

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 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570112

研究課題名（和文）核内受容体シグナルにおける脂肪酸結合タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of fatty acid-binding proteins (FABPs) involved in nuclear receptor signaling

研究代表者

藤井 博 (FUJII HIROSHI)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：90165340

研究成果の概要（和文）：(1) 高発現した FABP5 が核内で、癌の増殖・転移促進関連遺伝子群の転写を活性化している可能性が示唆された。(2) FXR によって活性化される新規 miRNA とその標的遺伝子を同定した。また、FABP6 のバリエーション (FABP6-L) が、胆汁酸存在下で抗アポトーシス活性を有することを明らかにした。(3) FABP5 遺伝子は、ヒト悪性前立腺癌細胞 PC-3 においてより脱 DNA メチル化傾向にあった。

研究成果の概要（英文）：(1) Functional analysis of FABP5 in nuclear receptor PPAR signaling in carcinogenesis or metastasis: I have found that nuclear receptor PPAR target gene, FABP5, is up-regulated in human malignant prostate cancer cells and that is localized into the nucleus in a ligand (fatty acid)-dependent manner. (2) Functional analysis of FABP6 in nuclear receptor FXR signaling: I have identified novel miRNAs and their target genes that were activated by the FXR agonist. Furthermore, I have demonstrated that a variant protein for FABP6, called FABP6-L/IBABP-L, has exhibited anti-apoptotic activity in the presence of bile acid in colorectal cancer cells. (3) Activation mechanisms of FABP5 gene expression: I have found that DNA methylation status of FABP5 gene isolated from PC-3 is much more demethylated compared with that of the gene from PNT-2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：核内受容体、脂肪酸結合タンパク質、脂肪酸、胆汁酸、シグナル伝達、遺伝子発現、癌転移、miRNA

1. 研究開始当初の背景

核内受容体のリガンドの多くは、脂溶性低分子化合物（脂質）であることから、細

胞膜を自由に通過して核へ直接到達する
と考えられているが、生理的条件下では必ず

しもこのことが当てはまるわけではない。細胞毒性の強い脂溶性リガンドを核内へ効率的に輸送するシステムがあるはずである。例えば、核内受容体 PPAR のリガンド（脂肪酸）は、分子機構の詳細は不明であるが、細胞膜の脂肪酸トランスポーター FATP (*fatty acid transport protein*) あるいは FAT/ CD36 (*fatty acid transporter*) を介して取り込まれ、細胞質の FABP によって脂肪酸の引き抜きや輸送が行われると考えられている。また、FXR のリガンド（胆汁酸）は、回腸では細胞膜の ISBT (*ileal Na⁺/bile acid cotransporter*/ASBT/SLC10a2)、細胞質の I-BABP (*ileal bile acid-binding protein*/FABP6) などの分子によって輸送されると考えられている。通常、これらのトランスポーターは、核内受容体と共発現しているが、核内受容体シグナルの制御に関与しているかほとんど解明されていない。

申請者は、これまで胆汁酸の核内受容体 FXR および脂肪酸の核内受容体 PPAR の標的遺伝子の同定と機能解析に焦点を当ててきたが、これらの核内受容体および FABP に関する研究で、以下のことを明らかにした（下線の原著論文）。

(1) 核内受容体 FXR の内因性リガンド（胆汁酸）の同定とその標的遺伝子が FABP6 であることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 274: 29749, 1999)。また、FABP6 (I-BABP) の特異的リガンドは胆汁酸で、構造上 FABP ファミリーに属すタンパク質であることを報告した (*Biochem J.* 330: 261, 1998)。更に、FABP6 は核内へ移行し、FXR と相互作用することによって FXR 依存的な転写を活性化することを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 280: 42283,

2005)。

(2) ヒト大腸癌における DNA マイクロアレイ解析で、正常大腸では発現していない FABP6 が、悪性大腸癌で高発現し、大腸癌の増殖を促進していることを明らかにした (*Clin. Cancer Res.* 12: 5090, 2006)。

(3) 脂肪酸の細胞内輸送に関与している上皮細胞型 FABP (FABP5/ C-FABP) が、転移能を獲得した悪性癌細胞（前立腺癌や乳癌など）で高発現し、FABP5 の発現レベルと転移活性が密接に関係していること、および FABP5 の核内局在化にともなって核内受容体 PPAR の下流遺伝子群 (VEGF など) が活性化されることなどを明らかにした (*Cancer Res.* 60: 2390, 2000, *Cancer Res.* 61: 4357, 2001, *Oncogene* 22: 2739, 2003, *Int. J. Oncol.* 32: 767, 2008)。

2. 研究の目的

これまでの核内受容体シグナルの研究は、主としてリガンドの同定、標的遺伝子の機能解析およびリガンド特異的な転写制御機構の解析など、様々な角度から行われてきたが、リガンド供給系の分子機構、即ちリガンドが細胞膜トランスポーターを介して細胞内へ取り込まれた後、いかにして核内へ輸送されリガンド特異的核内受容体による転写制御が行われるか、その分子基盤は解明されていない。特に、細胞内の微量のリガンドを核内へ効率的に輸送するメカニズムはほとんどわかっていない。従って、本申請課題の目的は、核内受容体 PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) あるいは FXR (*farnesoid x receptor*) のリガンド輸送に関与している脂肪酸結合タンパク質 FABP (*fatty acid-binding protein*) による核内受容体シグナル制御機構を解析することによって、これらの核内受容体シグナルの

変異に起因する疾患発症機序の解明を目指している。

(1) FABP による核内受容体(PPAR あるいは FXR)シグナル制御機構の解明

(2) 典型的な核移行シグナルを持たない FABP の核局在化機構の解明。特に、悪性腫瘍細胞における FABP の核移行メカニズムとその生理的意義の解明

(3) 悪性腫瘍細胞における FABP 遺伝子の転写活性化機構の解明

3. 研究の方法

(1) 核内受容体 PPAR シグナルにおける FABP5 の機能解析

① FABP5 による前立腺癌の転移能獲得機構を明らかにするために、FABP5 の siRNA 導入によって発現が変動する遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析で同定し、FABP5 によって活性化される遺伝子産物 (VEGF 以外) の機能を解析する。

② FABP5 と相互作用するタンパク質を同定する。FABP5 と特異的に相互作用するタンパク質を同定するため、FABP5 およびにタグ (FLAG) をつけた発現ベクター を癌細胞で発現させ、FLAG 抗体による免疫沈降後、SDS-PAGE のゲルから回収されたタンパク質を LC-MS 法で同定する。

③ FABP5 の転移能獲得活性に重要なアミノ酸残基や機能ドメインの決定

FABP5 の変異体遺伝子 (脂肪酸が結合できない変異体: M-1 (R106A) および R129A) の細胞内導入による転移能獲得活性を解析し、転移能獲得活性に脂肪酸が必要かどうか検討する。

④ 通常は細胞質にある FABP5 が、腫瘍の悪性化にともなって発現レベルが上昇し、細胞質から核内へ移行することを確認している

が (*Int. J. Oncol.* 32: 767, 2008)、典型的な核移行シグナルをもたない FABP5 が細胞質から核内へ移行するメカニズムとその生理的意義の解明。

(2) 核内受容体 FXR シグナルにおける FABP6/I-BABP の機能解析

正常大腸で発現していない FABP6/I-BABP がヒト大腸癌で高発現し、大腸癌の増殖を正に制御していることを確認したが、大腸癌の癌化過程における FABP6 の機能を解析する。上記(1)-②と同様に、高発現 FABP6 によって活性化される遺伝子群および FABP6 と特異的に相互作用するタンパク質を同定する。更に、高発現 FABP6 によって活性化される FXR の標的遺伝子の同定と機能解析をする。

(3) 悪性腫瘍細胞における FABP5 遺伝子の特異的転写活性化機構の解析

① ヒト悪性前立腺癌細胞 (PC-3) および良性 (PNT-2) における FABP5 遺伝子プロモーターのメチル化解析

② PC-3 および PNT-2 における FABP5 遺伝子のクロマチン構造の解析 (ChIP アッセイ)

4. 研究成果

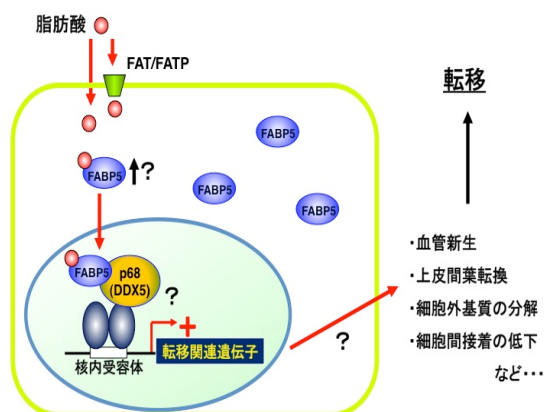
(1) 核内受容体 PPAR シグナルにおける FABP5 の機能解析

FABP5 による前立腺癌の転移能獲得機構を明らかにするために、高発現した FABP5 によって活性化される遺伝子 VEGF に着目し、FABP の過剰発現による VEGF 遺伝子の発現誘導機構を解析したところ、VEGF 遺伝子は脂肪酸によって発現が誘導された。また、細胞質に局在している FABP5 が、脂肪酸の存在下で、核内へ移行することを明らかにした。VEGF 遺伝子は PPAR δ のアゴニストによって活性化されることから、前立腺癌で高発現した FABP5 が核内へリガンド (脂肪酸) を輸送し、核内受

容体PPAR δ へ供給することによって、転移能獲得の鍵分子であるVEGFの遺伝子発現を亢進させる可能性が示唆された。

また、FABP5と特異的に相互作用するタンパク質を免疫沈降法で探索し、いくつかのタンパク質が同定された。その中には、転写共役因子として機能しているp68/DDX5 (*ATP-dependent RNA helicase*)が含まれていた。更に、FABP5がリガンド (脂肪酸) 依存的に細胞質から核内へ移行し、核内でp68/DDX5と特異的に相互作用し、この相互作用が、脂肪酸で増強されることを見出した。一方、P68は転写共役因子としても機能していることから、p68は、FABP5による転移能獲得に関与している遺伝子の特異的転写複合体のコンポーネントとして機能している可能性が示唆された。

図1. FABP5を介する転移シグナルネットワークのモデル(仮説)



今後、FABP5による転移能獲得におけるp68機能解析が必須である。また、脂肪酸依存的なFABP5の核移行は、脂肪酸をリガンドとするPPARシグナルの活性化につながる可能性を示唆しており、VEGF以外のFABP5の下流標的遺伝子の同定も必須課題である(図1)。

(2) 核内受容体 FXR シグナルにおける FABP6/I-BABP の機能解析

悪性ヒト大腸癌細胞 Lovo を用いて、FXR のアゴニストによって変動する遺伝子を同定した。胆汁酸あるいはFXRのアゴニストによって、FABP6だけでなく、いくつかのmiRNA遺伝子の発現が正あるいは負に制御されていることが示唆された。このことは、胆汁酸がFXRを介して、FABP6やmiRNAの発現を制御し、細胞の癌化過程においてなんらかの機能を果たしていることを示唆している。

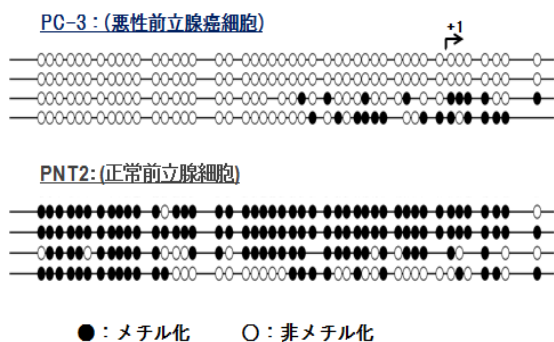
次に、高発現したFABP6と特異的に相互作用するタンパク質の同定を試みたが、まだ同定できていないため、今後の課題の一つとする。

更に、最近報告された、FABP6のバリエーション (FABP6-L/I-BABP-L) の機能についても解析し、FABP6-L/I-BABP-Lが、胆汁酸 (100 μ M) の存在下で抗アポトーシス活性を有することがわかった。一方、FABP6は逆に胆汁酸 (100 μ M) 存在下でアポトーシスを誘導し、癌細胞の増殖を抑制した。今後、FABP6とFABP6-Lの機能的差異とその発現機構について検証する。更に、FXRに応答するmiRNAの機能解析、大腸癌におけるFXRおよびFABP6の機能を解析する必要がある。

(3) 悪性腫瘍細胞における FABP5 遺伝子の特異的転写活性化機構の解析

ヒト悪性前立腺癌細胞 PC-3と正常前立腺細胞 PNT-2におけるFABP5遺伝子のDNAメチル化解析の結果、FABP5遺伝子はPC-3においてより脱DNAメチル化傾向にあった(図2)。今後、FABP5遺伝子の発現制御に関与している転写因子の結合部位の同定とDNAメチル化との関係を解析し、FABP5遺伝子の高発現との関連について明らかにする必要がある。

図2：FABP5 プロモーター領域のメチル化解析結果



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 7 件)

- ① W. Fujii, K. Toda, K. Kawaguchi, S. Kawahara, M. Katoh, Y. Hattori, H. Fujii, H. Makabe Syntheses of prodelphinidin B3 and C2, and their antitumor activities through cell cycle arrest and caspase-3 activation. *Tetrahedron* 69: 3543-3550, 2013 査読有
- ② Y. Oizumi, M. Katoh, Y. Hattori, K. Toda, K. Kawaguchi, H. Fujii, and H. Makabe Synthesis of procyanidin C2 & C1 using Lewis acid mediated equimolar condensation. *Heterocycles* 85 (9): 2241-2250, 2012 査読有
- ③ T. Kanda, A. Tsukahara, K. Ueki, Y. Sakai, T. Tani, A. Nishimura, T. Yamazaki, Y. Tamiya, T. Tada, M. Hirota, J. Hasegawa, H. Funaoka, H. Fujii, K. Hatakeyama Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study. *J. Gastroenterology* 46: 492-500, 2011 査読有
- ④ H. Funaoka, T. Kanda, S. Kajiura, Y. Ohkaru, and H. Fujii Development of a high-specificity sandwich ELISA system for the quantification of human intestinal fatty acid-binding protein

(I-FABP) concentrations. *Immunological Investigation*. 40(1): 1-20, 2011 査読有

- ⑤ Y. Nakano, H. Fujii, M. Kojima Effects of light wavelength and intensity on the expression of photoresponse genes in oyster mushroom mycelia. *J. Light & Visual Environment* 35 (1), 90-94, 2011 査読有
- ⑥ Y. Nakano, H. Fujii, M. Kojima Identification of blue-light photoresponse genes in oyster mushroom mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 2160-2165, 2010 査読有
- ⑦ M. Kojima, Y. Nakano, H. Fujii Light stimulation triggered expression of gene coding for vacuolar proton-pump enzymes v-ATPase and v-PPase in buckwheat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (7): 1507-1511, 2010 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 小嶋 政信、藤井 博 青色光刺激を与えてキノコ菌糸の代謝経路を制御する 第85回日本生化学会2012. 12. 15-16, 福岡
- ② 川口 耕一郎、木滑 歩、鈴木 俊介、藤井 博 ヒト前立腺癌細胞における転移原因遺伝子FABP5の発現制御機構の解析 第85回日本生化学会2012. 12. 15, 福岡
- ③ 戸田 一弥、川口 耕一郎、藤井 渉、真壁 秀文、藤井 博 転移原因遺伝子FABP5を分子標的とした抗腫瘍性分子の同定と作用機構の解 第85回日本生化学会2012. 12. 15, 福岡
- ④ 川村 悠気、藤井 博 大腸癌細胞におけるヒト核内受容体FXRの機能解析 第85回日本生化学会 2012. 12. 15, 福岡
- ⑤ 川村 悠気、藤井 博 Functional Analysis of the Farnesoid X receptor in Colorectal Cancer 大腸癌細胞における核内受容体 FXR の機能解析 第35回日本分子生物学会 2012. 12. 11, 福岡
- ⑥ 落合晋太郎、川口 耕一郎、藤井 博

ヒト FABP5 遺伝子による癌の転移能獲得機構の解析 Functional Analysis of Acquisition Mechanism of Prostate Cancer Metastasis Mediated by Human FABP5 第35回日本分子生物学会 2012. 12. 11, 福岡

⑦ 川口 耕一郎、木滑 歩、鈴木 俊介、藤井 博

ヒト前立腺癌細胞における FABP5 遺伝子の発現制御機構の解析 Analysis of Regulatory Mechanisms of FABP5 Gene Expression in Human Prostate Cancer 第35回日本分子生物学会 2012. 12. 11, 福岡

⑧ 戸田 一弥、川口 耕一郎、藤井 涉、真壁 秀文、藤井 博 転移原因遺伝子 FABP5 を標的とした抗腫瘍性分子の探索とその作用機構の解析 Identification and Characterization of a Novel Anti-tumorigenic Molecule Using the Metastasis-promoting Gene, FABP5, as a Molecular Target. 第35回日本分子生物学会 2012. 12. 11, 福岡

⑨ 川口 耕一郎、藤井 博 Analysis of the mechanism of prostatic cancer metastasis mediated by human epidermal-type fatty acid-binding protein (C-FABP/FABP5). 第84回日本生化学会 2011. 9. 22~23, 京都

⑩ 川口 耕一郎, 藤井 博 Characterization of metastasis-inducing gene, C-FABP/FABP5, overexpressed in human prostate cancer cells. 第34回日本分子生物学会 2011. 12. 14, 横浜

⑪ 川村 悠気, 藤井 博 大腸癌細胞における核内受容体FXRの機能解析 第34回日本分子生物学会 2011. 12. 14, 横浜

⑫ 吉田 満, 藤井 博 ヒト前立腺癌細胞におけるSIRT1の機能解析 第34回日本分子生物学会 2011. 12. 14, 横浜

⑬ Koichiro Kawaguti, Hiroshi Fujii Functional analysis of cancer promoting gene, human C-FABP/FABP5, in prostate cancer cells 第83回日本生化学会・第33回日本分子生物学会合同年会 2010. 12. 8, 神戸

(1)研究代表者

藤井 博 (FUJII HIROSHI)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：90165340

6. 研究組織