

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570081

研究課題名（和文） 脂肪酸結合タンパク質 FABP7 による睡眠制御の分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism of the sleep regulation by fatty acid binding protein FABP7

研究代表者

永田 奈々恵（NAGATA NANA E）

公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究員

研究者番号：80390805

研究成果の概要（和文）：プロスタグランジンなどの脂質（脂肪酸）は睡眠調節に関与することが知られている。一方で、睡眠は疲労回復や記憶の定着などに重要とされるが、これら睡眠の生理的意義の分子機構は解明されていない。本研究では、マウス大脳皮質での mRNA 発現レベルが明期と暗期で変動する脂肪酸輸送タンパク質 brain fatty acid binding protein (FABP7) の相互作用タンパク質として Glycoprotein M6a (GPM6a) を同定した。更に、両タンパク質がマウス脳でも相互作用していることを確認し、FABP7 と GPM6a がマウス脳で相互作用し機能している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Prostaglandin (PG) D<sub>2</sub> is lipid-derived eicosanoid that has been shown to promote sleep. PGD synthase is a part of a superfamily of lipidbinding proteins called lipocalins that also include fatty acid binding proteins (Fabps). The brain fatty acid binding protein (Fabp7) has previously been shown to have a diurnal regulation of mRNA and protein throughout mouse brain. In this study, we investigated the network involved in sleep-wake regulation in the mouse brain through the protein-protein interactions analyses. We found that FABP7 interacts with the Glycoprotein M6a (GPM6a) in the mouse brain, causing FABP7 to locate to plasma membrane. Our data suggest that FABP7 likely mediate both synthesis and transport of lipid-derived signaling cascades involved in sleep behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、動物生理・行動

キーワード：FABP7、脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠不足は日中の眠気を誘い、記憶や学習

能力、集中力を低下させて作業効率を減少させる。そして、疲れた脳は睡眠により効率よく回復する。しかし、その分子機構は不明である。最もよく解明されている睡眠制御機構

が、プロスタグランジンとアデノシンによる睡眠覚醒調節機構である。申請者らのグループは、これまでの研究で、内因性睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D<sub>2</sub> が脳を取り巻くクモ膜細胞で合成され、脳脊髄液中に分泌され、第2の睡眠物質であるアデノシンを介して睡眠覚醒を制御することを証明した。このプロスタグランジンの原材料であるアラキドン酸を始めとした長鎖脂肪酸は睡眠制御に重要であると考えられる。しかし、これら脂肪酸類がどのように脳内で輸送され、睡眠制御に関与するかは全く不明である。

申請者らは睡眠中のマウス的大脑皮質を用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、睡眠中の大脑皮質において mRNA 発現が明期と暗期で変動する遺伝子として、脂肪酸輸送タンパク質である FABP7 (fatty acid binding protein 7, brain) を同定した。

FABP7 は「脳型」と呼ばれ脳で最初に発見され、脳における発現レベルが高いことが分かっている。また、FABP7 は脂肪酸の中でもドコサヘキサエン酸や内因性の睡眠物質であるプロスタグランジン D<sub>2</sub> 合成の基質となるアラキドン酸に強く結合する。

一方で FABP7 は、発生期のマウス脳の radial glial cell や未分化のアストロサイトで発現し、成熟マウス脳では neuroglial cell や radial glial cell で発現することから neuroglial cell の分化と遊走に関与すると考えられている (Kurtz, A. et al., 1994, Development, 120, 2637, Feng, L. et al., 1994, Neuron, 12, 895)。他方、FABP7 欠損マウスでは海馬でのニューロン新生が減少することから、FABP7 はニューロン新生の過程で未分化な神経幹細胞の増殖に関わるという報告もある (Watanabe A et al., 2007, PLoS Biol, 5, e297)。これらの知見から、睡眠状態にある成熟マウス脳において、FABP7 と結合する脂肪酸及び FABP7 と相互作用するタンパク質が、神経細胞やアストロサイトの増殖や分化に関与し脳の恒常性維持に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

脂肪酸が睡眠の制御に重要であるとされるが、脂肪酸がどのようにして脳内で輸送され、睡眠の制御に関わるかは全く不明である。本申請研究では、マウス大脑皮質において mRNA 発現が明期と暗期で変動する FABP7 と相互作用するタンパク質を同定し、神経細胞などの培養細胞やマウス個体を用いて、これらの因子が睡眠中の脳内で果たす機能とそれらの生理的意義の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) FABP7 と相互作用するタンパク質の探索および結合の確認

①睡眠中のマウス的大脑皮質から cDNA ライブラリーを調製し、FABP7 をベイトとして in vitro virus 法を用いたタンパク質相互作用の探索を行った。

②FABP7 と相互作用するタンパク質の結合の確認には、それぞれ FLAG タグおよび His タグを付加した FABP7 および相互作用タンパク質の組み換えタンパク質を COS7 細胞株に強制発現させ、免疫沈降後、各タグの特異抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法により検証した。

③強制発現 COS7 細胞株を用い、各タグ抗体による免疫二重染色を行い、生理的条件下での相互作用を確認した。

④マウス大脑皮質のホモジネートを用いて、それぞれの相互作用タンパク質の特異抗体を用いて、免疫沈降実験を行い、生理的条件下での相互作用を確認した。

⑤マウス脳を用いて、各タンパク質の特異抗体による免疫二重染色を行い、FABP7 と相互作用タンパク質の局在が一致するかを調べることで、生理的条件下での相互作用を確認した。

⑥Biacore を用いて表面プラズモン法により結合実験を行った。

### (2) 培養神経細胞を用いた FABP7 と FABP7 相互作用タンパク質の相互作用の役割の検討

アデノ随伴ウイルスベクターを用い、マウス神経細胞株 Neuro2a 細胞に FABP7 と相互作用タンパク質を過剰発現させ、内因性睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D<sub>2</sub> の産生にも関与するアラキドン酸カスケード関連遺伝子の発現変動を定量的 PCR により調べた。

### (3) 同定した FABP7 相互作用タンパク質の経時的発現変化の解析

マウス大脑皮質から経時的に mRNA を抽出し、定量的 PCR を行い、相互作用タンパク質の発現レベルの経時変化を調べた。

## 4. 研究成果

(1) FABP7 と相互作用するタンパク質の探索および結合の確認

睡眠中のマウスの大脳皮質から cDNA ライブラリーを調製し、FABP7 をベイトとして in vitro virus 法を用いたタンパク質相互作用の解析を行い、相互作用候補タンパク質として、GPM6a を同定した。そこで、次に、FABP7 と GPM6a の結合の確認を行った。

①FLAG-FABP7 と His-GPM6a を COS7 細胞株に強制発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降後、各タグの特異抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法により相互作用を検証した。その結果、FABP7 と共沈した GPM6a が、抗 His 抗体により検出された (図 1. 上段)。免疫沈降した FABP7 は、抗 Flag 抗体により検出された (図 1. 下段)。

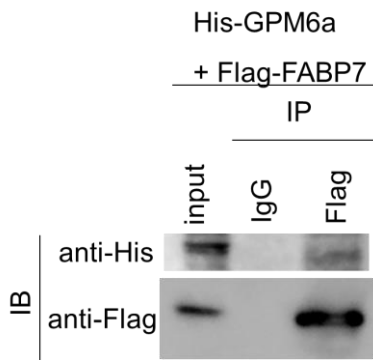


図 1. Flag-FABP7 / His-GPM6a 強制発現 COS7 細胞での FABP7 および GPM6a の相互作用

②FABP7 と GPM6a を COS7 細胞株に強制発現させ、抗 FABP7 抗体および抗 GPM6a 抗体を用いて免疫二重染色を行った。GPM6a との共発現により、FABP7 の局在は、細胞質から細胞膜近傍へ変化した (図 2)。

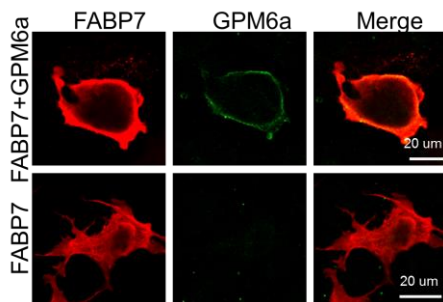


図 2. FABP7 / GPM6a 強制発現 COS7 細胞での FABP7 および GPM6a の相互作用

③マウス全脳のコモジネートを用い、抗 FABP7 抗体で免疫沈降を行った。その結果、

FABP7 と共沈した GPM6a が、抗 GPM6a 抗体により検出された (図 3. 上段)。免疫沈降した FABP7 は、抗 FABP7 抗体により検出された (図 3. 下段)。

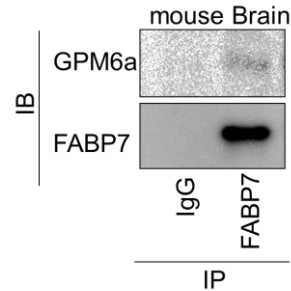


図 3. マウス大脳での FABP7 と GPM6a の相互作用

④抗 FABP7 抗体および抗 GPM6a 抗体を用いて成熟マウス脳の免疫二重染色を行った。海馬において、FABP7 陽性細胞と GPM6a 陽性細胞の共局在が認められた。

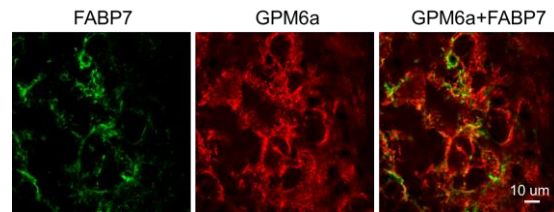


図 4. マウス海馬における FABP7 および GPM6a の共局在

⑤GPM6a の細胞内ドメイン (1-18, 101-129, 236-278) の GST 融合タンパク質を作製し、表面プラズモン共鳴法による結合実験を行った。FABP7 タンパク質をセンサーチップに固定化し、マイクロ流路系を介して GST 融合タンパク質を添加した。その結果、GPM6a 細胞内ドメイン (101-129) の GST 融合タンパク質と FABP7 との結合が認められた。

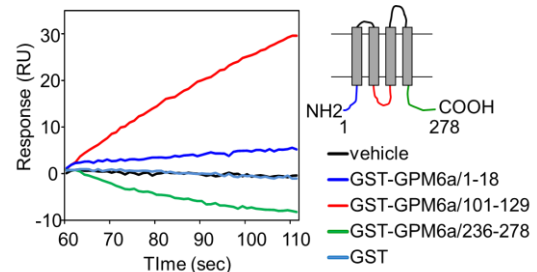


図 5. GPM6a タンパク質細胞内ドメインと FABP7 との相互作用

(2) 培養神経細胞を用いた FABP7 と FABP7 相互作用タンパク質の相互作用の役割の検討

マウス神経細胞株 Neuro2a 細胞に FABP7 と GPM6a を過剰発現させ、アラキドン酸カスケード関連遺伝子の発現変動を定量的 PCR により調べた。その結果、FABP7 あるいは GPM6a を単独で発現させた場合は PGD<sub>2</sub> 受容体の 1 つである DP2R mRNA 発現量が有意に増加したが、両タンパク質を共発現させた場合は、DP2R mRNA 発現量に変動はみられなかった (図 6)。

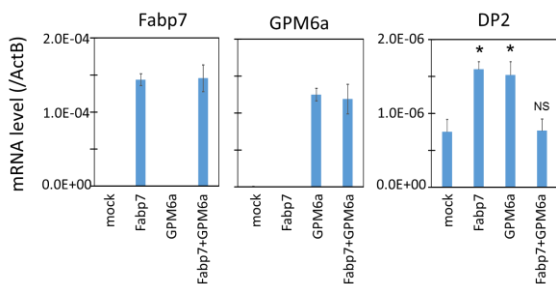


図 6. FABP7 / GPM6a 強制発現 Neuro2a 細胞での DP2R mRNA レベルの変化

(3) 同定した FABP7 相互作用タンパク質の睡眠・覚醒時における経時的発現変化の解析

成熟マウス大脳皮質から経時的に mRNA を抽出し、定量 PCR を行い、Fabp7 および Gpm6a mRNA 発現レベルを定量した。マウス大脳皮質での Fabp7 および Gpm6a mRNA の発現レベルは、睡眠中に相当する明期開始の 7 時間前から上昇し、明期開始後に元のレベルに戻った (図 7)。

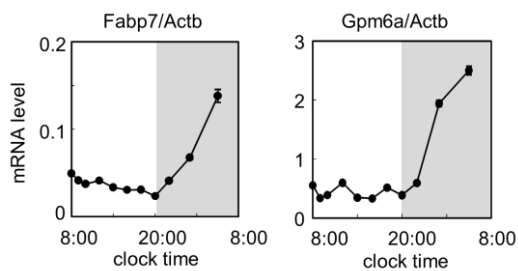


図 7. 成熟マウス大脳皮質での Fabp7 および Gpm6a mRNA レベルの経時変化

以上、FABP7 の相互作用タンパク質の探索および検証を行い、FABP7 の相互作用タンパク質として GPM6a を同定した。GPM6a は、神経細胞の成長円錐に最も多量に存在する膜タンパク質で、神経細胞の分化誘導に関わるといわれている。また、 $\mu$ -オピオイドレセプターなどの G タンパク質共役型受容体の内化に関与するという報告もある。

COS7 細胞に FABP7 と GPM6a を共発現させる

と、FABP7 の局在が変化したことや、Neuro2a 細胞に FABP7 と GPM6a を共発現させると、各遺伝子単独発現では認められた DP2R mRNA 発現量の増加が打ち消されたことは、FABP7 と GPM6a が生理的条件下において相互作用していることを示している。また、マウス大脳皮質での FABP7 と GPM6a の mRNA レベルが、明期開始 17 時間後、すなわち覚醒の 7 時間前から共に上昇し、明期開始後、共に元のレベルに戻ったことは、覚醒期の後半から睡眠期に移行する時点で FABP7 とその GPM6a が相互作用している可能性を示している。以上、本研究により、FABP7 と GPM6a が睡眠中の神経細胞において相互作用し、機能している可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Nagata N, Urade Y.; Endogenous sleep-promoting substance, Nihon Rinsho, 査読無, 2012; 70: 1227-1232, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844810>

② Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T, Narumiya S, Urade Y, Ohinata K.; Orally administered rubiscolin-6, a  $\delta$  opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice., Mol Nutr Food Res., 査読有, 2012; 56: 1315-1323. doi: 10.1002/mnfr.201200155

③ Nagata N, Urade Y.; Sleep-wake regulation by prostaglandin D2 and adenosine. Brain Nerve., 査読無, 2012; 64: 621-628. Review. Japanese. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647469>

[学会発表] (計 3 件)

① Nanae Nagata et al., Identification of new interacting partners of FABP7 in the mouse brain, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, マリンメッセ福岡

② Nanae Nagata et al., A novel SOX5 splicing isoform expressed in mouse brain during sleep, World Sleep 2011, 2011 年 9

月 4 日, 国立京都国際会館

③Nanae Nagata et al., et al., Function of a novel SOX5 splicing isoform expressed in mouse brain during sleep, Neuro2010, 2010 年 9 月 2 日, 神戸国際展示場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田 奈々恵 (NAGATA NANAE)  
公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究員  
研究者番号: 80390805

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤森 功 (FUJIMORI KO)  
大阪薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号: 70425453

柏木 香保里 (KASHIWAGI KAORI)  
公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究員  
研究者番号: 10372666  
(H22)

### (4) 研究協力者

宮本 悦子 (MIYAMOTO ETSUKO)  
東京大学医科学研究所東京大学医科学研究所・インタラクティブ医科学社会連携研究部門・部門長 特任准教授  
研究者番号: 70327708