

3 研究内容 (別紙)

研究課題名

抗生物質曝露後のマダイ (*Pagrus major*) における肝臓のハイスループットプロテオミクス
プロファイリングと影響評価

(High-throughput proteomic profiling and hazard assessment in the liver of red seabreams (*Pagrus major*) following antibiotics exposure)

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)

研究目的

肝臓は、薬物代謝や免疫に関わる重要な組織である。マウスでは抗生物質の投与により肝臓の薬物代謝系が攪乱されることが報告されている。魚養殖場では飼料に抗生物質が添加されているが、魚類において抗生物質による肝機能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を用いて抗生物質投与時の肝臓プロテームを明らかにし、肝機能に与える影響評価とその発現機序を予測することを目的とした。

研究内容

本研究では、①オキシテトラサイクリン (以下 OTC) を投与したマダイ幼魚 (図 1) を対象に、②肝臓タンパク質発現量を定量・同定し、③発現変化をしたタンパク質を特定する、④さらに、それらの機能を調べ、⑤引き起こされる影響を考察した。

1. OTC 投与条件

本研究では、3つの投与期間で OTC 投与を行なっている (図 1)。投与期間 A では育成馴化期間 (86日間) の後、7日間の投与期間を設け、その後、検体を解剖した。投与期間 B では、投与期間 A の後 30日間の投与休止期間を設け、その後 7日間の投与を行なった。さらに、投与期間 C では、投与期間 B の後、30日間の投与休止期間を設け、検体を解剖した。濃度試験区は3つの投与期間でそれぞれ対照区、低 OTC 区 (50mg/魚体 kg/日)、高 OTC 区 (500mg/魚体 kg/日) を設けた。



図1 OTC 投与期間

2. 肝臓タンパク質発現量の定量と同定

これまで我々は、OTC を投与したマダイ幼魚の肝臓から抽出したタンパク質を iTRAQ でラベルし MALDI TOF/TOF でタンパク質量の定量を行ってきた。さらに、この MS/MS のスペクトルデータから MASCOT データベース検索により、ペプチドの同定を行い、300 種類のタンパク質を同定することに成功している。しかし、シーケンスを得られた 1200 種のペプチドのうち、同定されたタンパク質が 200 種類あまりであったため、他のスズキ目の魚種（ヨーロッパヘダイ、ティラピア、スズキ）のペプチド配列を NCBI のデータベースから取得し、これらとの相同性検索から同定できるタンパク質の種類を増加させることを試みた。この結果、投与期間 A では 375 種、投与期間 B では 405 種、合計で 510 種類のタンパク質を同定することに成功した。さらに、本研究では以下の解析を行うために、上記で同定されたタンパク質のアミノ酸配列から BLAST 検索を用いてゼブラフィッシュのオーソログを同定した。

3. 発現変化したタンパク質の特定

次に、上記で同定されたタンパク質を対象として、対照群と比べて OTC の投与量依存的に発現量が変化したタンパク質をヨルクヒール・タプストラ検定により特定した ($p < 0.05$)。この結果、投与期間 A では投与量依存的に増加したタンパク質 14 種、投与量依存的に減少したタンパク質 17 種の合計 30 種、投与期間 B では投与量依存的に増加したタンパク質 21 種、投与量依存的に減少したタンパク質 26 種の合計 47 種のタンパク質が特定された (図 2)。投与期間 A と B で共通して特定されたタンパク質は Annexin (anxa5b)、Ribosomal protein S6 (rps6)、ribosomal protein L5a (rpl5a) と si:ch73-71d17.1 の 4 つだった。si:ch73-71d17.1 はヒトの amidohydrolase domain containing 1 (AMDHD1) のオーソログであり、ヒスチジン代謝に関わる加水分解酵素の一つである。投与期間 A で最も発現上昇したタンパク質は Aldolase, Fructose-Bisphosphate B (aldob; 高 OTC 区での $\log_2FC = 0.26$)、

発現減少したタンパク質は NADP-dependent malic enzyme (me1; 高 OTC 区での log2FC = -0.1) であった。投与期間 B で最も発現上昇したタンパク質は DNA polymerase epsilon catalytic subunit (pole; 高 OTC 区での log2FC = 0.50)、発現減少したタンパク質は 60S ribosomal protein L27a (rpl27a; 高 OTC 区での log2FC = -0.87) であった。

A) 投与期間 A



B) 投与期間 B



図2 対照群と比べて OTC の投与量依存的に発現量が変化したタンパク質。A) 投与期間 A で発現変動したタンパク質群 (左: 発現上昇した群、右: 発現減少した群)。B) 投与期間 B で発現変動したタンパク質群 (左: 発現上昇した群、右: 発現減少した群)。

4. 発現変化タンパク質の機能解析

さらに、発現量が変化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 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析をおこなった (Table 1)。この結果、投与期間 A・B 共に翻訳 (GO:0006412) やリボソーム (dre03010) に関わるタンパク質の発現量が変化していることが明らかとなった。さらに、炭素代謝 (dre01200:Carbon metabolism) に関わるタンパク質が期間 A で、リンゴ酸やカルボン酸代謝に関わるタンパク質が投与期間 B で変化していた。これらのことから、OTC 投与は真鯛幼魚の肝臓でタンパク質翻訳や代謝に影響を与えることが示唆された。

Table 1 発現変化タンパク質の機能解析

Term	PValue	Genes
投与期間A		
Biological process		
GO:0006412~translation	<0.01	RPL17, RPL31, RPL6, RPL5A, RPS6
GO:0000027~ribosomal large subunit assembly	0.03	RPL6, RPL5A
GO:0008152~metabolic process	0.03	ACLYA, FASN, SLC27A6, AACs
GO:0002181~cytoplasmic translation	0.04	RPL31, RPL6
Cellular component		
GO:0005840~ribosome	<0.01	RPL17, RPL31, RPL6, RPL5A, RPS6
GO:0030529~intracellular ribonucleoprotein complex	<0.01	RPL17, RPL6, RPL5A, RPS6
GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	<0.01	RPL31, RPL6, RPL5A
GO:0005737~cytoplasm	0.04	DPP3, ACLYA, CPTP, ANXA5B, ALDOB, PPA1B, AACs
GO:0005622~intracellular	0.04	RPL17, RPL31, RPL6, RPL5A, RPS6
Molecular function		
GO:0003735~structural constituent of ribosome	<0.01	RPL17, RPL31, RPL6, RPL5A, RPS6
GO:0003824~catalytic activity	<0.01	ACLYA, PKLR, ALDOB, FASN, SLC27A6, AACs
GO:0005544~calcium-dependent phospholipid binding	<0.01	ANXA6, ANXA5B, ANXA11B
GO:0016491~oxidoreductase activity	0.01	ME1, CYP4V8, PGD, FASN, DHRS9
KEGG pathway		
dre01200:Carbon metabolism	<0.01	ME1, PGD, PKLR, ALDOB, OGDHL
dre03010:Ribosome	<0.01	RPL17, RPL31, RPL6, RPL5A, RPS6
dre01130:Biosynthesis of antibiotics	0.01	ACLYA, PGD, PKLR, ALDOB, OGDHL
投与期間B		
Biological process		
GO:0006412~translation	<0.01	ZGC:171772, EIF4A2, RPL5A, RPL27A, RPS20, RPS6, EIF3S6IP, RPS7
GO:0055114~oxidation-reduction process	<0.01	GDI2, ADH5, ZGC:172341, PRDX2, MDH2, TDO2B, MDH1AB
GO:0006413~translational initiation	0.01	EIF4BA, EIF4A2, EIF3S6IP
GO:0042274~ribosomal small subunit biogenesis	0.02	RPS6, RPS7
GO:0006108~malate metabolic process	0.02	MDH2, MDH1AB
GO:0043009~chordate embryonic development	0.04	VCP, RPL5A, RPS7
GO:0019752~carboxylic acid metabolic process	0.04	MDH2, MDH1AB
Cellular component		
GO:0005840~ribosome	<0.01	RPS25, ZGC:171772, RPL5A, RPL27A, RPS10, RPS20, RPS6, RPS7
GO:0030529~intracellular ribonucleoprotein complex	<0.01	RPS25, RPL5A, RPL27A, RPS10, RPS20, RPS6, RPS7
GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	<0.01	RPS10, RPS6, RPS7
GO:0000502~proteasome complex	0.01	PSMD3, PSMD6, PSMA6A
GO:0005622~intracellular	0.01	ZGC:171772, GDI2, RPL5A, RPL27A, RPS20, RPS6, SSR3, RPS7
Molecular function		
GO:0003735~structural constituent of ribosome	<0.01	ZGC:171772, RPL5A, RPL27A, RPS10, RPS20, RPS6, RPS7
GO:0016491~oxidoreductase activity	<0.01	GDI2, ADH5, ZGC:172341, PRDX2, MDH2, TDO2B, MDH1AB
GO:0030060~L-malate dehydrogenase activity	0.01	MDH2, MDH1AB
GO:0016615~malate dehydrogenase activity	0.01	MDH2, MDH1AB
KEGG pathway		
dre03010:Ribosome	<0.01	RPS25, ZGC:171772, RPL5A, RPL27A, RPS10, RPS20, RPS6, RPS7
dre03050:Proteasome	0.03	PSMD3, PSMD6, PSMA6A

5. アウトカムとその発現機序予測

最後に、これらのタンパク質の発現変動がどのような病気と関連するのか、Comparative Toxicogenomics Database (CTD)を用いて調査した (Table 2)。この結果、期間 A・B 共に消化器官における新生物 (MESH:D004067; Digestive System Neoplasms、MESH:D005770; Gastrointestinal Neoplasms) に関わるタンパク質が発現変動していることが明らかとなった。さらに、期間 A では栄養と代謝系の病気 (MESH:D009750; Nutritional and Metabolic Diseases) に関わるタンパク質が多く発現変動していた。投与期間 C では高 OTC 区の検体で体重減少が引き起こされており、投与期間 A での栄養と代謝系の病気に関連しているタンパク質の発現変動の影響であることが示唆された。

Table 1 発現変化タンパク質の機能解析

Disease Name	Disease ID	Corrected P-value	Annotated Genes
投与期間A			
Chemical and Drug Induced Liver Injury	MESH:D056486	3.8E-05	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 ME1
Digestive System Diseases	MESH:D004066	1.0E-04	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD PKLR RPS6 UPB1
Drug-Related Side Effects and Adverse Reactions	MESH:D064420	2.0E-04	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 ME1
Poisoning	MESH:D011041	2.3E-04	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 ME1
Liver Diseases	MESH:D008107	4.2E-04	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 ME1 PGD PKLR RPS6
Digestive System Neoplasms	MESH:D004067	4.3E-04	ALDOB DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPS6
Gastrointestinal Diseases	MESH:D005767	6.9E-04	ALDOB DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 RPS6 UPB1
Neoplasms by Site	MESH:D009371	1.5E-03	ALDOB DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPL31 RPL6 RPS6
Neoplasms	MESH:D009369	1.7E-03	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPL31 RPL6 RPS6
Gastrointestinal Neoplasms	MESH:D005770	2.0E-03	ALDOB DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 RPS6
Spinocerebellar Ataxia 17	MESH:C564616	2.7E-03	HSPA5 HSPA8
Carcinoma	MESH:D002277	2.9E-03	FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPL6 RPS6
Carcinoma, Hepatocellular	MESH:D006528	3.0E-03	FASN HSPA5 ME1 PGD RPS6
Chemically-Induced Disorders	MESH:D064419	5.8E-03	ALDOB ANXA6 DDB1 FASN HSPA5 ME1
Adenocarcinoma	MESH:D000230	6.9E-03	FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPS6
Stomach Neoplasms	MESH:D013274	7.8E-03	ALDOB DDB1 HSPA8 RPS6
Neoplasms, Glandular and Epithelial	MESH:D009375	8.5E-03	FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPL6 RPS6
Neoplasms by Histologic Type	MESH:D009370	8.9E-03	ANXA6 FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PGD RPL6 RPS6
Stomach Diseases	MESH:D013272	1.0E-02	ALDOB DDB1 HSPA8 RPS6
Nutritional and Metabolic Diseases	MESH:D009750	1.2E-02	ALDOB FASN HSPA5 ME1 PKLR STT3A UPB1
Liver Neoplasms	MESH:D008113	1.4E-02	FASN HSPA5 ME1 PGD RPS6
Carbohydrate Metabolism, Inborn Errors	MESH:D002239	1.6E-02	ALDOB PKLR STT3A
Myocardial Ischemia	MESH:D017202	2.5E-02	FASN HSPA5 HSPA8 RPL17
Pathological Conditions, Signs and Symptoms	MESH:D013568	3.4E-02	ALDOB DDB1 FASN HSPA5 HSPA8 ME1 PKLR RPS6 SLC27A6
Acute Coronary Syndrome	MESH:D054058	3.9E-02	FASN HSPA8
投与期間B			
Neoplasms by Site	MESH:D009371	1.2E-04	FGG FKBP2 GDI2 GNMT HABP2 MDH2 P4HB POLE PRDX2 RPL27A RPS6 RPS7 SNX5 VCP
Neoplasms	MESH:D009369	3.3E-04	EIF4A2 FGG FKBP2 GDI2 GNMT HABP2 MDH2 P4HB POLE PRDX2 RPL27A RPS6 RPS7 SNX5 VCP
Gastrointestinal Neoplasms	MESH:D005770	3.4E-03	FGG FKBP2 GDI2 POLE PRDX2 RPS6 SNX5
Disease Progression	MESH:D018450	7.4E-03	FKBP2 RPS6 SNX5 VCP
Collagen Diseases	MESH:D003095	1.3E-02	FGG P4HB PRDX2
Digestive System Neoplasms	MESH:D004067	1.7E-02	FGG FKBP2 GDI2 GNMT POLE PRDX2 RPS6 SNX5
Gastrointestinal Diseases	MESH:D005767	1.9E-02	FGG FKBP2 GDI2 POLE PRDX2 RPS6 SNX5
Anemia, Diamond-Blackfan	MESH:D029503	2.9E-02	RPS10 RPS7
Red-Cell Aplasia, Pure	MESH:D012010	2.9E-02	RPS10 RPS7
Hematologic Diseases	MESH:D006402	3.5E-02	FGG HABP2 RPL27A RPS10 RPS7
Skin and Connective Tissue Diseases	MESH:D017437	4.2E-02	FGG P4HB POLE PRDX2 RPL27A RPS6 RPS7 VCP

今後の展望

本研究では、OTC 投与したマダイ幼魚を対象に、肝臓において発現変化タンパク質を同定し、それらの機能を調べ、引き起こされる影響を考察した。しかし、3つの投与期間のうち期間 A と B の2つの投与期間を解析対象としていた。今後、期間 C も解析対象とし、同様の解析を行う。得られた成果を、Toxicological Sciences に投稿する。