

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790295
 研究課題名（和文） 抗炎症脂質N-アシルエタノールアミンを代謝するリソソーム酵素の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the lysosomal enzyme metabolizing the anti-inflammatory lipid, *N*-acylethanolamine
 研究代表者
 坪井 一人（TSUBOI KAZUHITO）
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：80346642

研究成果の概要（和文）：

本研究では、抗炎症脂質 *N*-アシルエタノールアミン (NAE) の代謝酵素に関して、1) NAE を分解するリソソーム酵素である NAE 水解酸性アミダーゼ (NAAA) が、体内に存在するリン脂質やジヒドロリポ酸で活性化されることを明らかにし、2) NAAA の新規阻害剤を見出し、3) 癌抑制遺伝子群である HRASLS ファミリーに属する HRASLS1 が *N*-アシル転移活性を介して NAE の生合成に関わる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we analyzed enzymes metabolizing the anti-inflammatory lipid, *N*-acylethanolamine (NAE). We found that NAE-hydrolyzing acid amidase (NAAA), a lysosomal enzyme degrading NAEs, is activated by endogenous substances such as some phospholipids and dihydrolipoic acid and that several lipophilic amines are new inhibitors of NAAA. Furthermore, we suggested that HRASLS1, a member of the tumor suppressor HRASLS family, is involved in NAE biosynthesis by its *N*-acyltransferase activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：脂質、酵素、生理活性、生体分子

1. 研究開始当初の背景

N-アシルエタノールアミン (NAE) は長鎖脂肪酸のエタノールアミドの総称であり、動物組織中に微量ではあるが普遍的に存在する一群の脂質メディエーターである (Schmid, *et al.*, Prog. Lipid Res., 29, 1-43 (1990)).

このうち、脂肪酸部分がアラキドン酸であるアナンダミドは、カンナビノイド受容体の内因性リガンドとして報告され (Devane, *et al.*, Science, 258, 1946-49 (1992))、自発運動の低下、痛みの感受性低下、体温低下、カタレプシー誘発などのマリファナ様生物活性を示す (Fowler, *et al.*, Pharmacol.

Biochem. Behav., 81, 248-62 (2005))。また、パルミトイルエタノールアミドなどの飽和脂肪酸含有 NAE やオレオイルエタノールアミドのようなモノエン脂肪酸含有 NAE についても、カンナビノイド受容体には結合しないが、抗炎症や鎮痛・食欲抑制などの生物活性を有する。しかも、NAE が虚血時や炎症時に障害組織で著しく増加することから、その病態生理学的意義も注目されている。

NAE の生体内レベルは、合成速度と分解速度により決定される。NAE の分解経路については、脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) による脂肪酸とエタノールアミンへの加水分解が旧来から知られていて、解析が進んでいる。FAAH は中性-弱アルカリ性で機能し、小胞体等の膜面分に局在していると考えられている。一方、研究代表者は同一の分解反応をもつばら酸性領域で触媒する「NAE 水解酸性アミダーゼ (NAAA)」の遺伝子クローニングに成功し (Tsuboi, *et al.*, J. Biol. Chem., 280, 11082-92 (2005))、本酵素がマクロファージで豊富に発現する新規リソソーム酵素であることを明らかにした (Tsuboi, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1771, 623-32 (2007))。さらに研究代表者はプロセシングによる本酵素の活性化機構や糖鎖結合部位等の解析を行い成果を得た (Zhao, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1771, 1397-405 (2007); Wang, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1781, 710-17 (2008))。しかしながら、生体内における活性化機構には不明な点が多く、また強力な選択的阻害剤が未開発なため、その生理的役割についてはほとんど分かっていなかった。

一方、NAE の主たる生合成経路においては、(1) グリセリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基にアシル基を転移する *N*-アシル転移酵素と、(2) 特異的なホスホリパーゼ D (NAPE-PLD) が順次作用する。研究代表者のグループは、第二段階を触媒する NAPE-PLD の遺伝子クローニングに世界に先駆けて成功し (Okamoto, *et al.*, J. Biol. Chem., 279, 5298-305 (2004))、その後、がん抑制遺伝子群 HRASLS ファミリーに属する HRASLS5 が第一段階を触媒する *N*-アシル転移酵素として機能することを報告している (Jin, *et al.*, J. Biol. Chem., 282, 3614-23 (2007))。しかしながら、本ファミリーの他のメンバー、すなわち HRASLS1-4 が、*N*-アシル転移活性などのリン脂質代謝活性を持ち、NAE の生合成に関わるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、(1) NAAA の生理的役割と生体内における活性化機構を解明するために内

因性の活性促進物質を明らかにすること、(2) 本酵素の強力な選択的阻害剤を開発すること、(3) がん抑制遺伝子群 HRASLS ファミリーのメンバー HRASLS1-4 が、リン脂質代謝酵素として機能して NAE の生合成に関わるかどうか明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) NAAA 活性の測定時には活性化剤として、従来より Triton X-100 や Nonidet P-40 などの非イオン性界面活性剤と、チオール化合物であるジチオスレイトールとが組み合わせて用いられてきた。これらの人工的な化合物を代替する内因性物質の候補として、種々のリン脂質やチオール化合物について、NAAA 活性の促進効果を指標としてスクリーニングを行った。NAAA 標品としては、ラット NAAA を強制発現させた HEK293 細胞の顆粒画分を凍結融解し、可溶化された画分を用いた。酵素反応は、 $[^{14}\text{C}]$ パルミトイルエタノールアミドを基質として用い、 37°C で 30 分間行った。反応終了後に基質と反応産物の $[^{14}\text{C}]$ パルミチン酸を薄層クロマトグラフィーで分離し、画像解析装置 BAS1500 で放射活性を定量した。

さらに、NAAA が、同一の反応を触媒する FAAH が欠損すると生体内で代償的に誘導されるか否かという観点から NAAA の生理的役割を検討する目的で、FAAH 欠損マウスの種々の臓器における NAAA の発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法によって検討した (米国スクリプス研究所の Cravatt 教授との共同研究)。

(2) NAAA 阻害剤の候補化合物として、単純な長鎖アルキルアミンや、エステルあるいはエーテル結合をアルキル鎖に導入した長鎖アミンを神戸薬科大学との共同研究で有機合成した。次に、これらの脂溶性アミン化合物の NAAA や FAAH に対する阻害活性を検討した。NAAA 標品としては、ラット肺の顆粒画分を凍結融解し、可溶化された画分を用いた。FAAH 標品としては、ラット肝臓のミクロソーム画分を 1% Triton X-100 で可溶化した画分を用いた。酵素反応と活性の定量は (1) と同様の方法で行った。

(3) FLAG タグを付加したヒト HRASLS1 を COS-7 細胞に強制発現させ、抗 FLAG M2 アフィニティーカラムを用いて細胞質画分から精製組換えタンパク質を調製した。ホスホリパーゼ A_1 (PLA₁) および A_2 (PLA₂) 活性は、 ^{14}C で放射標識したホスファチジルコリン (PC) や PE を基質として用いて測定した。*N*-アシル転移活性は $[^{14}\text{C}]$ PC をアシル基供与体基質、非標識 PE をアシル基受容体基質として用い、*N*- $[^{14}\text{C}]$ アシル-PE を生成する活性を測定した。

O-アシル転移活性は非標識PCをアシル基供与体基質、 $[^{14}\text{C}]$ リゾPCをアシル基受容体基質として用い、 $[^{14}\text{C}]$ PCを生成する活性を測定した。また、ヒト組織におけるmRNAの発現分布はRT-PCR法によって検討した。

4. 研究成果

(1) NAAA 活性を促進する内因性物質として、PE、PC やスフィンゴミエンといった、コリンあるいはエタノールアミンを含有するリン脂質を見出した。PC による促進効果は濃度依存的であり、1 mM の PC によって NAAA 活性は 6.6 倍に上昇した。また、種々の内因性チオール化合物のうち、ジヒドロリポ酸がジチオスレイトールの効果を代替することが判明した。ジヒドロリポ酸は 0.1~1 mM で NAAA 活性を 8.5~9.0 倍に促進し、そのうち 0.03~0.3 mM における促進効果は同濃度のジチオスレイトールより高かった。これらの結果から、上記のリン脂質やジヒドロリポ酸がリソソーム内での NAAA の活性化に貢献する可能性が初めて示唆された。また、FAAH 欠損マウスの種々の臓器における NAAA mRNA の発現レベルは、野生型と差は見られず、当該欠損マウスにおける NAAA の代償的な発現上昇は認められなかった。

今後は NAAA 以外のリソソーム酵素に関しても上記のリン脂質やジヒドロリポ酸で活性が促進されるか検討の予定である。

(2) NAAA の阻害剤として脂溶性アミンであるペンタデシルアミンやトリデシル 2-アミノ酢酸を見出した。50%阻害濃度はそれぞれ 5.7 μM と 11.8 μM であった。基質濃度を変化させて Lineweaver-Burk プロットを行うことで両化合物の阻害様式を解析したところ、競合的であることが判明した。両化合物ともに、FAAH に対する阻害活性はほとんど認められなかった。炭素鎖長の異なるアナログでは阻害効果が低下したことから、阻害に適した炭素鎖長があることが分かった。両化合物は、さらに阻害活性の強い特異的阻害剤を開発する際の骨格として有用であり、今後も開発を進めたい。

(3) HRASLS1 の脂質代謝活性を検討したところ、PC および PE から脂肪酸を Ca^{2+} 非依存的に遊離させる PLA_1 および PLA_2 活性が検出された。また、 PLA_1 活性の方が PLA_2 活性よりも優位であった。PC をアシル基供与体とするアシル基転移活性を検討したところ、リゾPCの水酸基への O-アシル転移活性と PE のアミノ基への N-アシル転移活性の両者が認められた。これらの転移活性はアシルCoA 非依存的であった。ヒト組織においては、精巣および骨格筋で強い mRNA 発現が認められた。

これまでの知見と併せると、HRASLS1 を含む HRASLS ファミリー・メンバーの全てがグリセロリン脂質代謝活性を有することが明らかとなり、同ファミリーは新しい脂質代謝酵素群であることが明らかとなった。さらに、同酵素群が、その N-アシル転移活性により NAE の生合成に関わる可能性が示唆された。

今後は、HRASLS ファミリーのメンバーの N-アシル転移活性が実際に NAE の生合成に関わるか、細胞レベルや個体レベルといった、より生理的なモデルを用いて検討したい。

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 12 件)

1. Uyama, T., Ichi, I., Kono, N. Inoue, A., Tsuboi, K., Jin, X.-H., Araki, N., Aoki, J., Arai, H., and Ueda, N. Regulation of peroxisomal lipid metabolism by catalytic activity of tumor suppressor H-rev107. *Journal of Biological Chemistry* 287: 2706-2718, 2012. 査読有
2. Tai, T., Tsuboi, K., Uyama, T., Masuda, K., Cravatt, B. F., Houchi, H., and Ueda, N. Endogenous molecules stimulating N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *ACS Chemical Neuroscience*, DOI: 10.1021/cn300007s, 2012. 査読有
3. Yamano, Y., Tsuboi, K., Hozaki, Y., Takahashi, K., Jin, X.-H., Ueda, N., and Wada, A. Lipophilic amines as potent inhibitors of N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20:3658-3665, 2012. 査読有
4. Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., and Ohnishi, T. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *BioFactors* 37: 1-7, 2011. 査読有
5. Wellner, N., Tsuboi, K., Madsen, A. N., Holst, B., Diep, T. A., Nakao, M., Tokumura, A., Burns, M. P., Deutsch, D. G., Ueda, N., and Hansen, H. S. Studies on the anorectic effect of N-acyl phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine in mice. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811: 508-512, 2011. 査読有
6. Tsuboi, K., Okamoto, Y., Ikematsu, N., Inoue, M., Shimizu, Y., Uyama, T., Wang, J., Deutsch, D. G., Burns, M. P., Ulloa,

- N. M., Tokumura, A., and Ueda, N. Enzymatic formation of *N*-acylethanolamines from *N*-acylethanolamine plasmalogen through *N*-acylphosphatidylethanol-amine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811: 565-577, 2011. 査読有
7. Shinohara, N., Uyama, T., Jin, X.-H., Tsuboi, K., Tonai, T., Houchi, H., and Ueda, N. Enzymological analysis of the tumor suppressor A-C1 reveals a novel group of phospholipid-metabolizing enzymes. *Journal of Lipid Research* 52: 1927-1935, 2011. 査読有
 8. 坪井一人, 宇山 徹, 上田夏生. 三本鎖のリン脂質*N*-アシルホスファチジルエタノールアミンの動物組織における代謝. *生化学* 83: 485-494, 2011. 査読有
 9. 坪井一人, 上田夏生. 脂質メタボリエーターとして機能する*N*-アシルエタノールアミンの分解酵素とその阻害薬. *日本薬理学雑誌* 138: 8-12, 2011. 査読無
 10. 上田夏生, 坪井一人, 宇山 徹. 食欲抑制メタボリエーターとしてのオレオイルエタノールアミド. *ビタミン* 85: 604-607, 2011. 査読無
 11. Ueda, N., Tsuboi, K., and Uyama, T. *N*-acylethanolamine metabolism with special reference to *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Progress in Lipid Research* 49: 299-315, 2010. 査読有
 12. Ueda, N., Tsuboi, K., and Uyama, T. Enzymological studies on the biosynthesis of *N*-acylethanolamines. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801: 1274-1285, 2010. 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
1. 池松夏紀, 坪井一人, 井上愛美, 清水嘉文, 宇山 徹, 田中 保, 上田夏生, 徳村 彰. マウス全脳におけるエタノールアミン含有脂質の分子種分析と関連酵素の基質特異性解析. 第 50 回日本薬学会日本薬剤師会日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2011. 11. 13, 香川
 2. 篠原尚樹, 宇山 徹, 坪井一人, 芳地 一, 上田夏生. がん抑制遺伝子群HRASLSファミリーはリン脂質代謝酵素として機能する. 第 50 回日本薬学会日本薬剤師会日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2011. 11. 13, 香川
 3. 上田夏生, 宇山 徹, 金星華, 坪井一人, 芳地 一, 藤内武春. レシチン・レチノール・アシルトランスフェラーゼにホモロジーを示すがん抑制遺伝子HRASLSファミリー・メンバーのリン脂質代謝酵素活性. 第 332 回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 2011. 9. 30, 東京
 4. 坪井一人, 岡本安雄, 池松夏紀, 井上愛美, 清水嘉文, 宇山 徹, Dale G. Deutsch, 徳村 彰, 上田夏生. *N*-アシル化プラズマローゲンリン脂質からの*N*-アシルエタノールアミンの生合成. 第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 22, 京都
 5. 宇山 徹, 池松夏紀, 井上愛美, 篠原尚樹, 金星華, 坪井一人, 藤内武春, 徳村 彰, 上田夏生. Phospholipase A/Acyltransferase (PLA/AT) ファミリーの細胞内における*N*-アシルホスファチジルエタノールアミン生合成への関与. 第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 22, 京都
 6. Shinohara, N., Uyama, T., Jin, X.-H., Tsuboi, K., Tonai, T., Houchi, H., and Ueda, N. The tumor suppressor A-C1 has an *N*-acyltransferase activity involved in NAPE formation. 21st Annual symposium of the International Cannabinoid Research Society, 2011. 7. 6, St. Charles, IL, USA
 7. 宇山 徹, 篠原尚樹, 金星華, 坪井一人, 藤内武春, 芳地 一, 上田夏生. LRAT に相同性を示す癌抑制遺伝子群HRASLSファミリーの脂質代謝酵素活性. 日本ビタミン学会第 63 回大会, 2011. 6. 4, 広島
 8. 宇山 徹, 篠原尚樹, 金星華, 坪井一人, 藤内武春, 芳地 一, 上田夏生. 癌抑制遺伝子群HRASLSファミリー・メンバーHRASLS1 のリン脂質代謝酵素活性. 第 53 回日本脂質生化学会, 2011. 5. 12, 東京
 9. 宇山 徹, 篠原尚樹, 金星華, 坪井一人, 藤内武春, 芳地 一, 上田夏生. LRAT ファミリーに属するヒト新規脂質代謝酵素群の機能解析. 日本農芸化学会中四国支部第 29 回講演会 日本ビタミン学会中国・四国地区第 1 回講演会 合同講演会, 2011. 1. 22, 徳島
 10. 篠原尚樹, 宇山 徹, 金星華, 坪井一人, 藤内武春, 芳地 一, 上田夏生. 癌抑制遺伝子群HRASLSファミリー・メンバーA-C1 の脂質代謝酵素としての解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010. 12. 9, 兵庫
 11. Uyama, T., Jin, X.-H., Shinohara, N., Tsuboi, K., Tonai, T., and Ueda, N. Human tumor suppressors have a NAPE-forming *N*-acyltransferase

- activity. 20th Annual symposium of the International Cannabinoid Research Society, 2010.7.25, Lund, Sweden
12. 宇山 徹, 金 星華, 篠原尚樹, 坪井一人, 上田夏生. ヒト癌抑制遺伝子HRASLSファミリーの脂質代謝酵素活性の解析. 第52回日本脂質生化学会. 2010.6.14, 群馬
 13. 宇山 徹, 金 星華, 篠原尚樹, 坪井一人, 藤内武春, 上田夏生. LRATファミリーに属する4種のヒト新規脂質代謝酵素の機能解析. 日本ビタミン学会 第62回大会, 2010.6.12, 岩手
 14. Uyama, T., Jin, X.-H., Shinohara, N., Tsuboi, K., and Ueda, N. Identification of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes. Keystone Symposia: Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases, 2010.6.9, Kyoto, Japan
 15. 宇山 徹, 金 星華, 篠原尚樹, 坪井一人, 上田夏生. ヒト癌抑制遺伝子HRASLSファミリーのリン脂質代謝酵素としての同定. 第51回日本生化学会中国・四国支部例会, 2010.5.15, 山口

[その他]

ホームページ

<http://www.kms.ac.jp/~biochem/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 一人 (TSUBOI KAZUHITO)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80346642