鳥類の宿主防御ペプチドの多様性

石毛 太一郎

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Diversity of Avian Host defense peptide

Taichiro Ishige

Nodai Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture Sakuragaoka 1-1-1, setagaya-ku, Tokyo

はじめに

宿主防御ペプチド (Host defense peptide; HDP) は、別名抗菌ペプチドとも呼ばれ、病原微生物の感染から宿主を守るための自然免疫としての生体防御機構の 1 つで、細菌から脊椎動物、さらには植物にわたる幅広い生物種で報告されている (Cuperus ら 2013)。抗菌ペプチドの活性はそのアミノ酸配列およびその配列に基づく立体構造に依存し、微生物、真菌、原虫および一部のウイルスに対してかなり広範囲な活性を示す。HDP の直接のターゲットは微生物の細胞膜であり、HDP が静電相互作用により強く結合することにより、膜の流動性を劇的に変化させたり膜破壊を起こしたりすることにより、抗菌あるいは殺菌作用を発揮する。さらに、HDP はサイトカインの調節や免疫活性などの広範囲の免疫調節を有するものもある。病原微生物への一次防御機構の役割に加え、感染部位での炎症の抑制、樹状細胞の成熟化など獲得免疫の橋渡しの役割にも関与し、さらに、腫瘍細胞への細胞傷害活性も報告されている。近年、薬剤耐性菌や世界中で流行している感染症を引き起こす微生物などに対して、HDP はこのような問題を解決するための抗菌薬として期待されている。また、その多様性が疾患感受性に関わっていることが明らかになっており、その多様性を調べることは抗病性育種を考える上で重要と考えられている。

本稿では、まず HDP の簡単な解説から始め、次に我々が鳥類において主要な HDP と考えている 4 種の HDP について、その機能と我々の研究を例に紹介する。

1. HDP の特徴と機能

1-1. 特徴

HDP は抗菌ペプチドと呼ばれていたこともあり、その主な特徴は抗菌作用を有するペプチドで、微生物にも確認されていることから進化的にも強く保存された生体防御システムである。非常に多くの生物から HDP は同定されており、人工的に作られたものも合わせると約 10,000 個の HDP が知られている。

一方で、HDP はそのファミリーごとに特徴的なモチーフは存在するが、コンセンサス配列は存在しない。しかし、おおまかな特徴として、1. 100 アミノ酸残基以下であること (多くは 12-59 アミノ酸残基)、2. 塩基性アミノ酸を豊富に含むために生理的条件下では正電荷となること、3. α ヘリックス構造および β シート構造をとり、親水性アミノ酸領域と疎水性アミノ酸領域を併せ持つ両親媒性構造 (水にも脂質にも親和性を持つ) を形成することなどの特徴を持つ。また、短い故に、アミノ酸置換により、HDP の活性が大きく変化する場合がある。このため、上記のような特徴を有する既知タンパク質の中には、抗菌活性を示すことが報告されているものもある (Harwig ら 1995; El ら 2008)。

1-2. 抗菌活性

最も基本的な HDP の活性は、病原微生物の細胞膜を破壊することである (図 1) (Epand と Vogel 1999)。正に荷電した HDP は、病原微生物の細胞壁を透過し、酸性リン脂質が多く存在し、負に帯電している微生物の細胞膜に静電的に結合し抗菌または殺菌作用を示

連絡先: 石毛太一郎 東京農業大学生物資源ゲノム解析センター
〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1
(e-mail: t3ishige@nodai.ac.jp)

図1 HDPによる抗菌活性の模式図。HDPは正に荷電したアミノ酸を多く有し、総電荷も正である。一方で、微生物は負に荷電しているため、細胞壁を通り抜け静電的に細胞膜に結合する。細胞膜に結合したHDPはやがて、バレルスティープモデル、トロポイダルモデル、カーペットモデルといったいくつかの方法により細胞膜と相互作用し、膜を穿孔することで抗菌活性を発揮する。

す（Hancock 2001）。一方で、特定のHDPは、細胞膜の構成物（リポ多糖やペプチドグリカン）に特異的に結合することにより細胞膜を破壊する。また、HDPの中には細胞内分子に結合し、これを破壊するものもある。しかし、中性リン脂質に富んだ宿主細胞膜や膜安定化作用のあるコレステロールが存在する赤血球膜への結合性は弱いといった特徴がある。HDPの構造は、 α ヘリックス構造、 β シート構造、 α ヘリックス構造および β シート構造の両方を形成するものに分かれる。どのタイプも水溶性であり、 α ヘリックス構造のHDPは、溶液中ではランダムコイルで存在し、細胞膜と相互作用をすることによって、疎水性および親水性アミノ酸残基がそれぞれヘリックスの片面に偏る両親媒性のヘリックス構造を取るのが特徴である。 β シート構造のHDPはペプチド分子内に含まれる複数のシステイン残基の間でジスルフィド結合を形成し、これにより構造が安定する。

HDPの抗菌活性の機序は、バレルスティープモデル、トロポイダルモデルおよびカーペットモデルとして知られている3つが仮定されている（図1）。①バレルスティープモデルは、HDPの疎水性領域が微生物の細胞膜の脂質2重層に付着し、付着したHDP同士が細胞膜の脂質2重層を中心に束ねられるように凝集する。これにより、微生物の細胞膜に小さな孔が形成され、細胞内容物が流出し微生物を死に至らしめるモデルである（図1）。②トロポイダルモデルでは、HDPの極性領域と微生物の脂質の極性を持った部位

が結合し、HDPのらせん構造の部分が微生物の細胞膜に入り込み、HDPの親水性領域と細胞膜の脂質の極性を持った部位が共に細胞膜の中心に入り込んでくるために湾曲し、小さな孔を形成する。但し、バレルスティープモデルと異なり、HDPと脂質は常時結合する。これにより、細胞内容物が流出し微生物を死に至らしめるモデルである（図1）。③カーペットモデルでは、HDPの疎水性領域（正電荷）が微生物の細胞膜の陰イオン性の脂質層の表面に付着し、カーペットを敷いたように覆い、HDPは界面活性剤のように脂質層を破壊し、湾曲させ、最終的に脂質層をHDPが完全に覆ったミセル構造が形成される。これにより、細胞内容物が流出し微生物を死に至らしめるモデルである（図1）。

1-3. 免疫調節

HDPの主要な活性は、抗菌活性であるが、炎症調節または病原体毒素の中和へも影響を与える（Mahlapuu ら 2016）。HDPによってもたらされる広範囲の免疫調節には、走化性刺激、免疫細胞分化および獲得免疫への惹起、Toll様受容体（TLR）および（または）サイトカインを媒介とした炎症性サイトカイン産生の抑制および抗エンドトキシン活性などが含まれる。また、敗血症を含む過剰および有害な炎症促進反応を防ぐことも知られている（Mahlapuu ら 2016）。実は、こちらの機能が重要と考えている研究者もいる。

表 1. 宿主防御ペプチドの概要

	種								活性					遺伝子変異	
	細菌	植物	昆虫	魚類	両生類	爬虫類	鳥類	哺乳類	真菌	原生動物	グラム陽性菌	グラム陰性菌	ウイルス	一塩基多型	コピー数多型
NK-lysin				○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
LEAP-2				○	○	○	○	○			○	○	○	○	
Cathelicidin			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Defensin	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○

2. 鳥類の主要な 4 種の HDP の多様性

HDP は多細胞生物の進化に伴い、極めて多様性に富む分子群を構成するようになり、ヒトなどでは、染色体上でクラスターを形成する *cathelicidin* 遺伝子領域および *defensin* 遺伝子領域が知られている。このうち、本稿では鳥類（主にニワトリ）でもその存在が確認され、機能および含有量等の点から主要な HDP と考えられている（Cuperus ら 2013）Granulysin/NK-lysin（以下 NKL と記載）、Liver expressed antimicrobial peptide 2（以下 LEAP-2 と記載）、Cathelicidin（以下 CATH と記載）ならびに Avian β -defensin（以下 AvBD と記載）の 4 群の HDP（表 1）について解説したいと思う。

2-1. NKL

NKL は、脊椎動物特有の HDP とされ、新しいタイプの HDP とされ（Bruhn ら 2003）、他の HDP と異なり球状の 3 次元構造をとる（Kim ら 2016）。NKL の構造は、 α ヘリックス構造および β シート構造の両方を形成し、3 組のジスルフィド結合を有する。NKL は、赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）のアメーババポアと同様にサポシン様タンパク質ファミリーの一員である（Bruhn ら 2003）。ほ乳類の NKL は、ブタ小腸由来のナチュラルキラー（NK）細胞および細胞傷害性 T リンパ球の顆粒から初めて分離され（Andersson ら 1995）、NK 細胞および細胞障害性 T 細胞の顆粒に局在している（Peña と Krensky 1997）。その後、ナマズ（Wang ら 2006）、ウマ（Davis ら 2005）、ウシ（Endsley ら 2004）およびニワトリ（Hong ら 2006）を含む様々な生物種での分離が報告されている（表 1）。NKL は、グラム陰性・陽性菌、真菌および一部のウイルス（Andersson ら 1995; Stenger ら 1997; Ochoa ら 2001; Ma ら 2002）に対する活性に加えて抗腫瘍活性を示す（表 1）（Ernst ら 2000; Takamori ら 2005）。NKL は、走化性因子として、単球の活性および炎症性分子の産生など

免疫系の活性にも寄与する（Deng ら 2005）。また、ブタ（Andersson ら 1995）、ウシ（Endsley ら 2004）、ニワトリ（Lee ら 2012）の NKL には非同義置換が報告され、アミノ酸置換による実効電荷の差が抗菌活性に影響を与えることが示唆されている。ウシ NKL ではコピー数多型（CNV）が報告され、感染防御能を高めるためにコピー数の増加が起こったのではないかと考えられている（表 1）（Chen ら 2015）。

鳥類の NKL には、ニワトリ NKL（GgNKL）（Hong ら 2006）、シチメンチョウ NKL（MgNKL）（Dalloul ら 2010）ゼブラフィンチ NKL（TgNKL）（Warren ら 2010）およびニホンウズラ NKL（CjNKL）（Ishige ら 2014）が報告されている。鳥類の NKL は、他の脊椎動物の NKL と同様に抗菌活性（グラム陰性・陽性菌およびコクシジウム）および腫瘍細胞に対する傷害活性を示す（Hong ら 2006; Lee ら 2012）。GgNKL の Helix 2-loop-helix 3 構造は、抗菌活性に重要な領域（antimicrobial region: 30~31 aa、Lee ら 2012）である。多様性解析はニワトリでのみ報告され（Lee ら 2012）、白色レグホーンおよびコーニッシュにより実施された。その結果、抗菌活性領域内の N29D のアミノ酸置換を引き起こす 271A>G の塩基置換が確認されている。A 対立遺伝子の頻度は、白色レグホーンで 0.89、コーニッシュで 0.52 となり、系統間でその対立遺伝子頻度が異なる。アミノ酸置換 N29D は NKL の実効電荷を変化させるが、構造などには影響を与えず、29N は 29D に比べ、グラム陰性・陽性菌の抗菌活性および抗腫瘍活性が高い傾向が確認され、実効電荷が NKL の活性には重要であると示唆されている（Lee ら 2012）。

我々の研究では 6 系統・99 個体を用いた CjNKL の多様性解析により、ニワトリと同様に G31D のアミノ酸置換を確認した（Ishige ら 2016a）。このアミノ酸置換は実効電荷に影響を与え（31G:2.9、31D:1.9）、さらに、これが大腸菌への抗菌活性に影響を与えることを確認し（表 2）、ニワトリと同様に実効電荷が抗菌活

表 2. Cj31D、Cj31G、Gg29N および Gg29D に対するグラム陰性菌である大腸菌の生存 (%)

ペプチド (実効電荷)	ペプチド濃度 (μ M)			
	1	10	100	1000
Cj31D (1.9)	95 $\pm$ 15.1	111 $\pm$ 5.9	112 $\pm$ 2.8 ^d	14 $\pm$ 1.8 ^b
Cj31G (2.9)	102 $\pm$ 9.0	117 $\pm$ 3.3	35 $\pm$ 2.8 ^b	0 ^a
Gg29D (2.9)	94 $\pm$ 2.8	94 $\pm$ 5.8	99 $\pm$ 6.1 ^c	0 ^a
Gg29N (3.9)	102 $\pm$ 6.2	95 $\pm$ 5.0	0 ^a	0 ^a

a<b<c<d の順で有意差あり

各値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した

性に影響を与えることを確認した。また、興味深いことに CjNKL31G と GgNKL29D は、実効電荷が同値であるにも関わらず、ペプチド濃度が 100 μ M の際に、CjNKL31G の抗菌活性が有意に高いことが判明した (表 2)。これは、実効電荷だけでなくそのアミノ酸配列の構成の違いが抗菌活性に影響を与えたためと示唆された。

2-2. LEAP-2

Liver expressed antimicrobial peptide (LEAP) は、システインリッチペプチドの一種として報告されている (Cuperus ら 2013)。さらに、LEAP は、ジスルフィド結合のペア数が 4 つの場合に LEAP-1、ペア数が 2 つの場合に LEAP-2 に分類される (Cuperus ら 2013)。LEAP-1 については鳥類で報告されていないため割愛する。LEAP-2 は、シグナルペプチド、プレドメインおよび成熟ペプチドからなる。LEAP-2 は、硬骨魚類、爬虫類、鳥類およびほ乳類で報告されている (表 1) (Cuperus ら 2013)。

LEAP-2 は、2003 年にヒト血中で抗菌活性を有すペプチドとして同定された (Krause ら 2003)。LEAP-2 の構造は、 α ヘリックス構造および β シート構造の両方を形成し、2 つのジスルフィド結合を有すペプチドである。LEAP-2 は、他の HDP と同様に細胞膜を直接破壊する (Townes ら 2009) ことにより、グラム陰性・陽性菌を殺菌する (表 1) (Krause ら 2003; Liu ら 2010; Li ら 2015)。加えて、LEAP-2 は、微生物のゲノム DNA の加水分解により抗菌活性を伸介する (Li ら 2015)。しかし、LEAP-2 の免疫調整機能は報告されていない。ヒトおよびウシでは成熟ペプチド内に活性に影響を与えると予測される非同義置換が NCBI の一塩基多型 (SNP) のデータベースである dbSNP に登録されているが、その機能への影響は調べられていない。

一方で、鳥類の LEAP-2 にはニワトリを含めた 46 種類が報告されている。鳥類の LEAP-2 は、他の脊椎動物と同様に、グラム陰性菌に抗菌活性を示す

(Townes ら 2009)。ニワトリのみで、NCBI の dbSNP に活性に影響を与えると予測される非同義置換が登録されている。また、ニワトリの小腸では GgLEAP-2 の 100bp のスプライスバリエントが報告され、21-65 番目のペプチド断片が確認されている (Townes ら 2009)。

我々の研究で、ニホンウズラの LEAP-2 の抗菌活性領域は、驚くべきことにニワトリのある対立遺伝子のそれと完全に一致していた。また、他の鳥類とそのアミノ酸配列を比較したところ、70% 以上の類似性を示し、成熟ペプチドのアミノ酸配列について特定の部位における塩基もしくはアミノ酸の保存性（もしくは出現頻度）を視覚化するシーケンスロゴを作成しても種を超えて高い保存性があることが確認された。さらに、99 個体の LEAP-2 抗菌活性領域の多様性解析により、成熟ペプチド内にはアミノ酸置換どころか塩基配列の多型すら確認されなかった。つまり、ニホンウズラの LEAP-2 は抗菌活性だけでなく、何らかの恒常性維持にも必須であり、非常に高い保存性を維持していると示唆された (Ishige ら 2016c)。

2-3. CATH

CATH は魚類、両生類、爬虫類、鳥類およびほ乳類で報告されている (表 1) (Ageitos ら 2016)。しかし、ウサギおよび齧歯目などの真主齧上目およびイヌおよびネコなどの食肉目では、報告されていない (表 1)。また、多くの生物種で CATH は defensin と同様に常染色体上にクラスターを形成している。CATH は、名前の由来の通り N 末にカセリン様ドメインを持つ (Zhang と Sunkara 2014)。CATH の N 末にあるシグナルペプチドおよびカセリン様ドメインは種を超えて保存性があり、C 末は種により多様性がある。シグナルペプチドは、分泌される前に切断され、カセリン様ドメインも放出される前にセリンプロテアーゼにより切断される (Cuperus ら 2013)。CATH の構造は α ヘリックス構造を有する正に荷電したペプチドである。CATH は、

図2 ニワトリおよびニホンウズラ CATH 領域の遺伝子構成。破線はオルソログを示す。上側に位置する遺伝子はプラス鎖、下側に位置する遺伝子はマイナス鎖である。ニワトリとニホンウズラの CATH 領域は同じ遺伝子順序および転写方向で保存されている。

微生物の表面にあるリボポリサッカライドおよびリボタイコ酸のような負に荷電した分子および負に荷電した疎水性構造である微生物膜の脂質に結合するために両親媒性の構造を保持する (Zhang と Sunkara 2014)。CATH は、他の HDP と同様にグラム陰性・陽性菌、真菌、原生生物および一部のウイルスに対して活性を示す (表 1) (Roby と Nardo 2013; Ageitos ら 2016)。CATH の多様性については、カエル、ヒトおよびバッファローで多型、ウシで CNV が報告されている (Yu ら 2013; López ら 2014; Brahma ら 2015; Chen ら 2017)。しかし、これらの多型や CNV が機能に影響を与えるかは未だに不明である (表 1)。

一方で、14 種の鳥類で CATH が、報告されている (Cheng ら 2015)。ニワトリでは CATH1、CATH2、CATH3 および CATHB1 の 4 つの CATH がタンデムに座位する CATH 領域が報告されている (図 2) (Cheng ら 2015)。ニワトリ、ヨーロッパウズラおよびハトの CATH は、ほ乳類と同様に骨髄や上皮細胞で発現する (Zhang と Sunkara 2014)。鳥類の CATH は、グラム陰性・陽性菌および真菌に対して抗菌活性を示す (Zhang と Sunkara 2014; Gao ら 2015; Yu ら 2015)。鳥類では CATH の多型に関する報告はない。

我々の研究では、ニホンウズラ 5 個体は他のキジ科鳥類と同様に 4 種の CATH 遺伝子がタンデムに並んでいる (図 2) (Ishige ら 2017)。驚くべきことに、CATH3 の抗菌活性領域は、ニホンウズラとニワトリで完全に一致していた。さらに、CATH2 および CATHB1 にはペプチドの機能に影響を与えるアミノ酸置換が確認された (Ishige ら 2017)。以上のことから、CATH は各遺伝子座により多型性が異なり、確認され

たアミノ酸置換が抗菌活性に影響を与えることが示唆された。

2-4. Defensin

HDP の 1 つである defensin (以下 DEF と記載) は、酵母、植物、昆虫、魚類、鳥類およびほ乳類などで報告されており (表 1)、まさに HDP の代表格とも呼ぶに相応しいペプチドである。DEF の特徴は、システイン、アルギニンおよび芳香族アミノ酸に富み、システインによるジスルフィド結合により β シート構造を含む 30 – 45 アミノ酸残基のペプチドである (Hemshekhar ら 2016)。DEF は、多くの動物の常染色体上にクラスターを形成し、ヒトやマウスでは 30 種類の DEF が報告されている。DEF は、 α (DEFA)、 β (DEFB) および θ (DEFT) の 3 タイプに分類され、主に好中球、上皮細胞で合成・分泌される (Hemshekhar ら 2016)。DEFT を除いて、他の HDP と同様に、シグナルペプチド、プロピース、成熟ペプチドからなる。これら 3 タイプは、6 つのシステイン残基のジスルフィド結合の架橋により明確に分類される。DEFA は N 末端から数えて 1 番目のシステイン残基と 6 番目のシステイン残基 (C1-C6) 間、同様に C2-C5、C3-C4 間でジスルフィド結合する。DEFB は C1-C5、C2-4、C3-6 間でジスルフィド結合する。一方で、DEFT は環状構造を持つ極めてユニークな DEF である。DEFT は α -defensin-related peptide 前駆体からプロセスされた 2 種類の DEF 分子が 3 個のジスルフィド結合した後に末端を切り出し、末端を結合した環状構造を取る。これら 3 つの DEF の中で最古の DEF は DEFB である。なぜなら、DEFA は鳥類以下では確認されず、DEFT

図3 ニワトリおよびニホンウズラのAvBD領域。破線はオルソログを示す。各数字はAvBDの種類を示す。上側に位置する遺伝子はプラス鎖、下側に位置する遺伝子はマイナス鎖である。ニワトリとニホンウズラの遺伝子の向き、順序は一致する。しかし、ニホンウズラはAvBD3および7の欠損、AvBD6（ウズラではAvBD101と命名）のオルソログに3個の重複が起きている。

は霊長類のみ（ヒトでは偽遺伝子）である。しかし、DEFBはウシ、ブタを含むほ乳類や鳥類でも報告されており、このことから最古のDEFと考えられている。DEFは、その他のHDPと同様に微生物、真菌、原生生物およびウイルスに対して活性を示す（表1）（Bagnickaら2010; Hemshekharら2016）。

DEFでは、多型およびCNVが報告されている（Bagnickaら2010; Leeら2016）。ヒトのDEFBの多型は、*Helicobacter pylori*に誘導される胃炎、HIVおよびその他多くの感染症、ハンセン病、皮膚炎、乾癬、クローン病、前立腺癌、口腔扁平上皮癌、メラノーマおよび糖尿病の感受性との関係があることが報告されている（Bagnickaら2010）。ニワトリのAvBDでは、多型によりサルモネラ感染への抵抗性に影響を与えることが報告されている（Bagnickaら2010）。また、ウシにおいても多型が報告されている（Bagnickaら2010）。DEFのCNVは、ヒト（Incanniら2016）、ウシ（Meadeら2014）、イヌ（Leonardら2012）およびニワトリ（Leeら2016）で報告されている。特に、ヒトのDEFAおよびDEFBのCNVは、IgA腎症および腎機能障害（Aiら2016）、アルツハイマー病（Szekeresら2016）、尿路感染（Schwadererら2016）のような病気との関連が報告されている。このため、DEFの多型およびCNVはこれら疾患の進展・発症の個体差要因の可能性が有るのではないかと示唆されている。

一方、53種の鳥類でAvBDが報告されている（Chengら2015）。ニワトリでは14種のAvBD遺伝子がタンデムに座位するAvBD領域が報告されている（図3）（Xiaoら2004）。AvBDは、ほ乳類と同様に骨髄や上皮細胞で発現する（Achantaら2012）。鳥類のAvBDは、グラム陰性・陽性菌、真菌および一部のウイルスに対し

て抗菌活性を示す（Cuperusら2013）。また、免疫調節機能についても報告されている（Somanら2009a,b）。多様性については、ニワトリ、シジュウカラおよびセーシェルヤブセンニュウで多型またはCNVが報告されている（HasensteinとLamont2007; Hellgren2015; Gilroyら2016; Leeら2016）。ニワトリはAvBD11、12および13の多型により*Salmonella Enteritidis*感染の抵抗性が異なるため、マーカー遺伝子となる可能性が示唆されている（HasensteinとLamontら2007）。また、シジュウカラAvBD2、4、7、9、10および12の非同義置換は、疎水性および実効電荷に影響を与えることから、病原微生物への結合に影響を与えると考えられている（Hellgren2015）。さらに、種により欠損（AvBD2、3、4、5、7、11、12、13および14）および偽遺伝子化（AvBD1、7、9、11および14）が確認されている（Chengら2015）が、報告されているゲノム情報は次世代シーケンサーにより作成されたドラフトゲノムが多く、その精度には注意が必要である。

我々の研究では、まずニホンウズラのAvBD領域の塩基配列を決定した（Ishigeら2016b）。ニワトリと比較したところ、他の鳥類でも確認されているAvBD3および7の欠損（図3）、AvBD6に相当するAvBD101における3個のCNVが確認された（図3）。これらのことが、ニホンウズラの抗病性に影響を与える要因ではないかと示唆された。

おわりに

本稿では、鳥類のHDPの多様性について、HDPの概要と鳥類における多様性を我々の研究を交えて紹介した。現在、多くの鳥類でドラフトシーケンスが公開されているが、HDPは未同定もしくは一部同定であ

ることがよく見受けられる。特に *CATH* や *AvBD* のようにクラスターを形成するものの同定が進んでいないように思われる。HDP は遺伝子重複によりその数を増やしていったために、クラスターを形成する HDP 遺伝子はお互いが非常に高い類似性を示している。次世代シーケンサーを利用した全ゲノム *de novo* アセンブルでは、シーケンス長が短いこと（イルミナ次世代シーケンサーの場合は長くても 300bp）と *HDP* 遺伝子間の類似性は高いために現行のソフトでの解析は非常に難しいのではないかと考えられる。このため、我々が取ったような部分的に増幅する Long Range PCR を用いた amplicon sequence、または Pacific Bioscience 社の RS II / Sequel システムおよび Oxford Nanopore Technologies 社の MinIon のロングリードシーケンサーで解析することがポイントになると考えられる。我々が解析したニホンウズラは同一サンプルを用いて解析した。興味深いことに LEAP-2 のように多様性がないものがある一方で、NKL および一部の *CATH* に機能に影響を与えるアミノ酸置換が推定された。また、*AvBD* に関しては遺伝子座の重複や欠損が確認された。いずれにしても、ヒトの HDP 研究において、そのアミノ酸置換や CNV が疾患への罹患率に関わってくることは明白であり、家畜の抗病性育種を考える上で HDP は無視できないと考えられる。そのため、HDP の研究が、いつの日か家畜への抗病性育種に生かせる日が来ることを切に願っている。

謝辞

本稿で紹介したニホンウズラ HDP の解析は、東京農業大学先端研究「遺伝子発現機構に基づく新たな家畜改良に関する研究」、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「革新的ゲノム解析情報を用いた生物資源ゲノム解析と農学新領域の創出」および「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」による支援を受け行われた。ここに感謝いたします。

文献

Achanta M, Sunkara LT, Dai G, Bommineni YR, Jiang W, Zhang G. 2012. Tissue expression and developmental regulation of chicken cathelicidin antimicrobial peptides. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3: 1-7.

Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. 2016. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*, 133: 117-138.

Ai Z, Li M, Liu W, Foo JN, Mansouri O, Yin P, Zhou Q, Tang X, Dong X, Feng S, Xu R, Zhong Z, Chen J, Wan J, Lou T, Yu J, Zhou Q, Fan J, Mao H, Gale D, Barratt J, Armour JA, Liu J, Yu X. 2016. Low α -defensin gene copy number increases the risk for IgA nephropathy and renal dysfunction. *Science Translational Medicine*, 8: 345-388.

Andersson M, Gunne H, Agerberth B, Boman A, Bergman T, Sillard R, Jörnvall H, Mutt V, Olsson B, Wigzell H. 1995. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *The EMBO Journal*, 14: 1615-1625.

Bagnicka E, Strzałkowska N, Józwick A, Krzyżewski J, Horbańczuk J, Zwierzchowski L. 2010. Expression and polymorphism of defensins in farm animals. *Acta Biochimica Polonica*, 57: 487-497.

Brahma B, Patra MC, Karri S, Chopra M, Mishra P, De BC, Kumar S, Mahanty S, Thakur K, Poluri KM, Datta TK, De S. 2015. Diversity, antimicrobial action and structure-activity relationship of buffalo Cathelicidins. *PloS One*, 10: 1-21.

Bruhn H, Riekens B, Berninghausen O, Leippe M. 2003. Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochemical Journal*, 375: 737-744.

Chen J, Huddleston J, Buckley RM, Malig M, Lawhon SD, Skow LC, Lee MO, Eichler EE, Anderson L, Womack JE. 2015. Bovine NK-lysin: Copy number variation and functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: E7223-E7229.

Chen L, Chamberlain AJ, Reich CM, Daetwyler HD, Hayes BJ. 2017. Detection and validation of structural variations in bovine whole-genome sequence data. *Genetics Selection Evolution*, 49: 1-13.

Cheng Y, Prickett MD, Gutowska W, Kuo R, Belov K, Burt DW. 2015. Evolution of the avian β -defensin and cathelicidin genes. *BMC Evolutionary Biology*, 15: 1-17.

Cuperus T, Coorens M, van Dijk A, Haagsman, HP. 2013. Avian host defense peptides. *Developmental & Comparative Immunology*, 41: 352-369.

Dalloul RA, Long JA, Zimin AV, Aslam L, Beal K, Ann BL, Bouffard P, Burt DW, Crasta O, Croijmans RP, Cooper K, Coulombe RA, De S, Delany ME, Dodgson JB,

- Dong JJ, Evans C, Frederickson KM, Flicek P, Florea L, Folkerts O, Groenen MA, Harkins TT, Herrero J, Hoffmann S, Megens HJ, Jiang A, de Jong P, Kaiser P, Kim H, Kim KW, Kim S, Langenberger D, Lee MK, Lee T, Mane S, Marcais G, Marz M, McElroy AP, Modise T, Nefedov M, Notredame C, Paton IR, Payne WS, Pertea G, Prickett D, Puiu D, Qioa D, Raineri E, Ruffier M, Salzberg SL, Schatz MC, Scheuring C, Schmidt CJ, Schroeder S, Searle SM, Smith EJ, Smith J, Sonstegard TS, Stadler PF, Tafer H, Tu ZJ, Van Tassell CP, Vilella AJ, Williams KP, Yorke JA, Zhang L, Zhang HB, Zhang X, Zhang Y, Reed KM. 2010. Multi-platform next-generation sequencing of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*): genome assembly and analysis. *PLoS Biology*, 8: 1-21.
- Davis EG, Sang Y, Rush B, Zhang G, Blecha F. 2005. Molecular cloning and characterization of equine NK-lysin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 105: 163-169.
- Deng A, Chen S, Li Q, Lyu, SC, Clayberger C, Krensky AM. 2005. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *The Journal of Immunology*, 174: 5243-5248.
- El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT. 2008. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *Journal of Neuroimmunology*, 200: 11-16.
- Endsley JJ, Furrer JL, Endsley MA, McIntosh MA, Maue AC, Waters WR, Lee DR, Estes DM. 2004. Characterization of bovine homologues of granulysin and NK-lysin. *The Journal of Immunology*, 173: 2607-2614.
- Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, Krensky AM, Leippe M, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL. 2000. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *The Journal of Immunology*, 165: 7102-7108.
- Epand RM, Vogel HJ. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462: 11-28.
- Gao W, Xing L, Qu P, Tan T, Yang N, Li D, Chen H, Feng X. 2015. Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism. *Scientific Reports*, 5: 1-12.
- Gilroy D, Oosterhout C, Komdeur J, Richardson DS. 2016. Avian β -defensin variation in bottlenecked populations: the Seychelles warbler and other congeners. *Conservation Genetics*, 17: 661-674.
- Hancock RE. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 156-164.
- Harwig SS, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisenhauer PB, Lehrer RI. 1995. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *Journal of Clinical Investigation*, 95: 603-610.
- Hasenstein JR, Lamont SJ. 2007. Chicken gallinacin gene cluster associated with Salmonella response in advanced intercross line. *Avian Diseases*, 51: 561-567.
- Hellgren O. 2015. Allelic variation at innate immune genes (avian β -defensins), within a natural population of great tits. *Journal of Avian Biology*, 46: 113-118.
- Hemshekhkar M, Anaparti V, Mookherjee N. 2016. Functions of cationic host defense peptides in immunity. *Pharmaceuticals*, 9: 1-10.
- Hong YH, Lillehoj HS, Dalloul RA, Min W, Miska KB, Tuo W, Lee SH, Han JY, Lillehoj EP. 2006. Molecular cloning and characterization of chicken NK-lysin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110: 339-344.
- Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K. 2014. Basic characterization of avian NK-lysin (NKL) from the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Animal Science Journal*, 85: 90-95.
- Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K. 2016a. Effect of a single polymorphism in the Japanese quail NK-lysin gene on antimicrobial activity. *Animal Science Journal*, 87: 143-146.
- Ishige T, Hara H, Hirano T, Mannen H, Kono T, Hanzawa K. 2016b. Basic characterization of avian β -defensin genes in the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Animal Science Journal*, 87: 311-320.
- Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K. 2016c. Characterization and expression of non-polymorphic liver expressed antimicrobial peptide 2: LEAP-2 in the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Animal Science Journal*, 87: 1182-1187.
- Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K. 2017. Characterization of the cathelicidin cluster in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Science Journal*, 88: 1249-1257.
- Incanni F, Cossu C, Meloni A, Faà V, Serra ML, Dettori F, Meloni A, Rosatelli MC. 2016. β -defensin CNV is

- not associated with susceptibility to *Candida albicans* infections in Sardinian APS I patients. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46: 393-397.
- Kim WH, Lillehoj HS, Gay CG. 2016. Using genomics to identify novel antimicrobials. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 35: 95-103.
- Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Klüver E, Maronde E, Conejo - García J.R, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Nehls MC, Wattler F, Wattler S, Adermann K. 2003. Isolation and biochemical characterization of LEAP - 2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Science*, 12: 143-152.
- Lee MO, Kim EH, Jang HJ, Park MN, Woo HJ, Han JY, Womack JE. 2012. Effects of a single nucleotide polymorphism in the chicken NK-lysin gene on antimicrobial activity and cytotoxicity of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 12087-12092.
- Lee MO, Bornelöv S, Andersson L, Lamont SJ, Chen J, Womack JE. 2016. Duplication of chicken defensin7 gene generated by gene conversion and homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113: 13815-13820.
- Leonard BC, Marks SL, Outerbridge CA, Affolter VK, Kananurak A, Young A, Moore PF, Bannasch DL, Bevins CL. 2012. Activity, expression and genetic variation of canine β -defensin 103: a multifunctional antimicrobial peptide in the skin of domestic dogs. *Journal of Innate Immunity*, 4: 248-259.
- Li HX, Lu XJ, Li CH, Chen J. 2015. Molecular characterization of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*: Antimicrobial activity and molecular mechanism. *Molecular Immunology*, 65: 406-415.
- Liu F, Li JL, Yue GH, Fu JJ, Zhou ZF. 2010. Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133: 133-143.
- López Campos GN, Velarde Félix JS, Sandoval Ramírez L, Cázares Salazar S, Corona Nakamura AL, Amaya Tapia G, Prado Montes de Oca E. 2014. Polymorphism in cathelicidin gene (CAMP) that alters Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α ::ARNT) binding is not associated with tuberculosis. *International Journal of Immunogenetics*, 41: 54-62.
- Ma LL, Spurrell JC, Wang JF, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, Mody CH. 2002. CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *The Journal of Immunology*, 169: 5787-5795.
- Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6: 1-12.
- Meade KG, Cormican P, Narciani F, Lloyd A, O' Farrelly C. 2014. Bovine β -defensin gene family: opportunities to improve animal health? *Physiological Genomics*, 46: 17-28.
- Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Rollinghoff M, Nunes Sarno E, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL. 2001. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nature Medicine*, 7: 174-179.
- Peña SV, Krensky AM. 1997. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *In Seminars in Immunology*, 9: 117-125.
- Roby KD, Nardo AD. 2013. Innate immunity and the role of the antimicrobial peptide cathelicidin in inflammatory skin disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 10: e79-e82.
- Schwaderer AL, Wang H, Kim S, Kline JM, Liang D, Brophy PD, McHugh KM, Tseng GC, Saxena V, Barr-Beare E, Pierce KR, Shaikh N, Manak JR, Cohen DM, Becknell B, Spencer JD, Baker PB, Yu CY, Hains DS. 2016. Polymorphisms in α -Defensin-Encoding DEFA1A3 Associate with Urinary Tract Infection Risk in Children with Vesicoureteral Reflux. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27: 3175-3186.
- Soman SS, Arathy DS, Sreekumar E. 2009a. Discovery of *Anas platyrhynchos* avian β -defensin 2 (Apl_AvBD2) with antibacterial and chemotactic functions. *Molecular Immunology*, 46: 2029-2038.
- Soman SS, Nair S, Issac A, Arathy DS, Niyas KP, Anoop M, Sreekumar E. 2009b. Immunomodulation by duck defensin, Apl_AvBD2: In vitro dendritic cell immunoreceptor (DCIR) mRNA suppression, and B-and T-lymphocyte chemotaxis. *Molecular Immunology*, 46: 3070-3075.
- Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. 1997. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*, 276: 1684-1687.

- Szekeres M, Ivitz E, Datki Z, Kálmán J, Pákási M, Várhelyi ZP, Klivényi P, Zadori D, Somogyvári F, Szolnoki Z, Vécsei L, Mándi Y. 2016. Relevance of defensin β -2 and α defensins (HNP1-3) in Alzheimer's disease. *Psychiatry Research*, 239: 342-345.
- Takamori Y, Ogawa K, Nagata K, Nakamura M. 2005. Granulysin induces cell death with nuclear accumulation. *Journal of Medical and Dental Sciences*, 52: 1-7.
- Townes CL, Michailidis G, Hall J. 2009. The interaction of the antimicrobial peptide cLEAP-2 and the bacterial membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387: 500-503.
- Wang Q, Wang Y, Xu P, Liu Z. 2006. NK-lysin of channel catfish: gene triplication, sequence variation, and expression analysis. *Molecular Immunology*, 43: 1676-1686.
- Warren WC, Clayton DF, Ellegren H, Arnold AP, Hillier LW, Künstner A, Searle S, White S, Vilella AJ, Fairley S, Heger A, Kong L, Ponting CP, Jarvis ED, Mello CV, Minx P, Lovell P, Velho TA, Ferris M, Balakrishnan CN, Sinha S, Blatti C, London SE, Li Y, Lin YC, George J, Sweedler J, Southey B, Gunaratne P, Watson M, Nam K, Backström N, Smeds L, Nabholz B, Itoh Y, Whitney O, Pfenning AR, Howard J, Völker M, Skinner BM, Griffin DK, Ye L, McLaren WM, Flicek P, Quesada V, Velasco G, Lopez-Otin C, Puente XS, Olender T, Lancet D, Smit AF, Hubley R, Konkel MK, Walker JA, Batzer MA, Gu W, Pollock DD, Chen L, Cheng Z, Eichler EE, Stapley J, Slate J, Ekblom R, Birkhead T, Burke T, Burt D, Scharff C, Adam I, Richard H, Sultan M, Soldatov A, Lehrach H, Edwards SV, Yang SP, Li X, Graves T, Fulton L, Nelson J, Chinwalla A, Hou S, Mardis ER, Wilson RK. 2010. The genome of a songbird. *Nature*, 464: 757-762.
- Xiao Y, Hughes AL, Ando J, Matsuda Y, Cheng JF, Skinner-Noble D, Zhang G. 2004. A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics*, 5: 1-11.
- Yu H, Cai S, Gao J, Zhang S, Lu Y, Qiao X, Yang H, Wang Y. 2013. Identification and polymorphism discovery of the cathelicidins, Lf-CATHs in ranid amphibian (*Limnonectes fragilis*). *FEBS Journal*, 280: 6022-6032.
- Yu H, Lu Y, Qiao X, Wei L, Fu T, Cai S, Wang C, Liu X, Zhong S, Wang Y. 2015. Novel cathelicidins from pigeon highlights evolutionary convergence in avian cathelicidins and functions in modulation of innate immunity. *Scientific Reports*, 5: 1-13.
- Zhang G, Sunkara LT. 2014. Avian antimicrobial host defense peptides: from biology to therapeutic applications. *Pharmaceuticals*, 7: 220-247.