

コイ顆粒球の造血及び機能を制御する  
免疫関連サイトカインの研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻  
博士課程

西谷 広平

2021

## 目次

第1章 緒論.....	5
第2章 コイ好中球活性化因子の機能解析.....	12
2.1. 序論 .....	13
2.2. 材料および方法.....	16
2.2.1. 供試魚	
2.2.2. コイ血清の作製	
2.2.2. コイの組織および各種細胞の分離	
2.2.3. コイの組織および各種免疫細胞の分離	
2.2.4. コイ G-CSF 遺伝子の同定および解析	
2.2.5. コイの腎臓白血球およびマクロファージに対するマイトジェン刺激	
2.2.6. コイの各組織および各細胞集団における G-CSF 遺伝子の発現解析	
2.2.7. 組換えタンパク質の作製	
2.2.8. MTT 試験を用いた組換えコイ G-CSF による腎臓白血球に対する増殖活性の検討	
2.2.9. 組換えコイ G-CSF で刺激した腎臓白血球の遺伝子発現解析	
2.2.10. メチルセルロース培地ストックの作製	
2.2.11. 組換えコイ G-CSF による腎臓白血球に対するコロニーアッセイ	
2.2.12. コロニー細胞の性状解析	
2.2.13. 組換えコイ G-CSF による腎臓好中球に対する遊走活性試験	
2.2.14. 組換えコイ G-CSF による腎臓好中球に対する呼吸バースト試験	
2.2.15. 組換えコイ G-CSF のコイ生体に対する作用の検討	

2.3. 結果.....	29
2.3.1. 同定されたコイ G-CSF 遺伝子の in silico 解析	
2.3.2. 各組織および免疫細胞集団における G-CSF 遺伝子の発現様式	
2.3.3. 刺激時の腎臓白血球およびマクロファージにおける G-CSF の遺伝子発現	
2.3.4. 大腸菌発現系による組換えコイ G-CSFa1 および G-CSFb1 の作製	
2.3.5. 組換えコイ G-CSF による腎臓白血球に対する増殖活性	
2.3.6. 組換えコイ G-CSF 刺激を行った腎臓白血球の遺伝子発現	
2.3.7. コイ G-CSF 刺激によるコロニー形成	
2.3.8. コイ G-CSF により形成されたコロニーの性状解析	
2.3.9. 各臓器におけるコイ好中球前駆細胞の分布	
2.3.10. コイ G-CSF の腎臓好中球に対する遊走活性	
2.3.11. コイ G-CSF の腎臓好中球に対する活性酸素産生刺激	
2.3.12. コイ G-CSF のコイ生体に対する作用	
2.4. 考察 .....	39
第 3 章 コイ好塩基球産生因子の同定および機能解析.....	74
3.1. 序論.....	75
3.2. 材料および方法.....	78
3.2.1. コイ IL-5fam 遺伝子の探索およびクローニング	
3.2.2. コイ好塩基球および好中球の分取	
3.2.3. 大腸菌死菌によるコイに対する免疫刺激	
3.2.4. 腎臓白血球に対するマイトジェン刺激	
3.2.5. コイ IL-5fam の定量 PCR による遺伝子発現解析	

3.2.6.	組換えタンパク質発現ベクターの作製	
3.2.7.	組換えタンパク質安定発現細胞株の樹立	
3.2.8.	組換えタンパク質の精製	
3.2.9.	組換えコイ IL-5fam1 の生化学的性状の解析	
3.2.10.	組換えコイ IL-5fam1 による腎臓白血球に対する増殖活性の検討	
3.2.11.	増殖した細胞の性状解析	
3.2.12.	コイ IL-5fam1 のコロニー形成刺激能の検討	
3.2.13.	形成されたコロニーの染色および形態観察	
3.2.14.	形成されたコロニーの遺伝子発現解析	
3.2.15.	透過型電子顕微鏡による観察	
3.2.16.	コイ IL-5fam1 による腎臓細胞への刺激に伴う STAT5 活性化の解析	
3.3.	結果.....	86
3.3.1.	同定されたコイ IL-5fam 遺伝子の in silico 解析	
3.3.2.	死菌投与コイの頭腎および脾臓における IL-5fam1 遺伝子発現解析	
3.3.3.	マイトジェン刺激コイ腎臓白血球における IL-5fam1 遺伝子発現解析	
3.3.4.	組換えコイ IL-5fam1 の性状解析	
3.3.5.	コイ IL-5fam1 の腎臓造血細胞に対する作用	
3.3.6.	コイ IL-5fam1 のコロニー形成刺激試験	
3.3.7.	コロニーの形態および遺伝子発現	
3.3.8.	コイ $\beta$ c によるコロニー形成阻害	
3.3.9.	コイ IL-5fam1 のシグナル伝達経路	
3.4.	考察.....	93
第4章	総括.....	119
謝辞	.....	126

引用文献..... 127

## 第 1 章

### 緒論

魚類は一般的に、水中で生活し、鰓呼吸を行い、鰭を用いて移動する変温動物と定義される。分類学的には脊椎動物の内、両生類や鳥類、哺乳類等の四肢動物を除いたものを指す。すなわち魚類とは円口類 (無顎類) ・軟骨魚類・条鰭 (じょうき) 類・肉鰭 (にくき) 類などの異なる系統を包含する動物群の総称である。魚類の中でも、最も種数が多く、繁栄しているグループは条鰭類に属する真骨魚類であり、現生魚類のほとんどが含まれる。一方、ハイギョなどが含まれる肉鰭類は陸上環境に適応する進化を遂げ、哺乳類や鳥類などの四肢動物を生み出した (Fig. 1-1)。すなわち、現生の真骨魚類と哺乳類は 4~5 億年前に共通祖先から分岐したと考えられている。そのため、真骨魚類と哺乳類の間では、生理機能や免疫機構において多くの共通点が存在する。

上述の様に、魚類は哺乳類等の四肢動物と同様の共通祖先を有するため、免疫システムが類似している。例えば、脊椎動物の血球は赤血球・栓球・顆粒球・単球・リンパ球から構成され、脊椎動物間において共通の血球組成を備えている (Fig. 1-2)。血球の形態については、哺乳類の赤血球や栓球 (血小板) は無核であるのに対して、それ以外の脊椎動物 (鳥類・爬虫類・両生類・魚類) の赤血球や栓球は有核である等の違いがある。しかし、自然免疫において重要な役割を担う好中球様の細胞が確認されており (椎橋・飯田, 2003)、獲得免疫を担うリンパ球は、哺乳類と同様に T 細胞と B 細胞に分類されることが明らかになっている (Nakanishi et al., 2011)。これらのことから、自然免疫と獲得免疫から成る高度な免疫システムの大枠は、哺乳類や真骨魚類の共通祖先の段階で確立していたと考えられる。

真骨魚類と哺乳類の免疫システムは類似するが、それらを制御する分子機構は多様な進化を遂げてきた可能性がある。それらの原因の 1 つとして、進化の過程で起きた、染色体セットが倍化するイベント、即ち、全ゲノム重複 (whole

genome duplication, WGD) の影響が考えられる。脊椎動物は、初期の進化過程において、WGD を 2 回経験したと考えられている (Fig. 1-3) (Lundin, 1993; Ohno, 1999; 笠原, 2001)。このゲノム重複が起きると、余剰な遺伝子が大量に生じることになる。この余剰遺伝子が新規遺伝子の一次的な素材となり、新しい生物機能を持った様々な遺伝子が生み出されたと考えられている (Ohno, 2013)。真骨魚類は哺乳類と分岐した後およそ 3 億年前に、WGD をもう一度経験し、コイ等の一部の魚種においては、計 4 回の WGD を経験したと考えられている (Fig. 1-3) (Jaillon et al., 2004)。そのため、一部の遺伝子において、真骨魚類は哺乳類と相同な遺伝子を複数有していることが知られている (Vandepoele et al., 2004)。このような真骨魚類に特異的に生じた大量の重複遺伝子が、真骨魚類における莫大な形態・生理・行動・生態における多様性をもたらした可能性がある。これらのことから、真骨魚類の免疫システムを支える分子制御機構には、魚類特有の仕組みが存在すると考えられる。

免疫システムの分子制御機構において重要な役割を担う免疫関連サイトカインは、感染時などにおいて細胞間の情報伝達物質として機能する。上述の様に、WGD の影響により、サイトカイン遺伝子においても、哺乳類と真骨魚類では、大きな違いが生じている。近年のゲノム解読研究の発展により、真骨魚類におけるサイトカイン遺伝子について、哺乳類と相同な重複遺伝子が複数報告されている。ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) では、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 遺伝子について 2 つの重複遺伝子が確認されており、2 つの分子が哺乳類と同様に骨髓球系細胞の増殖に関与していることが知られている (Stachura et al., 2013)。しかし、重複分子間における機能の違いなど、WGD により生じたサイトカインにおける免疫学的な意義は明らかにされていない。また、哺乳類には存在しない、魚類のみが有するサイトカイン

についてもいくつか報告がある。例えば、哺乳類において、II型インターフェロン (Interferon, IFN) は  $IFN\gamma$  の 1 つのみが報告されているが、一部の魚種では  $IFN\gamma$  に加えて魚類特有の  $IFN\gamma$  である  $IFN\gamma_{rel}$  の存在が報告されている (Yamaguchi et al., 2015)。さらに、ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) では  $IFN\gamma_{rel}$  が哺乳類の  $IFN\gamma$  と同様に抗ウイルス活性を有することが知られている (Shibasaki et al., 2014)。このような魚類特有のサイトカインについては、遺伝子の存在は知られているもの、それらの機能解析はほとんど行われていない。これらのことから、魚類サイトカインは重複分子や魚類特有の分子による魚類独自の免疫制御機構を司っている可能性が高い。

本研究では、真骨魚類サイトカインによる魚類特有の免疫制御機構の特徴を明らかにするべく、日本大学魚病/比較免疫学研究室で実験系が確立しており、ゲノム情報が公開されているコイ (*Cyprinus carpio*) を対象として、顆粒球の産生および機能を制御するサイトカインの機能解析を行った。まず、好中球の産生および活性化を担う G-CSF について遺伝子解析および機能解析を行い、魚類サイトカインの重複分子における特徴の一端を明らかにした。続いて、ヒトでは同一サイトカインファミリーに属し、好酸球および好塩基球の産生を促すインターロイキン (Interleukin, IL)-5、IL-3、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) の 3 分子と関連したゲノム構造を有するサイトカイン遺伝子を同定し、その機能解析を行うことで、魚類特有のサイトカインの機能を明らかにした。



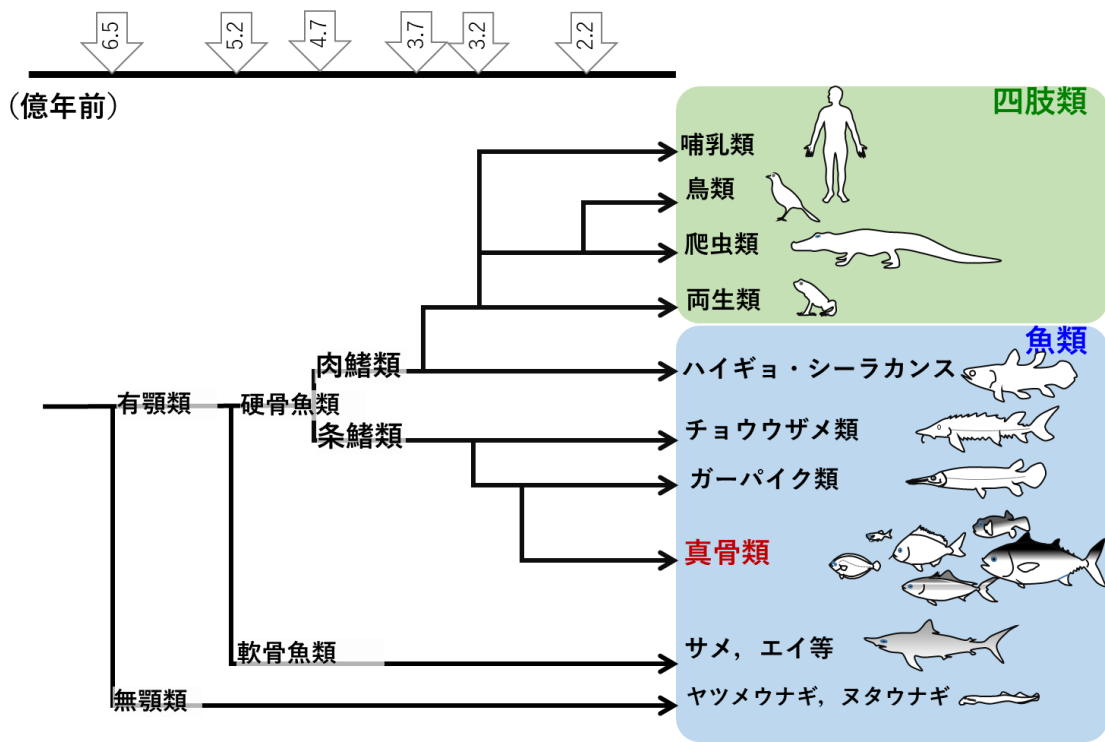


Fig. 1-1 脊椎動物の系統進化




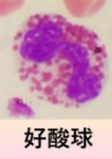
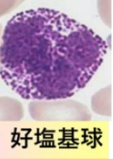
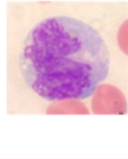

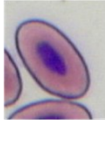




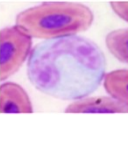

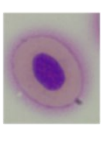
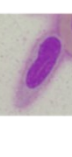
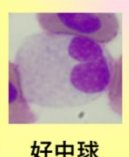
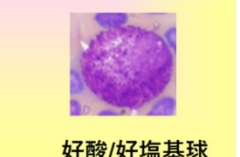
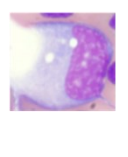

	赤血球	栓球	顆粒球			単球	リンパ球
哺乳類 (イヌ)		 血小板	 好中球	 好酸球	 好塩基球		 T/B/NK cell
鳥類 (ニワトリ)			 偽好酸球	 好酸球	 好塩基球		 T/B/NK cell
魚類 (コイ)			 好中球	 好酸/好塩基球			 T/B/NK cell

Fig. 1-2 脊椎動物の血球組成

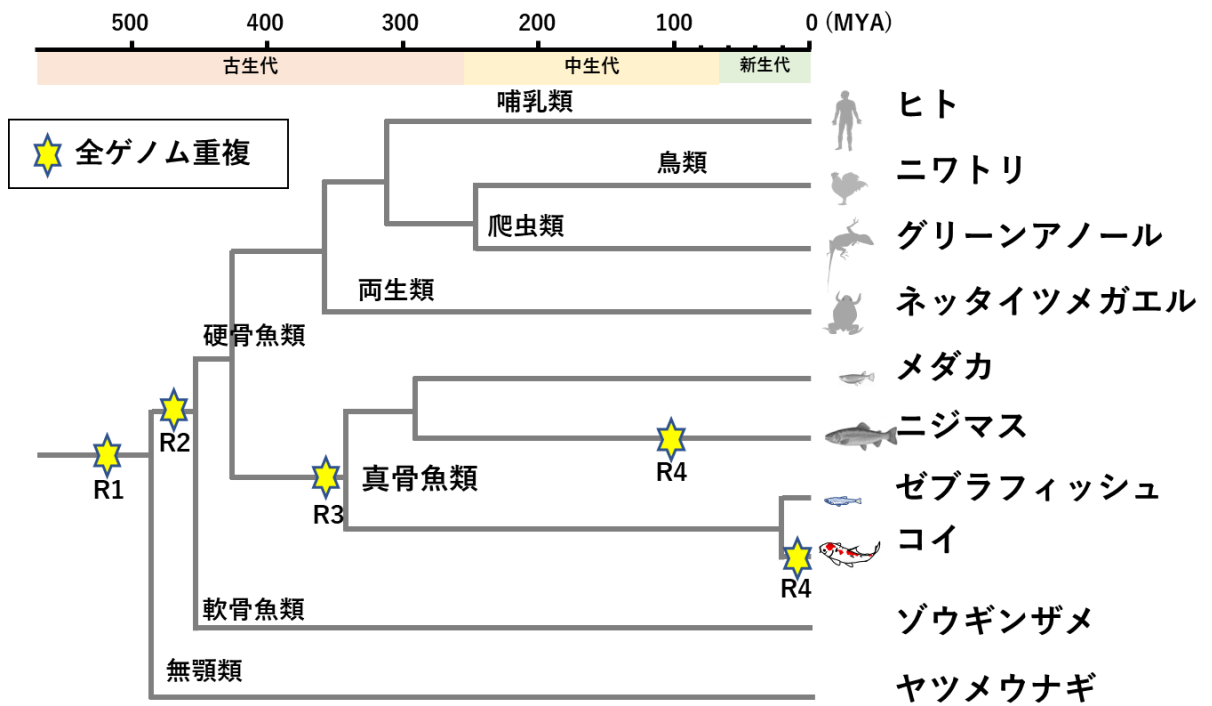


Fig. 1-3 脊椎動物における全ゲノム重複

R1, R2, R3, R4 はそれぞれ、1st-round WGD, 2nd-round WGD, 3rd-round WGD, 4th-round WGD を表す。

## 第 2 章

### コイ好中球活性化因子の機能解析

## 2.1. 序論

好中球は自然免疫の要であり、それらの活性化を促す因子は生体防御において重要な役割を担う。特に、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、哺乳類において好中球前駆細胞の増殖、分化、生存を促進し、成熟した好中球の感染局所への遊走や免疫機能を高めるサイトカインである (Panopoulos and Watowich, 2008)。ヒトの G-CSF は、主に単球およびマクロファージによって産生されるが (Oster et al., 1989)、線維芽細胞 (Koeffler et al., 1987)、血管内皮細胞 (Zsebo et al., 1988) および骨髄間質細胞 (Rennick et al., 1987) によっても産生される。また、健康なヒトの血清中の G-CSF タンパク質レベルは低いですが、炎症性サイトカインの増加や細菌性感染症の際の Lipopolysaccharide (LPS) の存在などの炎症性刺激によって G-CSF 産生の顕著な上昇が誘導される (Demetri and Griffin, 1991; Kawakami et al., 1990; Watari et al., 1989)。G-CSF の作用は、好中球やその前駆細胞に発現する受容体 G-CSFR と結合し、下流のシグナル伝達カスケードを活性化することで発揮される (Panopoulos and Watowich, 2008)。また G-CSF/G-CSFR シグナルを欠損したマウスは、骨髄球系前駆細胞の減少と循環系への好中球の動員障害を呈し、その結果、慢性的な好中球減少症を引き起こす (Lieschke et al., 1994; Liu et al., 1996)。これらのことから、G-CSF は好中球の発生における主要な制御因子であり、骨髄球系前駆細胞の制御に寄与していると考えられる。同時に、G-CSF は成熟好中球の機能にも影響を与える。G-CSF は成熟好中球のケモカイン受容体の発現を調節し、貪食作用と活性酸素 (ROS) の産生を活性化することで、好中球の殺菌活性を高めることが報告されている (Spiekermann et al., 1997)。

G-CSF は、最初にマウスで機能解析が行われたが (Nicola et al., 1983)、その後、ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) (Santos et al., 2006)、アフリカツメガエル

(*Xenopus laevis*)(Yaparla et al., 2016)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)(Santos et al., 2006)、トラフグ (*Takifugu rubrenes*)(Santos et al., 2006)、ミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*)(Santos et al., 2006)、クロメバル (*Sebastes ventricosus*)(Nam et al., 2009) およびゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)(Stachura et al., 2013) 等の哺乳類以外の脊椎動物においても研究が進められてきた。特に、真骨魚類の G-CSF 遺伝子は約 3 億年前に起きた WGD での遺伝子重複によって生じた 2 つの遺伝子 (パラログ) として存在する。真骨魚類において、重複した G-CSF は A グループ (G-CSFa) と B グループ (G-CSFb) が存在し、ゼブラフィッシュの G-CSFa と G-CSFb の両方が、*in vivo* および *in vitro* における造血幹細胞の出現と、好中球およびマクロファージの発生に必要であることが示唆されている (Stachura et al., 2013)。また、ゼブラフィッシュの G-CSFb は、傷害部位への成熟好中球の動員に関与していたが (Galdames et al., 2014)、G-CSFa の寄与は不明であった。この様に、真骨魚類の G-CSF は、哺乳類と相同な機能を部分的に有していることが知られている。しかしながら、重複分子は進化の過程でその機能について保存、新規化、または消失が起きると考えられており、パラログ間における機能の違いが生じることが予想される。現在までに、魚類 G-CSF において、重複分子の違いに着目した研究は行われておらず、それらの機能分担や免疫学的役割は不明である。

本研究では、コイの G-CSF パラログの機能解析を行うことで、魚類独自の免疫制御機構の一端を明らかにした。コイは大型魚種であるため、G-CSF の機能解析において重要な細胞機能解析や *in vivo* 試験に優れたモデルである。また、コイは、ゼブラフィッシュ等、他の真骨魚類と比較し、進化の過程で WGD イベントを 1 回多く経験している 4 倍体種である (Petit et al., 2017)。本章では、A グループに属する 2 つの G-CSF (*g-csfa1*, *g-csfa2*) と B グループの G-CSF (*g-csfb1*,

*g-csfb2*) における機能の特性について報告する。機能解析では、特にマクロファージで高発現している 2 つの G-CSF パラログ (G-CSFa1, G-CSFb1) の組換えタンパク質を作製し、コイ造血細胞に対する増殖、分化、コロニー形成に関する機能を調べた。また、これらの G-CSF パラログが、遊走活性、活性酸素の産生など、成熟好中球の機能に及ぼす影響を調べた。最後に、循環血液中の好中球に対する G-CSF パラログの *in vivo* での影響を検討した。

## 2.2. 材料および方法

### 2.2.1. 供試魚

供試魚として体重 30~100 g のコイ (*Cyprinus carpio*) (小コイ) および体重 1~2 kg のコイ (大コイ) を用いた。養魚場より購入後のコイは、0.5%濃度の塩水浴を 1 週間行った後、水温 25°Cの循環式 1 t 水槽で飼育し、1 日 1 回給餌を行った。小コイは、組織の分離および細胞培養に、大コイは血清の作製に使用した。

### 2.2.2 コイ血清の作製

細胞培養液に添加するコイ血清を作製するため、大コイの尾部血管から 1 尾あたり 30~40 mL の血液を 3 週間おきに採取した。採取した血液は、血餅形成のため室温で 2 時間静置後、4°Cで 2 時間静置し、続いて 2 度の遠心分離 (1,600×g, 15 分) により血清を回収した。血清は非働化 (40°C, 30 分) 後、5~6 個体分をプールした。また、造血に影響を及ぼすと考えられるステロイドホルモン等の低分子生理活性物質を血清から除去するため、粉末状の活性炭 (Sigma-Aldrich) を血清 1 mL に対し 10 mg の割合で加え 30 分間混和した。その後 3,000×g, 15 分で遠心分離後、上清を回収し、濾過滅菌 (pore size; 0.22 μm) し、使用時まで-20°Cで保存した。

### 2.2.3. コイの組織および各種免疫細胞の分離

組織と細胞の分離のために、小コイを 0.01% Benzocaine (Sigma-Aldrich) または Tricaine Methane Sulfonate (TMS, Crescent Research Chemicals) で麻酔し、尾静脈から採血した後、安楽殺を行った。



白血球は、頭腎、体腎、および脾臓から得た。コイを安楽殺後、頭腎、体腎および脾臓をそれぞれ無菌的に摘出し、これらを 5 mL の Eagle's minimum essential medium (MEM, Nissui Seiyaku Co., Ltd) を含むシャーレに移し、60#のステンレスメッシュ上で組織を揉み解すようにして血球を分離した。分離後、細胞を遠心沈殿 (200×g, 5 分) し、上清を捨て、5 mL の MEM に再浮遊させた。続いて、比重 1.075 の Percoll 液 (GE Healthcare) にこの細胞浮遊液を重層し遠心分離した (400×g, 20 分)。遠心後、MEM とパーコールの中間層を回収し、遠心分離により MEM で 2 回洗浄した後、20% ウシ胎児血清 (FBS) と 2.5% コイ血清を含む E-RDF 培地 (極東製薬工業株式会社) (以下 E-RDF20/2.5) で再懸濁し、35 μm セルストレーナー (Corning) を通過させて凝集体を除去した。

末梢血白血球 (PBL) は、コイの尾静脈からヘパリン処理したシリンジで 1 mL の血液を採取し、氷冷した MEM 9 mL に混合し、これを Percoll (1.075) に重層して遠心分離した (400×g, 20 分)。MEM と Percoll 境界面の細胞を採取し、遠心分離により MEM で 2 回洗浄し、E-RDF20/2.5 培地中に再懸濁した。

腎臓の好中球は、上述の通り腎臓血球を分離後、2 種類の Percoll (1.080 および 1.100g/cm<sup>3</sup>) に重層し、4°C で遠心分離した (400×g, 20 分)。遠心後、比重 1.080 より上層の細胞浮遊液は捨て、比重 1.100 より上層を回収し、5 mL の MEM に浮遊させ、遠心洗浄した (200×g, 5 分)。洗浄後、好中球と赤血球を含む細胞塊を赤血球溶解バッファー (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA) で 1 分間ピペティングすることによって溶血処理した。次いで細胞は遠心分離により MEM で 2 回洗浄し、各実験に適した培地で再懸濁した。好中球の純度は、BD FACS Canto (BD Biosciences) を用いたフローサイトメトリーおよびペルオキシダーゼ染色により 92% 以上であることを確認した。

胸腺細胞 (Joerink et al., 2006; Stolte et al., 2008) およびマクロファージ (Joerink

et al., 2006) は先行研究による手法で入手した。また、B 細胞および栓球は磁気活性化細胞分離システム (MACS) を用いて、抗コイ IgM 抗体 WCI12(Secombes et al., 1983)および抗コイ栓球抗体 WCL6 (Rombout et al., 1996) を用いて PBL から分離した。

#### 2.2.4 コイ G-CSF 遺伝子の同定および解析

コイ G-CSF の遺伝子は、他種で G-CSF に隣接していることが知られている遺伝子 (*med24*, *psmd3*, *kpnbl*) の情報を用いて、Augustus 遺伝子予測サーバー (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) により予測した。続いて、推定コイ G-CSF をコードするコイのゲノム配列に対してプライマーを設計した。PCR、RACE PCR、qRT-PCR および組換えタンパク質発現に使用したプライマーのリストは以下に示す (Table 2-1, 2-2, 2-3)。PCR 反応は、PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara) を用いて、コイの腎臓および心臓由来の cDNA を用いて行った。PCR 産物は、FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon genetics)を用いてゲル精製し、10×A-attachment Mix (Toyobo)と Ligation high ver.2 (Toyobo) を用いて pMD20-T vector (Takara) にライゲーションし、大腸菌の DH5α 株に形質転換した。ベクター特異的な M13 RV および M4 プライマーを用いたコロニーPCR により陽性コロニーを同定し、FastGene Plasmid Mini kit (Nippon genetics) を用いてプラスミドを単離し、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてインサートの配列を決定した。それらの配列について GENETYX version 11 (Genetic Information Processing Software) を用いて配列解析を行い、BLAST プログラムを用いて他種の G-CSF アミノ酸配列を取得した。続いて、各動物種における G-CSF 配列について Clustal Omega ソフトウェア (EMBL-European Bioinformatics Institute) を用

いてアライメントを行った。また、それぞれの G-CSF タンパク質のシグナルペプチド領域は、SignalP 4.0 サーバー (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて推定し、保存されたモチーフは SMART サーバー (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) を用いて予測した。系統解析は、MEGA version 6 ソフトウェアを用いて、neighbor-joining (NJ) 法と Poisson 法を用いて行い、ブートストラップを 1,000 回行い、値はパーセンテージで表した。コイの *g-csf1*, *g-csf2*, *g-csf1*, *g-csf2* の完全長塩基配列 (Accession number: MG882495, MG882496, MG882497, MG882498) は GenBank に登録した。

#### 2.2.5. コイの腎臓白血球およびマクロファージに対するマイトジェン刺激

健康なコイから単離した新鮮な腎臓白血球は培地のみ、LPS (終濃度 50 µg/mL)、polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C, Sigma-Aldrich, 終濃度 50 µg/mL)、または Concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich, 終濃度 10 µg/mL) と Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, 終濃度 1 µg/mL) の組み合わせでそれぞれ 1、3、6 時間刺激し、回収した。

2.2.3 において分離した頭腎由来のマクロファージは、LPS (終濃度 50 µg/mL)、ConA (終濃度 10 µg/mL) または PMA (終濃度 1 µg/mL) の組み合わせでそれぞれ 3、6 時間処理し、回収した。

#### 2.2.6. コイの各組織および各細胞集団における G-CSF 遺伝子の発現解析

健康なコイから組織と白血球を採取し、メーカーの指示に従って RNeasy キット (QIAGEN) を用いて total RNA を単離し、-80°C で保存した。続いて、単離した RNA について、SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) は、ABsolute QPCR

SYBR Green Mix (Thermo Scientific) を用いて Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) で行った。RT-qPCR の蛍光データは、Rotor-Gene software v1.7 を用いて解析した。各サンプルのテイクオフ値と、各プライマーセットの平均反応効率は、Rotor Gene ソフトウェアの Comparative Quantitation Analysis により求めた。標的遺伝子の相対的な発現量は、参照遺伝子は 40s サブユニットの s11 タンパク質遺伝子を用い、この遺伝子と標的遺伝子の発現を比較することで定量を行った。標的遺伝子のテイクオフ値が 32 以上の場合、目的の遺伝子を検出限界以下の発現量とした。

#### 2.2.7. 組換えタンパク質の作製

大腸菌発現系により組換えコイ G-CSFa1 および G-CSFb1 を作製した。組換えコイ G-CSF の発現ベクターは N 末端側に 10×histidine (His) tag が連結された pET-16b 発現ベクター (Novagen) を用いて作製された。すなわち、コイの *g-csfal* および *g-csfbl* のシグナルペプチドを除いた領域の配列に制限酵素認識配列が附加されるようプライマーを設計し、コイの腎臓および心臓の cDNA テンプレートを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物について、それぞれ制限酵素 *NdeI* および *BamHI* を用いて切断し、アガロースゲル電気泳動にて分離、精製後、発現ベクター pET-16b にそれぞれ連結した。

形質転換を行った大腸菌に対する、Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Wako) による組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 の発現誘導および組換えタンパク質の Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose (QIAGEN) を用いた精製は、添付のプロトコールに従い、若干の改良を加えて行った。すなわち、100 mL の Luria-Bertani (LB) 培地中で OD<sub>600</sub> = 0.5 付近まで大腸菌を増菌し、0.1 mM の IPTG を加えて G-CSFa1 については、37°Cにて、G-CSFb1 については 25°Cにて組換えタンパク質の発現

を誘導した。G-CSFa1 については4時間後に、G-CSFb1 については8時間後に大腸菌を回収し、50 mL 遠心管に移し、遠心後 (4°C, 4000×g, 15 分)、上清を完全に除き、ペレットを-20°Cで一晩保存した。冷凍庫に保存した大腸菌を氷上で融解し、ペレットの湿重量1 gに対し10 mL の lysis buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 50 mM imidazol, pH 7.4, 0.1% Triton-X and protease inhibitor cocktail) にて溶解し、超音波破碎した。続いて、破碎した大腸菌を遠心分離 (4°C, 9600×g, 30 分) し、上清に可溶性タンパク質、沈査に不溶性タンパク質が含まれているため、上清を 0.45 μm 孔径フィルターに通し、凝塊物を除いた。続いて、0.5 mL の Ni-NTA agarose を 1.5 mL チューブにとり、1 mL の wash buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 10 mM imidazol, pH 7.4) を加えて遠心洗浄 (800×g, 1 分) を2回行い、上清を除いた。洗浄後の Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose を清澄化した大腸菌溶液 (可溶性画分) に加え、4°Cで1~2時間混和後、空のカラム (Poly-Prep Chromatography Columns, Bio-Rad Laboratories)に装填した。その後、樹脂をカラム中で30 mL の Wash buffer にて洗浄した。続いて Elution buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 500 mM imidazol, pH 7.4) を用いて樹脂に結合した His-tag 融合組換えタンパク質を溶出した。組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 はさらにゲルろ過クロマトグラフィーにより精製および分子量測定を行った。すなわち、ゲルろ過バッファー (50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4) を用いて Sephacryl S-100 gel filtration column (HR 16/60) (GE Healthcare) にて分子量を測定し、G-CSFa1 および G-CSFb1 についてそれぞれ一次構造から予測される分子量 25,000 および分子量 22,000 の単量体タンパク質を精製した。なお、溶出液量とタンパク質分子量の関係性を示す検量線を作成する為の標準タンパク質には conalbumin (MW; 75,000)、ovalbumin (MW;44,000)、carbonic anhydrase (MW; 29,000)および ribonuclease A (MW; 13,700)を用いた。精

製した組換えタンパク質は LPS 除去カラム(Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, 0.5 mL, Thermo Fisher scientific) を用いてマニュアルに従い、大腸菌由来の残留 LPS を除去した後、0.1% bovine serum albumin (BSA)を含む PBS を等量混ぜ、0.22 µm のメンブレンフィルター (Millex -GV, Millipore) にて濾過滅菌し、使用時まで-80°Cまたは 4°Cにて保存した。また、タンパク質の濃度は Bradford 法 (Pierce Coomassie Bradford Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) にて定量した。

組換えコイエリスロポエチン (EPO)、Kit ligand A (KITLA)、トロンボポエチン (TPO) は腎臓白血球に対して増殖活性を有することが明らかになっている。そのため、これらを各実験の対照に用いた。これらの組換えタンパク質については先行研究を参照して、作製および精製した (Katakura et al., 2018; Katakura et al., 2015)。

#### 2.2.8. MTT 試験を用いた組換えコイ G-CSF による腎臓白血球に対する増殖活性の検討

4 個体から分離したコイの頭腎および体腎の造血細胞を、E-RDF20/2.5 培地で  $4-8 \times 10^5$  cells/mL の濃度に調整した。この細胞懸濁液を 96 ウェルプレートの各ウェルに 50 µL ずつ加え、そこに E-RDF20/2.5 培地の処理液を 50 µL ずつ加えた。処理液は、E-RDF 培地 (ネガティブコントロール)、コイ腎白血球培養液由来の 25%細胞調整液 (CCM) (ポジティブコントロール; Katakura et al, 2010)、組換え TPO と KITLA の組み合わせ (ポジティブコントロール, 各終濃度 100 ng/mL)、組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 (各終濃度 500, 100, 20, 4, 0.8, 0.16 ng/mL)、熱不活化 (98°C, 30 分) した組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 を用いた。各条件における細胞増殖を定量化するため、MTT アッセイ (Nacalai Tesque)を用いた。すな

わち、10  $\mu$ L の MTT 試薬を各ウェルに加え、プレートを 30  $^{\circ}$ C で 5 時間インキュベートして、生細胞数に応じた発色反応を生じさせた。その後、0 日目、3 日目、6 日目、9 日目に Multiskan GO マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて 570 nm の吸光度と 650 nm の吸光度を測定することで、細胞増殖を定量化した。各ウェルの吸光度については、650 nm の吸光度で得られた値から 570 nm の吸光度を差し引いた値により求めた。

#### 2.2.9. 組換えコイ G-CSF で刺激した腎臓白血球の遺伝子発現解析

分離したコイ腎臓白血球を、0.5 mL の E-RDF20/2.5 で 24 ウェルプレートに  $4 \times 10^5$  cells/mL の濃度で播種した。細胞は、培地 (無刺激コントロール)、組換え G-CSFa1 (終濃度 100 ng/mL)、G-CSFb1 (終濃度 100 ng/mL)、組換え G-CSFa1 と G-CSFb1 を両方添加したものの組み合わせのいずれかで、30  $^{\circ}$ C で 12 時間および 4 日間処理した。培養後、細胞を回収し、NucleoSpin RNA キット (Macherey-Nagel) を用いて total RNA を単離し、メーカーの指示に従って Omniscript RT キット (QIAGEN) を用いて cDNA に逆転写した。コイの造血関連転写因子 (*gata2*, *pu.1*, *cebpa*, *irf8*, *gata1*) (Dahl et al., 2003; Katzenback et al., 2016; Kurotaki et al., 2014; Ma et al., 2014; Rhodes et al., 2005; Tsai and Orkin, 1997) および骨髄球系マーカー (*gcsfr1*, *gcsfr2*, *csflr*, *mpx*) (Katzenback and Belosevic, 2009; Katzenback et al., 2016) について、Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara) を用いたリアルタイム PCR にて調べた。内因性コントロールは  *$\beta$ -actin* を採用した。定量 PCR のサイクリング条件は、95  $^{\circ}$ C で 30 秒の後、95  $^{\circ}$ C で 5 秒、60  $^{\circ}$ C で 30 秒のサイクルを 40 回行った。データは Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェア (Takara) を用いて解析し、4 個体 (n=4) の平均値と標準偏差で表した。

同様に、コイの腎臓好中球について、培地のみ、組換え G-CSFa1 もしくは G-

CSFb1(それぞれ終濃度 100 ng/mL)で、それぞれ 30°Cで 6 時間処理し、RNA を単離し、上述のように cDNA を合成した。qPCR は、コイケモカイン受容体 (*cxcr1*, *cxcr2*, *cxcr4*) (Fujiki et al., 1999; van der Aa et al., 2010) および NADPH オキシダーゼ構成成分 (*gp91<sup>phox</sup>*, *p22<sup>phox</sup>*, *p40<sup>phox</sup>*, *p67<sup>phox</sup>* and *p47<sup>phox</sup>*)(Mayumi et al., 2008) について実施した。また、内因性コントロールとして  *$\beta$ -actin* を用いた。定量 PCR のサイクル条件は、95°Cで 30 秒の後、95°Cで 5 秒、60°Cで 30 秒を 40 サイクル行った。データは Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェア (Takara) を用いて解析し、3 個体 (n=3) の平均値と標準偏差で表した。

#### 2.2.10. メチルセルロース培地ストックの作製

4g の methylcellulose powder (4,000 cps, Sigma-Aldrich)を 100 mL の超純水で混和し、混和液についてオートクレーブ滅菌を行った。その後、室温に達するまで冷却、等量の 2 倍濃縮 E-RDF 培地を混和した。続いて不溶物を完全に溶解させるため、混合液 (2% methylcellulose 含有 1×E-RDF 培地) を 4°Cにて 1 昼夜以上攪拌した。作製したメチルセルロース・ストック培地は 4°Cにて保存し 1~2 ヶ月以内に使用、あるいは使用時まで-20°Cで保存した。

#### 2.2.11. 組換えコイ G-CSF による腎臓白血球に対するコロニーアッセイ

コイの腎臓、脾臓または末梢血から分離した白血球を、40%FBS および 5%コイ血清を含む E-RDF 培地で  $2 \times 10^5$  cells/mL に再懸濁した。コロニーアッセイはメチルセルロースと軟寒天の 2 層培養法および軟寒天による単層培養を用いた。二層培養については先ず、下層の軟寒天層を 35 mm ディッシュに形成させた。すなわち、滅菌済みの 1.2% soft agar (SeaPlaque agar, Takara) 溶液と 2 倍濃縮 E-RDF 培地をそれぞれ 40°Cで保温し、その後両者を混和し、同じ温度で保



温した。次に、この 0.6%軟寒天 E-RDF 培地、FBS およびコイ血清(1/2×ストック) それぞれ 0.75 mL、0.2 mL および 0.05 mL をディッシュ上で混和し、固化するまで冷ました。上記軟寒天層の上に、腎臓白血球をメチルセルロース培地と混和して播種した。すなわち、腎臓白血球浮遊液および 2%メチルセルロース E-RDF ストック液を等量ずつ混和し、さらに組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 あるいはその両方 (各終濃度 100 ng/mL)を混和し、1 mL の混和液を軟寒天層の上に注いだ。それぞれのシャーレは、30°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 7~13 日培養した。軟寒天による単層培養については、滅菌済みの 1.2% soft agar と 2 倍濃縮 E-RDF 培地をそれぞれ 40°Cで保温し、その後両者を混和し、同じ温度で保温した。次に、この 0.6%軟寒天 E-RDF 培地、FBS、コイ血清 (1/2×ストック)、コイ腎臓白血球浮遊液をそれぞれ 0.5 mL、0.2 mL、0.05 mL および 0.25 mL を混和し、ディッシュ上に播種した。二層培養において形成されたコロニーはピペットで回収を行い性状解析に用いた。単層培養で形成されたコロニーについては顕微鏡下で観察し、その形態および数を調べた。各臓器の前駆細胞の数は、以下に示す式に従って推定した。

前駆細胞数=(各臓器の白血球総数)×(プレート 1 枚あたりのコロニー形成数)/(プレーティングした白血球数)

#### 2.2.12. コロニー細胞の性状解析

コロニー細胞の形態観察を行うために、それぞれのコロニーを顕微鏡下で観察しながら細胞を回収し、MEM 培地に再浮遊させ、遠心洗浄後 (400×g, 5 分)、サイトスピンを用いて 1,000 rpm で 5 分間遠心して塗沫標本作製した。その後、May-Gruenwald Giemsa (MGG) 染色またはペルオキシダーゼ染色を行い、顕微鏡にて観察した。さらにコロニー細胞の性状を明らかにするため、各種血球マーカー

一遺伝子の発現を RT-PCR 法にて定量した。すなわち、各形態のコロニーを顕微鏡下で回収し、MEM に懸濁して遠心洗浄を行った。回収した細胞より RNeasy plus Micro Kit (QIAGEN) を使用して total RNA を抽出し、Omniscript RT Kit を用い、添付の説明書に従って cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、各遺伝子のプライマーを使用して PCR を行った。PCR には、EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara) を用い、98 °C で 10 秒、58 °C で 10 秒および 72 °C で 30 秒を 23 ~ 38 サイクルの反応条件で行った。

好中球系列マーカーに対するネガティブコントロールとして、腎臓白血球を組換えコイエリスロポエチン (EPO) で刺激し、形成されたコロニー細胞から合成した cDNA を用いた。

#### 2.2.13. 組換えコイ G-CSF による腎臓好中球に対する遊走活性試験

組換え G-CSF による腎臓好中球に対する遊走活性を Boyden Chamber 法により測定した。陰性コントロールとして MEM 培地のみ、陽性コントロールとして fMLF (10 ng/mL, Sigma) を入れた MEM 培地、試験群として組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 (それぞれ終濃度 250 ng/mL、25 ng/mL および 2.5 ng/mL) を入れた MEM を作製し、200  $\mu$ L ずつチャンバー (Blind Well Chamber, Neuro Probe Inc.) の下室に入れ、フィルター (Polycarbonate Filter、孔径 5  $\mu$ m、直径 13 mm、Neuro Probe, Inc.) を光沢面が下になるように設置した。続いて MEM 中で  $1 \times 10^6$  cells/mL に調整した好中球を 200  $\mu$ L 入れ、25 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、上室の好中球浮遊液を取り除き、フィルターを取り出した。好中球浮遊液側の面に付着した細胞をチャンバーの縁で擦り取り、遊走因子側の面が上になるようスライドガラスに貼り付けた。スライドに貼り付けたフィルターをメタノールで固定した後、MGG 染色を行った。顕微鏡下で

染色したフィルターを観察し、400 倍でランダムに 40 視野の好中球数をカウントした。なお、濃度勾配に因らない試験因子存在下における好中球の運動性の活性化 (chemokinesis) の有無を測定するため、下室に組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 (各終濃度 250 ng/mL) を、上室に同種同濃度の組換え G-CSF および好中球を入れ、同様の方法で測定した。

#### 2.2.14. 組換えコイ G-CSF による腎臓好中球に対する呼吸バースト試験

活性酸素産生能の測定は、PMA 刺激で惹起される呼吸バーストにより生じる、好中球細胞内の dihydrorhodamine 123 (DHR123, Molecular probe) 酸化反応をフローサイトメーターで検出することにより行った。すなわち、コイの腎臓より分離した好中球を E-RDF20/2.5 培地に懸濁し  $2.5 \times 10^6$  cells/mL の浮遊液を得た。それから好中球を 1.5 mL エッペンチューブに 400  $\mu$ L ずつ分注し、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 (各終濃度 100 ng/mL) 存在下、25  $^{\circ}$ C で 6 時間刺激を行った。刺激後、それぞれの試験群の好中球に対し、DHR123 を 1  $\mu$ L ずつ (終濃度 10  $\mu$ M) 加え 5 分間静置し、続いて 500 ng/mL の PMA (Sigma-Aldrich) 含ハanks液を 100  $\mu$ L ずつ (終濃度 100 ng/mL) 加え 30 分間静置した。それらを FACS Canto にてフローサイトメトリー (FCM) 解析を行った。前方散乱 (FSC) 対側方散乱 (SSC) のドット・プロット上で好中球分画の細胞を FITC ヒストグラムに展開することで、腎臓好中球における DHR 平均蛍光強度を測定した。得られた実測値より、G-CSF 無処理群の好中球における活性酸素産生能を 1 としたときの各試験群における活性酸素産生能をサンプルごとに算出した。

#### 2.2.15. 組換えコイ G-CSF のコイ生体に対する作用の検討

コイは G-CSF パラログ投与の 2 日以上前に、ヘパリン処理した注射器を用いて

尾静脈から 200  $\mu$ L の採血を行い、キャピラリーガラス管で 400 $\times$ g、5 分間遠心分離した。赤血球層上の白血球を得て、赤血球溶解バッファーで処理し、ハンクス液で 2 回洗浄した後、フローサイトメトリー分析により、FSC 対 SSC のパラメータに基づいて、白血球総数に対する好中球の比率を測定した。その後、コイの体重 1 g あたり 100 ng 組換え G-CSF/コイの体重 1g/200  $\mu$ L 1 $\times$ PBS を腹腔内に注射(i.p.)した。また、ネガティブコントロールには、1 $\times$ PBS のみを投与した群を用いた。投与後 6 時間、24 時間、48 時間後に 200  $\mu$ L の末梢血を採取し、組換え G-CSFa1、G-CSFb1、PBS 投与群の 3 群について、各 3 個体の末梢血に含まれる好中球の比率を調べた。

#### 2.2.16. 統計解析

統計解析は、Prism 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。解析法はそれぞれ un-paired Student's *t*-test (Fig. 2-7)、one-to-one comparisons and a (repeated-measures) one-way analysis of variance (ANOVA) と Dunnet's *post-hoc* test の組み合わせ (Fig.2-8, Fig. 2-9, Fig.2-11, Fig. 2-12, Fig2-14, Fig. 2-18, Fig. 2-19)、two-way ANOVA と Tukey's *post-hoc* test の組み合わせ (Fig. 2-20, Fig. 2-21) を行い、P 値 0.05 以下の値を有意と認めた。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 同定されたコイ G-CSF 遺伝子の *in silico* 解析

コイは、2種類の G-CSF パラログを有しているゼブラフィッシュより WGD を一回多く経験しているため、4種類のパラログを有することが予想された。NCBI の carp genome and transcriptome databases (project no.PRJEB7241 and PRJNA73579) を参照すると、*psmd3*, *med24* もしくは *lrrc3* の隣に 4つの G-CSF パラログ遺伝子が検出された (Fig. 2-1)。また、これら G-CSF パラログにおける遺伝子の並び (シンテニー) は、第 12 染色体のゼブラフィッシュ G-CSFa 遺伝子または第 19 染色体の GCSFb 遺伝子と比較しても、高度に保存されていることが明らかとなった。

続いて、PCR 法により、各パラログに特異的なプライマーを用いて 4つのコイ G-CSF の cDNA 転写産物を増幅し、シーケンス解析および推定アミノ酸配列の解析を行った。その結果、G-CSF パラログのオープンリーディングフレーム (672、675、588、582bp) は、それぞれ 224、225、196、194 個のアミノ酸をコードし、5つのエクソンを有していた (Fig. 2-2 and 2-3)。また、コイの G-CSF パラログは、アミノ酸配列の相同性や類似性が非常に低いにもかかわらず (Table. 2-4)、5つの  $\alpha$ -helix から成る類似の予測構造を共有していた。一方、そのうちの 1つである G-CSFa1 は、酸性アミノ酸残基 (Asp および Glu) が豊富な Ser160 から Ser164 までの  $\alpha$ -helix 領域を 1カ所多く有すると予測された (Fig. 2-2 and 2-4)。また、SMART によるモチーフ解析では、コイの G-CSF パラログはいずれも IL-6/G-CSF/MGF タンパク質ファミリーの共通ドメインを有すると予想された。しかしながら、共通ドメインの大きな特徴である、2つのジスルフィド結合を形成する 4つのシステイン残基は保存されていなかった。また、コイの G-CSF パラ

ログは、ヒト G-CSF においてリガンドと受容体の結合に関与するとされる酸性アミノ酸残基を保存していたが、コイ G-CSFa2 では  $\alpha$ -helix E 付近にそのような酸性アミノ酸残基は存在しなかった (Fig. 2-2)。

系統解析の結果では、すべての G-CSF が、進化の過程上、関連性が高いとされる IL-6 と異なるクラスターを形成していることが判明した。また、4 種のコイのパラログは、それぞれ真骨魚類の A グループ G-CSF (*g-csfal*, *g-csfa2*)、もしくは、B グループ (*g-csfb1*, *g-csfb2*) に 2 つずつ分類された (Fig. 2-5)。そこで、系統解析とシンテニー解析の結果に基づいて、4 つのコイ G-CSF パラログを G-CSFa1, G-CSFa2, G-CSFb1, G-CSFb2 と命名した。

### 2.3.2. 各組織および免疫細胞集団における G-CSF 遺伝子の発現様式

健康なコイの各組織における G-CSF パラログの遺伝子発現解析を行ったところ、*g-csfal* の遺伝子発現はコイの筋肉で最も高く、次いで脾臓、心臓、鰓であった (Fig.2-6)。また、*g-csfa2* は、脾臓で発現量が多く、エラ、脳、胸腺、腎臓では発現量が少なかった (Fig.2-6)。一方、*g-csfb1* および *g-csfb2* の遺伝子発現は、ほとんどのコイの組織で、発現量が低い、もしくは、検出限界以下であった (Fig.2-6)。

各免疫細胞集団における発現レベルを調べたところ、全ての免疫細胞 (B 細胞、好中球、マクロファージ、胸腺細胞、栓球) において、A グループ G-CSF (*g-csfal*, *g-csfa2*) の発現が B グループ (*g-csfb1*, *g-csfb2*) の発現よりも著しく高かった (Fig. 2-7)。また、全てのコイ G-CSF パラログ遺伝子は、他の細胞における発現量と比較し、マクロファージにおいて発現が高かった。さらに、マクロファージにおいて、A グループでは *g-csfa2* よりも *g-csfal* が、B グループにおいて *g-csfb2* よりも *g-csfb1* の発現量が高かった。この結果について、統計解析を行った

結果、P 値が 0.05 以下であり ( $P \leq 0.05$ )、有意な差が認められた (Fig. 2-7)。

### 2.3.3. 刺激時の腎臓白血球およびマクロファージにおける G-CSF の遺伝子発現

腎臓白血球とマクロファージを各種刺激剤 (LPS、ConA、PMA、poly I:C) で処理後、G-CSF パラログの遺伝子発現量を検討した。腎臓白血球においては、LPS および ConA/PMA の組み合わせによる 3 時間および 6 時間の刺激後に、全てのパラログで発現上昇が認められたが、Poly I:C による刺激後には発現の上昇は認められなかった (Fig. 2-8)。同様に、マクロファージにおいても、4 つのパラログの遺伝子発現は、LPS および PMA の刺激によって明らかに亢進した (Fig. 2-9)。また、A グループの G-CSF (*g-csfa1*, *g-csfa2*) は 5~6 倍程度の発現上昇が認められたが、B グループの G-CSF (*g-csfb1*, *g-csfb2*) では 500 倍以上もの発現上昇を示した。また、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  のマクロファージにおける発現も、LPS 刺激後に有意に上昇していた (Fig. 2-9)。

### 2.3.4. 大腸菌発現系による組換えコイ G-CSFa1 および G-CSFb1 の作製

コイ G-CSF の機能解析を行うため、A グループより G-CSFa1 を、B グループより G-CSFb1 の組換えタンパク質を作製した。大腸菌 Rosetta-gami B (DE3) pLysS 株に発現させた組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 を Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーにて精製し、SDS-PAGE を行った結果、G-CSFa1 および G-CSFb1 はそれぞれ、予想分子量サイズである 25 kDa および 22 kDa 付近にバンドが確認された (Fig. 2-10A)。さらに、G-CSFa1 および G-CSFb1 についてゲルろ過クロマトグラフィー精製を行ったところ、それぞれの分子量は、25,275 および 22,355 と算出された (Fig. 2-10B)。また、これら精製タンパク質について還元状態で SDS-PAGE を行ったところ、先に示したように、それぞれ約 25 kDa および 22

kDa の付近にバンドが確認された。

および

### 2.3.5. 組換えコイ G-CSF による腎臓白血球に対する増殖活性

コイの腎臓はリンパ組織と共に造血組織を有している(Kobayashi et al., 2016)。コイの腎臓白血球に含まれる腎臓造血細胞に対する、コイ G-CSF の造血活性を調べるため、組換えコイ G-CSF 存在下で培養を行った。コイの腎臓白血球を組換え G-CSFa1 もしくは、G-CSFb1 存在下 (各終濃度 0.16, 0.8, 4, 20, 100, 500 ng/mL) で培養すると、組換えコイ G-CSF は共に 20 ng/mL 以上の濃度で、用量依存的な増殖反応が見られた (Fig. 2-11)。一方、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 を加熱 (98°C、30 分)により不活性化したところ、増殖促進効果は失われた (Fig. 2-12)。また、陽性対照の CCM もしくは組換え TPO+KITLA 存在下における培養でもコイ腎臓白血球の細胞増殖が認められた (Fig. 2-11 and 2-12)。

培養 8 日目の増殖細胞について顕微鏡下で観察を行ったところ、組換え G-CSFa1 で処理した細胞は、増殖した細胞の多くが培養に用いたプレート上に接着して増殖し細胞集塊も認められた。一方、組換え G-CSFb1 で処理した細胞は接着性が低く、散在していた (Fig. 2-13A)。それらの細胞についてサイトスピン塗抹標本を作製し、形態学的観察を行ったところ、組換え G-CSFa1 存在下で 8 日間培養した細胞の大部分は、好塩基性の細胞質とクロマチン構造が緩い核を有する、芽球様の細胞であった (Fig. 2-13B)。一方、組換え G-CSFb1 で 8 日間処理した細胞は、細胞質内に顆粒が存在する好中球様の細胞が認められた (Fig. 2-13B)。

### 2.3.6. 組換えコイ G-CSF 刺激を行った腎臓白血球の遺伝子発現

G-CSFa1 と G-CSFb1 の役割を明らかにするために、組換え G-CSFa1 単独、組



換え G-CSFb1 単独、もしくは組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 の共存在下で 12 時間刺激した細胞において、骨髄球造血 (*pu.1*, *cebpa*, *irf8*)、初期造血 (*gata2*)、赤血球造血 (*gatal*)、リンパ球造血 (*gata3*, *pax5*) に関与する転写因子について、遺伝子発現解析を行った。リアルタイム PCR による定量解析の結果、組換え G-CSFa1 で刺激した腎臓白血球では、転写因子の発現レベルに変化は見られなかったが、組換え G-CSFb1 で刺激した腎臓白血球は、無刺激の細胞と比較して、*cebpa* の発現レベルが有意に上昇していた (Fig. 2-14A)。また、他の転写因子については有意な変化を示さなかった (data not shown)。組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 共存在下で処理した細胞についても、メディウムコントロールと比較し、*cebpa* における発現レベルの有意な上昇が認められた (Fig. 2-14A)。続いて、G-CSFa1 と G-CSFb1 が、コイの骨髄球系細胞の造血に関与するサイトカイン受容体および好中球特異的ミエロペルオキシダーゼの発現を調節するかどうかを検討した。上記と同様の処理を 4 日間行った細胞における、*csflr*, *gcsfr1*, *gcsfr2*, *mpx* の mRNA レベルを定量的 PCR で解析した。その結果、マクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 受容体遺伝子である *csflr* の腎臓白血球における発現は、組換えコイ G-CSF で刺激した細胞と無刺激の細胞を比較しても発現量の変化は認められなかった (Fig. 2-14B)。腎臓の白血球における *gcsfr1* と *mpx* の発現は、組換え G-CSFb1 単独、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 共存在下における刺激により、メディウムコントロールと比較して、*gcsfr1* において約 2 倍、*mpx* では約 3 倍上昇したが、組換え G-CSFa1 単独存在下では上昇しなかった。一方、腎臓白血球における *gcsfr2* の発現は、組換え G-CSFa1 刺激では、メディウムコントロールと比較し、約 3 倍上昇したが、組換え G-CSFb1 刺激では 2 分の 1 程度に低下する傾向を示した (Fig. 2-14B)。

### 2.3.7. コイ G-CSF 刺激によるコロニー形成

哺乳類において、各種の成熟血球はそれぞれの系列の前駆細胞から分化するとされており、魚類においても、コロニー形成培養法により、造血前駆細胞の存在が明らかになっている (Katakura et al., 2015)。組換えコイ G-CSF により増殖した細胞の由来および血球系列を明らかにするため、コロニー形成培養を行った。その結果、組換え G-CSFa1 存在下においてコロニー形成はほとんど認められなかったが (Fig. 2-15A)、組換え G-CSFb1 存在下では培養 3 日目に球形で均一な細胞から構成される Type1 コロニー (Fig. 2-15B) が形成され、それらのコロニー数は培養 7 日目に約 20 個/ディッシュ形成され、コロニー数は最大となった。その後それらのコロニーは徐々に消失し、培養日数 11 日目ではコロニーはほとんど認められなかった (Fig. 2-15A)。さらに、組換え G-CSFa1 と G-CSFb1 の組み合わせで培養した結果、Type1 コロニーに加えて、培養 5 日目より大小不同の不均一な細胞からなる Type2 コロニー (Fig. 2-15B) が形成され、培養日数 11 日目において、コロニー数が最大となり、約 20 個/ディッシュ認められた。それらのコロニーは培養日数 15 日を経過した後もコロニーが観察された (Fig. 2-15A)。

### 2.3.8. コイ G-CSF により形成されたコロニーの性状解析

コロニーの特徴を明らかにするため、コロニーを回収し、サイトスピン塗抹標本の観察および各血球系列におけるマーカー遺伝子の発現解析を行った。サイトスピン塗抹標本では、いずれのコロニーも MGG 染色像において幼若な細胞から成熟した好中球様の細胞が認められ、ペルオキシダーゼ染色で弱～強陽性に染まる様々な分化段階の好中球様細胞より構成されていた (Fig. 2-16)。

遺伝子発現解析の結果、Type 1 のコロニーは、好中球の発生に関与する *g-csfr*、*cebpa*、*mpx* を高発現し、単球・マクロファージ系のマーカーである *csflr* をわず

かに発現したが、その他の遺伝子は発現しなかった。一方、組換え G-CSFa1 と G-CSFb1 の組み合わせで処理した Type 2 のコロニーは、好中球マーカー遺伝子だけでなく、*csf1r* や *irf8* も高発現していた (Fig. 2-17)。

### 2.3.9. 各臓器におけるコイ好中球前駆細胞の分布

コイの好中球前駆細胞の生体内における分布を明らかにするために、コロニー形成培養を行った。すなわち、白血球を頭腎、体腎、脾臓および末梢血から採取し、約  $1 \times 10^5$  cells の細胞について、メチルセルロース/アガロース培地上で、無刺激、もしくは組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 共存在下 (各終濃度 100 ng/mL) または非存在下で培養し、培養 6~11 日後にコロニーカウントを行った。各条件におけるコロニー数を計測した結果、末梢血由来 PBL と脾臓白血球は、サイトカインの添加の有無にかかわらず、コロニーを形成しなかった。一方、頭腎と体腎の細胞は、組換え G-CSFa1 と G-CSFb1 の両方の存在下で、Type 1 と Type 2 のそれぞれ約 25~40 個のコロニーを形成した。各臓器における CFU-G および CFU-GM の総数は Table. 5 のように推定した。

### 2.3.10. コイ G-CSF の腎臓好中球に対する遊走活性

造血部位において好中球が発生した後、好中球の速やかな感染局所への遊走は、効率的な炎症反応に不可欠である。本実験では、コイ腎臓好中球に対する組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 の遊走活性について、ボイデンチャンバー法を用いて調べた。これまでの報告 (Katzenback and Belosevic, 2009) と同様に、ボイデンチャンバーの上層に播種された好中球は fMLF が存在する下部チャンバーに向かって移動したため (Fig. 2-18)、fMLF を本実験のポジティブコントロールとした。実験の結果、100 ng/mL 以上の組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 の存在下

では、腎臓の好中球は下部チャンバーに向かって移動した (Fig. 2-18)。濃度依存的な遊走活性の有無を明らかにするため、Chemokinesis コントロールとして、組換え G-CSFa1 もしくは G-CSFb1 を上段と下段の両方のチャンバーに入れた場合、好中球の移動は培地コントロールと同様であった。このことから、好中球の移動はサイトカインの濃度勾配に依存することが示された (Fig. 2-18)。

G-CSFa1 および G-CSFb1 によるケモカイン受容体の遺伝子発現調節機構を明らかにするため、腎臓の好中球を培地、組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 で 6 時間処理した。真骨魚類の CXCR1 および CXCR2 は、IL-8 の受容体として知られており、感染および傷害の部位への好中球の遊走に重要であることがゼブラフィッシュにおいて報告されている (Blaser et al., 2017; Powell et al., 2017)。組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 で処理した好中球における *cxcr1* 発現レベルは、培地対照と比較してそれぞれ、2 倍または 3 倍程度上昇していた。特に、統計解析により、G-CSFb1 の発現上昇は有意な ( $P \leq 0.05$ ) 発現上昇である事が示された。このことから、G-CSFa1 および G-CSFb1 が好中球における IL-8 などのケモカインに対する感受性を高めることが示された (Fig. 2-19A)。組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 で処理した好中球における *cxcr2* の mRNA レベルは、培地対照と比較して変化しなかった (Fig. 2-19A)。哺乳類において、造血幹細胞の末梢への遊走等に関連する CXCL12 の受容体である *cxcr4* の mRNA レベルについても、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 の処理では変化しなかった (Fig. 2-19A)。

### 2.3.11. コイ G-CSF の腎臓好中球に対する活性酸素産生刺激

好中球の殺菌活性において重要な活性酸素の産生には、NADPH オキシダーゼが触媒となってスーパーオキシドアニオンを形成する、呼吸バーストが重要である (Babior et al., 1973; Hampton et al., 1998)。魚類の NADPH オキシダーゼは、

哺乳類の NADPH オキシダーゼと類似した活性化様式と機能的活性を有することが示されている (Mayumi et al., 2008; Olavarría et al., 2010)。NADPH オキシダーゼが組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 処理によって誘導されるかどうかを評価するために、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 で 6 時間処理した好中球における NADPH オキシダーゼ構成成分 (*gp91<sup>phox</sup>*、*p22<sup>phox</sup>*、*p47<sup>phox</sup>*、*p67<sup>phox</sup>* および *p40<sup>phox</sup>*) の mRNA レベルを測定した。定量 PCR の結果、組換え G-CSFa1 で処理した好中球の *p47<sup>phox</sup>* の mRNA レベルは、培地対照と比較して約 1.5 倍上昇した。また、組換え G-CSFb1 で処理した好中球の *p47<sup>phox</sup>* および *p40<sup>phox</sup>* の mRNA レベルは、培地対照と比較して約それぞれ、約 1.8 倍と約 1.3 倍上昇した。これらの結果について統計解析を行ったところ、有意な ( $P \leq 0.05$ ) 発現上昇である事が示された。一方、他の成分の mRNA レベルは有意に変化しなかった (Fig. 2-19B)。

コイ腎臓好中球を組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 で処理することで、PMA 等の刺激物質による活性酸素産生が増強されるプライミングが誘導されるかどうかを調べるために、PMA で刺激した好中球の呼吸バーストを測定した。好中球を培地、組換え G-CSFa1 または G-CSFb1 で 6 時間前処理した後、DHR123 の存在下で PMA を用いて、もしくは、用いずに処理し、フローサイトメトリーで分析した。その結果、無刺激の好中球、組換え G-CSFa1 で前処理した好中球および G-CSFb1 で前処理した好中球をそれぞれ PMA で刺激した際の平均蛍光強度はそれぞれ、約 14000、約 16000、約 18000 であった。これらの結果について統計解析を行ったところ、組換えコイ G-CSF で処理した好中球の蛍光強度は無刺激の細胞と比較して有意に ( $P \leq 0.05$ ) 上昇する事が示された。また、組換え G-CSFb1 で処理した好中球の呼吸バーストの増強は、組換え G-CSFa1 で処理した好中球よりも高かった。この結果について同様の統計解析を行った結果、有意な差 ( $P \leq 0.05$ ) である事が示された (Fig. 2-20)。このことは、*p47<sup>phox</sup>* の増強の

ップレギュレーションの結果と一致する (Fig. 2-19B)。また、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 による好中球の処理は、PMA 刺激なしに呼吸バーストを直接誘導することはなかった (Fig. 2-20)。

### 2.3.12. コイ G-CSF のコイ生体に対する作用

組換えコイ G-CSF の生体に対する作用を明らかにするため、組換えタンパク質を腹腔内に投与した。本実験は、無刺激群、PBS 投与群、組換え G-CSFa1 投与群および組換え G-CSFb1 投与群の 4 群を用意し、試料投与 6 時間後と 24 時間後に末梢白血球を回収後、フローサイトメトリーにより解析を行った。その結果、組換えコイ G-CSF 投与前の末梢白血球中に占める好中球の割合は、各群において、約 1~2%であった。一方、G-CSFa1 投与 6 時間後および 24 時間後における好中球数の割合はそれぞれ、約 17%と約 10%であった。また、G-CSFb1 投与 6 時間後および 24 時間後では、好中球数の割合はそれぞれ、約 29%と約 33%であった。これらの結果について統計解析を行ったところ、投与前と比較し、組換えコイ G-CSF の投与により末梢の好中球の割合が有意に ( $P \leq 0.05$ ) 増加することが明らかになった。さらに、組換えコイ G-CSF の投与 24 時間後には、組換え G-CSFb1 は、組換え G-CSFa1 よりも有意に ( $P \leq 0.05$ ) 高い循環好中球数を誘導した (Fig. 2-21)。一方、試料投与から 48 時間後では、無刺激群や PBS 投与群においても好中球数の増加が認められた (Fig. 2-22)。

## 2.4. 考察

本研究では、コイの4つのG-CSF遺伝子をクローニングし、それらの機能を明らかにした。コイG-CSFパラログの塩基配列およびアミノ酸配列を詳細に解析した結果、哺乳類G-CSFと多くの共通点が認められた。4つのコイG-CSF遺伝子はすべて5つのexonと4つのintronで構成されており、ヒトやマウスのG-CSFや他の真骨魚類のG-CSFに見られる遺伝子構造を保持していた (Santos et al., 2006)。また、コイとヒトのG-CSF分子は、G-CSFa1を除き、5つの $\alpha$ -helix構造を共有していた。さらに、全てのG-CSFパラログ分子は、IL-6/G-CSF/MGFドメインを有していると考えられた。加えて、リガンドと受容体の結合に関与するAspやGluなどの酸性アミノ酸残基の位置についても、哺乳類のG-CSFと類似していた (Aritomi et al., 1999; Cebon et al., 1994)。これらのことから、哺乳類G-CSFとコイG-CSFのアミノ酸配列における相同性は全体的に低いが、全てのコイG-CSFパラログは哺乳類G-CSFと共通の祖先遺伝子から生じた遺伝子、すなわち、オルソログであることが考えられた。一方で、パラログ間においてもいくつかの違いが認められた。系統解析の結果では、コイのG-CSFパラログは、AグループのG-CSF (*g-csfa1*, *g-csfa2*) とBグループのG-CSF (*g-csfb1*, *g-csfb2*) に2つずつ分けられ、予測された立体構造においても違いが存在していた。すなわち、パラログ間においてシステイン残基の保存されている位置が異なり、また、G-CSFa1には酸性残基に富む $\alpha$ -helixが1つ多く存在していた。そこで、各パラログ間の機能の差異を明らかにするため、遺伝子発現解析を行った。その結果、Aグループ (*g-csfa1*, *g-csfa2*) とBグループ (*g-csfb1*, *g-csfb2*) のG-CSFにおいて転写の制御に違いがあることが明らかとなった。すなわち、定量PCRの結果において、Aグループは、特に健常個体における脾臓で発現が高かったのに対し、

Bグループの発現は全ての組織で非常に低いことが明らかとなった。同様に、調べたすべての免疫細胞において、Aグループの発現量はBグループの発現量よりも明らかに高かった。さらに、マクロファージは、哺乳類のG-CSFの主要な細胞源であることが知られているが (Oster et al., 1989)、コイのマクロファージにおいて他の免疫細胞集団と比較し、常にG-CSFパラログの発現が最も高かった。また、マクロファージにおける*g-csfa1*の遺伝子発現レベルは*g-csfa2*よりも高く、マクロファージにおける*g-csfb1*の遺伝子発現レベルは*g-csfb2*よりも高かった。これらの結果から、コイにおいてもマクロファージがG-CSFの産生細胞として機能する可能性が考えられた。

G-CSFa1 および G-CSFb1 の機能をさらに検討するために、Aグループより G-CSFa1 を、Bグループより G-CSFb1 を選定してそれぞれの組換えタンパク質を作製した。本研究で用いた大腸菌発現系は、安価に大量の組換えタンパク質を得ることができるが、タンパク質への糖鎖付加が起きず、また、大腸菌由来の菌体内毒素が混入する可能性がある。しかし、哺乳類のG-CSFに関する以前の研究では、糖鎖付加はその活性発揮に必須でないことが報告されており、実際、非グリコシル化 G-CSF はヒトの好中球減少症の治療薬に利用されている (Bönig et al., 2001)。

組換えコイ G-CSF の腎臓白血球に対する活性の検討を行った結果、哺乳類の G-CSF やゼブラフィッシュの G-CSF (Souza et al., 1986; Stachura et al., 2013) と同様に、コイの G-CSF は用量依存的に腎臓白血球の増殖を誘導した。組換え G-CSFa1 は培養シャーレに接着した芽球様細胞の増殖を誘導し、組換え G-CSFb1 は好中球様細胞の増殖を誘導した。実際、腎臓白血球を組換え G-CSFb1 で刺激すると、好中球の発生に関与する転写因子 *cebpa* のアップレギュレーションが認められている (Ma et al., 2014)。また、2種類のコイ G-CSF 受容体遺伝子 (*g-*



*csfr1, g-csfr2*) を調べたところ、組換え G-CSFb1 のみが *gcsfr1* およびミエロペルオキシダーゼ (*mpx*) 遺伝子の発現を増強することが明らかとなった。これらのデータは、G-CSFb1 と G-CSFR1 がコイの好中球発生において主要な役割を担うことを示唆している。ゼブラフィッシュでは、G-CSFa と G-CSFb の両方が、好中球とマクロファージの両方に発現している G-CSFR に結合し、細胞増殖を促進すると考えられていた (Stachura et al., 2013)。これらの研究結果とは対照的に、本研究では、コイの G-CSFa1 単独ではコロニー形成が認められなかった。これは、本研究で用いている半固形培地を用いた培養において、アガロース層によりマクロファージやストローマ細胞の接着が妨げられ、特に、マクロファージから産生される増殖因子の影響が制限されたためと考えられる (Neumann et al., 1998)。実際に G-CSFa1 がマクロファージ自ら産生する細胞増殖因子と相乗的に細胞増殖を促すかについては、さらなる研究が必要である。一方、コイの組換え G-CSFb1 は単独で Type 1 のコロニー形成を刺激したが、組換え G-CSFa1 と G-CSFb1 の組み合わせでは、Type 1 だけでなく Type 2 のコロニー形成も刺激した。遺伝子発現解析の結果、Type 1 のコロニーは、好中球系マーカーを高発現し、単球・マクロファージ系のマーカーである *csflr* をわずかに発現した。このことから、Type 1 のコロニーは、哺乳類の顆粒球コロニー形成単位 (CFU-G) に相当する前駆細胞に由来することが示唆された。一方、Type 2 のコロニーは、好中球マーカー遺伝子だけでなく、単球・マクロファージ系マーカーも高発現していた。そのため、Type 2 コロニーは、哺乳類の顆粒球・マクロファージコロニー形成単位 (CFU-GM) に相当する前駆細胞に由来することが考えられた。これらの結果から、コイの G-CSFb1 は好中球系列限定的に造血を促進するのに対し、コイの G-CSFa1 は CFU-GM より幼若な造血前駆細胞の増殖を刺激するサイトカインである可能性が示された。また、組換え G-CSFa1 および G-CSFb1 の機能における

違いから、誘導された細胞の応答は組換えタンパク質作製時の大腸菌由来の成分によるものである可能性は極めて低く、サイトカイン特異的であると考えられた。結論として、コイ G-CSF は哺乳類と同様に造血因子として機能していたが、パラログ間において機能の違いが認められた。

哺乳類の G-CSF は好中球に対して遊走活性を有していることが報告されている (Semerad et al., 2002; Wang et al., 1988)。また、ゼブラフィッシュでは、G-CSFa ではなく G-CSFb が、傷害部位への好中球の遊走に関与していると考えられている (Galdames et al., 2014)。本研究により、コイの腎臓好中球に対して G-CSFa1 および G-CSFb1 は共に遊走活性を有するが、G-CSFb1 はより強い活性を有することが明らかとなった。また、G-CSF の遊走活性には、真骨魚類において好中球遊走因子として知られる IL-8 が関与していることも示唆されている (De Oliveira et al., 2015; De Oliveira et al., 2013; van der Aa et al., 2010)。本実験において、コイ腎臓好中球を組換え G-CSFb1 で刺激した結果、好中球の遊走に必要な IL-8 受容体である *cxcr1* の有意な発現上昇が認められた。一方、好中球による炎症の収束に関与し、創傷部位における好中球の分散を誘導する CXCR2 遺伝子の発現上昇は認められなかった (Powell et al., 2017)。また、哺乳類の G-CSF は、造血組織において好中球を保持するのに重要な CXCR4 の転写を誘導するが、コイ G-CSF パラログは、それらの転写を誘導しなかった。結論として、コイ G-CSF パラログの中でも、G-CSFb1 が好中球における遊走に最も重要であると考えられた。

好中球は、炎症性サイトカインのシグナルを受け取ると、「プライミング」され、迅速かつより強力な貪食や活性酸素産生等の抗菌反応を発揮することができるようになる (Hallett and Lloyds, 1995)。腎臓好中球に対して G-CSF パラログによる刺激試験を行った結果、ビーズやザイモサン粒子に対する貪食活性は、どの期間においても有意な変化が認められなかったことから (data not

shown)、魚類では好中球の貪食作用は他のシグナルによって制御されていると考えられた。哺乳類の G-CSF は単独ではナイーブな好中球の呼吸バーストを開始することができないが、好中球のプライミングを誘起し、fMLF や PMA などの刺激後におけるスーパーオキシドアニオンの産生の上昇を促すことが報告されている (Kitagawa et al., 1987; Spiekermann et al., 1997)。魚類では、食細胞を炎症性サイトカインで刺激すると、(i) プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化、(ii) p47<sup>phox</sup> のリン酸化、(iii) NADPH オキシダーゼが触媒する活性酸素の産生、から成る 3 つの連続したステップを経て、活性酸素の産生が活性化されることが報告されている (Olavarria et al., 2010)。本研究において、組換えコイ G-CSF で好中球を刺激し、NADPH オキシダーゼ構成成分の発現解析を行ったところ、特に p47<sup>phox</sup> の発現が上昇していた。このことから、コイ G-CSF の好中球に対するプライミング効果は、p47<sup>phox</sup> 蛋白の発現上昇を介して制御されていることが明らかになった。さらに、呼吸バースト試験の結果より、G-CSFb1 は G-CSFa1 よりも強力に好中球をプライミングすることが示された。以上より、真骨魚類 G-CSF が好中球に対するプライミング作用を有することが明らかになった。

これまでのコイの研究では、死滅した大腸菌やザイモサンを腹腔内投与した場合、6~18 時間後に循環血中の好中球数が増加し、24 時間後には速やかに減少することが示されている。即ち、魚の腹腔内炎症は腎臓由来の好中球を循環血中に一時的に動員することが示されている (Havixbeck et al., 2016; Kodama et al., 2002)。本研究では、組換えコイ G-CSF の腹腔内投与により、投与後 6 時間および 24 時間後に循環血中好中球数が増加したことから、*in vivo* でも G-CSFa1 および G-CSFb1 がケモカインおよび好中球造血因子として働いていることが示唆された。医学領域において、組換え G-CSF は、化学療法や放射線療法により好中

球減少を起こした患者における細菌感染等を防ぐために使用されている (Aapro et al., 2011)。魚類の G-CSF パラログが同様に感染症に対する生体防御賦活剤として作用するかどうかを調べるには、さらなる研究が必要である。また、本研究における G-CSF パラログの機能解析は G-CSFa1 と G-CSFb1 に限られているため、G-CSFa2 と G-CSFb2 が同様の機能を持つ可能性については推測することしかできない。この 4 倍体魚における複雑な免疫制御機構の全体像を明らかにするには、すべてのコイ G-CSF パラログの組換えタンパク質を用いたさらなる研究が必要である。

以上のように、本章では 4 種類のコイ G-CSF パラログを同定し、体内でのこれらの遺伝子発現パターンを調べ、コイの造血細胞や好中球に対する A グループと B グループの G-CSF における機能的な違いを明らかにした。A グループの G-CSF は健常時に比較的高い遺伝子発現を示し、恒常性の維持に関与している可能性が考えられた。一方、B グループの G-CSF は遺伝子発現が低く、マイトジェン刺激等の誘導を必要とするため、健常時には不活性で感染状態に伴う免疫学的な役割を担っていることが示唆された。造血活性に関しては、G-CSFa1 は好中球/マクロファージ共通前駆細胞の増殖を促進し、G-CSFb1 はコイの腎臓における好中球/マクロファージ共通前駆細胞および好中球前駆細胞の増殖、分化、コロニー形成を促進し、哺乳類の G-CSF と同様の作用を示した。更に、G-CSFa1 と G-CSFb1 は、ケモカイン受容体である CXCR1 の発現を調節することで、好中球の走化性因子として作用し、好中球の遊走に G-CSF パラログが関与していることが示唆された。また、G-CSFa1 と G-CSFb1 はともに好中球の生体防御機構を増強させる状態である「プライミング」を誘導した。本研究の成果は、WGD によって生じた重複サイトカインに異なった機能が存在することを示した初めての報告であり、魚類免疫の大きな特徴である、重複分子による免疫制御機構を

解明するための重要な知見になると考えられる。

**Table 2-1. Oligonucleotide primers used for cDNA cloning from carp and construction of expression plasmid vectors.**

Primer name	Primer nucleotide sequences (5'-3')	Application
g-csfa1 F1	CACACTTGTGGGAATTGTGG	Partial sequencing
g-csfa1 R1	TACTGCGGAGGATGTCACAG	Partial sequencing
g-csfa1_3' F1	GCATCTGCCCAATCTCTGACAAAC	3' RACE
g-csfa1_3' F2	GGCTCAGACAGACCAAGTAAAAGACC	3' RACE (nested PCR)
g-csfa1_5' R1	ACATGCAGGTTGACAAGCAA	5' RACE
g-csfa1_5' R2	TCTGATGCCTGCTTTGATGGGTCA	5' RACE (nested PCR)
g-csfa1_full F	ATGGGGACTGCTGCAATCTG	CDS cloning
g-csfa1_full R	CATGTATGCTAGGGTACAATGCTG	CDS cloning
g-csfa2_full F	CATGTTCTTTTTGATTACTGCTGTG	CDS cloning
g-csfa2_full R	AAGGGAGTTCCTAATGTGTAAATTAA	CDS cloning
g-csfb1_3' F1	CGCGCCACGAGTTTAGCCAAGAAG	3' RACE
g-csfb1_3' F2	TCACACAGGACGTCTTCCGCAGTC	3' RACE (nested PCR)
g-csfb1_5' R1	AGACTGCGGAAGACGTCCTGTGTGAA	5' RACE
g-csfb1_5' R2	CGGCCACAATACGGCTTAAACTC	5' RACE (nested PCR)
g-csfb1_full F	CGCAATAACGAGACAGCTCA	CDS cloning
g-csfb1_full R	CACAGGGTACAACATCTGTCAA	CDS cloning
g-csfb2_full F	AGCCTGCTAGAAATCCCTTGA	CDS cloning
g-csfb2_full R	AAATATAGCAGGGACTGGTTGG	CDS cloning
G-CSFa1_ProExp_NdeI_F	CATATGGCCCAATCTCTGA	Construction of an expression plasmid vector
G-CSFa1_ProExp_BamHI_R	GGATCCTCATAGACCTGCTTTA	Construction of an expression plasmid vector
G-CSFb1_ProExp_NdeI_F	CATATGGCGCCGCTCCAG	Construction of an expression plasmid vector
G-CSFb1_ProExp_BamHI_R	GGATCCCTAGTTTGATGCATCA	Construction of an expression plasmid vector

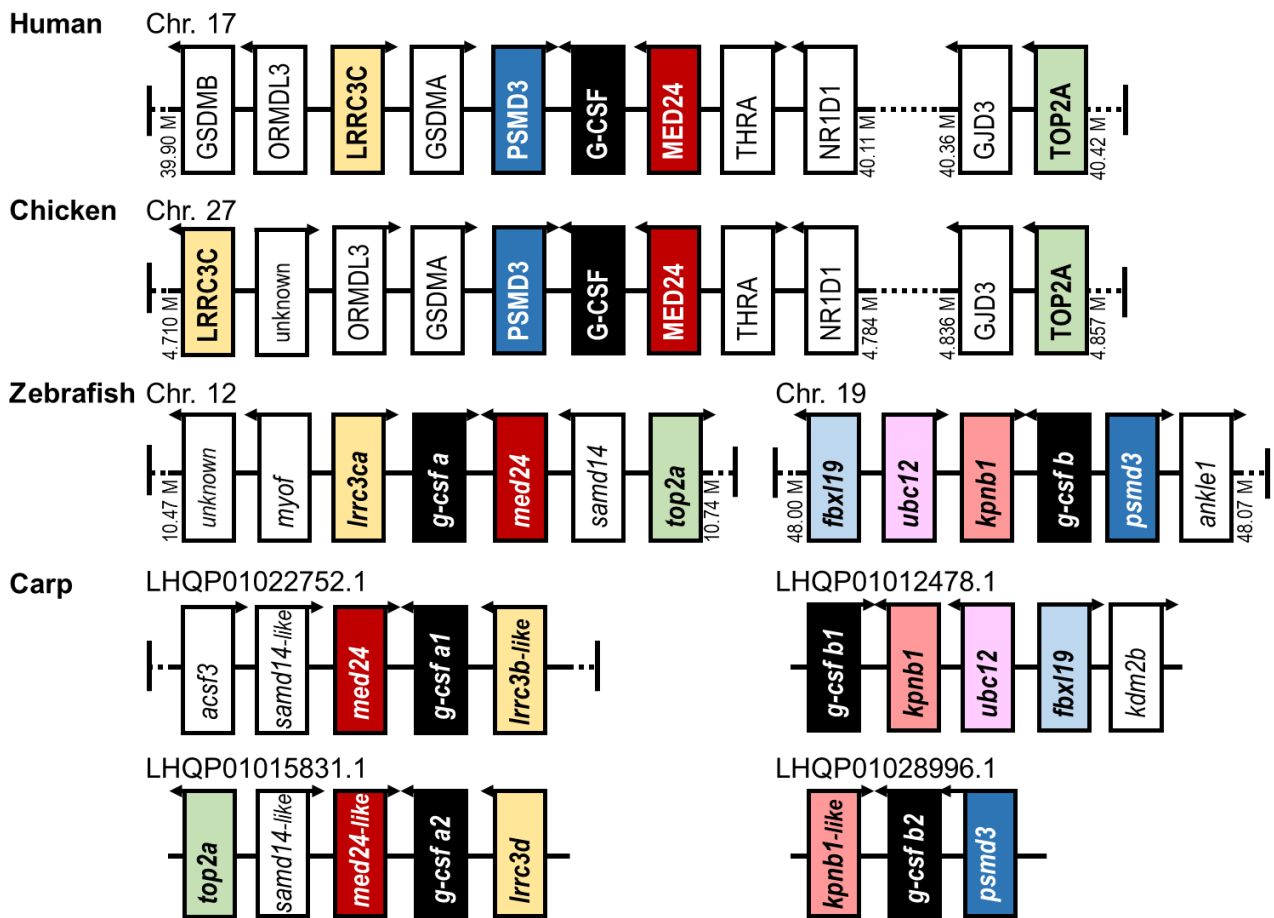
**Table. 2-2 Oligonucleotide primers used for gene expression analysis with quantitative RT-PCR**

Target (Accession No.)	Primer nucleotide sequences (5'-3')	Product length	Marker for
<i>Carp g-csfa1</i> (MG882495)	F ACCCTCTGCCCCAGTTCTTC R TCTGAGCCAGTGTGGTTGC	134 bp	G-CSFa1
<i>Carp g-csfa2</i> (MG882496)	F TGGGCGACAACACGATTAGA R TGAAGTTGCAGTCCCTTCACC	136 bp	G-CSFa2
<i>Carp g-csfb1</i> (MG882497)	F TGAAGTTTTGCCTCATTCTTGC R CAACGTCGCTCAGGATCTTCT	135 bp	G-CSFb1
<i>Carp g-csfb2</i> (MG882498)	F CCACAGAATCCCAGAAAACCA R GGCGTAGACTGCGGAAGACA	135 bp	G-CSFb2
<i>Carp cebpa</i> (MH262559)	F AAGACACCGCTGGAGACCTG R TTGCTTGGAGTTGTTGTGGAA	128 bp	Transcription factor (TF) involved in myelopoiesis
<i>Carp pu.1</i> (XM_019107899)	F ACCGGGCATCACCTCACTCT R CTGCTGGGGTCATCGTCATC	125 bp	TF involved in myelopoiesis
<i>Carp irf8</i> (XM_019088951)	F ACTATGGAGGTCGGCTGGTG R GATGTTCTGGAGGCTGTCTGG	122 bp	TF involved in myelopoiesis
<i>Carp gata2</i> (AB429308)	F CCCATCCCAACCTACCCAAC R TCACACATTCACGCCCTCT	157 bp	TF involved in early hematopoiesis
<i>Carp gata1</i> (AB429307)	F TGAGCCCTTCATCATTCTCC R TCCGCAAGCATTACAGAGGT	146 bp	TF involved in erythropoiesis
<i>Carp gata3</i> (AB429311)	F TATCGACGGACAGAGCAACC R CCATCAAGCCAAGGAAGAGA	132 bp	TF involved in T lymphopoiesis
<i>Carp pax5</i> (AB429310)	F CAGCGTCAGCTCAATCAACA R TACTGCGGATACCTGGGTCA	121 bp	TF involved in B lymphopoiesis
<i>Carp csf1r</i> (AB526448)	F CAGGAAACCGGCCACTACA R CCCATCTCACCATCGCTACA	106 bp	Colony-stimulating factor 1 receptor (monocyte/ macrophage)
<i>Carp gcsfr1</i> (MH262557)	F TGTTTCATACGATGGGTGGAAG R AACACAGGCAAACACAACGA	145 bp	G-CSF receptor 1 (neutrophil)
<i>Carp gcsfr2</i> (MH262558)	F GCTGGGCTCTGTCTCCTGTT R CACTGAGGGATGCTGGTGT	92 bp	G-CSF receptor 2
<i>Carp mpx</i> (AB429306)	F GTGGTTCGTGTCGGTCTCTT R GATGCCTTTTGTGTTGGTGGTG	118 bp	Myeloperoxidase (neutrophil)
<i>Carp cxcr1</i> (AB010468)	F AGACGAATCACGCCGACATA R GACCACCAGAGGGAAGAGGA	80 bp	Interleukin-8 receptor alpha subunit
<i>Carp cxcr2</i> (AB010713)	F GCCATCGTGAAAGCAACC R AGGCACATACCCACACCAAC	82 bp	Interleukin-8 receptor beta subunit
<i>Carp cxcr4</i> (AB012310)	F TGACACGGGCATGAATACGA R ATGTGCTGAAAGCGGAACAC	87 bp	Receptor for CXCL12
<i>Carp gp91<sup>phox</sup></i> (AB290328)	F TCATCAAGTGCCCATCCATC R CCACGGTTTTGTACCTCCA	150 bp	Transmembrane subunit of NADPH oxidase
<i>Carp p22<sup>phox</sup></i> (AB290329)	F TATGCGACTGGTGGGATTGT R CTTTGCCCCGTTTGCTTC	124 bp	Transmembrane subunit of NADPH oxidase
<i>Carp p47<sup>phox</sup></i> (AB290330)	F GTGGGTGGTCAGGAAAGGAG R GGGCGTTGCGTATGGTAGA	146 bp	Cytosolic subunit of NADPH oxidase
<i>Carp p67<sup>phox</sup></i> (AB290331)	F AGGCTCAGTTGGGAAAATGG R TATGGCTGAAC TTGGCGTCT	84 bp	Cytosolic subunit of NADPH oxidase
<i>Carp p40<sup>phox</sup></i> (AB290332)	F CCCCCACACGCAAAGTAAA R CTGCCGCTGAAGTCAAACAC	88 bp	Cytosolic subunit of NADPH oxidase
<i>Carp β-actin</i> (M24113)	F CAAGGCCAACAGGGAAAAGA R AGGCATACAGGGACAGCACA	98 bp	Internal control
<i>Carp 40s</i> (AB012087)	F CCGTGGGTGACATCGTTACA R TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	69 bp	Internal control

**Table 2-3. Oligonucleotide primers used for gene expression analysis with semi-quantitative RT-PCR**

Target (Accession No.)	Primer nucleotide sequences (5'-3')	Product length	Marker for
<i>Carp gcsfr(1/2)</i> (MH262557 / MH262558)	F GTTGTGTTTGCCTGTGTTGG	379 bp	Neutrophil
	R CTGGTGGAGGGGATGAATG		
<i>Carp cebpa</i> (MH262559)	F GCTGGAGACCTGAGCGAGAT	353 bp	Neutrophil
	R GCGTGGTGTGAGAGTGGTG		
<i>Carp mpx/mpo</i> (AB429306)	F ACCACAGTATACCAGGCTATAATGC	270 bp	Neutrophil
	R GGTTCTCAAACCATAACCTGTCC		
<i>Carp csflr/mcsfr</i> (AB526448)	F AACTAAAGCTCGGAAAGACTCTGG	286 bp	Monocyte/ macrophage
	R CGCAGGAAGTTCAGAAGATCAC		
<i>Carp irf8</i> (XM_019088951)	F GTGCCAGAGGAGGAACAGAAG	414 bp	Monocyte/ macrophage
	R GATGTTCTGGAGGCTGTCTGG		
<i>Carp lck</i> (AB429309)	F CGTCGGGTGGCTATCAAGAG	328 bp	T cell
	R TGAGCTCATCGGACACCAA		
<i>Carp IgM heavy chain (ighm)</i> (AB004105)	F TTCTTCCACCACCCAC	353 bp	B cell
	R GCTGCAATCTTGAATAGGAACTG		
<i>Carp gatal</i> (AB429307)	F TTCCAGCTCTGAGACTGACTTACTGC	442 bp	Erythrocyte
	R CCCGTATGGACCCAGCATGT		
<i>Carp <math>\beta</math>-actin</i> (M24113)	F GTACGTTGCCATCCAGGCTGTG	465 bp	Internal control
	R ACGTCACACTTCATGATGGAGTTGAAG		





**Fig. 2-1. Synteny analysis of G-CSF of human, chicken, zebrafish, and carp.**

The G-CSF locations in human, chicken, and zebrafish are obtained from respective genome resources at NCBI and carp G-CSF locations are obtained from carp genome and transcriptome projects PRJEB7241 and PRJNA73579 at NCBI.



**Fig. 2-2. Alignment of vertebrate granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) amino acid sequences.**

Alignment of vertebrate granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) amino acid sequences. Complete protein sequences of carp *Cc* G-CSFa1 (*Cyprinus carpio*, MG882495), carp *Cc* G-CSFa2 (MG882496), zebrafish *Dr* G-CSFa (*Danio rerio*, NP\_001138714), carp *Cc* G-CSFb1 (MG882497), carp *Cc* G-CSFb2 (MG882498), zebrafish *Dr* G-CSFb (NP\_001137226), african clawed frog *Xl* G-CSF (*Xenopus laevis*, Scaffold13265:3008399-3011722), mouse *Mm* G-CSF (*Mus musculus*, NP\_034101), and human *Hs* G-CSF (*Homo sapiens*, NP\_000750) were aligned using Clustal Omega. Signal sequences are shown with gray letters and conserved cysteine residues are boxed. In the human G-CSF, helices (A to E) are denoted with coils, and Glutamic acid (E) and Aspartic acid (D) residues representing major interfaces with G-CSF receptor are highlighted in black. In the carp G-CSFs, predicted alpha helical regions are underlined with a broken line, modeled on the structure of human G-CSF, and residues expected to interact with the receptor are highlighted in gray. Amino acids that are conserved in all sequences are denoted with an asterisk (\*), strong similarity with a colon (:), and weak similarity with a period (.).

# A

ACTGCTGCAATCTGGTGACTTTGGCGATTTTCTTTTTGATCACTGTTGCTATAATGAACTTCCAGGgt..(intron1;341  
M N F Q A  
bp)..agCGGCTCTGTTAGTCCACTTGTGGGAATTGTGGCATCTGCCCAATCTCTGACAACTGGACATTATGAACAAGG  
A L L V T L V G I V A S A P I S D K L D I M N K D  
ATACTATTGAACAGGCCACAGTTTAATCAACAAAATTCTACAAGACATTCTACAACCTATGCAGCCTGGATAAAGAGCAA  
T I E Q A H S L I N K I L Q D I P T T H A A W I K S K  
Ggt..(intron2;769bp)..agAGTCTGACTTTGGGCGACAGCAAGGCTAGGCTGGAGTTGGAGTTCTTGAAGAAAGACA  
S L T L G D S K A R L E L E F L K K D M  
TGTATATACCCCTGCCCCAGTCTTTCAGCTCATTTCCAATAAATTTCAGCATGgt..(intron3;228bp)..agGAAACC  
Y I P S A P V L Q L I S N N F S M E T  
TGCCTTTCAAACATAACGAAGGGACTGCAACTGCATCTCAATCTCTGAAAGAGATCAGCAATGCAACCACACTGGCTCAGA  
C L A N I T K G L Q L H L N L L K E I S N A T T L A Q T  
CAGACCAAGTAAAGACCTTCAAGCTGAAATATATGAACCTTCTGCTCCTAATTGAAGAGgt..(intron4;445bp)..ag  
D Q V K D L Q A E I Y E L L L L I E E  
TTGCAGAACCAGGCAGGATTTGACCCATCAAAGCAGGCATCAGATGAGGAGTCGCAGACCCCTGAGCATGATCTGGCCAAGC  
L Q N Q A G F D P S K Q A S D E E S Q T P E H D L A K R  
GTCTGACAAATGAATACCTGACCCAGGTGGCAGCCACCTCACCTGCAACAGCTTCAGGACTTCAGCTGTGACATCTCCG  
L T N E Y L T Q V A A H L T L Q Q L Q D F S C D I L R  
CAGTATTACAGTATGACCTCCAGCTTGGCAGAGAACCCTAACACTGTGCAGCTCTGCGTAAATAAAGCAGGTCATGAGCA  
S I H S M T S S L A E N P N T V Q L C V N K A G L \*  
GCCTAGAGTGTAAGCCCAAAGTATACCTGAGTTTTGACACAAAACGCATTGCCTTTCAAATAAACTTAAAGCCTGCAAAAT  
TTACTGAAACACATGCAGGTTGACAAGCAAACTGAAAGTCCATCTTTGTCTAGTGTCTGTGCTATTCTCCACAGATGCT  
AGGAAAATTTGACTTCCCAATGGAAAAAAAATAAACCTGGCTGTTGTACTCTATAGAGCATGCATAGATTAACAGCATT  
GTACCCTAGCATAACATGCAAAATCAAAGTAAACTTTGGGCTTTACACAAAACAGATACAGTGACAAGTAAAAAACTAATT  
AACAGCTGATATGTGTACACAGTCAAATGTTTGTGTGGAATCTTGTGACCATCAGTCAGGACATGGAGGCAATGGTA  
TTGTTTTCTTTGTATTTTTCTTCAGATTTGTATTTTTATTATTATTATTAATTAGGTTATTTATTTTTATTTCACTTGGC  
ATTTTATTTATTTAAGTCATTTAGGAACTCCCTAAATGATTGCATTCTTTACAGTCTCATAAAGTAATGTGTTACTTA  
ATTCAGTGTGAAATACTTTACTGTGTACATAAATCTGAATGCATGACCATGTCTCATAACTTGCCAAATGAGAACATGGTCA  
TTGGATTGATCTCCTGATCTCTGTGAGAACTACACACTGTTTTATTAGTCATTTTCATGTGATATTATGAGATATGTAATGT  
GATATCATACCATAAAAAGTAAGTGAGATTTTCAGATGAGTTTACGTATGAATCAGTATTATTTATTTATTTAATGTAA  
CTAAAAATACATGTATTTATTTTGCATTATTTGTTATGATATTTTTGGAATATTTGAAGATGTGCCATTATGTTTGTATCCA  
AATAAACATTTCTGATGTGTGTTAAA

**Fig.2-3. Genomic sequences encoding carp G-CSF paralogs.**

(A) Genomic sequences encoding carp G-CSF $\alpha$ 1. LHQP01022752.1, *Cyprinus carpio* isolate UL-001 Contig22774.

## B

```
GCTTTGTTACTGCTGGGGTCTGGTGACTTTGTGCATGTTCTTTTTGATTACTGCTGTGATAATGAACCTCCAGGgt..(int
ron1;359bp)..agCGGCTATATTAGTCACACTTGTGGGAATTGTGGCATCTGCCCAATCTCTGACAAACTGGACATTTT
M N F Q A
A I L V T L V G I V A S A P I S D K L D I L
GAACAAGGATACTATTGAACAAGCCCACAGTTTAATCAACAAAATTTTAGAAGATGCTCCTAAAGCTCATGCAGCCTGGATA
N K D T I E Q A H S L I N K I L E D A P K A H A A W I
AATAACAAGgt..(intron2;477bp)..agGGTCTGACTTTGGGCGACAACACGATTAGACTGCAGCTGAATTACTTGAA
N N K
G L T L G D N T I R L Q L N Y L K
ATCTGTGATACCCTCTGCCAGTCTTCAGAACATCTCCAATATCTCCAGCATGgt..(intron3;502bp)..agGAAA
S V I P S A P V L Q N I S N I S S M
E T
CCTGCCTTGCAGACATGGTGAAGGGACTGCAACTTCATCTGAATCTCCTGAATGAGATCATCAAAAACTGGCCGACAGAGA
C L A D M V K G L Q L H L N L L N E I I K K L A Q T D
CCAAGTGAATGTACTTAAATCTGAAATTCAGAACTTCAATCCCTAATCAAAAAGgt..(intron4;369bp)..agTTGC
Q V N V L K S E I Q E L H S L I K K
L Q
AGAAACAGGCGGGATTTGACCCATCAAGCATGCAAAAGATGAGCAGTCACAGACCCTTGTGCATGATCTGCACAAGCATCT
K Q A G F D P S K H A K D E Q S Q T L V H D L H K H L
GACAACGGAATTCATGATCCAGGTGGCCGCCACCTCACCTGCAACAGCTTCAGGACTTCAGCTGTGACGTCCTCTGCAGT
T T E F M I Q V A A H L T L Q Q L Q D F S C D V L C S
TTCTTTAGTATTGCAGAATGACCTCCAACATGTCCATGGCAGAGAACCCCTAAGACTGTGCAGCTCTGCATAAATGCGAG
F L S I R R M T S N M S M A E N P K T V Q L C I N A A G
GTCTATGAGCAGCGTAGACTGTAAAGCCCAAAGTATACTTGAGTTTTGACACAGAAGCA
L *
```

**Fig.2-3. sequences encoding carp G-CSF paralogs.**

(B) Genomic sequences encoding carp G-CSFa2. LHQP01015831.1, *Cyprinus carpio* isolate UL-001 Contig15846.

## C

```
GTGACGCAGCGCTTACGGATGCGGTCTGGGCTTTTTCTCGCTGTTCTCTGCAGTGACGAAACAGAAGAATCCCGGGAGATTT
CTCCTTCAGACCCGTCAGATCCGGACCCGAGGGATATTAAACATCTATGACCATAACCATTAATTCGCCCGGAAAATAAGGG
GCATTTTGTGCGGAGCACTTGCTTTGATTACACAAGAGCAGAACTAAGTTCAGAAACGTGAAATAATTTCCACTTTTTTG
GGGCGTTTTCACTCCCCCCCCCAAGAACAGGAGACACAGGAGTGTGTTTTCTCCTTGACACCTTTCCTCACTGGTTTTT
CGCAACGCAGCGTACACGTAATAGATTATAATGTAGTCGCAATAACGAGACAGCTCATCAAAGTTTCTCAGTTGGACAATC
TCAATGGGTTTTAAATAGGCTACTAGAATGCAGTAAAATATTCGATACACTCACAACCACAATGAAGTTTTGTCTCAgt..(I
M K F C L I
ntron1;140bp)..agTTCTTGCAAGTGTGCGTGTCTGACGCTGGTGGACGCGCGCGCTCCAGAAAGCAGGAGATG
L A V L R C C L T L V D A A P L Q K Q E M
ACGCGCGCTGTGGAGCGCGCCAGAGTTTAGCCAAGAAGATCTGAGCGAGCTTCCCGCGGCGCACCAGGCGTGGCTCAACA
T R A V E R A T S L A K K I L S D V P A A H Q A C V N T
CCGCGgt..(intron2;220bp)..agGGTTTGGCTCTCTCCAGCGAAGCAGGACACTTGGAGTATTTCTTAAGTACCTT
A
G L A L S S E A G H L E Y F L S D L
GGCATCCCCGCGCCCGGCTCAAGTCAGAGACCTCAGCATGgt..(intron3;420bp)..agGACGTGAGTTTAAAG
G I P A P P V L K S E D L S M
D V S L S
CCGTATTGTGGCCGCTGGACCTACCCGTGACCTCCTGCAGGACATCCGAGAGCGCTCGAGCTCCACAGAAGAACTGAGC
R I V A G L D L H R D L L Q D I R E R S S S T E E L S
CTCCTGCTCGCTGATATCACAGACCTGTCTGCTCAGGTCCACCAGgt..(intron4;98bp)..agATGCAGCAGCTGGCC
L L L A D I T D L S A Q V H Q
M Q Q L A
CAGATTTCCAGCACAGTGTCCAGAAGGCAGCGTTCCAGCGCTCTCTCCACGGCTCAGCGGTGATTATCAAGTCCAAGTGG
Q I P S T V S Q K A A F P A L S P R L S G D Y Q V Q V A
CCATCCATCTTTCTCTCAGCAGCTGCGCAGCTTACACAGGACGCTTCCGCGCTGCGCCACATTGCTGCATCAAACATA
I H L S L Q Q L R S F T Q D V F R S L R H I A A S N *
GCTGACTTTTCTGTGTGGAGTGTATTTTTGTAAGGCTCACTGGTTGTAACATTTGAATGGGTTATCCTTGCTAAGTTTGA
GCTGAACTTTGGAATAACTgttgttttaaatgatgtTTTTATGGTAATTTAAAGTATTTATTGTTTATTTAATATAT
A ACTTAAATATTTTTTATTGCTGATTTTTTATGATGTTATATTGACAGATGTTGTACCTGTGGGTACTGTGAAGATA
TCTATTAAACCTTATTTATTACTGA
```

**Fig.2-3. Genomic sequences encoding carp G-CSF paralogs.**

(C) Genomic sequences encoding carp G-CSFb1. LHQP01012478.1, *Cyprinus carpio* isolate UL-001 Contig12486.

## D

```
TCCGCACGTGTGTGTCAGACAGCAGTTAAACACTACATCATCACATTAATCATCACATTAGTAAAGGGCTTTTCGCTGATGA
TCGCTTGCTCTGATTCGCGCAAGAGCAGAACTGAGTACAAGAAACGTGAAATAAGGTTTTGGGGCGTTCTCACTTCCCCCC
CACATTTAAAGAACC GGAAACATAGGAGTGTGTTTTCTCTTTTTTCCCCTATTGGTTTTTCGCAATGCATTGTACGTAATA
GGACCACAGTTTAGGTGAAATAGCTAGACAACCTCATGGAAGTTTCCCCAGTTGAACAATCTGAACGGGTTAAATAGCCTGC
TAGAAATCCCTTGATCAATGCAGTCAAATATCCCAAACCTCTGTGAAGCACAATGCAGCTTTACCTCAgt..(intron1;26
M Q L Y L I
5bp)..agTTCTCGCAGCGCACTGCTGTCTGACGCTGGTGGACTCCGCGCCGCTCCGGACGCACGAGCTGACGCGCGCCGTG
L A A H C C L T L V D S A P L R T H E L T R A V
GACAGCGCCATGAGTTTAGCCAGGAAGATCCTGAGCGACATTCGCGCAGCGCACGAGGCGTGCCTCAAAGCCACGgt..(in
D S A M S L A R K I L S D I P A A H E A C V K A T
tron2;167bp)..agGGTTTGACCCTTCCAGTGAATCAGAACAACCTTGGAGTATTTACTGAGTGACATTGGCATCCCTGCG
G L T L S S E S E H L E Y L L S D I G I P A
CCTCCGCTGCTCAAGTCAGAGCACCTCAGCCTGgt..(intron3;1591bp)..agGATGTGAGTTTAAGCCGTATTGTAG
P P L L K S E H L S L D V S L S R I V D
ACGGTTTGGAGCTACACCACAAACTTCTGCAGGAAATTAAGAGCTCTTGACCTCCACAGAAGAACTGACCTGCTGCTGGC
G L E L H H K L L Q E I K E L L T S T E E L T L L L A
AGATATTACAGACCTGTCTGCTCAGGTCCATAAGgt..(intron4;88bp)..agATGCAGCAGCTGGCCAGATTCCCAC
D I T D L S A Q V H K M Q Q L A Q I P T
AGAATCCCAGAAAACCACGTTCCAGCGATCTCTCCACAGCTCAGCAGTGACTATCATGTCCAAGTGGCCATCCACCTTTGT
E S Q K T T F P A I S P Q L S S D Y H V Q V A I H L C
CTTCAGCAGCTGCGCAGTTTTACTCATGATGTCTTCCGAGCTACGCCACATTGCTGCATCAAACTAGTTGACCAGTACTA
L Q Q L R S F T H D V F R S L R H I A A S N *
ACCCAACCAACCAGTCCCTGCTATATTTTGTATTTTCTGCGTAGAAATGTATTTTTGTAATGCTCACTGTTTGTGTTATCCT
TGCTAAGTTTAAGATGAACCTTAGAATAATTTTATTTAATCAGATGTTTAAATTTAATGTATTTAATATTTA
```

**Fig.2-3. Genomic sequences encoding carp G-CSF paralogs.**

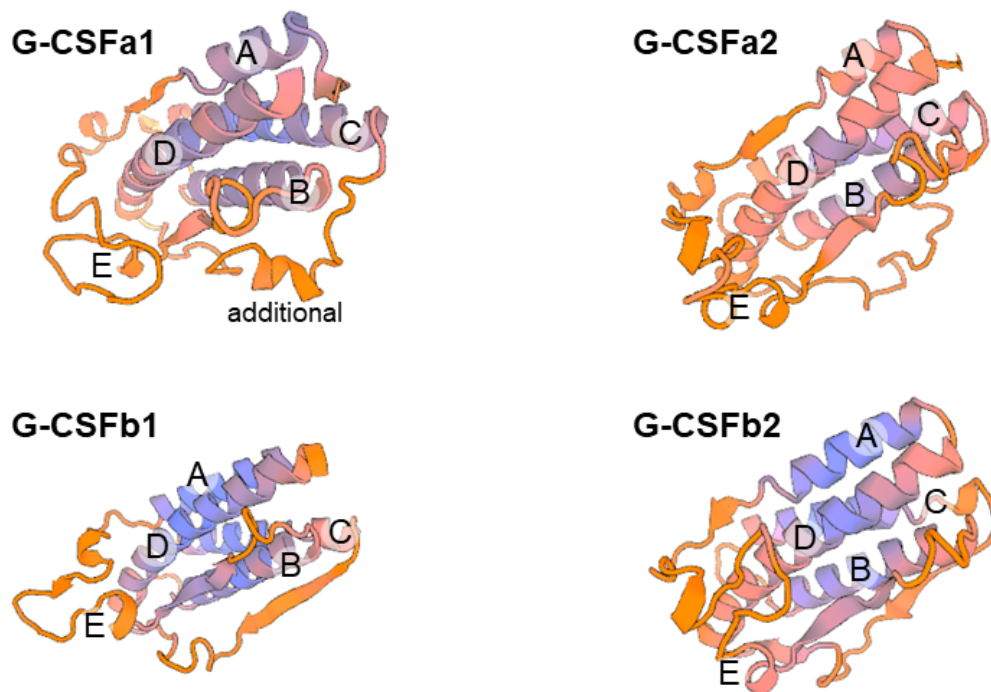
(D) Genomic sequences encoding carp G-CSFb2. LHQP01028996.1, *Cyprinus carpio* isolate UL-001 Contig29026, reverse complement.

**Table 2-4. Amino acid sequence identities ( gray upper grids) and similarities (*white lower grids*) of human, mouse, chicken, xenopus, and fish G-CSF orthologues.**

Amino acid identities and similarities (in percentages) were calculated using the Sequence Manipulation Suite v2: Ident and Sim ([http://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)) following the multiple alignment with the Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

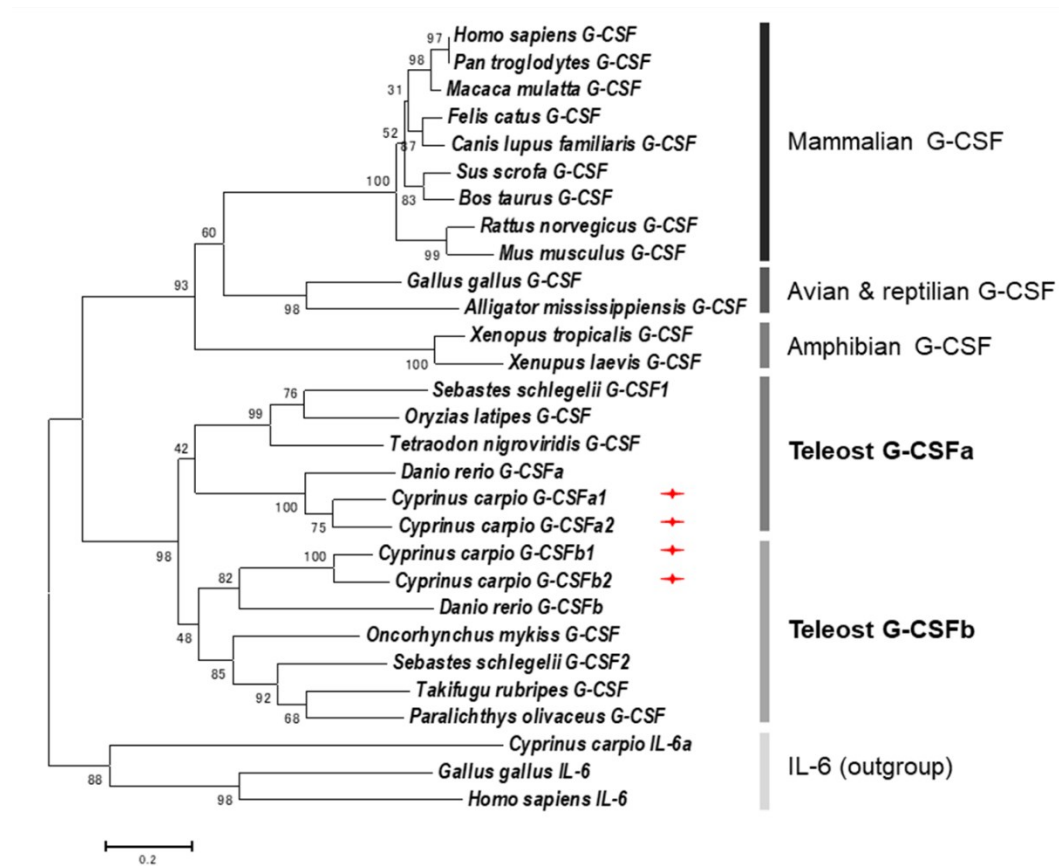
	Human	Mouse	Chicken	African-clawed frog	Zebrafish G-CSFa	Carp G-CSFa1	Carp G-CSFa2	Zebrafish G-CSFb	Carp G-CSFb1	Carp G-CSFb2
Human		69.95	35.21	22.86	16.07	14.40	13.88	18.64	20.81	21.82
Mouse	76.06		33.02	24.04	13.78	14.81	13.36	15.11	16.37	17.78
Chicken	49.77	49.06		25.37	14.29	15.25	14.71	15.28	18.89	19.35
African-clawed frog	31.90	37.50	39.02		15.81	13.25	13.56	13.62	13.55	14.55
Zebrafish G-CSFa	29.91	29.78	30.41	29.77		56.70	51.32	18.87	28.23	27.75
Carp G-CSFa1	29.63	30.86	31.78	28.63	68.30		69.74	18.61	28.07	28.95
Carp G-CSFa2	27.35	28.34	30.67	26.69	60.96	75.44		19.91	28.38	29.26
Zebrafish G-CSFb	30.00	26.22	30.09	23.47	34.43	34.20	35.50		34.34	36.36
Carp G-CSFb1	37.10	34.51	36.87	27.10	44.98	44.30	44.54	53.54		72.82
Carp G-CSFb2	36.82	34.22	34.10	30.05	45.93	44.74	45.85	52.53	82.05	

using default parameters. Accession numbers of protein sequences listed are same to Fig. 1B.



**Fig. 2-4. Proposed 3D structure of carp G-CSFa1, G-CSFa2, G-CSFb1 and G-CSFb2.**

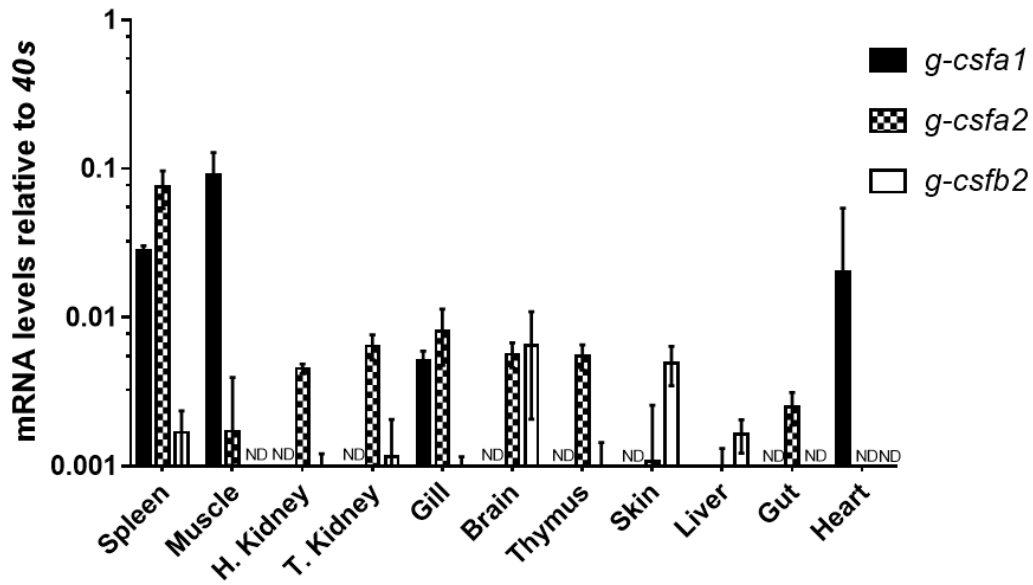
Putative structures are modeled based on the structure of human G-CSF using the SWISS-MODEL server (<https://swissmodel.expasy.org/>).



**Fig. 2-5. Phylogenetic analysis of mammalian, avian, reptilian, amphibian and teleost fish G-CSF proteins.**

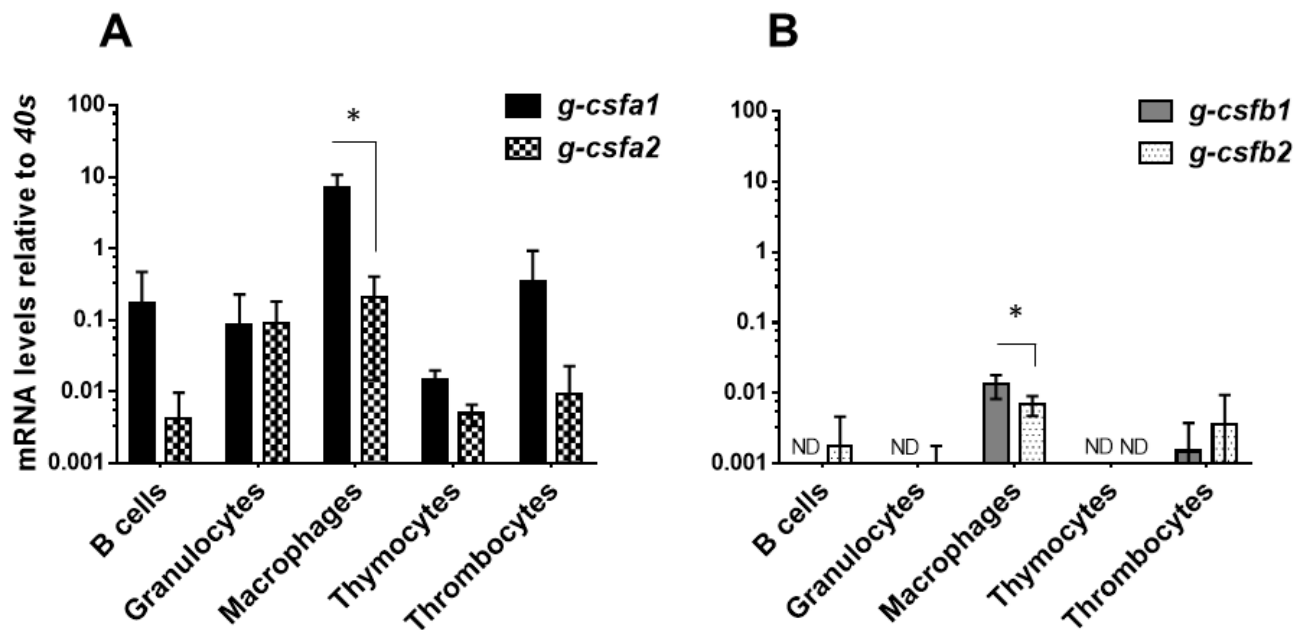
Phylogenetic analysis included carp G-CSFa1 (*C. carpio*, MG882495); carp G-CSFa2 (MG882496); carp G-CSFb1 (MG882497); carp G-CSFb2 (MG882498); zebrafish G-CSFa (*D. rerio*, NP\_001138714); zebrafish G-CSFb (NP\_001137226); rockfish G-CSF1 (*S. schlegelii*, BAH56611); rockfish G-CSF2 (BAH56612); medaka G-CSF (*O. latipes*, XP\_004080425); green-spotted puffer G-CSF (*T. nigroviridis*, CAG04394); rainbow trout G-CSF (*O. mykiss*, CAQ42965); fugu G-CSF (*T. rubripes*, XP\_003965085); flounder G-CSF (*P. olivaceus*, BAE16320); african clawed frog G-CSF (*X. laevis*, Scaffold13265:3008399-3011722); tropical clawed frog G-CSF (*X. tropicalis*, XP\_002940261); alligator G-CSF (*A. mississippiensis*, XP\_006270858); chicken G-CSF (*G. gallus*, NP\_990610); human G-CSF (*H. sapiens*, NP\_000750); chimpanzee G-CSF (*P. troglodytes*, XP\_009430519); rhesus monkey G-CSF (*M. mulatta*, XP\_001095097); cat G-CSF (*F. catus*, NP\_001009227); dog G-CSF (*C. lupus familiaris*, XP\_005624600); pig G-CSF (*S. scrofa*, XP\_005653977); cattle G-CSF (*B. taurus*, NP\_776453); rat G-CSF (*R. norvegicus*, NP\_058800); mouse G-CSF (*M. musculus*, NP\_034101); carp interleukin-6a (IL-6a, AGR82313); chicken IL-6 (NP\_989959); and human IL-6 (NP\_000591). Phylogenetic analysis was conducted using the neighbor joining method in MEGA version 6 and bootstrapped 1,000 times with bootstrap values expressed as percentages.





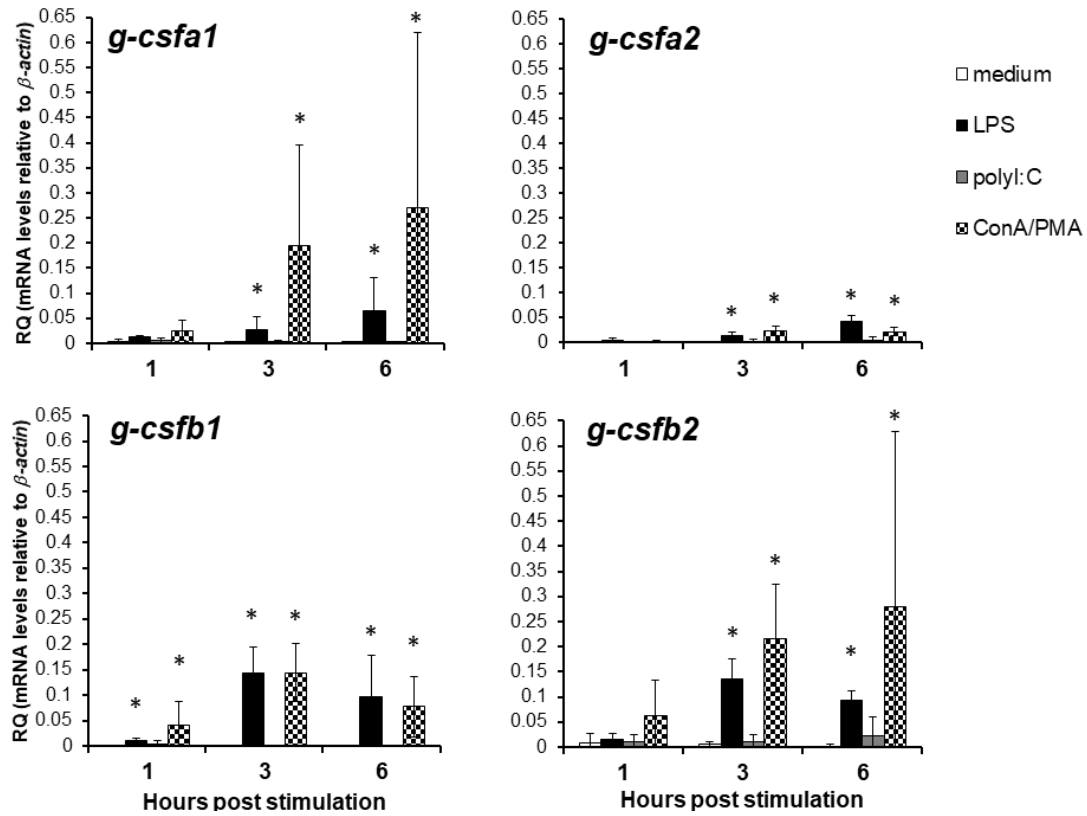
**Fig. 2-6. Quantitative mRNA expression analysis of four carp G-CSF paralogues in normal carp tissues.**

The tissues examined were: spleen, muscle, head kidney, trunk kidney, gill, brain, thymus, skin, liver, gut and heart. The relative mRNA levels of carp G-CSFs were determined using *40s* as the endogenous control and presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ , except thymus,  $n = 2$ ).



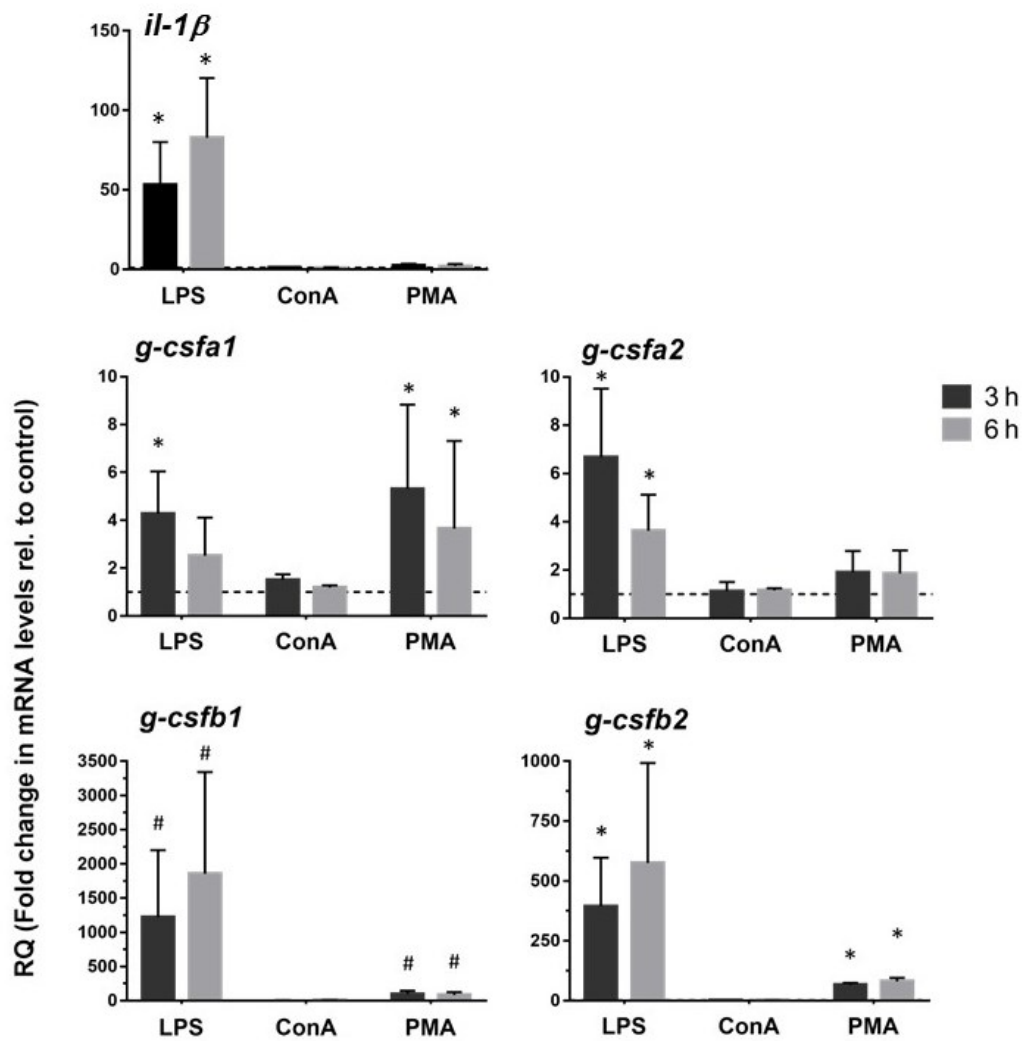
**Fig. 2-7. Quantitative mRNA expression analysis of carp G-CSFa1 and G-CSFa2 (A) and G-CSFb1 and G-CSFb2 (B) in the immune cells from normal carp.**

The expression levels were determined relative to *40s* and presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 4$  except thymocytes and thrombocytes  $n = 2$ ). (\*) above the line denotes significance ( $p < 0.05$ ) between indicated genes in macrophages.



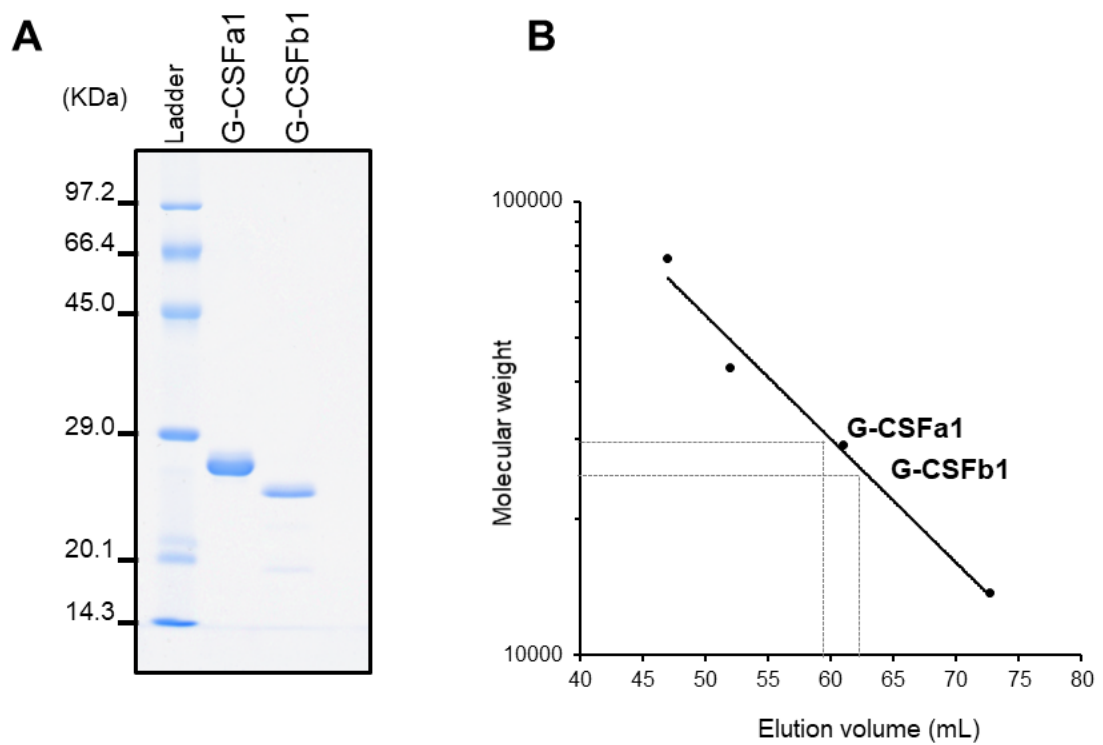
**Fig. 2-8. Quantitative mRNA expression analysis of four carp G-CSF paralogs in kidney leukocytes stimulated with mitogens for 1, 3 and 6 h.**

Freshly isolated kidney leukocytes from normal carp were treated with the medium, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  polyI:C, or a combination of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA for 1, 3 and 6 h. The relative mRNA levels were calculated using  $\beta\text{-actin}$  as reference gene. Data represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the reference sample.



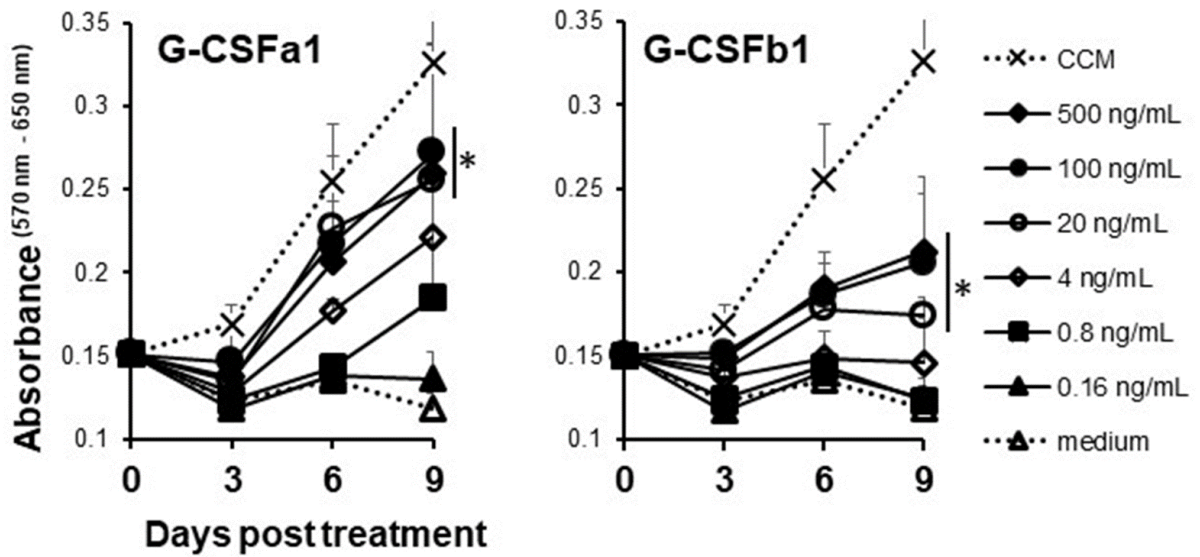
**Fig. 2-9. Quantitative expression analysis of carp *g-csfa1* (A1), *g-csfa2* (A2), *g-csfb1* (B1) and *g-csfb2* (B2) in head kidney-derived macrophages stimulated with LPS, ConA and PMA for 3 and 6 h.**

The reported relative mRNA levels were calculated using *40s* as an endogenous control. The data were normalized against the mRNA levels of each gene in macrophages unstimulated at each time point, set to an arbitrary value of 1, mean  $\pm$  standard deviation is shown ( $n = 4$ ). Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the reference sample.



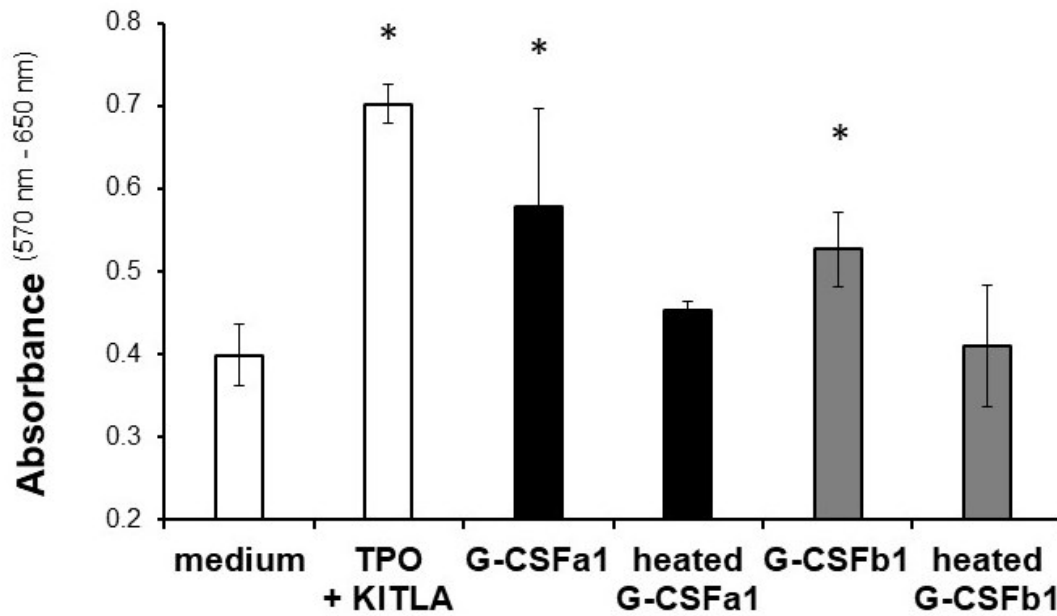
**Fig. 2-10. Purification and characterization of recombinant carp G-CSFa1 and G-CSFb1.**

(A) Purified G-CSFa1 and G-CSFb1 were separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions and visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Molecular weight of the recombinant proteins were determined with gel filtration chromatography using a Sephacryl S-100 column (HR 16/60) under native condition. The molecular weights of the standard proteins: conalbumin, 75,000; ovalbumin, 44,000; carbonic anhydrase, 29,000; ribonuclease A, 13,700.



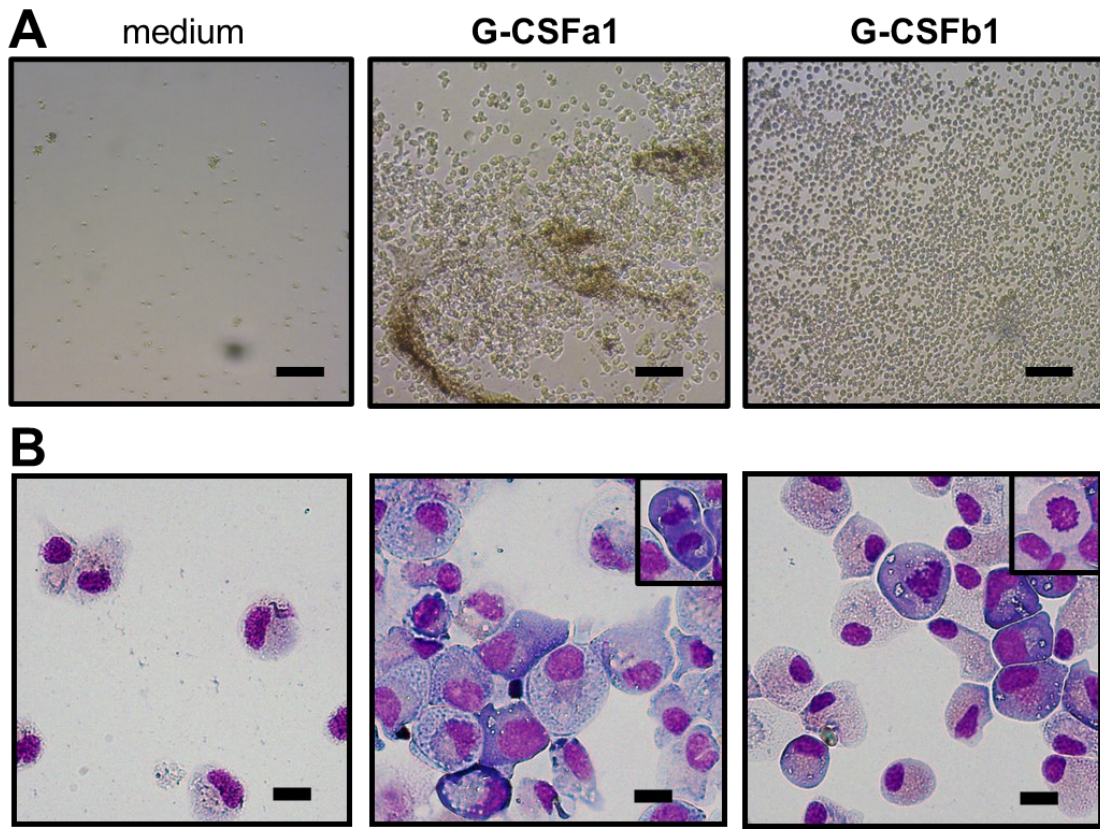
**Fig. 2-11. Proliferation of carp kidney leucocytes.**

Proliferative response of carp kidney leucocytes treated with recombinant carp G-CSFa1 and G-CSFb1. Live cells treated with or without 500, 100, 20, 4, 0.8 and 0.16 ng/mL of recombinant carp G-CSFa1 or G-CSFb1 were measured with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay at day 0, 3, 6 and 9 in the culture. Absorbance values with 650 nm were subtracted from experimental absorbance values with 570 nm in each well. Each point on the graphs represents mean + standard error ( $n=4$ ).



**Fig. 2-12. Heat-inactivated recombinant carp G-CSF had no effect.**

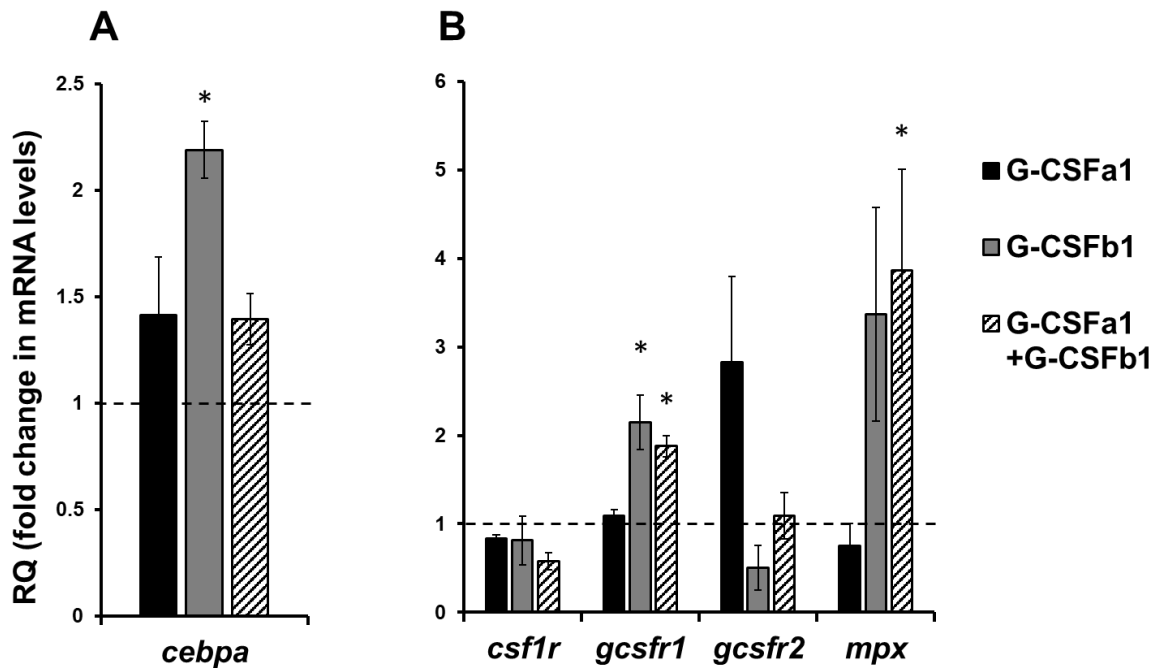
Proliferative response of carp kidney leukocytes (40,000 cells) treated with medium alone, recombinant carp TPO (100 ng/mL) plus KITLA (100 ng/mL), recombinant carp G-CSFa1 (100 ng/mL), G-CSFb1 (100 ng/mL) or heat-inactivated G-CSF paralogs. Live cells treated with different stimuli were measured with the MTT assay at day 6 in the culture. Absorbance values at 650 nm were subtracted from experimental absorbance values at 570 nm in each well. Data represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the reference (medium) group.



**Fig. 2-13. Morphology of proliferated kidney leucocytes.**

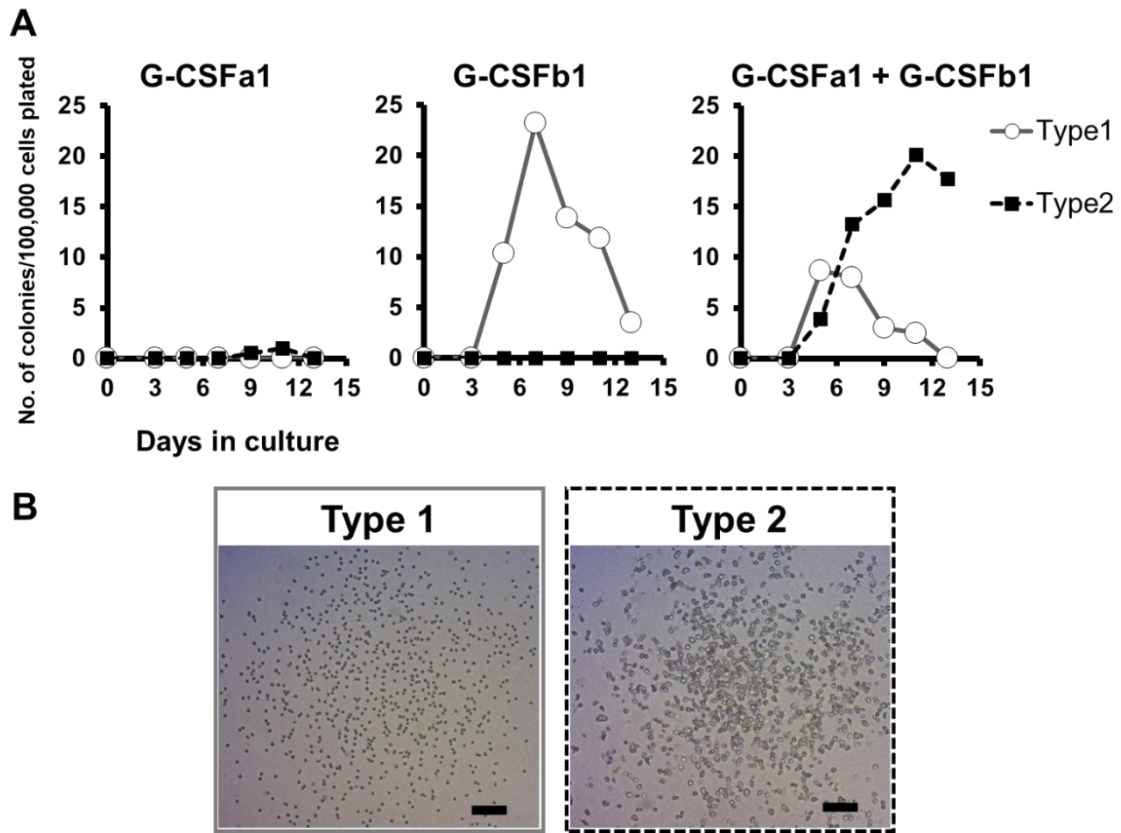
(A) Photomicrographs of liquid cultures in the absence (medium) or presence of recombinant G-CSFa1 and G-CSFb1 after 8 days of the culture. Scale Bars indicate 100  $\mu\text{m}$ . (B) After 8 days culture in the absence or presence of G-CSFa1 and G-CSFb1, kidney cells were cytocentrifuged onto glass slides and stained with May-Grunwald Giemsa. Mitotic figures were frequently observed. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .





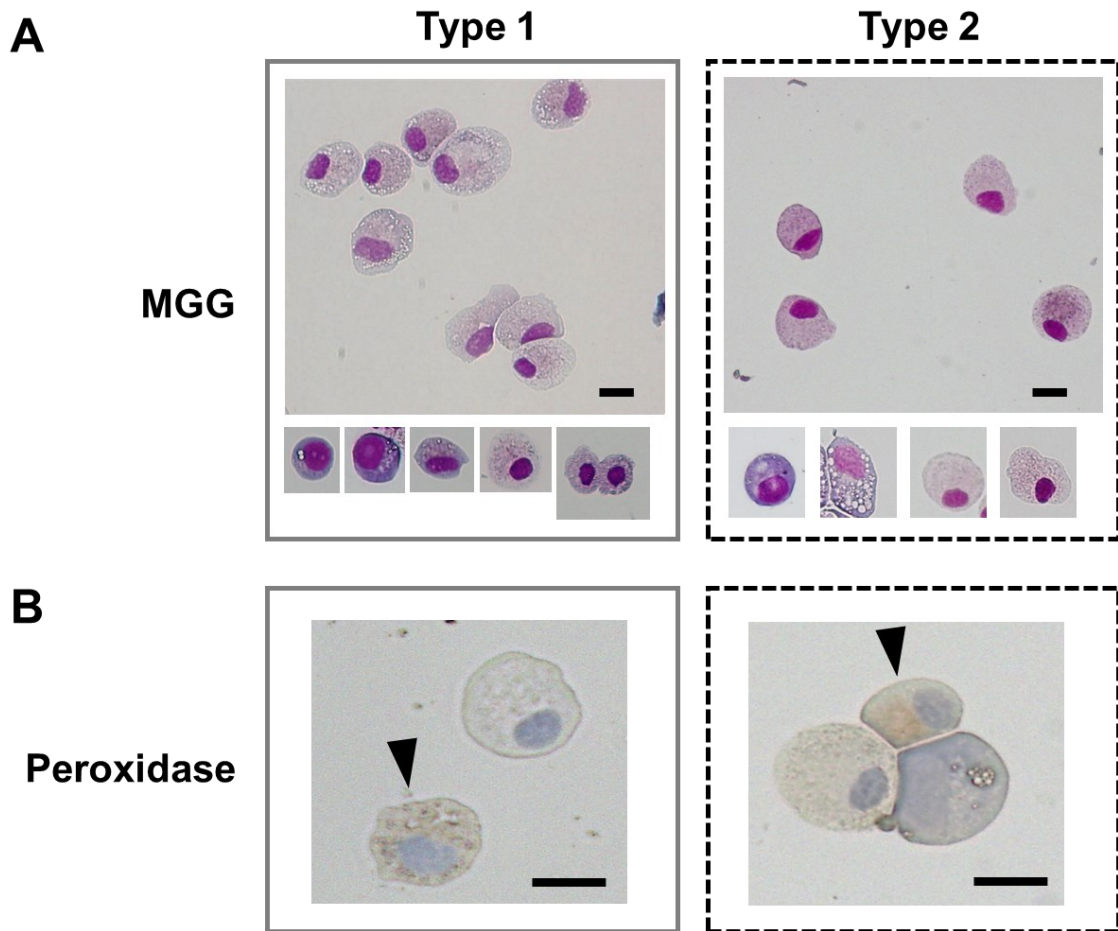
**Fig. 2-14. Quantitative expression analysis of proliferated kidney leucocytes.**

(A) Quantitative expression analysis of carp transcription factors involved in myelopoiesis (*cebpa*, *pu.1* and *irf8*), early hematopoiesis (*gata2*), erythropoiesis (*gata1*) and lymphopoiesis (*gata3* and *pax5*) in carp kidney leukocytes treated or untreated with G-CSFa1, G-CSFb1 or a combination of G-CSFa1 and G-CSFb1 for 12 h. White bars represent cells treated with medium alone, gray bars represent cells treated with 100 ng/mL G-CSFa1, black bars represent cells treated with 100 ng/mL G-CSFb1, and bars with oblique lines represent cells treated with both 100 ng/mL G-CSFa1 and 100 ng/mL G-CSFb1. The mRNA levels were calculated using b-actin as an endogenous control. Data were normalized to the medium alone cells and mean  $\pm$  standard error is shown (n = 4). Statistical analysis was performed using an one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the reference sample. (B) Quantitative expression analysis of myeloid cytokine receptors and myeloperoxidase in carp kidney leukocytes treated or untreated with G-CSFa1, G-CSFb1 or a combination of G-CSFa1 and G-CSFb1 for 4 days. The mRNA levels were calculated using b-actin as an endogenous control. Data were normalized to the medium alone cells and mean  $\pm$  standard error is shown (n = 4). Statistical analysis was performed using an one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the reference sample.



**Fig. 2-15. Colony formation of kidney cells in response to recombinant carp G-CSFa1 and G-CSFb1.**

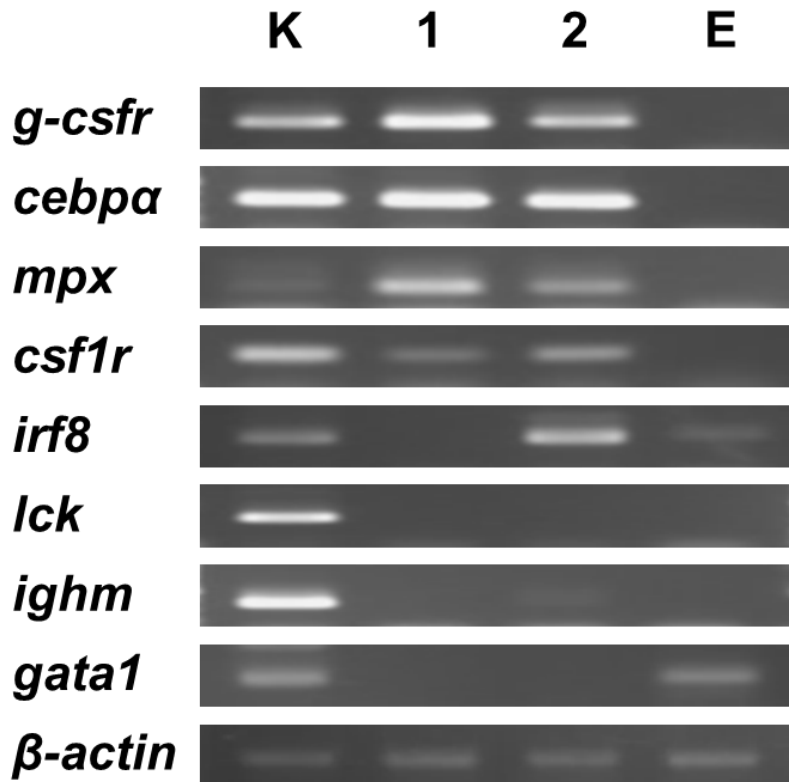
(A) One hundred thousands of carp kidney leukocytes were cultured in the semi-solid media in the absence or presence of 100 ng/mL of G-CSFa1 alone, 100 ng/mL of G-CSFb1 alone, or a combination of 100 ng/mL G-CSFa1 and 100 ng/mL G-CSFb1 for 13 days. Two distinct morphology of colonies were eventually distinguishable as shown in (B). White circle points represent type 1 colonies and black square points show type 2 colonies. Each point indicates mean colony counts from 4 individual fish under each condition. Cultures scored every 2 days between day 3 to 13 of incubation. (B) Representative Photomicrographs of two types of colony. Bars show 200  $\mu$ m.



**Fig. 2-16. Stainability in colony cells**

(A) Colony cells (type 1; left and type 2; right) were harvested, cytocentrifuged onto glass slides and stained with May-Grunwald Giemsa. Bars indicate 10  $\mu$ m.

(B) Peroxidase-stained cells obtained from a type 1 colony (left) and a type 2 colony (right). Cells were counterstained with Mayer's Hematoxylin. Arrow heads indicate myeloperoxidase-positive cells. Bars show 10  $\mu$ m.



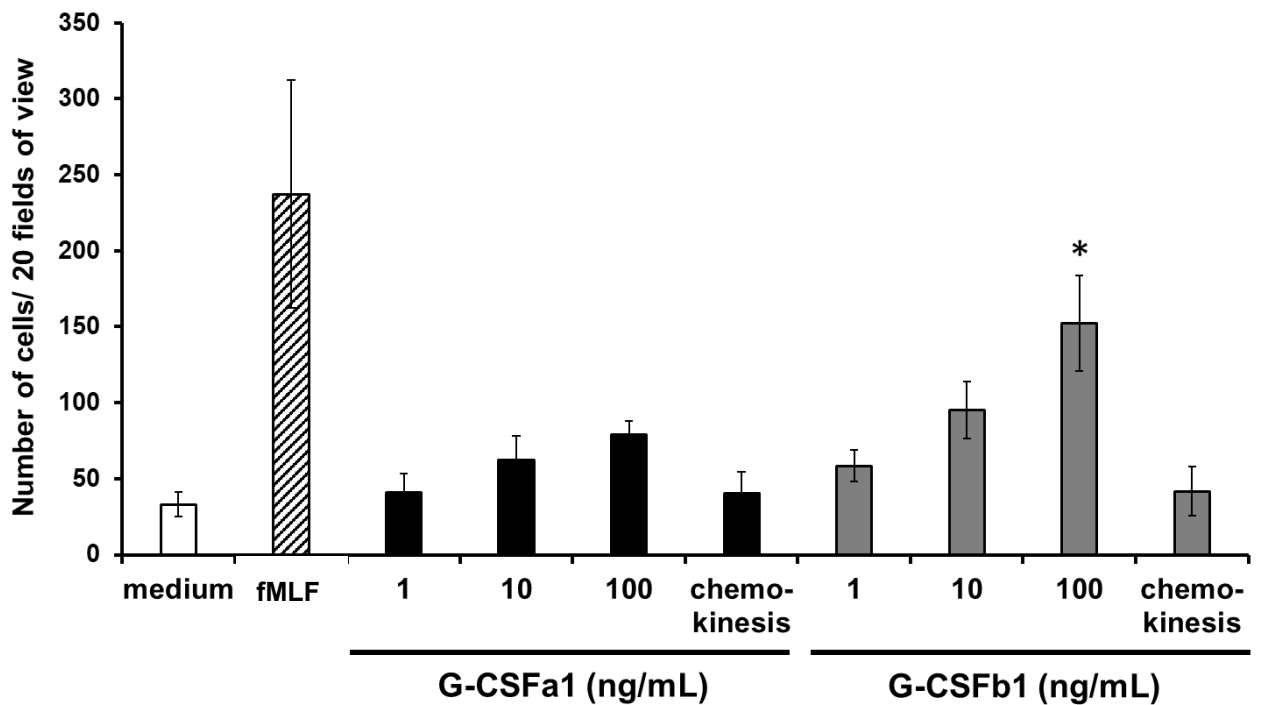
**Fig. 2-17. Expression analysis of colony cells**

RT-PCR analysis for expression of lineage-associated marker genes in type 1 and type 2 colony cells. Type 1 colonies cultured in the presence of 100 ng/mL G-CSFb1 for 6 days were collected under microscopic visualization based on morphology, pooled and RNA isolated and reverse transcribed into cDNA prior to RT-PCR (lane 1). Type 2 colonies cultured in the presence of both 100 ng/mL G-CSFa1 and 100 ng/mL G-CSFb1 for 10 days were collected and examined (lane 2). cDNA from carp kidney leukocytes was used as a positive control (lane K). cDNA from cells cultured in the presence of 100 ng/mL carp EPO for 7 days was examined as well (lane E). PCR products were electrophoresed on agarose gels and stained with ethidium bromide prior to visualization under UV light.

**Table 5. The number of type 1 and type 2 colonies formed from 100,000 cells in head kidney, trunk kidney, spleen and PBLs in the semi-solid culture with the combination of 100 ng/mL G-CSFa1 and 100 ng/mL G-CSFb1.**

Data were obtained from duplicate cultures in the presence of both 100 ng/mL G-CSFa1 and 100 ng/mL G-CSFb1 (n = 4). Type 1 colonies were counted at 7 days of cultivation. Type 2 colonies were counted at 10 days of cultivation. ND, not determined.

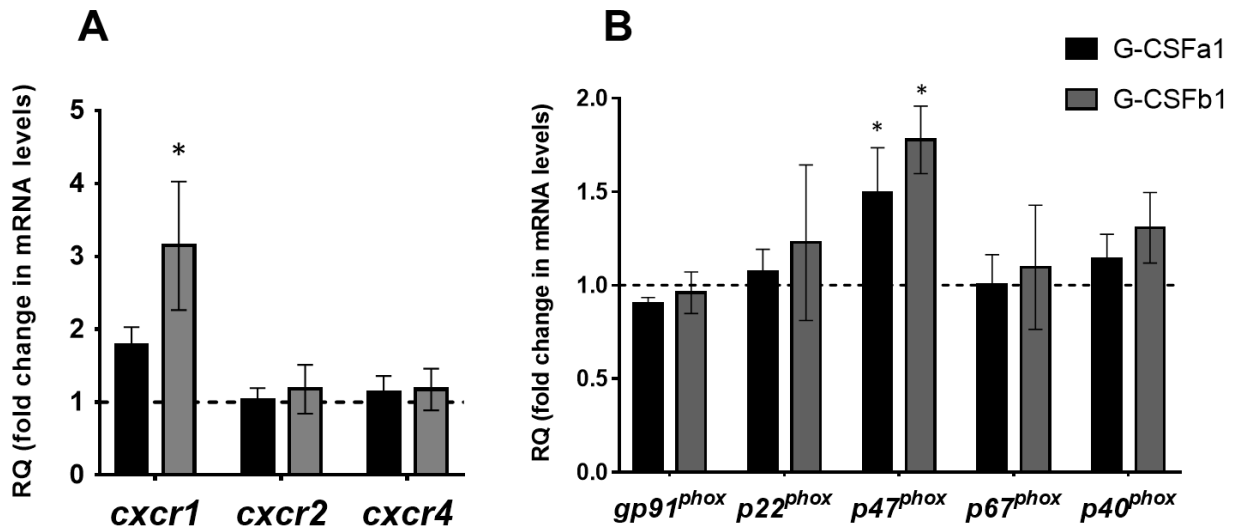
	Head kidney		Trunk kidney		Spleen		PBLs	
	Type 1 (CFU-G)	Type 2 (CFU-GM)	Type 1 (CFU-G)	Type 2 (CFU-GM)	Type 1 (CFU-G)	Type 2 (CFU-GM)	Type 1 (CFU-G)	Type 2 (CFU-GM)
Mean of colonies formed (± SEM)	29.1 ± 4.2	34.5 ± 4.5	22.9 ± 3.5	34.0 ± 3.8	0	0	0	0
Mean of leukocytes in each whole organ	9.24×10 <sup>6</sup>		8.94×10 <sup>6</sup>		3.60×10 <sup>5</sup>		ND	
No. of progenitors estimated (± SEM)	<b>2689±388</b>	<b>3188±416</b>	<b>2047±313</b>	<b>3039±340</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

**Fig. 2-18. Recombinant carp G-CSFb1 induces chemotactic response of kidney neutrophils.**

Following one hour incubation, duplicate filters separating kidney neutrophils and cytokines at the concentrations indicated were stained with May-Gruenwald Giemsa and the total number of cells in 20 random fields of view (40× magnification) were determined. Medium alone was the negative control and the positive control was 10 ng/mL fMLF in the bottom chemotaxis chamber. Equal concentrations (100 ng/mL) of cytokines in the upper and lower chemotaxis chambers served as chemokinesis control. Kidney neutrophils were obtained from each of four fish. The data represent mean ± SEM.



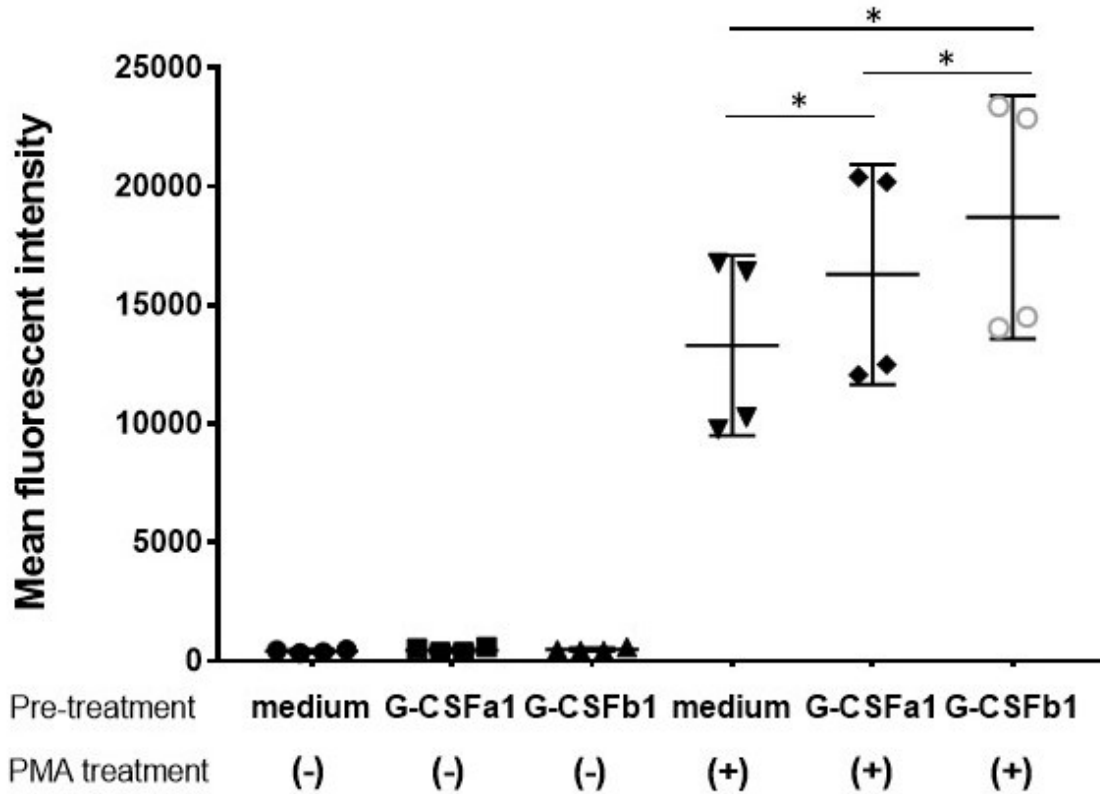
13

14 **Fig. 2-19. Recombinant G-CSFa1 and G-CSFb1 up-regulates *cxcr1* and *p47<sup>phox</sup>* mRNA**  
 15 **expression levels in carp kidney neutrophils. Quantitative expression analysis of mRNA levels of**  
 16 **chemokine receptors**

17 **(A)** and NADPH oxidase components **(B)** in carp kidney neutrophils treated with the medium, 100  
 18 ng/mL G-CSFa1 and 100 ng/mL G-CSFb1 for 6 h. The mRNA levels were calculated using *β-actin* as  
 19 a reference gene. Data were normalized to the control cells (dashed line at  $y = 1$ ) and presented as  
 20 mean + standard deviation ( $n = 3$ ). Significant differences compared to unstimulated controls were  
 21 determined using one-way ANOVA followed by Dunnet's *post-hoc* test, ( $p < 0.05$ ) are denoted by  
 22 asterisks (\*)

23

24

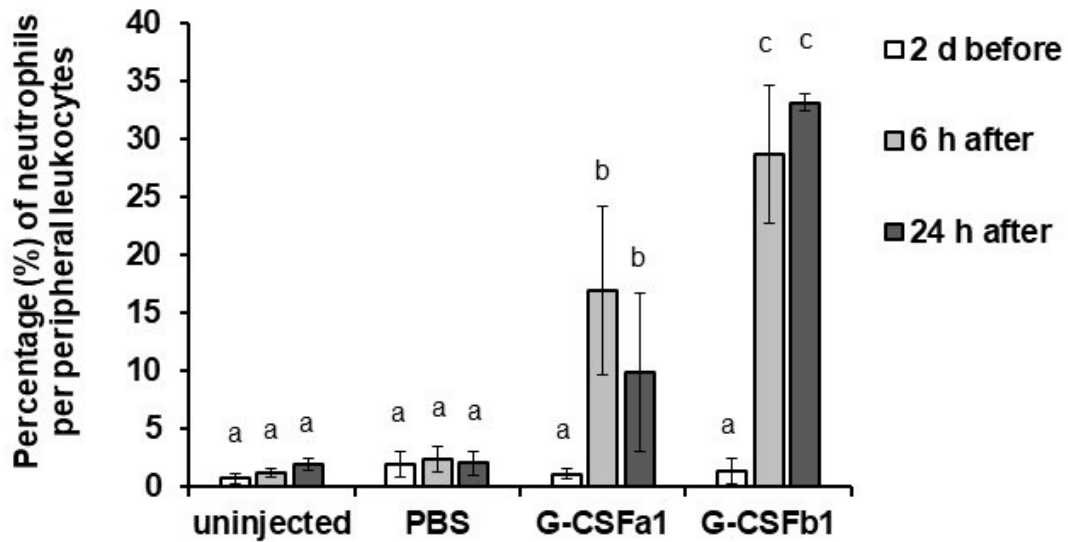


26 **Fig. 2-20. Recombinant G-CSFa1 and G-CSFb1 induces increased respiratory burst capability.**

27 Respiratory burst capability of kidney neutrophils after pre-treatment with the medium, 100 ng/mL G-  
 28 CSFa1 or 100 ng/mL G-CSFb1 for 6 h and subsequently treated with or without 100 ng/mL PMA for  
 29 30 min in the presence of DHR123. Mean of DHR123 fluorescence intensity (MFI) in gated neutrophil  
 30 population was measured by flow cytometry. Data points are presented as mean values of individuals  
 31 and error bars show standard deviation. Kidney neutrophils were obtained from four fish. Significant  
 32 differences compared to every other group with two factors of G-CSF pre-treatment and PMA  
 33 treatment were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test, ( $p < 0.05$ ) are  
 34 denoted by asterisks (\*). N.S. represents 'not significant'.

35





37 **Fig. 2-21. Administration of G-CSFa1 and G-CSFb1 to carp increases circulating blood**  
 38 **neutrophil population.**

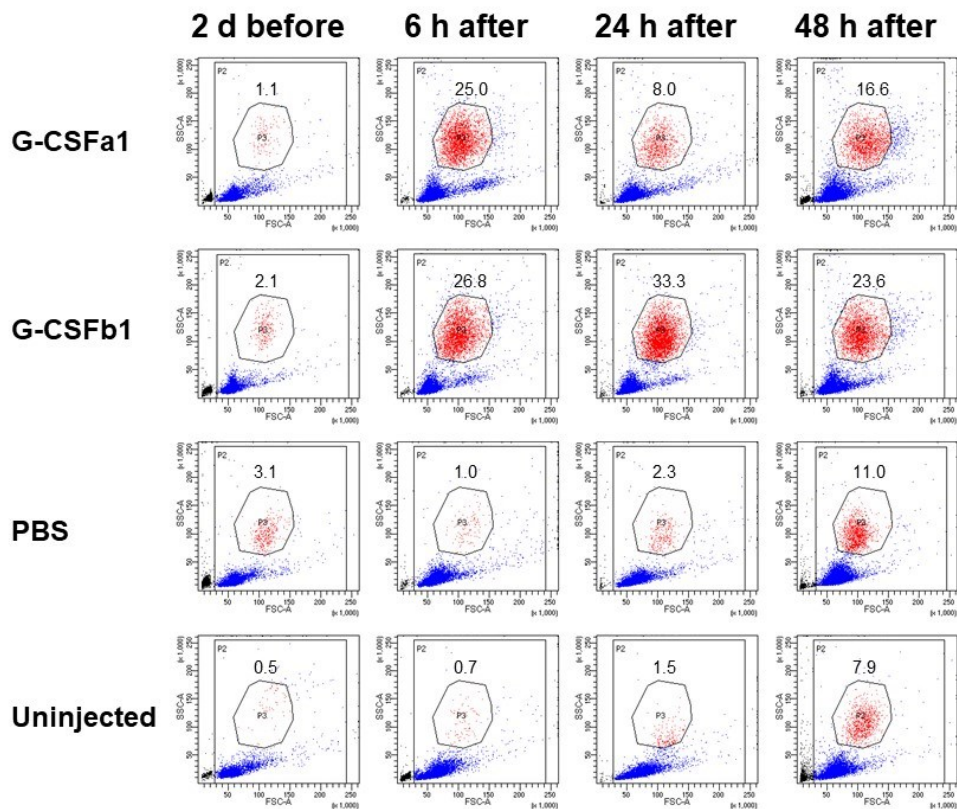
39 Peripheral blood leukocytes were collected from carp 2 days before and 6 and 24 h after intraperitoneal  
 40 injection of  $1 \times$  PBS, recombinant G-CSFa1 and G-CSFb1 or of unhandled carp and analyzed by flow  
 41 cytometry. Percentage of gated neutrophil population per live peripheral blood leukocytes was  
 42 measured. Three fish for each group were used and data are presented as mean + standard deviation.  
 43 Significant differences compared to other treatment groups and other time points were determined  
 44 using two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test, ( $p < 0.05$ ) are denoted by different letters.

45

46

47

48



Supplementary figure S7

49

50

51 **Fig. 2-22. Flow cytometry analysis of peripheral blood leukocytes from carp i.p. injected**  
 52 **recombinant G-CSFa1, G-CSFb1 and PBS and uninjected.** Peripheral blood leukocytes were  
 53 collected over time from carp intraperitoneally injected with 1xPBS, recombinant G-CSFa1 and G-  
 54 CSFb1 and uninjected. Ten thousand leukocytes were analyzed by flow cytometry based on the  
 55 depiction in forward scatter and side scatter parameters. P3 gates represent the neutrophil population  
 56 with high side scatter and numbers show percentages of neutrophils in PI- live cells. Representative  
 57 data in three fish per group are shown.

58

59

60

61

62

63

64

65

### 第3章

66

67

コイ好塩基球産生因子の同定および機能解析

68

### 3.1. 序論

69

70

71 哺乳類においてインターロイキン(Interleukin, IL)-5、IL-3、顆粒球-マクロファ  
72 ージコロニー刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-  
73 CSF) は 4 つの短鎖  $\alpha$ -helix 構造を有するサイトカインサブファミリーであり、  
74 IL-5 ファミリーサイトカイン (IL-5 family) と総称される (Dougan et al., 2019)。  
75 これら 3 分子の遺伝子は、同じゲノム領域にマッピングされ、ヒトの第 5 番染  
76 色体やマウスの第 11 番染色体上で IL-4 や IL-13 とともに Th2 サイトカイン遺伝  
77 子群を形成する (Van Leeuwen et al., 1989)。これら IL-5 family のレセプターは、  
78 各サイトカイン特異的な  $\alpha$  鎖 (IL-5R $\alpha$ , IL-3R $\alpha$ , CSF2R $\alpha$ ) と  $\beta$  鎖共通受容体 ( $\beta$ c)  
79 サブユニットからなるヘテロ二量体受容体から構成される。また、IL-5 family の  
80 主要な細胞内シグナル伝達を担うのは  $\beta$ c とされており、3 分子は JAK-STAT 等  
81 を介した共通の経路でシグナル伝達を行う (Shearer et al., 2003)。これらの受容体  
82 を介して、IL-5 family はそれぞれ、種々の白血球の産生や機能を制御し、特に、  
83 好酸球および好塩基球 (好酸/好塩基球) の制御において、重複した機能を示す。  
84 このようなゲノム構造、受容体や機能の共通点から、IL-5 family は進化の過程に  
85 おいて、共通の祖先遺伝子から複数のタンデム遺伝子重複を経て生じたと考え  
86 られている (Lee et al., 1989; Van Leeuwen et al., 1989)。

87 哺乳類以外の脊椎動物においても、IL-5 family と IL-4 および IL-13 が近傍の  
88 ゲノム領域に位置する特徴的なゲノム構造が保存されているが、鳥類、両生類や  
89 魚類においては、IL-5 family 遺伝子の保存性は多様である。例えば、ニワトリは  
90 IL-3、GM-CSF、IL-5 の偽遺伝子を持っていることが報告されているが、これら  
91 は哺乳類のものと塩基配列の類似性が低い (Avery et al., 2004)。また、ツメガエル  
92 属 (*Xenopus* spp.) は、IL-3 と GM-CSF を持たず、IL-5 受容体  $\alpha$  鎖様遺伝子

93 (GenBank ID: NM\_001094351 and NM\_001123462) を持つが、そのリガンドは発  
94 見されていない。魚類では、近年のゲノム解読技術の進展により、軟骨魚類等で  
95 IL-5 family (IL-5fam) と仮称されるサイトカイン様遺伝子が報告されている  
96 (Yamaguchi et al., 2015)。IL-5fam 遺伝子はゲノム上において、哺乳類の IL-4 およ  
97 び IL-13 と相同な遺伝子とされる IL-4/13 遺伝子近傍にマッピングされているが、  
98 系統解析においては、哺乳類の IL-5、IL-3、GM-CSF とは異なるクラスターに分  
99 類されている。これらのことから、IL-5fam は魚類特有の遺伝子であるものの、  
100 哺乳類 IL-5 family との関連性が示唆されている。一方、真骨魚類において、IL-  
101 5fam の存在は報告されていない。しかし、真骨魚類は IL-4/13 遺伝子を有してお  
102 り、 $\beta c$  遺伝子についても真骨魚類を含む幅広い生物種で保存されている。その  
103 ため、真骨魚類においても IL-5fam 遺伝子が存在している可能性がある。

104 哺乳類において、IL-5 family が産生および機能の制御を担う好酸/好塩基球は、  
105 魚類においても保存されているが、それらの組成は多様である。すなわち、ほと  
106 んどの魚種は好中球を有し、一部の魚種は、“第二の顆粒球”として形態学的に  
107 好酸球または好塩基球に類似した顆粒球を有することが報告されている (Hine,  
108 1992)。第二の顆粒球の機能についてはいくつかの報告が存在する。例えば、ゼ  
109 ブラフィッシュは好酸球を有し、抗寄生虫免疫に関与していることが報告され  
110 ている (Balla et al., 2010)。また、フグが有する好塩基球は、IgM 依存性および  
111 IgM 非依存性の脱顆粒および抗原提示を示すことが明らかになっている (Odaka  
112 et al., 2018)。この様に、真骨魚類の好酸球や好塩基球は重要な生体防御機能を有  
113 するため、それらの産生や機能を制御する、哺乳類の IL-5 family に相当するサ  
114 イトカインが真骨魚類においても存在する可能性は高い。

115 本研究では、循環血液中に好塩基球が比較的多く存在し (Suzuki, 1992)、ゲノ  
116 ムの解読がなされているコイにおいて (Kolder et al., 2016; Xu et al., 2014)、真骨

117 魚類で初めて **IL-5fam** 遺伝子のクローニングを行った。同定した遺伝子につい  
118 て、定常状態と免疫刺激状態における発現解析を行った。また、哺乳類細胞発現  
119 系を用いて組換えタンパク質を作製し、**IL-5fam** の腎臓白血球に対するシグナル  
120 伝達、細胞増殖、コロニー形成などの機能活性を検討した。  
121

## 3.2. 材料および方法

122

123

### 3.2.1. コイ IL-5fam 遺伝子の探索およびクローニング

124  
125 コイのゲノム配列上において、哺乳類の IL-4 および IL-13 と相同な分子とさ  
126 れる IL-4/13 の遺伝子が存在する領域の近傍について転写産物予測ソフトウェア  
127 (GENSCAN: <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) を使用して探索し、IL-5fam 遺  
128 伝子領域を推定した。IL-5fam 遺伝子に相当すると推定された領域の配列に、特  
129 異的なプライマーを作製し、コイ成魚の脾臓 cDNA を鋳型として PrimeSTAR HS  
130 DNA polymerase (Takara) を用いて RACE PCR および RT-PCR を行い、コイ IL-  
131 5fam1 および IL-5fam2 の全長配列を決定した。PCR、RACE-PCR、qRT-PCR およ  
132 び組換えタンパク質発現に使用したプライマーのリストは以下に示す (Table 3-  
133 1, 3-2, 3-3)。決定した全長配列を元に、Clustal Omega による多重配列比較解析お  
134 よび GENETYX version 11 を用いた unweighted pair group method (UPGMA) 法に  
135 よる分子系統解析を行った。

136

### 3.2.2. コイ好塩基球および好中球の分離

138 好塩基球は密度勾配遠心法によってコイの末梢血から分離した。すなわち、ヘ  
139 パリン処理シリンジを用いてコイ尾静脈から末梢血を回収し、ハンクス液で 10  
140 倍希釈後、5 mL の比重 1.122 の Percoll 液上に重層し、遠心を行った(400×g, 20  
141 分)。遠心後、好塩基球と赤血球を含む細胞塊を超純水で 1 分間ピペッティング  
142 することによって溶血処理した。次いで、細胞は遠心分離により MEM で 2 回洗  
143 浄し、MEM 培地で再懸濁した。

144 コイ好中球は第 2 章 2.2.3 の方法に準じて、分離した。

145

146 3.2.3. 大腸菌死菌によるコイに対する免疫刺激

147 *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$  株) を 10 mL の LB 培地中で、37°C、24 時間培養した  
148 後、菌体を回収し、10 mg/mL となるように生理食塩水に懸濁し、70°Cで 30 分間  
149 インキュベートして死滅させた。コイを免疫刺激するために、熱処理した大腸菌  
150 死菌の懸濁液 0.2 mL をそれぞれ 3 個体の小コイ?に腹腔内接種し、投与 5 時間  
151 後に安楽殺して頭腎と脾臓を採取した。

152

153 3.2.4. 腎臓白血球に対するマイトジェン刺激

154 腎臓白血球の免疫刺激は、既報の方法に若干の修正を加えて行った (Stolte et  
155 al., 2008)。分離した腎臓白血球を Phytohemagglutinine (PHA, Sigma-Aldrich)、LPS  
156 (Sigma-Aldrich) および poly I:C (Sigma-Aldrich) で刺激した。すなわち、E-  
157 RDF20/2.5 培地を用いて 24 穴プレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/well の濃度で細胞を播種  
158 し、PHA, LPS, poly I:C (各終濃度 0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) で 30°C、5 時間刺激した  
159 後、回収した。

160

161 3.2.5. コイ IL-5fam1 の定量 PCR による遺伝子発現解析

162 健康なコイの腸管、脾臓、体腎、鰓、脳、胸腺および頭腎の各組織片を回収し  
163 RNA later (Qiagen) 中にて保存後、TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いた total RNA 抽  
164 出を添付の説明書に従って行った。また、回収した total RNA は DNase I 処理後、  
165 Omniscript RT kit (Qiagen) を用いて cDNA 合成を行い、使用時まで -20°C で保存  
166 した。上記の cDNA をテンプレートとし、Thermal Cycler Dice Real Time System  
167 II (Takara) を用いたリアルタイム PCR を行った。内因性コントロールは  $\beta$ -actin  
168 を採用した。定量 PCR のサイクリング条件は、95°Cで 30 秒の後、95°Cで 5 秒、  
169 60°Cで 30 秒のサイクルを 40 回行った。データは Thermal Cycler Dice Real Time



170 System ソフトウェア (Takara) を用いて解析を行った。

171

### 172 3.2.6. 組換えタンパク質発現ベクターの作製

173 組換えコイ IL-5fam1 および  $\beta c$  の発現ベクターは、PA-tag (Wako)と共に哺乳  
174 類細胞発現用エピソーマルベクターである pEBMulti-Hyg (Wako) に挿入して構  
175 築した。コイの IL-5fam1 についてはシグナルペプチドを含む領域の配列に制限  
176 酵素認識配列が付加されるようプライマーを設計し、コイ脾臓の cDNA テンプ  
177 レートを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物について、それぞれ制限酵素  
178 *Bam*HI および *Xho*I を用いて切断し、アガロースゲル電気泳動にて分離、精製  
179 後、発現ベクターpEBMulti-Hyg にそれぞれ連結した。

180 コイ  $\beta c$  は、既存の配列 (XM\_019077358) を基に、細胞外領域について、*Bam*HI  
181 および *Xho*I の認識配列が付加されるようプライマーを設計し、コイ脾臓の  
182 cDNA テンプレートをを用いて PCR 増幅を行い、上述と同様の処理で発現ベクタ  
183 ーへ挿入した。

184

### 185 3.2.7. 組換えタンパク質安定発現細胞株の樹立

186 得られたコイ IL-5fam1 およびコイ  $\beta c$  発現用プラスミドをリポフェクション  
187 法にて HEK293T 細胞に遺伝子導入した。すなわち、Poly-L-Lysine (Sigma) コー  
188 トした 6 穴プレートに HEK293T を  $2 \times 10^5$  cells/well になるように播種し、15 mM  
189 HEPES (Sigma)、1%非必須アミノ酸 (Wako)、1%ピルビン酸ナトリウム (Wako)、  
190 10%FBS を含む DMEM (DMEM10) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。播種  
191 翌日の細胞に対して FuGENE® HD Transfection reagent (Promega) を使用して添  
192 付の説明書に従い遺伝子導入を行った。遺伝子導入 12 時間後に細胞を Poly-D-  
193 Lysin-coated 100 mm dish (Corning) に継代し、500  $\mu$ g/mL の Hygromycin B (Wako)

194 含有 DMEM10 を用いて遺伝子導入細胞の選択培養を行った。培養 60 時間後に、  
195 細胞と培養上清を回収し、組換えタンパク質の存在を検討した。組換えタンパク  
196 質は、HRP (Wako) を結合させた抗 PA-tag 抗体 (1 : 5000 希釈) を用いた western  
197 blotting により評価を行い、標的タンパク質の C 末端に付加されている PA-tag を  
198 検出した。ブロット膜は EzWestLumi plus (ATTO) を用いて現像し、冷却 CCD カ  
199 メラ (AE-9300 Ez-Capture MG, ATTO) と ImageSaver5 ソフトウェア (ATTO) を  
200 用いて発光シグナルを検出した。その後、組換えタンパク質を発現する HEK293T  
201 細胞を、Hygromycin B を 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含む DMEM10 を用いて選択培養し、選択さ  
202 れた細胞を、Hygromycin B を 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含む DMEM10 を用いて、5%CO<sub>2</sub> 存在  
203 下、37°Cで継続培養した。コンフルエントになった時点で、細胞を連続的に継代  
204 し、培養上清を 3 日ごとに回収してプールし、遠心して細胞と破片を除去し、孔  
205 径 0.45 $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過して、精製するまで 4°Cで保存した。

206

### 207 3.2.8. 組換えタンパク質の精製

208 安定発現細胞株の培養上清を約 300 mL 回収し、抗 PA-tag 抗体ビーズ (Wako)  
209 を用いて添付のプロトコールに従いアフィニティ精製を行った。すなわち、培養  
210 上清を 1 M Tris buffer にて pH 7.5 に調整し 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過した後、1  
211 mL (net beads volume 500  $\mu\text{L}$ ) の抗 PA-tag 抗体ビーズを添加して 4°C で 2 時間混  
212 和して目的タンパク質をビーズに結合させた。抗原結合ビーズを 50 mL チュー  
213 ブに入れ遠心 (7,500 $\times g$ 、1 分間) することにより沈降させ、氷冷した 5~10 mL  
214 のトリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS)にて遠心洗浄を 5 回以上繰り  
215 返した。洗浄した抗原結合ビーズは、ビーズ体積の 2 倍量の 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PA-tag ペ  
216 プチド TBS 溶液 (Wako) 入り 1.5 mL チューブに移し 4°C で 30 分間混和させた  
217 後、遠心 (7,500 $\times g$ 、30 秒) することにより上清中への PA-tag 融合タンパク質の

218 溶出した。これを 5~6 回繰り返して行い、回収した各分画のサンプルを SDS-  
219 PAGE し、Coomassie 染色および HRP 結合抗 PA-tag 抗体を用いた western blotting  
220 にて目的サンプルの存在と純度を確認した。溶出サンプルを限外濾過カラム  
221 (Amicon Ultra-2, 10 kDa, Merck) に移し遠心により濃縮後、SDS-PAGE にて純度  
222 を確認した。得られたタンパク質は Bradford 法 (Pierce Coomassie Bradford Protein  
223 Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定後、等量の 0.2% BSA 含 PBS と  
224 混合し、0.22  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターで濾過滅菌後、使用時まで 4°C にて保存  
225 した。

226

### 227 3.2.9. 組換え IL-5fam1 の生化学的性状の解析

228 組換え IL-5fam1 について、N型糖鎖修飾されているかどうかを確認するため、  
229 Glycopeptidase F キット (Takara) を用いて、添付の説明書に従って N 型糖鎖の消  
230 化処理を行った。2.5  $\mu\text{L}$  の 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  組換え IL-5fam1 溶液を等量の変性バッ  
231 ファーと混合し、100°C で 3 分間加熱した。その後、安定剤 5  $\mu\text{L}$  と超純水 13  $\mu\text{L}$  を  
232 加え、2  $\mu\text{L}$  (1 mU) の Glycosidase F の存在下または非存在下で、37°C、16 時間  
233 インキュベートした。処理したサンプルについて、10%ポリアクリルアミドゲル  
234 を用いた SDS-PAGE と、HRP 標識抗 PA-tag 抗体を用いた western blotting を行っ  
235 た。

236 組換え IL-5fam1 がオリゴマー化しているかどうかを確認するために、SDS-  
237 PAGE を還元条件または非還元条件で行った。すなわち、1  $\mu\text{g}$  の組換え IL-5fam1  
238 溶液を、還元剤であるジチオスレイトール (DTT) 添加、あるいは無添加で、等  
239 量の EZapply サンプルバッファー (ATTO) と混合し、15%ポリアクリルアミド  
240 ゲルを用いた SDS-PAGE と、western blotting を行った。

241

242 3.2.10. 組換え IL-5fam1 による腎臓白血球に対する増殖活性の検討

243 6 個体のコイから分離した頭腎および体腎の白血球を、E-RDF20/2.5 培地で  
244  $8 \times 10^5$  cells/mL の濃度に調整した。この細胞懸濁液を 96 穴プレートの各ウェルに  
245 50  $\mu$ L ずつ加え、そこに E-RDF20/2.5 培地の処理液を容量 50  $\mu$ L ずつ加えた。処  
246 理液は、E-RDF 培地 (ネガティブコントロール)、コイ G-CSF $\alpha$ 1 (ポジティブコン  
247 トロール、終濃度 100 ng/mL)、の組換え IL-5fam1 (終濃度 0.16, 0.8, 4, 20, 100  
248 ng/mL) を用いた。各条件における細胞増殖の定量は、第 2 章 2.2.8 の方法に準  
249 じた MTT アッセイによって行った。

250

251 3.2.11. 増殖した細胞の性状解析

252 コイから回収した腎臓細胞を前述の細胞増殖試験と同様の方法で 9 日間培養  
253 した後、増殖した細胞を回収し、サイトスピン (Shandon) により標本を作製し  
254 た。その後、MGG 染色を行い、顕微鏡 (Olympus BX51) にて細胞の形態を観察  
255 した。

256

257 3.2.12. コイ IL-5fam1 のコロニー形成刺激能の検討

258 コロニーアッセイはメチルセルロースと軟寒天の 2 層培養法を用いた。すな  
259 わち、滅菌済みの 1.2% soft agar (SeaPlaque agar, Takara) 溶液と 2 倍濃縮 E-RDF  
260 培地をそれぞれ 40°C で保温し、その後両者を混和し、同じ温度で保温した。次  
261 に、この 0.6% 軟寒天 E-RDF 培地、FBS およびコイ血清 (1/2 $\times$ ストック) をそれ  
262 ぞれ 0.75 mL、0.2 mL および 0.05 mL をディッシュ上で混和し、固化するまで  
263 冷ました。続いて、この軟寒天層の上に、腎臓白血球浮遊液をメチルセルロース  
264 培地と混和して播種した。すなわち、コイ腎臓細胞浮遊液および血清 Mix  
265 (FBS:1/2 コイ血清=4:1) を等量混和したものと、2%メチルセルロース含有 E-

266 RDF ストック液を等量混和し、さらに 組換えコイ IL-5fam または 組換えコイ  
267  $\beta c$  を添加した。この細胞 /メチルセルロース含有培地混和液を 16 G blunt-end 針  
268 を装着したシリンジに取り、これを 1 mL ずつ軟寒天層の上に注いだ。それぞれ  
269 のシャーレは、30°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 3~13 日培養した。

270

### 271 3.2.13. 形成されたコロニーの染色および形態観察

272 2 層の半固形培地に形成された細胞コロニーは、顕微鏡下でマイクロピペッ  
273 トにより吸引した。それらのコロニー細胞を MEM に再懸濁し、サイトスピンを  
274 用いて細胞遠心分離して調製した。スライドを乾燥、固定し、MGG 染色、ペル  
275 オキシターゼ染色、Periodic Acid Schiff (PAS) 染色を行った。細胞質のムコ多糖  
276 とグルコースを区別するために、固定した細胞塗抹標本を唾液アミラーゼに 15  
277 分間曝した後、PAS 染色を行った。

278

### 279 3.2.14. 形成されたコロニーの遺伝子発現解析

280 造血系マーカー遺伝子の発現は、コイの各血球系列に特異的なプライマーと  
281 KOD FX (Toyobo) を用いた RT-PCR で解析した。標的遺伝子は、骨髓球造血  
282 (*cebpa*)(Ma et al., 2014)、好酸/好塩基球造血 (*gata2*)(Balla et al., 2010; Zon et al.,  
283 1993)、赤血球造血 (*gata1*)(Rhodes et al., 2005)に関わる転写因子、好中球マーカ  
284 ー (*mpx*)(Katakura et al., 2019; Katzenback and Belosevic, 2009; Katzenback et al.,  
285 2016)、単球/マクロファージマーカー (*csfl1r*, *irf8*)(Katzenback and Belosevic, 2009;  
286 Katzenback et al., 2016; Kurotaki et al., 2014)、T 細胞マーカー (*lck*)(Araki et al., 2007)、  
287 栓球マーカー(*cd41*)(Lin et al., 2005) を用いた。PCR は、94°Cで 2 分間の 1 サイ  
288 クルに続いて、98°Cで 10 秒間の変性、58°Cで 30 秒間のアニーリング、68°Cで  
289 30 秒間の伸長を 25~38 サイクル行った。成熟細胞の対照群には、上述で述べた

290 方法で回収した腎臓好中球と腎臓好塩基球を用いた。また、好中球前駆細胞とし  
291 ての対照群に、2章で好中球造血因子とされた組換えコイ G-CSFb1 刺激により  
292 形成されたコロニーを用いた。

293

### 294 3.2.15. 透過型電子顕微鏡による細胞の形態観察

295 0.1M リン酸緩衝液中の 2%グルタルアルデヒドで細胞を固定し、以下の分析  
296 手順を花市電子顕微鏡技術研究所に委託した。細胞を 12%ゼラチン/PBS に包埋  
297 し、ペレット化した。続いて、ゼラチンペレットを 2%四酸化オスミウム緩衝液  
298 で固定し、洗浄した後、段階的に濃度を変えたエタノール (30~100%) で脱水  
299 し、プロピレンオキシドに置換した。試料は Epon-812 (Electron Microscopy  
300 Sciences) に包埋した。試料より、薄さ 80-90nm の切片を切りとり、コロジオン  
301 コートしたクーパーグリッドにマウントし、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色  
302 した後、H-7600 電子顕微鏡 (Hitachi) を用いて 100kV の電圧で観察した。

303

### 304 3.2.16. 組換え IL-5fam1 による腎臓細胞への刺激に伴う STAT5 活性化の解析

305 コイの腎臓の白血球を氷冷した MEM 培地に再懸濁し、組換え IL-5fam1 によ  
306 る刺激を行うまで氷上で保存した。続いて、 $5 \times 10^6$  個の細胞を 20 ng/mL の組換  
307 え IL-5fam1 の存在下で、5% CO<sub>2</sub> 中 30°C で 0 分および 30 分インキュベートし  
308 た。培養後、0.1% Triton-X100 を含む氷冷した 50mM Tris-buffered saline で細胞を  
309 溶解し、16,000×g で 5 分間、4°C で遠心分離し、上清を得た。細胞溶解液のタン  
310 パク質濃度を測定し、6 μg のサンプルを、5-15%のポリアクリルアミド勾配を含  
311 む分離ゲルを用いた SDS-PAGE で分析した後、western blotting を行った。ブロッ  
312 ティングした PVDF 膜を Block-Pro 1×ブロッキングバッファー (Wako) で処理  
313 し、1:1000 に希釈した抗 phospho STAT5 (Y694) 抗体 (Cell Signaling Technology,

314 CST, #9351) または 1:500 に希釈した抗 total STAT5 抗体 (CST, #936)で反応後、  
315 続いて 1:1000 に希釈した抗ウサギ IgG HRP 結合抗体 (CST) で反応させた後に  
316 上述と同様の方法で発光シグナルを検出した。

317

### 318 3.2.17. 統計解析

319 統計解析は、Prism 9 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行  
320 った。解析法はそれぞれ un-paired Student's *t*-test (Fig. 3-4)、one-to-one comparisons  
321 and a (repeated-measures) one-way analysis of variance (ANOVA) と Dunnet's *post-*  
322 *hoc* test の組み合わせ (Fig.3-6, Fig. 3-8, Fig.3-13) を行い、P 値 0.05 以下の値を有  
323 意と認めた。

324

325

### 3.3. 結果

326

327

#### 3.3.1. 同定されたコイ IL-5fam 遺伝子の *in silico* 解析

329 軟骨魚類であるゾウギンザメのゲノム上において、哺乳類の Th2 サイトカインとされる IL-4 および IL-13 と相同な遺伝子である、IL-4/13 遺伝子の付近に IL-5fam 遺伝子が存在することが報告されている (Yamaguchi et al., 2015)。コイのゲノムデータベースを用いて、IL-4/13 パラログ (*il-4/13a1*, *il-4/13a2*, *il-4/13b1*, *il-4/13b2*) 付近の遺伝子を探索したところ、翻訳可能な IL-5fam 様の遺伝子と予測される 2 種類 (*il-5fam1*, *il-5fam2*) を、それぞれ IL-4/13B1 および IL-4/13B2 遺伝子の近傍に発見した (Fig. 3-1)。

336 2 つのコイ IL-5fam 遺伝子に特異的なプライマーをそれぞれ作製し、それらを用いた PCR 法により、cDNA 転写産物を増幅し、シーケンス解析および推定アミノ酸配列の解析を行った。その結果、IL-5fam1 および IL-5fam2 のオープンリーディングフレーム (438、432bp) は、それぞれ 146、144 個のアミノ酸をコードし、4 つの exon を有することが明らかとなった。この exon-intron 構造は、四肢動物の IL-5 および GM-CSF の構造と類似していた (Fig. 3-2)。さらに四肢動物の IL-5 family と魚類 IL-5fam のアミノ酸配列について、アライメント解析を行った結果、哺乳類の IL-3、IL-5、GM-CSF における  $\alpha$ -helix の A 領域に存在する、リガンド- $\beta$ c 受容体相互作用に必須のグルタミン酸残基の位置が (Barry et al., 1994; Hercus et al., 1994; Tavernier et al., 1995)、コイの IL-5fam においても保存されていた (Fig. 3-3)。一方、系統解析の結果、魚類 IL-5fam は哺乳類の IL-5 family と異なるクラスターに分類された (Fig. 3-4)。また、アミノ酸配列の類似性は、哺乳類の IL-5 family と比較しても、20.6~27.5% と非常に低かった。一方、コイ IL-5fam 間におけるアミノ酸配列の類似性は 57.3% であった (Table. 3-3)。本研究



350 では、2 種類のコイ IL-5fam のうち、IL-5fam1 に着目して詳細な解析を行った。

351

### 352 3.3.2. 死菌投与コイの頭腎および脾臓における IL-5fam1 遺伝子発現解析

353 正常なコイの各組織（腸管、脾臓、腎臓、鰓、脳および胸腺）における、*il-*  
354 *5fam1* の発現量をリアルタイム RT-PCR にて調べた結果、解析を行ったいずれ  
355 の組織においても CT 値が検出限界以下である 35 以上となり、*il-5fam1* は定常  
356 状態のコイ全身組織において発現量が極めて低いことがわかった (data not  
357 shown)。定常状態のコイ頭腎および脾臓の *il-5fam1* の発現量はそれぞれ、 $1.7 \times 10^{-6}$   
358 および  $3.7 \times 10^{-6}$  であったが、大腸菌の加熱死菌をコイの腹腔内に投与すると、  
359 頭腎および脾臓における *il-5fam1* の発現量は、それぞれ  $1.1 \times 10^{-5}$  および  $8.5 \times 10^{-6}$   
360 であった。統計解析を行った結果、頭腎における加熱死菌投与後の発現上昇は優  
361 位 ( $P \leq 0.05$ ) であることが認められた (Fig. 3-5)。

362

### 363 3.3.3 マイトジェン刺激コイ腎臓白血球における IL-5fam1 遺伝子発現解析

364 コイの腎臓白血球に対して PHA, LPS, PolyI:C を 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の各濃度  
365 で 5 時間刺激培養を行い、それらの細胞を回収し、定量 RT-PCR を行った。そ  
366 の結果、T 細胞マイトジェンである PHA を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で添加した培養細  
367 胞において、無刺激の細胞と比べ約 15 倍の顕著な発現増強が認められた。また、  
368 その他の刺激においても無刺激の対照群と比較して 3~5 倍程度の発現増強が認  
369 められた。統計解析を行った結果、PHA を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で刺激した細胞は、  
370 無刺激の細胞と比較し、*il-5fam1* の有意な発現上昇を示した (Fig. 3-6)。

371

### 372 3.3.4. 組換えコイ IL-5fam1 の性状解析

373 コイ IL-5fam1 の機能を明らかにするため、HEK293T 細胞の発現系で調製した

374 組換え IL-5fam1 を PA-tag アフィニティ精製法で精製し、組換えタンパク質を作  
375 製した。精製したタンパク質を SDS-PAGE に供し、クマシー染色を行ったとこ  
376 ろ、分子量 15 kDa と 19 kDa 付近に 2 本のバンドが認められた (Fig. 3-7A)。分子  
377 量が小さい方のバンドは、PA-tag が付加された組換え IL-5fam1 の予想分子量で  
378 ある 16.2 kDa とほぼ一致した。コイの IL-5fam1 には exon 4 の予測アミノ酸配列  
379 に、N-結合型糖鎖を形成する可能性のある 3 つの NXS/T モチーフが存在する  
380 (Fig. 3-3)。そのため、分子量が 19 kDa のバンドは糖鎖付加を受けたタンパク質  
381 である可能性が考えられた。Glycopeptidase F を用いて組換え IL-5fam1 の N-結  
382 合型糖鎖の切断を試みたところ、抗 PA-tag 抗体を用いた western blotting におい  
383 て、15 kDa 付近に 1 本のバンドのみが検出され、19 kDa のバンドの消失が認め  
384 られた。

385 哺乳類の IL-5 はジスルフィド結合によりホモ 2 量体を形成するため  
386 (Takahashi et al., 1990)、コイの組換え IL-5fam1 について還元および非還元条件下  
387 で western blotting を行った。実験の結果、還元状態と非還元状態において分子量  
388 の違いは認められなかった (Fig. 3-7C)ため、組換え IL-5fam1 は単量体で存在す  
389 ると考えられた。

390

### 391 3.3.5. コイ IL-5fam1 の腎臓造血細胞に対する作用

392 コイ IL-5fam1 の造血活性を明らかにするため、コイ造血細胞を含む腎臓白血  
393 球を生体より分離し、組換え IL-5fam1 (0.16, 0.8, 4, 20, 100 ng/mL) 存在下で培養  
394 した。その結果、0.16 ng/mL 以上でコイ腎臓白血球の増殖が認められた。また、  
395 組換え IL-5fam1 は培養 9 日目に 20 ng/mL で最大の増殖活性を示した (Fig. 3-  
396 8A)。組換え IL-5fam1 存在下で培養した細胞のサイトスピン塗沫標本を作製し、  
397 MGG 染色を行ったところ、細胞質が青染する幼若な形態の細胞と好塩基性の顆

398 粒を含む顆粒球様の細胞が混在していた。加えて、幼若細胞において細胞の分裂  
399 像が認められた (Fig. 3-8B)。

400

### 401 3.3.6. コイ IL-5fam1 のコロニー形成刺激試験

402 増殖細胞の詳細な性状解析を行うため、コロニー形成試験を行った結果、20  
403 ng/mL の組換え IL-5fam1 の存在下で、2 種類 (Type 1, Type 2) のコロニーが観察  
404 された。Type 1 のコロニーは、コロニーの中心部では細胞が密に凝集し、辺縁部  
405 では細胞が散在した形態を示した。一方、Type 2 のコロニーは、細胞が密に集合  
406 した球状のコロニーであった (Fig. 3-9A)。また、Type 1 のコロニーが大多数を  
407 占め、Type 2 のコロニーはほとんど観察されなかった。Type 1 のコロニーは培養  
408 5 日目より形成され、11 日目に形成数はピークとなり、細胞を  $1.0 \times 10^5$  個播種し  
409 た well において、約  $3.2 \times 10^2$  個のコロニー形成が認められた。一方、Type 2 のコ  
410 ロニーは培養 7 日目に平均で約  $4.0 \times 10^1$  個認められたが、時間の経過とともに  
411 徐々に消失した (Fig. 3-9B)。

412

### 413 3.3.7. コロニーの形態および遺伝子発現

414 コロニーの性状を明らかにするため、コロニーを回収し、それらの構成細胞に  
415 ついて、細胞形態解析、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および RT-PCR による発  
416 現解析を行った。コロニー細胞の形態観察を行った結果、2 種類のコロニーの細  
417 胞は、MGG 染色後においてそれぞれ異なった特徴を示した。Type 1 のコロニー  
418 は、好塩基性の細胞質を持つ未熟な形状の細胞と、円形から楕円形を呈した核が  
419 偏在し細胞質に好塩基性の顆粒を有する細胞が混在していた。

420 Type 1 コロニーの細胞が有する顆粒の特徴を明らかにするため、コロニー構  
421 成細胞について、PAS 染色とペルオキシダーゼ染色を行い、生体から分離した腎

422 臓好中球および腎臓好塩基球と比較した。コイの顆粒球は、PAS 染色陽性、ペル  
423 オキシターゼ染色陰性の好塩基球と PAS 染色陰性、ペルオキシターゼ染色陽性  
424 の好中球から構成される (Suzuki, 1986)。染色の結果、Type 1 のコロニーでは、  
425 PAS 陽性だが、ペルオキシターゼは陰性の細胞が多く存在していた。また、両染  
426 色とも陰性の細胞も混在していた。一方、Type 2 のコロニーでは、多くの細胞が  
427 クロマチンの凝縮が不十分な核と好塩基性の細胞質を有する幼若な細胞であり、  
428 不定形の細胞質を有するマクロファージ様細胞も少数存在していた。また、Type  
429 2 のコロニー細胞は、PAS およびペルオキシターゼがともに陰性であったため、  
430 顆粒球を含まないことが示唆された (Fig. 3-10)。

431 組換え IL-5fam1 により増殖が刺激された顆粒球が好塩基球であるかを確認  
432 するため、コロニー細胞を回収し、細胞内部の微細構造を TEM 分析で観察した。  
433 即ち、組換え IL-5fam1 存在下でコロニー形成培養を行い、培養 7 日目に Type 1  
434 と Type 2 のコロニーを混合して全細胞を採取し、コイの腎臓の好中球および好  
435 塩基球と比較した。コイの腎臓の成熟好中球は、最大長径 500 nm の細長い形態  
436 をした顆粒を有し、内部には電子密度の高い棒状の構造体が存在していた (Fig.  
437 3-11A, Fig. 3-11B)。また、コイの腎臓の成熟好塩基球は、最大直径 1  $\mu\text{m}$  で電子  
438 密度が高い、円形もしくは楕円形の顆粒を有していた (Fig. 3-11C, Fig. 3-11D)。一  
439 方、コロニー構成細胞の顆粒球は、好塩基球と同様の形状および電子密度を持つ  
440 顆粒を有していた (Fig. 3-11C-H)。加えて、コロニー構成細胞は様々な分化段階  
441 の好塩基球様細胞が含まれていた。すなわち、未成熟と考えられる好塩基球では  
442 小さな顆粒がわずかに認められ (Fig. 3-11E)、成熟好塩基球では顆粒の大きさ  
443 数が増加していた (Fig. 3-11G, Fig. 3-11H)。これは、Fig. 3-11E から Fig. 3-11G の  
444 順番に、顆粒の大きさと数が段階的に変化していることから支持される。また、  
445 コロニー細胞の細胞小器官には、豊富なミトコンドリア (Fig. 3-11I) とゴルジ装

446 置が存在し、活発に顆粒を生成していることが分かった (Fig. 3-11J)。

447 コロニー細胞の特徴をより詳細に明らかにするため、各血球系列のマーカー  
448 遺伝子について発現解析を行った。始めに、Type 1 および Type 2 コロニーの遺  
449 伝子発現パターンと、腎臓白血球、分離した成熟好中球、成熟好塩基球および第  
450 2 章で好中球造血因子であることが確認された G-CSFb1 刺激により形成された  
451 コロニー細胞の発現パターンを比較した (Fig. 3-12)。Type 1 コロニーは、骨髄  
452 球系細胞の発生に関与する *cebpa*、好酸球・好塩基球の発生に関与する *gata2* を  
453 高発現し、マクロファージコロニー刺激因子の受容体遺伝子である *csflr* をわず  
454 かに発現した。一方、他のマーカー遺伝子は発現しなかったことから、Type 1 コ  
455 ロニーは好塩基球とマクロファージの共通前駆細胞に由来することが考えられ  
456 た。また、Type 2 コロニーは、*cebpa* とマクロファージマーカーである *csflr* お  
457 よび *irf8* を高発現していたため、マクロファージ系の前駆細胞に由来すること  
458 が示唆された。さらに、Type 1 と Type 2 のコロニーはいずれも  $\beta c$  を高発現して  
459 いた。一方、成熟顆粒球や G-CSFb1 により形成されたコロニー細胞はほとんど  
460 発現していなかった (Fig. 3-12)。

461

### 462 3.3.8. コイ $\beta c$ によるコロニー形成阻害

463 コイ  $\beta c$  が IL-5fam1 の受容体であるかを確かめるため、 $\beta c$  細胞外領域の組換  
464 えタンパク質を作製し、コロニー形成培養に用いることで、コロニー形成阻害試  
465 験を行った。腎臓白血球に 0.8 ng/mL の組換え IL-5fam1 を単独で添加してプレ  
466 ーティングしたところ 300 個以上のコロニー形成が認められたため、0.8 ng/mL  
467 の組換え IL-5fam1 と様々な濃度の組換え  $\beta c$  を混合し (混合試料)、プレインキ  
468 ュベートを行った。組換え IL-5fam1 と  $\beta c$  の混合試料をコロニー形成培養に供し  
469 た結果、組換え  $\beta c$  の濃度が 100 ng/mL 以上で、組換え  $\beta c$  を添加していない培養

470 と比較し、コロニー形成が 50%程度抑制された。一方、組換え IL-5fam1 を 1000  
471 ng/mL の熱不活化した組換え  $\beta$ c とプレインキュベートした場合、抑制効果は認  
472 められなかった (Fig. 3-13)。加えて、 $\beta$ c 単独あるいは組換え IL-5fam1 を添加し  
473 ない培養では、コロニー形成は認められなかった (data not shown)。

474

#### 475 3.3.9. コイ IL-5fam1 のシグナル伝達経路

476 コイ IL-5fam1 が JAK-STAT 経路を介したシグナル伝達を行うかを明らかにす  
477 るため、コイの腎臓白血球を組換え IL-5fam1 で 30 分刺激した後、それらの細胞  
478 溶解液を抗-phosphoSTAT5 抗体を用いた western blotting に供した。その結果、組  
479 換え IL-5fam1 で刺激した細胞溶解液において、抗-phosphoSTAT5 抗体によりリ  
480 ン酸化された STAT5 が特異的に検出されるバンドが認められた (Fig. 3-14A)。さ  
481 らに、抗-phosphoSTAT5 抗体に反応するバンドは、細胞刺激の際に 100 nM 以上  
482 の JAK 阻害剤を添加した場合、検出されなかった (Fig. 3-14B)。

483

#### 4.考察

484

485

486 本研究では、哺乳類の IL-5 family (IL-5, IL-3, GM-CSF) に類似すると考えられ  
487 る真骨魚類の IL-5 family サイトカインを同定し、その機能解明を試みた。コイ  
488 のゲノムデータベースより、コイ IL-5fam 遺伝子の探索を行ったところ、Th2 サ  
489 イトカインと考えられる IL-4/13 遺伝子の近傍にコイ IL-5fam が存在していた。  
490 このことから、哺乳類や軟骨魚類と同様、真骨魚類においても Th2 サイトカイ  
491 ン遺伝子群のゲノムシンテニー構造が保存されていることが明らかとなった。  
492 また、コイの IL-5fam を含む魚類 IL-5fam と哺乳類の IL-5 family サイトカイン  
493 は、系統解析において異なるクラスターに分類され、IL-5fam が魚類特有の遺伝  
494 子であることが分かった。さらに、四肢動物の IL-5family と魚類 IL-5fam 間のア  
495 ミノ酸配列の相同性は、約 16%～約 27%と低かったが、哺乳類 IL-5family の  $\alpha$ -  
496 helix の A 領域に存在する、IL-5 family サイトカインと  $\beta$ c 受容体の相互作用に必  
497 須であるグルタミン酸残基は、コイを含む魚類のほとんどの IL-5fam において保  
498 存されていた (Hercus et al., 1994; Tavernier et al., 1995)。これらのことから、魚類  
499 の IL-5fam と哺乳類の IL-5 family は、 $\beta$ c 受容体との結合を介して同じシグナル  
500 伝達経路を共有する、同一の祖先分子から派生したサイトカインであることが  
501 示唆された。本研究において、IL-5fam が機能的な分子であることが示されたが、  
502 ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) やメダカ (*Oryzias latipes*) では、IL-5fam 遺伝子  
503 は発見されなかった。また、ゼブラフィッシュの IL-5fam はゲノムデータベース  
504 上では偽遺伝子として存在し、疑似 4 倍性魚種であるコイにおいては 2 種類し  
505 か発見されなかった (Yamaguchi et al., 2015)。このような保存性の低さは、ニワ  
506 トリ等の哺乳類以外の脊椎動物における IL-5 family でも認められている。この  
507 ことは、魚類 IL-5fam と哺乳類 IL-5 family の共通祖先分子が、進化に伴う環境

508 の変化に適応するため、多様な変異を遂げてきたことを示している。

509 コイ IL-5fam の機能的特性を明らかにするべく、取得した配列をもとに、定常  
510 状態と免疫刺激時における IL-5fam の遺伝子発現解析を行った。本研究では、魚  
511 類 IL-5fam の機能解明の足掛かりとして、2 つのコイ IL-5fam を代表して IL-  
512 5fam1 について詳細な解析を行った。ヒトにおける IL-5 の過剰産生は、好酸球  
513 増加をもたらし、蠕虫排除に寄与するが、同時に、炎症性疾患やアレルギー性疾  
514 患等の様々な好酸球増多症の原因となる (Sanderson, 1992)。そのため、IL-5 の定  
515 常状態における発現は低レベルで制御されていることが報告されている  
516 (Bohjanen et al., 1990)。IL-5 と同様に、哺乳類における IL-3 や GM-CSF の発現に  
517 ついても定常状態では発現が低い、感染症などの病的な状況下では発現が上  
518 昇し、宿主防御に貢献していることが報告されている (Broughton et al., 2012)。  
519 コイ IL-5fam1 の発現レベルは、調べたすべての組織で非常に低かったが、大腸  
520 菌死菌を腹腔内に投与すると、腎臓と脾臓でその発現が強く誘導された。このこ  
521 とは、哺乳類の IL-5 family と同様に、コイの IL-5fam1 も感染刺激時に誘導的に  
522 産生されることを示唆している。さらに、腎臓の白血球では、T 細胞マイトジェ  
523 ンである PHA の刺激により、IL-5fam1 の発現が有意に上昇した。これは、IL-  
524 5fam1 が活性化 T 細胞によって産生されることを示唆している。哺乳類 IL-5  
525 family は活性化 T 細胞から産生されることが報告されているため (Dougan et al.,  
526 2019)、魚類の IL-5fam も同様の産生機構を有することが考えられた。今後、ど  
527 のような T 細胞サブセットが IL-5fam1 を分泌するのか、また、どのような刺激  
528 が IL-5fam1 産生を引き起こすかについては、さらなる研究が必要である。

529 コイの IL-5fam1 のさらなる機能を明らかにするため、哺乳類細胞発現系で組  
530 換えコイ IL-5fam1 を作製した。コイの組換え IL-5fam1 の生化学的性状解析を行  
531 った結果、組換え IL-5fam1 は N 結合型糖鎖修飾を受けており、さらに、哺乳類



532 の IL-5 が 2 量体であるのに対し、単量体で存在することを明らかにした。また、  
533 IL-3 および GM-CSF も単量体として存在するため (Murphy and Young, 2006)、脊  
534 椎動物の IL-5 family の祖先分子は単量体である可能性が考えられた。

535 組換え IL-5fam1 の腎臓白血球に対する活性を検討した結果、組換え IL-5fam1  
536 は、コイの腎臓白血球の増殖とコロニー形成を用量依存的に促進した。一方、組  
537 換え IL-5fam1 は脾臓細胞の増殖や末梢血白血球数の増加を誘導しなかったため  
538 (data not shown)、コイの IL-5fam1 は腎臓白血球に含まれる幼若な造血細胞に対  
539 する分化・増殖因子として作用すると考えられる。

540 続いて、組換え IL-5fam1 により形成されたコロニーの性状を明らかにするこ  
541 とで、コイ IL-5fam1 の血球産生因子としての詳細な機能を明らかにした。哺乳  
542 類の IL-3 や GM-CSF は多系列のコロニー形成を促し (Becher et al., 2016; Suda et  
543 al., 1985)、IL-5 は好酸球系統に限定したコロニー形成を誘導する (Yamaguchi et al.,  
544 1988)。本研究では、組換え IL-5fam1 によって誘導されたコロニーにおける構成  
545 細胞の特徴を調べると、形態学的特徴、細胞に含まれる顆粒の生化学的性状、遺  
546 伝子発現様式、細胞内の超微細構造から、主に形成される Type1 コロニーは好  
547 塩基球/マクロファージ共通前駆細胞由来であり、少数形成される Type2 コロニ  
548 ーはマクロファージ系列の前駆細胞に由来することが考えられた。今回、好塩基  
549 球のマーカースとして用いた転写因子 *gata2* はゼブラフィッシュにおいて好酸球  
550 マーカーである (Balla et al., 2010)。本研究により *gata2* 陽性の顆粒球産生が IL-  
551 5fam1 により促進されたため、真骨魚類における好酸球や好塩基球等の第 2 の顆  
552 粒球の産生には、哺乳類と同様、IL-5 family サイトカインが関与していることが  
553 示唆された。さらに、主に形成されたコロニーは好塩基球系列前駆細胞由来であ  
554 ったため、哺乳類の IL-5 と同様、特定の血球系列限定的な作用を有することが  
555 考えられた。哺乳類 IL-5 の機能は、造血活性だけでなく、好酸球の活性化や B

556 細胞の IgA 産生細胞への分化誘導など、いわゆる 2 型免疫の主要な制御サイト  
557 カインとしての働きもある。魚類では、哺乳類の 2 型免疫に相当する生体防御  
558 システムの詳細な分子制御機構は解明されていないため、IL-5fam の詳細な機能  
559 解析によって、それらを明らかにできる可能性がある。また、最も重要なことと  
560 して、2 種類のコロニーはともに、 $\beta c$  遺伝子を発現していた。そのため、コイ IL-  
561 5fam1 がコイ  $\beta c$  のリガンドとして機能することが示唆された。

562 コイ IL-5fam1 が  $\beta c$  のリガンドとして機能しているかを明らかにするため、組  
563 換えコイ  $\beta c$  を用いて IL-5fam1 のコロニー形成阻害試験を行った。哺乳類では、  
564 IL-5family サイトカインは、まずリガンド特異的な  $\alpha$  鎖受容体と低親和性で結合  
565 してリガンド-受容体複合体を形成し、その後、高親和性に  $\beta c$  受容体と結合して  
566 シグナル伝達することが知られている (Lopez et al., 1992)。本研究において、組  
567 換え  $\beta c$  は IL-5fam によるコロニー形成を用量依存的に阻害した。このことから、  
568  $\beta c$  が IL-5fam1 と相互作用することが明らかになった。しかし、架橋剤である  
569 disuccinimidyl suberate (DSS) を用いても、組換えコイ IL-5fam1 が組換えコイ  $\beta c$   
570 に直接結合することは確認できなかった (data not shown)。これまでのところ、  
571 魚類では IL-5fam の  $\alpha$  鎖受容体の候補は報告されていない。しかしながら、本研  
572 究の阻害実験にはコイ血清を用いているため、血清中に存在する分泌型の  $\alpha$  鎖  
573 が IL-5fam と結合し、組換え  $\beta c$  と高親和性に結合することで、コロニー形成の  
574 阻害が起きた可能性が考えられる。

575 最後に、本研究により、組換えコイ IL-5fam1 がコイの腎臓白血球に対して、  
576 JAK- STAT 経路を介して細胞内シグナル伝達を行うことを明らかにした。哺乳  
577 類の  $\beta c$  は、IL-5 family の結合により、JAK-STAT 経路を介したシグナル伝達を  
578 担うことが明らかとなっている (Shearer et al., 2003)。本実験では、コイのリン酸  
579 化された STAT5 は、他の種の STAT5 (~92kDa) と比較して、低分子量 (~60kDa)

580 の領域に検出された。 Guarienti らは、ゼブラフィッシュの胚において、リン酸  
581 化された STAT5 には3つのアイソフォーム（それぞれ90、70および18kDa）が  
582 存在することを報告している (Guarienti et al., 2015)。また、コイの組換えトロン  
583 ボポエチン (TPO) も 60 kDa の STAT5 のリン酸化を誘導したため (data not  
584 shown)、コイの腎臓白血球では、60 kDa のアイソフォームが活性化することが  
585 考えられた。これらの結果より、IL-5fam は  $\beta c$  のリガンドであり、哺乳類の IL-  
586 5 family と同様のシグナル伝達を行うことが明らかになった。

587 本研究では、コイ IL-5fam の好塩基球産生因子としての機能が明らかになった  
588 が、今後、成熟好塩基球に対する作用についても検討する必要がある。哺乳類の  
589 IL-5 family は以下のように、成熟好酸球や好塩基球の機能を制御することが知  
590 られている。

591 (i) IL-5 を欠損したマウスでは、蠕虫感染後の好酸球の産生が著しく阻害される  
592 (Kopf et al., 1996)。

593 (ii) IL-3 欠損マウスを用いた研究では、IL-3 が線虫感染下で好塩基球の産生とそ  
594 の反応を促進する(Lantz et al., 1998)。

595 (iii) ヒトの GM-CSF は、アレルギー性炎症や喘息の過程で好酸球のプライミン  
596 グを誘導する(Pazdrak et al., 2011)。

597 本研究の結果では、コイの成熟好塩基球において、 $\beta c$  の発現は認められな  
598 かった。しかしながら、4倍性魚種であるコイは、 $\beta c$  を複数有している可能性があ  
599 るため、成熟好塩基球には IL-5fam1 と結合可能な  $\beta c$  の重複分子が発現している  
600 可能性も考えられる。また、今回解析を行っていない IL-5fam2 が  $\beta c$  の重複分子  
601 に作用する可能性も考えられるため、成熟好塩基球に対するコイ IL-5fam の作用  
602 については、受容体を含めた更なる解析が必要である。

603 以上のように、本研究では、哺乳類の IL-5、IL-3、GM-CSF とのシンテニー、

604 発現様式、機能に関する類似性から、共通の祖先分子を有する新規の真骨魚類の  
605 サイトカインを同定した。コイ IL-5fam1 は、死菌や PHA などの免疫刺激に反応  
606 して産生され、 $\beta c$  受容体を介して JAK-STAT5 シグナル経路を伝達し、主に好塩  
607 基球の産生を促進する。このことから、IL-5 family と  $\beta c$  の相互作用からなる免  
608 疫制御システムは、脊椎動物の進化において高度に保存されていることが明ら  
609 かになった。本研究は、脊椎動物において、IL-5 family の機能が保存されている  
610 ことを示した初めての研究である。これらの知見は、真骨魚類において、機能が  
611 明らかになっていない好酸球や好塩基球の詳細な機能解析や魚類における 2 型  
612 免疫の制御メカニズムを解明する上で、重要な成果である。

613 **Table 3-1. Oligonucleotide primers used for cDNA cloning from carp and construction of**  
 614 **expression plasmid vectors.**

Primer name	Primer nucleotide sequences (5' - 3')	Application
IL-5fam1_3'	AGAATGCACGTGAGTGTGACGCCTTA	3' RACE
IL-5fam1_5'	GTGAAGGTGCAGGTGACGATTGACC	5' RACE
IL-5fam1_full_F	GAAAGCATCCCTGTGAACAAGA	CDS cloning
IL-5fam1_full_R	ATGTAATCCACATCTCCATAGCAGT	
IL-5fam1_EukExp_XhoI_F	ATCTCTCGAGAACATGAAACTGCTA	Construction of an expression plasmid vector
IL-5fam1_EukExp_BamHI_R	GCTAGGATCCTTTGCAGATCAC	
$\beta$ c_EukExp_XhoI_F	ACCCTCGAGATGTTGTCCAC	Construction of an expression plasmid vector
$\beta$ c_EukExp_BamHI_R	AATGGATCCAGGGCTGATG	
IL-5fam2 full F	AAAGCATCCCTGCGAACAAG	CDS cloning
IL-5fam2 full R	AGGATAGAGAACACAGACTGGTCAA	

615  
 616  
 617  
 618  
 619  
 620  
 621  
 622  
 623

624

625

**Table 3-2. Oligonucleotide primers used for gene expression analysis with quantitative RT-PCR.**

626

627

Target ( Accession No. )	Primer nucleotide sequences (5' - 3')	Product length	Primer efficiency	Marker for
<i>Carp il-5fam1</i> (MN882543)	F CCAGAAACCAGTATGCCAACA R GTGAAGGTGCAGGTGACGA	94 bp	94.4%	IL-5fam
<i>Carp bactin</i> (M24113)	F CAAGGCCAACAGGGAAAAGA R AGGCATACAGGGACAGCACA	98 bp	104.5%	$\beta$ -actin

628

629 **Table 3-3. Oligonucleotide primers used for gene expression analysis with semi-q**  
 630 **uantitative RT-PCR.**

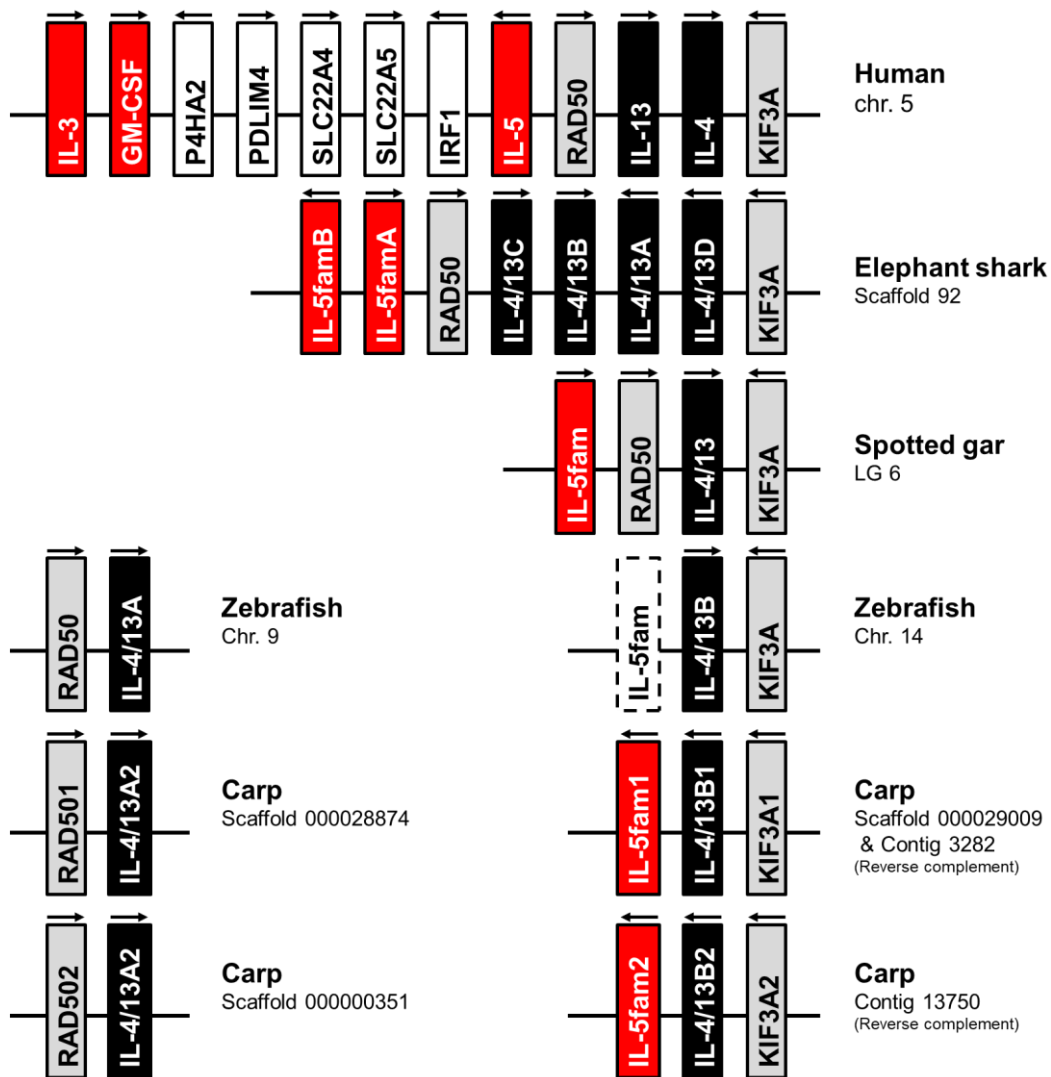
631

Target ( Accession No. )	Primer nucleotide sequences (5' - 3')	Product length	Marker for
<i>Carp βc</i> (MN882543)	F ATGGTTGGATTCGCTCTGCT R TCAGCCACCCTCTCTGTCAA	425 bp	β chain receptor
<i>Carp mpx/mpo</i> (AB429306)	F ACCACAGTATACCAGGCTATAATGC R GGTTCCTCAAACCATAACCTGTCC	270 bp	Neutrophil
<i>Carp cebpa</i> (MH262559)	F GCTGGAGACCTGAGCGAGAT R GCGTGGTGTGAGAGTGGTG	353 bp	Myeloid cell
<i>Carp gata2</i> (AB429308)	F TACGGACAAGCACACGCTCG R TGGTGGAGGTCGGAGAAGAA	322 bp	Eosinophil/basophil
<i>Carp csf1r/mcsfr</i> (AB526448)	F AACTAAAGCTCGGAAAGACTCTGG R CGCAGGAAGTTCAGAAGATCAC	266 bp	Monocyte/macrophage
<i>Carp irf8</i> (XM_019088951)	F GTGCCAGAGGAGGAACAGAAG R GATGTTCTGGAGGCTGTCTGG	414 bp	Monocyte/macrophage
<i>Carp lck</i> (AB429309)	F CGTCGGGTGGCTATCAAGAG R TGAGCTCATCGGACACCAAA	326 bp	T cell
<i>Carp IgM heavy chain</i> ( <i>ighm</i> ) (AB004105)	F TTCTTCCACCACCCCCAC R GCTGCAATCTTGAATAGGAACTG	353 bp	B cell
<i>Carp gata1</i> (AB429307)	F TTCCAGCTCTGAGACTGACTTACTGC R CCCGTATGGACCCAGCATGT	442 bp	Erythrocyte
<i>Carp cd41</i> (AB429305)	F CGGCCTACCTACTGCCTGAG R ACCTGCTTTCAGCTGATGTCC	440 bp	Thrombocyte
<i>Carp bactin</i> (M24113)	F GTACGTTGCCATCCAGGCTGTG R ACGTCACACTTCATGATGGAGTTGAAG	465 bp	Internal control

632

633

634



635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

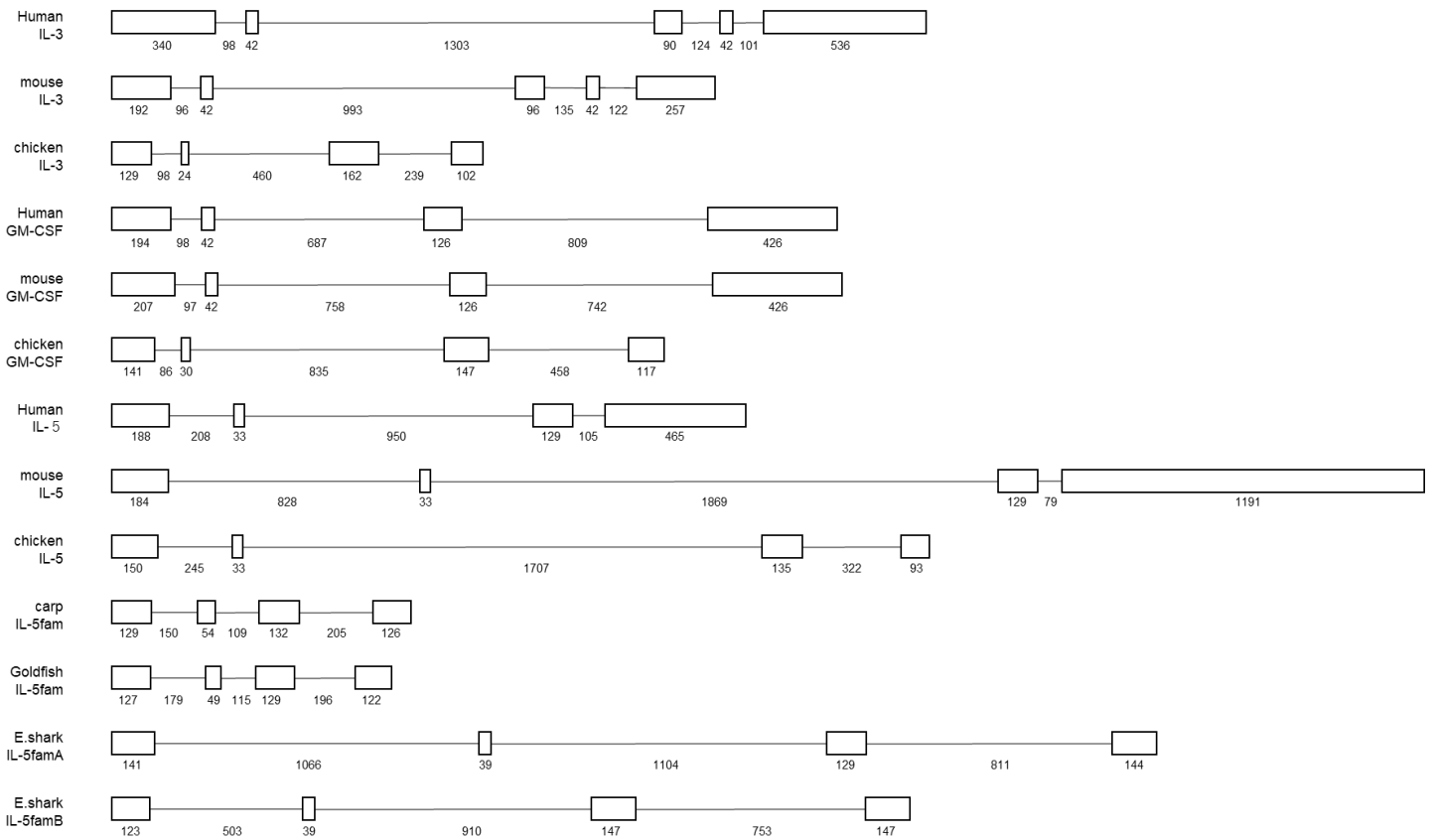
646

647

**Fig. 3-1. Similar genomic positions of *IL-3/IL-5/GM-CSF* family member genes in mammals and fish.** In fish like in mammals, the *IL-3/IL-5/GM-CSF* family member genes map to the (duplicated)  $T_H2$  locus together with *RAD50*, *KIF3A*, and *IL-4/13* family genes. In an ancestor of teleost fish a whole genome duplication event and subsequent gene losses have resulted in the mapping of *RAD50* + *IL-4/13A* to a different linkage group than *KIF3A* + *IL-4/13B* + *IL-5fam* (Ohtani et al., 2008; Yamaguchi et al., 2015). The genomic situation in human, elephant shark (*Callorhinchus milii*), spotted gar (*Lepisosteus oculatus*), and zebrafish (*Danio rerio*) was analyzed before (Yamaguchi et al., 2015) and was based on Ensembl databases (<https://ensembl.org/index.html>) and the Elephant Shark Genome Project (<http://esharkgenome.imcb.a-star.edu.sg/>). The depicted carp (*Cyprinus carpio*) gene locations were based on carp genome and transcriptome projects PRJEB7241 and PRJNA73579 at NCBI.



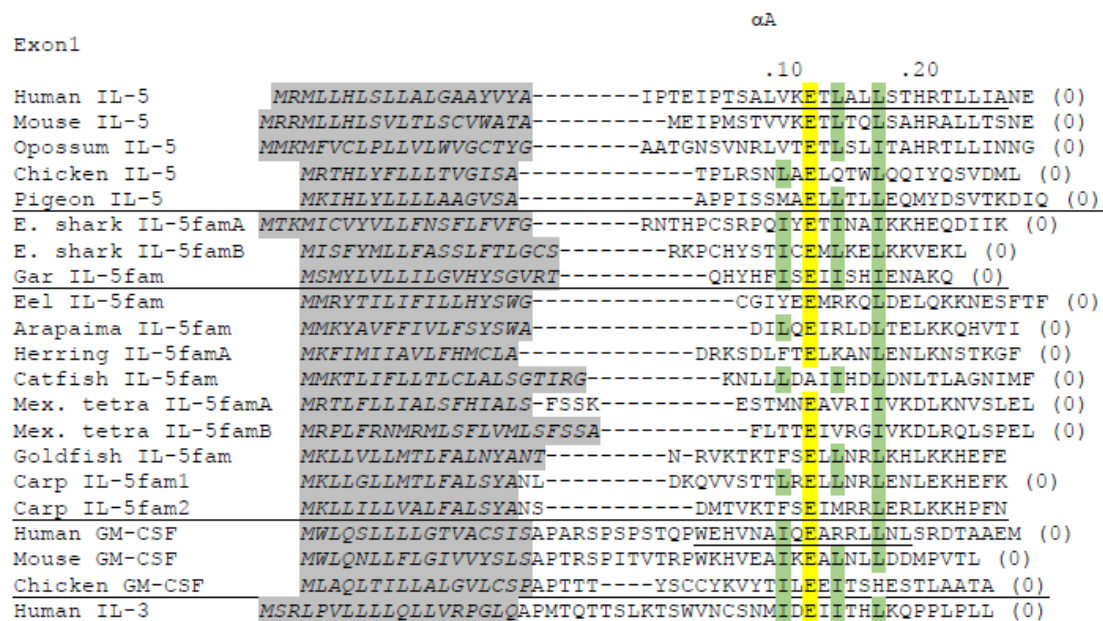
648



649

650 **Fig. 3-2. Comparison of exon-intron structures of various species**

651 The square indicates exon and the line indicates intron. The numbers at the bottom of the  
 652 squares and lines indicate the number of base pairs of exon and intron in the genome. The  
 653 reference sequence is the same as the Fig. 3-3 and 3-4.

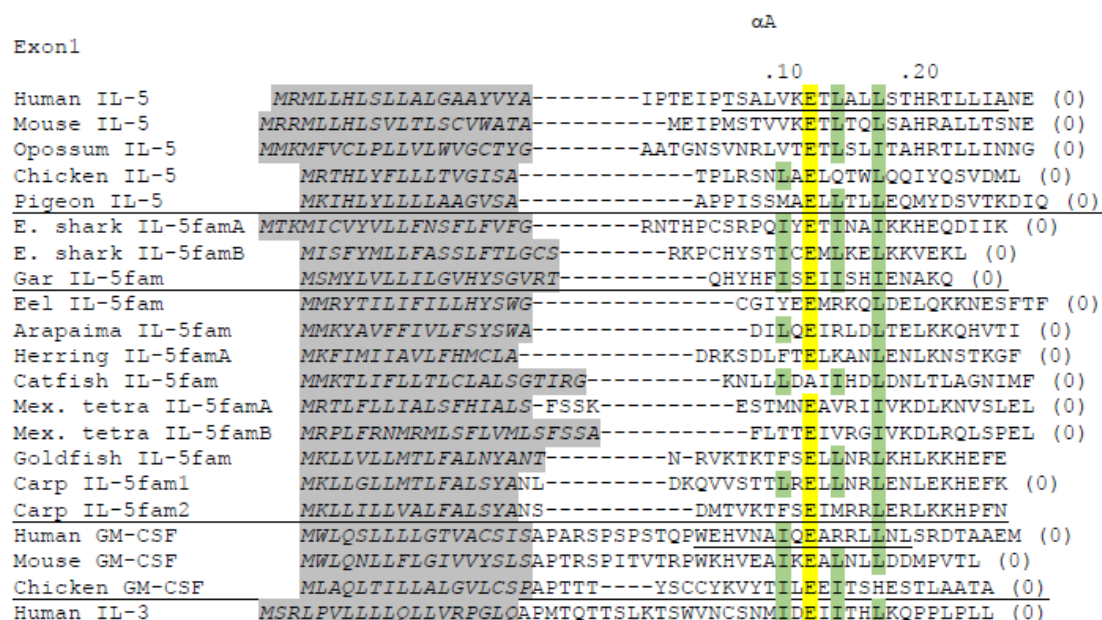


654

655 **Fig. 3-3. Alignment of deduced IL-3/IL-5/GM-CSF family member amino acid sequences.**  
 656 **(exon 1 region)**

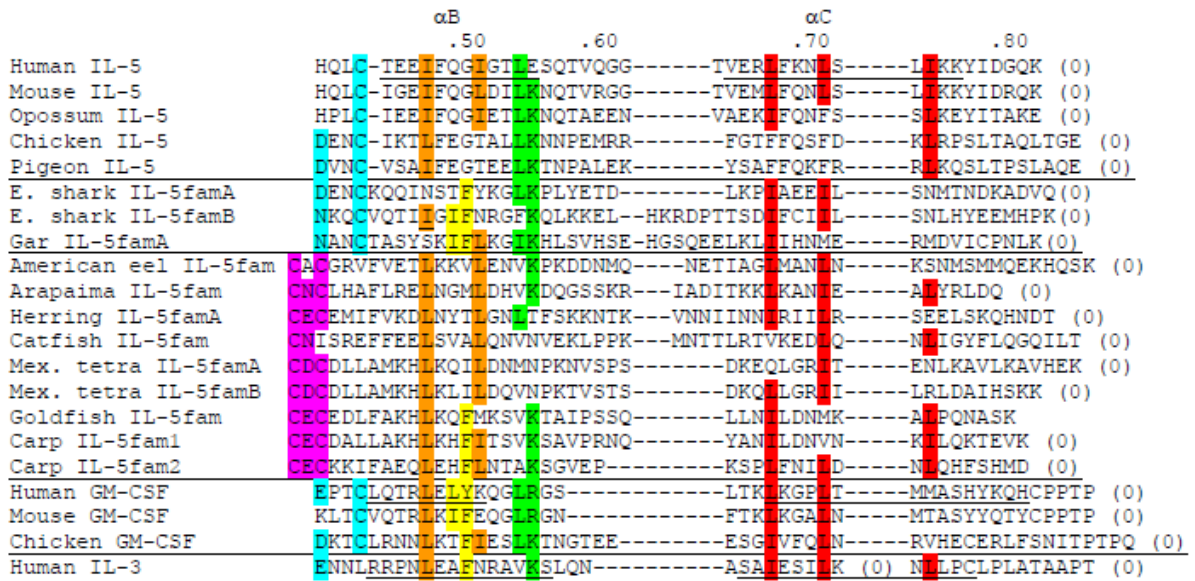
657 (Predicted) leader peptides are indicated with gray shading; for predictions. The  
 658 alignment is organized according to the matching exons, and brackets relate to intron  
 659 positions with the number indicating the intron phase. The  $\alpha$ -helices  $\alpha$ A-to- $\alpha$ D, of human  
 660 IL-5, GM-CSF and IL-3 are indicated by underlining. Sequences were predicted and  
 661 aligned by a combination of software analyses and manual searches and modifications,  
 662 based on considerations of genomic location, protein structure, and evolution. Motifs of  
 663 interest are highlighted by different color shading in a somewhat instinctive and random  
 664 manner, but mostly include leucines/isoleucines (expected to be) located at the inner core  
 665 of the four a-helix bundle and conserved cysteines. The yellow shaded glutamic acid in  
 666  $\alpha$ -helix A is important for function (Barry et al., 1994; Hercus et al., 1994; McKinnon et  
 667 al., 1997), and, at least for GM-CSF, for binding the common  $\beta$  receptor chain (Hansen  
 668 et al., 2008). N-glycosylation sites are highlighted in black. Aligned, in that order, are the  
 669 following sequences: Human (*Homo sapiens*) IL-5, GenBank accession NP\_000870;  
 670 mouse (*Mus musculus*) IL-5, NP\_034688; gray short-tailed opossum (*Monodelphis*  
 671 *domestica*) IL-5, XP\_001371840; chicken (*Gallus gallus*) IL-5, ADL28818; white-  
 672 throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*) IL-5, XP\_005483812; rock pigeon (*Columba*  
 673 *livia*) IL-5, EMC79983; elephant shark (*Callorhinchus milii*) IL-5famA and IL-5famB  
 674 (Dijkstra, 2014); spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) IL-5fam [Yamaguchi et al. 2015];  
 675 American eel (*Anguilla rostrata*) IL-5fam, prediction from genomic sequence  
 676 LTYT01002422; arapaima (*Arapaima gigas*) IL-5fam, predicted from genomic sequence

677 UFQX01000020; Atlantic herring (*Clupea harengus*) IL-5famA, predicted from  
678 genomic sequence OOIJ01000022 (there is also a second IL-5fam gene copy but that may  
679 be a pseudogene); Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) IL-5fam, cDNA sequence  
680 GEHJ01102137 (intron positions were found by comparison with the genomic sequence  
681 LBML01015439); Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*) IL-5famA, predicted from  
682 genomic sequence APWO02000008; IL-5famB, cDNA sequence GFIF01009956 (also  
683 found in genomic sequence APWO02000008); goldfish (*Carassius auratus*) IL-5fam,  
684 GBZM01010380 (Yamaguchi et al., 2015); common carp (*Cyprinus carpio*) IL-5fam1,  
685 MN882543; human (*Homo sapiens*) GM-CSF, NP\_000749; mouse (*Mus musculus*) GM-  
686 CSF, CAA26192; chicken (*Gallus gallus*) GM-CSF, NP\_001007079; human (*Homo*  
687 *sapiens*) IL-3, AAH66275.  
688



689 **Fig. 3-3. Alignment of deduced IL-3/IL-5/GM-CSF family member amino acid sequences..**  
690 **(exon 2 region)**  
691

Exon3(3a plus 3b)

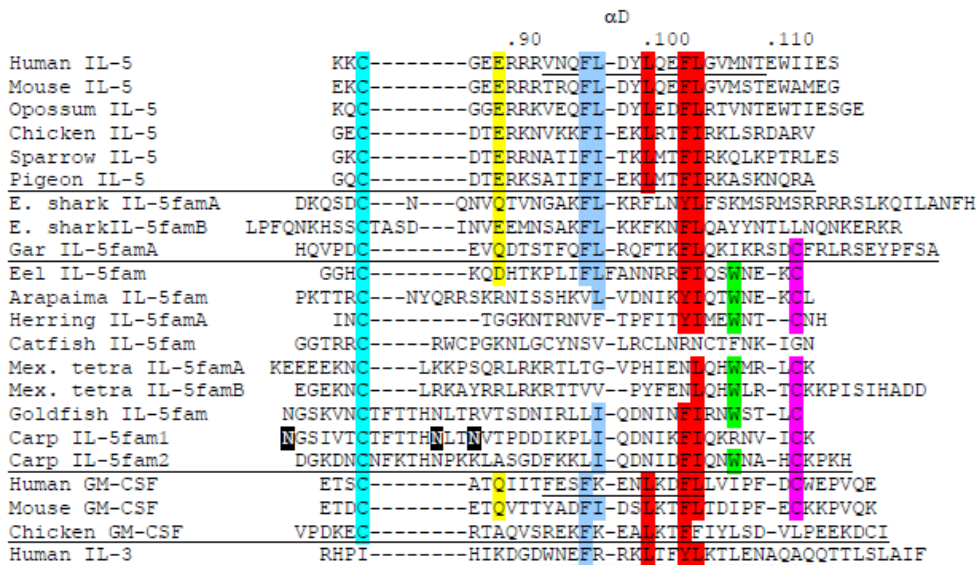


692

693 **Fig. 3-3. Alignment of deduced IL-3/IL-5/GM-CSF family member amino acid sequences..**

694 **(exon 3 region)**

Exon4



695

696 **Fig. 3-3. Alignment of deduced IL-3/IL-5/GM-CSF family member amino acid sequences..**

697 **(exon 4 region)**

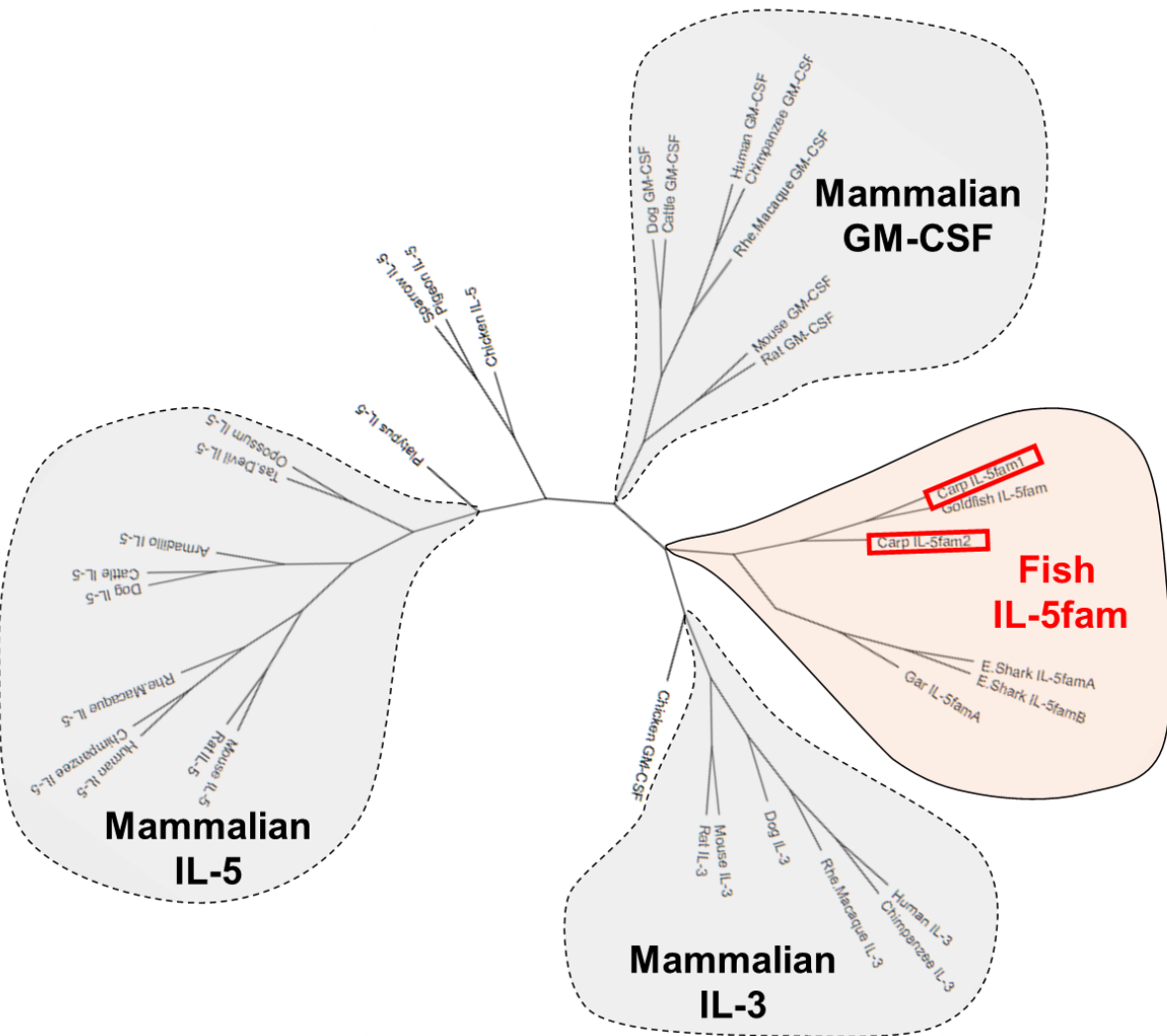
698

699

700

701

702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
711  
711  
711  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737



**Fig. 3-4. Phylogenetic tree analysis of vertebrate IL-5 family cytokines**

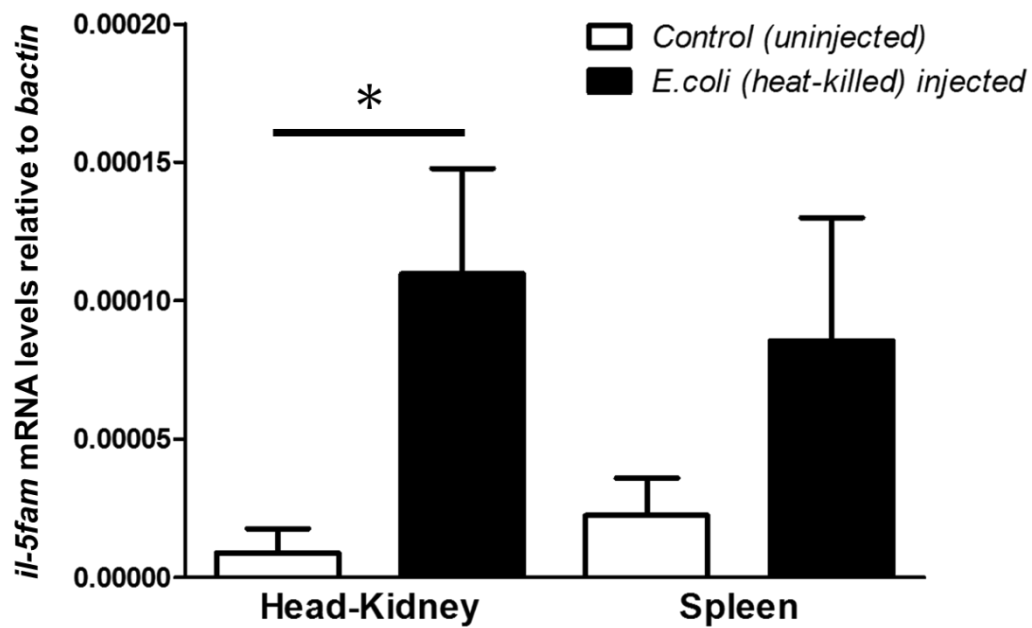
Phylogenetic analysis was performed based on the alignment by clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The phylogenetic tree was created by unweighted pair group method using Genetyx. The individual sequences used in this analysis are described in Fig.3-3 and below. Chimpanzee (*Pan troglodytes*) IL-5, NP\_001040598; Rhe.Macaque (*Macaca mulatta*) IL-5, NP\_001040598; Dog (*Canis lupus familiaris*) IL-5, NP\_001006951; Cattle (*Bos taurus*) IL-5, NP\_776347; Rat (*Rattus norvegicus*), IL-5NP\_068606; Armadillo (*Dasypus novemcinctus*) IL-5, XP\_004456511; Sparrow (*Zonotrichia albicollis*) IL-5, XP\_005483812; Pigeon (*Columba livia*) IL-5, EMC79983; Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*) IL-5, XP\_003756529; Platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) IL-5, XM\_007658048; Chimpanzee GM-CSF, XP\_527005; Rhe.Macaque GM-CSF, NP\_001028121; Dog GM-CSF, NP\_001003245; Cattle GM-CSF, NP\_776452; Rat GM-CSF, NP\_446304; Opossum GM-CSF, XP\_007474457; Tasmanian devil GM-CSF, Ensembl DEVIL7.0; Chicken GM-CSF, NP\_001007079; Budgerigar GM-CSF, Ensembl MelUnd6.3; Chimpanzee IL-3, NP\_001129106; Rhe.Macaque IL-3, NP\_001095204; Mouse IL-3, NP\_034686; Opossum IL-3, Ensembl BROADO5; Tasmanian devil IL-3, Ensembl DEVIL7.0; Chicken IL-3, NP\_001007084; Rat IL-3, NP\_113701; Dog IL-3, NP\_001013857; Chicken IL-3, NP\_001007084; B.F.Amazon (*Amazona aestiva*) IL-3, KQK77063

738 **Table 3-4. Amino acid sequence identities (gray upper grids) and similarities (lower grids) of human, mouse, chicken IL-5/IL-3/GM-CSF family**  
739 **cytokines and fish IL-5fam orthologues.** Amino acid identities and similarities (in percentages) were calculated using the Sequence Manipulation  
740 Suite v2: Ident and Sim ([http://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)) following the multiple alignment with the Clustal Omega  
741 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) using default parameters. Accession numbers of protein sequences listed are same to Fig.3-3 and 3-4.

	Carp IL-5fam1	Carp IL-5fam2	Goldfish IL-5fam	Gar0 IL-5famA	E. Shark IL-5famA	E. Shark IL-5famB	Human IL-5	Mouse IL-5	Chicken IL-5	Human IL-3	Mouse IL-3	Chicken IL-3	Human GM-CSF	Mouse GM-CSF	Chicken GM-CSF
Carp IL-5fam1		<b>46</b>	<b>60.27</b>	<b>9.09</b>	<b>8.54</b>	<b>12.9</b>	<b>12</b>	<b>9.93</b>	<b>9.4</b>	<b>8.07</b>	<b>8.82</b>	<b>15.69</b>	<b>10.46</b>	<b>7.89</b>	<b>9.8</b>
Carp IL-5fam2	57.33		<b>45.27</b>	<b>13.07</b>	<b>8.54</b>	<b>14.01</b>	<b>14.38</b>	<b>13.64</b>	<b>9.27</b>	<b>8.07</b>	<b>8.24</b>	<b>16.23</b>	<b>7.79</b>	<b>7.84</b>	<b>13.73</b>
Goldfish IL-5fam	69.18	59.46		<b>9.74</b>	<b>10.37</b>	<b>14.84</b>	<b>13.33</b>	<b>11.26</b>	<b>7.43</b>	<b>9.32</b>	<b>12.35</b>	<b>14.47</b>	<b>7.84</b>	<b>7.89</b>	<b>7.84</b>
Gar IL-5famA	26.62	28.1	24.03		<b>20</b>	<b>16.67</b>	<b>14.86</b>	<b>12.75</b>	<b>11.81</b>	<b>6.96</b>	<b>8.33</b>	<b>10.53</b>	<b>8.55</b>	<b>10.53</b>	<b>13.33</b>
E.Shark IL-5famA	22.56	18.9	22.56	30		<b>31.1</b>	<b>16.45</b>	<b>15.13</b>	<b>11.04</b>	<b>12.35</b>	<b>8.98</b>	<b>8.97</b>	<b>13.29</b>	<b>11.39</b>	<b>11.88</b>
E.Shark IL-5famB	29.03	27.39	31.61	30.77	41.46		<b>12.99</b>	<b>13.55</b>	<b>13.73</b>	<b>10.18</b>	<b>9.3</b>	<b>10.69</b>	<b>10.06</b>	<b>10.13</b>	<b>13.29</b>
Human IL-5	24	25.49	23.33	25	32.24	26.62		<b>69.63</b>	<b>19.85</b>	<b>9.68</b>	<b>5.42</b>	<b>11.81</b>	<b>11.64</b>	<b>11.03</b>	<b>12.33</b>
Mouse IL-5	21.85	24.03	19.21	23.49	30.92	27.74	74.07		<b>21.17</b>	<b>7.05</b>	<b>3.61</b>	<b>9.66</b>	<b>11.56</b>	<b>9.59</b>	<b>10.88</b>
Chicken IL-5	21.48	20.53	17.57	23.61	25.97	27.45	32.35	32.85		<b>9.15</b>	<b>7.78</b>	<b>7.69</b>	<b>15.86</b>	<b>11.81</b>	<b>13.79</b>
Human IL-3	20.63	20.13	26.71	24.68	21.6	20.36	25.81	17.95	17.65		<b>13.53</b>	<b>11.18</b>	<b>10.46</b>	<b>9.15</b>	<b>6.45</b>
Mouse IL-3	15.84	21.57	22.35	23.21	19.76	16.28	21.69	18.67	17.37	26.47		<b>9.58</b>	<b>7.78</b>	<b>10.18</b>	<b>13.02</b>
Chicken IL-3	22.99	26.8	26.97	26.32	19.87	23.9	23.61	20	22.38	28.95	20.96		<b>12.5</b>	<b>13.19</b>	<b>13.61</b>
Human GM-CSF	25.49	25.47	20.26	18.42	24.68	25.79	26.03	25.17	27.59	28.76	19.76	24.31		<b>54.86</b>	<b>15.65</b>
Mouse GM-CSF	23.03	20.59	22.37	21.71	29.75	25.95	23.45	19.86	27.08	25.49	19.76	22.92	64.58		<b>14.97</b>
Chicken GM-CSF	27.45	28.57	26.14	25.33	26.88	24.05	33.56	23.49	27.59	24.52	27.22	27.21	31.97	27.89	

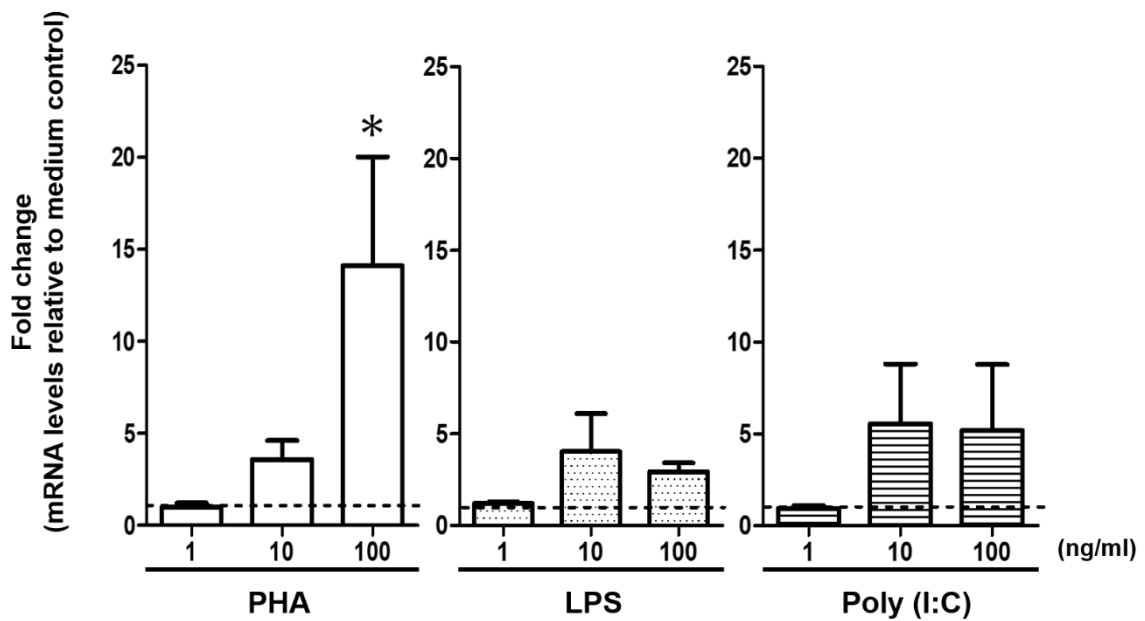
742

743



744 **Fig. 3-5. Quantitative expression analysis of *il-5fam1* in carp head-kidney and spleen**  
 745 **following 6 hours post administration of heat-killed *E. coli*.** The relative mRNA levels  
 746 of *il-5fam1* were determined using *bactin* as the endogenous control. Data are mean +  
 747 standard error ( $n = 4$ ). Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the samples  
 748 from uninjected carp.

749  
 750



751

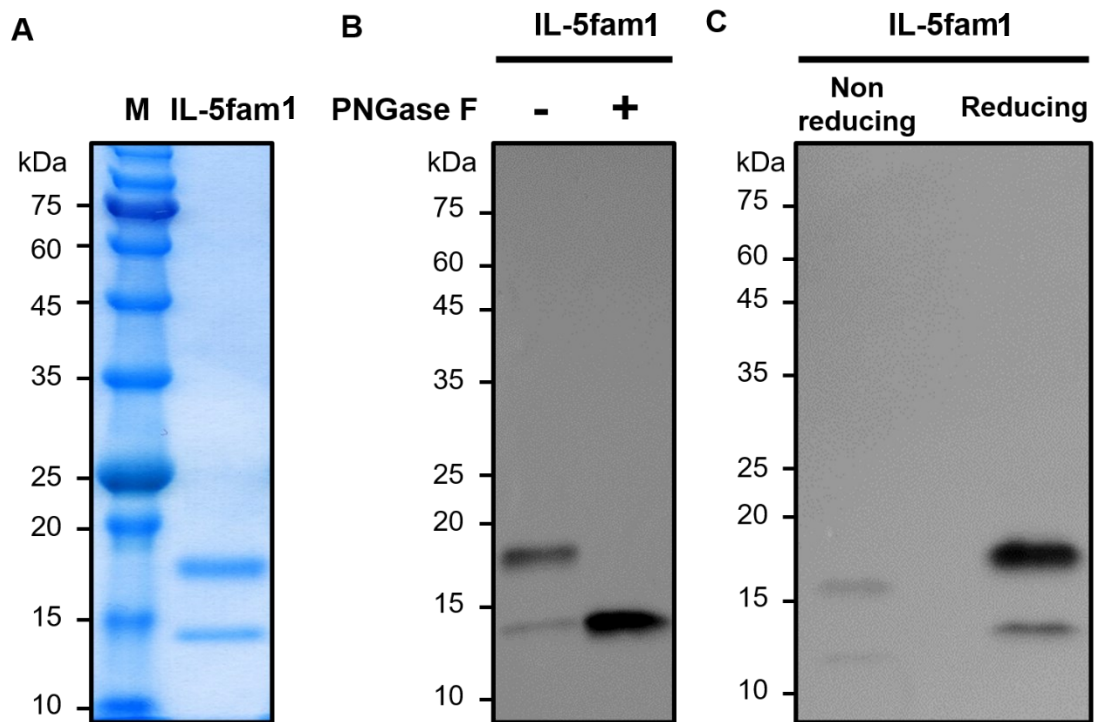
752 **Fig. 3-6 Quantitative expression analysis of *il-5fam1* in kidney-derived leukocytes**  
 753 **stimulated with PHA, LPS and PolyI:C for 5 hours.** The reported relative mRNA  
 754 levels were calculated using *bactin* as an endogenous control. The data were normalized  
 755 against the mRNA levels of *il-5fam1* gene in unstimulated kidney leukocytes and set to  
 756 an arbitrary value of 1 shown by broken line; mean + standard error is shown ( $n = 4$ ).  
 757 Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted by (\*) compared to the reference sample.

758

759

760





761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

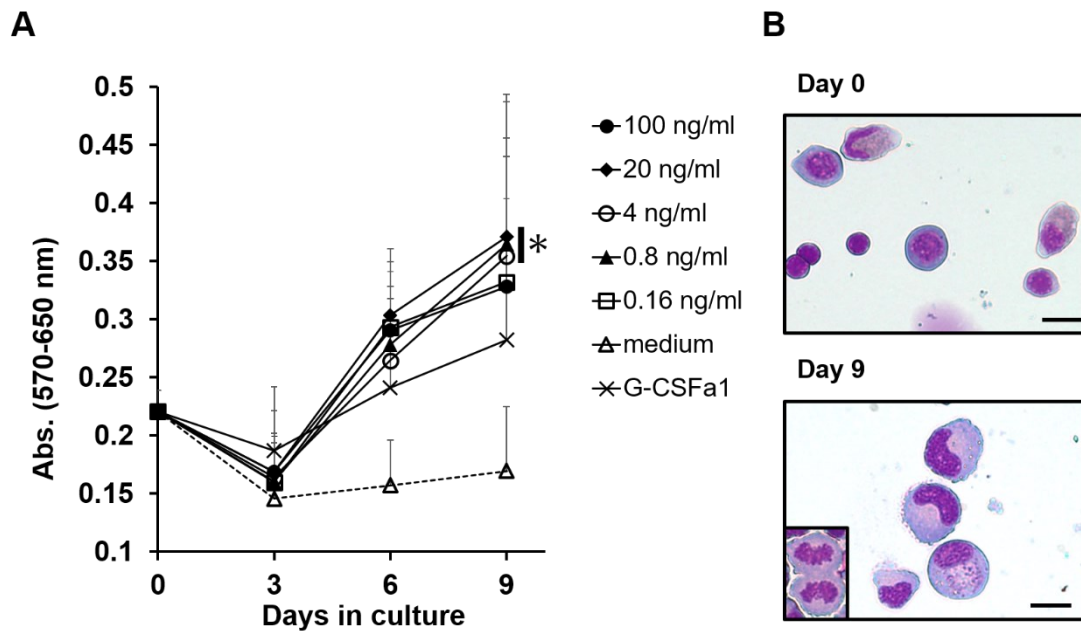
772

773

774

775

**Fig. 3-7 Purification and biochemical characterization of recombinant carp IL-5fam1.** (A) SDS-PAGE analysis of purified recombinant carp IL-5fam1. The 15% SDS-PAGE gel was stained with coomassie brilliant blue. M, ATTOEzProtein Ladder, sizes are listed on left side; recombinant carp IL-5fam1, purified PA-tagged IL-5fam1 protein. (B) Western blot analysis of recombinant carp IL-5fam1 protein following deglycosylation experiments. Purified recombinant carp IL-5fam1 was treated with or without Glycopeptidase F under denature condition at 37°C overnight. Samples were resolved by SDS-PAGE followed by western blotting using anti-PA-HRP conjugate. (C) Western blot analysis of purified recombinant carp IL-5fam1 under reducing or non-reducing conditions. recombinant carp IL-5fam1 was mixed with equal amounts of EZ apply (ATTO) with or without DTT and heat treated at 95°C for 5 minutes. The following western blotting procedure was performed similarly as for Fig. 4B.



776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

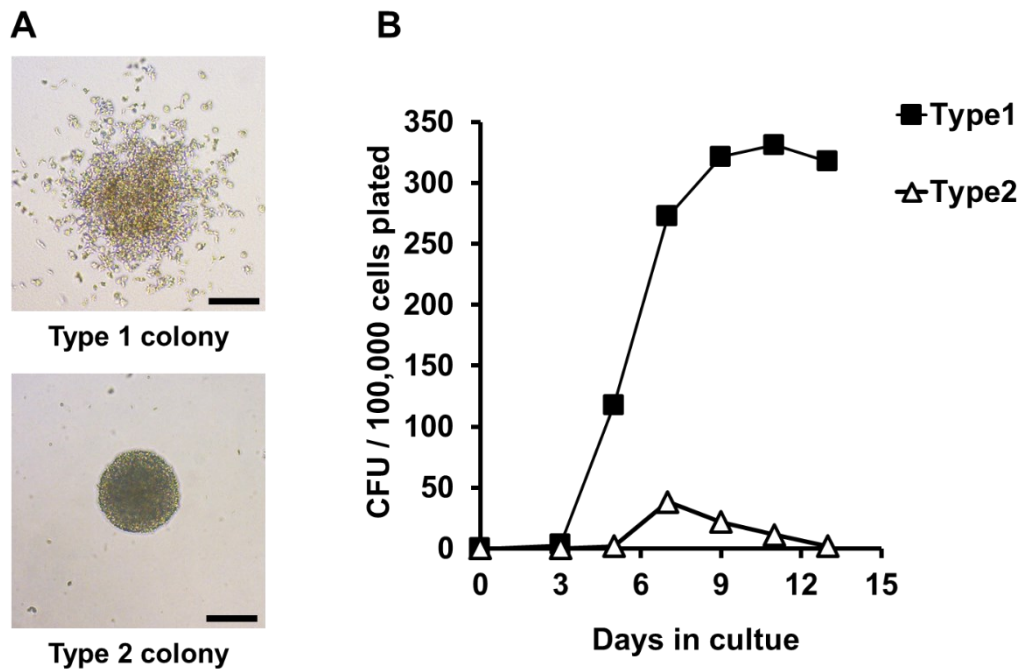
786

787

788

789

**Fig. 3-8. Recombinant carp IL-5fam1 promotes proliferation of carp kidney leukocytes.** (A) Proliferative response of carp kidney leukocytes (20,000 cells) treated with medium alone (negative control), recombinant carp G-CSFa1 (positive control), or recombinant carp IL-5fam1 at different concentrations listed. Live cells treated with each stimulus were measured with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay at day 0, 3, 6 and 9 in the culture. Absorbance values with 650 nm were subtracted from experimental absorbance values with 570 nm in each well. Each point on the graphs represents mean + standard error ( $n = 6$ ). (B) May-Grünwald Giemsa staining of kidney cells after 0 or 9 days culture in the presence of recombinant carp IL-5fam1. Mitotic Fig. s (small enclosure) were frequently observed. Scale bars indicate 10  $\mu\text{m}$ .



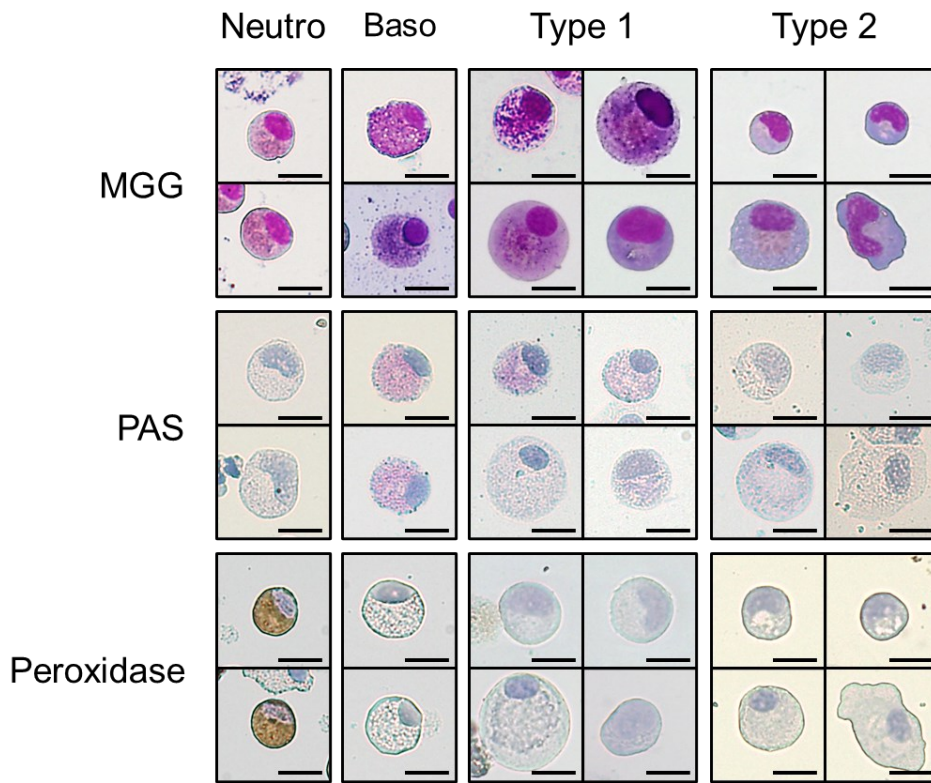
790

791

792 **Fig. 3-9. Recombinant carp IL-5fam1 promotes colony formation.** (A) Colony-  
 793 formation of kidney cells in response to 20 ng/mL recombinant carp IL-5fam1. Overall  
 794 two types of colonies (type 1 and type 2) were observed in the semi-solid culture. Bars  
 795 indicate 200  $\mu$ m. (B) Colony counts during semi-solid culture of kidney cells ( $1 \times 10^5$ ) in  
 796 the presence of 20 ng/mL recombinant carp IL-5fam1. Each point indicates mean colony  
 797 counts from 4 individual fish under each condition. Cultures were scored every 2 days  
 798 between 3 and 13 days of incubation.

799

800



801

802

803

804

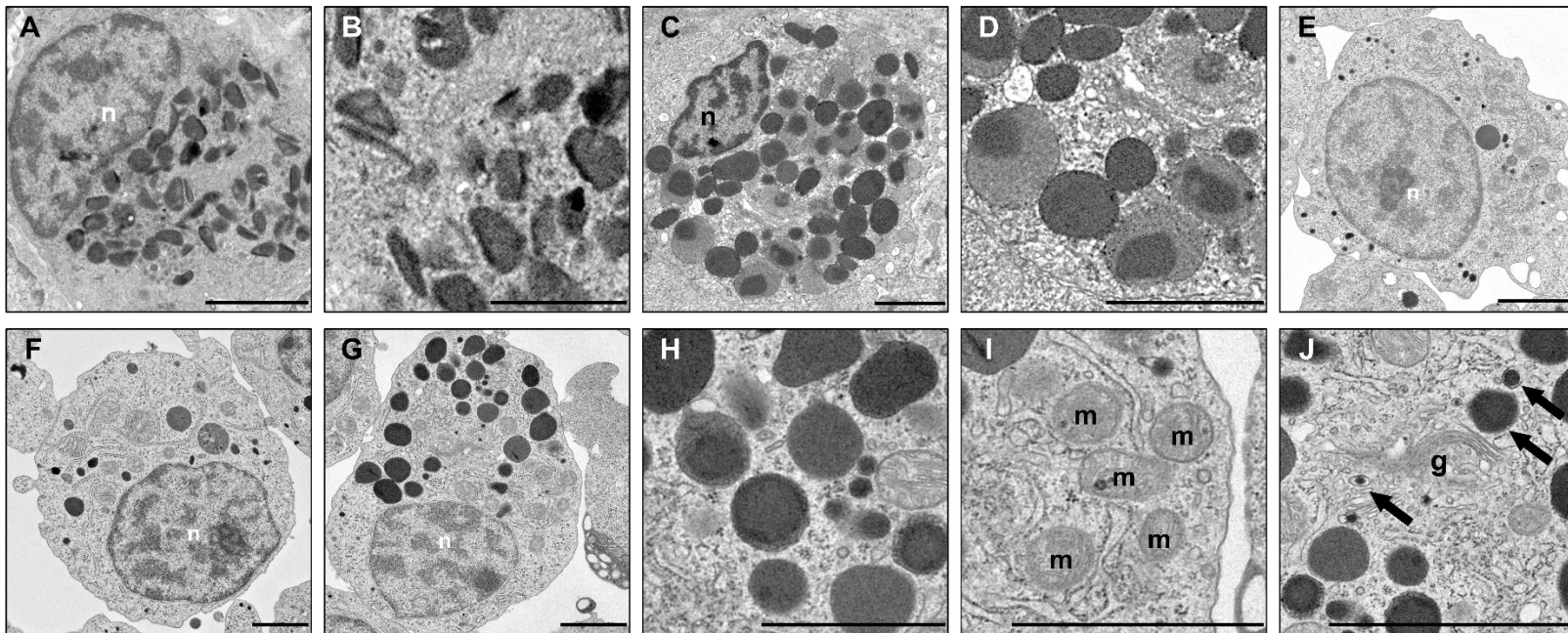
805

806

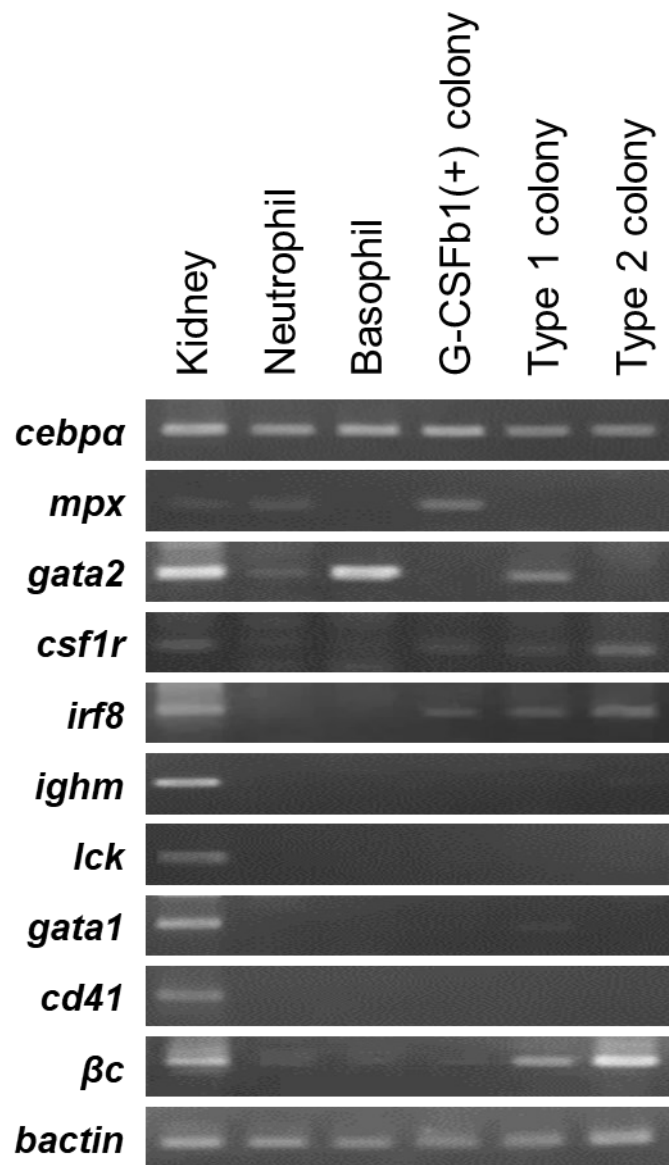
807

808

**Fig. 3-10. Cytochemical and RT-PCR analysis of two types of colonies.** (A) Two types of colonies isolated from the semi-solid cultures after 10 days of incubation were smeared and stained by May-Grünwald Giemsa (MGG) staining, PAS-staining (PAS) and Peroxidase-staining. PAS and Peroxidase staining were counterstained by Mayer's Hematoxylin. Bars indicate 10  $\mu$ m.

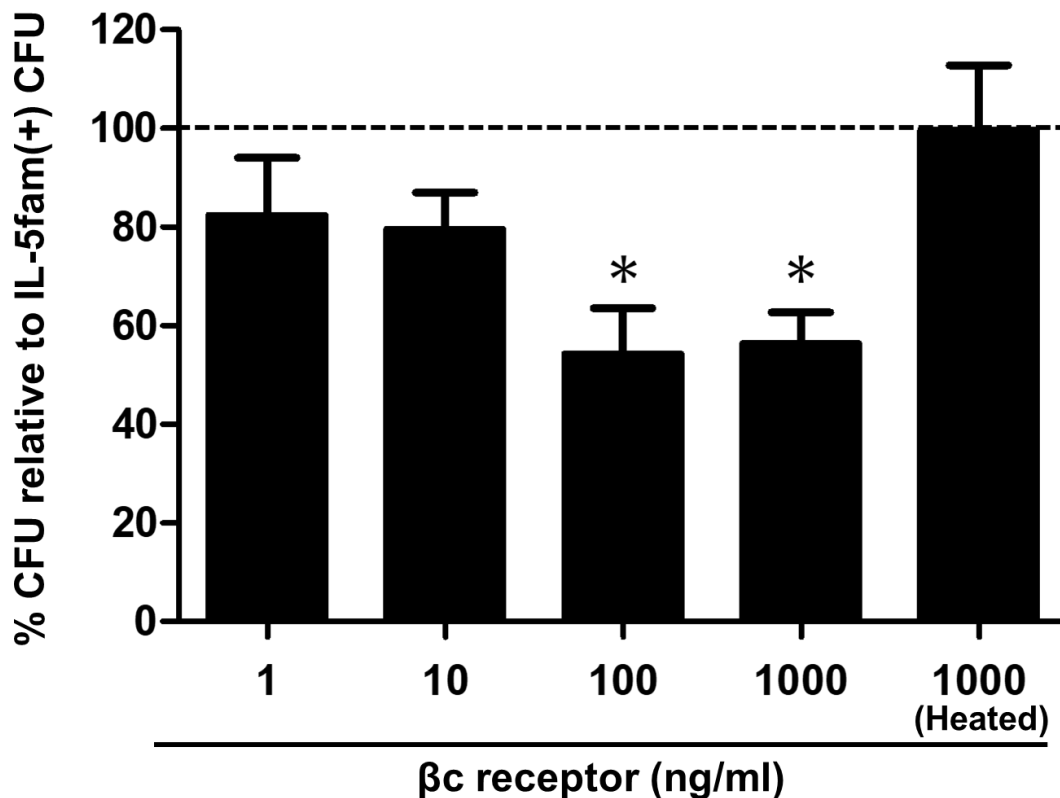


809  
 810 **Fig. 3-11. Transmission electron microscope analysis reveals that recombinant carp IL-5fam1 induces EBM development.** (A and  
 811 **B)** A typical carp kidney neutrophil having narrow-shaped granules containing a rod-shaped electron-dense core. (C and D) A typical carp  
 812 kidney EBM having eccentric nucleus and round to oval granules filled with electron-dense material. (E, F and G) Cells in the colonies  
 813 formed in the presence of recombinant carp IL-5fam1 after 7 days of culture were ordered according to their putative developmental  
 814 stages: an immature cell including small granule-like structures in cytoplasm and a nucleus with poor chromatin structure (E); a cell which  
 815 commences to produce a couple of EBM-like granules and has an eccentric nucleus with clear chromatin structure (F); and a cell which  
 816 is actively producing EBM-like granules and has an eccentric nucleus with rich chromatin structure (G). (H, I and J) High magnification  
 817 of the cell in (G) shows a number of EBM-like granules (H), abundant mitochondria (I) and Golgi apparatus producing granules (arrows)  
 818 in cytoplasm (J). The letters 'n', 'm' and 'g' mean nucleus, mitochondria and Golgi apparatus, respectively. Scale bars indicate 2  $\mu$ m.



819

820 **Fig. 3-12. RT-PCR expression analysis of lineage-associated marker genes in type 1**  
 821 **and type 2 colony cells.** Each colony cultured in the presence of 20 ng/mL recombinant  
 822 carp IL-5fam1 for 10 days was collected under microscopic visualization based on  
 823 morphology. Approximately 20 colonies were pooled and RNA isolated and reverse  
 824 transcribed into cDNA prior to RT-PCR. Kidney cells were used as positive controls for  
 825 all blood cell markers. Kidney-derived sorted EBMs, sorted neutrophils and recombinant  
 826 carp G-CSFb1-induced colonies were used as control groups for EBM- and neutrophil-  
 827 lineages. PCR products were electrophoresed on agarose gels and stained with ethidium  
 828 bromide prior to visualization under UV light. Data shown are representative of three  
 829 individual carp examined.



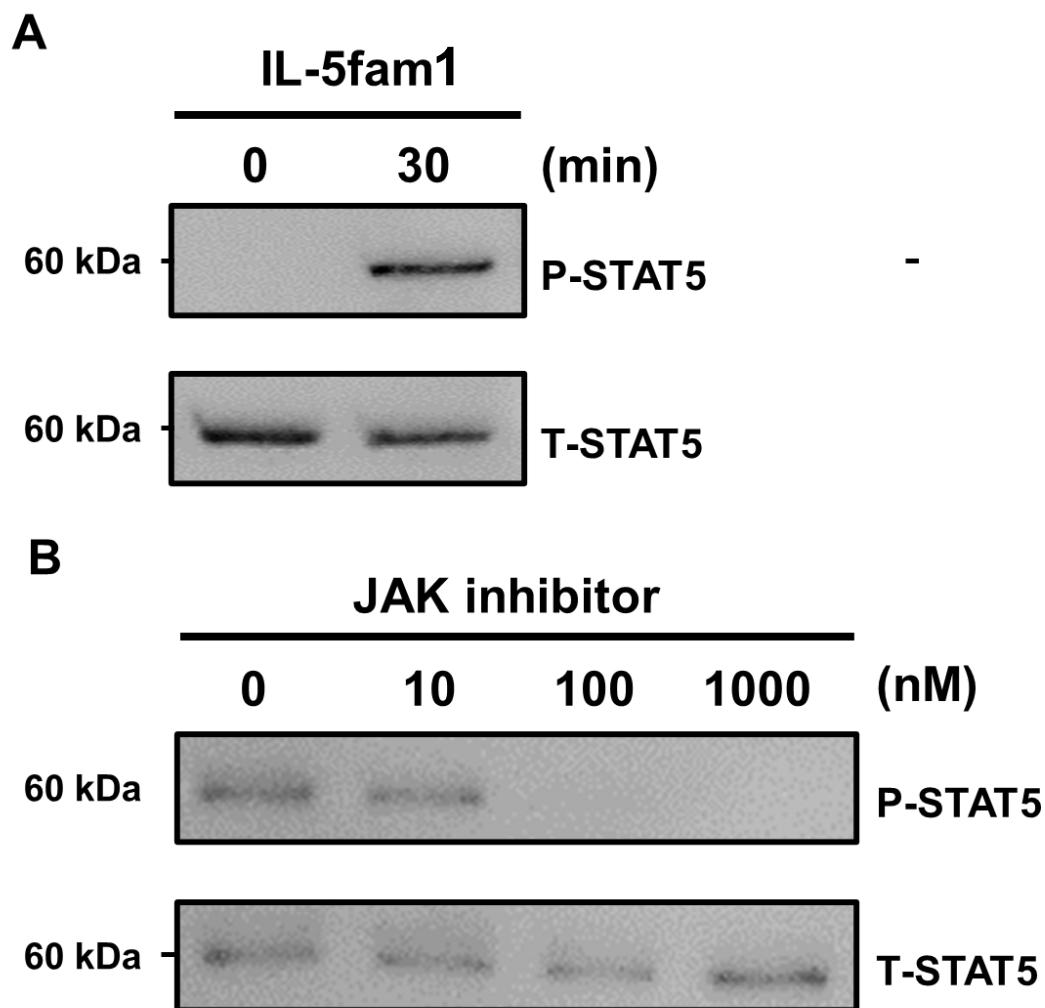
830

831

832 **Fig. 3-13. Recombinant carp IL-5fam1 activity is sensitive to  $\beta c$  receptor and**  
 833 **stimulates formation of two types of colonies from kidney cells.**

834 Recombinant carp soluble form of  $\beta c$  receptor consisting of the extracellular region (recombinant carp  $\beta c$ )  
 835 reduced recombinant carp IL-5fam1-induced colony-formation. Carp kidney leukocytes  
 836 ( $1 \times 10^5$  cells) were cultured in technical duplicate in the presence of 0.8 ng/mL of  
 837 recombinant carp IL-5fam1 alone (control group) and 0.8 ng/mL of recombinant carp IL-  
 838 5fam1 pre-incubated with 1, 10, 100 or 1000 ng/mL of recombinant carp  $\beta c$  or heat-  
 839 inactivated ( $95^\circ\text{C}$  for 15 min) 1000 ng/mL of recombinant carp  $\beta c$  at  $4^\circ\text{C}$  for 12 h. After  
 840 7 days of culture, colonies under each condition were enumerated. Percentages of colony-  
 841 forming unit (CFU) against CFU in the IL-5fam1 alone control group (broken line) were  
 842 calculated. Data represent mean + standard error ( $n = 3$ ). Significance ( $p < 0.05$ ) is denoted  
 843 by (\*) compared to the control (Heat-inactivated 1000 ng/mL of recombinant carp  $\beta c$ ).

844



845

846

847 **Fig. 3-14. Recombinant carp IL-5fam1 can induce phosphorylation of**  
 848 **transcriptional factor STAT5.** (A) Carp kidney leukocytes were isolated and incubated  
 849 with 20 ng/mL of recombinant carp IL-5fam1. After 0 or 30 min incubation, kidney  
 850 leukocytes were lysed and analyzed by Western blotting using anti-pSTAT5 following  
 851 electrophoretic separation in SDS-PAGE gel. (B) Carp kidney leukocytes were pre-  
 852 treated with 0, 10, 100, 1000 nM JAK inhibitor I (Merck, #420097) for 1 h before 30 min  
 853 stimulation with 20 ng/mL IL-5fam1, followed by analyzed STAT5 activation.

854

855

856

857

858



859

860

861

862

863

864

865

## 第 4 章

866

867

## 総括

868

869

870

871 哺乳類と真骨魚類は共通の祖先を有するため、血球組成等の免疫システムに  
872 は類似している。しかし、真骨魚類は約 4~5 億年前に哺乳類等の四肢動物の祖  
873 先と分岐した後、さらなる全ゲノム重複 (WGD) を経験したため、免疫システ  
874 ムの分子制御機構においては哺乳類等のそれとは異なる特殊性が存在している  
875 可能性がある。本研究では、真骨魚類における進化の独自性に着目し、重複分子  
876 や魚類特有の分子が存在する魚類サイトカインの機能解析を行うことで、魚類  
877 特有の免疫制御機構を明らかにした。本研究では、コイ (*Cyprinus carpio*) の顆粒  
878 球の産生および機能を制御するサイトカインの機能解析を行った。まず、哺乳類  
879 において好中球活性化因子として知られ、多くの魚種で重複分子の存在が明ら  
880 かになっている、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor,  
881 G-CSF) について遺伝子解析および機能解析を行った。続いて、ヒトでは同一サ  
882 イトカインファミリーに属し、好酸球および好塩基球の産生を促すインターロ  
883 イキン (Interleukin, IL)-5、IL-3、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子  
884 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) の 3 分子に関連する  
885 魚類特有の遺伝子を同定し、その機能解析を行った。以下に、本研究の概要総括  
886 する。

887

#### 888 コイ好中球活性化因子の機能解析

889 哺乳類の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球の産生、遊走、活性化  
890 を促進するサイトカインである。真骨魚類の G-CSF 遺伝子は、約 3 億年前に起  
891 きた WGD の影響により、遺伝子重複によって生じた 2 つの遺伝子 (パラログ)  
892 として存在する。本研究で対象としたコイは約 1 千万年前に WGD をさらにも  
893 う一度経験しているため、4 種のパラログが存在する可能性がある。重複分子は  
894 進化の過程でその機能について保存、新規化、または消失といういずれかの運命

895 を辿るが、魚類の G-CSF パラログの各分子における詳細な機能解析は行われて  
896 いなかった。そこで、本研究では、コイの 4 つの G-CSF パラログの遺伝子発現  
897 および機能解析を行い、魚類の重複サイトカインによる免疫制御機構を明らか  
898 にした。

899 コイのゲノムデータベースを探索した結果、4 種の G-CSF パラログ(*g-csfa1*, *g-*  
900 *csfa2*, *g-csfb1*, *g-csfb2*) が哺乳類と相同な遺伝子の近傍に存在していた。分子系統  
901 解析の結果、コイ G-CSF パラログは、A グループ (*g-csfa1*, *g-csfa2*) と B グルー  
902 プ (*g-csfb1*, *g-csfb2*) に分類された。G-CSF パラログについて定量 PCR による発  
903 現解析を行った結果、A グループの G-CSF はほとんどの組織で高発現だったが、  
904 B グループの G-CSF は多くの組織で検出限界以下であった。また、全てのパラ  
905 ログは、哺乳類において G-CSF 産生細胞とされるマクロファージにおいて高い  
906 発現を示した。さらに、マクロファージを LPS 刺激した結果、*g-csfa1* と *g-csfa2*  
907 は 5~6 倍程度の発現上昇が認められたが、*g-csfb1* と *g-csfb2* では 500 倍以上も  
908 の発現上昇を示した。これらのことから、A グループの G-CSF は組織において  
909 恒常的に発現し、B グループの G-CSF は免疫応答の際に発現するサイトカイン  
910 であると考えられた。

911 コイ G-CSF の機能解析を行うため、A グループから G-CSFa1 組換え体を、B  
912 グループより G-CSFb1 組換え体をそれぞれ作製した。半固形培地を用いたコロ  
913 ニー形成試験を行ったところ、G-CSFb1 は単独でコロニー形成を刺激し、形成  
914 されたコロニーは構成細胞における遺伝子発現様式と形態学的特徴から、好中  
915 球前駆細胞由来であると考えられた。一方、G-CSFa1 単独ではコロニー形成が認  
916 められなかったが、G-CSFa1 と G-CSFb1 を両方添加した培養において、好中球  
917 /マクロファージ共通前駆細胞由来のコロニー形成が刺激された。続いて、コイ  
918 G-CSF の腎臓好中球に対する遊走活性試験を Boyden-chamber 法により行った結

919 果、G-CSFa1 と G-CSFb1 は好中球に対して遊走活性を示し、その活性は G-CSFa1  
920 よりも G-CSFb1 の方が高い傾向を示した。最後に、コイ G-CSF の活性酸素産生  
921 に対するプライミング作用を明らかにするため、呼吸バースト試験を行った結  
922 果、G-CSFa1 または G-CSFb1 で刺激した好中球集団は無刺激のものと比較し、  
923 高い活性酸素産生を示し、コイ G-CSF は好中球のプライミング作用を有するこ  
924 とが明らかとなった。さらに、G-CSFb1 は G-CSFa1 より強力に好中球のプライ  
925 ミングを刺激した。

926 以上より、コイの G-CSF は A グループと B グループに大別され、G-CSFa1 と  
927 G-CSFb1 の間で機能の分担が認められた。G-CSFa1 は種々の組織において、恒  
928 常的な遺伝子発現を示し、好中球/マクロファージ共通前駆細胞の増殖を刺激し  
929 たことから、骨髄球系細胞を数的に維持する役割を持つことが示唆された。一方、  
930 G-CSFb1 は感染刺激時に発現し、好中球の産生、遊走および活性化を強く刺激  
931 したことから、コイの自然免疫応答において主要な役割を担っていると考えら  
932 れた。

933

#### 934 コイ好塩基球産生因子の同定および機能解析

935 ヒトの IL-3、IL-5、GM-CSF は、活性化 T 細胞から産生され、好酸球および好  
936 塩基球の産生を促すサイトカインである。ヒトにおいてこれら 3 分子をコード  
937 する遺伝子は、いずれも第 5 染色体上において、Th2 サイトカインである IL-4  
938 および IL-13 の遺伝子の近傍に位置する。加えて、3 分子は全て共通受容体  $\beta$  鎖  
939 ( $\beta c$ ) とその下流の JAK-STAT を介してシグナル伝達を行うことから、同一遺伝  
940 子から派生したと考えられる IL-5 family サイトカイン群である。真骨魚類では、  
941 これら 3 分子と相同な遺伝子は発見されておらず、存在は不明であった。しか  
942 し、近年ゾウギンザメやガーといった真骨魚類以外の魚種で IL-5 family サイト

943 カイン様遺伝子 IL-5fam の存在が示された。本研究では、真骨魚類のコイで初め  
944 て IL-5fam を同定し、その生物活性を明らかにするため、遺伝子発現解析を行う  
945 とともに、組換えタンパク質を作製して、シグナル伝達経路、造血活性の検討お  
946 よび増殖した細胞の性状解析を行った。

947 コイのゲノム情報を用いて、哺乳類の IL-4 と IL-13 の相同遺伝子と考えられ  
948 る IL-4/13 付近の遺伝子を検索した結果、IL-5fam 遺伝子はパラログ (IL-5fam1,  
949 IL-5fam2) として存在していた。また、分子系統解析の結果、コイの IL-5fam は  
950 哺乳類の IL-5、IL-3 および GM-CSF と異なる、魚類 IL-5fam のクラスターに分  
951 類された。本研究では、IL-5fam1 について遺伝子発現解析および組換えタンパ  
952 ク質による機能解析を行った。

953 IL-5fam1 について遺伝子発現解析を行った結果、大腸菌死菌を投与したコイ  
954 の腎臓組織やマイトジェン刺激した腎臓白血球において発現上昇が認められた。  
955 特に、T 細胞マイトジェンであるフィトヘマグルチニンで刺激した結果、無刺激  
956 の細胞と比較し、*il-5fam1* の発現が 15 倍程度増強されたため、IL-5fam1 は免疫  
957 刺激時に活性化 T 細胞より産生されることが示唆された。

958 次に、コイ IL-5fam1 の組換えタンパク質を作製し、機能解析を行った。組換  
959 えコイ IL-5fam1 が液体培地上で、腎臓白血球に対する増殖活性を示したため、  
960 増殖細胞の性状解析を目的として、コロニー形成試験を行った。その結果、IL-  
961 5fam1 は主に散在性の細胞から成るコロニー (Type 1) の形成を促し、僅かに凝  
962 集細胞から成るコロニー (Type 2) の形成も促した。コロニーを回収し、構成細  
963 胞の性状解析を行った結果、Type 1 コロニーにおいて好塩基球と同様の染色性  
964 および遺伝子発現様式を示す顆粒球が認められた。それらの顆粒球は、透過型電  
965 子顕微鏡において好塩基球と類似した顆粒が認められたため、Type 1 コロニー  
966 が好塩基球系列の前駆細胞由来であると考えられた。一方、Type 2 コロニーには

967 形態観察では、顆粒球は存在せず、幼若な細胞のみが認められた。また、遺伝子  
968 発現解析では、マクロファージ系列のマーカーを発現した。そのため、Type 2 コ  
969 ロニーはマクロファージ前駆細胞に由来することが示唆された。さらに、2 種類  
970 のコロニーはともに、 $\beta c$  遺伝子を発現していた。

971 IL-5fam1 が  $\beta c$  と相互作用を示すかを明らかにするため、細胞外  $\beta c$  組換え体  
972 を用いて IL-5fam1 に対するコロニー形成阻害試験を行った。その結果、 $\beta c$  組換  
973 え体は濃度依存的にコロニー形成を阻害した。また、IL-5fam1 の腎臓白血球に  
974 おけるシグナル伝達経路を検討したところ、JAK-STAT 経路を活性化しているこ  
975 とが明らかになり、IL-5fam は哺乳類と同様に  $\beta c$  を介して JAK-STAT 経路を介  
976 したシグナル伝達経路を行うことが明らかになった。

977 このような結果からコイ IL-5fam1 は、免疫刺激によって T 細胞から産生され  
978 る機能的なサイトカインであり、腎臓白血球に存在する造血細胞に作用して好  
979 塩基球の分化・増殖を促すことが明らかになった。一方、IL-5fam1 は  $\beta c$  を介し  
980 て造血活性を示した。このことから、魚類の IL-5fam は哺乳類 IL-5family サイト  
981 カインと共通の形質を有する、3 分子と同一の分子から派生したサイトカインで  
982 あると考えられた。

983 以上、本研究の成果により、コイ G-CSF は好中球の産生、遊走および活性化  
984 を制御すること、IL-5fam は  $\beta c$  受容体を介して好塩基球の産生を制御すること  
985 が明らかとなり、脊椎動物のサイトカインにおける本質的な生物活性の普遍性  
986 が示された。一方、WGD により生じた A と B の 2 グループの G-CSF は免疫学  
987 的に機能分担していること、また、IL-5fam は 3 分子に派生した哺乳類とは異な  
988 り祖先形質をそのまま残していることが示唆され、真骨魚類における免疫制御  
989 機構の特殊性の一端が示された。

990 約 4~5 億年前に四肢動物と分岐した真骨魚類は、生命維持に重要なシステム

991 を保有しながらも、多様な進化を遂げ、様々な環境に適応してきた。この進化の  
992 原動力には、WGDにより生じた、新たな機能を有する遺伝子が重要な役割を果  
993 たしてきたと考えられる。水中で常に多くの病原体にさらされている魚類は、自  
994 然免疫による恒常的な病原体の排除や、迅速な生体防御反応が求められる。WGD  
995 により生じた G-CSF における重複分子による定常状態と感染状態における機能  
996 分担は、これらの反応を効率良く行うためのシステムである可能性が考えられ  
997 る。また、4 億年以上かけて様々な環境に適応した真骨魚類は、未だ明らかにな  
998 っていない多様な免疫システムを有している可能性がある。好中球以外の顆粒  
999 球は寄生虫排除に重要であることが示されているものの、それらの組成は魚種  
1000 により大きく異なっている。また、本研究により、顆粒球の産生を制御するサイ  
1001 トカインである IL-5fam の保存性についても、魚種間で多様であることが明らか  
1002 となった。この免疫システムの多様性の背景には、WGDにより生じた新たな遺  
1003 伝子が、寄生虫排除などに対する生体防御機構の制御を代替している可能性が  
1004 考えられる。いずれにしても、魚類の免疫システムの特殊性の要因は、WGDに  
1005 集約される可能性が高いと考えられる。

1006 以上、本研究の知見は、真骨魚類におけるサイトカイン研究の進展や、顆粒球  
1007 が関与する自然免疫機構の深い理解に繋がる重要な成果である。今後、これらの  
1008 知見を応用することで、今後、魚病における病態解明等、魚病対策への貢献も期  
1009 待される。

1010

## 謝辞

1011

1012

1013 本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜った日本大学大学院獣医学研  
1014 究科魚病/比較免疫学研究室の森友忠昭 教授、片倉文彦 専任講師に心より感謝  
1015 申し上げます。また、本論文の厳密なる校正を賜りました日本大学生物資源科学  
1016 部獣医学科の伊藤琢也 教授、壁谷 英則 教授に謹んで感謝いたします。さら  
1017 は、実験の実施にあたり熱心に協力してくださった魚病/比較免疫学研究室の関  
1018 係諸氏に深く感謝いたします。

1019 本研究を行うにあたり直接の御指導を賜りました藤田医科大学総合医科学研  
1020 究所の Dijkstra Johannes Martinus 教授、オランダワーゲニンゲン大学の Geert F  
1021 Wiegertjes 教授に心より感謝いたします。

1022 博士課程在学中、宮前二郎 博士、宮澤龍一郎 博士ならびに岡野雅春 博士と  
1023 多くの時間を共有し苦楽を共にしたことは、研究を進めていく上で大きな励み  
1024 となったことをここに記すとともに、深く感謝申し上げます。

1025 最後に、大学院博士課程への進学を応援いただき、終始温かく見守り、支え続  
1026 けてくれた家族に心から感謝致します。

1027

1028

1029

1030



## 引用文献

1031

1032

- 1033 Aapro, M., Bohlius, J., Cameron, D.A., Dal Lago, L., Donnelly, J.P., Kearney, N., Lyman, G.,  
1034 Pettengell, R., Tjan-Heijnen, V., Walewski, J., 2011. 2010 update of EORTC  
1035 guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence  
1036 of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with  
1037 lymphoproliferative disorders and solid tumours. *European journal of cancer* 47, 8-32.
- 1038 Araki, K., Hirano, K., Takizawa, F., Moritomo, T., Ototake, M., Nakanishi, T., 2007.  
1039 Identification and characterization of multiple lck genes in ginbuna crucian carp *Carassius*  
1040 *auratus langsdorfii*. *Fisheries science* 73, 1017-1024.
- 1041 Aritomi, M., Kunishima, N., Okamoto, T., Kuroki, R., Ota, Y., Morikawa, K., 1999. Atomic  
1042 structure of the GCSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition  
1043 scheme. *Nature* 401, 713-717.
- 1044 Avery, S., Rothwell, L., Degen, W.D., Schijns, V.E., Young, J., Kaufman, J., Kaiser, P., 2004.  
1045 Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains  
1046 functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that  
1047 appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34.  
1048 *Journal of interferon & cytokine research* 24, 600-610.
- 1049 Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms. The production  
1050 by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical*  
1051 *investigation* 52, 741-744.
- 1052 Balla, K.M., Lugo-Villarino, G., Spitsbergen, J.M., Stachura, D.L., Hu, Y., Bañuelos, K., Romo-  
1053 Fewell, O., Aroian, R.V., Traver, D., 2010. Eosinophils in the zebrafish: prospective  
1054 isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. *Blood*,  
1055 blood-2010-2003-267419.
- 1056 Barry, S.C., Bagley, C.J., Phillips, J., Dottore, M., Cambareri, B., Moretti, P., D'Andrea, R.,  
1057 Goodall, G.J., Shannon, M.F., Vadas, M.A., 1994. Two contiguous residues in human  
1058 interleukin-3, Asp21 and Glu22, selectively interact with the alpha-and beta-chains of its  
1059 receptor and participate in function. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8488-8492.
- 1060 Becher, B., Tugues, S., Greter, M., 2016. GM-CSF: from growth factor to central mediator of  
1061 tissue inflammation. *Immunity* 45, 963-973.
- 1062 Blaser, B.W., Moore, J.L., Hagedorn, E.J., Li, B., Riquelme, R., Lichtig, A., Yang, S., Zhou, Y.,  
1063 Tamplin, O.J., Binder, V., 2017. CXCR1 remodels the vascular niche to promote  
1064 hematopoietic stem and progenitor cell engraftment. *Journal of Experimental Medicine*

1065 214, 1011-1027.

1066 Bohjanen, P.R., Okajima, M., Hodes, R.J., 1990. Differential regulation of interleukin 4 and  
1067 interleukin 5 gene expression: a comparison of T-cell gene induction by anti-CD3  
1068 antibody or by exogenous lymphokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*  
1069 87, 5283-5287.

1070 Bönig, H., Silbermann, S., Weller, S., Kirschke, R., Körholz, D., Janssen, G., Göbel, U.,  
1071 Nürnberger, W., 2001. Glycosylated vs non-glycosylated granulocyte colony-stimulating  
1072 factor (G-CSF)—results of a prospective randomised monocentre study. *Bone Marrow*  
1073 *Transplantation* 28, 259-264.

1074 Broughton, S.E., Dhagat, U., Hercus, T.R., Nero, T.L., Grimbaldston, M.A., Bonder, C.S.,  
1075 Lopez, A.F., Parker, M.W., 2012. The GM-CSF/IL - 3/IL - 5 cytokine receptor family:  
1076 from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological reviews* 250, 277-302.

1077 Cebon, J., Layton, J.E., Maher, D., Morstyn, G., 1994. Endogenous haemopoietic growth factors  
1078 in neutropenia and infection. *British journal of haematology* 86, 265-274.

1079 Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., Simon, M.C., 2003. Regulation  
1080 of macrophage and neutrophil cell fates by the PU. 1: C/EBP  $\alpha$  ratio and granulocyte  
1081 colony-stimulating factor. *Nature immunology* 4, 1029-1036.

1082 De Oliveira, S., Lopez-Muñoz, A., Martínez-Navarro, F.J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V.,  
1083 Calado, Â., 2015. Cxcl8-l1 and Cxcl8-l2 are required in the zebrafish defense against  
1084 *Salmonella Typhimurium*. *Developmental & Comparative Immunology* 49, 44-48.

1085 De Oliveira, S., Reyes-Aldasoro, C.C., Candel, S., Renshaw, S.A., Mulero, V., Calado, Â., 2013.  
1086 Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory  
1087 response. *The Journal of Immunology* 190, 4349-4359.

1088 Demetri, G.D., Griffin, J.D., 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor.

1089 Dijkstra, J.M., 2014. T H 2 and T reg candidate genes in elephant shark. *Nature* 511, E7.

1090 Dougan, M., Dranoff, G., Dougan, S.K., 2019. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines:  
1091 regulators of inflammation. *Immunity* 50, 796-811.

1092 Fujiki, K., Shin, D.-H., Nakao, M., Yano, T., 1999. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*)  
1093 CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural  
1094 killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization.  
1095 *Immunogenetics* 49, 909-914.

1096 Galdames, J.A., Zuñiga-Traslaviña, C., Reyes, A.E., Feijóo, C.G., 2014. Gcsf-Chr19 promotes  
1097 neutrophil migration to damaged tissue through blood vessels in zebrafish. *The Journal of*  
1098 *Immunology* 193, 372-378.

1099 Guarienti, M., Giacomuzzi, E., Gianoncelli, A., Sigala, S., Spano, P., Pecorelli, S., Pani, L.,  
1100 Memo, M., 2015. Computational and functional analysis of biopharmaceutical drugs in

1101 zebrafish: Erythropoietin as a test model. *Pharmacological research* 102, 12-21.

1102 Hallett, M.B., Lloyds, D., 1995. Neutrophil priming: the cellular signals that say ‘amber’but not  
1103 ‘green’. *Immunology today* 16, 264-268.

1104 Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome:  
1105 oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood, The Journal of the American*  
1106 *Society of Hematology* 92, 3007-3017.

1107 Hansen, G., Hercus, T.R., McClure, B.J., Stomski, F.C., Dottore, M., Powell, J., Ramshaw, H.,  
1108 Woodcock, J.M., Xu, Y., Guthridge, M., 2008. The structure of the GM-CSF receptor  
1109 complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 134, 496-507.

1110 Havixbeck, J.J., Rieger, A.M., Wong, M.E., Hodgkinson, J.W., Barreda, D.R., 2016. Neutrophil  
1111 contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in  
1112 teleost fish. *Journal of leukocyte biology* 99, 241-252.

1113 Hercus, T.R., Cambareri, B., Dottore, M., Woodcock, J., Bagley, C.J., Vadas, M., Shannon, M.,  
1114 Lopez, A., 1994. Identification of residues in the first and fourth helices of human  
1115 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor involved in biologic activity and in  
1116 binding to the alpha-and beta-chains of its receptor. *Blood* 83, 3500-3508.

1117 Hine, P., 1992. The granulocytes of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 2, 79-98.

1118 Jaillon, O., Aury, J.-M., Brunet, F., Petit, J.-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L.,  
1119 Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., 2004. Genome duplication in the teleost fish  
1120 *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431, 946-957.

1121 Joerink, M., Ribeiro, C.M., Stet, R.J., Hermsen, T., Savelkoul, H.F., Wiegertjes, G.F., 2006. Head  
1122 kidney-derived macrophages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show plasticity and  
1123 functional polarization upon differential stimulation. *The Journal of Immunology* 177, 61-  
1124 69.

1125 Katakura, F., Nishiya, K., Wentzel, A.S., Hino, E., Miyamae, J., Okano, M., Wiegertjes, G.F.,  
1126 Moritomo, T., 2019. Paralogs of common carp granulocyte colony-stimulating factor (G-  
1127 CSF) have different functions regarding development, trafficking and activation of  
1128 neutrophils. *Frontiers in immunology* 10.

1129 Katakura, F., Sugie, Y., Hayashi, K., Nishiya, K., Miyamae, J., Okano, M., Nakanishi, T.,  
1130 Moritomo, T., 2018. Thrombopoietin (TPO) induces thrombocytic colony formation of  
1131 kidney cells synergistically with kit ligand A and a non-secretory TPO variant exists in  
1132 common carp. *Developmental & Comparative Immunology* 84, 327-336.

1133 Katakura, F., Yabu, T., Yamaguchi, T., Miyamae, J., Shirinashihama, Y., Nakanishi, T.,  
1134 Moritomo, T., 2015. Exploring erythropoiesis of common carp (*Cyprinus carpio*) using an  
1135 in vitro colony assay in the presence of recombinant carp kit ligand A and erythropoietin.  
1136 *Developmental & Comparative Immunology* 53, 13-22.

1137 Katzenback, B.A., Belosevic, M., 2009. Isolation and functional characterization of neutrophil-  
1138 like cells, from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney. *Developmental & Comparative*  
1139 *Immunology* 33, 601-611.

1140 Katzenback, B.A., Katakura, F., Belosevic, M., 2016. Goldfish (*Carassius auratus* L.) as a model  
1141 system to study the growth factors, receptors and transcription factors that govern  
1142 myelopoiesis in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 58, 68-85.

1143 Kawakami, M., Tsutsumi, H., Kumakawa, T., Abe, H., Hirai, M., Kurosawa, S., Mori, M.,  
1144 Fukushima, M., 1990. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients  
1145 with infections.

1146 Kitagawa, S., Yuo, A., Souza, L.M., Saito, M., Miura, Y., Takaku, F., 1987. Recombinant human  
1147 granulocyte colony-stimulating factor enhances superoxide release in human granulocytes  
1148 stimulated by the chemotactic peptide. *Biochemical and Biophysical Research*  
1149 *Communications* 144, 1143-1146.

1150 Kobayashi, I., Katakura, F., Moritomo, T., 2016. Isolation and characterization of hematopoietic  
1151 stem cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 58, 86-94.

1152 Kodama, H., Tijiwa, K., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2002. Granulocyte responses to  
1153 experimental injection of live and formalin-killed bacteria in carp (*Cyprinus carpio*).  
1154 *Veterinary immunology and immunopathology* 90, 101-105.

1155 Koeffler, H.P., Gasson, J., Ranyard, J., Souza, L., Shepard, M., Munker, R., 1987. Recombinant  
1156 human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor.

1157 Kolder, I., Van Der Plas-Duivesteyn, S., Tan, G., Wiegertjes, G., Forlenza, M., Guler, A., Travin,  
1158 D., Nakao, M., Moritomo, T., Irnazarow, I., 2016. A full-body transcriptome and  
1159 proteome resource for the European common carp. *BMC genomics* 17, 701.

1160 Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P.D., Ramsay, A.J., Milbourne, E.A., Dai, W.J., Ovington,  
1161 K.S., Behm, C.A., Köhler, G., Young, I.G., 1996. IL-5-deficient mice have a  
1162 developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody  
1163 and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4, 15-24.

1164 Kurotaki, D., Yamamoto, M., Nishiyama, A., Uno, K., Ban, T., Ichino, M., Sasaki, H.,  
1165 Matsunaga, S., Yoshinari, M., Ryo, A., 2014. IRF8 inhibits C/EBP  $\alpha$  activity to restrain  
1166 mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nature*  
1167 *communications* 5, 4978.

1168 Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y.,  
1169 Dranoff, G., Galli, S.J., 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil  
1170 development and in immunity to parasites. *Nature* 392, 90.

1171 Lee, J.S., Campbell, H.D., Kozak, C.A., Young, I.G., 1989. The Il-4 and Il-5 genes are closely  
1172 linked and are part of a cytokine gene cluster on mouse chromosome 11. *Somatic cell and*

1173 molecular genetics 15, 143-152.

1174 Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S.,  
1175 Zhan, Y.F., Dunn, A.R., 1994. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have  
1176 chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and  
1177 impaired neutrophil mobilization.

1178 Lin, H.-F., Traver, D., Zhu, H., Dooley, K., Paw, B.H., Zon, L.I., Handin, R.I., 2005. Analysis of  
1179 thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood* 106, 3803-3810.

1180 Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., Link, D.C., 1996. Impaired production and  
1181 increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-  
1182 deficient mice. *Immunity* 5, 491-501.

1183 Lopez, A.F., Elliott, M.J., Woodcock, J., Vadas, M.A., 1992. GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-  
1184 competition on human haemopoietic cells. *Immunology today* 13, 495-500.

1185 Lundin, L.G., 1993. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal  
1186 regions in man and the house mouse. *Genomics* 16, 1-19.

1187 Ma, O., Hong, S., Guo, H., Ghiaur, G., Friedman, A.D., 2014. Granulopoiesis requires increased  
1188 C/EBP  $\alpha$  compared to monopoiesis, correlated with elevated Cebpa in immature G-CSF  
1189 receptor versus M-CSF receptor expressing cells. *PLoS One* 9, e95784.

1190 Mayumi, M., Takeda, Y., Hoshiko, M., Serada, K., Murata, M., Moritomo, T., Takizawa, F.,  
1191 Kobayashi, I., Araki, K., Nakanishi, T., 2008. Characterization of teleost phagocyte  
1192 NADPH oxidase: molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*)  
1193 phagocyte NADPH oxidase. *Molecular immunology* 45, 1720-1731.

1194 McKinnon, M., Page, K., Uings, I.J., Banks, M., Fattah, D., Proudfoot, A.E., Graber, P., Arod,  
1195 C., Fish, R., Wells, T.N., 1997. An interleukin 5 mutant distinguishes between two  
1196 functional responses in human eosinophils. *Journal of Experimental Medicine* 186, 121-  
1197 129.

1198 Murphy, J.M., Young, I.G., 2006. IL - 3, IL - 5, and GM - CSF signaling: crystal structure of the  
1199 human beta - common receptor. *Vitamins & Hormones* 74, 1-30.

1200 Nakanishi, T., Toda, H., Shibasaki, Y., Somamoto, T., 2011. Cytotoxic T cells in teleost fish.  
1201 *Developmental & Comparative Immunology* 35, 1317-1323.

1202 Nam, B.-H., An, G.-H., Baeck, G.-W., Kim, M.-C., Kim, J.-W., Park, H.J., Lee, D.-C., Park, C.-  
1203 I., 2009. Molecular cloning and expression of cDNAs for two distinct granulocyte colony  
1204 stimulating factor genes from black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Fish & shellfish*  
1205 *immunology* 27, 360-364.

1206 Neumann, N.F., Barreda, D., Belosevic, M., 1998. Production of a macrophage growth factor (s)  
1207 by a goldfish macrophage cell line and macrophages derived from goldfish kidney  
1208 leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 22, 417-432.

- 1209 Nicola, N.A., Metcalf, D., Matsumoto, M., Johnson, G.R., 1983. Purification of a factor inducing  
1210 differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte  
1211 colony-stimulating factor. *Journal of Biological Chemistry* 258, 9017-9023.
- 1212 Odaka, T., Suetake, H., Maeda, T., Miyadai, T., 2018. Teleost Basophils Have IgM-Dependent  
1213 and Dual Ig-Independent Degranulation Systems. *The Journal of Immunology*, ji1701051.
- 1214 Ohno, S., 1999. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970–1999,  
1215 *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier, pp. 517-522.
- 1216 Ohno, S., 2013. *Evolution by gene duplication*. Springer Science & Business Media.
- 1217 Ohtani, M., Hayashi, N., Hashimoto, K., Nakanishi, T., Dijkstra, J.M., 2008. Comprehensive  
1218 clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. *Immunogenetics* 60,  
1219 383-397.
- 1220 Olavarría, V.H., Gallardo, L., Figueroa, J.E., Mulero, V., 2010. Lipopolysaccharide primes the  
1221 respiratory burst of Atlantic salmon SHK-1 cells through protein kinase C-mediated  
1222 phosphorylation of p47phox. *Developmental & Comparative Immunology* 34, 1242-1253.
- 1223 Oster, W., Lindemann, A., Mertelsmann, R., Herrmann, F., 1989. Production of macrophage - ,  
1224 granulocyte - , granulocyte - macrophage - and multi - colony - stimulating factor by  
1225 peripheral blood cells. *European journal of immunology* 19, 543-548.
- 1226 Panopoulos, A.D., Watowich, S.S., 2008. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular  
1227 mechanisms of action during steady state and ‘emergency’hematopoiesis. *Cytokine* 42,  
1228 277-288.
- 1229 Pazdrak, K., Young, T.W., Straub, C., Stafford, S., Kurosky, A., 2011. Priming of eosinophils by  
1230 GM-CSF is mediated by protein kinase C  $\beta$  II-phosphorylated L-plastin. *The Journal of*  
1231 *Immunology* 186, 6485-6496.
- 1232 Petit, J., David, L., Dirks, R., Wiegertjes, G.F., 2017. Genomic and transcriptomic approaches to  
1233 study immunology in cyprinids: What is next? *Developmental & Comparative*  
1234 *Immunology* 75, 48-62.
- 1235 Powell, D., Tauzin, S., Hind, L.E., Deng, Q., Beebe, D.J., Huttenlocher, A., 2017. Chemokine  
1236 signaling and the regulation of bidirectional leukocyte migration in interstitial tissues. *Cell*  
1237 *reports* 19, 1572-1585.
- 1238 Rennick, D., Yang, G., Gemmell, L., Lee, F., 1987. Control of hemopoiesis by a bone marrow  
1239 stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-  
1240 stimulating factors. *Blood* 69, 682-691.
- 1241 Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T.X., Look, A.T., Kanki, J.P., 2005. Interplay of  
1242 pu. 1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish.  
1243 *Developmental cell* 8, 97-108.
- 1244 Rombout, J., Koumans - van Diepen, J., Emmer, P., Taverne - Thiele, J., Taverne, N., 1996.

- 1245 Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *Journal of*  
1246 *Fish Biology* 49, 521-531.
- 1247 Sanderson, C.J., 1992. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-3109.
- 1248 Santos, M.D., Yasuike, M., Hirono, I., Aoki, T., 2006. The granulocyte colony-stimulating factors  
1249 (CSF3s) of fish and chicken. *Immunogenetics* 58, 422-432.
- 1250 Secombes, C., Van Groningen, J., Egberts, E., 1983. Separation of lymphocyte subpopulations in  
1251 carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies.  
1252 *Immunology* 48, 165.
- 1253 Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., Link, D.C., 2002. G-CSF is an essential  
1254 regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17, 413-  
1255 423.
- 1256 Shearer, W.T., Rosenwasser, L.J., Bochner, B.S., Martinez-Moczygemba, M., Huston, D.P.,  
1257 2003. Biology of common  $\beta$  receptor–signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF.  
1258 *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, 653-665.
- 1259 Shibasaki, Y., Yabu, T., Araki, K., Mano, N., Shiba, H., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2014.  
1260 Peculiar monomeric interferon gammas, IFN  $\gamma$  rel 1 and IFN  $\gamma$  rel 2, in ginbuna crucian  
1261 carp. *The FEBS journal* 281, 1046-1056.
- 1262 Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R.,  
1263 Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., 1986. Recombinant human granulocyte colony-  
1264 stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232, 61-65.
- 1265 Spiekermann, K., Roesler, J., Emmendoerffer, A., Elsner, J., Welte, K., 1997. Functional features  
1266 of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical  
1267 implications. *Leukemia* 11, 466-478.
- 1268 Stachura, D.L., Svoboda, O., Campbell, C.A., Espín-Palazón, R., Lau, R.P., Zon, L.I., Bartůněk,  
1269 P., Traver, D., 2013. The zebrafish granulocyte colony-stimulating factors (Gcsfs): 2  
1270 paralogous cytokines and their roles in hematopoietic development and maintenance.  
1271 *Blood* 122, 3918-3928.
- 1272 Stolte, E.H., Savelkoul, H.F., Wiegertjes, G., Flik, G., Verburg-van Kemenade, B.L., 2008.  
1273 Differential expression of two interferon- $\gamma$  genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.).  
1274 *Developmental & Comparative Immunology* 32, 1467-1481.
- 1275 Suda, T., Suda, J., Ogawa, M., Ihle, J.N., 1985. Permissive role of interleukin 3 (IL - 3) in  
1276 proliferation and differentiation of multipotential hemopoietic progenitors in culture.  
1277 *Journal of cellular physiology* 124, 182-190.
- 1278 Suzuki, Y., 1986. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bulletin of the*  
1279 *Japanese Society of Scientific Fisheries* 52, 1895-1899.
- 1280 Suzuki, Y., 1992. Basophil migration in acute inflammation in the puffer fish. *Nippon Suisan*

1281 Gakkaishi 58, 2005-2007.

1282 Takahashi, T., Yamaguchi, N., Mita, S., Yamaguchi, Y., Suda, T., Tominaga, A., Kikuchi, Y.,  
1283 Miura, Y., Takatsu, K., 1990. Structural comparison of murine T-cell (B151K12)-derived  
1284 T-cell-replacing factor (IL-5) with rIL-5: dimer formation is essential for the expression  
1285 of biological activity. *Molecular immunology* 27, 911-920.

1286 Tavernier, J., Tuypens, T., Verhee, A., Plaetinck, G., Devos, R., Van der Heyden, J., Guisez, Y.,  
1287 Oefner, C., 1995. Identification of receptor-binding domains on human interleukin 5 and  
1288 design of an interleukin 5-derived receptor antagonist. *Proceedings of the National  
1289 Academy of Sciences* 92, 5194-5198.

1290 Tsai, F.-Y., Orkin, S.H., 1997. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival  
1291 of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid  
1292 terminal differentiation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 89,  
1293 3636-3643.

1294 van der Aa, L.M., Chadzinska, M., Tijhaar, E., Boudinot, P., Verburg-van Kemenade, B.M.,  
1295 2010. CXCL8 chemokines in teleost fish: two lineages with distinct expression profiles  
1296 during early phases of inflammation. *PLoS One* 5, e12384.

1297 Van Leeuwen, B., Martinson, M., Webb, G., Young, I., 1989. Molecular organization of the  
1298 cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on  
1299 human chromosome 5. *Blood* 73, 1142-1148.

1300 Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J.S., Meyer, A., Van de Peer, Y., 2004. Major events in the  
1301 genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-  
1302 finned fishes and land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101,  
1303 1638-1643.

1304 Wang, J.M., Chen, Z.G., Colella, S., Bonilla, M.A., Welte, K., Bordignon, C., Mantovani, A.,  
1305 1988. Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.

1306 Watari, K., Asano, S., Shirafuji, N., Kodo, H., Ozawa, K., Takaku, F., Kamachi, S.-i., 1989. Serum  
1307 granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with  
1308 various disorders as estimated by enzyme immunoassay.

1309 Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., 2014.  
1310 Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature  
1311 genetics* 46, 1212.

1312 Yamaguchi, T., Takizawa, F., Fischer, U., Dijkstra, J., 2015. Along the axis between type 1 and  
1313 type 2 immunity; principles conserved in evolution from fish to mammals. *Biology* 4, 814-  
1314 859.

1315 Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A., Takatsu, K.,  
1316 1988. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of



- 1317 murine eosinophilic precursors. Journal of Experimental Medicine 167, 43-56.
- 1318 Yaparla, A., Wendel, E.S., Grayfer, L., 2016. The unique myelopoiesis strategy of the amphibian  
1319 Xenopus laevis. Developmental & Comparative Immunology 63, 136-143.
- 1320 Zon, L.I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E.A., Kimura, A., Bennett, J.C., Orkin, S.H., Ackerman,  
1321 S.J., 1993. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and  
1322 basophils: potential role in gene transcription. Blood 81, 3234-3241.
- 1323 Zsebo, K.M., Yuschenkoff, V.N., Schiffer, S., Chang, D., McCall, E., Dinarello, C.A., Brown,  
1324 M.A., Altrock, B., Bagby, G.J., 1988. Vascular endothelial cells and granulopoiesis:  
1325 interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. Blood 71, 99-103.
- 1326 笠原, 正., 2001. ヒトのゲノムは本来 8 倍体だったのか?(ゲノムサイエンスの新たなる挑戦)--  
1327 (第 2 部 ゲノムの機能解析から生命の多様性に迫る 3. 脊椎動物). 蛋白質核酸酵素 46,  
1328 2473-2476.
- 1329 椎橋孝、飯田貴次, 顆粒球—顆粒球—魚類好中球の活性酸素産生機構を中心として—, 「魚  
1330 類免疫系, 渡辺 翼編」. 2003, 恒星社厚生閣, 東京.
- 1331
- 1332
- 1333
- 1334
- 1335
- 1336
- 1337
- 1338
- 1339
- 1340
- 1341