

「脂肪酸結合タンパク質 FABP のリガンド選択性の解明」

甲南大学フロンティアサイエンス学部 中野修一

1 研究の背景と目的

脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid binding protein: FABP) は、脂肪酸輸送を担う分子量 14~15 kDa の球状タンパク質である。その中央部に中鎖～長鎖の脂肪酸が結合し、脂肪酸の代謝や核内受容体の活性化に関与することが知られている(図 1 A)。また、薬剤の細胞内取り込みや神経疾患との関連性も指摘されており、FABP 研究は神経疾患の診断や治療法の開発に重要である。本研究は、脳の発生段階において重要な役割を担うと考えられている FABP-3 (H-FABP)、FABP-5 (E-FABP)、FABP-7 (B-FABP) のリガンド探索とその選択性を明らかにすることを目的とした(図 1 B)。リガンドの結合実験に適した高い精製度のタンパク質を調製し、様々な脂溶性分子との結合性を同一条件で測定することで、FABP のリガンド選択性を比較できるデータを取得することを試みた。

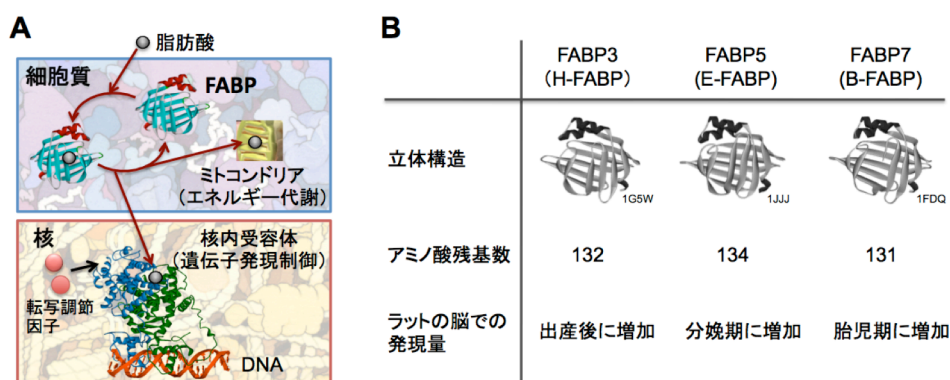


図 1. (A) 細胞内での脂肪酸輸送と (B) 脳の発生に重要な役割を果たす FABP

2 研究方法・研究内容

2-1. タンパク質の発現と精製

マウス由来の FABP 遺伝子は、pET 発現系 (Novagen) を使って構築した。このベクターを大腸菌 BL21(DE3)pLysS システム (Novagen) に組み込み、N 末端に His タグが付加したタンパク質を発現させた。超音波破碎した大腸菌の可溶性画分に含まれる FABP を、アニオン交換カラム (Hi-trap: GE healthcare) および Ni²⁺ アフィニティーカラム (His-trap: GE healthcare) を用いて精製した。さらに、スピンカラム (アミコン: Millipore) による精製と濃縮を行い、SDS-PAGE (ゲル電気泳動) と MALDI-TOF MS (質量分析) を用いて FABP の分子量を確認した。こうして得られたタンパク質は、FABP7 については低溶解度であったためリガンド探索に十分な量を得ることができなかったものの、FABP3 と FABP5 は水溶性が高く、本研究に適した性質を備えていることがわかった。

2-2. 発現タンパク質に結合した脂溶性分子の除去

大腸菌から得られる FABP には、脂肪酸などの脂溶性分子が結合している可能性がある。2-1 で調製した FABP 水溶液に残存する脂肪酸を取り除くために、有機溶媒を用いた脱脂操作を行った。FABP 溶液 6 mL にジイソプロピルエーテルと n-ブタノールの 3:2 混合溶液 2.4 mL を加え、室温にて 12~13 rpm で 30 分間振とうさせ

た後に有機溶媒を取り除いた。この脂溶性分子を除去する操作を 3 回繰り返した。

脱脂操作後に残存する脂肪酸を定量化するために、液体クロマトグラフィーによる分析を行った。FABP 溶液にクロロホルムとメタノールの 1:1 混合溶液を加え、遠心分離 (8000 rpm) 後の有機層を回収した。残った水層にクロロホルムを加え、遠心分離によって有機層を回収するという操作を 3 回繰り返した後、分取した有機溶媒を窒素ガスにより乾燥させた。こうして得られたペレットをメタノールで溶解させ、カルボキシ基と反応する ADAM (脂肪酸分析試薬: フナコシ) を加えた。ADAM によって蛍光標識化された脂肪酸は、C18 カラム (InertSustain C18, Swift C18: GLサイエンス) による液体クロマトグラフィーで蛍光検出した。含まれる脂肪酸を定量化するために、大腸菌では合成されない炭素数 11 の飽和脂肪酸を内部標準試薬として用いた。

2-3. リガンドの結合評価

脂肪酸のカルボン酸部分が FABP と静電相互作用することから、脂肪酸を標識化せずにリガンドの結合性を評価する方法が必要である。そこで、リガンドが結合すると FABP の構造安定性が増大することを利用したサーマルシフトアッセイを試みた。この方法は、FABP の立体構造が変性する温度 (熱変性温度 T_d) を測定するものであり、FABP のリガンドを網羅的に調べることができる。ポリペプチド鎖に結合して蛍光強度が変化する色素分子として SYPRO Orange を使用し (図 2)、蛍光プレートリーダーを用いたハイスループット測定を行った。96 穴マイクロプレートに FABP 溶液と脂肪酸 (0.25% DMSO 溶液) を添加し、室温にて 1 時間放置した。その後、SYPRO Orange (5×濃度) を加え、LightCycler 480 II (Roche) を用いて毎分 1.2 °C の昇温速度で FABP の熱変性曲線を測定した。

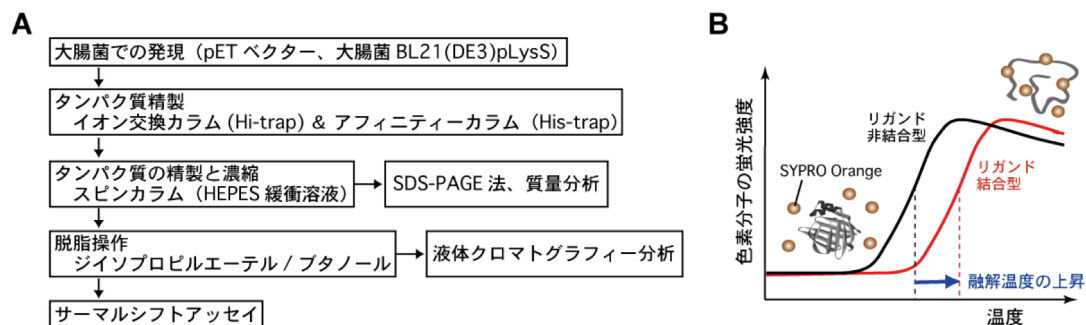


図 2. (A) FABP 調製の流れと (B) サーマルシフトアッセイによるリガンドの結合評価

3 研究成果

上記の方法で精製・脱脂した FABP (図 3A) に対して、溶液に残存する脂肪酸を液体クロマトグラフィー分析によって定量化した。その結果、FABP3 溶液に残存する脂肪酸はタンパク質のモル数に対して 0.73%、FABP5 では 0.34%、FABP7 では 2.2%であった。このように、アニオン交換カラムと Ni^{2+} アフィニティークラムを使った精製 (2-1)、ならびにジイソプロピルエーテルと n -ブタノールの混合溶媒を用いた脱脂操作 (2-2) によって、脂溶性分子をほとんど含まないアポタンパク質を調製することができた。また、脱脂操作における有機溶媒との接触が FABP の立体構造に与える影響を調べるために、CD (円二色性) スペクトル測定を行った。その結果、全ての FABP において β -シートに特徴的なシグナルが得られ (図 3B)、脱脂操

作の前後でタンパク質の立体構造は変化しないことが確認された。以上のように、リガンド分子の結合実験に適した精製度の高いタンパク質を得る方法を確認することができた。

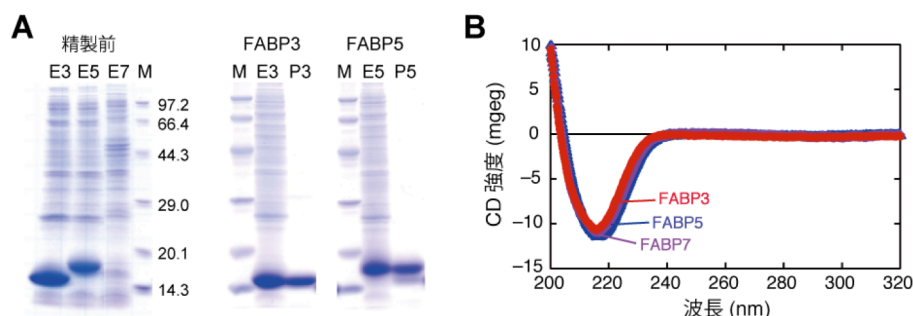


図 3. (A) FABP3,5,7 に対する SDS-PAGE の結果 (E: 精製前、P: 精製後、M: サイゾマーカータンパク質) と (B) CD スペクトルの結果

次に、脱脂された FABP3 と FABP5 を使ってリガンドの探索を行った。まず、HEPES 緩衝溶液中の FABP の熱変性温度 (T_d) を CD スペクトルによって調べたところ、FABP は比較的安定な高次構造を形成していることが明らかになった ($T_d > 55^\circ\text{C}$)。しかしながら、同様の実験をポリエチレングリコールによる分子クラウディング環境下で行うと、FABP の変性温度は大きく低下した。この知見を基に、65 種類の脂肪酸ライブラリー (炭素数 10~24 の飽和脂肪酸、シス-トランス異性体を含む不飽和度 1~6 の不飽和脂肪酸) との結合評価を、HEPES 緩衝溶液を用いて行った。FABP が熱変性すると SYPRO Orange の蛍光強度が変化することが確認されたので、FABP 濃度、脂肪酸濃度、SYPRO Orange 濃度をそれぞれ最適化し、リガンドの結合評価を行った。その結果、特定の脂肪酸を加えた場合に FABP3 と FABP5 の T_d が上昇することが見出された。3 回以上の測定で再現性が確認されたデータを比較したところ、FABP3 には炭素数が 14 から 18 の不飽和脂肪酸は結合するが、飽和脂肪酸はリガンドにならないことが示された (表 1)。脂肪酸濃度を変化させた実験から、FABP3 と各脂肪酸リガンドの解離定数は数~数百マイクロモル程度であることもわかった。FABP5 に対しては、二重結合の有無に関わらず炭素数が 11 から 13 までの比較的短鎖の脂肪酸に結合し (ω -1 位に二重結合がある場合を除く)、炭素数が 14 以上になると不飽和度が 1 の脂肪酸に結合するという傾向が見出された (表 2)。また、FABP3 のリガンドとして見出された炭素数 18 の脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸、 α リノレン酸など) は FABP5 のリガンドにならないことも明らかになった。これらの結果は、FABP3 と FABP5 は脂肪酸に対する結合選択性を有しており、脂肪酸のアルキル鎖長と二重結合の有無を識別していることを示している。この脂肪酸ライブラリーを用いた検討によって、FABP3 と FABP5 は結合するリガンドに違いがあることが明らかになったが、FABP7 との比較が課題として残されている。本研究では十分な量の FABP7 を得ることができなかったが、時間をかけてタンパク質の調製を繰り返せばサーマルシフトアッセイに使えるだけの量を得られる可能性があるため、実験を継続する予定である。また、脂肪酸以外の様々な脂溶性分子からなる化合物ライブラリー (ステロイド、テルペン、ビタミンなど) を用いてリガンド探索を試みたところ、FABP の熱変性温度を上昇させる化合物が見出された。今後はこの結果を精査し、リガンド選択性のデータとリガンドの化学構造を比較することで、各 FABP の結合選択性の原因を探っていく予定である。

表 1. サーマルシフトアッセイによって明らかになった FABP3 のリガンドの一例

T_d を上昇させた脂肪酸	T_d を上昇させなかった脂肪酸
9(Z)-Tetradecenoic acid、9(E)-Tetradecenoic acid	Myristic acid、Pentadecanoic acid
10(Z)-Pentadecenoic acid、10(E)-Pentadecenoic acid	Palmitic acid、Heptadecanoic acid
9(Z)-Hexadecenoic acid、9(E)-Hexadecenoic acid	Stearic acid、Nondecylic acid
10(Z)-Heptadecenoic acid、10(E)-Heptadecenoic acid	6(Z)-Octadecenoic acid
Oleic acid、Linoleic acid、 α -Linolenic acid	6(E)-Octadecenoic acid
9(E),11(Z)-Octadecadienoic acid	7(E)-Nonadecenoic acid
9(E),12(E)-Octadecadienoic acid	Eicosanoic acid
9(Z),12(Z),15(Z)-Octadecatrienoic acid	11(E)-Eicosenoic acid
6(Z),9(Z),12(Z),15(Z)-Octadecatetraenoic acid	

表 2. サーマルシフトアッセイによって明らかになった FABP5 のリガンドの一例

T_d を上昇させた脂肪酸	T_d を上昇させなかった脂肪酸
Undecanoic acid、Lauric acid、Tridecanoic acid	Decanoic acid、10-Undecenoic acid
9(Z)-Tetradecenoic acid、9(E)-Tetradecenoic acid	11-Dodecenoic acid、Myristic acid
10(Z)-Pentadecenoic acid、10(E)-Pentadecenoic acid	Pentadecanoic acid、Palmitic acid
6(Z)-Octadecenoic acid、6(E)-Octadecenoic acid	Linoleic acid、 α -Linolenic acid
10(E)-Nonadecenoic acid	9(E),11(Z)-Octadecadienoic acid
	9(E),12(E)-Octadecadienoic acid

4 生活や産業への貢献および波及効果

4-1. 生活や産業への貢献

本研究は脳の発生に重要な役割を果たす FABP ファミリータンパク質のリガンド選択性を明らかにするものである。本研究成果によって、脳の発生に関わる FABP のリガンド選択性を比較できるデータを得ることができた。このデータは、細胞内の脂溶性分子の量と動態に関する理解を深め、その挙動を予測したり、脳発生における FABP の役割を解明するのに有用である。また、FABP はエネルギー代謝や遺伝子発現への関与以外に神経疾患との関連性も知られており、その遺伝子変異が統合失調症や自閉症と関連する可能性が指摘されていることから、本研究成果は神経疾患の診断・治療法の開発などに有用な知見を与えるものである。

4-2. 生活や産業への波及効果

FABP は脂肪酸以外にも、様々な脂溶性分子（例えばステロイド関連物質や脂溶性薬剤分子）の運搬に関わることが知られている。また、心臓や腎臓疾患のバイオマーカーとしても用いられており、多くの分野で注目されているタンパク質である。このことから、本研究成果は様々な研究に波及することが期待される。例えば、細胞に取り込まれやすい薬剤分子の設計や、その動態シミュレーションに役立つと考えられる。生物工学の分野では、アミノ酸改変によって FABP のリガンド選択性や結合力を人為的に変える試みや、薬剤分子のキャリアとしての FABP の利用が進むことも期待できる。また、本研究で利用したハイスループット測定法は脂溶性リガンドの探索に適していることから、この手法は脂溶性分子をリガンドとする様々なタンパク質（例えば、細胞内レチノイン酸結合タンパク質や核内受容体）の評価に利用できる可能性がある。