

3 研究内容 (別紙)

研究課題名

抗生物質によるマダイ幼魚の腸内細菌叢と臓器プロテオームへの影響評価
(Effects of antibiotics on gut microbiota and proteome of organs in young red seabreams (*Pagrus major*))

共同研究者名

代表者：飯田 緑 (九州工業大学大学院)

分担者：前田 和勲 (九州工業大学 若手研究者フロンティア研究アカデミー)

研究目的

健常成人の腸内細菌叢は安定性が高い。抗菌性薬使用による腸内細菌叢攪乱は、全身の免疫系を過剰に活性化して自己免疫疾患などの炎症を悪化させる。魚養殖場では飼料に抗生物質が添加されているが、抗生物質の魚類腸内細菌叢や免疫系への影響は明らかにされていない。そこで本研究計画では、マダイ幼魚にオキシテトラサイクリンを経口投与し、定量プロテオミクスと腸内細菌叢解析を用いて抗生物質投与時の腸内細菌叢の変動が免疫に関連する臓器に与える影響およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究内容

本年度は、オキシテトラサイクリン (以下 OTC) を投与したマダイ幼魚を対象に、肝臓タンパク質発現量の変化を調べた。具体的には以下の3点を実施した。

まず、OTC 投与群と非投与群それぞれにおけるマダイ臓器内タンパク質の網羅的な発現量を明らかにするために、iTRAQ®試薬を用いてペプチドのN末端およびリジン残基に安定同位体標識し、nano-LC と MALDI-TOF/TOF を用いてプロテオーム解析を行った。次に、対照群と比べて OTC 投与によって発現量が増加したタンパク質を同定した。さらに、発現量が増加したタンパク質の機能的な特徴をとらえるために Gene ontology (GO) 解析とパスウェイエンリッチメント解析をおこなった。

研究成果

iTRAQ を用いた質量分析の結果、229 のタンパク質を同定することに成功した。

まず、どのようなタンパク質が発現変動を示したのかを調べるため、同定した 229 のタンパク質を対象に、傾向検定

(Jonckheere-Terpstra test) を行った。この結果、オキシテトラサイクリンの投与によってマダイ肝臓では、U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2a (u2af2a) などの 12 種類のタンパク質がオキシテトラサイクリンの投与濃度依存的に発現変動を示すことが明らかとなった (Table 1 および Fig. 1)。

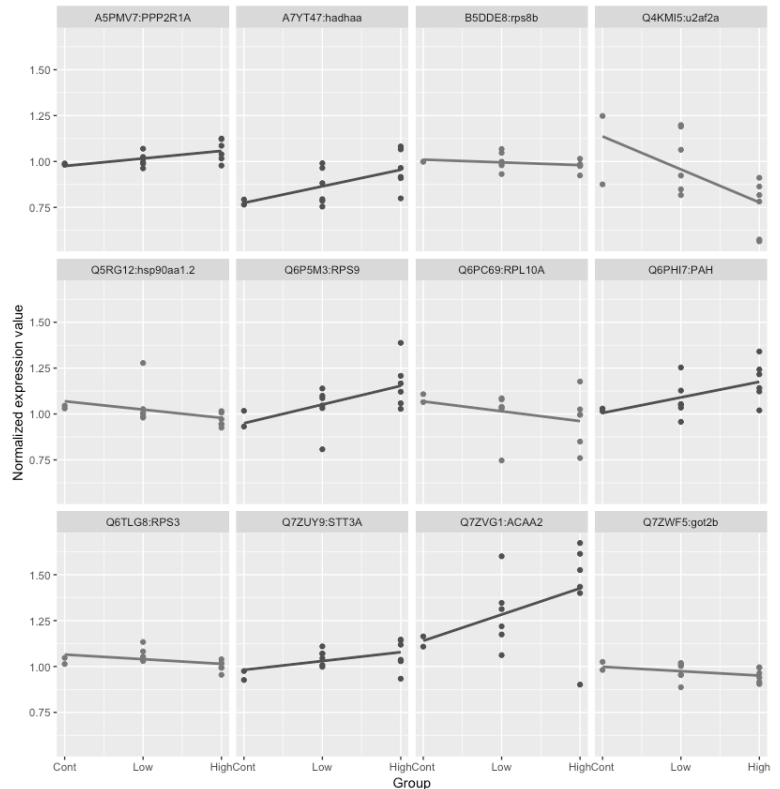


Fig.1 傾向検定で有意に発現変動したタンパク質の発現量。回帰直線が上向きの場合は濃度依存的に発現量が増加したタンパク質、下向きの場合は濃度依存的に発現量が減少したタンパク質を示す。

Table 1 傾向検定で有意に発現変動したタンパク質

Uniport ID	Symbol	Gene Name	log2FC (Low/Cont)	log2FC (High/Cont)	p-value (Increase)	p-value (Decrease)
A5PMV7	ppp2r1a	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	0.03	0.11	0.02	0.99
A7YT47	hadhaa	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit a	0.15	0.30	0.02	0.98
B5DDE8	rps8b	ribosomal protein S8b	0.01	-0.03	0.96	0.04
Q4KMI5	u2af2a	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2a	-0.08	-0.50	0.99	0.01
Q5RG12	hsp90aa1.2	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 2	0.01	-0.10	0.99	0.01
Q6P5M3	rps9	ribosomal protein S9	0.09	0.25	0.02	0.98
Q6PC69	rpl10a	ribosomal protein L10a	-0.12	-0.17	0.97	0.03
Q6PHI7	pah	phenylalanine hydroxylase	0.08	0.21	0.02	0.99
Q6TLG8	rps3	ribosomal protein S3(rps3)	0.05	-0.04	0.99	0.02
Q7ZUY9	stt3a	STT3A, subunit of the oligosaccharyltransferase complex (catalytic)	0.14	0.17	0.04	0.96
Q7ZVG1	aca2	acetyl-CoA acyltransferase 2	0.18	0.33	0.02	0.98
Q7ZWF5	got2b	glutamic-oxaloacetic transaminase 2b, mitochondrial	-0.05	-0.08	0.95	0.05

次に、これらの発現変動タンパク質が生体内でどのような機能を持つのかを Gene ontology (GO) 解析および、パスウェイエンリッチメント解析によって調べた。GO 解析の結果、タンパク質翻訳に関わる遺伝子が発現変動することが明らかとなった (Table 2)。また、KEGG パスウェイエンリッチメント解析を行った結果、(タンパク質翻訳機構) やリボソームに関わる遺伝子 (rps8b, rps3, rps9, rpl10a) が多く発現変動していることが明らかとなった (Table 2 および Fig. 2)。

Table 2 エンリッチメント解析の結果

Term	Count	Genes	p-value	q-value
Biological Process (BP)				
GO:0006412~translation	4	rps8b, rpl10a, rps3, rps9	0.001	0.038
Cell Component (CC)				
GO:0005840~ribosome	4	rps8b, rpl10a, rps3, rps9	<0.001	0.003
GO:0030529~intracellular ribonucleoprotein complex	4	rps8b, rpl10a, rps3, rps9	<0.001	0.003
GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	3	rps8b, rps3, rps9	<0.001	0.002
Molecular function (MF)				
GO:0003735~structural constituent of ribosome	4	rps8b, rpl10a, rps3, rps9	<0.001	0.01
KEGG Pathway				
dre03010:Ribosome	4	rps8b, rpl10a, rps3, rps9	0.002	0.07

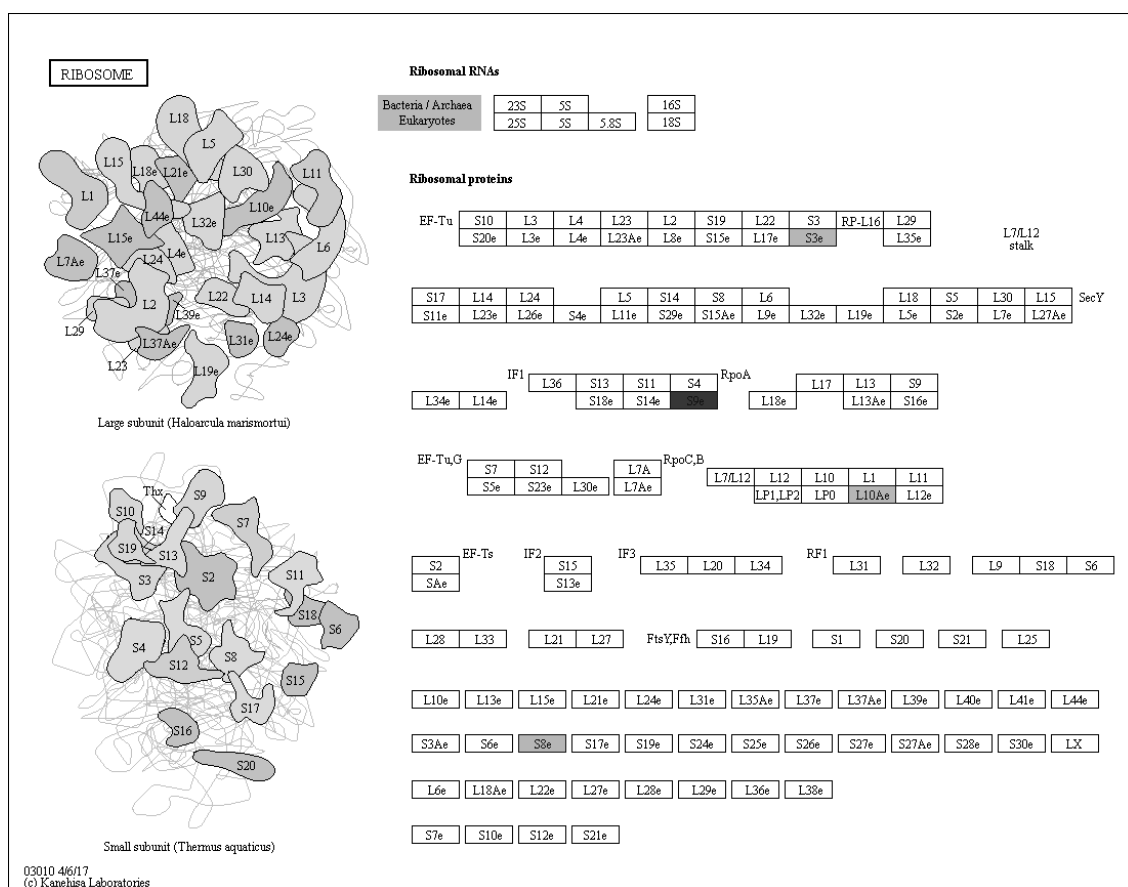


Fig.2 KEGG パスウェイエンリッチメント解析によって優位に変動していたリボソームパスウェイに関わる遺伝子。左上は Large subunit、右上は Small subunit を示している。色付きの四角は傾向検定で有意に発現変動していたタンパク質を示す (濃い灰色は濃度依存的に発現量が増加したタンパク質、薄い灰色は濃度依存的に発現量が減少したタンパク質)。

テトラサイクリンは原核生物のアミノアシル-tRNA の結合を阻害することによりタンパク質の翻訳を阻害し、抗生物質として働くことが知られている。本研究によって、真核生物であるマダイ幼魚の肝臓においても、オキシテトラサイクリンがリボソーム関連タンパク質の発現量を変化させることにより、翻訳機能に影響することが示唆された。

成果発表

これらの成果については、今後、環境毒性学会および環境ホルモン学会等で発表を予定している。

今後の問題点

本研究では、タンパク質の網羅的解析を行うことを目的としていたが、同定されたタンパク質は200あまりと少なかった。そこで、次期ではゼブラフィッシュ以外の硬骨魚類のリファレンスを用いて同定可能なタンパク質の増加を試みる。また、今年度実施できなかった腸内細菌叢の解析については、沿岸環境科学研究センター 生態系解析部門 鈴木聡教授の研究室で実施され成果発表される予定である。