

平成21年4月10日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590189
 研究課題名（和文） 脂肪酸の細胞機能制御因子としての脂肪酸結合タンパク（FABP）分子
 研究課題名（英文） A role of fatty acid binding protein as a regulator of cellular functions.
 研究代表者
 大和田 祐二（OWADA YUJI）
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20292211

研究成果の概要：

FABP分子群の生体機能を明らかにすべく、細胞内シグナル伝達系の制御への関与とその機構、脂肪酸代謝物であるエイコサノイドの産生系への関与と活性の制御、等について焦点を当てながら検証を加えた。その結果、①表皮型FABP分子が、マウス肥満細胞において、LPS誘導TNF α 産生経路にポジティブに関与していることが判明した。②表皮型FABP分子が、マウス表皮細胞においてリノール酸の代謝制御を介して、早期分化過程に関与していることが判明した。③脳型FABP分子が、マウスアストロサイトの脂肪酸代謝を介して、精神神経疾患の病態に関与していることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：脂肪酸結合タンパク，脳，ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

FABP分子群は、リガンドである脂肪酸の脂肪酸代謝物の細胞内取り込み・輸送・代謝の調節などを介して様々な細胞機能に関わっていると考えられている。しかしながらその生体レベルでの分子機能については、未だ不明であった。

2. 研究の目的

FABP分子の①細胞内シグナル伝達系の制御への関与とその機構、②細胞骨格タンパクとの連関やその細胞レベルでの意義、③脂肪酸

代謝物であるエイコサノイドの産生系への関与と活性の制御、に主に着目しながら、これまで知られていないFABP分子の新しい細胞機能について遺伝子ノックアウトマウスや培養細胞を用いて証明することを、目的とする。

3. 研究の方法

1) エイコサノイド定量解析

野生型マウスとE-FABP変異マウスから分離した表皮細胞に対してカルシウムによる分化誘導

を行い、形態学的な変化を野生型とノックアウトマウス間で比較する。さらに、培養液中におけるn-6系脂肪酸から代謝されるエイコサノイドをLC/MS/MSを用いて定量し、両群間で8-HETE, 12-HETE, 13-HODEなどの表皮細胞の分化を制御するエイコサノイド含量に変化が見られるか否かを調べる。もし含量変化が認められた場合は、各エイコサノイドの合成酵素である8-lipoxygenase(8-LO), 12-LOなどの発現レベルでの変化の有無を遺伝子・タンパクレベルで検討を加えるとともに、これらの基質であるn-6系脂肪酸の細胞内量の変化をガスクロマトグラフにより測定する。

2) 転写制御解析

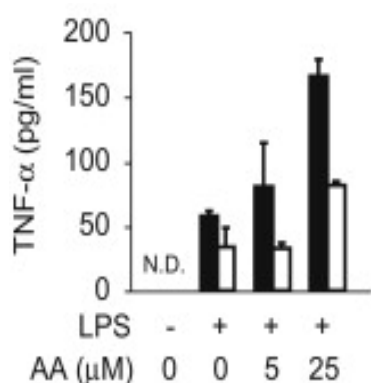
E-FABPがこれらのエイコサノイドの核内受容体PPARの活性化機構に関与している可能性を検証する。具体的には培養表皮細胞にPPARのDNA結合エレメントであるPPREにレポーターであるルシフェラーゼを結合させたベクターを遺伝子導入し、8-HETEや13-HODEを添加後にルシフェラーゼアッセイを行い、野生型と変異型の両群間で比較する。

3) 分裂能の評価

ノックアウトマウス由来のアストロサイトを用いて、アストロサイトにおけるB-FABP分子の細胞分裂への関与を検討する。具体的には、BrdU染色やMTTアッセイなどを行う。さらにyeast-two hybrid法により、B-FABPと細胞内相互作用を持ち分子を探索する。

4. 研究成果

(1) 表皮型(E-)FABP分子が、マウス肥満細胞において、LPS誘導TNF α 産生経路にポジティブに関与していることが判明した。



上図に示すように、野生型(黒塗り)に比べて、E-FABPノックアウトマウス由来の肥満細胞では、TNF α の産生が低下しており、その低下はアラキドン酸(AA)の添加の有無にかかわらず観察された(Yamamoto et al., *Prost Leuko Ess Fatty Acids*, 2008)。

(2) E-FABP分子が、マウス表皮細胞においてリノール酸の代謝制御を介して、早期分化過程に関与していることが判明した。

E-FABPノックアウトマウス由来の培養表皮細胞を用いて、必須脂肪酸であるリノール酸の取り込みを検討したところ、野生型表皮細胞に比べて、約30%の低下を示した。さらに、細胞内のリノール酸およびリノール酸代謝物である13-HODEの量を計測したところ、両者ともノックアウトマウスで有意な低下が認められた(論文投稿中)。さらに、表皮細胞におけるE-FABPが制御するシグナル伝達経路を検索したところ、NF κ Bの活性化に関与していることが明らかとなった。

(3) 脳型(B-)FABP分子が、マウスアストロサイトの脂肪酸代謝を介して、精神神経疾患の病態に関与していることが判明した。

B-FABPノックアウトマウスに対して、prepulse inhibition(PPI)を測定したところ、野生型マウスに比べて、PPIが障害されていることが判明した。さらにヒト統合失調症患者の遺伝子解析から、FABP7が統合失調症の病態に深く関与している可能性が示された(Watanabe et al., *PLoS Biol* 2007)。さらにB-FABPノックアウトマウス由来のアストロサイトにおいて、脂肪酸代謝が著明に変化していることも判明した(投稿準備中)。

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15件)

- 1 Kaneko, I., Suzuki, K., Matsuo, K., Kumagai, H., Owada, Y., Noguchi, N., Hishinuma, T. and Ono, M. (2009): Cysteinyl leukotrienes enhance the degradation of bone marrow-derived mast cells through the autocrine mechanism. *Tohoku J. Exp. Med.* 217, 185-191
- 2 Maekawa, M., Takashima, N., Matsumata, M., Ikegami, S., Kontani, M., Hara, Y., Kawashima, H., Owada, Y., Kiso, Y., Yoshikawa, T., Inokuchi, K. and Osumi, N. (2009): Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses. *PLoS ONE* 4, e5085
- 3 Motohashi, K., Yamamoto, Y., Shioda, N., Kondo, H., Owada, Y. and Fukunaga, K. (2009): Role of heart-type fatty acid

- binding protein in the brain function. *Yakugaku Zasshi* 129, 191-195. (Japanese)
- 4 Tamai, K., Tanaka, N., Toyoshima, M., Yamamoto, N., Owada, Y., Kiyonari, H., Ueno, Y., Ono, M., Shimosegawa, T., Watanabe, M. and Sugamura, K (2008): Loss of Hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. *Am J Pathol* 173, 1806-1817
 - 5 Zhang, M.I., Furukawa, H., Tokunaka, K., Saiga, K., Date, F., Owada, Y., Nose, M. and Ono, M. (2008): Mast cell hyperplasia in the skin of Dsg4 deficient hypertrichosis mice, which are long-living mutant of lupus-prone mice. *Immunogenetics*, 60, 599-607
 - 6 Yamamoto, N., Kaneko, I., Motohashi, K., Sakagami, H., Adachi, Y., Tokuda, N., Sawada T., Furukawa, H., Ueyama, Y., Fukunaga, K., Ono, M., Kondo, H. and Owada, Y. (2008): Fatty acid binding protein regulates TNF- α production in mast cells. *Prost Leuko Ess Fatty Acids* 79, 21-26
 - 7 Schachtrup, C., Malcharek, S., Owada, Y., Binas, B., Kondo, H., Rüstow, B., Galla, H.J. and Spener, F. (2008): Activation of PPAR γ reverses a defect of surfactant synthesis in mice lacking two types of fatty acid binding protein (FABP). *Biochem. Biophys. Acta*, 1781, 314-320
 - 8 Owada, Y. (2008): Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J. Exp. Med.* 214, 213-220
 - 9 Kaneko, I., Hishinuma, Y., Suzuki, K., Owada, Y., Kitanaka, N., Kondo, H., Goto, J. Furukawa, H. and Ono, M. (2008): Prostaglandin F $_{2\alpha}$ regulates cytokine production of mast cell through the receptors for prostaglandin E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 590-597
 - 10 Watanabe, A., Toyota, T., Owada, Y., Hashimoto, K., Ishitsuka, Y., Ohba, H., Iwayama, Y., Nakaya, A., Hayashi, T., Maekawa, M., Ohnishi, T., Yamada, K., Kondo, H., Osumi, N. and Yoshikawa, T. (2007): *FABP7* maps to a quantitative trait locus for a schizophrenic endophenotype. *PLoS Biol.* 5, e297
 - 11 Kamata, A., Sakagami, H., Tokumitsu, H., Sanda, M., Owada, Y., Fukunaga, K. and Kondo, H. (2007): Distinct developmental expression of two isoforms of Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinases and their involvement in hippocampal dendritic formation. *Neurosci Lett.* 423, 143-148
 - 12 Sakagami, H., Homma, T., Sukegawa, J., Owada, Y., Yanagisawa, T. and Kondo, H. (2007) Somatodendritic localization of EFA6A, a guanine nucleotid exchanging factor, and its possible interaction with α -actinin in denritic spine. *Eur. J. Neurosci.* 25, 618-625
 - 13 Saito, A., Sugawara, A., Uruno, A., Kudo, M., Kagechika, H., Sato, Y., Owada, Y., Kondo, H., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., Ito, S. (2007): Retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor: possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology* 148, 1412-1423
 - 14 Abdelwahab, SA., Owada, Y., Kitanaka, N., Adida, A., Sakagami, H., Watanabe, M., Spener, F. and Kondo, H. (2007): Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in the apoptotic lymphocyte. *Mol. Cell. Biochem.* 299, 99-107
 - 15 Kamata, A., Sakagami, H., Tokumitsu, H., Owada, Y., Fukunaga, K. and Kondo, H. (2007): Spatiotemporal expression of four isoforms of Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase I in brain and its possible roles in hippocampal dendritic formation. *Neurosci. Res.* 57, 86-97
- [学会発表] (計 2 件)
- 1 末梢免疫臓器における脳型脂肪酸結合タンパク (B-FABP/FABP7) の局在 徳田信子、山本のり子、安達泰宏、澤田知夫、近藤尚武、大和田祐二 第 113 回日本解剖学会総会 2008 年 3 月 28 日 由布市
 - 2 高次脳機能における心臓脂肪酸結合タンパク (H-FABP/FABP3) の役割 本橋慧樹、山本のり子、安達泰宏、徳田信子、澤田知夫、福永浩司、近藤尚武、大和田祐二 第 113 回日本解剖学会総会 2008 年 3 月 28 日 由布市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和田 祐二 (OWADA YUJI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20292211

(2) 研究分担者

徳田 信子 (TOKUDA NOBUKO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70227578

安達 泰弘 (ADACHI YASUHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10346564