<i>Salmo trutta</i>)	pycard (ASC-1)	ENSSTUG 00000036423	3 51,367,197- 51,368,734	different chromosome	
		pycard (ASC-2)	ENSSTUG 00000047471	37 25,142,824- 25,145,221		
ASC-3		ENSSTUG 00000049143	21 10,677,880- 10,680,553			
Sciaenidae	Large yellow croaker (<i>Larimichthys crocea</i>)	pycard (ASC-1)	ENSLCRG 00005014220	XIII 32,742,638- 32,750,156	tandem	
		pycard (ASC-2)	ENSLCRG 00005014230	XIII 32,757,347- 32,788,850		
		ASC-3	ENSLCRG 00005014240	XIII 32,762,859- 32,779,369		
Scophthalmidae	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	pycard (ASC)	ENSSMAG 00000004414	1 15,134,379- 15,138,000	no	
Serrasalimidae	Red-bellied piranha (<i>Pygocentrus nattereri</i>)	pycard (ASC)	ENSPNAG 00000021107	KV575518.1 522,119- 530,127	no	
Sparidae	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	pycard (ASC)	ENSSAUG 00010023679	17 30,187,615- 30,200,518	no	
Syngnathiformes	Tiger tail seahorse (<i>Hippocampus comes</i>)	pycard (ASC)	ENSHCOG 00000012431	KV879817.1 1,199,837- 1,202,547	no	
Tetraodontidae	Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	ASC	ENSTRUG 000000030194	7 243,218- 246,225	no	

Table 3. Identity and similarity of full-length ASC (A), PYD (B) and CARD (C) domains of

ASC.

A

ASC		similarity (%)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Medaka_ASC-1	identity (%)		43.5	48.1	55.7	50.0	53.9	63.8	57.7	50.2	47.8	47.4	48.8	43.3	49.3	49.3	45.4	42.6	45.7	46.0
2. Medaka_ASC-2		26.9		69.1	44.2	33.3	37.8	45.7	41.5	40.8	40.1	32.3	37.6	32.2	34.2	36.0	38.2	38.5	40.4	41.3
3. Medaka_ASC-3		28.5	58.6		48.1	36.5	41.6	51.2	44.8	44.8	43.2	35.5	40.1	39.0	39.8	42.2	41.2	40.9	43.1	42.7
4. Croaker_ASC-1		40.0	24.5	27.8		47.6	60.8	65.2	61.4	55.2	50.0	44.2	50.5	43.0	48.8	47.4	43.2	49.5	46.0	46.5
5. Croaker_ASC-2		36.3	20.4	22.7	31.1		46.7	58.4	49.5	41.9	38.8	36.5	40.8	38.9	42.3	42.8	41.3	38.2	38.8	37.8
6. Croaker_ASC-3		37.8	22.3	25.1	50.0	32.0		61.9	53.7	46.3	42.7	38.4	43.1	36.9	41.7	39.4	36.7	36.6	40.4	39.0
7. Turbot_ASC		44.8	28.6	31.1	46.1	42.6	43.8		65.8	55.4	48.8	45.5	51.5	46.9	50.0	48.5	46.1	46.0	52.3	52.3
8. Fugu_ASC		39.2	23.2	25.9	45.2	35.7	37.3	49.0		59.9	48.1	46.3	46.4	41.0	41.2	42.2	45.9	41.2	48.1	47.3
9. Seabream_ASC		30.8	23.3	25.9	39.0	22.6	30.8	37.1	42.0		46.2	38.8	46.9	39.6	39.3	39.8	40.2	41.7	47.6	47.1
10. Zebrafish_ASC		35.2	24.2	26.2	31.7	25.3	29.8	30.4	31.4	28.0		53.1	68.5	50.2	52.2	52.7	57.8	51.6	42.6	43.1
11. Goldfish_ASC-1		29.5	19.2	21.0	28.1	24.6	24.0	27.7	28.0	21.5	39.7		62.6	46.9	51.2	50.7	52.2	47.2	37.7	39.4
12. Goldfish_ASC-2		30.2	22.5	22.6	30.3	25.2	29.1	34.8	30.1	25.8	51.7	53.8		54.1	57.6	56.7	61.6	53.8	44.7	45.6
13. Trout_ASC-1		28.3	19.3	22.0	32.2	22.5	25.8	28.0	26.4	21.6	34.2	30.3	36.5		81.5	73.0	50.5	52.6	35.2	38.1
14. Trout_ASC-2		31.4	20.8	23.6	35.2	26.4	27.0	32.0	27.4	22.7	34.6	33.9	39.9	74.5		79.7	58.3	55.0	38.9	43.8
15. Trout_ASC-3		31.8	20.4	23.6	32.8	25.4	28.4	33.0	27.0	23.6	35.6	33.0	39.9	63.2	68.3		56.9	57.3	39.9	43.8
16. Gar_ASC-1		31.8	22.6	26.0	28.1	26.4	26.6	30.0	28.2	21.5	40.6	35.4	42.8	38.8	43.6	40.1		60.7	45.7	43.3
17. Gar_ASC-2		28.2	22.5	24.6	30.5	19.8	22.0	28.8	27.3	24.0	36.1	31.1	38.6	37.5	39.3	38.8	44.5		37.8	40.6
18. Human_ASC		29.1	24.0	22.7	28.1	21.3	23.9	29.6	30.0	28.1	26.7	22.0	27.6	22.3	23.5	24.5	30.7	28.1		81.0
19. Mouse_ASC		28.2	24.4	23.6	27.2	20.8	23.4	32.1	28.7	26.2	24.8	21.1	29.6	21.4	23.5	25.4	28.8	26.2	71.2	

B

PYD		similarity (%)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Medaka_ASC-1	identity (%)		58.0	56.8	65.4	70.4	61.7	72.8	65.4	45.7	61.0	61.0	61.0	46.9	60.5	58.0	61.7	56.8	45.2	46.4
2. Medaka_ASC-2		35.8		96.3	54.3	58.0	48.1	64.2	54.3	51.9	56.1	48.8	50.0	43.2	45.7	46.9	59.3	49.4	52.4	53.6
3. Medaka_ASC-3		35.8	95.0		51.9	58.0	45.7	61.7	55.6	50.6	56.1	47.6	48.8	43.2	45.7	45.7	58.0	46.9	51.2	52.4
4. Croaker_ASC-1		46.9	28.3	28.3		66.7	59.3	69.1	63.0	51.9	64.6	68.3	67.1	49.4	65.4	65.4	63.0	67.9	54.8	57.1
5. Croaker_ASC-2		55.5	39.5	40.7	44.4		69.1	80.2	66.7	53.1	56.1	64.6	63.4	51.9	61.7	61.7	67.9	60.5	50.0	50.0
6. Croaker_ASC-3		43.2	28.3	29.6	38.2	50.6		71.6	56.8	44.4	52.4	57.3	56.1	44.4	49.4	50.6	55.6	49.4	40.5	42.9
7. Turbot_ASC		50.6	41.9	41.9	49.3	61.7	53.0		70.4	53.1	62.2	62.2	62.2	51.9	63.0	60.5	61.7	63.0	50.0	52.4
8. Fugu_ASC		41.9	30.8	32.0	41.9	55.5	35.8	49.3		59.3	61.0	62.2	62.2	48.1	51.9	53.1	66.7	55.6	52.4	51.2
9. Seabream_ASC		23.1	26.8	26.8	29.2	24.3	20.7	30.4	32.9		48.8	46.3	56.1	39.0	45.1	42.7	51.9	43.2	48.8	50.0
10. Zebrafish_ASC		43.9	31.7	34.1	37.8	37.8	35.3	37.8	39.0	22.8		74.4	75.6	54.9	61.0	58.5	62.2	57.3	47.1	50.6
11. Goldfish_ASC-1		39.0	29.2	28.0	42.6	42.6	31.7	37.8	37.8	22.8	53.6		87.8	58.5	67.1	68.3	72.0	67.1	49.4	52.9
12. Goldfish_ASC-2		36.5	28.0	26.8	42.6	41.4	40.2	40.2	36.5	25.3	56.0	79.2		57.3	67.1	67.1	70.7	63.4	51.8	56.5
13. Trout_ASC-1		29.6	24.6	24.6	33.3	32.0	29.6	29.6	29.6	18.2	40.2	40.2	41.4		77.8	65.4	60.5	50.6	39.3	41.7
14. Trout_ASC-2		38.2	27.1	27.1	46.9	40.7	32.0	41.9	33.3	23.1	41.4	52.4	50.0	72.8		84.0	69.1	63.0	47.6	52.4
15. Trout_ASC-3		37.0	25.9	27.1	41.9	37.0	35.8	39.5	29.6	25.6	41.4	46.3	47.5	56.7	70.3		66.7	63.0	47.6	50.0
16. Gar_ASC-1		41.9	34.5	35.8	39.5	44.4	40.7	40.7	39.5	20.7	43.9	46.3	48.7	49.3	56.7	49.3		72.8	61.9	63.1
17. Gar_ASC-2		34.5	27.1	27.1	41.9	35.8	29.6	38.2	37.0	24.3	39.0	41.4	41.4	39.5	45.6	46.9	55.5		52.4	53.6
18. Human_ASC		28.5	26.1	27.3	32.1	30.9	23.8	29.7	34.5	29.7	27.0	27.0	29.4	21.4	28.5	26.1	41.6	36.9		90.5
19. Mouse_ASC		25.0	29.7	30.9	30.9	30.9	25.0	30.9	33.3	26.1	28.2	27.0	32.9	21.4	28.5	28.5	42.8	36.9	80.9	

C

CARD		similarity (%)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Medaka_ASC-1	identity (%)		51.1	57.0	63.2	35.2	60.2	63.5	54.4	60.0	60.5	28.4	59.1	64.0	66.3	66.3	57.0	54.7	58.1	52.3
2. Medaka_ASC-2		32.5		56.5	45.5	23.3	44.9	47.7	45.1	50.6	45.3	26.1	47.7	46.5	47.7	66.3	44.2	48.8	46.5	47.7
3. Medaka_ASC-3		32.5	36.4		54.5	30.8	52.8	57.0	50.5	58.1	53.5	26.1	51.1	57.0	55.8	55.8	50.0	53.5	51.1	47.7
4. Croaker_ASC-1		45.9	27.2	34.0		43.0	88.5	77.0	74.2	65.5	62.5	31.5	63.2	60.2	60.2	58.0	52.3	56.8	56.8	53.4
5. Croaker_ASC-2		21.9	12.2	16.4	36.5		42.6	45.1	40.6	40.4	35.9	20.9	34.0	38.0	35.9	35.9	31.5	31.5	33.0	28.6
6. Croaker_ASC-3		43.1	25.8	31.4	86.2	37.2		75.0	72.2	63.6	62.9	28.9	63.6	60.7	60.7	56.2	53.9	58.4	57.3	52.8
7. Turbot_ASC		47.0	31.3	30.2	54.0	34.0	54.5		73.3	69.4	59.3	22.7	62.5	66.3	66.3	64.0	57.0	59.3	62.8	60.5
8. Fugu_ASC		38.8	27.4	29.6	62.9	29.1	56.6	57.7		64.4	53.8	26.1	56.7	57.1	56.0	54.9	51.6	50.5	54.9	53.8
9. Seabream_ASC		42.3	30.5	32.5	54.0	28.0	52.2	49.4	51.1		52.3	25.3	54.5	59.3	57.0	54.7	53.5	61.6	53.5	52.3
10. Zebrafish_ASC		44.1	26.7	30.2	43.1	25.0	42.6	38.3	36.2	37.2		33.0	68.2	61.6	59.3	64.0	57.0	58.1	60.5	55.8
11. Goldfish_ASC-1		7.9	9.0	11.3	10.1	9.8	8.8	7.9	7.6	5.7	10.2		27.0	23.9	21.6	23.9	26.1	26.1	29.5	26.1
12. Goldfish_ASC-2		40.9	29.5	28.4	40.2	20.2	39.7	43.1	40.0	38.6	54.5	7.8		62.5	62.5	61.4	60.2	56.8	58.0	58.0
13. Trout_ASC-1		47.6	29.0	31.3	48.8	21.7	48.3	44.1	42.8	41.8	43.0	11.3	43.1		95.3	88.4	59.3	67.4	55.8	58.1
14. Trout_ASC-2		46.5	31.3	34.8	45.4	20.6	44.9	44.1	41.7	40.6	40.6	11.3	43.1	87.2		89.5	62.8	66.3	54.7	60.5
15. Trout_ASC-3		45.3	29.0	31.3	44.3	23.9	44.9	47.6	42.8	39.5	43.0	12.5	44.3	74.4	80.2		64.0	67.4	53.5	55.8
16. Gar_ASC-1		44.1	27.9	32.5	39.7	22.8	40.4	38.3	37.3	37.2	43.0	7.9	42.0	44.1	46.5	44.1		67.4	55.8	53.5
17. Gar_ASC-2		43.0	31.3	36.0	37.5	17.3	37.0	37.2	32.9	37.2	41.8	9.0	43.1	50.0	48.8	41.8	47.6		54.7	53.5
18. Human_ASC		37.2	31.3	26.7	36.3	18.6	35.9	36.0	32.9	31.3	40.6	9.0	39.7	41.8	38.3	39.5	39.5	38.3		81.0
19. Mouse_ASC		37.2	30.2	26.7	32.9	16.4	32.5	40.6	30.7	31.3	36.0	9.0	43.1	39.5	38.3	41.8	36.0	37.2	70.2	

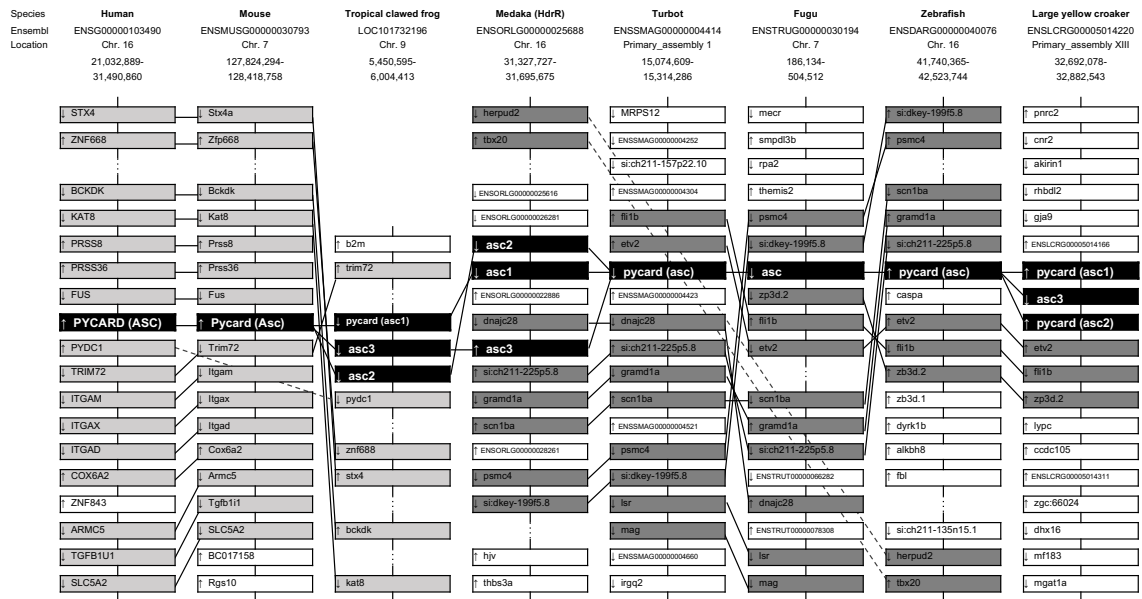


Fig. 12. Synteny analysis and chromosomal location of *asc* from Japanese medaka and other known vertebrates. The localization of *asc* genes is highlighted in black boxes.

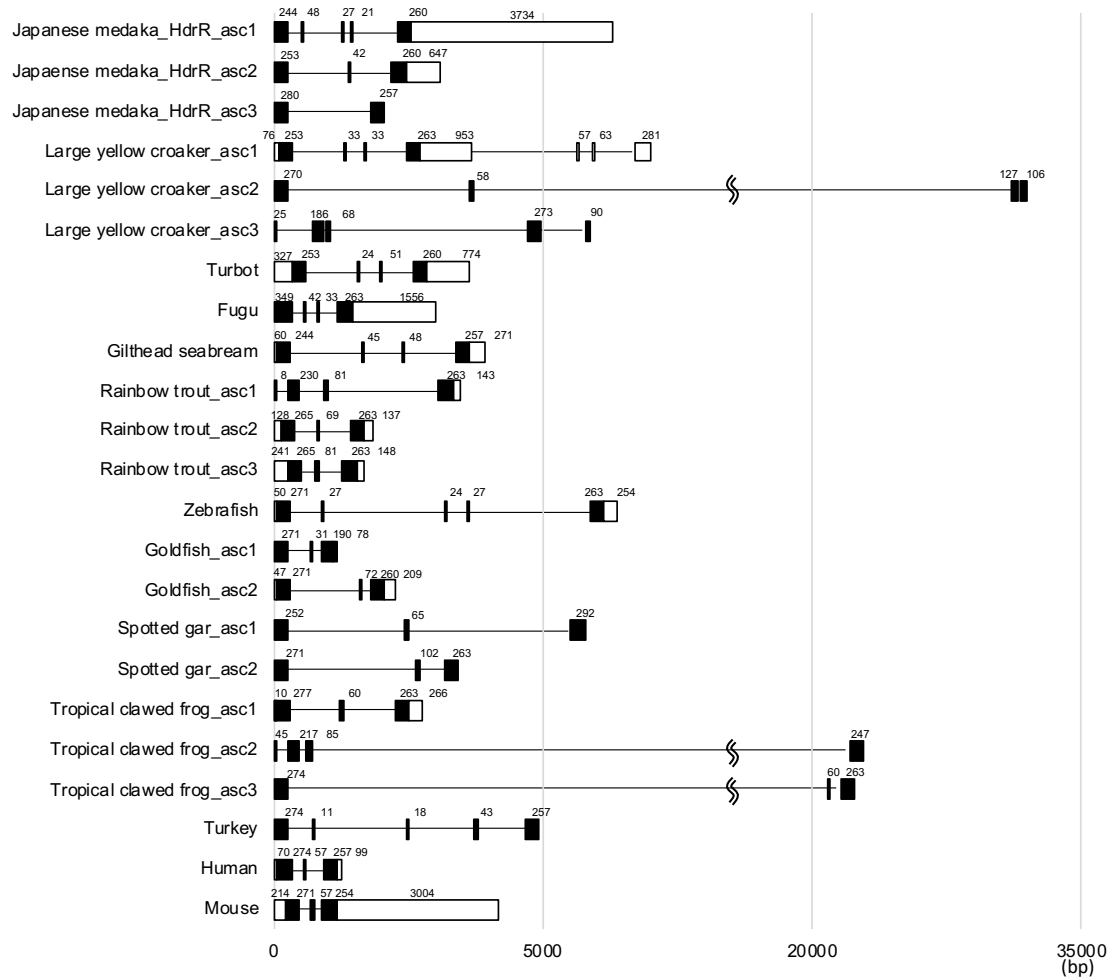


Fig. 13. Schematic diagram showing the *ASC* gene organization in medaka and other vertebrates. Exons and introns are represented as boxes and lines, respectively. Untranslated regions and open reading frames in exons are shown with white and black boxes, respectively.

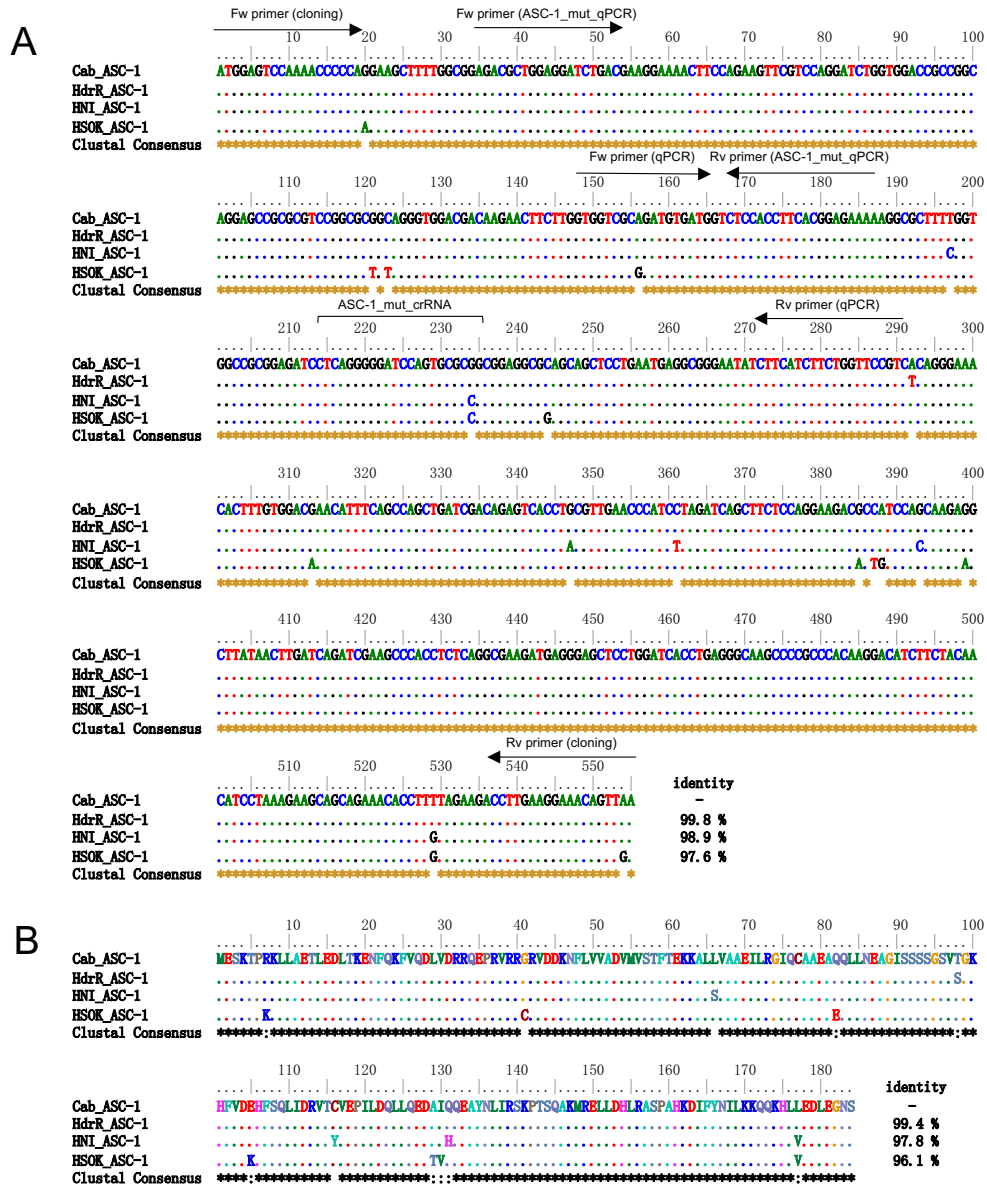


Fig. 14. Nucleotide sequence (A) and the deduced amino acid sequence (B) alignment of ASC-1 from Japanese medaka four strains. The sequences were aligned with BioEdit v7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The accession numbers using in the alignment are as follows: Japanese medaka Cab strain *ascI*; LC530061, Japanese medaka Hd-rR strain *ascI*; ENSORLT0000039664, Japanese medaka HNI strain *ascI*; ENSORLT00020016457, Japanese medaka HSOK strain *ascI*; ENSORLT00015034006.

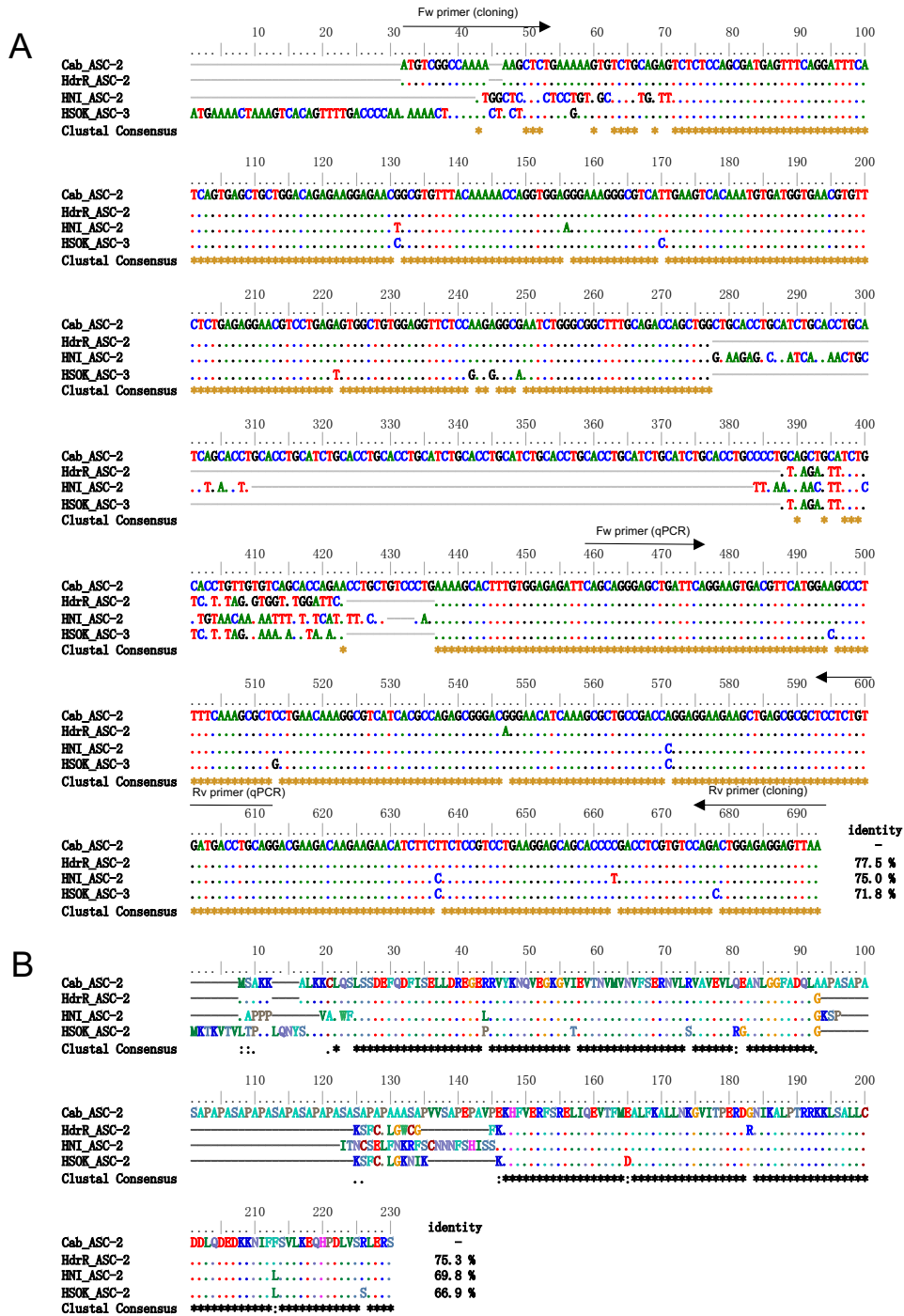


Fig. 15. Nucleotide sequence (A) and the deduced amino acid sequence (B) alignment of ASC-2 from Japanese medaka four strains. The sequences were aligned with BioEdit v7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The accession numbers using in the alignment are as follows: Japanese medaka Cab strain *asc2*; LC568547, Japanese medaka Hd-rR strain *asc2*; ENSORLT0000041025, Japanese medaka HNI strain *asc2*; ENSORLT00020031113, Japanese medaka HSOK strain *asc2*; ENSORLT00015023763.

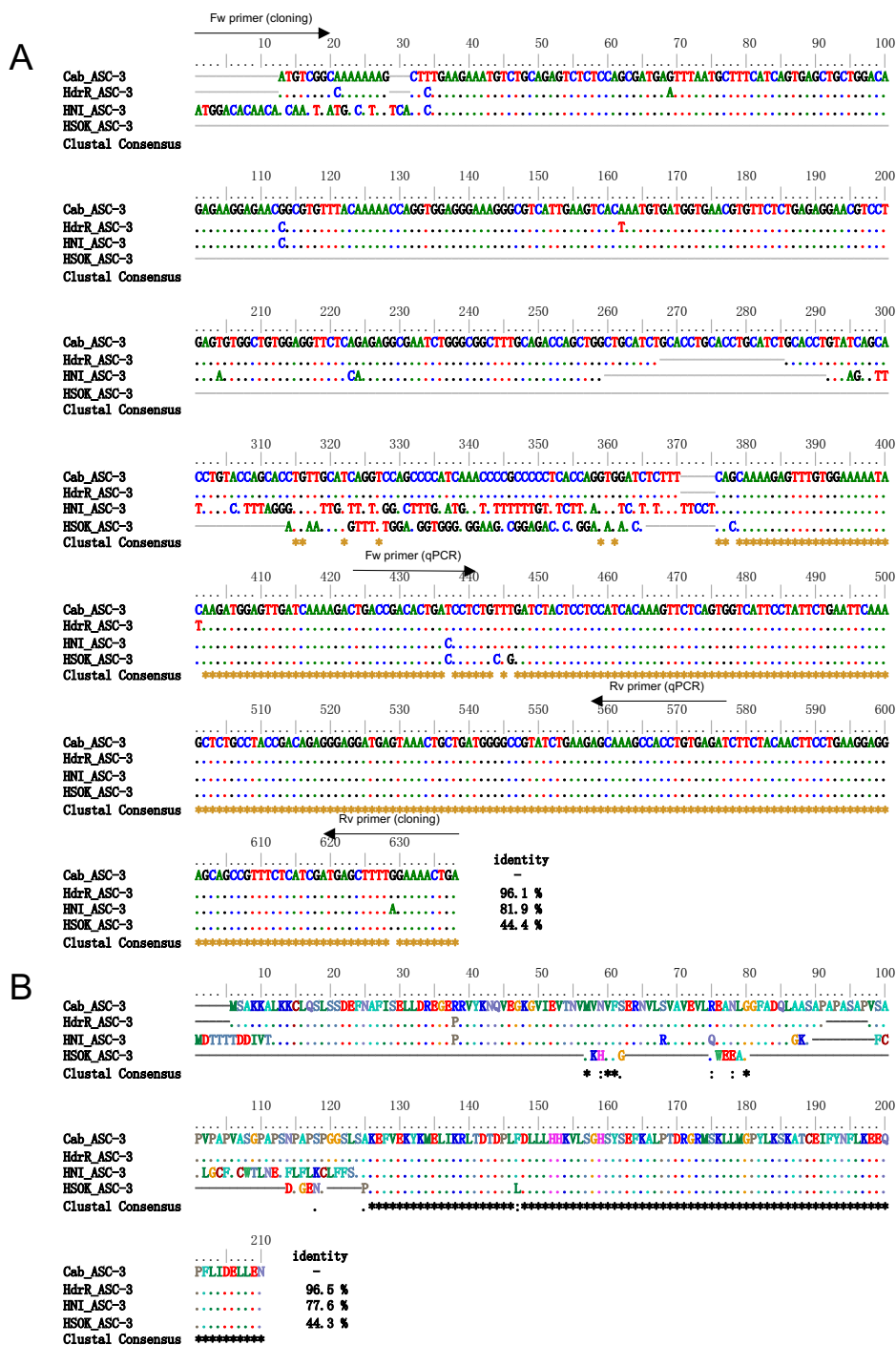


Fig. 16. Nucleotide sequence (A) and the deduced amino acid sequence (B) alignment of ASC-3 from Japanese medaka four strains. The sequences were aligned with BioEdit v7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The accession numbers using in the alignment are as follows: Japanese medaka Cab strain *asc3*; LC568548, Japanese medaka Hd-rR strain *asc3*; ENSORLT0000030561, Japanese medaka HNI strain *asc3*; ENSORLT00020031089, Japanese medaka HSOK strain *asc3*; ENSORLT00015033992.

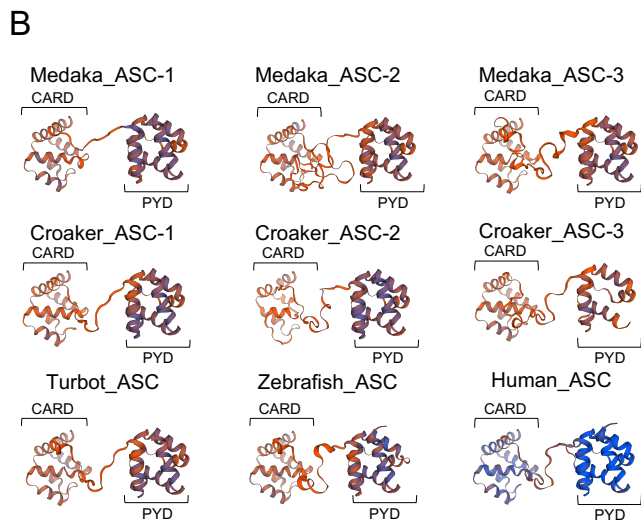
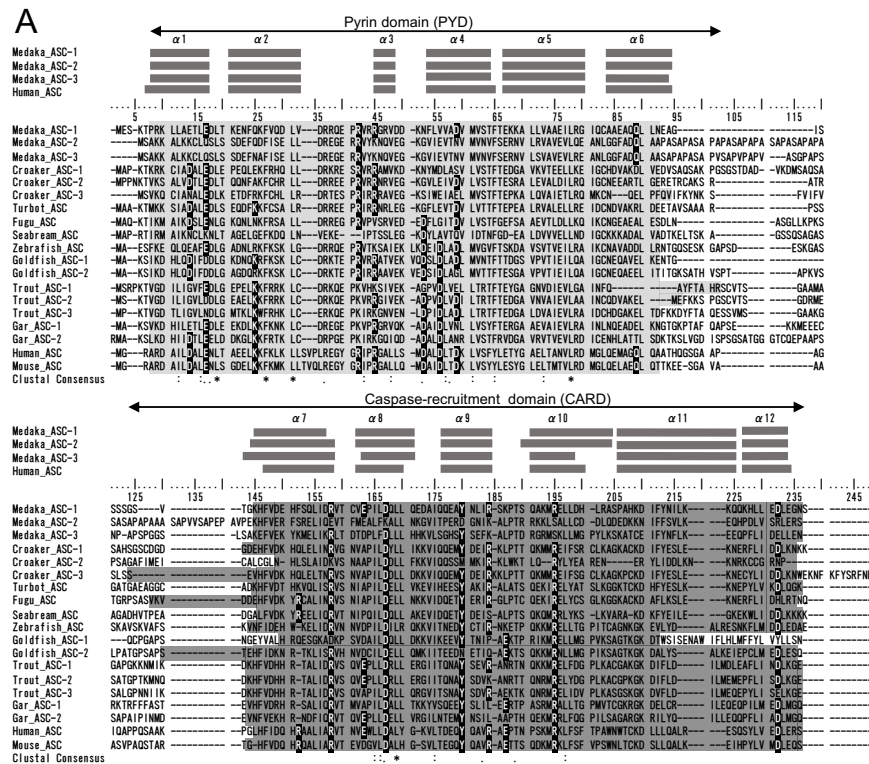


Fig. 17. Sequence analysis of the ASCs from Japanese medaka and other vertebrates. Multiple sequence alignment (A) and 3D structures (B) of ASCs from Japanese medaka and other known vertebrates. Putative domain organization of ASCs predicted by SMART 7. PYD and CARD regions are highlighted in gray and dark gray, respectively. The amino acids important for inflammasome assembly are highlighted in black. The secondary structures of ASC were predicted by PSIPRED, and the structure is shown upon the alignment: α , α -helix structure. The accession numbers are shown in Table 5.

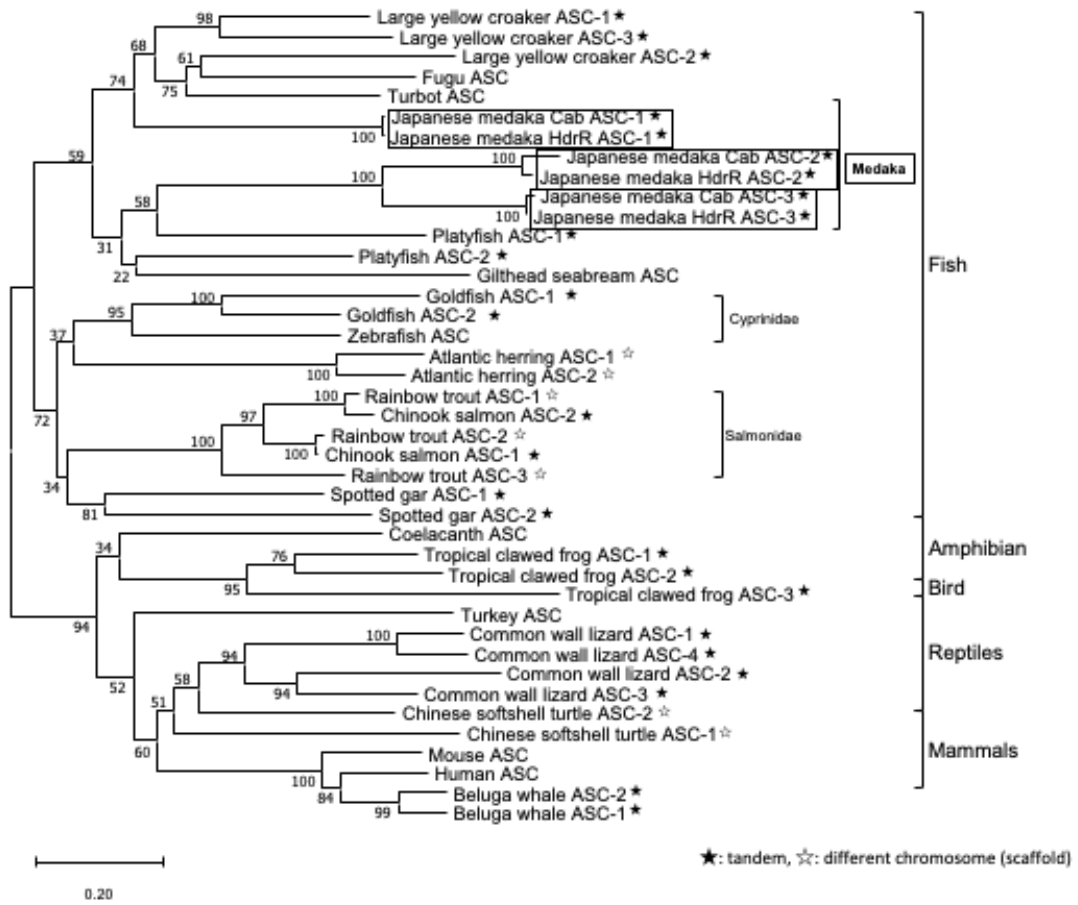


Fig. 18. Phylogenetic relationship of medaka ASCs with other vertebrate ASCs. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replications.

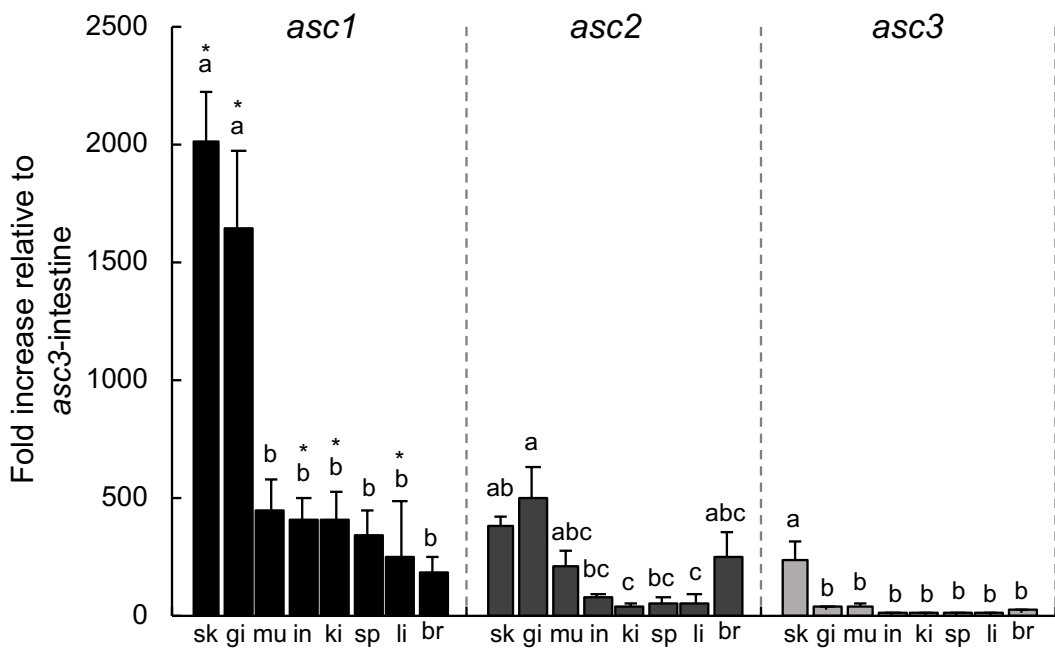


Fig. 19. Tissue distribution of the three types of *asc* genes in the Japanese medaka Cab strain.

The expression of these genes from skin (sk), gill (gi), muscle (mu), intestine (in), kidney (ki), spleen (sp), liver (li), and brain (br) were analyzed using qPCR, and the expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of *ASC-3* in intestine samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. Bars represent the mean \pm SEMs ($n = 3$). Means denoted by a different letter indicate statistically significant differences between the tissues under each *asc* (Tukey-Kramer tests, $p < 0.05$). The asterisks * indicate that expression levels of *asc1* were statistically higher than those of the other *asc* genes in the same tissue (Student's *t*-tests, $* p < 0.05$).

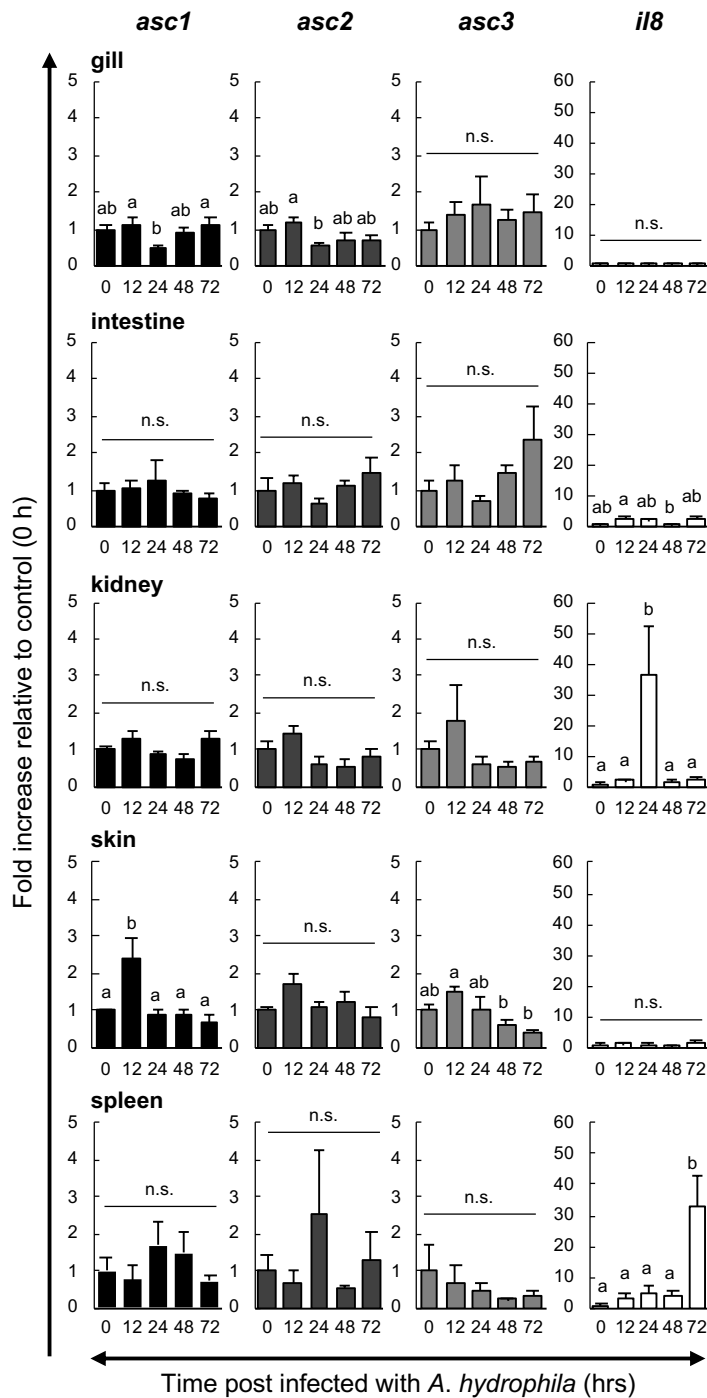


Fig. 20. The expression of the three types of *asc* genes in Japanese medaka during *A. hydrophila* infection. Medaka were immersed in *A. hydrophila*-containing tanks (4.3×10^7 CFU/mL). The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of healthy medaka samples. The *actb* was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from five individual experiments ($n = 5/\text{group}$).

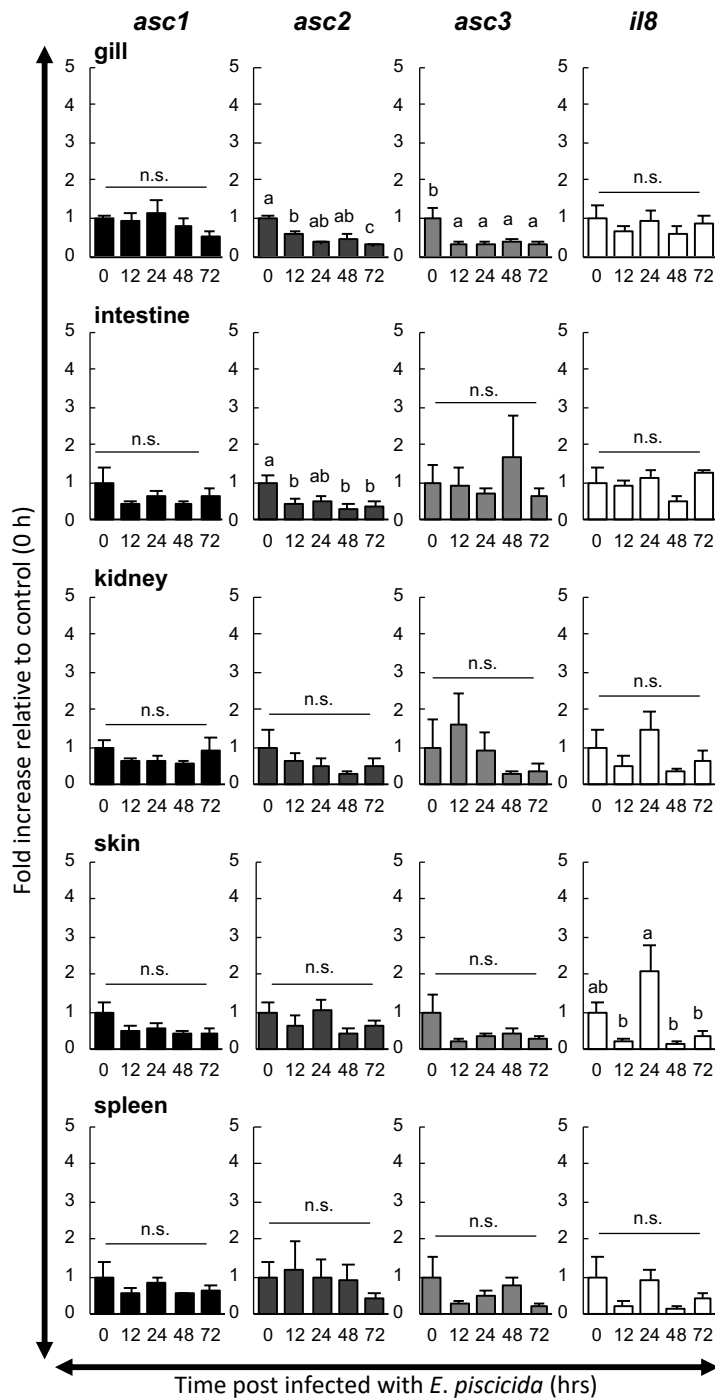


Fig. 21. The expression of the three types of *asc* genes in Japanese medaka during *E. piscicida* infection. Medaka were immersed in *E. piscicida*-containing tanks (2.5×10^6 CFU/mL). The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of healthy medaka samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from five individual experiments ($n = 5/\text{group}$).

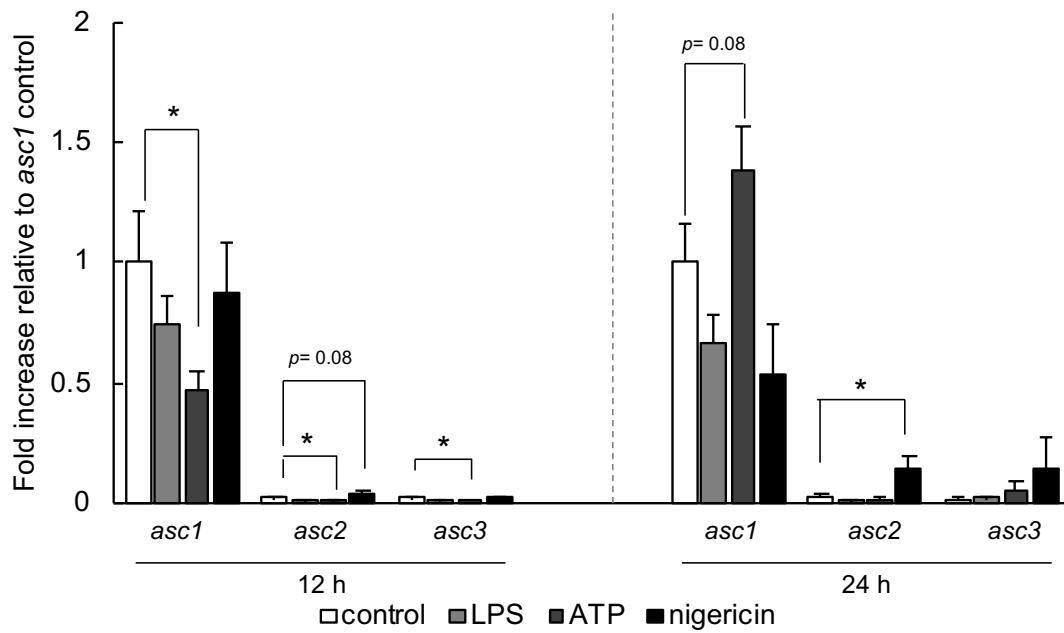


Fig. 22. The expression of the three types of *asc* genes in OLHNI-2 cells stimulated with inflammasome activators. Cells were treated with LPS, ATP, or nigericin for 12 or 24 h. The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of control samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from four individual experiments ($n = 4/\text{group}$). * $p < 0.05$ (Student *t*-test).

第4章 *A. hydrophila* 感染時におけるメダカ *asc1* を介した炎症応答および細胞死誘導機構の解明

第1節 緒言

哺乳類において ASC は細菌感染時に、インフラマソーム および ASC スペックを介した炎症応答などの免疫応答に関与している。第3章においてメダカには3種類の *asc* が存在し、その中でも *asc1* がその他の *asc* に比べて高く発現していることを明らかにした。そこで本章では、*A. hydrophila* 感染後の ASC-1 の役割を明らかにするために、ASC-1 変異メダカの構築を行い、ASC-1 変異メダカの *A. hydrophila* に対する感受性および炎症応答を詳細に解明した。

第2節 材料および方法

4.2.1. 実験動物

野生型メダカは第3章-3.2.1.と同様のメダカ Cab 系統を用いた。

4.2.2. 遺伝子発現解析

4.2.2.1. サンプルリング

第3章-3.2.4.1.と同様の方法で行った。

4.2.2.2. Total RNA 抽出

第3章-3.2.4.2.と同様の方法で行った。

4.2.2.3. cDNA 合成

第3章-3.2.4.3.と同様の方法で行った。

4.2.4.4. qPCR

第3章-3.2.4.4.と同様の方法で行った。使用したプライマーは Table 7 に示す。

4.2.3. ASC-1 変異メダカの構築

4.2.3.1. 使用したプラスミド

CRISPR-Cas9 法で ASC-1 変異メダカを作製するために pCS2 + hSpCas9 (Addgene,#51815)および pDR274 (Addgene, #42250)を用いた。pCS2 + hSpCas9 は SP6 プロモーターの下流で Cas9 スクレアーゼを発現するベクターであり、pDR274 は T7 プロモーターの下流で sgRNA を発現するためのベクターである。

4.2.3.2. crRNA の設計

crRNA を設計するために、Ensembl Genome Database Project ver. 93 のメダカゲノムデータベースからメダカ Hd-rR 系統の *asc1* の塩基配列の情報を得た (Ensembl ID: ENSORLG00000016765)。その後、メダカ Cab 系統の *asc1* の cDNA 塩基配列を第3章でクローニングを行い、その配列を元に crRNA 配列を決定した (Ansai and Kinoshita, 2014; Chang et al., 2013)。Ran et al., 2013 の報告から推薦される設計方法に従い、*asc1*-crRNA は 5'-N₂₁GG-3'となる配列を探索し、作製した。設計した *asc1*-crRNA 配列は Table 7 に示す。

4.2.3.3. *asc1*-crRNA のクローニング

設計した *asc1*-crRNA の sense 鎖および antisense 鎖の合成は Mission Biotech Co., Ltd. (Taipei, Taiwan)に委託し、カートリッジ精製(oligonucleotide purification cartridge: OPC)を用いて行った。この sense 鎖および antisense 鎖の 1 対のオリゴヌクレオチド (終濃度:

10 μ M) を 10 μ L の annealing buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) 中で、95 °C で 2 分間加熱した。その後、25 °C まで 1 時間かけて緩やかに冷却した。pDR274 vector は *Bsa*I で処理し、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを Ligation high ver.2 を用いてライゲーションし、大腸菌にトランスフォーメーションした。その後、プラスミド抽出したもの (pDR274_ *asc*1-crRNA) を用いて *asc*1-sgRNA の合成を行った。

4.2.3.3. Cas9 mRNA および *asc*1-sgRNA の合成

Cas9 発現ベクターである pCS2+hSpCas9 は NotI を用いて 37 °C でオーバーナイト処理し、線状化したものを鋳型に mRNA の合成を行った。RNA の転写には、mMessage mMachine SP6 kit (Life Technologies, California, USA) を用いて行い、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製することで 5'-キャップ付き Cas9 mRNA を得た。4.2.3.2. で *asc*1-crRNA 配列をクローニングした pDR274_ *asc*1-crRNA を *Dra*I により 37 °C でオーバーナイト処理し、線状化したものを鋳型に *asc*1-sgRNA の合成を行った。*asc*1-sgRNA の合成には、AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit (Epicentre Biotechnologies, Wisconsin, USA) を用いて行い、酢酸アンモニウム沈殿により精製した。精製した RNA は 1% アガロースゲル電気泳動により確認し、使用するまで -80 °C で保存した。

4.2.3.4. メダカ卵へのマイクロインジェクション

マイクロインジェクションは、氷冷した Iwamatsu's Balanced Salt Solution [6.5 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.2 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O, pH7.4] 中のメダカの卵に行った。4.2.3.5. で合成した Cas9 mRNA 200 ng/ μ L および *asc*1-sgRNA 25 ng/ μ L の混合溶液を準備し、1 細胞期の受精卵の胚にマイクロインジェクションした。その後、インジェクションした卵は Medaka embryo culture medium [0.0001% methylene blue, 0.1% NaCl, 0.3% KCl, 0.004% CaCl₂ · 2H₂O, 0.016% MgSO₄ · 7H₂O] 中に移し、室温で培養した。孵化後、生育し

た個体をファウンダー (F0) メダカとした。

4.2.3.5. ヘテロ二本鎖移動度分析 (Heteroduplex mobility assay: HMA)

Cas9 mRNA および *asc1*-sgRNA によるメダカのゲノム DNA の変異を確認するために、ヘテロ二本鎖移動度分析を行った。使用するゲノム DNA は、メダカの尾鰭から得たものを用いた。まず、MS-222 を用いてメダカに麻酔をかけ、尾鰭の一部をメスで切除した。その後、25 μ L のアルカリ溶解液 (25 mM NaOH および 0.2 mM EDTA) 中に切除した尾鰭を浸け、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。尾鰭が完全に溶解したことを確認し、氷冷した中和溶液 (40 mM Tris-HCl, pH 8.0) を 25 μ L 添加したものをゲノム DNA 溶液として使用した。このゲノム DNA を鋳型とし、変異導入領域の増幅を PCR により行った。PCR は KOD Fx (TOYOBO, Osaka, Japan) 7.5 μ L、Forward Primer (5 μ M) 1 μ L、Reverse Primer (5 μ M) 1 μ L、ゲノム DNA 溶液 1 μ L および nuclease-free water (Qiagen, Hulsterweg, Netherlands) 4.5 μ L を混合し、サーマルサイクラーを用いて 94 $^{\circ}$ C で 2 分間のプレヒーティング後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 20 秒間の伸長反応を 33 サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ C で 10 分間の再伸長反応を行った。使用したプライマーは Table 7 に示す。反応終了後、PCR 産物を 12%ポリアクリルアミドゲル (PAGE) で電気泳動 (60 mA, 60 分間) し、増幅した DNA 断片の分子サイズを比較することにより遺伝子変異の有無を確認した。

4.2.3.6. 変異導入領域の塩基配列の確認

変異の導入を確認した F0 メダカと野生型メダカを交配させ得た雑種第 1 代 (filial generation 1: F1) メダカを 4.2.3.5. と同様の方法で変異の導入を確認した。変異が確認された個体のゲノムは、塩基配列決定用のプライマー (Table 7) を用いて同条件でもう一度 PCR を行った。その後、第 2 章-2.2.1.2. と同様の方法で PCR 産物から DNA を精製

し、pGEM-T Easy vector (Promega, Wisconsin, USA)にライゲーションした。ライゲーション産物は、第2章-2.2.1.3と同様の方法で大腸菌にトランスフォーメーション後、第3章-3.2.2.6と同様の方法でコロニーPCRによるインサートDNAの確認を行った。インサートDNAを確認したコロニーから第2章-2.2.1.4と同様の方法でプラスミド抽出したものを、第2章-2.2.1.7と同様の方法で変異導入領域の塩基配列の確認を行った。

4.2.4. 細菌感染試験

4.2.4.1. 使用した菌株および培養条件

第3章-3.2.5.1.に示した *A. hydrophila* FPC-0866 株を用いた。培養条件は、第3章-3.2.5.1.に従った。

4.2.4.2. 感染方法

第3章-3.2.5.2.と同様の方法で行った。

4.2.4.3. 累積死亡率の測定

本試験においては、2種類の濃度区[(A) 7.5×10^6 CFU/mL および(B) 7.25×10^7 CFU/mL]で浸漬感染させ、13日間の観察後、累積死亡率を算出した。

4.2.4.4. 遺伝子発現解析

第3章-3.2.5.3.と同様の方法で行った。使用したプライマーは Table 7 に示す。

4.2.5. 組織内における菌数の測定

第3章-3.2.4.1.と同様の方法で麻酔をかけ、PBS+0.2% Tween® 20 (MP Biomedicals, Inc., California, USA)で体表に付着した菌を除去するための洗浄を行った。PBS+0.2% Tween®

20 で洗浄後、Tween® 20 を除去するために、PBS で 3 回体表の洗浄を行った。その後、第 3 章-3.2.4.1.と同様の方法で麻酔をかけ、腎臓組織をピンセットで取り出し、組織の重さを測定した。次に、組織に PBS 200 μ L を添加し、ペッスルを用いて組織の破碎を行い、組織破碎液を段階希釈後、HI 寒天培地に 100 μ L 塗布し、25 °C で培養した。組織破碎液塗布 24 時間後に HI 寒天培地上に生えてきたコロニーの数と組織の重さから組織 1 g 当たりの CFU を求めた。

4.2.6. メダカ腎臓細胞における活性酸素種の測定

4.2.6.1. 腎臓細胞の採取

第 3 章-3.2.4.1.と同様の方法で麻酔をかけ、尾柄部を切断し、切断部を 0.1 mg/mL ヘパリンナトリウム (Wako, Osaka, Japan)を溶解した PBS 1 mL に漬けることで脱血を行った。脱血後、腎臓組織をピンセットで取り出し、0.1 mg/mL ヘパリンナトリウムを溶解した PBS 1 mL に漬けた。その後、Falcon® Cell Strainer 100 μ m Nylon (Corning, New York, USA)に組織を押し付け、細胞を単離し、回収した。回収した細胞は 4 °C、400 \times g で 5 分間の遠心を行い、PBS で 2 回洗浄後、Medaka primary culture medium [5% FBS、1% penicillin/streptomycin および 15 mM HEPES buffer を添加した L-15 培地](Carlson et al., 2002) 200 μ L に再懸濁し、生細胞数を測定した。その後、Nuncolon™ Delta Surface 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)に 5×10^5 cells/well 播種し、33 °C で 24 時間培養したものを腎臓細胞とした。

4.2.6.2. Nitroblue tetrazolium (NBT) 法

採取した腎臓細胞を PBS で洗浄後、1mg/mL Nitroblue Tetrazolium Chloride (Wako, Osaka, Japan)を溶解した PBS を 100 μ L 添加し、30 °C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、PBS で洗浄し、メタノール (Wako, Osaka, Japan)を 100 μ L 添加し、室温で 2

分間の固定を行った。固定後、メタノールを除去し、室温で風乾した。風乾したことを確認後、120 μL の 2 M KOH (Wako, Osaka, Japan) および 140 μL の Dimethyl Sulfoxide (Wako, Osaka, Japan) を添加し、ピペッティングすることで発色させた。発色液の吸光度は、Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて 620 nm の波長で測定を行った。

4.2.7. メダカ腎臓細胞における細胞傷害活性の測定

4.2.7.1. 腎臓細胞の採取

4.2.6.1. と同様の方法で採取および生細胞数の測定を行った。また、*A. hydrophila* による刺激を行うため、腎臓細胞単離後、再懸濁した培地は penicillin/streptomycin を含まない Medaka primary culture medium を用いた。その後、Nuncolon™ Delta Surface 96-well plate に 2.5×10^5 cells/well 播種し、24 時間培養したものを腎臓細胞とした。

4.2.7.2. 腎臓細胞の刺激

4.2.6.1. で採取した腎臓細胞の培地を除去し、新しい penicillin/streptomycin を含まない Medaka primary culture medium 50 μL を添加した。その後、細胞に *A. hydrophila* 2.5×10^6 CFU/well または Nigericin (1 mM) を添加し、培地の全量が 100 μL となるようにした。刺激後、1 時間または 2 時間における細胞傷害活性の測定を行った。

4.2.7.3. Lactate dehydrogenase (LDH) 放出の測定

細胞傷害活性は LDH の放出を測定することにより明らかにした。放出された LDH の測定は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (DOJINDO, Kumamoto, Japan) を用いて行った。4.2.7.2. で刺激した腎臓細胞の培地に Working Solution を 100 μL 添加し、プレートの側面を軽く叩き、よく混和し、室温で遮光して 30 分間静置したすることで呈色反応した。

その後、Stop Solution を 50 μ L 添加し、反応を止め、Multiskan FC を用いて 492 nm における吸光度の測定を行った。LDH が全量放出された場合の positive control として、キットに付属している Lysis Buffer で全細胞を溶解したもの、negative control として何も添加していない細胞を用いて以下の計算式を用いて LDH 放出の測定を行った：
$$\{(OD_{492} \text{ sample} - OD_{492} \text{ negative control}) / (OD_{492} \text{ positive control} - OD_{492} \text{ negative control})\} \times 100。$$

第 3 節 結果

4.3.1. ASC-1 変異メダカの構築

メダカ Hd-rR 系統の *asc1* は 5 エキソン-4 イントロンで構成され、オープンリーディングフレーム(open-reading frame: ORF)領域はエキソン 3 から 5 にコードされていた。そこで、メダカ Cab 系統の *asc1* を変異させるために、メダカ Hd-rR 系統のゲノム情報 (Ensembl ID. ENSORLG00000025688) を基にメダカ Cab 系統の mRNA 配列における特異的な標的配列を含む *asc1*-crRNA の設計を行った。その結果、*asc1* の PYD ドメインがエキソン 3 にあるため、*asc1*-crRNA 標的配列は PYD ドメイン領域の後半部に設計した (Fig. 23)。

Cas9 mRNA および *asc1*-sgRNA を卵に注射した F0 メダカはヘテロ二本鎖移動度分析で変異の導入を確認し、変異が入っている個体と野生型メダカを交配させ、F1 メダカを得た。F1 メダカのうち、*asc1* 塩基配列に 7 塩基欠損のヘテロ変異メダカを選抜し、さらに野生型メダカと交配させ、F2 を得た。さらに、ヘテロ二本鎖移動度分析で選抜し、F2 メダカ(#6 雄および#11 雌)が同じ 7 塩基欠損のヘテロ変異体であったため、これらの個体を交配させ、F3 においてホモ変異体の ASC-1 変異メダカを得た。F3 の遺伝子型は 7 塩基欠損を PYD ドメイン領域の半ばに有するホモ変異体であり (Fig. 23)、F4 以降においても同様の遺伝子型を有した。さらに、変異を加えた *asc1* の演繹されたアミ

ノ酸配列においては、PYD ドメイン領域の半ばから 7 塩基欠損によるフレームシフトが起こり、7 塩基欠損領域の後から ASC-1 とは異なるアミノ酸残基がコードされたのちに終止コドンの挿入が確認された (Fig. 23)。これらのことから、作製した *asc1*-crRNA によりメダカ *asc1* のエクソン 3 に変異が導入された結果、ASC-1 変異メダカを構築することができた。

4.3.2. ASC-1 変異メダカの *A. hydrophila* 感染に対する感受性

野生型および ASC-1 変異メダカを *A. hydrophila* に感染させ累積死亡率の測定を行った。 10^6 および 10^7 CFU/mL の 2 種類の濃度で感染試験を行った結果、どちらの濃度においても ASC-1 変異メダカは野生型メダカに比べて累積死亡率が高かった (Fig. 24)。特に、高濃度の浸漬感染で野生型と ASC-1 変異メダカの累積死亡率に有意な差が見られた (Fig. 24)。 *A. hydrophila* 感染時の症状として、数匹の野生型および ASC-1 変異メダカにおいて立鱗が見られた。また、野生型メダカにおいてのみ腎臓の肥大が見られた。さらに、 *A. hydrophila* がメダカに感染していることを確認するために、死亡魚の腹腔内から菌を分離し、 *A. hydrophila* 特異的なプライマーを用いて PCR を行い、 *A. hydrophila* であることを確認した。

4.3.3. *A. hydrophila* 感染 ASC-1 変異メダカの表皮細胞における *asc2* および *asc3* の発現誘導

ASC-1 変異メダカにおいて、 *asc1* の配列中に 7 塩基の欠損が生じたことで *asc1* の演繹されたアミノ酸配列において途中で終始コドンが挿入されたが、 *asc1* の PYD ドメインの一部は保存されたままである (ASC_1_mut 配列)。この ASC-1_mut がその他の *asc* の発現に影響を与えるかどうかは不明である。そこで、 *A. hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカにおける 3 種類の *asc* の発現を解析した。ASC-1 変異メダカの鰓において、 *A.*

A. hydrophila 感染後 72 時間で *asc1* および *asc2* の発現は野生型に比べて有意に低かった (Fig. 25)。これに対して、*asc3* の発現は感染後 0 時間および 24 時間で有意に高かった (Fig. 25)。

4.3.4. *A. hydrophila* 感染 ASC-1 変異メダカの腎臓における NF- κ B 関連遺伝子の発現動態

野生型および ASC 変異型における炎症応答を明らかにするために、*A. hydrophila* 感染時の腎臓および腸管における 17 種類の免疫関連遺伝子の発現動態を調べた。未感染状態の ASC-1 変異メダカの腎臓において、炎症性サイトカイン遺伝子(*il1b1*, *il1b2*, *il8*, *ifng* および *tnfa*)、炎症関連遺伝子(*casp1*)およびアポトーシス関連遺伝子(*casp3*)の発現は野生型メダカに比べて高かった (Fig. 26)。一方で、腸管においては真逆の遺伝子発現パターンを示した (Fig. 26)。ASC 変異メダカの腎臓における *il1b2*, *il8* および *tnfa* の発現は有意に高く、腸管における *il18* の発現は有意に低かった (Fig. 26)。*A. hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカの腎臓において、炎症性サイトカイン遺伝子(*il1b1*, *il8*, *ifng* および *tnfa*)および炎症関連遺伝子 (*mmp9* および *ripk2*) の発現は野生型メダカに比べて有意に低かった (Fig. 26)。ASC-1 変異メダカの腸管において、*A. hydrophila* 感染後 24 時間で *ifng* および *tnfa* の発現は野生型メダカに比べて有意に減少した (Fig. 26)。さらに、ASC-1 変異メダカの腸管において、腸管の炎症関連遺伝子(*il17af1*, *il17af3* および *il17c*) の発現は無刺激時および *A. hydrophila* 感染時において野生型に比べて有意に高く、特に *A. hydrophila* 感染時において有意な差が見られた (Fig. 26)。さらに、ASC-1 変異メダカの腎臓における *hmgbl* および *casp1* の発現量は、*A. hydrophila* 感染後 24 時間で野生型メダカの腎臓と比較して変化が見られなかったが、腸管においては、ASC-1 変異メダカは野生型メダカに比べて有意に高かった (Fig. 26)。ASC-1 変異メダカの腎臓および腸管において、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (*mmp9*)の発現は野生型に比べて有意に

低かった (Fig. 26)。また、これらの組織における *casp8* の発現は野生型と ASC-1 変異メダカで変化は見られなかったが、*A. hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカにおける *casp3* の発現は野生型メダカに比べて有意に高かった (Fig. 26)。さらに、ASC-1 変異メダカの両組織ににおける *ripk2* の発現は、野生型に比べて有意に低かった (Fig. 26)。これらの結果に加えて、*A. hydrophila* 感染時のメダカの腎臓および腸管における好中球およびマクロファージ特異的な遺伝子(myeloperoxidase, *mpx*; macrophage-expressed gene 1, *mpegl*) の発現量の解析を行なった。無刺激時の ASC-1 変異メダカの腎臓における *mpx* の発現は、野生型に比べて有意に低かったが、*A. hydrophila* 感染 24 時間においては有意に高かった (Fig. 26)。

4.3.5. ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における *A. hydrophila* 感染後の活性酸素種(ROS) 産生、細胞障害活性および組織内生菌数の変化

脊椎動物において、ROS の産生は微生物を殺菌し、哺乳類の単球において NLRP3 インフラマソームは ROS の産生に関与していることが知られている。また、哺乳類において、ASC は細菌を排除する過程で Casp-1 の活性化を介してパイロトーシスを誘導するために重要である。そこで、魚類において *A. hydrophila* 感染に対する ASC の役割を明らかにするために、*A. hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカの腎臓における細菌数の測定、ASC-1 変異メダカの腎臓細胞の *A. hydrophila* 感染時の ROS 産生および細胞死の検出を行なった。

まず、*A. hydrophila* 感染時の腎臓における細菌数の測定を行なった。*A. hydrophila* 感染後 24 時間における ASC-1 変異メダカの腎臓における細菌数は、野生型メダカに比べて有意に多かった (Fig. 27)。また、ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における ROS の産生を測定するために、NBT の還元を測定した。ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における ROS の産生は野生型に比べて低かった (Fig. 28)。さらに、細胞死の割合を測定するために、

LDH の放出の測定を行なった。ASC-1 変異メダカの腎臓細胞を NLRP3 インフラマソームの刺激剤であるナイジェリシン刺激した場合、野生型メダカの腎臓細胞に比べて LDH 放出の割合は低い傾向を示した (Fig. 29)。また、*A. hydrophila* で刺激した場合、ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における LDH 放出の割合は野生型メダカに比べて有意に低かった (Fig. 29)。

第4節 考察

哺乳類において、ASC は Casp-1 を活性化することで細胞質内の免疫応答を調節するインフラマソーム複合体のアダプター分子として知られている (Schroder and Tschopp, 2010)。さらに、ASC はそれ単体の多量体である ASC スペックを形成することによっても Casp-1 を活性化することが知られている。本章においては、メダカの ASC-1 に着目し、細菌感染時における ASC-1 の機能を明らかにするために、ASC-1 変異メダカの構築を行い、細菌感染時における炎症応答を明らかにした。

哺乳類において複数の細菌感染症に対して、インフラマソームが生体防御に重要な役割を果たすことが知られており (Sahoo et al., 2011)、*Francisella tularensis* および *Mycobacterium tuberculosis* を含む細菌感染時に ASC を欠損させた場合には野生型に比べて高い累積死亡率および感染細菌数の上昇が見られたという報告がある (Mariathasan et al., 2005; McElvania Tekippe et al., 2010)。多くの文献において、*A. hydrophila* 感染時に炎症が誘導されることが報告されているが、*A. hydrophila* 感染に対するインフラマソームを介した炎症応答に関する報告は非常に少ない (McCoy et al., 2010b, 2010a)。本章においては、*A. hydrophila* 感染時における ASC-1 の役割を明らかにするために、ASC-1 変異メダカを用いて *A. hydrophila* に対する累積死亡率および免疫応答を解析した。その結果、ASC-1 変異メダカにおける累積死亡率および組織に感染した細菌数は野生型に比べて高かった。これは魚類において *A. hydrophila* 感染に対して ASC-1 が重要

な役割を持つことを示した初めての報告である。

魚類において、*A. hydrophila* は腎臓や腸管を含む様々な臓器を標的として、重篤な炎症を引き起こす (Chen et al., 2018; Luo et al., 2018; Song et al., 2014)。興味深いことに、*A. hydrophila* に感染した ASC-1 変異メダカにおける炎症関連遺伝子の発現動態は腎臓と腸管で異なった。メダカを含む魚類において、腎臓は哺乳類における骨髄と同様の役割を持つ造血組織として知られている (Aghaallaei et al., 2010)、*A. hydrophila* を含む複数の細菌感染時のマウスの骨髄由来マクロファージ (BMDMs) において、ASC 欠損状態では野生型に比べて IL-1 β の分泌量が有意に減少した (Abdelaziz et al., 2011; Chen et al., 2017; McCoy et al., 2010a; Patankar et al., 2015)。さらに、腸管におけるインフラマソームは IL-18 の分泌を介して腸管上皮細胞の増殖、組織の修復および抗菌性の防御を行うことで腸管の恒常性を維持するための重要な役割を担っている (Khameneh et al., 2019; Lei-Leston et al., 2017; Winsor et al., 2019)。哺乳類の腸管上皮細胞において、ASC は腸管の炎症を誘導するインフラマソームの重要な構成分子であり (Sellin et al., 2015)、マウスの腸管においては *Citrobacter rodentium* 感染時に ASC の欠損により重篤な症状が引き起こされた (Song-Zhao et al., 2014)。したがって、哺乳類においても、魚類においても、ASC は造血組織と腸管で異なる役割を果たすことが示唆された。

転写因子である NF- κ B は、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IL-18 および MMP ファミリーを含む、多数の免疫および炎症関連遺伝子の転写を制御している (Liu et al., 2017)。哺乳類において、ASC は Casp-1 と RIPK2 の結合を介した NF- κ B の活性化を阻害するという報告がある (Sarkar et al., 2006)。また、ニシキテグリにおいても ASC は NF- κ B の活性化を阻害し (Sun et al., 2008)、キンギョにおいては RIPK2 と結合し、NF- κ B の活性を抑制する (Xie and Belosevic, 2016)。メダカの *A. hydrophila* 感染時の炎症関連遺伝子の発現解析において、感染後 24 時間の ASC-1 変異メダカの腎臓において、野生型メダカに比べて *ripk2* の発現が減少していた。さらに、ASC-1 変異メダカにおいて NF- κ B によ

り制御される遺伝子である *illb*、*il6*、*il8*、*tnfa* および *mmp9* の発現量も野生型メダカに比べて有意に減少していた。これらの結果から、*A. hydrophila* 感染時にメダカの ASC-1 は *ripk2* の転写を制御し、これらの分子が NF- κ B を介した炎症関連遺伝子の発現に関与していることが示唆された。タイプ II インターフェロンの一種である IFN- γ は、それが産生されることにより、マクロファージの活性化および抗原提示刺激などを介した自然免疫および獲得免疫を増強する (Schroder et al., 2004)。哺乳類において、*Salmonella typhimurium* および *F. novicida* 感染時に ASC を介した IL-18 の分泌量依存的に IFN- γ の量が上昇する (De Jong et al., 2014; Yan et al., 2020)。これと同様に、*A. hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカにおいて、*ifng* の発現は野生型メダカに比べて低かった。一方で、*il18* の発現は ASC-1 変異メダカと野生型メダカで有意な差は見られなかった。マウスにおいて、*IL-18* の転写量は ASC 欠損マウスおよび野生型マウス間で差が見られなかったが、ASC 欠損マウスの血清中に放出された *IL-18* の量は野生型マウスに比べて低かった (Yan et al., 2020)。これらのことが、メダカの *il18* の発現量に差が見られなかった原因として考えられ、*A. hydrophila* 感染時の ASC-1 を介した *IL-18* による生体防御機構を明らかにするためには、*IL-18* の産生量をタンパク質レベルで検出する必要がある。

哺乳類において、NLRP3 インフラマソームは、潰瘍性大腸炎の原因として知られ、細菌および化学物質により引き起こされる腸炎に対して保護する役割を持つ (Song-Zhao et al., 2014)。それに加えて、ASC は CD4 陽性 T 細胞の増殖を制限することで腸管の恒常性を維持する役割を持つ (Khameneh et al., 2019)。腸管において、CD4 陽性 T 細胞の中でも特に Th17 細胞が細菌感染に対する粘膜上皮の維持および防御において重要であり、それらが組織の修復を誘導する (Huber et al., 2012)。IL-17 は Th17 細胞から産生される炎症性サイトカインファミリーであり、抗菌ペプチドの産生を誘導する (Moseley et al., 2003)(Lei-Leston et al., 2017)。哺乳類において、ASC の欠損は CD4 陽性 T 細胞の分化に影響を与えず (Lei-Leston et al., 2017)、*C. rodentium* 感染マウスの盲腸にお

いて、ASC 欠損による *IL-17A* の発現への影響は見られなかった (Song-Zhao et al., 2014)。しかし、*A. hydrophila* 感染後 24 時間のメダカの腸管において、ASC-1 変異メダカの *il17af1*、*il17af3* および *il17c* の発現は野生型メダカに比べて有意に高かった。哺乳類において、*ripk2* は CD4 陽性 T 細胞から病原体により誘導される病原性 Th17 細胞への分化を制御しており、IL-1 β シグナル経路を介した *IL-17A* の転写の抑制を行っている (Shimada et al., 2018)。*Aeromonas hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカの腸管において、*ripk2* の発現は野生型メダカに比べて有意に低かった。これらの結果から、メダカの ASC-1 は Th17 細胞で *ripk2* の活性を介して *il17af1*、*il17af3* および *il17c* の転写を制御していることが示唆された。さらに、マウスの CD4 陽性 T 細胞において、ASC が欠損することで抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生量が増加し、IFN- γ の産生量が減少した (Narayan et al., 2011)。メダカの遺伝子発現レベルにおいてもこれと同様な傾向が見られ、*A. hydrophila* 感染時の ASC-1 変異メダカの腸管において *il10* の発現が上昇し、*ifng* の発現が減少した。これらの結果から、メダカの ASC-1 は哺乳類の ASC と同様に腸管免疫において重要な役割を果たすことが示唆された。

ソウギョにおいて、*A. hydrophila* 感染の初期に好中球とマクロファージが有意に増加することが報告されている (L. Li et al., 2016)。野生型メダカにおいて、*A. hydrophila* 感染後にマクロファージ特異的遺伝子である *mpeg1* の発現は有意に上昇した。一方で、好中球特異的遺伝子である *mpx* の発現は *A. hydrophila* 感染後に有意な上昇が見られないことから、*A. hydrophila* 感染後のメダカにおいてマクロファージが誘導されたことが示唆された。しかし、*A. hydrophila* 感染後 24 時間の ASC-1 変異メダカの腸管における *mpx* の発現は野生型に比べて有意に高かった。マウスの腸管において、*C. rodentium* 感染時に ASC 欠損状態で好中球を含む顆粒球が誘導され炎症を誘導するという報告があり (Song-Zhao et al., 2014)、*A. hydrophila* 感染メダカの結果と一致する。一方で、ASC-1 変異メダカの腎臓において *A. hydrophila* 感染後に *mpx* の発現が野生型に比べて有意に高

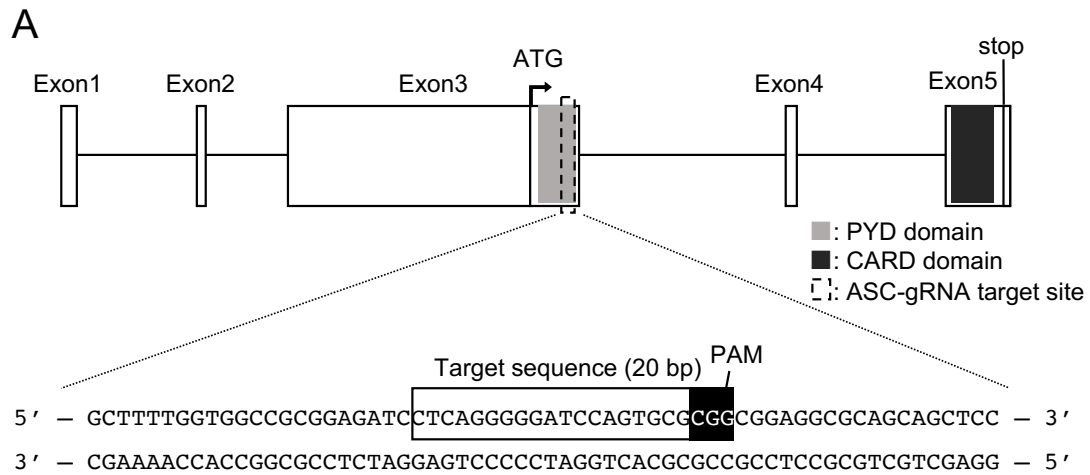
かったにも関わらず、好中球遊走因子として知られている *il8* および *mmp9* の ASC-1 変異メダカにおける発現は野生型に比べて低かった。哺乳類において、ASC は炎症関連の主要な転写因子である NF- κ B および AP-1 の活性化を促進し、*IL-8* の転写を誘導するという報告がある (Hasegawa et al., 2009)。これらの結果から、ASC-1 変異メダカにおいて、好中球が *A. hydrophila* に感染した組織に誘導されるが、好中球遊走因子の遺伝子の発現は減少することが示唆された。メダカの ASC-1 と好中球の誘導機構の関連性についてより詳細に理解するためには、さらなる研究が必要である。ASC-1 変異メダカにおける *A. hydrophila* 感染による累積死亡率および腎臓における感染細菌数は野生型に比べて有意に高かったが、腎臓細胞における ROS の産生は有意に低かった。マクロファージや好中球などの貪食細胞において、病原体などの貪食の過程で ROS の産生により病原体は排除される (Biller and Takahashi, 2018)。哺乳類において、TNF- α は好中球およびマクロファージの ROS の産生を制御しており (Blaser et al., 2016)、IL-1 β の産生は細菌を排除するために好中球の遊走と ROS の放出を促進する (Jorgensen et al., 2016)。 *Aeromonas hydrophila* 感染後 24 時間の ASC-1 変異メダカの腎臓における *tnfa* および *illb* の発現および ROS の産生は野生型メダカに比べて低かった。これらのことから、メダカの ASC-1 は、*tnfa* および *illb* の発現を介して ROS の産生を誘導し、細菌の排除に関与することが示唆された。

Aeromonas hydrophila 感染時の哺乳類のマクロファージにおいて、細菌を排除するために、パイロトーシスやアポトーシスのような細胞死が誘導される (Krzymińska et al., 2009; Majumdar et al., 2009; McCoy et al., 2010a)。また、複数の魚種において、*A. hydrophila* 感染時に宿主の細胞のアポトーシスが誘導されることが示唆されている (Chen et al., 2020; Liu et al., 2020; Shelly et al., 2017)。さらに、*M. tuberculosis* 感染時のゼブラフィッシュにおいて、TNF がミトコンドリアの ROS を産生することによりネクロトーシスを誘導することが報告されている (Roca et al., 2019)。本章において、LDH の放

出の割合を細胞死の指標とした。ASC-1 変異メダカの腎臓細胞を *A. hydrophila* で刺激した場合、LDH の放出は野生型メダカより有意に低かった。脊椎動物において、アポトーシスは 2 種類のカスパーゼにより制御されている。1 つは Casp-8 などの細胞死のシグナルを開始する誘導型カスパーゼであり、もう 1 つは Casp-3 などの細胞死を実行する実行型カスパーゼである。ハイギョ (*Channa striata*) において、*A. hydrophila* 感染後 24 時間で *casp3* および *casp8* の発現が有意に上昇している(Kumaresan et al., 2016)。さらに、ウォーキングキャットフィッシュ (*Clarias batrachus*) の頭腎マクロファージにおいて、*A. hydrophila* は *casp3* の活性化を介したアポトーシスを誘導した(Banerjee et al., 2012)。メダカの腎臓および腸管において、*A. hydrophila* 感染時に野生型および ASC 変異メダカ間で *casp8* の発現に有意な差は見られなかったが、ASC-1 変異メダカにおける *casp3* の発現は野生型メダカに比べて有意に高かった。これらの結果から、メダカの ASC-1 は *A. hydrophila* の感染から生き残るために、好中球の発生および遊走に関与し、好中球およびマクロファージにおいて ROS の産生および細胞死を介して細菌を排除する機構に関わっていることが示唆された。しかし、魚類における ASC-1 と細胞死経路の関連性について不明な点が多々ある。したがって、細胞死経路における ASC-1 の役割をより理解するためには、Casp-1 および GSDM ファミリーの切断などを詳細に解明していくことが必要である。

Table 7. Oligonucleotide sequences used in this study.

name	sequences (5' ->3')	mer (bp)
<i>Primers for cloning into pGEM-T Easy vector:</i>		
P#1116_OI_ASC-F1	ACTTCTATCCAGCTCCGTCT	20
P#1117_OI_ASC-R1	TTCCACGTCTGACGTGTTCT	20
<i>sgRNA for OLASC CRISPR/Cas9 target site:</i>		
OI_ASC-sgRNA-Sense	TAGGTCAGGGGATCCAGTGCG	21
OI_ASC-sgRNA-Antisense	CGCACTGGATCCCCTGACCTA	21
<i>Primers for genotyping:</i>		
P#947_OI_ASC_HMA-F1	TGAATTCATGGCACAAGTAATTAATACCA	28
P#1045_OI_ASC_HMA-R1	GTACTCGAGTTAACGCAGCAGAGACAG	27
P#1112_OI_ASC_HMA_seq_F1	GCCGAATTCGATAACGAATCATGGCACA	28
<i>Primers for qPCR analyses:</i>		
P#1328_OI_ASC_rt_F5	GTGGTCGCAGATGTGATG	18
P#1226_OI_ASC_rt_R1	CGCCTCATTGAGAGCTGCT	20
P#1107_OI_IL-1 β _F2	GTCCAGCTGAACATGTCTAC	20
P#1108_OI_IL-1 β _R2	TTGTCTCTTCTTGGTGGCA	20
P#1548_OI_IL-1 β -like_F2	CGGACGAGAAGGAAAAGGTC	20
P#1549_OI_IL-1 β -like_R2	CTCCATGACGGTGCTACAGA	20
P#1254_OI_IL-6_F4	CTGAAGCAGGTGGAGAAGGAGTAC	24
P#1255_OI_IL-6_R4	GACCCGCTCGCTCCTTTTCATCTT	24
P#1403_OI_IL-8_rt_F1	GGACCTGGTTGTCCTCATT	20
P#1404_OI_IL-8_rt_R1	CCCCTATGACTTCAGTCTCTG	22
P#1597_OI_IL-18_rt_F1	GAACAACGGCAACAGTCAGA	20
P#1598_OI_IL-18_rt_R1	CATTGGTTGACTGCAGATGG	20
P#1339_OI_IFN- γ _qPCR_F1	CAAGACCATCCAGAACCTCC	20
P#1340_OI_IFN- γ _qPCR_R1	AGCTGCTTCAGCATGTGTCC	20
P#1617_OI_TNF- α _rt_F1	GAAGATGGCGTTTTGGTGG	20
P#1618_OI_TNF- α _rt_R1	GCTCTGTAGGACTCATTATTTT	22
P#1427_OI_IL-10_F1	CCATTAAGAGCGAGTTCGC	19
P#1428_OI_IL-10_R1	ATCTGCGCCCGCTTTGGG	19
P#1607_OI_IL-17A/F1-exF1	TTCAGCAACCAGCTTCTGC	19
P#1608_OI_IL-17A/F1-exR1	GGTCACCATCATCCTCATCA	20
P#1609_OI_IL-17A/F3-exF1	GCTTCTGGTTCTGAGAGCTT	20
P#1610_OI_IL-17A/F3-exR1	ACTTTGGTCTTGCTTCAGC	20
P#1720_OI_IL-17C-exF1	CCTGAAAATACACGGAAGTCA	21
P#1721_OI_IL-17C-exR1	AGGGGCTTGGAGTTGAAGTT	20
P#1718_OI_mmp9_rt_F1	ACAGACCTGGCAGAGAGCTA	20
P#1719_OI_mmp9_rt_R1	GTCTCGTCTAGGCCAGTTG	20
P#1657_OI_ripk2_rt_F2	GACATCCCCAGCAGAGAGAC	20
P#1658_OI_ripk2_rt_R2	GGGCTGAACAACAAGGTGAT	20
P#1157_Casp1_RTP_F2	TTCTACATCCAGCTGCTGC	20
P#1158_Casp1_RTP_R2	GTATCGGGAGTGCAGGAAAG	20
P#1651_OI_Casp-3_rt_F4	GCATGGACTACCCAAAATG	20
P#1652_OI_Casp-3_rt_R4	ATCTGATCCACGGTCTGGTC	20
P#1589_OI_Casp-8_rt_F2	CAGACCCACCAACTCACCT	20
P#1590_OI_Casp-8_rt_R2	GCCAAAACGATGGAACAAGT	20
P#1563_OI_mpx_rt_F2	CCTAACATTGACCCAGCAT	20
P#1564_OI_mpx_rt_R2	TCCACCCTCAAAGACCACTC	20
P#1567_OI_mpeg1_rt_F1	CAAGGTGGCTCTGACAGTGA	20
P#1568_OI_mpeg1_rt_R1	CAGTTCTGTGCATGCTTGGT	20
P#1151_ol_ β -actin_F2	CCACCATGTACCTGGAATC	20
P#1152_ol_ β -actin_R2	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	20



B

Nucleotide sequences

WT : ...AGATC**CCTCAGGGGGATCCAGTGC CGCGCGGAGGCGCAGCAGCCT**...

ASC-KO: ...TCTAGCTCAGGGGGATCC-----GCGGAGGCGCAGCAGCCT...

7-bp deletion

Amino acid sequences

WT : MESKT.....LRGIQCAAEAQQLLNEAGISSSSG.....LEGNS*

ASC-KO: MESKT.....LRGIRRRRSSS*

Frame-shifted sequence

* stop codon

Fig. 23. ASC-1-crRNA target regions and mutated sequences in the medaka *asc1* gene. (A) Schematic representation of medaka *asc1* gene, including five exons (Medaka Hd-rR *ASC-1*: ENSORLG00000025688). The ASC-1-crRNA was designed in exon 3 of the *asc1* gene. (B) The mutated nucleotide and amino acid sequences of the WT and ASC-1-KO medaka. The targeted nucleotides with crRNA are shown in bold letters, and the 7-bp deletion was confirmed in the ASC-1-KO strain. The ASC amino acid sequence of the mutant medaka was terminated by a stop codon in the middle of its full-length sequence due to a codon frame-shift.

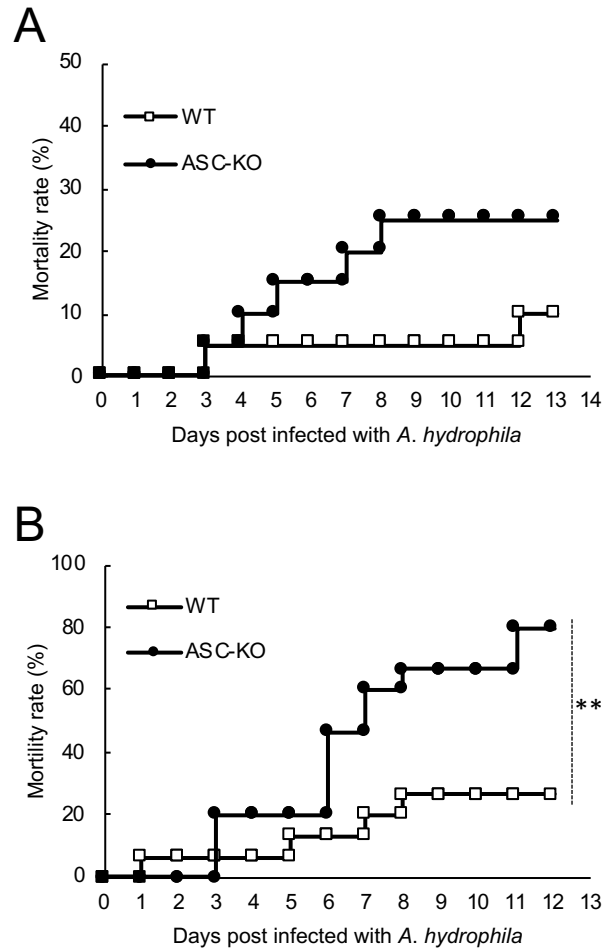


Fig. 24. Mortality rates of the WT and ASC-1-KO medaka infected with *A. hydrophila*. The WT and ASC-1-KO medaka immersed in 7.5×10^6 CFU/mL (A) or 7.25×10^7 CFU/mL (B) *A. hydrophila*-containing water, and the mortality was observed [In the experiment (A), 20 individual fish separately for WT and ASC-1-KO groups were used, and in the experiment (B), 15 fish were used]. Statistical analysis was performed using the Fisher's exact test (** $p < 0.01$).

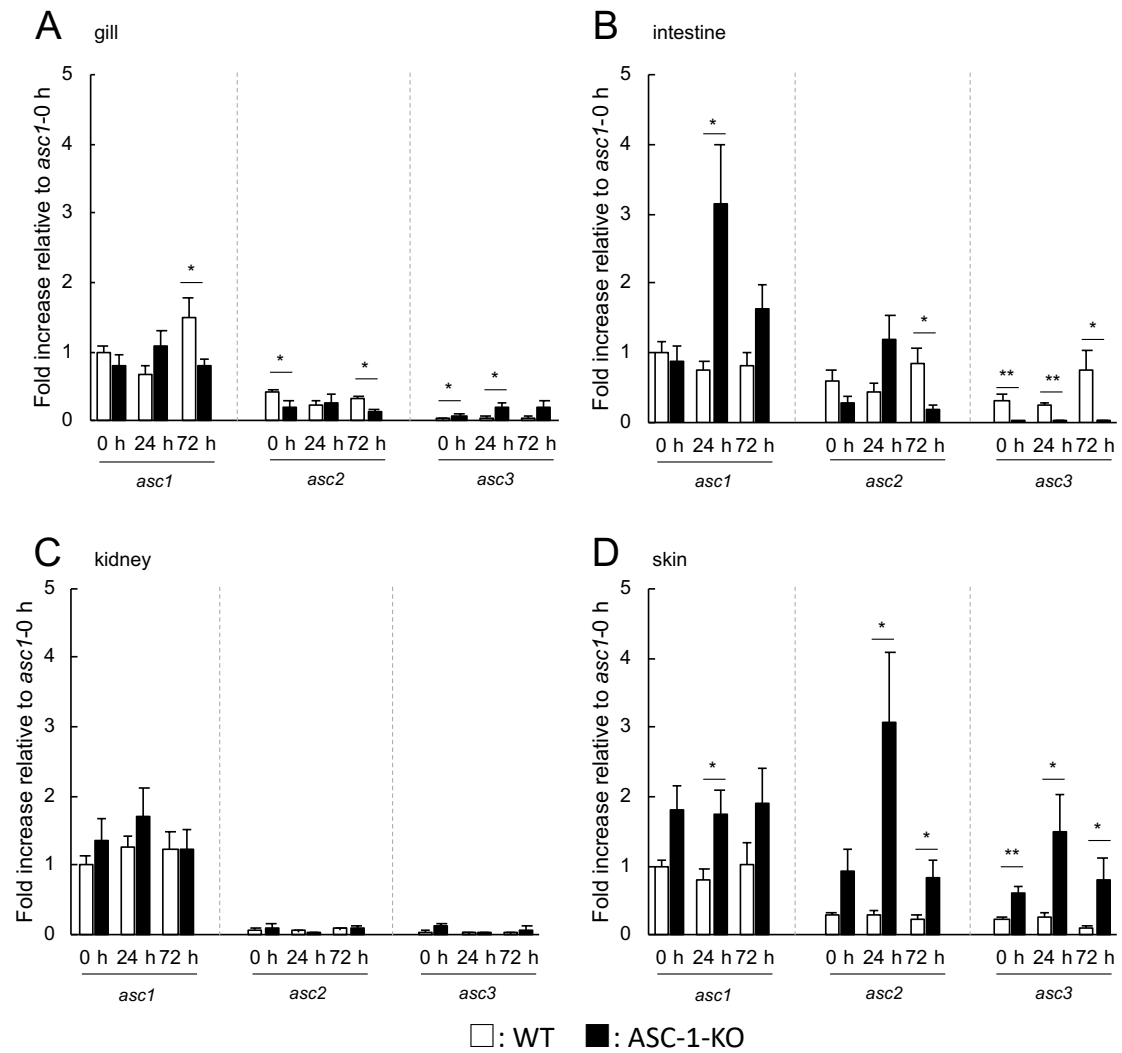


Fig. 25. The *asc* mRNA levels in the gill, intestine, kidney, and skin of the WT Cab strain and *ASC-1-KO* medaka at the indicated time points following *A. hydrophila* infection. The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of *asc1* in healthy WT medaka samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from five individual experiments ($n = 5/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student *t*-test).

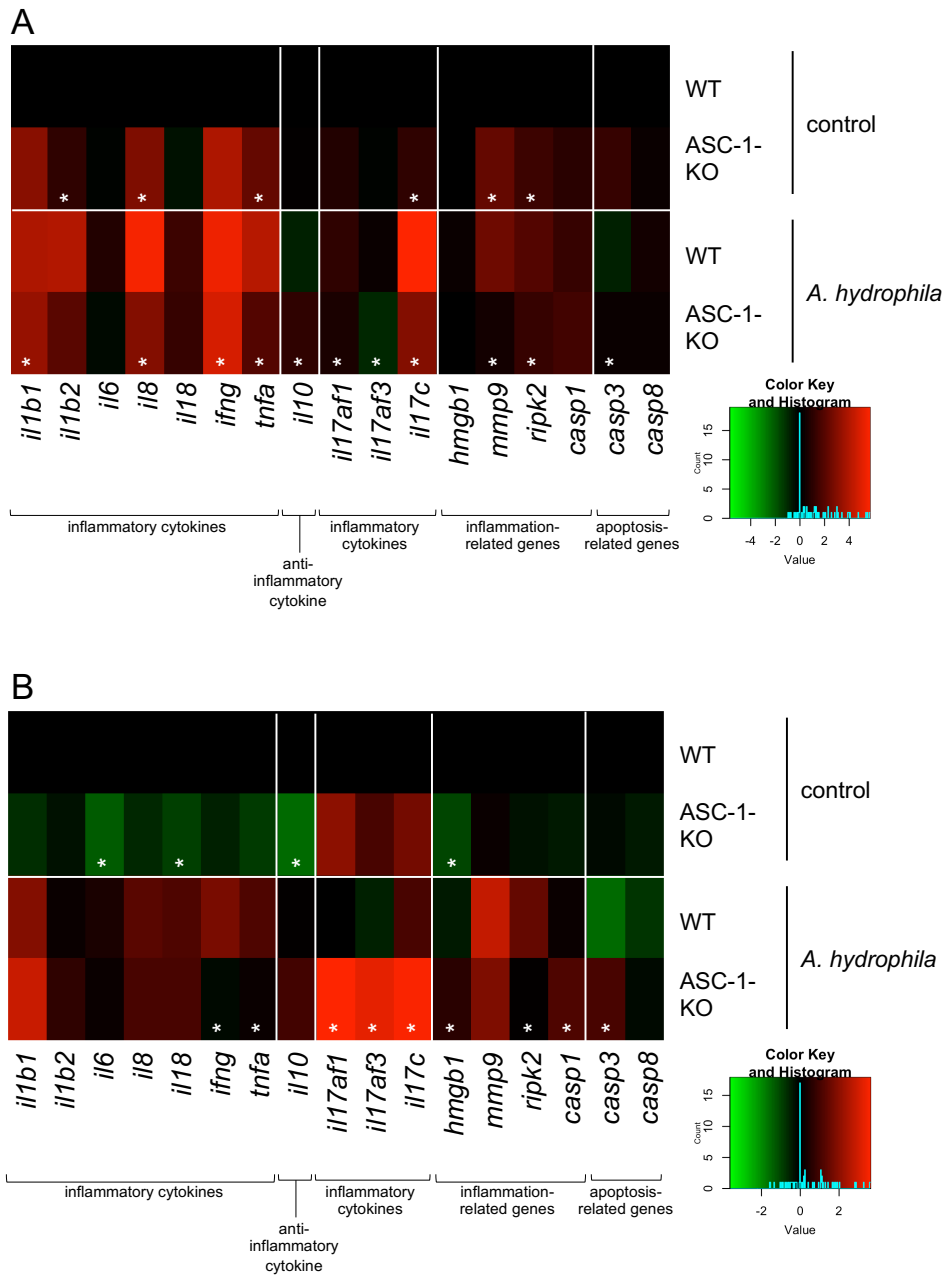


Fig. 26. Comparative analyses of the mRNA levels of immune-related genes in the kidney (A) and intestine (B) from the WT and ASC-1-KO medaka infected with *A. hydrophila*. The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of WT healthy medaka samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from four individual experiments ($n=4/\text{group}$), and WT and ASC-1-KO medaka were immersed in *A. hydrophila*-containing tanks (4.3×10^7 CFU/mL). Significant difference in the expression level of each group in control or *A. hydrophila* infection was indicated by asterisk.

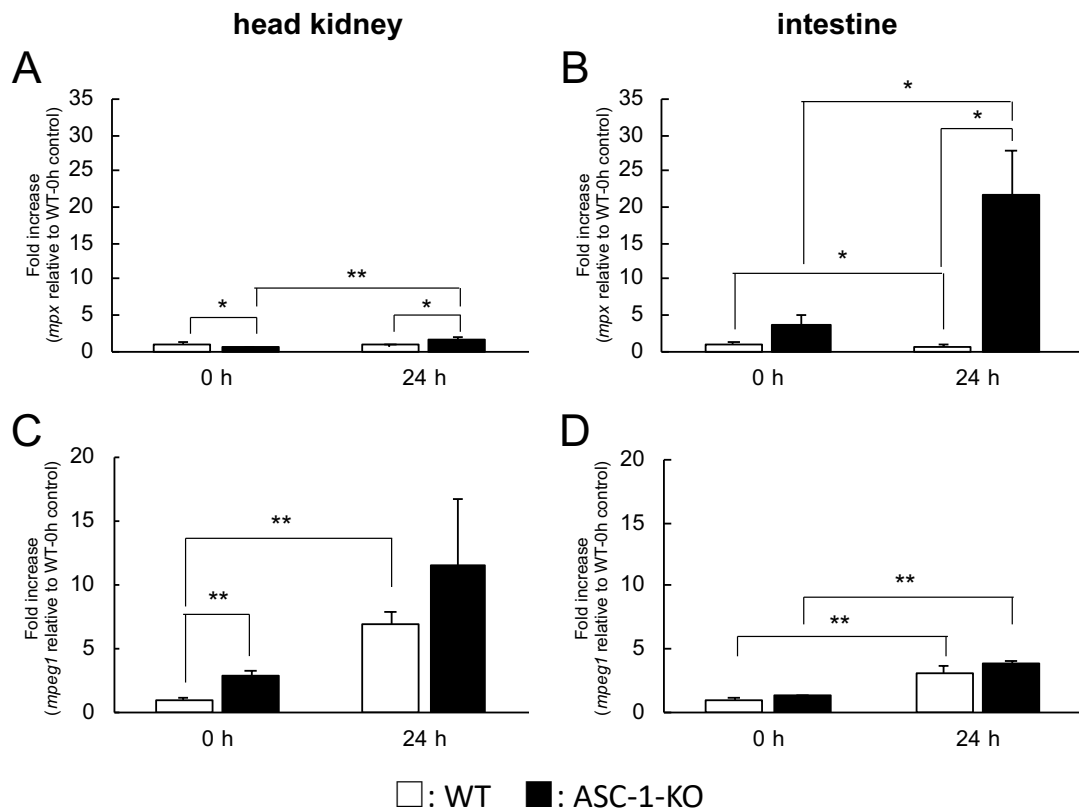


Fig. 27. Expression of neutrophil- and macrophage-specific genes in the WT and ASC-1-KO medaka infected with *A. hydrophila*. The expression of neutrophil-specific (*mpx*) (A and B) and macrophage-specific (*mpeg1*) (C and D) genes in the kidney (A and C) and intestine (B and D) of the medaka. Expression levels were normalized with β -actin and shown as fold increase values relative to the non-infected WT medaka. Error bars represent the mean \pm SEMs (n= 4); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student *t*-test).

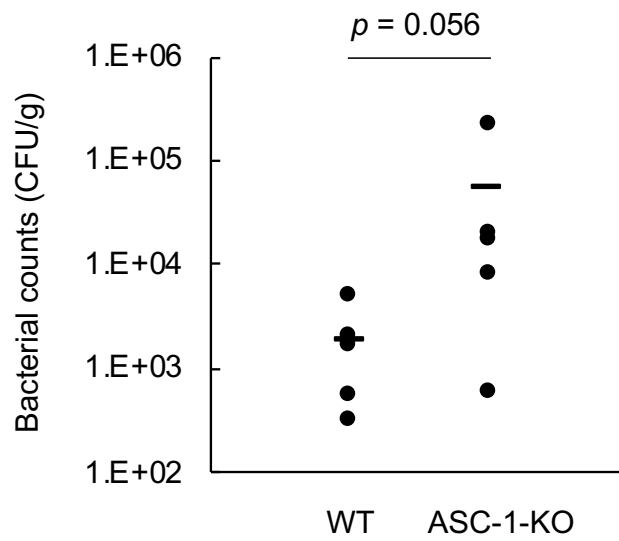


Fig. 28. Bacterial burden of the kidney cells of WT and ASC-1-KO medaka that were infected with *A. hydrophila* (4.3×10^7 CFU/mL). *A. hydrophila* burden was measured at 24 h post-infection in the kidney of the WT and ASC-1-KO medaka. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U* test (n= 5).

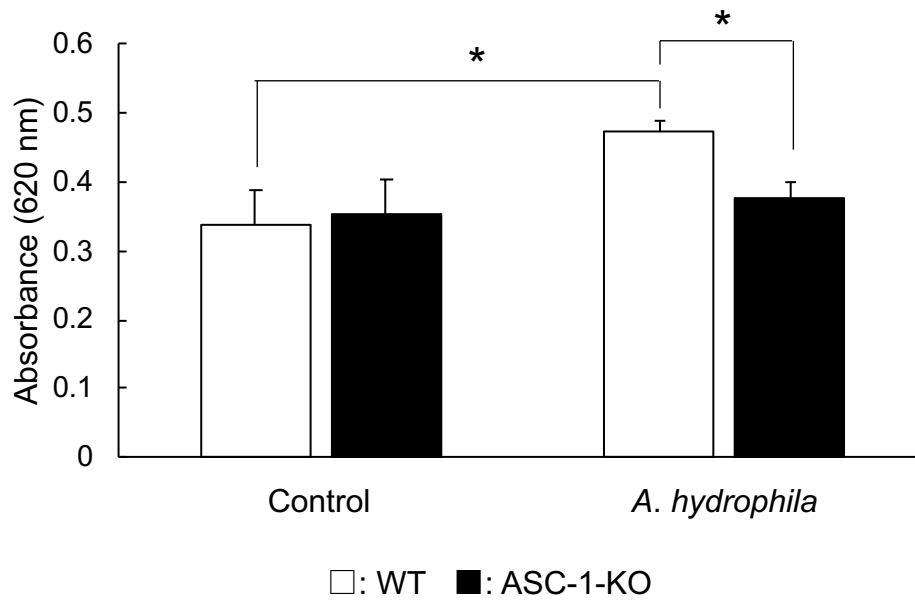


Fig. 29. Production of the superoxide anion in the WT and ASC-1-KO medaka kidney cells after *A. hydrophila* (7.25×10^7 CFU/mL) infection. Superoxide anion production was measured by optical density (OD) at 620 nm with a nitroblue tetrazolium assay. Error bars represent the mean \pm SEMs of triplicate samples ($n=3$); * $p < 0.05$ (Student *t*-test).

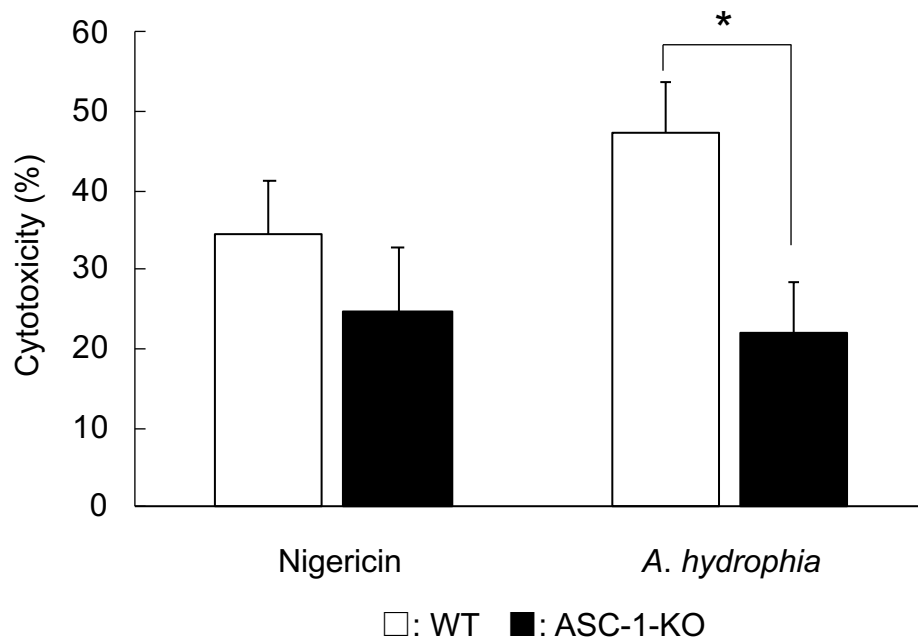


Fig. 30. Percentages of LDH released in the kidney cells of the WT and ASC-1-KO medaka stimulated with nigericin (1 mM) or challenged with *A. hydrophila* (2.5×10^6 CFU) for 1 h. LDH release was measured by OD at 492 nm. Error bars represent the mean \pm SEMs (n= 5); * $p < 0.05$ (Student *t*-test).

第5章 メダカにおける *E. piscicida* 感染時の *asc1* を介した炎症応答および細胞死誘導機構とその役割

第1節 緒言

哺乳類において、*E. tarda* は VI 型分泌装置 (T6SS) を有し、そのエフェクター分子である EvpP を分泌することにより ASC を介したインフラマソーム活性化経路を阻害することが知られている (Chen et al., 2017)。魚病細菌である *E. piscicida* も T6SS を有し、インフラマソームを介した炎症の誘導を阻害することがゼブラフィッシュにおいて報告された (Tan et al., 2019)。しかし、ゼブラフィッシュにおけるインフラマソームは Casp-1 の相同分子である Caspy が他の生物種とは異なる構造を持つため、特殊な分子機構を持っている (Masumoto et al., 2003; Yang et al., 2018)。本章において、*E. piscicida* 感染時におけるメダカ ASC-1 を介した炎症応答および細胞死誘導機構を明らかにした。

第2節 材料および方法

5.2.1. 実験動物

野生型メダカは、第3章 3.2.1. と同様のメダカ Cab 系統を用いた。ASC-1 変異メダカは、第4章-4.2.3. で構築したものをを用いた。

5.2.2. 細菌感染試験

5.2.2.1. 使用した菌株および培養条件

第3章-3.2.5.1. にある *E. piscicida* E381 株を用い、培養条件は第3章-3.2.5.1. に従った。

5.2.2.2. 感染方法

第3章-3.2.5.2. と同様の方法で行った。

5.2.2.3. 累積死亡率の測定

本試験においては、2種類の濃度区 [(A) 5.8×10^6 CFU/ml および (B) 3.7×10^8 CFU/ml] で浸漬感染させ、10 または 35 日間の死亡魚の割合を算出し、累積死亡率とした。

5.2.2.4. 遺伝子発現解析

第3章-3.2.5.3.と同様の方法で行った。使用したプライマーは Table 8 に示す。

5.2.3. 組織内における菌数の測定

第4章-4.2.5.と同様の方法で行った。また、腎臓、肝臓および腸管の組織破砕液から Monarch® Genomic DNA Purification Kit (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Massachusetts, USA) を用いてゲノム抽出を行った。抽出したゲノムを鋳型とし、*E. piscicida* の *fimA* 遺伝子特異的なプライマー (Table 8) を用いて qPCR によって組織のゲノム 10 ng 中に含まれる *E. piscicida fimA* 遺伝子のコピー数を絶対定量法により解析した。

5.2.4. メダカ腎臓細胞における活性酸素種の測定

第4章-4.2.6.と同様の方法で行った。

5.2.5. メダカ腎臓細胞における細胞傷害活性

第4章-4.2.7.と同様の方法で行った。

第3節 結果

5.3.1. ASC-1 変異メダカにおける *E. piscicida* 感染に対する感受性

野生型および ASC-1 変異メダカを *E. piscicida* に感染させ累積死亡率の測定を行った。10⁶ および 10⁸ CFU/mL の 2 種類の濃度で感染試験を行った結果、どちらの濃度においても ASC-1 変異メダカは野生型メダカに比べて累積死亡率が低かった (Fig. 31)。特に、低濃度の浸漬感染で野生型と ASC-1 変異メダカの累積死亡率に有意な差が見られた (Fig. 31)。 *Edwardsiella piscicida* 感染時の症状として、野生型メダカにおいては肝臓の発赤が見られたが、ASC-1 変異メダカにおいてはその症状は軽減されていた。さらに、*E. piscicida* がメダカに感染していることを確認するために、死亡魚の腹腔内から菌を分離し、*E. piscicida* 特異的なプライマーを用いて PCR を行い、*E. piscicida* であることを確認した。

5.3.2. *E. piscicida* 感染 ASC-1 変異メダカの腎臓における NF- κ B 関連遺伝子の発現動態および組織内生菌数の変化

野生型および ASC 変異型における炎症応答を明らかにするために、*E. piscicida* 感染時の腎臓、腸管および肝臓における 6 種類の免疫関連遺伝子の発現動態を調べた。未感染状態の ASC-1 変異メダカと野生型メダカを比較すると、腸管において *il8* および *tnfa* の発現が、頭腎において *il10* の発現が ASC-1 変異メダカで有意に低かった (Fig. 32)。一方で、抗菌ペプチドである *lyzg* は、未感染状態の ASC-1 変異メダカの腎臓において野生型メダカに比べて低かった (Fig. 32)。また、炎症性サイトカイン遺伝子である *il1b* は、*E. piscicida* 感染 24 時間の ASC-1 変異メダカの肝臓および腸管で有意に低かった (Fig. 32)。一方で、*E. piscicida* 感染時の *il8* は ASC-1 変異メダカと野生型メダカで変化は見られなかった (Fig. 32)。さらに、*E. piscicida* 感染時の肝臓において、*ifng* および *il10* の発現が野生型メダカに比べて ASC-1 変異メダカで低かった (Fig. 32)。また、組織内の *E. piscicida* の *fimA* 遺伝子のコピー数から組織内における菌数の測定を行った。その結果、*E. piscicida* 感染 24 時間の腎臓、腸管および肝臓において ASC-1 変異メダカと野

生型メダカで有意な差は見られなかった (Fig. 33)。一方で、感染 72 時間では、全ての組織において、ASC-1 変異メダカの組織内の菌数は野生型メダカと比較して有意に高かった (Fig. 33)。

5.3.3. *E. piscicida* に感染した ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における活性酸素種(ROS) 産生および細胞障害活性

Edwardsiella piscicida 感染時の ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における ROS の産生を測定するために、NBT の還元を測定した。ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における ROS の産生は野生型に比べて低かった (Fig. 34)。さらに、細胞死の割合を測定するために、LDH の放出の測定を行なった。また、*E. piscicida* で刺激した場合、ASC-1 変異メダカの腎臓細胞における LDH 放出の割合は野生型メダカに比べて有意に低かった (Fig. 35)。

第 4 節 考察

Edwardsiella piscicida は細胞内寄生細菌として知られ、病原関連因子として III 型および VI 型分泌装置 (T3SS および T6SS) を有する (Chen et al., 2017; Hu et al., 2019)。この中でも、T3SS は細胞質内の NLRP3 および NLRC4 インフラマソームに認識され、パイロトシスを介した炎症を誘導することが哺乳類で報告されている (Chen et al., 2017; Xie et al., 2014)。また、ゼブラフィッシュにおいても同様に *E. piscicida* の T3SS がパイロトシスを介した炎症誘導に関与していることが示唆されている (Tan et al., 2019; Yang et al., 2018)。一方で、*E. piscicida* の T6SS のエフェクター分子である EvpP は Jnk シグナルを抑制することで、哺乳類においては ASC の多量体化を抑制する (Chen et al., 2017)。また、魚類においては、*E. piscicida* の T6SS の EvpP が Jnk シグナルを抑制することで、Caspase インフラマソームの形成を抑制することがゼブラフィッシュで報告されている (Tan et al., 2019)。しかし、ゼブラフィッシュの Caspase は哺乳類の Casp-1 の相同

分子であるにも関わらず、哺乳類および他の魚種の Casp-1 とは異なるドメイン構造をしており、ASC を介さずに下流のシグナルを活性化することが報告されている (Masumoto et al., 2003; Yang et al., 2018)。本章においては、メダカの ASC-1 に着目し、*E. piscicida* 感染時における ASC-1 を介した炎症応答を明らかにした。

第4章で示したように、ASC-1 変異メダカの *A. hydrophila* 感染時における累積死亡率は野生型メダカに比べて有意に高かった。一方で、*E. piscicida* 感染時には、ASC-1 変異メダカの方が野生型メダカに比べて累積死亡率が有意に低くなった。哺乳類において、細胞内寄生細菌である *Mycobacterium tuberculosis* 感染時には、ASC を欠損させた場合、野生型と比較して累積死亡率が高くなることが報告されている (McElvania Tekippe et al., 2010)。同様の細胞内寄生細菌である *Salmonella typhimurium* 感染の場合、ASC を欠損させても累積死亡率への影響は見られない (Lara-Tejero et al., 2006)。以上のことから、哺乳類においてもメダカにおいても感染した細菌種により ASC の役割は異なり、*E. piscicida* 感染の場合、ASC-1 に変異が入っていることにより、野生型メダカより累積死亡率が低くなったのではないかと考えられた。本実験で用いた ASC-1 変異メダカにおける変異の入った ASC-1 配列 (ASC-1_mut 配列)には、PYD 領域の大半が含まれている。哺乳類においては、POP (Pyrin-only protein) 1、POP2 および POP3 と呼ばれる PYD 領域のみで構成される分子が存在する (Devi et al., 2020)。それらの分子は、NLR ファミリーや ALR ファミリー分子の PYD ドメイン領域と ASC の PYD ドメイン領域の結合を阻害する役割を持っている。これらの POPs により、Casp-1 の活性化を阻害し、IL-1 β および IL-18 の活性化の阻害およびパイロトーシスが阻害され、炎症が抑制される (Devi et al., 2020)。確かに、*E. piscicida* 感染時の ASC-1 変異メダカの肝臓および腸管において、炎症性サイトカイン遺伝子である *illb* および *tnfa* の発現量は野生型に比べて有意に低かった。このことから、ASC-1 変異メダカにおける ASC-1_mut 配列により *E. piscicida* 感染時の肝臓および腸管における *illb* および *tnfa* の発現が抑制

されたことが考えられた。一方で、好中球遊走因子である *il8* の発現は *E. piscicida* 感染時の肝臓、腸管および腎臓において ASC-1 変異メダカと野生型メダカで変化が見られていない。好中球特異的遺伝子である *mpx* の発現も *il8* と同様に、*E. piscicida* 感染時の肝臓、腸管および腎臓において ASC-1 変異メダカと野生型メダカで有意な差はない。しかし、*E. piscicida* の T6SS の EvpP が存在することにより Jnk シグナルを抑制することで、好中球遊走因子である *cxcl8a (il8)* および *mmp13* の発現を抑制し、好中球の遊走を抑制することがゼブラフィッシュで報告されている (Tan et al., 2019)。確かに、未感染時と *E. piscicida* 感染時で比較すると、ASC-1 変異メダカおよび野生型メダカの腎臓において、*mpx* の発現量は *E. piscicida* 感染後に有意に減少している。これらのことから、*E. piscicida* の T6SS によりメダカの腎臓の好中球の遊走を阻害したが、ASC-1_mut および *il8* の発現の影響は受けないことが示唆された。ASC-1 変異メダカにおける *E. piscicida* 感染時の腎臓における感染細菌数は野生型に比べて有意に高かったが、腎臓細胞における ROS の産生は有意に低かった。これは、第 4 章で示した *A. hydrophila* 感染時と同様な結果であり、ROS の産生により組織内の *E. piscicida* の菌数の抑制が起こることが示唆された。しかし、*A. hydrophila* 感染時には ASC-1 変異メダカの腎臓における *tnfa* および *il1b* の発現が抑制されたことが ROS の産生の減少につながったことを示したが、*E. piscicida* 感染時には野生型と比較しても有意な差はない。このことから、*A. hydrophila* 感染時と *E. piscicida* 感染時における ROS の産生の誘導機構は異なっていることが示唆され、今後、この機構のより詳細な解明が必要である。哺乳類において、*E. piscicida* の有している T3SS により ASC および Casp-1 を介した IL-1 β の活性化およびパイロトーシスを引き起こす (Chen et al., 2017; Xie et al., 2014)。一方で、*E. piscicida* の T6SS はこの経路を抑制する (Chen et al., 2017)。ターボットにおいても同様の結果が示されており、T3SS と T6SS のバランスが感染時の *E. piscicida* の病原性に関与する (Hu et al., 2019)。一方で、ゼブラフィッシュにおいては、*E. piscicida* が T3SS を有して

いてもパイロトーシス様の細胞死が起こらないことが示唆されている (Yang et al., 2018)。ASC-1 変異メダカの腎臓細胞を *E. piscicida* で刺激した場合、LDH の放出は野生型メダカより有意に低かった。これらのことから、メダカの ASC-1 は *E. piscicida* 感染時の細胞死の誘導機構に関与していることを示した。しかし、魚類における ASC-1 と細胞死経路の関連性について不明な点が多い。したがって、*E. piscicida* 感染時の細胞死経路における ASC-1 の役割をより理解するためには、*E. piscicida* の T3SS と T6SS と ASC-1 の関係性を詳細に解明していくことが必要である。

Table 8. Oligonucleotide sequences used in this study

name	primer #	sequences (5' - 3')	mer (bp)
<i>Primers for qPCR analyses:</i>			
Ol_ASC_rt_F5	P#1328	GTGGTCGCAGATGTGATG	18
Ol_ASC_rt_R1	P#1226	CGCCTCATTCAGGAGCTGCT	20
Ol_IL-1 β _rt_F2	P#1107	GTCCAGCTGAACATGTCTAC	20
Ol_IL-1 β _rt_R2	P#1108	TTGTCTCCTTCTTGGTGGCA	20
Ol_IL-8_rt_F1	P#1403	GGACCCTGGTTGTCCTCATT	20
Ol_IL-8_rt_R1	P#1404	CCCGCTATGACTTCAGTCTCTG	22
Ol_TNF- α _rt_F4	KP#409	GAAGATGGCGGTTTTGGTGG	20
Ol_TNF- α _rt_R4	KP#410	GCTCTGTAGGACTCATTATTTTC	22
Ol_IFN- γ _rt_F1	P#1339	CAAGACCATCCAGAACCTCC	20
Ol_IFN- γ _rt_R2	P#1340	AGCTGCTTCAGCATGTGTCC	20
Ol_IL-10_rt_F1	P#1427	CCATTAAGAGCGAGTTCGC	19
Ol_IL-10_rt_R1	P#1428	ATCCTGCCGCCGCTTTGGG	19
Ol_ β -actin_rt_F2	P#1151	CCACCATGTACCCTGGAATC	20
Ol_ β -actin_rt_R2	P#1152	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	20

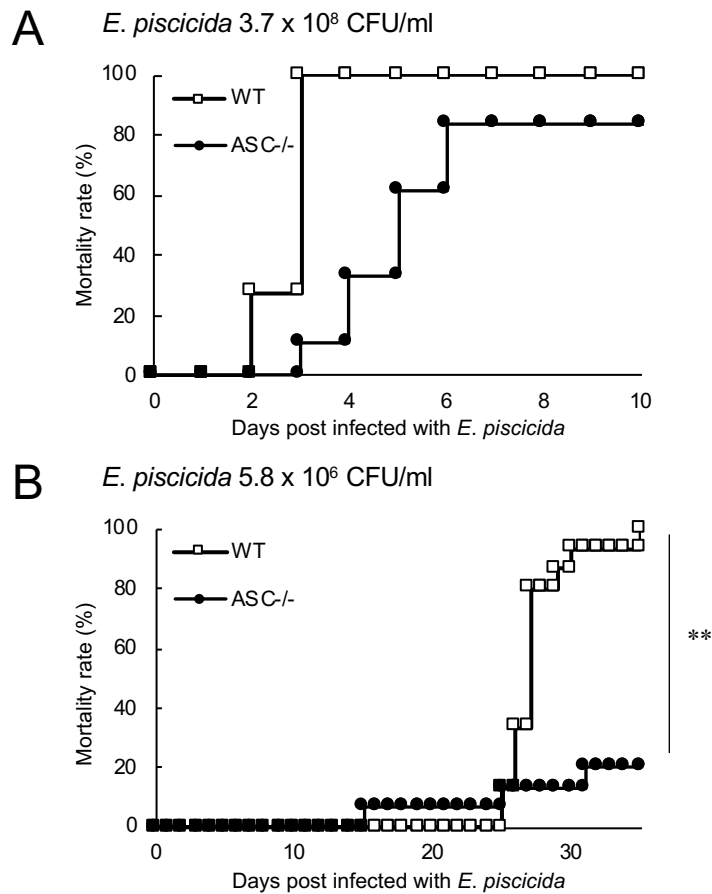


Fig. 31. Mortality rates of the WT and ASC-1-KO medaka infected with *E. piscicida*. The WT and ASC-1-KO medaka immersed in 3.7×10^8 CFU/mL (A) or 5.8×10^6 CFU/mL (B) *E. piscicida*-containing water, and the mortality was observed [In the experiment (A), 10 individual fish separately for WT and ASC-1-KO groups were used, and in the experiment (B), 10 fish were used]. Statistical analysis was performed using the Fisher's exact test (** $p < 0.01$).

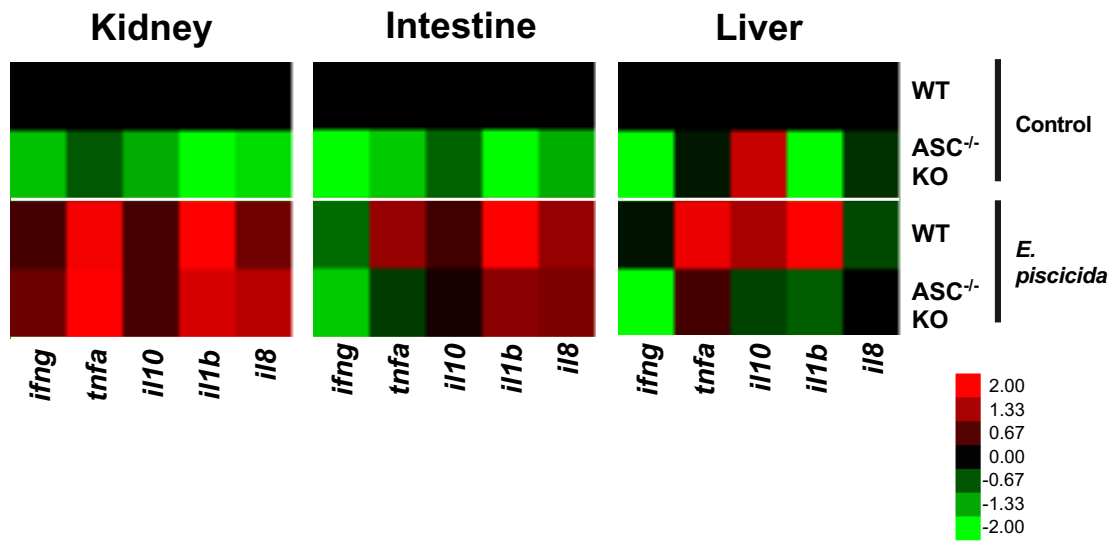


Fig. 32. Comparative analyses of the mRNA levels of immune-related genes in the kidney (A) and intestine (B) from the WT and ASC-1-KO medaka infected with *E. piscicida*. The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of WT healthy medaka samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from four individual experiments ($n=3/\text{group}$), and WT and ASC-1-KO medaka were immersed in *E. piscicida*-containing tanks (3.7×10^8 CFU/mL).

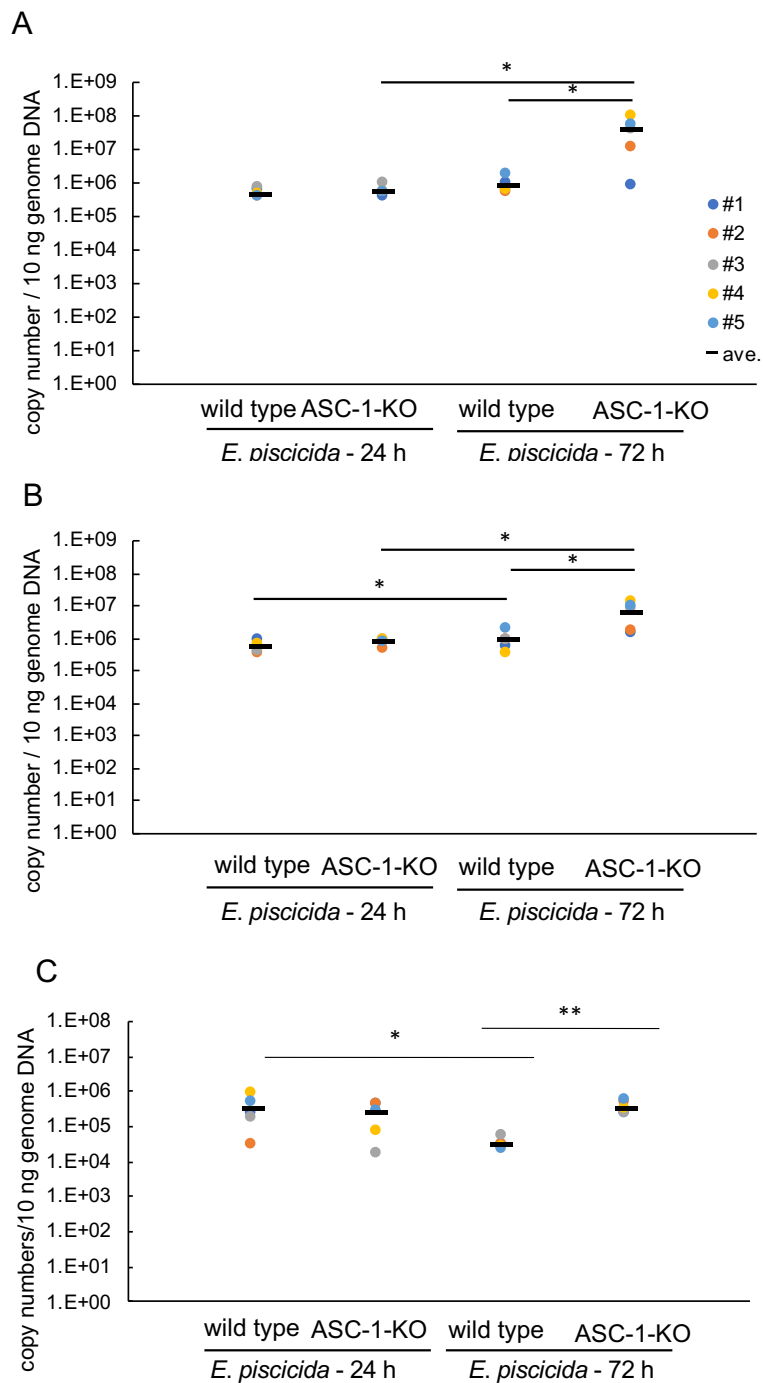


Fig. 33. Bacterial burden of the kidney cells of WT and ASC-1-KO medaka that were infected with *E. piscicida*. *E. piscicida* burden was measured at 24 and 72 h post-infection in the kidney (A), liver (B), and intestine (C) of the WT and ASC-1-KO medaka. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U* test (n= 5).

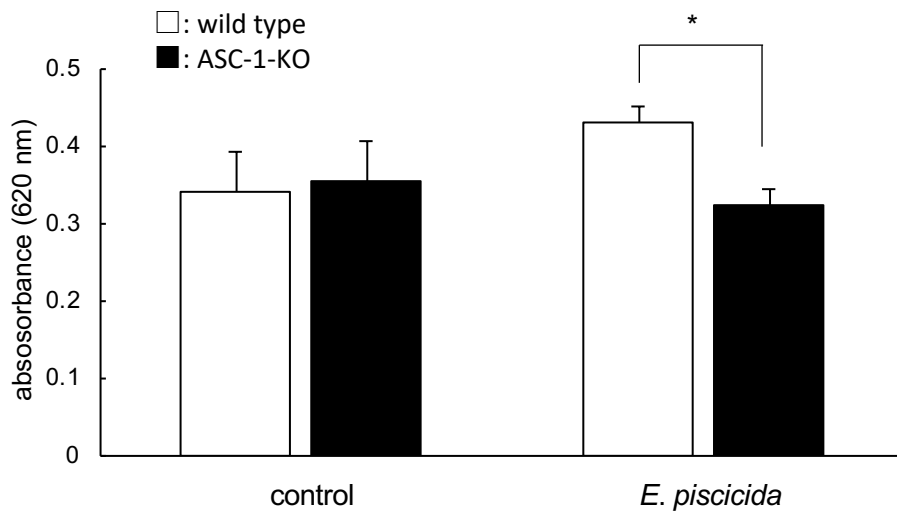


Fig. 34. Production of the superoxide anion in the WT and ASC-1-KO medaka kidney cells after *E. piscicida* infection. Superoxide anion production was measured by optical density (OD) at 620 nm with a nitroblue tetrazolium assay. Error bars represent the mean \pm SEMs of triplicate samples (n = 3). * $p < 0.05$ (Student *t*-test).

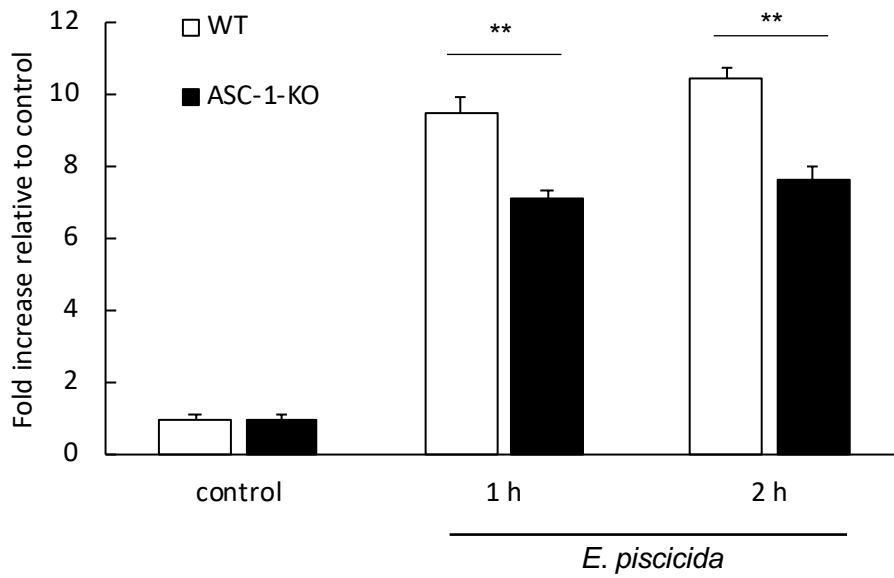


Fig. 35. Fold increase values of LDH released in the kidney cells from the WT and ASC-1-KO medaka challenged with *E. piscicida* for 1 or 2 h. LDH release was measured by OD at 492 nm. Error bars represent the mean \pm SEMs (n= 5). ** $p < 0.01$ (Student *t*-test).

第6章 メダカにおける新規 *il1b* の同定およびその遺伝子発現解析

第1節 緒言

哺乳類において、IL-1 β は炎症性サイトカインとして知られており、様々な疾病においてその動態が調べられている(Dinarello, 2018)。魚類においても、炎症性サイトカインとして IL-1 β は同定され、*IL1B* 遺伝子の発現は細菌やウイルスの感染時や PAMPs などの刺激剤による刺激時におけるの炎症の指標として用いられている。さらに、IL-1 β 前駆体はインフラマソームの活性化を介して活性化型の IL-1 β となり細胞外に分泌されるため、インフラマソームによる炎症誘導機構を解明するために重要な分子である (Jorgensen et al., 2016; Vande Walle and Lamkanfi, 2016)。しかし、メダカにおける *il1b* は未同定のままである。本章ではメダカにおける *il1b* の同定およびその遺伝子発現解析を行った。

第2節 材料および方法

6.2.1. 実験動物

第3章-3.2.1.と同様のメダカ Cab 系統を用いた。

6.2.2. メダカ *il1b1* および *il1b2* のクローニング

6.2.2.1. メダカ *il1b1* および *il1b2* のプライマーの設計

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて、メダカ Hd-rR 系統における *il1b1* および *il1b2* の ORF 領域の全長塩基配列 (GenBank acc. No. XM_011478737 および XM_023961088) を入手した。これらの配列を参考にし、各遺伝子の全長塩基配列を PCR で増幅し、pcDNA4-HisMaxA vector にクローニングするためのプライマーを設計した (Table 9)。

6.2.2.2. PCRによる *ilb1* および *ilb2* の増幅

第3章-3.2.2.2.と同様の方法で行った。使用したプライマーは Table 9 に示す。

6.2.2.3. DNA の精製および制限酵素処理

第3章-3.2.2.3.と同様の方法で行った。精製した DNA の末端および pcDNA4-HisMaxA vector の制限酵素処理には、*EcoRI* および *XhoI* を使用し、インサート DNA およびベクターDNA を得た。

6.2.2.4. ライゲーション

第2章-2.2.1.11.と同様の方法で行った。

6.2.2.5. コンピテントセルへのトランスフォーメーション

第3章-3.2.2.5.と同様の方法で行った。

6.2.2.6. コロニーPCRによるインサート DNA の確認

第2章-2.2.1.13.と同様の方法で行った。

6.2.2.7. プラスミド DNA 抽出

第3章-3.2.2.7.と同様の方法で行った。

6.2.2.8. 塩基配列の決定

第3章-3.2.2.8.と同様の方法で行った。

6.2.3. *in silico* 解析

第3章-3.2.3.と同様の方法で行った。使用した全ての配列の情報を Table 10 に示す。

6.2.4. 遺伝子発現解析

第3章-3.2.4.と同様の方法で行った。qPCR に使用したプライマーは Table 9 に示す。

6.2.5. 細菌感染による刺激を与えたメダカにおける遺伝子発現解析

第3章-3.2.5.と同様の方法で行った。プレートカウント法により、細菌感染時の実際の菌濃度を算出した結果、*A. hydrophila* は 4.3×10^7 CFU/ml、*E. piscicida* は 3.7×10^8 CFU/ml であった。

6.2.6. 統計解析

統計解析は Tukey-Kramer 法による一元配置分散分析を使用した。

第3節 結果

6.3.1. メダカ Cab 系統における *illb1* および *illb2* のクローニングおよびシーケンス解析

メダカ Cab 系統から *illb* をクローニングするために、GenBank Database を探索した結果、メダカ Hd-rR 系統には2種類の *illb* が存在することが明らかになった。これらの2種類の *illb* をそれぞれ *illb1* (XM_011478737) および *illb2* (XM_023961088) とし、プライマーの設計を行い、クローニングを行った。メダカ Cab 系統における *illb1* の cDNA の ORF 領域は 723-bp であり、240-aa のアミノ酸をコードしていることが予測された。また、Cab 系統における *illb1* は Hd-rR 系統における *illb1* の塩基配列の、23 番目のシ

トシンがチミンに、114 番目のチミンがアデニンにそれぞれ置換されていた。その塩基の置換により、演繹されたアミノ酸配列において、Hd-rR 系統における 8 番目のスレオニン残基が Cab 系統においてはメチオニン残基としてコードされていた。Cab 系統と Hd-rR 系統の *illb1* の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 99.7 および 99.5%であった。次に、メダカ Cab 系統における *illb2* の cDNA の ORF 領域は 813-bp であり、270-aa のアミノ酸をコードしていることが推定された。Cab 系統の *illb2* は、Hd-rR 系統における 497 番目および 530 番目のアデニンがグアニンにそれぞれ置換されており、演繹されたアミノ酸配列において、167 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に、193 番目のイソロイシン残基がバリン残基にそれぞれ置換されていた。Cab 系統と Hd-rR 系統の *illb2* の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 99.7 および 99.2%であった。また、メダカにおける 2 種類の IL-1 β とゼブラフィッシュ、フグ、シーバスおよびニジマスを含む魚類とヒトおよびマウスの IL-1 β アミノ酸配列との比較を行うために、多重アライメントを作成した。その結果、アライメントに用いた全ての生物種の IL-1 β において、IL-1 ドメインが保存されていた (Fig. 36)。ヒトにおいて、IL-1 β の 117 番目のアスパラギン酸残基の直後を Casp-1 が切断し、活性型 IL-1 β となる (Fig. 36)。しかし、アライメント上において、上記の部位にはヒトとマウスのみでアスパラギン残基がコードされており、そのほかの生物においては異なるアミノ酸残基がコードされていた (Fig. 36)。一方で、ゼブラフィッシュの IL-1 β においては、107 番目および 125 番目のアスパラギン残基の直後を哺乳類の Casp-1 のホモログである CaspyA または CaspyB が切断し、活性型 IL-1 β となる (Fig. 36)。ゼブラフィッシュにおける 107 番目のアスパラギン酸残基は、その他の生物種においては保存されていなかった (Fig. 36)。一方で、ゼブラフィッシュにおける 125 番目のアスパラギン酸残基はその他の生物種において保存されていた (Fig. 36)。また、シーバスにおいても、ゼブラフィッシュの 125 番目のアスパラギン酸残基と同様の位置において切断される (Fig. 36)。さらに、

2種類のメダカの IL-1 β とその他の生物種の IL-1 β のアミノ酸配列の相同性および類似性の解析を行った。まず、メダカの IL-1 β 1 と IL-1 β 2 のアミノ酸配列の相同性および類似性は、それぞれ 21.4 および 40.4%であり、低い値を示した (Table 11)。次に、メダカの IL-1 β 1 アミノ酸配列とその他の生物種の IL-1 β との相同性および類似性は、それぞれ 20.9-52.5%および 35.2-69.5%であり、マウス IL-1 β との相同性および類似性が一番低く、シーバスとの相同性および類似性が最も高かった (Table 11)。一方で、メダカの IL-1 β 2 アミノ酸配列とその他の生物種の IL-1 β との相同性および類似性は、それぞれ 15.1-23.3%および 32.7-42.4%であり、ヒトの IL-1 β との相同性および類似性が一番低く、フグの IL-1 β との相同性および類似性が最も高かった (Table 11)。

6.3.2. 分子系統解析

系統樹の作成は、近隣接合法を用いてブートストラップ値を 1000 回で行った。メダカ IL-1 β 1 および IL-1 β 2 を含むすべての魚類の IL-1 β は、哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類を含むその他の IL-1 β とは異なるクラスターを形成した (Fig. 37)。また、メダカ IL-1 β 1 および IL-1 β 2 は、魚類のクラスター中で、さらにそれぞれが異なるクラスターに分岐していた (Fig. 37)。

6.3.3. シンテニー解析

IL-1 β のゲノム上における位置や方向について、NCBI database を用いて解析した。シンテニー解析において、メダカ Hd-rR 系統の *il1b1* および *il1b2* は異なる染色体上に存在し、周辺遺伝子は異なっていた (Fig. 38)。メダカの *il1b1* の周辺遺伝子は、ゼブラフィッシュの *il1b* の周辺には保存されていなかったが、メダカの *il1b2* の周辺遺伝子である *sec14l7*、*cnm4a*、*purb*、*ved*、*polm*、*gnsb* および *mrps24* はゼブラフィッシュの *il1b* の周辺遺伝子としても保存されていた (Fig. 38)。また、メダカの *il1b2* およびゼブラフィ

ツシユの *il1b* の周辺遺伝子として保存されている *polm* および *mrps24* はアフリカツメガエルにおいても保存されていた (Fig. 38)。さらに、ゼブラフィッシュの *il1b* の周辺遺伝子として保存されている *camk2b2* および *ogdhb* はアフリカツメガエルおよびニワトリにおいても保存されていた (Fig. 38)。また、周辺遺伝子はヒト、マウス、ニワトリおよびアフリカツメガエル間で類似しており、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュおよびメダカ *il1b2* 間で類似していたが、哺乳類とメダカ *il1b2* の周辺遺伝子では完全に異なっていた (Fig. 38)。さらに、メダカ *il1b1* の周辺遺伝子は他のどの生物種においても保存されていなかった (Fig. 38)。

6.3.4. メダカの組織における *il1b1* および *il1b2* の発現

メダカの *il1b1* および *il1b2* の脳、鰓、腸管、肝臓、筋肉、表皮、脾臓および腎臓を含む様々な組織における相対的な遺伝子の発現量を定量するために、qPCR を行った。メダカにおいて *il1b1* および *il1b2* の mRNA はすべての組織で発現しており、*il1b1* の発現量は、鰓、腎臓および表皮において *il1b2* の発現量より有意に高かった (Fig. 39)。

6.3.5. メダカの *A. hydrophila* および *E. piscicida* 感染時における *il1b1* および *il1b2* の発現動態

細菌感染時の *il1b1* および *il1b2* の発現パターンを明らかにするために、細胞外増殖性細菌である *A. hydrophila* および細胞内寄生性細菌である *E. piscicida* により感染させたメダカの腎臓および腸管における *il1b1* および *il1b2* の発現量を qPCR で解析した。まず、腸管において、*E. piscicida* 感染後 24 時間において *il1b1* の発現量は無刺激時と比較して有意に上昇したが、*il1b2* の発現量に変動は見られなかった (Fig. 40)。また、*A. hydrophila* 感染 24 時間の腸管においても *il1b1* の発現量は増加傾向が見られたが、*il1b2* の発現に変動は見られなかった (Fig. 40)。次に、*E. piscicida* 感染 24 時間の腎臓におけ

る *il1b1* の発現量は増加する傾向が見られたが、同条件における *il1b2* の発現に変動は見られなかった (Fig. 40)。しかし、*A. hydrophila* 感染 24 時間の腎臓において、*il1b1* の発現量は無刺激時と比較して有意に増加し、*il1b2* の発現量も増加する傾向が見られた (Fig. 40)。

第 4 節 考察

IL-1 ファミリーは炎症性サイトカインとして知られており、パターン認識受容体が PAMPs や DAMPs を認識することで発現が誘導される (Dinarello, 2018; Takeuchi and Akira, 2010)。哺乳類において、IL-1 ファミリーの 1 種である IL-1 β は、パターン認識受容体が PAMPs や DAMPs を認識することで発現が誘導され、インフラマソームの活性化を介して活性型 IL-1 β となり、パイロトーシスにより細胞外に分泌される (Dinarello, 2018)。細胞外に分泌された IL-1 β は、他の免疫細胞に発現する IL-1 受容体に認識され、炎症を助長する (Weber et al., 2010)。本章において、メダカ Cab 系統において 2 種類の *il1b* が存在することを明らかにし、それらの塩基配列の決定を行い、細菌感染時における 2 種類の *il1b* の遺伝子発現動態を明らかにした。

哺乳類において、IL-1 β は Casp-1 により切断され、活性型 IL-1 β となる (Davis et al., 2011)。哺乳類の Casp-1 は IL-1 β のアミノ酸配列中に含まれるアスパラギン酸残基の直後を切断する活性を有している (Kostura et al., 1989)。魚類における Casp-1 も同様の働きを有することが知られており、ゼブラフィッシュにおいては、哺乳類の Casp-1 のホモログとして知られている CaspyA および CaspyB が IL-1 β のアミノ酸配列中のアスパラギン残基の直後で切断し、IL-1 β を活性型にすることが報告されている (Vojtech et al., 2012)。メダカの 2 種類の IL-1 β のアミノ酸配列とその他の既知の IL-1 β のアミノ酸配列のアライメントを作成すると、ヒトにおける Casp-1 により切断されるアスパラギン酸残基はメダカの 2 種類の IL-1 β において保存されていなかった。一方で、ゼブラフィッ

シユの CaspyA および CaspyB により切断されるアスパラギン酸残基はメダカの 2 種類の IL-1 β において保存されており、その他の生物種においても保存されていた。これらことから、哺乳類と魚類において、Casp-1 により IL-1 β が活性型に切断される部位は異なり、メダカの 2 種類の IL-1 β にはゼブラフィッシュの IL-1 β の切断部位と同様の位置にアスパラギン酸残基が保存されていることが示唆された。しかし、メダカの Casp-1 がゼブラフィッシュの CaspyA や CaspyB と同様の機能を有しているのかは不明であるため、メダカの Casp-1 による IL-1 β 1 および IL-1 β 2 の切断の確認を行う必要がある。

魚類の進化の過程において、ゲノム重複が起こったことにより哺乳類では一つしか存在しない遺伝子が複数個存在することがある (Meyer and Van De Peer, 2005; Ravi and Venkatesh, 2008)。第 3 章で示したメダカにおいて *asc* が複数個存在したことも、ゲノム重複によるものだと考えられる。メダカの *illb* も同様に 2 つの遺伝子が存在した。サケ科魚類においても、*illb* は重複しており、複数個存在する (Husain et al., 2012)。それらの IL-1 β を詳細に分類するために、ゼブラフィッシュの *illb* に類似しているものを“タイプ I IL-1 β ”およびフグの *illb* に類似しているものを“タイプ II IL-1 β ”と分類している (Ogryzko et al., 2014; Sun et al., 2008)。系統樹解析において、メダカ IL-1 β 1 および IL-1 β 2 はそれぞれゼブラフィッシュの IL-1 β とフグの IL-1 β と同じクラスターに属していた。このことから、メダカ IL-1 β 1 は“タイプ II IL-1 β ”、メダカ IL-1 β 2 は“タイプ I IL-1 β ”であることが推察された。メダカ以外の魚種においては、ナイルティラピア、ヒラメ、カンパチおよびインドメダカが両タイプの IL-1 β を有していた (Ogryzko et al., 2014)。一方で、コイ科魚類において、コイおよびキンギョは複数個の IL-1 β を有していたが、その全ては“タイプ I IL-1 β ”に属していた。このような分類はされているが、単一魚種において、“タイプ I IL-1 β ”と“タイプ II IL-1 β ”を比較している報告はない。まず、メダカの各組織における *illb1* と *illb2* の発現量を比較した場合、脳、鰓、腸管、肝臓、筋肉、表皮、脾臓および腎臓を含む全ての組織において *illb1* は *illb2* の発現量よりも多かった。そ

の中でも特に、鰓、腎臓および表皮において *illb1* の発現量は *illb2* の発現より有意に高かった。これらの組織は免疫関連組織であり、鰓および表皮は外の環境に面しており、病原体などに最初に接する組織である。また、魚類における腎臓は、哺乳類における骨髄と同じ役割を有する造血組織として知られており、免疫に密接に関わっている (Aghaallaei et al., 2010)。これらのことから、メダカにおいて、*illb1* が免疫関連組織において優性的に発現する *illb* であることが示唆された。前述した通り、魚類の IL-1 β は“タイプ I IL-1 β ”と“タイプ II IL-1 β ”が存在する。一方で、細菌感染時の 2 タイプの IL-1 β の発現や機能の違いなどの報告はない。本章において、*A. hydrophila* または *E. piscicida* 感染時のメダカの腸管および腎臓における *illb1* および *illb2* の発現の比較を行った。その結果、腸管において、*E. tarda* 感染 24 時間後の腸管 *illb1* の発現が有意に上昇し、腎臓においても上昇傾向が見られた。一方で、*illb2* は *E. tarda* 感染時の両組織において変動を示さなかった。インドゴイの *illb* は *E. tarda* 感染 6 時間から 48 時間にかけて腎臓で有意に発現が増加し (Meijer et al., 2004)、ゼブラフィッシュの *illb* は、*E. tarda* 感染 6 時間および 24 時間の腸管、腎臓および肝臓で有意に発現量が増加した (Liu et al., 2014)。さらに、ソウギョの *illb* は *E. tarda* 感染 12 時間から 96 時間にかけて腎臓で有意に発現量が増加した (Liu et al., 2014)。これらの魚種は、“タイプ I IL-1 β ”しか有していない。一方で、“タイプ II IL-1 β ”に属するターボットの *illb* は *E. piscicida* 感染 12 時間および 24 時間の鰓で発現が増加したが、肝臓、脾臓および腎臓においては感染後 11 日で有意に発現が上昇した (Liu et al., 2014)。これらのことから、“タイプ I IL-1 β ”と“タイプ II IL-1 β ”が存在するメダカにおいては、“タイプ II IL-1 β ”である *illb1* が *E. tarda* 感染初期の腸管および腎臓において優性的に発現する遺伝子であることが示唆された。また、*A. hydrophila* 感染 24 時間の腸管において、*illb1* の発現は上昇傾向にあり、腎臓においては有意に上昇した。一方で、*A. hydrophila* 感染 24 時間の腸管においては、*illb2* の発現は変動しなかったが、腎臓においては発現が上昇傾向にあった。“タイプ II IL-1 β ”に属

するヨーロッパヘダイの *il1b* は *A. hydrophila* 感染 24 および 48 時間の腎臓および腸管において発現量の変化が見られなかった(Liu et al., 2014)。一方で、“タイプ I IL-1 β ”に属するアメリカナマズ頭腎における *il1b* の発現量も 24 および 48 時間で発現量の変動は見られなかった(Liu et al., 2014)。しかし、“タイプ I IL-1 β ”に属するソウギョの *il1b* の発現量は *A. hydrophila* 感染 24 時間および 72 時間の腸管において、有意に増加した(Liu et al., 2014)。これらのことから、“タイプ I IL-1 β ”と“タイプ II IL-1 β ”が存在するメダカにおいては、*A. hydrophila* 感染初期の腎臓において両タイプの *il1b* の発現が誘導されるが、腸管においてはどちらの *il1b* も誘導されないことが示唆された。しかし、それぞれの *il1b* を発現制御する機構については明らかになっていないため、今後解析していく必要がある。

Table 9. Oligonucleotide sequences used in this study

name	sequence (5' - 3')	mer (bp)
<i>Primers for cloning into pcDNA4-HisMax A vector:</i>		
P#1736_Ol_IL-1 β -1_EcoRI_cl-F1	CATGAATTCATGGCGTGCCACAAGAGCGA	29
P#1737_Ol_IL-1 β -1_XhoI_cl-R1	CATCTCGAGTTAGCTCTGGCGGATGTGGA	29
P#1738_Ol_IL-1 β -2_EcoRI_cl-F1	CAGGAATTCTGTCTTTGAACGACTTTGA	28
P#1739_Ol_IL-1 β -2_XhoI_cl-R1	CAGCTCGAGCTATAACTTTCTCAGTTGGC	29
<i>Primers for qPCR analyses:</i>		
P#1107_Ol_IL-1 β _F2	GTCCAGCTGAACATGTCTAC	20
P#1108_Ol_IL-1 β _R2	TTGTCTCCTTCTTGGTGGCA	20
P#1548_Ol_IL-1 β 2_F2	CGGACGAGAAGGAAAAGGTC	20
P#1549_Ol_IL-1 β 2_R2	CTCCATGACGGTGCTACAGA	20
P#1151_ol_ β -actin_2F	CCACCATGTACCCTGGAATC	20
P#1152_ol_ β -actin_2R	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	20

Table 10. IL-1 β genes from various species on GenBank genome database

	species	gene name	GenBank acc. No.		chromosome	location
			(nucleotide)	(protein)	(scaffold)	
Mammals	Human (<i>Homo sapiens</i>)	IL1B	NM_000576	NP_000567	2	NC_000002 112,829,751-112,836,843
	Mouse (<i>Mus musculus</i>)	Il1b	XM_006498795	XP_006498858	2	NC000068 129,206,490-129,213,059
Birds	Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	IL1B	NM_204524	NP_989855	22	NC_006109 5,171,644-5,173,380
	Swan goose (<i>Anser cygnoides</i>)	IL1B	JF505290	AEL31285	unknown	
	Rock pigeon (<i>Columba livia</i>)	IL1B	XM_01291734	XP_021147409	Unplaced scaffold	NW_004973367 60,685-62,415
Reptiles	Common wall lizard (<i>Podarcis muralis</i>)	IL1B	XM_028742182	XP_028598015	8	NC_041319 82,730,631-82,738,492
	Chinese soft-shelled turtle (<i>Pelodiscus sinensis</i>)	IL1B	NM_001317048	NP_001303977	Unplaced scaffold	NW_005854220 177,046-181294
Amphibians	African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	il1b	NM_001085605	NP_001079074	3S	NC_030729 26,276,262-26,281,864
Fish	Japanese medaka Cab (<i>Oryzias latipes</i>)	il1b1	identified in this study			
(IL-1 β)	Japanese medaka Cab (<i>Oryzias latipes</i>)	il1b2	identified in this study			
	Japanese medaka HdrR (<i>Oryzias latipes</i>)	il1b1	XM_011478737	XP_011477039	9	LOC101169209 1,418,225-1,429,783
	Japanese medaka HdrR (<i>Oryzias latipes</i>)	il1b2	XM_023961088	XP_023816856	12	LOC101159280 1,809,201-1,817,115
	Indian medaka (<i>Oryzias melastigma</i>)	il1b1	XM_024275296	XP_024131064	LG9	NC_050520 3,666,394-3,667,889
	Indian medaka (<i>Oryzias melastigma</i>)	il1b2	XM_024299630	XP_024155398	LG12	NC_050523 1,488,502-1,496,384
	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	il1b	AY340959	AAQ16563	10	NC_007121 44,956,660-44,963,775
	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	il1b1	XM_026220359	XP_026076144	35	NC_039277 16,822,061-16,824,276
	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	il1b2	XM_026274671	XP_026130456	10	NC_039252 21,615,610-21,617,940
	Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	il1b	XM_011615826	XP_011614128	21	NC_042305 16,188,959-16,190,854
	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	il1b1	NM_001124347	NP_001117819	6	NC_035082 42,308,757-42,311,851
	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	il1b2	XM_021622166	XP_021477841	11	NC_035087 72,435,205-72,438,229
	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	il1b3	XM_021590496	XP_021446171	29	NC_035105 5,561,317-5,565,273
	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	il1b4	XM_021601282	XP_021456957	5	NC_035081 13,972,847-13,974,051
	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	il1b1	NM_001123582	NP_001117054	ssa24	NC_027323 1,288,362-1,292,349
	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	il1b2	XM_014143360	XP_013998835	ssa15	NC_027314 669,436-672,604
	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	il1b3	XM_014128008	XP_013983483	ssa11	NC_027310 49,963,056-49,967,704
	Greater amberjack (<i>Seriola dumerili</i>)	il1b1	XM022753749	XP_022609470	Unplaced Scaffold	NW_019174448 1,583,732-1,586,435
	Greater amberjack (<i>Seriola dumerili</i>)	il1b2	XM_022769563	XP_022625284	Unplaced Scaffold	NW_019177904 343,605-347,230
	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	il1b1	XM_030416076	XP_030271936	5	NC_0444191 20,514,062-20,517,023
	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	il1b2	XM_030435228	XP_030291088	12	NC_044198 25,915,718-25,919,492
	Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	il1b1	XM_019365841	XP_019221386	LG12	NC_031977 31,502,577-31,504,665
	Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	il1b2	XM_005457887	XP_005457944	LG7	NC_031972 10,650,006-10,658,351
	Large yellow croaker (<i>Larimichthys crocea</i>)	il1b	XM_010736551	XP_010734853	III	NC_040013 40,771,713-40,774,476
	Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	il1b1	XM_020105656	XP_019961215	Unplaced Scaffold	NW_017859825 167,916-170,251
	Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	il1b2	XM_020081882	XP_019937441	Unplaced Scaffold	NW_017859647 2,238,122-2,242,997
	Channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	il1b	NM_001200220	NP_001187149	16	NC_030431 18,786,991-18,790,081
	Seabass (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	il1b	AY383480	AAQ89601	Unknown	
(IL-1 family member A)	Indian medaka (<i>Oryzias melastigma</i>)	il1fma	XM_024295782	XP_024151550	LG3	NC_050514 11,598,223-11,605,240
	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	il1fma	NM_001290418	NP_001277347	11	NC_007122 29,965,932-29,971,591
	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	il1fma	XM_026275530	XP_026131315	11	NC_039253 13,196,699-13,199,321
	Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	il1fma	XM_003969852	XP_003969901	13	NC_042297 15,274,144-15,277,121
	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	il1fma	XM_030415377	XP_030271237	4	NC_044190 18,091,635-18,096,736

Table 11. Identity and similarity of IL-1 β amino acid sequences from Japanese medaka and other vertebrates

		similarity (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
identity (%)	1 Medaka_IL-1 β 1		40.4	45.5	67.3	69.5	63.2	58.6	45.2	44.9	39
	2 Medaka_IL-1 β 2	21.4		41.8	42.4	40	42.1	40.6	42.4	37	32.7
	3 Zebrafish_IL-1 β	26.8	22.3		39.6	39.1	43	42	42.9	38.8	36.4
	4 Fugu_IL-1 β	48.6	23.3	23.9		77.7	64.2	58.7	43	42.2	37.8
	5 Seabass_IL-1 β	52.5	20.7	24.9	62.3		60.6	55.1	40.8	39.5	35.5
	6 Rainbow trout_IL-1 β 1	45.2	22.3	24.1	43.9	47.4		85.4	43.4	41.9	39.9
	7 Rainbow trout_IL-1 β 2	44.8	23	22	42.4	44.8	74.6		42.1	41.5	38.5
	8 Rainbow trout_IL-1 β 3	27.1	23.2	22.6	25.5	23.4	27.5	26.2		58	35.3
	9 Rainbow trout_IL-1 β 4	26.7	21.8	22.3	24.8	23.6	27	25.5	49.6		30.2
	10 Human_IL-1 β	23.4	15.1	19.7	21.3	21.1	25.1	24.4	18.9	18.2	
	11 Mouse_IL-1 β	20.9	15.2	17.7	20.9	21.8	23.7	22.3	17.6	15.1	63.7

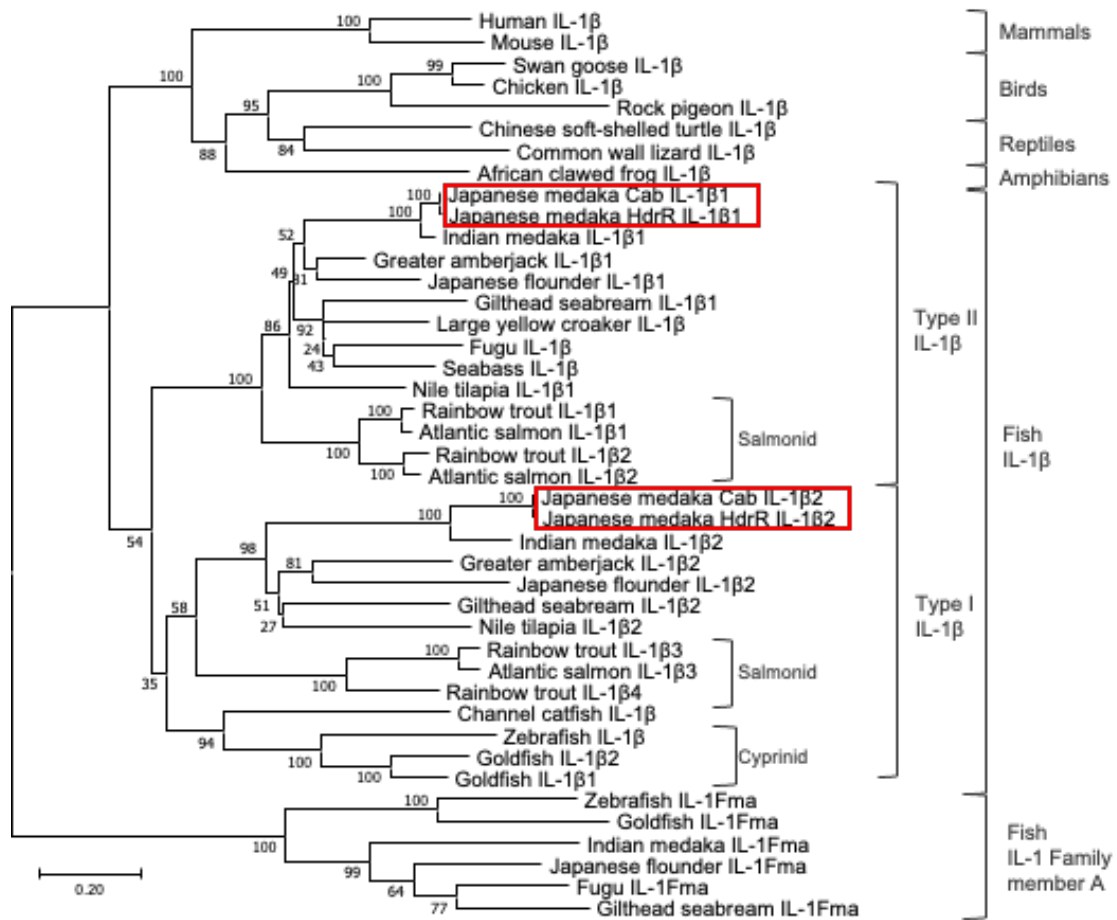


Fig. 37. Phylogenetic relationship of medaka IL-1βs with other vertebrate IL-1βs. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replications.

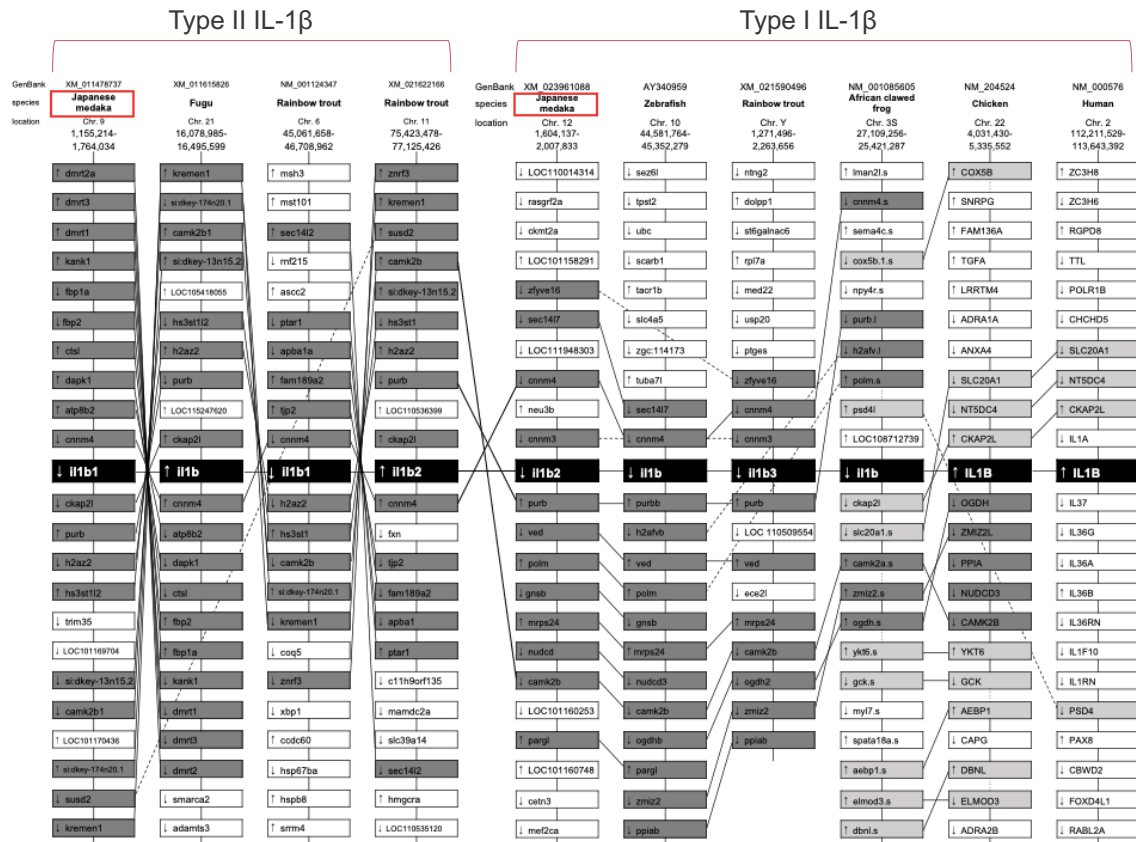


Fig. 38. Synteny analysis and chromosomal location of *il1b* from Japanese medaka and other known vertebrates. The localization of *il1b* genes is highlighted in black boxes.

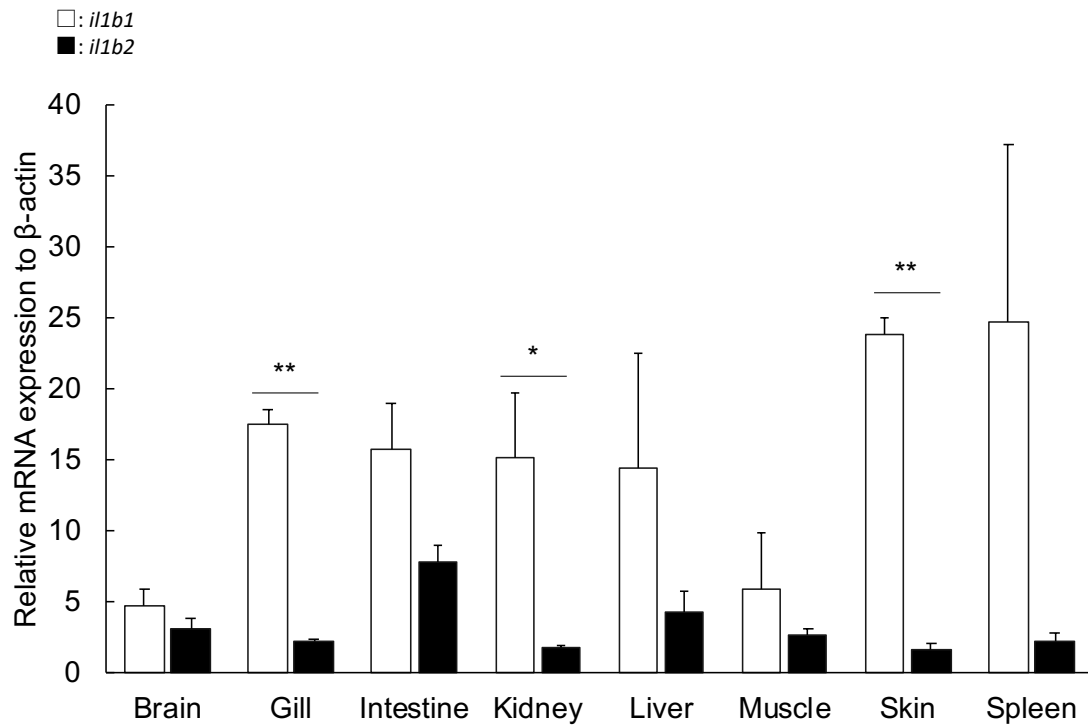


Fig. 39. Tissue distribution of the two types of *il1b* genes in the Japanese medaka Cab strain. The expression of these genes from brain, gill, intestine, kidney, liver, muscle, skin, and spleen were analyzed using qPCR, and the expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of *il1b2* in skin samples. The *actb* gene was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. Bars represent the mean \pm SEMs (n = 3). (Student's *t*-tests, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

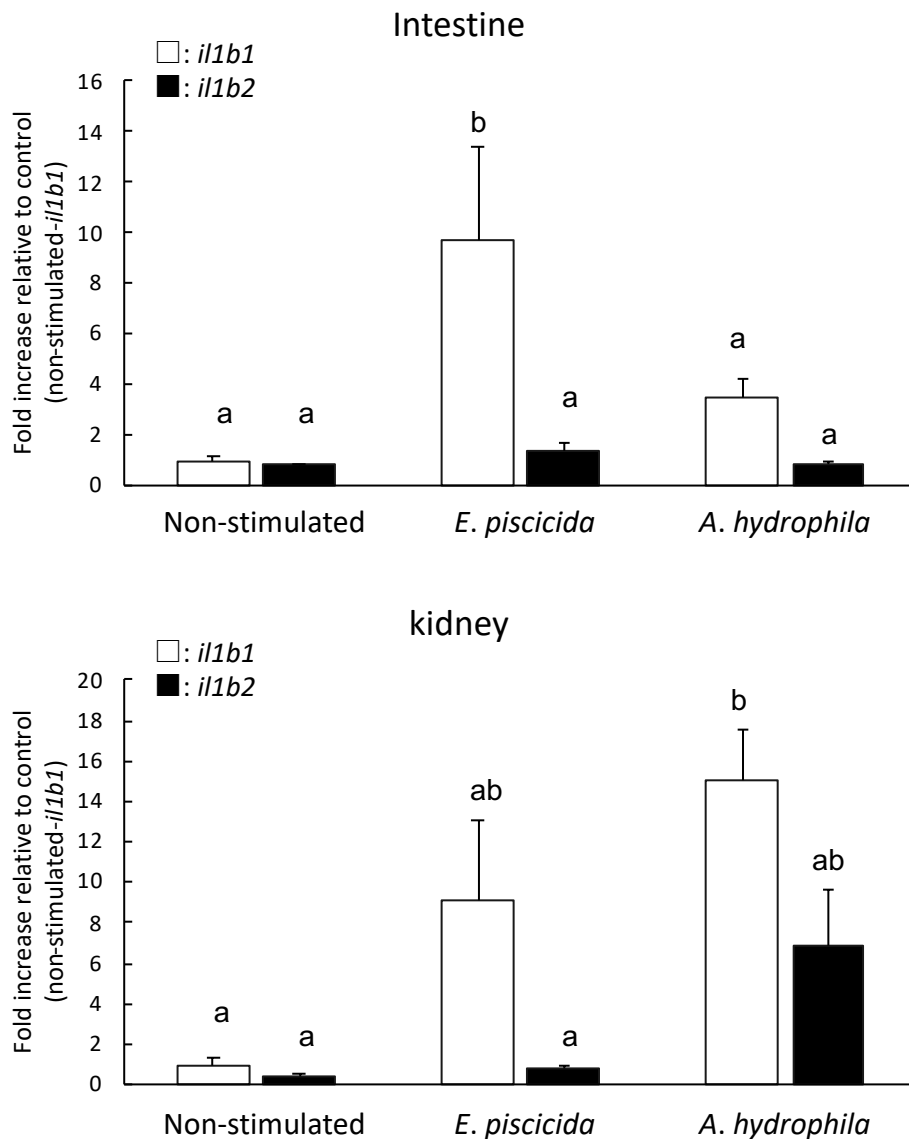


Fig. 40. The expression of the two types of *il1b* genes in Japanese medaka during *E. piscicida* or *A. hydrophila* infection. Medaka were immersed in *E. piscicida* (2.5×10^6 CFU/mL)- or *A. hydrophila* (4.3×10^7 CFU/mL)-containing tanks. The expression levels are shown in $-\log_2$ values as the fold change relative to the expression levels of healthy medaka samples. The *actb* was used as an internal control to normalize the expression levels of each gene. The results were obtained from five individual experiments ($n = 5/\text{group}$).

謝辞

本研究は、宮崎大学農学部応用生物科学科食品衛生・免疫学研究室において、引間順一教授のご指導の下で行われました。本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご指導を賜りました。この場を借りて、感謝の意を申し上げます。

主指導教員である引間順一教授は、研究の方針から学会発表および論文執筆の支援まで、様々な面においてご指導・ご鞭撻賜りました。修士課程から宮崎大学に移り、遺伝子研究について無知であった私を快く受け入れ、研究の基礎からご指導いただき、現在に至ることができました。心から感謝申し上げます。

副指導教員である酒井正博教授は、研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導をいただきました。また、申請書の作成についてもご指導いただきました。心より感謝を申し上げます。

同じく副指導教員である河野智哉准教授は、研究のご助言のみならず、研究が順調に進まないときにも温かい励ましの言葉をかけていただきました。また、親身になって様々なお話を聞いて、アドバイスをしていただき、本当に感謝しております。

水産大学校生物生産学科の近藤昌和教授には、学部時代から博士課程まで終始多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました。水産大学校卒業後も、ヒラメの実験において大変お世話になり、*E. piscicida* OA-3 株の提供をしていただきました。また、なかなか結果が出ず、悩んでいる際にも、多くご助言をいただき、温かく見守っていただきました。心より感謝申し上げます。

National Chen Kung University の前川俊博士ならびに Han-Ching Wang 博士には、メダカのゲノム編集の際に多大なるご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

長崎大学の金井欣也教授ならびに増養殖研究所の高野倫一博士には、*A. hydrophila* FPC-0866 株および *E. piscicida* E381 株を提供していただきました。感謝申し上げます。

食品衛生・免疫学研究室および免疫生物学研究室に所属している皆様には、様々な形でお世話になりました。特に、同期の岡村洋さんならびに尾上禎佳さんには、研究の話のみならず、様々な相談にのっていただきました。また、実験技術や知識が未熟だった私に、様々なことを教えてくれました。本当にありがとうございました。また、後輩の皆様は、研究室の雰囲気を作ってください、とても有意義で楽しい研究生生活を送ることができました。感謝いたします。

最後に、博士課程に進学することを快く受け入れ、支えてくださった母ならびに姉に心より感謝いたします。

参考文献

- Abdelaziz, D.H.A., Gavrilin, M.A., Akhter, A., Caution, K., Kotrange, S., Khweek, A.A., Abdulrahman, B.A., Hassan, Z.A., El-Sharkawi, F.Z., Bedi, S.S., Ladner, K., Gonzalez-Mejia, M.E., Doseff, A.I., Mostafa, M., Kanneganti, T.D., Guttridge, D., Marsh, C.B., Wewers, M.D., Amer, A.O., 2011. Asc-dependent and independent mechanisms contribute to restriction of *Legionella pneumophila* infection in murine macrophages. *Front. Microbiol.* 2 (18), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00018>
- Aghaallaei, N., Bajoghli, B., Schwarz, H., Schorpp, M., Boehm, T., 2010. Characterization of mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a cxcr3a:gf_p reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18079–18084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000467107>
- Ansai, S., Kinoshita, M., 2014. Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biol. Open* 3 (5), 362–371. <https://doi.org/10.1242/bio.20148177>
- Banerjee, C., Goswami, R., Verma, G., Datta, M., Mazumder, S., 2012. *Aeromonas hydrophila* induced head kidney macrophage apoptosis in *Clarias batrachus* involves the activation of calpain and is caspase-3 mediated. *Dev. Comp. Immunol.* 37 (3-4), 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.005>
- Baoprasertkul, P., Xu, P., Peatman, E., Kucuktas, H., Liu, Z., 2007. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1218–1230. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.002>
- Beatson, S.A., Minamino, T., Pallen, M.J., 2006. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol.* 14, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.001>
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J. Fish Dis.* 36, 371–388. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>

- Bell, J.K., Mullen, G.E.D., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R., Segal, D.M., 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24, 528–533.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00242-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00242-4)
- Biller, J.D., Takahashi, L.S., 2018. Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 3403–3414.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>
- Biswas, G., Bilen, S., Kono, T., Sakai, M., Hikima, J. ichi, 2016. Inflammatory immune response by lipopolysaccharide-responsive nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Dev. Comp. Immunol.* 55, 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.008>
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T.W., Brenner, D., 2016. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends Cell Biol.* 26, 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.002>
- Broz, P., Dixit, V.M., 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Broz, P., Newton, K., Lamkanfi, M., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Monack, D.M., 2010. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J. Exp. Med.* 207, 1745–1755. <https://doi.org/10.1084/jem.20100257>
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015. Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Buján, N., Mohammed, H., Balboa, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Arias, C.R., Magariños, B., 2018. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.004>

- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol.* 56, 289–301. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00223-5)
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.W., Xi, J.J., 2013. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res.* 23, 465–472. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.45>
- Chen, H., Yang, D., Han, F., Tan, J., Zhang, L., Xiao, J., Zhang, Y., Liu, Q., 2017. The Bacterial T6SS effector EvpP prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting the Ca²⁺-dependent MAPK-Jnk pathway. *Cell Host Microbe* 21, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.004>
- Chen, J., Liu, N., Zhang, H., Zhao, Y., Cao, X., 2020. The effects of *Aeromonas hydrophila* infection on oxidative stress, nonspecific immunity, autophagy, and apoptosis in the common carp. *Dev. Comp. Immunol.* 105, 103587. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103587>
- Chen, N., Jiang, J., Gao, X., Li, X., Zhang, Y., Liu, X., Yang, H., Bing, X., Zhang, X., 2018. Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 83, 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.023>
- Coll, R.C., Robertson, A.A.B., Chae, J.J., Higgins, S.C., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M.C., Vetter, I., Dungan, L.S., Monks, B.G., Stutz, A., Croker, D.E., Butler, M.S., Haneklaus, M., Sutton, C.E., Núñez, G., Latz, E., Kastner, D.L., Mills, K.H.G., Masters, S.L., Schroder, K., Cooper, M.A., O'Neill, L.A.J., 2015. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21, 248–257. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>

- Davis, B.K., Wen, H., Ting, J.P.-Y., 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 707-735. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>
- de Alba, E., 2019. Structure, interactions and self-assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 670, 15-31. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.05.023>
- De Jong, H.K., Koh, G.C.K.W., van Lieshout, M.H.P., Roelofs, J.J.T.H., van Dissel, J.T., van der Poll, T., Wiersinga, W.J., 2014. Limited role for ASC and NLRP3 during *in vivo* *Salmonella* Typhimurium infection. *BMC Immunol.* 15, 30. <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0030-7>
- De Zoete, M.R., Keestra, A.M., Wagenaar, J.A., Van Putten, J.P.M., 2010. Reconstitution of a functional toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem.* 285, 12149–12158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070227>
- Devi, S., Stehlik, C., Dorfleutner, A., 2020. An update on card only proteins (COPS) and pyd only proteins (POPS) as inflammasome regulators. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6901. <https://doi.org/10.3390/ijms21186901>
- Dinarello, C.A., 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 281, 8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>. Overview
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., Alnemri, E.S., 2007. The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death *via* caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* 14, 1590–1604. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402194>
- Guo, H., Callaway, J.B., Ting, J.P., 2015. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21 (7), 677-687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
- Han, H.J., Kim, D.H., Lee, D.C., Kim, S.M., Park, S.I., 2006. Pathogenicity of *Edwardsiella*

tarda to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis. 29, 601–609. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00754.x>

Hasegawa, M., Imamura, R., Motani, K., Nishiuchi, T., Matsumoto, N., Kinoshita, T., Suda, T., 2009. Mechanism and repertoire of ASC-mediated gene expression. J. Immunol. 182, 7655–7662. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800448>

Håstein, T., Gudding, R., Evensen, O., 2005. Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. Dev. Biol. 121, 55–74.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410, 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>

Hirayama, M., Mitani, H., Watabe, S., 2006. Temperature-dependent growth rates and gene expression patterns of various medaka *Oryzias latipes* cell lines derived from different populations. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 176, 311–320. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0053-8>

Hu, T., Chen, R., Zhang, L., Wang, Z., Yang, D., Zhang, Y., Liu, X., Liu, Q., 2019. Balanced role of T3SS and T6SS in contribution to the full virulence of *Edwardsiella piscicida*. Fish Shellfish Immunol. 93, 871–878. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.014>

Huber, S., Gagliani, N., Flavell, R.A., 2012. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. Eur. J. Immunol. 42, 2238–2245. <https://doi.org/10.1002/eji.201242619>

Husain, M., Bird, S., Zwieten, R. van, Secombes, C.J., Wang, T., 2012. Cloning of the IL-1 β gene and IL-1 β 4 pseudogene in salmonids uncovers a second type of IL-1 β gene in teleost fish. Dev. Comp. Immunol. 38, 431–446. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.07.010>

Hwang, S.D., Asahi, T., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., 2010. Molecular cloning and expression

study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish Immunol. 29, 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.011>

Jiang, S., Gu, H., Zhao, Y., Sun, L., 2019. Teleost gasdermin E is cleaved by caspase 1, 3, and 7 and induces pyroptosis. J. Immunol. 203, 1369–1382. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900383>

Joh, S.J., Kim, M.J., Kwon, H.M., Ahn, E.H., Jang, H., Kwon, J.H., 2011. Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea. J. Vet. Med. Sci. 73, 7–11. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0252>

Jorgensen, I., Lopez, J.P., Laufer, S.A., Miao, E.A., 2016. IL-1 β , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. Eur. J. Immunol. 46, 2761–2766. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Khameneh, H.J., Leong, K.W.K., Mencarelli, A., Vacca, M., Mambwe, B., Neo, K., Tay, A., Zolezzi, F., Lee, B., Mortellaro, A., 2019. The inflammasome adaptor ASC intrinsically limits CD4⁺ T-cell proliferation to help maintain intestinal homeostasis. Front. Immunol. 10, 1566. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01566>

Kim, J.H., Namgung, B., Jeon, Y.J., Song, W.S., Lee, J., Kang, S.G., Yoon, S. il, 2018. Helicobacter pylori flagellin: TLR5 evasion and fusion-based conversion into a TLR5 agonist. Biochem. Biophys. Res. Commun. 505, 872–878. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.179>

Kostura, M.J., Tocci, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A., Schmidt, J.A., 1989. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 β convertase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 5227–5231. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5227>

Krzywińska, S., Kaznowski, A., Chodysz, M., 2009. *Aeromonas* spp. human isolates induce

apoptosis of murine macrophages. *Curr. Microbiol.* 58, 252–257.
<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9316-4>

Kumaresan, V., Ravichandran, G., Nizam, F., Balachandran, N.D., Arasu, M.V., Al-Dahabi, N.A., Harikrishnan, R., Arockiaraj, J., 2016. Multifunctional murrel caspase 1, 2, 3, 8 and 9: Conservation, uniqueness and their pathogen-induced expression pattern. *Fish Shellfish Immunol.* 49, 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.008>

Lara-Tejero, M., Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Flavell, R.A., Galán, J.E., 2006. Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J. Exp. Med.* 203, 1407–1412. <https://doi.org/10.1084/jem.20060206>

Lee, B.L., Mirrashidi, K.M., Stowe, I.B., Kummerfeld, S.K., Watanabe, C., Haley, B., Cuellar, T.L., Reichelt, M., Kayagaki, N., 2018. ASC- and caspase-8-dependent apoptotic pathway diverges from the NLRC4 inflammasome in macrophages. *Sci. Rep.* 8, 3788.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21998-3>

Lee, M.S., Kim, Y.J., 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 447–480.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060605.122847>

Lei-Leston, A.C., Murphy, A.G., Maloy, K.J., 2017. Epithelial cell inflammasomes in intestinal immunity and inflammation. *Front. Immunol.* 20, 1168.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01168>

Li, J.Y., Wang, Y.Y., Shao, T., Fan, D.D., Lin, A.F., Xiang, L.X., Shao, J.Z., 2019. The zebrafish NLRP3 inflammasome has functional roles in ASC-dependent interleukin-1 β maturation and gasdermin E-mediated pyroptosis. *J. Biol. Chem.* 295, jbc.RA119.011751.
<https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.011751>

Li, L., Dang, Y., Shen, Y., Xu, X., Huang, W., Li, J., 2016. Hematological and Immunological

- plasma assays for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) infected with *Aeromonas hydrophila* as an immune model in carp aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 647–653.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.048>
- Li, S., Chen, X., Peng, W., Hao, G., Geng, X., Zhan, W., Sun, J., 2016. Cloning and characterization of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC) gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.022>
- Li, Y., Huang, Y., Cao, X., Yin, X., Jin, X., Liu, S., Jiang, J., Jiang, W., Xiao, T.S., Zhou, R., Cai, G., Hu, B., Jin, T., 2018. Functional and structural characterization of zebrafish ASC, *FEBS J.* 285, 2691–2707. <https://doi.org/10.1111/febs.14514>
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., David, M., Davies, D.R., 2008. Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-strand RNA. *Science.* 320, 379–381.
<https://doi.org/10.1126/science.1155406>. Structural
- Liu, Q., Xu, M., Sun, Z., Ye, H., Mai, K., Tan, X., Zou, C., Chen, S., Su, N., Zhou, Y., Chen, L., Ye, C., 2020. Effects of dietary monocalcium phosphate supplementation on the anti-oxidative capacity, anti-bacteria function in immune organs of obscure puffer (*Takifugu obscurus*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 98, 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.043>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.C., 2017. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, X., Chang, X., Wu, H., Xiao, J., Gao, Y., Zhang, Y., 2014. Role of intestinal inflammation in predisposition of *Edwardsiella tarda* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 41, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.009>
- Lu, A., Wu, H., 2015. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* 282, 435–444.

<https://doi.org/10.1111/febs.13133>

Lu, J., Sun, P.D., 2012. The structure of the TLR5-flagellin complex: A new mode of pathogen detection, conserved receptor dimerization for signaling. *Sci. Signal.* 5, pe11.

<https://doi.org/10.1126/scisignal.2002963>

Luo, K., Di, J., Han, P., Zhang, S., Xia, L., Tian, G., Zhang, W., Dun, D., Xu, Q., Wei, Q., 2018. Transcriptome analysis of the critically endangered Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) head kidney response to *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 83, 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.044>

Majumdar, T., Chattopadhyay, P., Saha, D.R., Sau, S., Mazumder, S., 2009. Virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* induces macrophage apoptosis and helps in developing systemic infection in mice. *Microb. Pathog.* 46, 98–107.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.11.002>

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Dixit, V.M., Monack, D.M., 2005. Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J. Exp. Med.* 202, 1043–1049. <https://doi.org/10.1084/jem.20050977>

Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T., Sagara, J., 1999. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 33835–33838. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33835>

Masumoto, Junya, Taniguchi, S., Nakayama, J., Shiohara, M., Hidaka, E., Katsuyama, T., Murase, S., Sagara, J., 2001. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1269–1275.

<https://doi.org/10.1177/002215540104901009>

- Masumoto, J., Taniguchi, S., Nakayama, J., Shiohara, M., Hidaka, E., Katsuyama, T., Murase, S., Sagara, J., 2001. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1269–1275. <https://doi.org/10.1177/002215540104901009>
- Masumoto, J., Zhou, W., Chen, F.F., Su, F., Kuwada, J.Y., Hidaka, E., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Ngo-Hazelett, P., Postlethwait, J.H., Núñez, G., Inohara, N., 2003. Caspy, a zebrafish caspase, activated by ASC oligomerization is required for pharyngeal arch development. *J. Biol. Chem.* 278, 4268–4276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203944200>
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M., Seya, T., 2008. Teleost TLR22 Recognizes RNA Duplex to Induce IFN and Protect Cells from Birnaviruses. *J. Immunol.* 181, 3474–3485. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3474>
- McCoy, A.J., Koizumi, Y., Higa, N., Suzuki, T., 2010a. Differential regulation of caspase-1 activation *via* NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* Infection. *J. Immunol.* 185, 7077–7084. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002165>
- McCoy, A.J., Koizumi, Y., Toma, C., Higa, N., Dixit, V., Taniguchi, S., Tschopp, J., Suzuki, T., 2010b. Cytotoxins of the human pathogen *Aeromonas hydrophila* trigger, *via* the NLRP3 inflammasome, caspase-1 activation in macrophages. *Eur. J. Immunol.* 40, 2797–2803. <https://doi.org/10.1002/eji.201040490>
- McElvania Tekippe, E., Allen, I.C., Hulseberg, P.D., Sullivan, J.T., McCann, J.R., Sandor, M., Braunstein, M., Ting, J.P.Y., 2010. Granuloma formation and host defense in chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-

1. PLoS One 5, e12320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012320>
- Meijer, A.H., Gabby Krens, S.F., Medina Rodriguez, I.A., He, S., Bitter, W., Snaar-Jagalska, B.E., Spaank, H.P., 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol. Immunol.* 40, 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.003>
- Meyer, A., Van De Peer, Y., 2005. From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays* 27, 937–945. <https://doi.org/10.1002/bies.20293>
- Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., 2007. Edwardsiellosis in fish: A brief review. *J. Biosci.* 32, 1331–1344. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0143-8>
- Morimoto, N., Kondo, M., Kono, T., Sakai, M., Hikima, J., 2019. Nonconservation of TLR5 activation site in *Edwardsiella tarda* flagellin decreases expression of interleukin-1 β and NF- κ B genes in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.* 87, 765–771. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.024>
- Moriya, M., Taniguchi, S., Wu, P., Liepinsh, E., Otting, G., Sagara, J., 2005. Role of charged and hydrophobic residues in the oligomerization of the PYRIN domain of ASC. *Biochemistry* 44, 575–583. <https://doi.org/10.1021/bi048374i>
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., Reddi, A.H., 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (2), 155-174. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00002-9)
- Munang'andu, H., 2018. Intracellular bacterial infections: A challenge for developing cellular mediated immunity vaccines for farmed fish. *Microorganisms* 6, 33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020033>
- Muñoz, I., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., Mulero, V., 2013. Molecular cloning, phylogenetic analysis and functional characterization of soluble toll-like receptor 5 in gilthead seabream,

- Sparus aurata*. Fish Shellfish Immunol. 35, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.374>
- Narayan, S., Kolly, L., So, A., Busso, N., 2011. Increased interleukin-10 production by ASC-deficient CD4⁺ T cells impairs bystander T-cell proliferation. Immunology 134, 33–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03462.x>
- O’Neill, L.A.J., Dinarello, C.A., 2000. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: Crucial receptors for inflammation and host defense. Immunol. Today 21, 206–209. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01611-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01611-X)
- Ogryzko, N. V., Renshaw, S.A., Wilson, H.L., 2014. The IL-1 family in fish: Swimming through the muddy waters of inflammasome evolution. Dev. Comp. Immunol. 46, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.008>
- Patankar, Y.R., Mabaera, R., Berwin, B., 2015. Differential ASC requirements reveal a key role for neutrophils and a noncanonical IL-1 β response to *Pseudomonas aeruginosa*. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 309, L902–L913. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00228.2015>
- Pierini, R., Juruj, C., Perret, M., Jones, C.L., Mangeot, P., Weiss, D.S., Henry, T., 2012. AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in *Francisella*-infected caspase-1-deficient macrophages. Cell Death Differ. 19, 1709–1721. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.51>
- Praveen, P.K., Debnath, C., Shekhar, S., Dalai, N., Ganguly, S., 2016. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. Vet. World 9, 6–11. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.6-11>
- Protti, M.P., De Monte, L., 2020. Dual role of inflammasome adaptor ASC in cancer. Front. Cell Dev. Biol. 8, 40. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00040>
- Qin, L., Sun, Y., Zhao, Y., Xu, J., Bi, K., 2017. In vitro model to estimate *Edwardsiella tarda*-

macrophage interactions using RAW264.7 cells. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 177–184.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.027>

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

Ravi, V., Venkatesh, B., 2008. Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.11.001>

Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., Aderem, A., 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9577–9582. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502272102>

Roca, F.J., Whitworth, L.J., Redmond, S., Jones, A.A., Ramakrishnan, L., 2019. TNF induces pathogenic programmed macrophage necrosis in tuberculosis through a mitochondrial-lysosomal-endoplasmic reticulum circuit. *Cell* 178, 1344–1361.e11.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.004>

Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., Del Barrio, L., Re, F., 2011. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal.* 11, 2037–2050.
<https://doi.org/10.1100/2011/212680>

Santos, L., Ramos, F., 2018. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 135–143.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>

Sarkar, A., Duncan, M., Hart, J., Hertlein, E., Guttridge, D.C., Wewers, M.D., 2006. ASC directs NF- κ B activation by regulating receptor interacting protein-2 (RIP2) caspase-1 interactions. *J. Immunol.* 176, 4979–4986. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4979>

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT

method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Schroder, K., Hertzog, P., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>. *Journal*

Schroder, K., Tschopp, J., 2010. The Inflammasomes. *Cell* 140 (6), 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>

Sellin, M.E., Maslowski, K.M., Maloy, K.J., Hardt, W.D., 2015. Inflammasomes of the intestinal epithelium. *Trends Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.002>

Sepulcre, M.P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Cayuela, M.L., Mulero, V., 2009. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: Fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. *J. Immunol.* 182, 1836–1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801755>

Shelly, A., Banerjee, C., Saurav, G.K., Ray, A., Rana, V.S., Raman, R., Mazumder, S., 2017. *Aeromonas hydrophila*-induced alterations in cytosolic calcium activate pro-apoptotic cPKC-MEK1/2-TNF α axis in infected headkidney macrophages of *Clarias gariepinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 76, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.015>

Shimada, K., Porritt, R.A., Markman, J.L., O'Rourke, J.G., Wakita, D., Noval Rivas, M., Ogawa, C., Kozhaya, L., Martins, G.A., Unutmaz, D., Baloh, R.H., Crother, T.R., Chen, S., Arditi, M., 2018. T-cell-intrinsic receptor interacting protein 2 regulates pathogenic T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 49, 873–885.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.022>

Song-Zhao, G.X., Srinivasan, N., Pott, J., Baban, D., Frankel, G., Maloy, K.J., 2014. Nlrp3 activation in the intestinal epithelium protects against a mucosal pathogen. *Mucosal Immunol.* 7, 763–774. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.94>

- Song, W.S., Jeon, Y.J., Namgung, B., Hong, M., Yoon, S. Il, 2017. A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin. *Sci. Rep.* 7, 40878. <https://doi.org/10.1038/srep40878>
- Song, X., Zhao, J., Bo, Y., Liu, Z., Wu, K., Gong, C., 2014. *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): An experimental model. *Aquaculture* 434, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.015>
- Srinivasula, S.M., Poyet, J.L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., Alnemri, E.S., 2002. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J. Biol. Chem.* 277, 21119–21122. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200179200>
- Stehlik, C., Lee, S.H., Dorfleutner, A., Stassinopoulos, A., Sagara, J., Reed, J.C., 2003. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J. Immunol.* 171, 6154–6163. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6154>
- Sun, Y., Wang, J., Lao, H., Yin, Z., He, W., Weng, S., Yu, X., Chan, S.M., He, J., 2008. Molecular cloning and expression analysis of the ASC gene from mandarin fish and its regulation of NF- κ B activation. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.07.006>
- Tahoun, A., Jensen, K., Corripio-Miyar, Y., McAteer, S., Smith, D.G.E., McNeilly, T.N., Gally, D.L., Glass, E.J., 2017. Host species adaptation of TLR5 signalling and flagellin recognition. *Sci. Rep.* 7, 17677. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17935-5>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140 (6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tan, J., Yang, D., Wang, Z., Zheng, X., Zhang, Y., Liu, Q., 2019. EvpP inhibits neutrophils recruitment via Jnk-caspy inflammasome signaling *in vivo*. *Fish Shellfish Immunol.* 92, 851–860. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.051>

- Tsoi, S., Park, K.C., Kay, H.H., O'Brien, T.J., Podor, E., Sun, G., Douglas, S.E., Brown, L.L., Johnson, S.C., 2006. Identification of a transcript encoding a soluble form of toll-like receptor 5 (TLR5) in Atlantic salmon during *Aeromonas salmonicida* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.05.013>
- Tsujita, T., Ishii, A., Tsukada, H., Matsumoto, M., Che, F.S., Seya, T., 2006. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response *via* physical binding to flagellin. *Vaccine* 24, 2193–2199. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.003>
- Tsujita, T., Tsukada, H., Nakao, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., 2004. Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikis*). *J. Biol. Chem.* 279, 48588–48597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407634200>
- Tsukada, H., Fukui, A., Tsujita, T., Matsumoto, M., Iida, T., Seya, T., 2005. Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5S) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity. *Int J Mol Med.* 15, 519–525.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M., 2016. Pyroptosis. *Curr. Biol.* 26, R568–R572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.019>
- Vojtech, L.N., Scharping, N., Woodson, J.C., Hansen, J.D., 2012. Roles of inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1 β in *Francisella noatunensis* infection. *Infect. Immun.* 80, 2878–2885. <https://doi.org/10.1128/IAI.00543-12>
- Voogdt, C.G.P., Wagenaar, J.A., van Putten, J.P.M., 2018. Duplicated TLR5 of zebrafish functions as a heterodimeric receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E3221–E3229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719245115>
- Wang, W., Tan, J., Wang, Z., Zhang, Y., Liu, Q., Yang, D., 2020. Characterization of the inflammasome component SmASC in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish*

Immunol. 100, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.032>

Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M., 2010. Interleukin-1 (IL-1) pathway. Sci. Signal. 3, cm1.
[h t t p s : / / d o i . o r g / 1 0 . 1 1 2 6 / s c i s i g n a l . 3 1 0 5 c m 1](https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1)

Winsor, N., Krustev, C., Bruce, J., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2019. Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells. Cell. Microbiol. 21 (11), e13079.
[h t t p s : / / d o i . o r g / 1 0 . 1 1 1 1 / c m i . 1 3 0 7 9](https://doi.org/10.1111/cmi.13079)

Xie, H.X., Lu, J.F., Rolhion, N., Holden, D.W., Nie, P., Zhou, Y., Yu, X.J., 2014. *Edwardsiella tarda*-induced cytotoxicity depends on its type III secretion system and flagellin. Infect. Immun. 82, 3436–3445. <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-13>

Xie, J., Belosevic, M., 2016. Functional characterization of apoptosis-associated speck-like protein (ASC) of the goldfish (*Carassius auratus* L.). Dev. Comp. Immunol. 65, 201–210.
[h t t p s : / / d o i . o r g / 1 0 . 1 0 1 6 / j . d c i . 2 0 1 6 . 0 7 . 0 1 3](https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.013)

Yan, S., Shen, H., Lian, Q., Jin, W., Zhang, R., Lin, X., Gu, W., Sun, X., Meng, G., Tian, Z., Chen, Z.W., Sun, B., 2020. Correction: Deficiency of the AIM2–ASC signal uncovers the STING-driven overreactive response of type I IFN and reciprocal depression of protective IFN- γ immunity in mycobacterial infection. J. Immunol. 204, 472–472.
[h t t p s : / / d o i . o r g / 1 0 . 4 0 4 9 / j i m m u n o l . 1 9 0 1 3 7 0](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901370)

Yang, D., Zheng, X., Chen, S., Wang, Z., Xu, W., Tan, J., Hu, T., Hou, M., Wang, W., Gu, Z., Wang, Q., Zhang, R., Zhang, Y., Liu, Q., 2018. Sensing of cytosolic LPS through caspy2 pyrin domain mediates noncanonical inflammasome activation in zebrafish. Nat. Commun. 9 (1), 3052. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04984-1>

Yoon, S., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A. V, Osterman, A.L., Wilson, I.A., 2012. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. Science. 335, 859–864.
[h t t p s : / / d o i . o r g / 1 0 . 1 1 1 1 / c m i . 1 2 7 1 4](https://doi.org/10.1111/cmi.12714)

Zhang, X., Liu, Z., Li, C., Zhang, Y., Wang, L., Wei, J., Qin, Q., 2020. Characterization of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ASC and caspase-1 involved in extracellular ATP-mediated immune signaling in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 97, 58–71.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.023>