

脂質ラフト機能における脳型脂肪酸結合蛋白質と アクチン蛋白質の相互作用解析

[1] 組織

代表者：香川 慶輝
(東北大学大学院医学系研究科)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：大和田 祐二
(東北大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

近年、脳の高次機能や神経疾患と栄養摂取との関係が数多く報告されている。中でも注目されているのが、DHA などの長鎖脂肪酸で、その摂取不足は、統合失調症などの精神疾患を引き起こすことが知られている。しかし、その分子機序については未だ解明されていない。

脂肪酸結合蛋白質 (FABP) は長鎖脂肪酸を可溶化することで、細胞内脂肪酸動態を制御する。サブタイプの一つである脳型 FABP (FABP7) は脳アストロサイトに強く発現し、DHA に強い親和性を持つ。これまでに我々は、FABP7-KO マウスは情動行動異常を示すこと (Owada et al. *Eur J Neurosci.* 2016)、FABP7-KO マウス脳の内側前頭前野のニューロンが異常形態を示すこと (Ebrahimi et al. *Glia.* 2016)、アストロサイトで FABP7 は細胞外刺激応答のプラットフォームである細胞膜脂質ラフトの機能を制御すること (Kagawa et al. *Glia.* 2015)、を明らかにした。つまり、“FABP7 蛋白質欠損による細胞内脂質動態異常により脂質ラフトを介した細胞外部刺激応答が変化することで恒常的にアストロサイトの細胞活性が低下し、神経可塑性変化が引き起こされる”ことが予想される。

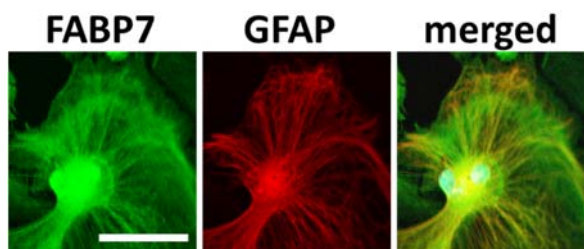


図 1 初代培養アストロサイトにおける FABP7 の発現・局在

アストロサイトにおいて FABP7 は細胞質・核に発現し、特に細胞質に発現する FABP7 はアストロサイトの間径径フィラメントである GFAP に沿った発現様式を示すものが存在することが明らかになった (図 1)。また FABP7 蛋白質と相互作用を持つ蛋白質の同定を行い、FABP7 はアクチン蛋白質に強く結合することが明らかになった (図 2、赤矢印①)。これらの予備実験結果より、FABP7 は細胞骨格蛋白質と結合することで細胞膜やオルガネラの形態維持または変化に関与することが推測される。そこで、FABP7 の持つ脂肪酸結合ドメインの役割に着目し、アクチン蛋白質との結合、及び、その相互作用機能の解析を行った。

本研究では、月に 1 度代表者と対応者の研究グループが集まり、得られたデータを共有する打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

FABP7 蛋白質はその C 末端近傍に脂肪酸結合ドメインを持つ。過去の報告で、ヒト FABP7 蛋白質で F104A (TTT3AGA), R126A (CGC3GCC), and Y128A (TAT3GCT) の変異を加えると脂肪酸結合能力が欠失することが報告されている (Mita R et al. *J Biol Chem.* 2010)。本研究ではまず第 1 に、マウス FABP7 (FABP7wt) の脂肪酸結合ドメインに変異が入った発現ベクターの作成を行った。マウスとヒトで相同性のある部分はアミノ酸 126 番目のアルギニン、128 番目のチロシンであったため、この 2 つのアミノ酸に変異 (R126A, Y128A) を加えた FABP7 (FABP7mut) を発現させるシステムを用い

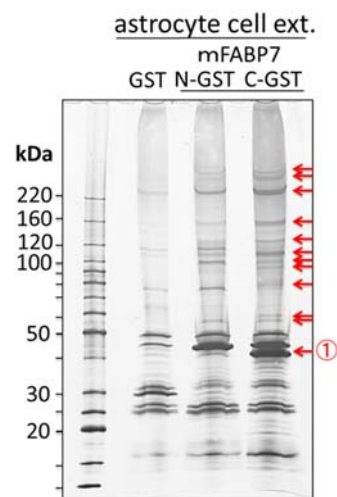


図 2 アストロサイト細胞溶液を用いた GST-pull down 法で得られたものを電気泳動・銀染色したもの (unpublished data)

る。バキュロウイルスを用いて、GST、GST-FABP7wt、GST-FABP7mut をそれぞれ発現させるシステムを構築し、ウイルス感染した昆虫細胞を培養後、組換え蛋白質の精製を行い、その発現を CBB 染色で確認した。(図 3)

作成した組み換え蛋白質が、脂肪酸結合能力を欠失しているかどうかを確認する為に、ANS (fluorescent probe, 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid)を用いて binding assay を行った。GST-FABP7wt に比べ、GST-FABP7mut では脂肪酸結合能力が約 40%低下していることが明らかになった(図 4)。

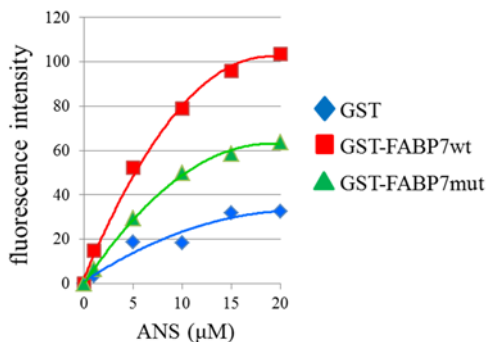


図 4 精製した組み換え蛋白質の脂肪酸結合能力を ANS assay で検討した。(unpublished data)

第 2 に、精製した組み換え蛋白質にタグ付けされた GST を利用して FABP7wt と結合する蛋白質の同定、さらに脂肪酸結合能力が減少した FABP7mut と FABP7wt、それぞれに結合する蛋白質を比較することで、脂肪酸が蛋白質相互作用に影響するかどうかを検討した。先の実験で生成した組み換え蛋白質にタグ付けされて

図 5 FABP7wt と FABP7mut 蛋白質に結合する蛋白質を GST-pull down 法・電気泳動・銀染色で同定 (unpublished data)

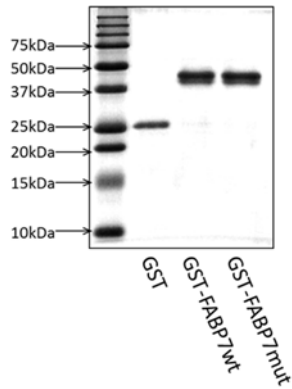


図 3 精製した組み換え蛋白質を CBB 染色で確認 (unpublished data)

いる GST を利用した pull-down assay を施行した。得られたサンプルを電気泳動、銀染色した結果、FABP7wt に結合するが FABP7mut には結合しない蛋白質のバンドが数本見られた(図 5、赤矢印)。一方、FABP7mut に結合するが FABP7wt には結合しない蛋白質のバンドも数本見られた(図 5、青矢印)。これら蛋白質の同定は現在質量分析で解析中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

多価不飽和脂肪酸は水に溶けず、ゲノムに直接コードされない性質を持つことから、細胞内に強制発現させることや局在を移動させるなど実験的ターゲットとして扱うことが非常に難しい。FABP7 は n-3 系多価不飽和脂肪酸に親和性を強く持つことから、この性質を利用し、細胞内 FABP7 の発現をコントロールすることで脂質動態を間接的に制御し、細胞機能に与える影響を検討することが出来る。最終的に FABP7 が制御する脂質や蛋白質を同定することで、蛋白質相互作用における脂肪酸の役割を明らかにすることが出来る。さらにこれまで得られている、骨格蛋白質の機能制御に脂肪酸が関与することが明らかになれば、新研究領域の開拓につながると考えている。さらに、脂質ラフト機能における FABP7 の機能解析をより詳細にすることで、FABP7 が関与する精神疾患の病態や癌バイオロジーの解明及びそれら疾患の治療創薬の開発に大きく貢献できると考える。

[4] 成果資料

未だ成果発表には至っていない。

