

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860134

研究課題名(和文) 脂肪酸結合蛋白質の脂質代謝制御による高次脳機能発現調節

研究課題名(英文) Fatty acid binding protein regulates higher brain function via lipid metabolism regulation

研究代表者

山本 由似 (YAMAMOTO, Yui)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80635087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では、野生型マウス及びFABP3KOマウスを用いて、FABP3のGABA合成系の調節機構と神経伝達調節機構について検証した。その結果、1. FABP3KOマウス前帯状皮質(ACC)では、GAD67プロモーター領域への転写抑制因子結合量が減少していた。2. ホールセルパッチクランプ法を用いてACC錐体細胞への抑制性入力を測定した結果、FABP3 KOマウスでは抑制性入力の有意に増加していた。ACCの抑制性介在神経において、FABP3はGAD67遺伝子の発現制御に関わり、FABP3の欠損はACCの興奮/抑制バランスを破綻させることで認知・情動行動に異常を引き起こすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of fatty acid binding protein 3 (FABP3) in the regulation of GABA synthesis and neurotransmission, mainly by using FABP3 gene ablated mice. The following results have been so far obtained: 1. In ACC of FABP3 KO mice, GAD67 promoter methylation and binding of MeCP2 and HDAC1 to GAD67 promoter were significantly decreased compared with wild-type mice. 2. To determine whether FABP3 directly regulates synaptic plasticity in the ACC, we recorded the amplitude and frequency of miniature IPSCs (mIPSCs) in ACC neurons. The mIPSC frequency was significantly increased in FABP3 KO mice compared with wild-type mice. On the other hand, the mIPSC amplitude was unchanged, suggesting that the loss of FABP3 produces alterations in inhibitory synaptic transmission. These findings suggest that DNA hypomethylation and the associated chromatin remodeling underlie the elevation of GAD67 in ACC and the abnormal behaviors and excitatory/inhibitory balance of FABP3 KO mice.

研究分野：神経科学

キーワード：脂肪酸結合タンパク質 GABA GAD67

1. 研究開始当初の背景

不飽和結合を2つ以上有する多価不飽和脂肪酸の多くは、食餌からの摂取に依存する必須脂肪酸として知られている。生体膜リン脂質を構成している脂肪酸の多価不飽和脂肪酸含有率が高いほど流動性が増し、特に神経細胞においては情報伝達効率が高まる。疫学調査から、統合失調症、双極性障害やうつ病などの精神疾患において、脳内多価不飽和脂肪酸が低下していることが明らかになった。しかし、これらの疫学データと精神疾患の関連を結ぶ分子や制御機構は不明である。

申請者は、多価不飽和脂肪酸の認知機能を含めた高次脳機能に及ぼす影響と、その制御機構を解明する鍵として、脂肪酸結合タンパク質 (FABP) に着目した。FABP は、水に不溶性脂肪酸や脂肪酸代謝物の細胞内取り込み・輸送・代謝の調節を介して、様々な細胞機能に関わっている。中枢神経系において、グリア細胞特異的に発現する FABP7 遺伝子の変異が、ヒト統合失調症患者の遺伝子スクリーニングの結果発見された (Maekawa et al., *J Hum Genet.* 2010)。一方 FABP3 は、生体内の神経細胞特異的に発現する (Murphy et al., *Biochemistry.* 2005)。FABP3 は、高次脳機能発現に最も重要な神経細胞に発現しているにもかかわらず、未だ細胞生物学的意義の検証がなされていない。FABP3 の機能解析が進まない原因の一つに、FABP3 は脳神経細胞に一樣に発現するのではなく、限られた脳領域の特定の神経細胞にのみ発現していることが挙げられる。

2. 研究の目的

申請者は予備実験により、FABP3 遺伝子欠損 (KO) マウスでは情動行動異常や認知機能異常などの高次脳機能異常が起こることを明らかにした。また、FABP3 が前帯状皮質 (認知情報処理や情動表出に参与) の抑制性介在ニューロンに特に高発現していることを初めて明らかにした。前帯状皮質は、認知・情動行動にかかわる脳領域と相互に線維連絡を持ち、刺激のトップダウンとボトムアップの処理や他の脳領域への適切な制御の割り当ての中心的役割を果たす。前帯状皮質神経活動の高次脳機能への関与は、人及びげっ歯類において多く報告されている。しかし、FABP3 により制御される FABP3 陽性抑制性介在ニューロンの脂質代謝変化が、前帯状皮質に関連する情報処理にいかに関与するのか、全く不明である。本研究では、前帯状皮質の局所神経回路特異的に発現している FABP3 が、高次脳機能に対して担っている意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

FABP3 の前帯状皮質における詳細な分布を、野生型マウスを用いて検討した。次に

FABP3 KO マウスを用いた検討を加えた。10 週齢マウス前帯状皮質のパンチアウトサンプルを作製し、抑制性シナプス関連タンパク質の発現を、ウェスタンブロット法を用いて検証した。GAD67 遺伝子発現に関与するプロモーター領域への転写抑制因子の結合を、クロマチン免疫沈降法で解析した。ホールセルパッチクランプ法を用いて前帯状皮質第 2・3 層の錐体細胞への興奮性入力と抑制性入力をそれぞれ測定した。

4. 研究成果

本研究では、以下の点を明らかにすることができた。

(1) 前部帯状回皮質のプルブアルブミン (GABA 作動性抑制性神経の代表的なマーカー) 陽性細胞の約 80% は、FABP3 を発現していた。一方、抑制性介在ニューロンのサブpopulation マーカーとして、ソマトスタチンやカルレチニンなども知られているが、これらのマーカーの発現細胞は、ほとんど FABP3 を発現していなかった。

(2) FABP3 KO マウスの前部帯状皮質では、GABA 濃度が増加していることが、ELISA による定量解析の結果から明らかになった (図 1)。FABP3 がどのようにして ACC 抑制性介在ニューロンの GABA 合成に関与しているのか、分子機構を理解するため予備実験として、抑制性シナプス伝達に関連する分子の発現比較を行った。その結果、GABA 合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素 67 (GAD67) のタンパク質及び mRNA (図 2) が、野生型マウスと比べて有意に増加していた。一方、その他の認知・情動機能に関わる代表的な神経伝達物質のドーパミンやセロトニンも同様に測定したが、FABP3 KO マウスでの変化は認められなかった。また、興奮性アミノ酸のグルタミン酸の細胞外遊離を、マイクロダイアリシス法を用いて測定したところ、グルタミン酸の放出が FABP3 KO マウス前帯状皮質で減少していた。

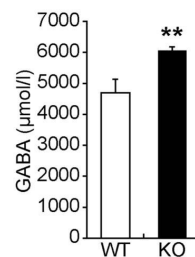


図1. FABP3KOマウスACCではGABA濃度が増加している

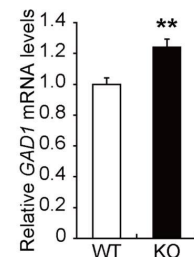


図2. FABP3KOマウスACCではGAD67(GAD1)のmRNA発現量が増加している

(3) FABP3 KO マウス前帯状皮質では、GAD67 プロモーター領域の低メチル化と、メチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) やヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の結合量の減少が観察された。また、ホール

セルパッチクランプ法を用いて前帯状皮質第2・3層の錐体細胞における微小興奮性後電流(mEPSC)と微小抑制性後電流(mIPSC)を記録したところ、FABP3 KO マウス前帯状皮質では、mIPSCの振幅は変化がなかったが、頻度が増加していた。mEPSCの頻度及び振幅は変化がなかった。

これらの結果は、FABP3 KO マウスの前部帯状皮質では、神経細胞の興奮と抑制機構のバランスが破たんし、その結果として、前部帯状皮質が重要な役割を果たす認知・情動行動に異常を来した可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Kida H, Tsuda Y, Ito N, Yamamoto Y, Owada Y, Kamiya Y, Mitsushima D: Motor Training Promotes Both Synaptic and Intrinsic Plasticity of Layer II/III Pyramidal Neurons in the Primary Motor Cortex. *Cereb Cortex*, in press, 2016. (査読有)

(DOI: 10.1093/cercor/bhw134)

Yasumoto Y, Miyazaki H, Vaidyan LK, Kagawa Y, Ebrahimi M, Yamamoto Y, Ogata M, Katsuyama Y, Sadahiro H, Suzuki M, Owada Y: Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS One*, 11(1), e0147717, 2016. (査読有)

(DOI: 10.1371/journal.pone.0147717)

Ebrahimi M, Yamamoto Y, Sharifi K, Kida H, Kagawa Y, Yasumoto Y, Islam A, Miyazaki H, Shimamoto C, Maekawa M, Mitsushima D, Yoshikawa T, Owada Y: Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Glia*, 64(1), 48-62, 2016. (査読有)

(DOI: 10.1002/glia.22902)

Pan Y, Scanlon MJ, Owada Y, Yamamoto Y, Porter CJ, Nicolazzo JA: Fatty Acid-Binding Protein 5 Facilitates the Blood-Brain Barrier Transport of Docosahexaenoic Acid. *Mol Pharm.*, 12(12), 4375-4385, 2015.

(DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00580) (査読有)

Kagawa Y, Yasumoto Y, Sharifi K, Ebrahimi M, Islam A, Miyazaki H, Yamamoto Y, Sawada T, Kishi H, Kobayashi S, Maekawa M, Yoshikawa T, Takaki E, Nakai A, Kogo H, Fujimoto T, Owada Y: Fatty acid-binding protein 7 regulates

function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. *Glia*, 63(5), 780-794, 2015. (査読有)

(DOI: 10.1002/glia.22784)

Islam A, Kagawa Y, Sharifi K, Ebrahimi M, Miyazaki H, Yasumoto Y, Kawamura S, Yamamoto Y, Sakaguti S, Sawada T, Tokuda N, Sugino N, Suzuki R, Owada Y: Fatty acid binding protein 3 is involved in n-3 and n-6 PUFA transport in mouse trophoblasts. *J Nutr*, 144(10), 1509-1516, 2014. (査読有)

(DOI: 10.3945/jn.114.197202)

Miyazaki H, Sawada T, Kiyohira M, Yu Z, Nakamura K, Yasumoto Y, Kagawa Y, Ebrahimi M, Islam A, Sharifi K, Kawamura S, Kodama T, Yamamoto Y, Adachi Y, Tokuda N, Terai S, Sakaida I, Ishikawa T, Owada Y: Fatty acid binding protein 7 regulates phagocytosis and cytokine production in Kupffer cells during liver injury. *Am J Pathol*, 184(9), 2505-2515, 2014. (査読有)

(DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.05.015)

[学会発表](計11件)

山本 由似、木田 裕之、美津島 大、大和田 祐二、福永 浩司、脂肪酸結合蛋白質3(FABP3)は前帯状皮質においてGAD67発現を制御する、第89回日本薬理学会年会、2016.3.10、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

山本 由似、澤田 知夫、徳田 信子、大和田 祐二、脂肪酸結合タンパク質FABP3による抑制性介在神経制御機構、日本解剖学会第70回中国・四国支部学術集会、2015.10.25、愛媛大学(愛媛県・松山市)

山本 由似、脂肪酸結合蛋白質の脂質代謝制御による高次脳機能発現調節、第4回生物学的精神医学会若手研究者育成プログラム、2015.9.25、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

山本 由似、木田 裕之、美津島 大、大和田 祐二、メチオニンはFABP3遺伝子欠損マウスにおけるGAD67の発現上昇と行動異常を改善する、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015.3.21、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

山本 由似、木田 裕之、美津島 大、福永 浩司、大和田 祐二、FABP3遺伝子欠損マウスにおけるGAD67の発現上昇と行動異常のメチオニン投与による改善作用、第88回日本薬理学会年会、2015.3.18、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

山本 由似、大和田祐二、精神神経疾患を理解するための脂肪酸結合タンパク

質 (FABP) 研究、第 30 回時間学研究セミナー「生物の発生と進化の時間」、2015.1.23、山口大学(山口県・山口市) Kida, H., Tsuda, Y., Yamamoto Y., Owada, Y., Mitsushima, D., Motor training changes the properties of layers II/III neurons in the primary motor cortex and glutamatergic synaptic plasticity. Neuroscience 2014, 2014.11.19, Washington Convention Center, Washington D.C. (USA)
Yamamoto Y., Sharifi, K., Islam, A., Ebrahimi, M., Yasumoto, Y., Miyazaki, H., Kagawa, Y., Sawada, T., Tokuda, N., Fukunaga, K. and Owada, Y. Localization of FABP3 in the mouse cingulate cortex and its possible role in the regulation of inhibitory neurons. Neuroscience 2014, 2014.11.17, Washington Convention Center, Washington D.C. (USA)
Ebrahimi, M., Sharifi, K., Kagawa, Y., Islam, A., Yasumoto, Y., Miyazaki, H., Kawamura, S., Yamamoto Y., Sawada, T., Yoshikawa, T. and Owada, Y., Role of astrocytic FABP7 in medial prefrontal cortex (mPFC) as a regulator of mouse emotional behavior. Neuroscience 2014, 2014.11.17, Washington Convention Center, Washington D.C. (USA)
山本 由似、脂肪酸結合蛋白質の脂質代謝制御による高次脳機能発現調節、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会、2014.9.30、奈良県文化会館(奈良県・奈良市)
山本 由似、脳内脂質環境の食事による変化と高次脳機能への影響、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014.6.1、酪農学園大学(北海道・江別市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~org-anat/6> . 研究組織

(1)研究代表者

山本 由似 (YAMAMOTO, Yui)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80635087

(2)研究協力者

大和田 祐二 (OWADA, Yuji)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20292211