

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06915

研究課題名(和文) 食欲抑制作用を示すN-アシルエタノールアミンの生合成・生理機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of anorexic N-acylethanolamine

研究代表者

宇山 徹 (Uyama, Toru)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30457337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：N-アシル-ホスファチジルエタノールアミン(N-アシル-PE)は生体膜を構成するリン脂質であり、微量ながら様々な細胞で合成される。また、N-アシル-PEは脂質メディエーターとして知られるN-アシルエタノールアミンの前駆体としても機能する。本研究では、最近、N-アシル-PEを合成するN-アシル転移酵素として同定された細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA2 またはPLA2G4E)の機能解析を細胞および個体レベルで行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

N-アシルエタノールアミンは食欲抑制や抗炎症作用などの多様な生物活性を示す。N-アシルエタノールアミンがどのように合成されるかを理解することで、食欲や炎症などを調節することが可能になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：N-Acylphosphatidylethanolamine (N-acyl-PE) is a phospholipid present in biomembrane and functions as a precursor of bioactive N-acylethanolamines. Recently, the isoform of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2, also known as PLA2G4E) was identified as Ca²⁺-dependent N-acyltransferase. In this study, we analyzed biological roles of cPLA2.

研究分野：脂質生化学

キーワード：cPLA2 PLA2G4E N-アシル-PE N-アシルエタノールアミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

N-アシルエタノールアミンは多様な生理機能をもつ脂質メディエーターであり、動植物組織中に普遍的に存在している。これらの多彩な機能は結合している脂肪酸の違いに由来しており、脂肪酸の鎖長や不飽和度に応じて異なる受容体にリガンドとして作用する。例えば、アラキドン酸が結合した *N*-アラキドニールエタノールアミン (別名アナндаミド) はカンナビノイド受容体 CB1 の内因性リガンドとして機能し、オレイン酸が結合した *N*-オレオイルエタノールアミンは、核内受容体 PPAR に作用することで生理機能を発揮する。このように脂肪酸の違いによって特徴的な挙動を示す *N*-アシルエタノールアミンの生理機能発現は、生合成段階、特にそれに関わる酵素によって厳密に制御されていると考えられる。

N-アシルエタノールアミンは主として二段階の酵素反応によって生成し、第一段階では *N*-アシル転移酵素によってホスファチジルエタノールアミン (PE) にアシル基が転移されることで *N*-アシル-PE と呼ばれる特殊なグリセロリン脂質が合成される。その後、NAPE-PLD と呼ばれるホスホリパーゼ D 型酵素が *N*-アシル-PE に作用することで *N*-アシルエタノールアミンが生じる。しかしながら、生体内においてこれらの酵素の内、どれがどの程度 *N*-アシルエタノールアミン生合成を制御しているのかについては依然として不明であり、結合している脂肪酸の違いによって異なる生理機能を発揮する *N*-アシルエタノールアミン分子種のそれぞれが生体の必要に応じて供給される分子基盤はほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

N-アシルエタノールアミンは脂肪酸とエタノールアミンが結合した脂質メディエーターであり、結合している脂肪酸の種類によって異なる受容体に作用し、多様な生理機能を発揮する。中でもオレイン酸が結合した *N*-オレオイルエタノールアミンは、核内受容体である PPAR に作用することで食欲抑制作用を示す。興味深いことに、同脂質分子の含量は小腸でダイナミックに変動し、絶食時には極めて低い量に維持されている一方で、摂食時には著増し、PPAR を介して飽満感を動物に与え、その後の摂食を抑制する。このように特徴的な変動を示す同脂質分子の生理機能発現は、生合成に関わる酵素によって厳密に制御されていると考えられるが、その責任酵素は不明である。これより本研究の目的は、*N*-アシルエタノールアミン生合成の律速酵素と考えられる *N*-アシル転移酵素に焦点を当て、その機能発現のメカニズムを解析することとする。また、摂食行動との関連が深い *N*-オレオイルエタノールアミンの生合成機構と生理機能を個体レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) FLAG タグを付加した cPLA₂ を安定に発現する HEK293 細胞 (cPLA₂ 発現細胞) を樹立した。siRNA によって同細胞中のホスファチジルセリン (PS) の合成酵素を抑制し、種々の検討に用いた。放射標識脂肪酸などで cPLA₂ 発現細胞を代謝ラベルし、総脂質を Bligh & Dyer 法によって抽出後、薄層クロマトグラフィーで脂質分子の組成を解析した。cPLA₂ 発現細胞から cPLA₂ を抗 FLAG 抗体が結合したアフィニティーカラムで精製することで不純物を除き、高度精製組換えタンパク質を調製した。本酵素を用いて cPLA₂ の酵素活性を種々のリン脂質の存在下で検討した。

(2) cPLA₂ 発現細胞を放射標識脂肪酸などで代謝ラベルし、総脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィーで脂質分子の組成を解析した。併せて、非放射標識脂質抽出物を LC-MS/MS によって分析した。Ca²⁺の刺激を解析するため、イオノマイシンによって処理した。

(3) 野生型及び cPLA₂ 欠損マウスの脳を単離し、cPLA₂ の発現部位や性状解析を行った。野生型及び cPLA₂ 欠損マウスを脳虚血モデルに供し、脂質分子を液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー (LC-MS/MS) によって分析した。

4. 研究成果

(1) 樹立した cPLA₂ 発現細胞において PS を合成する酵素の発現を siRNA によってノックダウンすると、抑制の程度に応じて cPLA₂ の細胞内含量がタンパク質レベルで有意に減少した。また、共焦点レーザー顕微鏡の解析より、コントロール siRNA で処理した細胞では cPLA₂ が形質膜や細胞内小胞に局在していたが、PS 合成を抑制した細胞では cPLA₂ の細胞内小胞での局在は減少し、主に形質膜に局在していた。精製した組換え cPLA₂ に対する種々の酸性リン脂質の効果を検討したところ、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸やホスファチジン酸などは PS と同様に cPLA₂ の酵素活性を上昇させた。以上の結果から、cPLA₂ は細胞内においても PS によって制御されており、PS 以外の酸性リン脂質も同分子の制御に関与する可能性が示された。

(2) Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンによって cPLA_2 発現細胞を処理すると、*N*-アシル-PE がコントロール細胞と比較して 13 倍以上にまで増加した。LC-MS/MS による分析より、*N*-アシル基に飽和または一価不飽和脂肪酸を含む *N*-アシル-PE が著増していた。これと並行して、*sn*-2 位に多く存在する多価不飽和脂肪酸を含むリゾリン脂質が増加していたことから、 cPLA_2 は主としてリン脂質の *sn*-1 位の脂肪酸を PE に転移していることが示唆された。また、*N*-アシルエタノールアミンも 17 倍以上増加しており、そのアシル基組成は *N*-アシル-PE と同様の傾向を示した。以上の結果から、ヒト cPLA_2 は Ca^{2+} 依存的に主としてリン脂質の *sn*-1 位に結合している飽和および一価不飽和脂肪酸を転移して *N*-アシル-PE を生成し、その一部が *N*-アシルエタノールアミンの生成に用いられることが示唆された。

(3) cPLA_2 欠損マウスの脳のホモジネートを用いて、 Ca^{2+} 依存的 *N*-アシル転移酵素を測定したところ、活性は消失していた。次に、質量分析による脂質組成解析から、*N*-アシル-PE や *N*-アシルエタノールアミンが有意に減少していることが明らかとなった。これより、 cPLA_2 は脳において *N*-アシル-PE を合成する主要な酵素であることが明らかとなった。次に、脳虚血モデルにおいて、野生型マウスでは *N*-アシル-PE と *N*-アシルエタノールアミンが著しく増加していたが、 cPLA_2 欠損マウスではほとんど変化が見られなかった。これより、虚血部位で著増する *N*-アシル-PE と *N*-アシルエタノールアミンは主として cPLA_2 によって合成されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Smriti Sultana Binte Mustafiz, Toru Uyama, Katsuya Morito, Naoko Takahashi, Katsuhisa Kawai, Zahir Hussain, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, Kei Yamamoto, Tamotsu Tanaka, and Natsuo Ueda	4. 巻 1864
2. 論文標題 Intracellular Ca ²⁺ -Dependent Formation of N-Acyl-phosphatidylethanolamines by Human Cytosolic Phospholipase A2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.158515	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 宇山 徹、上田 夏生	4. 巻 269
2. 論文標題 アナンダミドとN-アシルエタノールアミンの代謝と疾患制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1015-1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Smriti Sultana Binte Mustafiz, Toru Uyama, Zahir Hussain, Katsuhisa Kawai, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, and Natsuo Ueda	4. 巻 165
2. 論文標題 The role of intracellular anionic phospholipids in the production of N-acyl-phosphatidylethanolamines by cytosolic phospholipase A2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 343-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuhito Tsuboi, Toru Uyama, Yasuo Okamoto, and Natsuo Ueda	4. 巻 38
2. 論文標題 Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-018-0086-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宇山 徹、上田 夏生	4. 巻 58
2. 論文標題 明らかになり始めた生理活性脂質N-アシルエタノールアミンの生合成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 599-605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坪井 一人、宇山 徹、上田 夏生	4. 巻 92
2. 論文標題 N-アシルエタノールアミンの機能と生合成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学666	6. 最初と最後の頁 666 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Toru Uyama, Zahir Hussain, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Katsuhisa Kawai, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, and Natsuo Ueda
2. 発表標題 Anionic phospholipids enhance the production of N-acyl-phosphatidylethanolamines by cytosolic phospholipase A2
3. 学会等名 Gordon Research Conferences: Cannabinoid Function in the CNS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Uyama, Zahir Hussain, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Katsuhisa Kawai, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, and Natsuo Ueda
2. 発表標題 Anionic phospholipids facilitate the formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines by cytosolic phospholipase A2
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇山 徹, Smriti Sultana Binte Mustafiz, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Zahir Hussain, 坪井一人, 荒木伸一, 山本 圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 cPLA2 によるN-アシル-ホスファチジルエタノールアミンの細胞内カルシウム依存的な生成
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇山 徹, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Zahir Hussain, 川合克久, 坪井一人, 荒木伸一, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシルエタノールアミンの生成に関わるcPLA2 の酸性リン脂質による制御
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda
2. 発表標題 Characterization of cytosolic phospholipase A2 ;: phosphatidylserine-stimulated production of N-acyl-phosphatidylethanolamine
3. 学会等名 28th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda
2. 発表標題 Analyses of Purified Cytosolic Phospholipase A2 ; from Humans and Mice Reveal the Stimulatory Effect of Phosphatidylserine
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda
2. 発表標題 enhancement of Cytosolic Phospholipase A2 ; -catalyzed Formation of N-Acyl-phosphatidylethanolamine by Phosphatidylserine
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda
2. 発表標題 Analyses of Purified Cytosolic Phospholipase A2 ; from Humans and Mice Reveal the Stimulatory Effect of Phosphatidylserine
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Uyama, Smriti Sultana Binte Mustafiz, Katsuya Morito, Naoko Takahashi, Katsuhisa Kawai, Zahir Hussain, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, Kei Yamamoto, Tamotsu Tanaka, and Natsuo Ueda
2. 発表標題 Phospholipid species used for the Ca ²⁺ -dependent formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine by cPLA2
3. 学会等名 30th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山 徹, Smriti Sultana Binte Mustafiz, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Zahir Hussain, 坪井一人, 荒木伸一, 山本 圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシル-ホスファチジルエタノールアミンの生成におけるcPLA2 の細胞内基質の検討
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山 徹, Smriti Sultana Binte Mustafiz, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Zahir Hussain, 坪井一人, 荒木伸一, 山本 圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 バイオファクターであるN-アシルエタノールアミンの生合成に関わるcPLA2 の機能解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山 徹, Zahir Hussain, 森戸克弥, 田中 保, 太田健一, 上野正樹, 村上 誠, 上田夏生
2. 発表標題 脳虚血モデルでのN-アシル-ホスファチジルエタノールアミンの蓄積はcPLA2 によって引き起こされる
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

香川大学医学部生体分子医学講座生化学 http://www.kms.ac.jp/~biochem/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------