

# 低タンパク質飼料マウス腸内細菌叢の網羅的 16S 解析

学籍番号：47-126912

氏名：清水翔

指導教官：服部正平 教授

## 【背景】

近年、腸内細菌と生活習慣-特に食生活-と疾病との関連性が示唆されている。この食習慣と腸内細菌叢、疾病の三者間における関連性は、生活習慣病に代表される富栄養状態での健康障害のみならず、飢餓状態による健康障害に対しても同様であると考えられる。タンパク質摂取量不足を原因とする疾病であるクワシオルコル病では、腸内細菌と低栄養の両方が疾病に関与することが示唆されている<sup>(1)</sup>。

## 【目的】

先に挙げた研究はタンパク質欠乏状態における発病メカニズムに関するものである。そこで、本研究では通常マウスに低タンパク質飼料と通常飼料を与え、両群の腸内細菌叢を比較することにより、飼料の違いが腸内細菌叢に及ぼす影響性の解析を目的とした。

## 【方法】

5 週齢の雄 C57BL/6J マウスを 20%タンパク質飼料で 2 週間の馴化後、2 群に分けて 20%タンパク質飼料、5%タンパク質飼料を与えた。1 週間毎に各マウス群から糞便サンプルの採取と体重測定を行った。糞便サンプル中の細菌 DNA を抽出し、16SrRNA 遺伝子の可変領域 V1-V2 を PCR 増幅した。得られた PCR 産物を 454 シークエンサーによるバーコードシークエンシングに供した。

得られたハイクオリティな 16S リードを uclust を用いて 96%以上の配列相同性で、OTU(Operational Taxonomic Unit)を作成した。各代表配列を NCBI GenBank と Ribosomal Database Project (RDP) の両データベースに対して GLSearch を用いた相同性検索を行い、菌種の特定を行った。得られた結果から、飼料の異なる 2 群間で腸内細菌叢の菌種組成比較を行った。

## 【結果】

低タンパク質飼料群（LPM 群）では、control 群に比べて体重変化率が有意に低下することがわかった (Fig. 1)。また、UniFrac 解析等から両群の細菌叢は飼料変更後 2 週間以内の早い時期で有意に異なることが明らかとなった (Fig. 2)。LPM 群で有意に増減する OTUs とその菌種帰属 (*Lactobacillus murinu* や *Bacteroidetes* 門に属する菌種) を Table 1 に示す。これらの結果は、低たんぱく質飼料により、マウス腸内細菌叢が有意に変動し、その菌叢変動には炎症誘導に関与すると考えられる菌種の増加が一部に観察された。

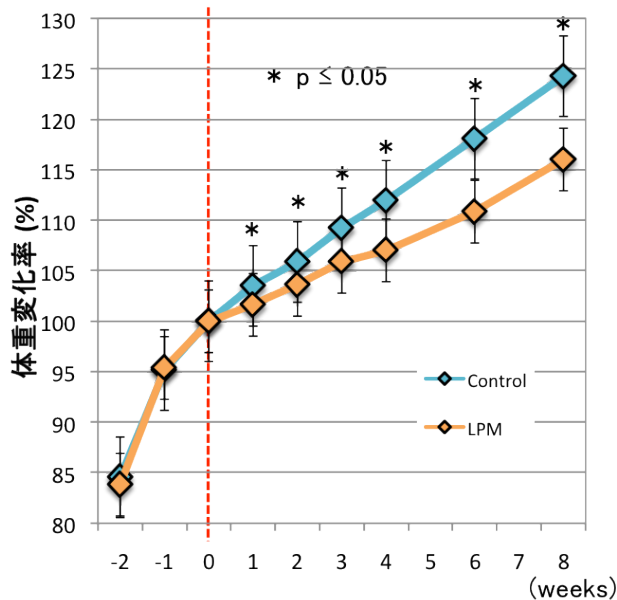


Figure 1 飼料変更日を100とした際の体重変化率の比較

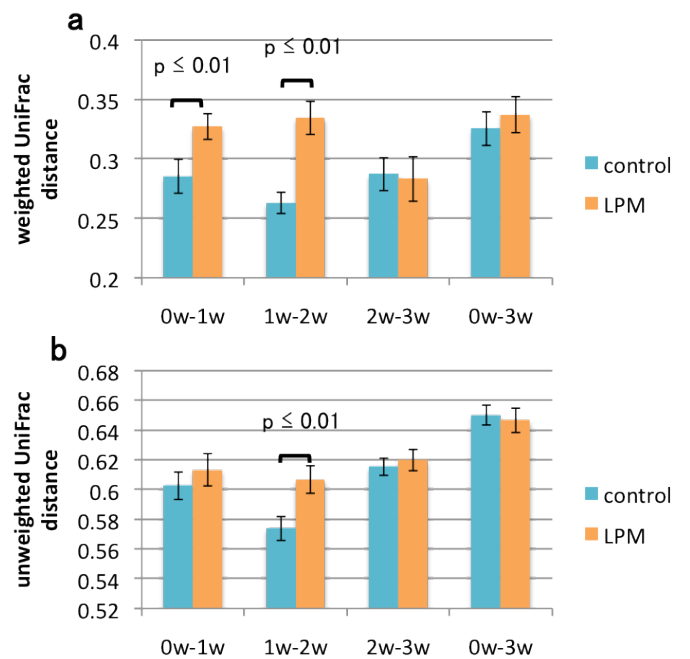


Figure 2 UniFrac distance に基づいた菌叢類似度の経時的変化  
(a) weighted UniFrac distance による  
(b) unweighted UniFrac distance による

Table 1 存在比が0.1%以上であり、両群間で有意差(p<0.01)が得られたOTU

OTU name	Phylum	Most closest Species	Identity	p-value	多く観察される群
total_OTU00046	Firmicutes	<i>Lactobacillus murinus</i>	100	0.0088	LPM
total_OTU00089	Firmicutes	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	88.34	0.0001	LPM
total_OTU00022	Bacteroidetes	<i>Tannerella forsythia</i>	79.06	0.0057	LPM
total_OTU00006	Bacteroidetes	<i>Prevotella sp. canine oral taxon 282</i>	86.94	0.0008	LPM
total_OTU00285	Bacteroidetes	<i>Parabacteroides distasonis</i>	81.33	0.0002	LPM
total_OTU00185	Firmicutes	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	91.36	2.76E-05	control
total_OTU00024	Firmicutes	<i>Lactococcus lactis</i>	99.37	0.0010	control
total_OTU00013	Bacteroidetes	<i>Rikenella microfusum</i>	81.53	0.0011	control

参考文献 1. Smith MI *et al*: Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor. *Science* (2013)