

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790060

研究課題名 (和文) 酸化リン脂質分解酵素による生理活性脂質の産生・作用機構の解明

研究課題名 (英文) Physiological role of PAFAH2, an oxidized phospholipid-hydrolyzing enzyme and PAFAH2-derived bioactive lipids

研究代表者

河野 望 (KONO NOZOMU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：50451852

研究成果の概要 (和文)：本研究において、以下の結果が得られた。

- (1) PRDX2 や SCD2 など、PAFAH2 と結合する分子を同定した。
- (2) PAFAH2 の DTNB 感受性を担うアミノ酸残基として、種間で保存性の高い Cys83 を同定し、Cys83 が修飾されることにより PAFAH2 の活性が制御されることが示唆された。
- (3) PAFAH2 の膜移行を細胞染色により検出する実験系を構築した。
- (4) PAFAH2 欠損マウスはマスト細胞の脱顆粒不全により即時型アレルギー反応が減弱することを明らかにした。
- (5) PAFAH2 欠損マウスから得た骨髓由来培養マスト細胞は IgE 依存的脱顆粒反応が減弱することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we obtained following results:

- (1) Using immunoprecipitation coupled with mass spectrometry, several PAFAH2-interacting proteins including PRDX2 and SCP2 were identified.
- (2) From mutational analysis of PAFAH2, Cys-83 was found to be the only residue conferring sensitivity of PAFAH2 to DTNB, suggesting that PAFAH2 activity can be regulated by modification of Cys-83.
- (3) An immunocytochemical assay to detect the translocation of PAFAH2 from cytosol to membrane was established.
- (4) PAFAH2-deficient mice exhibited reduced PCA reaction most probably by impaired mast cell degranulation.
- (5) Bone marrow-derived mast cells from PAFAH2-deficient mice also showed decreased IgE-dependent degranulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：PAF-AH、酸化リン脂質

1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成するリン脂質には2本の脂肪酸鎖が結合しており、グリセロール骨格の1位には飽和脂肪酸、2位にはリノール酸やアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸が結合している。

炎症や虚血等の病態時に活性酸素が産生されると、リン脂質の高度不飽和脂肪酸鎖は酸化され「酸化リン脂質」を生成する。酸化リン脂質は、生体膜の透過性上昇や膜タンパク質の機能低下を引き起こし、生体に悪影響を及ぼす。アラキドン酸のような高度不飽和脂肪酸鎖が活性酸素により非酵素的に酸化されると、様々な脂肪酸酸化物が生成するが、その中にはイソプロスタン鎖のような酸化脂肪酸鎖も生成する。近年、遊離型のイソプロスタンには血管収縮、TGF β 産生促進などの生理活性があることが報告され、酸化脂肪酸の新たな生理機能あるいは毒性発現機構として注目されている。

このような酸化脂肪酸はリン脂質に結合したままでは生理活性を示さず、膜リン脂質から切り離され遊離型とならなければならない。II型PAFアセチルヒドロラーゼ(PAFAH2)は、生理活性脂質であるPAFのアセチル基を加水分解する酵素として申請者のグループが精製・クローニングに成功し、この酵素がPAFのみならず酸化リン脂質の酸化脂肪酸鎖も選択的に加水分解するホスホリパーゼA2であることが判明した。

我々は、最近PAFAH2のノックアウト(KO)マウスを作製し、四塩化炭素投与により誘導した急性肝障害からの回復が有意に遅延することを明らかにした(*J. Biol. Chem.* (2008) 283, 1628-1636)。さらに興味深いことに、四塩化炭素処理したKOマウスの肝臓では、リン脂質結合型のイソプロスタンが野生型に比べて顕著に増加していることを見出した。以上のことから、酸素ストレス下に生じたリン脂質結合型のイソプロスタンがPAFAH2により加水分解され、遊離型イソプロスタンを生成していることが示された。すなわち、PAF-AH2は、生体膜中に生じた酸化リン脂質を選択的に加水分解するとともに、生理活性を有する酸化脂肪酸を生成する酵素であることが示唆された。プロスタグランジン等の酵素的に産生される生理活性脂質は、刺激に応じてアラキドン酸が膜リン脂質から切り出されてから合成される。一方、イソプロスタンは酸化ストレスによりリン脂質内で生成してから切り出され、その生成過程は対照的である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が作製したPAF-AH2 KO

マウス、および培養細胞を用いて、活性酸素により非酵素的に産生される「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の産生経路および作用機構を分子レベルで解明することを目指した。具体的には以下の2点について解析を行った。

(1) PAFAH2による「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の産生機構の解析

PAFAH2が細胞膜に生じた酸化リン脂質に作用するためには細胞膜に結合する必要がある。PAF-AH2はN末端がミリスチル化されており、細胞質と細胞膜の両方に存在する。申請者は、培養細胞において、酸化ストレス時にPAFAH2が細胞膜へ移行することを見出している。このような予備的知見をもとに、PAFAH2の細胞膜への移行メカニズム、活性化機構を分子レベルで解明する。

(2) PAFAH2 KOマウスを用いた「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の機能解明

PAFAH2 KOマウスの表現型解析から、PAFAH2の生理学的または病理学的役割を明らかにする。さらにPAFAH2の表現型に関わる酸化脂肪酸をマスマスペクトロメトリーにより網羅的に探索し、最終的に生理活性を持つ酸化脂肪酸の同定をめざす。

3. 研究の方法

(1) PAFAH2による「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の産生機構の解析

①PAFAH2結合因子の探索

PAFAH2と結合するタンパク質を同定するために、PAFAH2と共免疫沈降するタンパク質をLC-MS/MSにより探索した。

②PAFAH2の活性制御機構の解析

PAFAH2は酸化によって失活しやすい特性を持つことから、PAFAH2中のシステイン残基の活性に対する影響を検討した。

③PAFAH2の刺激依存的な膜移行を検出する実験系の確立

PAFAH2の刺激依存的な膜移行を解析するために、細胞染色で膜移行を評価できる実験系を検討した。

(2) PAF-AH2 KOマウスを用いた「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の機能解明

①PAFAH2 KOマウスの表現型解析

PAFAH2の生理機能を明らかにするために、PAFAH2 KOマウスの表現型を探索した。

①PAFAH2の培養細胞を用いた機能解析

PAFAH2 KOマウスの表現型を再現する培養細胞モデルの構築と脂質解析を行った。

4. 研究成果

(1) PAFAH2 による「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の産生機構の解析

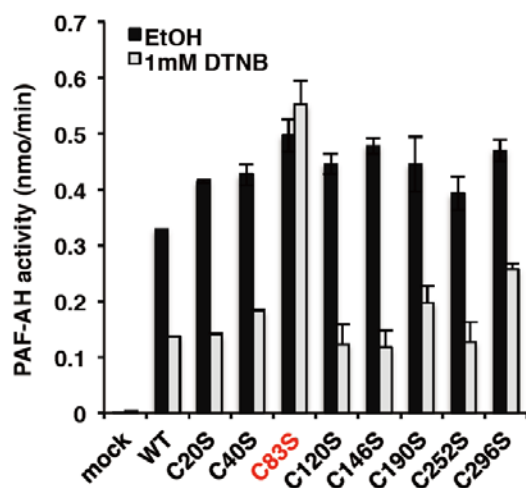
①PAFAH2 結合因子の探索

PAFAH2 は 40kDa の単量体酵素であり、これまでに他のタンパク質との相互作用は全く知られていない。PAFAH2 の作用機構解明の手がかりとして PAFAH2 と相互作用するタンパク質の同定を試みた。Flag タグを付加した PAFAH2 を 293 細胞に発現させ、Flag タグによる免疫沈降を行い、共沈降物を LC-MS/MS により網羅的に解析した。その結果、PAFAH2 と相互作用する 17 のタンパク質を同定した。その中には抗酸化作用をもつタンパク質である PRDX2 や脂質結合蛋白質である SCP2 などが含まれており、これらのタンパク質と協調して PAFAH2 が機能していることが考えられた。

②PAFAH2 の活性制御機構の解析

PAFAH2 は酸化によって失活しやすい特性を持つことが PAFAH2 の精製過程で明らかとなっていた。タンパク質中のシステイン残基は酸化により修飾を受けることが知られていることから、PAFAH2 中のシステイン残基が酸化により修飾を受け、活性に影響を与えていることが考えられた。そこで、PAFAH2 の活性に影響を与えるシステイン残基の同定を試みた。

まず、PAFAH2 を過剰発現させた HeLa 細胞を酵素源とし、その PAF 分解活性 (PAF-AH 活性) に対するシステイン修飾試薬 DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) の効果を調べたところ、DTNB 存在下では PAF-AH 活性の著しい低下がみられた (図 1)。



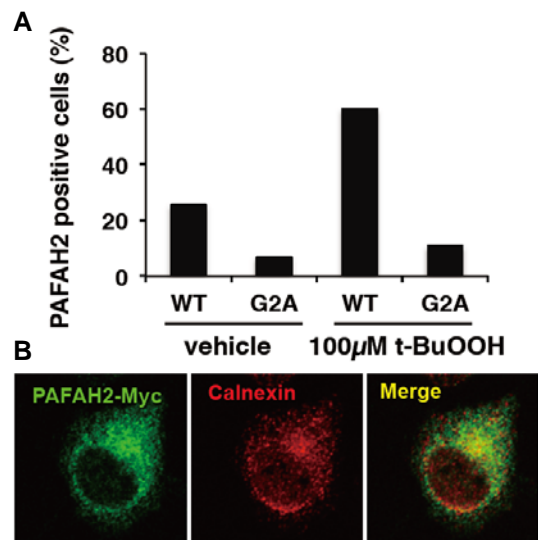
【図 1】 PAFAH2 の DTNB 感受性を担う Cys 残基の同定 PAFAH2 を過剰発現した HeLa 細胞を酵素源とし、PAFAH2 の活性を [3H]PAF の分解活性により評価した。

そこで、種間で高度に保存されている PAFAH2 の 8 個のシステイン残基をセリン残基に置換した変異型 PAFAH2 を作成し、それらの DTNB 感受性を調べた。その結果、83 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した PAFAH2-C83S のみで DTNB に対する感受性が解除された。また興味深いことに、PAFAH2-C83S は野生型 PAFAH2 と同等の活性を示した (図 1)。すなわち、PAFAH2 の 83 番目のシステイン残基は PAFAH2 の活性には必須ではないが、修飾されることにより PAFAH2 の活性を制御していることが明らかとなった。

またリコンビナント PAFAH2 を過酸化水素とインキュベーションすることによりシステインの酸化を誘導しても、PAFAH2 の活性には影響を与えなかった。一方、酸化型グルタチオンは DTNB と同様に PAFAH2 の活性を抑制することが分かった。これらのことから、PAFAH2 の 83 番目のシステイン残基に比較的高い分子が結合することが、PAFAH2 の活性抑制を引き起こすことが示唆された。

③PAFAH2 の刺激依存的な膜移行を検出する実験系の確立

PAFAH2 は細胞質と細胞膜の両方に存在しており、酸化ストレスなどの刺激により、膜移行することが明らかとなっている。これまでの膜移行の評価は細胞分画による生化学的手法であったため、PAFAH2 の刺激依存的な膜移行を担うドメインやアミノ酸などを解析するには不向きであった。そこで、細胞染色で膜移行を評価できる実験系を検討した。その結果、サポニンにより膜透過処理を行った後に固定し、細胞染色を行うことにより、細胞質に存在する PAFAH2 を除き、膜に



【図 2】 PAFAH2 膜移行の細胞染色による検出 A, PAFAH2 の膜移行を示した細胞の割合。B, 膜透過後固定による染色法により検出された PAFAH2 の細胞内局在。

局在している PAFAH2 を検出することに成功した。

上記の染色法と通常の染色法（固定後に膜透過）を用いて、PAFAH2 が膜局在を示した細胞の割合を評価したところ、酸化ストレス刺激（t-BuOOH 処理）により PAFAH2 が膜局在を示した細胞の割合の増加がみられた。さらにこの増加が PAFAH2 の N 末端のミリスチン酸修飾が起こらない G2A 変異体ではみられなかった（図 2 A）。また、膜局在を示した PAFAH2 は小胞体局在タンパク質であるカルネキシンと一部共局在し、小胞体様の局在を示した（図 2 B）。

このように、PAFAH2 の刺激依存的な膜移行を細胞染色により検出する実験系を確立することができた。この系を用いることで、PAFAH2 の刺激依存的な膜移行を担うドメインやアミノ酸などが同定でき、PAFAH2 の活性化の詳細なメカニズムが明らかになると期待される。

(2) PAF-AH2 KOマウスを用いた「生理活性を持つ酸化脂肪酸」の機能解明

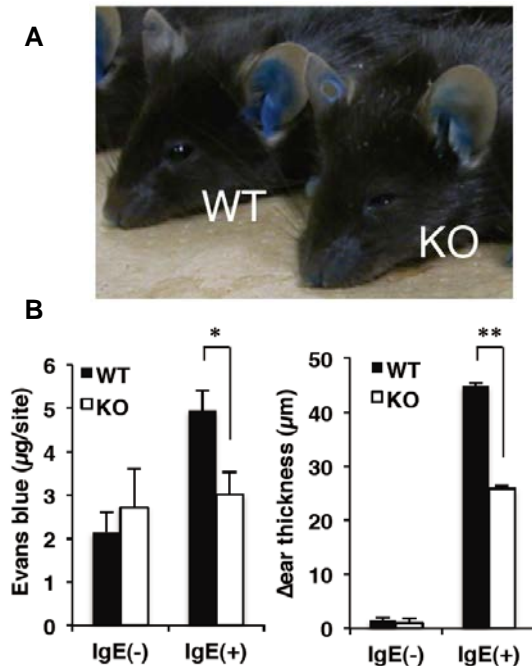
①PAFAH2 KO マウスの表現型解析

PAFAH2 は主に上皮細胞に発現していることを見出している。PAFAH2 のマウスにおける発現をさらに詳しく調べた結果、マスト細胞に高く発現がしていることを見出した。そこで、マスト細胞における PAFAH2 の機能を調べるために、即時型アレルギー反応のモデルである皮膚受動アナフィラキシー (PCA) 反応を行った。その結果、PAFAH2 KO マウスでは PCA による耳介への色素漏出、耳介の肥厚の顕著な抑制がみられ、即時型アレルギー反応が抑制されていることがあきらかとなった（図 3）。耳介のマスト細胞の組織切片を観察したところ、PAFAH2 KO マウスのマスト細胞数は野生型マウスと同等であったが、PCA 反応時に脱顆粒しているマスト細胞の割合が KO で顕著に抑制されていた。これらの結果から、PAFAH2 はマスト細胞に発現しており、マスト細胞の脱顆粒反応に重要な役割をしていることが示唆された。

②PAFAH2 の培養細胞を用いた機能解析

培養細胞において、PAFAH2 KO マウスの表現型が再現できるか、骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) を用いた解析を行った。野生型マウス、PAFAH2 KO マウスの BMMC を調製し、IgE-抗原依存的な脱顆粒反応を β -ヘキソサミニダーゼの放出により評価したところ、PAFAH2 KO マウス由来の BMMC では野生型マウス由来の BMMC に比べ IgE-抗原依存的な β -ヘキソサミニダーゼの放出が減弱していることが明らかになった。すなわち、培養マスト細胞においても、脱顆粒反応における PAFAH2 の機能が再現できた。そこで、IgE-抗原刺激した

BMMC から酸化脂肪酸を抽出し、網羅的なメタボローム解析を行うことで、PAFAH2 依存的に産生される酸化脂肪酸の探索を行った。現在、野生型 BMMC と KO BMMC で差がある酸化脂肪酸の絞り込みとそれらの酸化脂肪酸の IgE-抗原刺激依存的な脱顆粒反応における効果を検討している。



【図 3】 PAFAH2 KO マウスの即時型アレルギー反応
A, 即時型アレルギー反応 (PCA 反応) による血中色素の耳介への漏出 (写真)。B, PCA 反応による色素漏出と耳介の肥厚 (グラフ)。

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 3 件)

(1) 河野 望、新井 洋由

α -TTP ノックアウトマウス

The Lipid, 22, 4-9 (2011). 査読なし

(2) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response.

Hiroyuki Ariyama, †, Nozomu Kono †, Shinji Matsuda, Takao Inoue and Hiroyuki Arai

J. Biol. Chem., 285, 22027-35 (2010).

査読有り † co-first author

(3) 河野 望、新井 洋由

リゾリン脂質と動脈硬化性疾患

The Lipid, 20, 266-276 (2009). 査読なし

〔学会発表〕(計 22 件)

(1)向井 康治朗、河野 望、新井 洋由
酸化リン脂質選択的ホスホリパーゼ PAFAH2
の活性制御
日本薬学会 第 131 年会 (2011 年 3 月 30 日、
静岡)

(2)河野 望、新井 洋由
生体膜脂肪酸組成と小胞体ストレス応答
日本薬学会 第 131 年会 (2011 年 3 月 31 日、
静岡)

(3)河野 望、佐々木 純子、佐々木 雄彦、
新井 洋由
 α -TTP を介した肝細胞内ビタミンE輸送にお
ける PIPs の役割ビタミン E の肝細胞内輸送
における PIPs の役割
第 22 回ビタミンE研究会(2011 年 1 月 28 日、
京都)

(4)Nozomu Kono, Hiroyuki Ariyama, Shinji
Matsuda, Takao Inoue & Horoyuki Arai
Decrease in Membrane Phospholipid
Unsaturation Induces Unfolded Protein
Response
ASCB 50th Annual Meeting (2010 年 12 月 14
日、フィラデルフィア)

(5)Rikuto Tanaka, Yusuke Hirata, Nozomu
Kono, Takao Inoue Eriko Nakadai Shouhei
Mitani Hiroyuki Arai
Biological significance of ire-1
activation in PUFA-depleted *C. elegans*
東京大学グローバル COE 第 3 回 疾患のケミ
カルバイオロジー教育研究拠点 リトリート
(2010 年 12 月 12 日、千葉)

(6)向井 康治朗、河野 望、新井 洋由
酸化リン脂質選択的ホスホリパーゼ PAFAH2
の活性制御
BMB2010 (2010 年 12 月 10 日、神戸)

(7)有山 博之、河野 望、松田 真治、井
上 貴雄、新井 洋由
Decrease in membrane phospholipid
unsaturation induces unfolded protein
response.
BMB2010 (2010 年 12 月 10 日、神戸)

(8)田中 陸人、平田 祐介、河野 望、井上 貴
雄、中臺 枝里子、三谷 昌平、新井 洋由
Biological significance of PUFA
depletion-activated ire-1 in *C. elegans*
BMB2010 (2010 年 12 月 10 日、神戸)

(9)平田 祐介、田中 陸人、河野 望、井上 貴
雄、有山博之、鈴木 健裕、堂前 直、安藤 恵
子、三谷 昌平、新井 洋由
線虫 *C. elegans* を用いた生体膜脂肪酸環境
の感知機構の解析
第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウ
ム (2010 年 11 月 29 日、富山)

(10)河野 望、有山 博之、松田 真治、井
上 貴雄、新井 洋由
飽和脂肪酸毒性におけるリン脂質脂肪酸組
成の関与
第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウ
ム (2010 年 11 月 29 日、富山)

(11)河野 望、新井 洋由
生体膜脂肪酸と小胞体ストレス応答
第 5 回小胞体ストレス研究会 (2010 年 10 月
29 日、東京)

(12)向井 康治朗、河野 望、新井 洋由
酸化リン脂質分解酵素 PAFAH2 の活性制御
フォーラム 2010 衛生環境トキシコロジー
(2010 年 9 月 9 日、東京)

(13)有山 博之、河野 望、松田 真治、井
上 貴雄、新井 洋由
飽和脂肪酸毒性におけるリン脂質脂肪酸組
成の関与
フォーラム 2010 衛生環境トキシコロジー
(2010 年 9 月 9 日、東京)

(14)Nozomu Kono, Umeharu Ohto, Yoshinori
Satow and Hiroyuki Arai
Alpha-Tocopherol transfer protein (α -
TTP) exerts its biological function by
binding to PIPs in liver cells
第 28 回内藤カンファレンス (2010 年 6 月
30 日、札幌)

(15)有山 博之、河野 望、新井 洋由
生体膜脂肪酸組成変化に対する応答機構の
解明
日本薬学会 第 130 年会 (2010 年 3 月 28 日、
岡山)

(16)七里 元督、河野 望、谷戸 正樹、吉
田 康一、岩橋 均、二木 鋭雄、国分 友
邦、玉井 浩、新井 洋由
抗マラリア薬クロロキンの細胞毒性に対す
るビタミンE特異的輸送蛋白質 (α -
tocopherol transfer protein; α -TTP)によ
る耐性機構の解明
第 21 回ビタミンE研究会(2010 年 1 月 22 日、
東京)

(17)河野 望、大戸 梅治、佐藤 能雅、新井 洋由
α-TTPによるビタミンEの肝細胞内輸送におけるPIPsの役割
第21回ビタミンE研究会(2010年1月22日、東京)

(18)Nozomu Kono, Umeharu Ohto, Yoshinori Satow and Hiroyuki Arai
alpha-Tocopherol transfer protein exerts its biological function by binding to PIPs in liver cells
第32回日本分子生物学会年会(2009年12月12日、横浜)

(19)有山 博之、河野 望、新井 洋由
生体膜脂肪酸組成変化に対する応答機構の解明
ファーマ・バイオフィオーラム 2009 (2009年11月14日、名古屋)

(20)中崎 康子、井上 貴雄、李 賢哲、佐々木 純子、田中 史晴、河野 望、服部 光治、小木曾 英夫、田口 良、伊藤 俊樹、佐々木 雄彦、新井 洋由
Functional analysis of lysophosphatidylinositol-specific acyltransferase, mboa-7/LPIAT in mammals
第82回日本生化学会大会(2009年10月22日、神戸)

(21)木村 真子、井上 貴雄、白江 伸一郎、河野 望、中臺 枝里子、三谷 昌平、新井 洋由
A genome-wide RNAi screen for genes required for normal development under PUFA-depleted conditions
第82回日本生化学会大会(2009年10月22日、神戸)

(22)櫻木健司、井上貴雄、原直子、河野望、安藤恵子、三谷昌平、新井洋由
グリセロ脂質 de novo 合成に関与する脂肪酸転移酵素の包括的解析
第51回脂質生化学会(2009年7月30日、名古屋)

[図書](計1件)

(1)新井 洋由・有田 誠・井上 貴雄・河野 望
創薬科学の魅力—東京大学大学院薬学系研究科からの発信—
広川書店(2010)233-246(総ページ464)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)
○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~eisei/jp/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 望 (KONO NOZOMU)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号: 50451852

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし