

# 日本鳗鲡 *TBK-1* 基因的克隆及免疫刺激的表达模式

赵歌洁<sup>1</sup>, 黄 贝<sup>1, 2, 3</sup>, 黄文树<sup>1, 2, 3</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 利用PCR技术克隆了日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) *TBK-1* 基因 (*AjTBK-1*), 其开放阅读框为2193 bp, 编码731个氨基酸。序列结构分析结果显示, *AjTBK-1* 含有4个保守结构域, 分别为氨基端激酶结构域, 泛素样结构域和羧基端两个卷曲-螺旋结构域。系统发育分析表明, 鱼类与四足类的 *TBK-1* 各自聚为一枝。实时定量PCR (qPCR) 结果显示, *AjTBK-1* 在日本鳗鲡各组织中均有表达。Poly I: C 刺激6 h后, 日本鳗鲡脾脏组织中 *AjTBK-1* 的上调倍数最高, 为对照组的1.63倍; 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染24 h后, 日本鳗鲡肝脏组织中 *AjTBK-1* 的上调倍数最高, 为对照组的2.2倍; 表明 *AjTBK-1* 参与了日本鳗鲡抗病毒、抗细菌免疫反应应答。

[关键词] 日本鳗鲡; *TBK-1* 基因; 序列分析; 转录表达

[中图分类号] S 917.4

## Cloning and Expression Profile Analysis After Immune Stimulation of *TBK-1* Gene in Japanese Eel (*Anguilla japonica*)

ZHAO Gejie<sup>1</sup>, HUANG Bei<sup>1, 2, 3</sup>, HUANG Wenshu<sup>1, 2, 3</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. Engineering Research Center of Aquaculture Breeding and Healthy of Fujian, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The *TBK-1* gene from Japanese eel (*Anguilla japonica*) named *AjTBK-1* was cloned using polymerase chain reaction (PCR) technology, which has an open reading frame of 2193 bp encoding 731 amino acids. Sequence and structure analysis showed that *AjTBK-1* contains four conserved domains, including an *N*-terminal kinase domain, a ubiquitin-like domain, and two coiled-coil domains at the C-terminus. Phylogenetic analysis indicated that fish and tetrapod *TBK-1* formed separate branches. qPCR results showed that *AjTBK-1* is expressed in various tissues of Japanese eel. After stimulation with Poly I: C for 6 h, the maximal expression of *AjTBK-1* was detected in the spleen, which was 1.63-fold high than that of the control group. After infection with *Edwardsiella tarda* for 24 h, the maximal expression of *AjTBK-1* was detected in the liver, which was 2.2-fold high than that of the control group. Taken together, our results indicated that *AjTBK-1* is involved in the antibacterial and antiviral immune responses of Japanese eel.

**Keywords:** Japanese eel (*Anguilla japonica*); *TBK-1* gene; sequence analysis; transcriptional expression

[收稿日期] 2023-03-29

[基金项目] 福建省自然科学基金项目 (2021J02047, 2020J01666); 国家自然科学基金项目 (32073011)

[作者简介] 赵歌洁 (1997—), 女, 硕士生, 从事水产动物免疫方向研究。通信作者: 黄文树 (1973—), 男, 博士, 教授, 从事水产动物免疫与疾病防控方向研究。

## 0 引言

TANK 结合激酶 (TANK binding kinase, TBK-1), 又称为核因子  $\kappa$ B 激活激酶, 是非典型 I $\kappa$ B 激酶家族成员, 在机体天然免疫应答特别是抗病毒免疫应答中起着十分重要的作用<sup>[1-2]</sup>。宿主的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 如视黄酸诱导蛋白 I (retinoic acid inducible protein I, RIG-I)、黑色素瘤分化相关蛋白 5 (melanoma differentiation associated protein 5, MDA5), 识别入侵病毒后, 可招募线粒体接头蛋白 MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) 进而激活 TBK-1<sup>[3-4]</sup>。活化的 TBK-1 可磷酸化干扰素调节因子 3 (interferon regulatory transcription factor 3, IRF3) 与核因子  $\kappa$ B (nuclear factor, NF- $\kappa$ B), 启动 I 型干扰素 (interferon, IFN) 等抗病毒基因的转录表达<sup>[5]</sup>。TBK-1 参与了细胞增殖分化、自噬等生物过程信号转导<sup>[6-9]</sup>。例如, TBK-1 可促进自噬蛋白 p62/SQSTM1 (sequestosome 1) 磷酸化进而调控线粒体发生自噬, 并通过控制自噬小体的成熟促进自噬介导的抗菌防御<sup>[9-10]</sup>。此外, TBK-1 还参与调节树突状细胞中 T 细胞的动态平衡、自身免疫和抗肿瘤免疫等过程<sup>[11]</sup>。

目前, TBK-1 基因已在多种鱼类中被克隆鉴定, 包括斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[3]</sup>、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)<sup>[12]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[13]</sup>、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[14]</sup>、鲫 (*Carassius auratus*)<sup>[15]</sup>、黑尾近红鲌 (*Ancherythroculter nigrocauda*)<sup>[16]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[17]</sup> 等。鱼类 TBK-1 在结构上与哺乳类相似, 均含有氨基端的激酶结构域 (kinase domain, KD)、泛素样结构域 (ubiquitin like domain, ULD), 以及羧基端的两个卷曲-螺旋结构域 (c-terminal coiled-coil domains, CCD)。类似于哺乳动物, 鱼类 TBK-1 参与了机体的抗病毒免疫应答。在鲫囊胚细胞系 CAB 细胞中过表达鲫 TBK-1 可显著激活 IFN 启动子<sup>[15]</sup>; 过表达黑尾近红鲌 TBK-1 可显著上调鲤鱼上皮细胞系 EPC 细胞内源性 IFN、Vig1 基因的表达水平, 进而抑制鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 的增殖<sup>[16]</sup>; 使用 Poly I: C、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 感染大黄鱼后, TBK-1 在肝脏、脾脏、头肾中表达量显著上调<sup>[17]</sup>。

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 是我国重要的经济水产养殖品种, 近年来受到多种病毒和细菌感染的威胁, 影响了其生长和存活率<sup>[18-19]</sup>。有关日本鳗鲡 TBK-1 在宿主的免疫应答中的作用尚不清楚。本研究拟克隆日本鳗鲡的 TBK-1 基因 (*AjTBK-1*), 分析其基因结构特点及系统发育关系, 利用实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测了 *AjTBK-1* 在正常组织, 以及 Poly I: C 或迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染后的不同组织中的表达模式。研究结果可为进一步解析 TBK-1 在日本鳗鲡抗病毒、抗菌免疫应答中的作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

健康的日本鳗鲡购于福建省福清某养殖场 (体重约为 200 g)。实验前将日本鳗鲡置于本实验室 27 ℃ 循环水养殖水箱中暂养两周。

将日本鳗鲡随机分为 3 组, 每组 24 尾, 实验组每尾注射 200  $\mu$ L Poly I: C (溶于 PBS, 质量比为 10  $\mu$ g/g) 或 200  $\mu$ L 迟缓爱德华氏菌 (悬浮于 PBS,  $2 \times 10^5$  cfu/g), 对照组每尾注射相同体积的 PBS (200  $\mu$ L)。分别于注射后 6、12、24 和 48 h 采集样品, 每组、每个时间点取样 6 尾。取样前使用 0.05% 丁香酚麻醉, 并采集肝脏、心脏、肾脏、脾脏、脑、皮肤、肠道、鳃、肌肉、性腺组织, 置于 TRIzol 试剂中, 放入 -80 ℃ 冰箱备用。

实验过程中操作人员严格遵守动物实验伦理规范, 并按照集美大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 实验试剂

TRIzol 试剂 (MagZol Reagent)、质粒提取试剂盒 (HiPure Plasmid/BAC EF Mini Kit) 购自广州美

基生物科技有限公司 (Magen); 反转录试剂 (HiScript III RT SuperMix for qPCR)、荧光定量预混液 (Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix)、胶回收试剂盒 (FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司 (Vazyme); *Ex Taq* 酶 (TaKaRa *Ex Taq*<sup>®</sup>)、pMD 19-T 载体 (pMD 19-T Vector Cloning Kit)、高保真酶 (PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase)、T4 连接酶 (T4 DNA Ligase) 购自 Takara 公司。

引物合成和菌液测序均由厦门铂瑞生物科技有限公司进行。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

总 RNA 的提取参照 TRIzol 试剂说明书进行, 使用 NanoDrop 2000 (Thermo) 检测 RNA 的浓度与纯度, 并采用琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性。根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链, 置于 -20 ℃ 备用。

1.3.2 引物设计与基因克隆

以斑马鱼 *TBK-1* 作为种子序列, 在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上对日本鳎基因组数据 (GCA\_916313395.1) 进行比对。根据比对结果选择保守区域设计特异性引物 (见表 1), 再以日本鳎鳃组织 cDNA 为模板扩增 *AjTBK-1*。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 参照胶回收试剂盒说明书进行回收, 并连接至 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经 PCR 鉴定阳性克隆后送至厦门铂瑞生物科技有限公司测序。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in the present study

引物名称	序列(5'-3')	用途
AjTBK-1-qF	AGGACGTAGTTGCTGGCATGA	qPCR
AjTBK-1-qR	TGTCTGGGTGCAGGTACTCCTC	
AjEF-1- $\alpha$ -q-F	GCCAGCAGCAATATGTCCTG	
AjEF-1- $\alpha$ -q-R	GGTACAGTTCCAATACCTCCA	
AjTBK-1-F	ATGCAGAGCACAGCAAACTAC	基因克隆
AjTBK-1-R	TTGTAAATTATTAATACGGTCAGTATT	

1.3.3 qPCR 检测

根据 *AjTBK-1* 序列设计跨内含子的定量引物 (见表 1)。在避光条件下, 于冰上配制如下反应体系: 2  $\times$  iQ SYBR Green Super Mix 10  $\mu$ L, 上下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 无菌水 8.2  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L。每个模板均设置 3 个平行。于 Roche Light-Cycler 480 仪器中运行, 运行程序为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 5 min, 60 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环; 绘制溶解曲线。

以 *AjEF-1- $\alpha$*  基因作为内参基因, 用 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  法计算目的基因的相对表达水平<sup>[20]</sup>。使用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行单因素方差分析, 进行 Duncan 多重比较检验, *P* < 0.05 ( \* ) 表示差异显著, *P* < 0.01 ( \*\* ) 表示差异极显著。使用 GraphPad Prism 7 和 Adobe IllustratorCC 2019 绘图。

1.3.4 序列分析

用 Pfam(<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白理论分子量、等电点 (isoelectric point, PI)。用 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 进行氨基酸多重序列比对及序列同源性分析。从 Ensembl 或 NCBI 数据库中搜寻具有代表性物种的 *TBK-1* 氨基酸序列 (见表 2), 用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建进化树, 设置自展值 (bootstrap) 为 1000。

表 2 TBK-1 多重序列比对及系统发育分析的序列登录号

Tab. 2 Accession numbers of TBK-1 sequences used in multiple sequence alignments and phylogenetic analysis

物种	登录号	物种	登录号
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_037386.1	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001038213.2
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_062760.3	斑点雀鳝 <i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_006633695.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	XP_046794052.1	大西洋鲑 <i>Atlantic salmon</i>	ENSSSAT00000109647
绿色安乐蜥 <i>Anolis carolinensis</i>	XP_008109286.1	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003458486.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001135652.1	虹鳟 <i>Rainbow trout</i>	ENSOMYT00000138601.1
林蛙 <i>Rana temporaria</i>	XP_040200003.1	欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	XP_035282695.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ENSLCRT00005035827.1.1	日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	UYB76978.1
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007256086.2		

2 实验结果与分析

2.1 *AjTBK-1* 的基因结构

日本鳗鲡 *TBK-1* 的开放阅读框全长为 2193 bp，编码 731 个氨基酸（aa），理论蛋白分子量为 83.9 kD，等电点为 6.27。对结构域的预测表明，*AjTBK-1* 含有 4 个保守的结构域，包括 KD 结构域、ULD 结构域及两个 CCD 结构域（见图 1）。



KD 为激酶结构域；ULD 为泛素样结构域；CCD 为卷曲-螺旋结构域；数字表示每个结构域起止氨基酸位点

图 1 日本鳗鲡 *TBK-1* 蛋白示意图

Fig.1 Schematic diagram of *AjTBK-1* protein

2.2 *AjTBK-1* 氨基酸序列比对分析

氨基酸序列同一性分析结果显示，脊椎动物 *TBK-1* 序列高度保守。日本鳗鲡 *TBK-1*（*AjTBK-1*）与尼罗罗非鱼（*OnTBK-1*）序列同一性最高，为 87.5%，其后依次为虹鳟（*RtTBK-1*，84.6%）、斑马鱼（*DrTBK-1*，84.3%）、大西洋鲑（*AsTBK-1*，82.2%）、人（*HsTBK-1*，72.2%）、鸡（*GgTBK-1*，71.9%）、鼠（*MmTBK-1*，71.8%）、绿色安乐蜥（*AcTBK-1*，71.1%）、非洲爪蟾（*XtTBK-1*，66%）（见图 2）。

翻译后修饰可改变靶蛋白的活性、亚细胞定位、构象及相互作用。已有研究表明，人源 *TBK-1* 的激酶活性与多个关键氨基酸上发生的翻译后修饰有关，分别为 Lys30、Ser172、Tyr179、Lys251、Tyr354、Lys372、Tyr394、Lys401、Ser510、Ser527、Lys670、Lys694 和 Ser716<sup>[2]</sup>。序列多重比对结果显示，Lys30、Ser172、Tyr179、Lys251、Tyr354、Lys401、Ser510、Lys694、Ser716 在日本鳗鲡 *TBK-1* 中保守，而 Lys372 被组氨酸替代，Tyr394 被苯丙氨酸替代，Ser527 被亮氨酸替代，Lys670 则没有对应的氨基酸。此外，在不同脊椎动物 *TBK-1* 的 KD 结构域中有保守的 ATP 结合位点（LGQGATANV）（见图 3）。

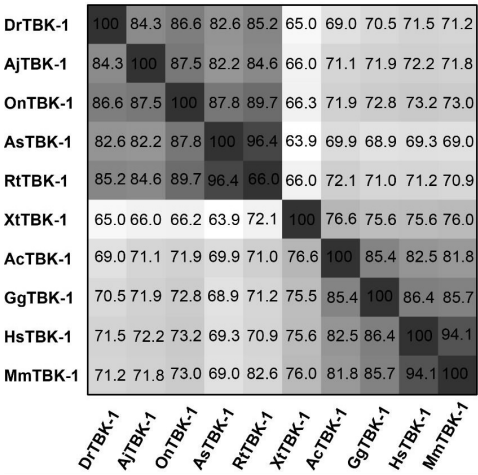


图 2 脊椎动物 *TBK-1* 蛋白序列同一性矩阵

Fig. 2 The percentage identity matrix of vertebrate *TBK-1* proteins





2.3 *AjTBK-1* 系统发育分析

从 Ensembl、NCBI 数据库中搜寻哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类及硬骨鱼类代表性物种的 *TBK-1* 蛋白序列，利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。结果表明，日本鳗鲡与欧洲鳗鲡的 *TBK-1* 聚为一枝，并且与其他鱼类的 *TBK-1* 共聚为一个大的枝，而四足类的 *TBK-1* 单独聚为一枝（见图 4）。

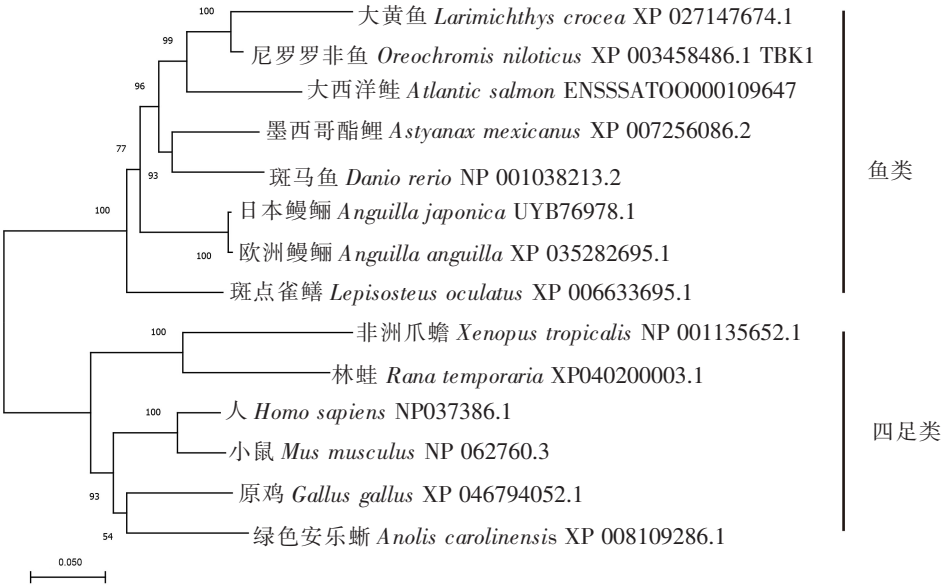


图 4 脊椎动物 *TBK-1* 系统发育树分析  
Fig. 4 Phylogenetic analysis of *TBK-1* from various vertebrate species

2.4 *AjTBK-1* 表达模式分析

qPCR 结果显示，*AjTBK-1* 在所有检测的组织/器官中均有表达，在鳃中的表达水平最高，其次是脑、脾脏、肠道、皮肤、头肾、肠道、心脏，而在性腺和肌肉中表达量相对较低（见图 5）。

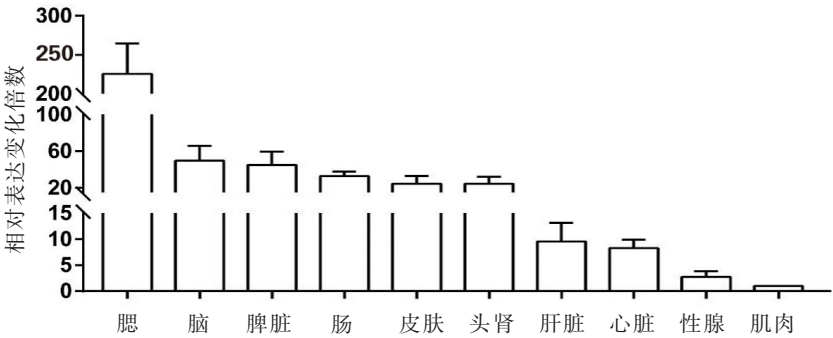


图 5 *AjTBK-1* 在日本鳗鲡不同组织/器官中的分布  
Fig.5 Distribution of *AjTBK-1* in tissues/organs of *A. japonica*

Poly I: C 刺激可显著上调 *AjTBK-1* 在脾脏及头肾中的表达。刺激 6 h 后，头肾组织中 *AjTBK-1* 的表达量显著上调，为对照组的 1.51 倍；刺激 6 h 和 12 h 后，脾脏组织中 *AjTBK-1* 的表达量显著上调，分别为对照组的 1.63 倍与 1.24 倍。迟缓爱德华氏菌感染 6 h 和 12 h 后，头肾组织中 *AjTBK-1* 的表达量分别为对照组的 1.70 倍与 1.65 倍；感染 24 h 和 48 h 后，肝脏组织中 *AjTBK-1* 的表达量分别为对照组的 2.20 倍和 1.54 倍（见图 6）。

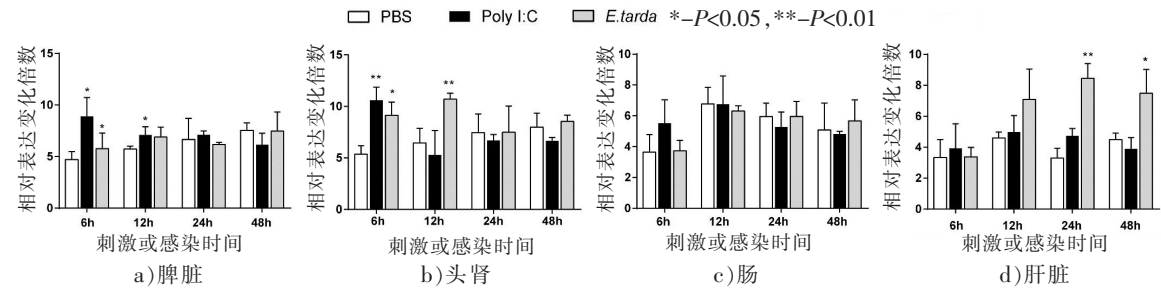


图 6 Poly I:C 刺激或迟缓爱德华氏菌感染后 *AjTBK-1* 在不同组织中的表达变化  
Fig.6 Expression analysis of *AjTBK-1* in different tissue in response to Poly I:C or *E. tarda* challenge

3 讨论

本研究克隆了日本鳗鲡 *TBK-1* 基因, 并分析了其序列结构特征, 以及 Poly I: C 刺激或 *E. tarda* 感染后在日本鳗鲡脾脏、头肾、肠和肝脏组织中的表达变化。序列分析结果显示, *AjTBK-1* 包含 KD 结构域、ULD 结构域及两个 CCD 结构域。研究哺乳动物发现, KD 结构域为 *TBK-1* 催化活性中心, 可激活下游靶基因; ULD 结构域发挥调控功能; CCD 结构域负责与 TANK (TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator)、NAP1 (NF- $\kappa$ B activating kinase-associated protein 1)、STINTBAD (similar to NAP1 *TBK-1* adaptor) 及其他接头蛋白结合<sup>[21-22]</sup>。*AjTBK-1* 具有与哺乳动物类似的结构域构成, 推测其功能和作用方式与哺乳类 *TBK-1* 类似。本研究经序列比对发现脊椎动物 *TBK-1* 的 Lys30、Ser172、Tyr179、Lys251、Tyr354、Lys401、Ser510 和 Lys694 位点最为保守; Tyr394、Ser527 和 Lys670 在四足类中保守, 在鱼类中则被其他氨基酸替换或缺失; Lys372 只存在于哺乳类及部分鱼类 (斑马鱼、罗非鱼) 中, 在其他脊椎动物中被异亮氨酸、精氨酸或组氨酸替换; Ser176 也只在哺乳类及部分鱼类 (斑马鱼、日本鳗鲡及虹鳟) 中保守, 在其他脊椎动物中被丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸替换。哺乳动物中的研究表明, *TBK-1* 的翻译后修饰对其激酶活性至关重要, Ser172、Ser716 与 Tyr179 位点的磷酸化可以促进 *TBK-1* 活化并增强其活性<sup>[24-25]</sup>; 而 Ser510、Ser527、Tyr354、Tyr394 位点的磷酸化则会阻止 *TBK-1* 二聚化与激活或促进其降解, 抑制其介导的信号转导<sup>[26-28]</sup>。此外, Lys30、Lys401 位点的非降解性泛素化修饰 (即以 Lys63 连接) 可促进 *TBK-1* 激活并增强蛋白稳定性<sup>[3]</sup>; Lys251、Lys372 与 Lys670 位点的降解性泛素化修饰 (即以 Lys48 连接), 可导致 *TBK-1* 降解<sup>[27-30]</sup>; Lys694 位点的 SUMO 化修饰则会增强 *TBK-1* 抗病毒效应<sup>[31]</sup>。*AjTBK-1* 含有与磷酸化修饰相关的残基、与泛素化相关的残基, 以及与 SUMO 化相关的残基, 推测其具有与哺乳动物类似的翻译后修饰类型和调控机制。

基因表达结果显示, 病毒双链 RNA 模拟物 Poly I: C 刺激和迟缓爱德华氏菌感染, 可显著上调日本鳗鲡头肾和脾脏组织 *AjTBK-1* 基因的表达水平。其他鱼类研究发现, 病毒或细菌感染可导致 *TBK-1* 基因的表达水平上调, 如在使用 SVCV 和呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 感染青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 后, *TBK-1* 在头肾和脾脏中表达量显著增加<sup>[33]</sup>; 使用溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 感染金鲳 (*Trachinotus ovatus*) 后, *TBK-1* 在头肾与脾脏中的表达量分别在感染后 48 h 与 24 h 达到峰值<sup>[34]</sup>; 使用 Poly I: C、GCRV、LPS 或肽聚糖 (peptidoglycan, PGN) 刺激草鱼肾脏细胞系 CIK 细胞后, *TBK-1* 的表达量显著上调<sup>[15]</sup>。并且, 在 CIK 细胞中过表达 *TBK-1* 可显著抑制 GCRV 的增殖<sup>[15]</sup>; EPC 细胞中过表达斑马鱼 *TBK-1* 可显著降低 SVCV 导致的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)<sup>[3]</sup>; 在斜带石斑鱼脾脏细胞系 GS 细胞中过表达斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) *TBK-1* 也可显著削弱虹彩病毒 (singapore grouper iridovirus, SGCV) 和赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 神经坏死病毒 (red-spotted grouper NNV, RGNNV) 感染导致的 CPE, 抑制病毒基因的表达<sup>[32]</sup>。因此, 推测 *AjTBK-1* 可能参与了宿主对抗 RNA 病毒及细菌感染的免疫应答。然而, *AjTBK-1* 在日本鳗鲡免疫应答中的具体作用机制尚不清楚, 有待进一步研究。



总之,本研究成功克隆了日本鳎的 *TBK-1* 基因,利用多重序列比对和系统发育树分析其基因结构特征及保守进化关系,通过 qPCR 分析 *AjTBK-1* 在正常组织及感染组织中的表达模式。本研究结果为揭示 *TBK-1* 在日本鳎抗病毒、抗细菌免疫应答中的功能和作用机制奠定了基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] POMERANTZ J L, BALTIMORE D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase[J]. *EMBO Journal*, 1999, 18(23):6694-6704. DOI:10.1093/emboj/18.23.6694.
- [2] ZHOU R Y, ZHANG Q, XU P L. TBK1, a central kinase in innate immune sensing of nucleic acids and beyond[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(7):757-767. DOI:10.1093/abbs/gmaa051.
- [3] ZHANG L, CHEN W Q, HU Y W, et al. TBK1-like transcript negatively regulates the production of IFN and IFN-stimulated genes through RLRs-MAVS-TBK1 pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54:135-143. DOI:10.1016/j.fsi.2016.04.002.
- [4] RATHINAM V A, FITZGERALD K A. Cytosolic surveillance and antiviral immunity[J]. *Current Opinion in Virology*, 2011, 1(6):455-462. DOI:10.1016/j.coviro.2011.11.004.
- [5] WANG Z N, JI J Y, PENG D, et al. Complex regulation pattern of IRF3 activation revealed by a novel dimerization reporter system[J]. *Journal of Immunology*, 2016, 196(10):4322-4330. DOI:10.4049/jimmunol.1502458.
- [6] OU Y H, TORRES M, RAM R, et al. TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation[J]. *Molecular Cell*, 2011, 41(4):458-470. DOI:10.1016/j.molcel.2011.01.019.
- [7] YANG K M, JUNG Y, LEE J M, et al. Loss of TBK1 induces epithelial-mesenchymal transition in the breast cancer cells by ER $\alpha$  downregulation[J]. *Cancer Research*, 2013, 73(22):6679-6689. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-0891.
- [8] THURSTON T L, BOYLE K B, ALLEN M, et al. Recruitment of TBK1 to cytosol-invading Salmonella induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy[J]. *EMBO Journal*, 2016, 35(16):1779-1792. DOI:10.15252/embj.201694491.
- [9] PILLI M, ARKO-MENSAH J, PONPUAK M, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation[J]. *Immunity*, 2012, 37(2):223-234. DOI:10.1016/j.immuni.2012.04.015.
- [10] MATSUMOTO G, SHIMOGORI T, HATTORI N, et al. TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation[J]. *Human Molecular Genetics*, 2015, 24(15):4429-4442. DOI:10.1093/hmg/ddv179.
- [11] XIAO Y C, ZOU Q, XIE X P, et al. The kinase TBK1 functions in dendritic cells to regulate T cell homeostasis, autoimmunity, and antitumor immunity[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2017, 214(5):1493-1507. DOI:10.1084/jem.20161524.
- [12] CHI H, ZHANG Z B, BØGWALD J, et al. Cloning, expression analysis and promoter structure of TBK1 (TANK-binding kinase 1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4/5):1055-1063. DOI:10.1016/j.fsi.2011.02.002.
- [13] FENG H, LIU H, KONG R Q, et al. Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4/5):1159-1169. DOI:10.1016/j.fsi.2011.03.002.
- [14] FENG X, SU J G, YANG C R, et al. Molecular characterizations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TBK1 gene and its roles in regulating IFN-I pathway[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 45(2):278-290. DOI:10.1016/j.dci.2014.03.018.
- [15] SUN F, ZHANG Y B, LIU T K, et al. Fish MITA serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 187(5):2531-2539. DOI:10.4049/jimmunol.1100642.
- [16] CHEN J, ZHOU X Y, LI P, et al. Molecular characterization of a cyprinid fish (*Ancherythroculter nigrocauda*) TBK1 and its kinase activity in IFN regulation[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 114:103805. DOI:10.1016/j.dci.2020.103805.
- [17] ZHANG D L, YU D H, CHEN J, et al. Expression profiles and interaction suggest TBK1 can be regulated by Nrdp1 in response to immune stimulation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2):



745-752. DOI:10.1016/j.fsi.2015.08.013.

- [18] KIM H J, YU J H, KIM D W, et al. Molecular evidence of anguillid herpesvirus-1 (AngHV-1) in the farmed Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, in Korea[J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(4):315-319. DOI:10.1111/j.1365-2761.2012.01344.x.
- [19] 陈强, 李英英, 杨金先, 等. 鳗鲡疱疹病毒对欧洲鳗鲡的致病性[J]. 水产学报, 2021, 45(6):940-947. DOI:10.11964/jfc.20200812370.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.
- [21] IKEDA F, HECKER C M, ROZENKNOP A, et al. Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-i kinases in regulation of IFN-inducible genes[J]. EMBO Journal, 2007, 26(14):3451-3462. DOI:10.1038/sj.emboj.7601773.
- [22] RYZHAKOV G, RANDOW F, SINTBAD. A novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAPI and TANK[J]. EMBO Journal, 2007, 26(13):3180-3190. DOI:10.1038/sj.emboj.7601743.
- [23] MA X L, HELGASON E, PHUNG Q T, et al. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(24):9378-9383. DOI:10.1073/pnas.1121552109.
- [24] ZHU L, LI Y C, XIE X P, et al. TBKBP1 and TBK1 form a growth factor signalling axis mediating immunosuppression and tumorigenesis[J]. Nature Cell Biology, 2019, 21(12):1604-1614. DOI:10.1038/s41556-019-0429-8.
- [25] LI X, YANG M, YU Z, et al. The tyrosine kinase Src promotes phosphorylation of the kinase TBK1 to facilitate type I interferon production after viral infection[J]. Science Signaling, 2017, 10(460):eaae0435. DOI:10.1126/scisignal.aae0435.
- [26] WU S, ZHANG Q, ZHANG F, et al. HER2 recruits AKT1 to disrupt STING signalling and suppress antiviral defence and antitumour immunity[J]. Nature Cell Biology, 2019, 21(8):1027-1040. DOI:10.1038/s41556-019-0352-z.
- [27] AN T, LI S, PAN W, et al. DYRK2 negatively regulates type I interferon induction by promoting TBK1 degradation via Ser527 phosphorylation[J]. PLOS Pathogens, 2015, 11(9):e1005179. DOI:10.1371/journal.ppat.1005179.
- [28] LIU S D, CHEN S D, LI X R, et al. Lck/Hck/Fgr-mediated tyrosine phosphorylation negatively regulates TBK1 to restrain innate antiviral responses[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 21(6):754-768. e5. DOI:10.1016/j.chom.2017.05.010.
- [29] ZHENG Q L, HOU J, ZHOU Y, et al. Siglec1 suppresses antiviral innate immune response by inducing TBK1 degradation via the ubiquitin ligase TRIM27[J]. Cell Research, 2015, 25(10):1121-1136. DOI:10.1038/cr.2015.108.
- [30] LIN M, ZHAO Z Y, YANG Z F, et al. USP38 inhibits type I interferon signaling by editing TBK1 ubiquitination through NLRP4 signalosome[J]. Molecular Cell, 2016, 64(2):267-281. DOI:10.1016/j.molcel.2016.08.029.
- [31] SAUL V V, NIEDENTHAL R, PICH A, et al. SUMO modification of TBK1 at the adaptor-binding C-terminal coiled-coil domain contributes to its antiviral activity[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1853(1):136-143. DOI:10.1016/j.bbamer.2014.10.008.
- [32] HU Y, HUANG Y H, LIU J X, et al. TBK1 from orange-spotted grouper exerts antiviral activity against fish viruses and regulates interferon response[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73:92-99. DOI:10.1016/j.fsi.2017.12.010.
- [33] YAN C Z, XIAO J, LI J, et al. TBK1 of black carp plays an important role in host innate immune response against SVCV and GCRV[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 69:108-118. DOI:10.1016/j.fsi.2017.08.016.
- [34] HE J Q, HU S, XIE Y S, et al. Molecular characterization and expression analysis of TRIF, TRAF6, and TBK1 of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 127:604-610. DOI:10.1016/j.fsi.2022.07.001.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)