

## [研究課題名]

深層学習により再構築したマダイ固有のインタラクトームを用いた、マダイ幼魚への抗生物質（オキシテトラサイクリン）の影響評価

## [研究代表者名]

飯田 緑（九州工業大学大学院 情報工学研究院 生命化学情報工学研究系）

## [共同研究者名]

前田 和勲（九州工業大学大学院 情報工学研究院 生命化学情報工学研究系）

## [研究目的]

オキシテトラサイクリン（OTC）は養殖業で広く使用されている抗生物質である。OTC 投与の副作用として、魚類では免疫反応（炎症反応）やエネルギー代謝異常があることが報告されている。しかし、先行研究では生化学的な反応を報告したものが多く、プロテオームやインタラクトームの観点からの毒性発現機序についてはほとんど検討されていない。申請者はこれまで OTC を投与したマダイ幼魚の肝臓たんぱく質発現プロファイルを明らかにしてきた。本研究課題では、マダイ固有のインタラクトームを再構築し、ネットワーク解析を行うことで、毒性発現を担うたんぱく質群の探索と毒性発現機序の予測を目的とする。

## [研究内容]

### 1. インタラクトームの再構築

ここでは、マダイのアミノ酸配列をもとに、深層学習を用いてたんぱく質間相互作用を推定し、マダイ固有のインタラクトームを構築することを試みた。OmixBox(<https://www.biobam.com/omicsbox/>)を用いて、公開されている2種類のマダイゲノム<sup>1,2</sup>から28,343個の遺伝子配列を得た。さらに、これらの遺伝子配列をアミノ酸配列へ変換し、Yangら(2020)<sup>3</sup>が提案している手法によりタンパク質—タンパク質相互作用を推定することを試みた。しかし、予定よりも実装と推定に時間がかかり、以下の解析を行うための十分なデータが得られなかったため、本年度は、研究計画書に記載したとおり、ゼブラフィッシュのたんぱく質相互作用ネットワークを利用することとした。

そこで、STRING データベース<sup>4</sup>からゼブラフィッシュのたんぱく質相互作用のデータを取得し、9089 遺伝子・約 18 万の相互作用からなるゼブラフィッシュインタラクトーム (N = 9089, 平均次数 = 39.8) を作成した。また、構築したゼブラフィッシュインタラクトームの妥当性を検討するため、HuRI(<http://www.interactome-atlas.org/about/>) など 7 つのデータベースからたんぱく質-たんぱく質相互作用データを収集し、ヒトインタラクトームも構築した (N = 13377, 平均次数 = 35)。生物ネットワークの次数分布は、次数  $k$  の増加に従い  $P(k)$  がほぼ直線的に減少するべき分布を持つことが知られている。そこで、ゼブラフィッシュとヒトのインタラクトーム次数分布を比較した。この結果、ゼブラフィッシュインタラクトームの次数分布はヒトインタラクトームの次数分布と同様に、次数  $k$  の増加に従い  $P(k)$  がほぼ直線的に減少するべき分布を示した (Fig.1)。

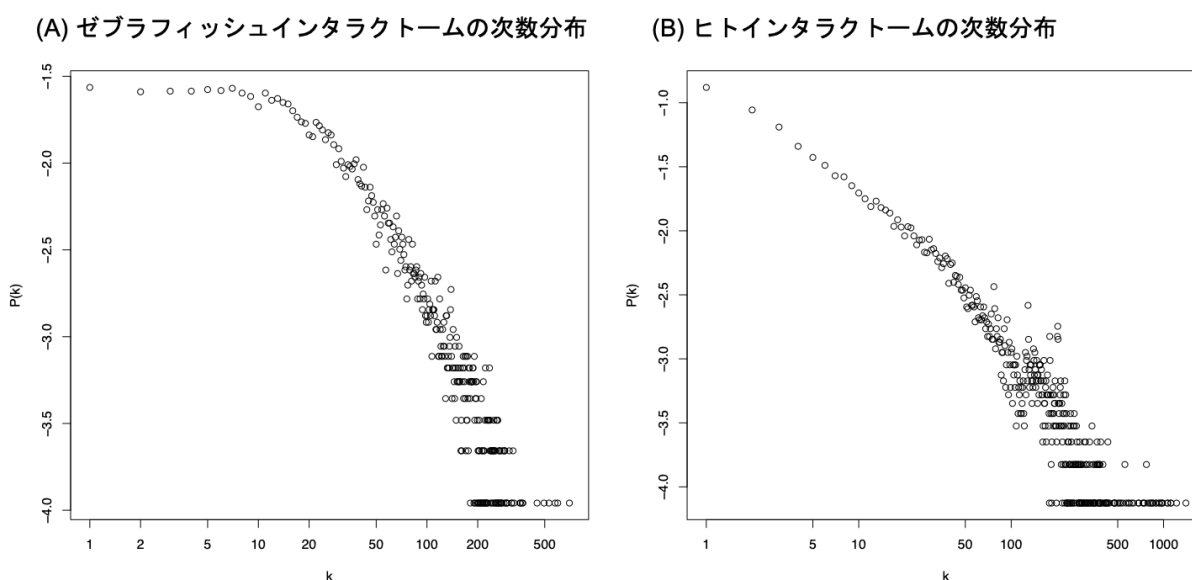


Fig.1 インタラクトームの次数分布 (A) ゼブラフィッシュのインタラクトーム (N = 9089, 平均次数 = 39.8) の次数分布 (B) ヒトのインタラクトーム (N = 13377, 平均次数 = 35) の次数分布

## 2. モジュールとハブたんぱく質の同定

ネットワーク生物学において、ノードがネットワーク上で密に相互作用している部分をモジュールと呼ぶ。また、多くのノードとつながっているノードはハブと呼ばれる。インタラクトームにおいて、モジュールは毒性発現の中心となるたんぱく質群と考えられ、ハブたんぱく質は毒性発現に重要な役割を持つ

と考えられる。そこで、構築したインタラクトームにオキシテトラサイクリン (OTC) の曝露により発現変動したたんぱく質をマッピングし、発現変動たんぱく質モジュールとハブたんぱく質を同定した(Fig2)。

この結果、1 サイクル目の OTC 連続曝露後 (1PE) の低濃度曝露群では ppid(peptidylprolyl isomerase D)と fgg(fibrinogen gamma chain)をハブとした2つのモジュールが、高濃度群では pklr(pyruvate kinase L/R)をハブとしたモジュールが同定された (Fig.2 A, D)。ppid は真菌が産生する環状ポリペプチド抗生物質の一つである、cyclosporin A 結合活性があることが知られている。このことから、OTC が ppid と結合し、下流の遺伝子へ影響を及ぼす可能性が示唆された。Fgg は炎症の急性期に血中に増加するたんぱく質であることが知られている。また、fgg をハブとするモジュールには C3(Complement C3)が含まれていたことから、1 PE の OTC 低濃度曝露群で見られていた免疫反応は、これらのたんぱく質が協調して働くことで惹起されていると考えられた。また、高濃度曝露群では、rps9(ribosomal protein S9)や rpl31(ribosomal protein L31)といった OTC のターゲットであるリボソームを構成するたんぱく質だけではなく、翻訳開始に関わる遺伝子(eif3i; eukaryotic translation initiation factor 3)も含まれていた。近年の研究から、OTC は Initiation Factor (IF3) の立体構造を変化させることで、タンパク質の翻訳開始を阻害することが明らかになっている<sup>5</sup>。このことから、高濃度曝露群では、OTC は原核生物と同様に翻訳を阻害することで毒性影響を惹起したと考えられた。

また、2 サイクル目の OTC 連続曝露後 (2PE) の低濃度曝露群では、dldh など 23 個のたんぱく質を含む大きなモジュールが、高濃度群では、hpda(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase a)と rps3a (ribosomal protein S3A)を中心とした、2つの小さなモジュールが同定された。低濃度群で同定されたモジュールには、代謝に関わるたんぱく質群がエンリッチされていたことから、OTC は dldh を介し代謝へ関わる多くのたんぱく質へ影響していると考えられた。このモジュールには、abat(4-aminobutyrate aminotransferase) や gapdh(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)といった神経系に関わるタンパク質も含まれていた。このことから、OTC の曝露は代謝に関わるタンパク質の発現変化を介して神経系に関わるタンパク質の発現を変化させていることが示唆された。また、高濃度群で同定されたモジュールには、1PE で同

定されたモジュールと同様に、リボソームを構成するたんぱく質のほか、翻訳開始に関わるたんぱく質も含まれていた。これらのことから、2PEにおいても OTC 高濃度曝露群では、たんぱく質の翻訳が阻害されることが示唆された。

2 サイクル目の休止期間後 (PEP)、OTC 低濃度曝露群では、pgk1(phosphoglycerate kinase 1)や eno1a(enolase 1a)を中心とした大きなモジュールが同定された。また、高濃度曝露群では、eno1a を含む小さなモジュールが同定された。これらモジュールには、解糖系に関わるたんぱく質がエンリッチしていた。PEP の OTC 曝露群では他にも hadhb (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta)を含むモジュールが同定されており、これらのたんぱく質は脂肪酸代謝に関わりエネルギー産生の機能を持つ。これらのことから、PEP でみられた代謝異常は主に解糖系や脂質代謝系のたんぱく質の発現変動によって引き起こされていることが示唆された。

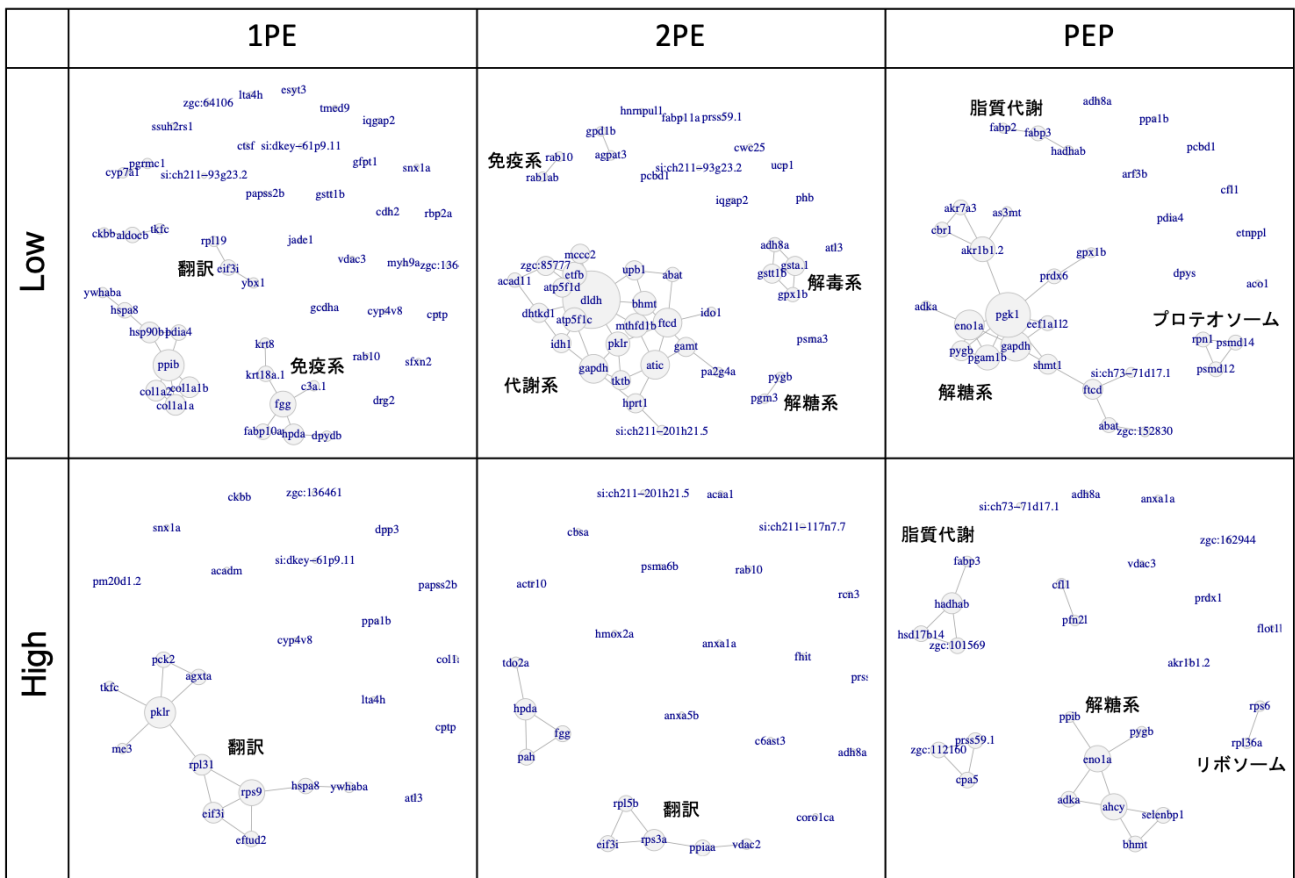


Fig.2 ゼブラフィッシュインタラクトームにおけるオキシテトラサイクリン (OTC) 発現変動たんぱく質モジュール. ノードはたんぱく質、エッジはたんぱく質間の相互作用を示す. 青字はたんぱく質のシンボル、黒字は、各モジュールでエンリッチしていた機能を示す.

## [研究成果]

これらの研究成果は環境ホルモン学会（JSEDR）で発表し、Toxicological science に投稿予定である。

## [参考文献]

1. Shin, G. H. *et al.* First Draft Genome for Red Sea Bream of Family Sparidae. *Front. Genet.* **9**, (2018).
2. Sawayama, E. *et al.* Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance to RSIVD in Red Sea Bream (*Pagrus major*). *Mar. Biotechnol.* **19**, (2017).
3. Yang, F., Fan, K., Song, D. & Lin, H. Graph-based prediction of Protein-protein interactions with attributed signed graph embedding. *BMC Bioinformatics* **21**, (2020).
4. Jensen, L. J. *et al.* STRING 8 - A global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* **37**, (2009).
5. Barrenechea, V., Vargas-Reyes, M., Quiliano, M. & Milón, P. A Complementary Mechanism of Bacterial mRNA Translation Inhibition by Tetracyclines. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).