

平成30年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08278

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子群PLA/ATファミリーの脂質代謝酵素としての生理機能解析

研究課題名(英文) Biochemical and functional analysis of PLAAT family members as lipid-metabolizing enzymes

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Phospholipase A/acyltransferase (PLAAT) ファミリーは5つの分子 (PLAAT-1-5) から構成されており、いずれも脂質代謝酵素活性を示す。本研究では、PLAAT-3がどのようにペルオキシソーム形成に関与しているかを検討した。また、3本の脂肪酸をもつ生理活性脂質であるN-アシル-ホスファチジルエタノールアミンの生合成を担うN-アシル転移酵素の性状解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase A/acyltransferase family members consist of five proteins (PLAAT-1-5) and possess lipid-metabolizing activities. In this study, we examined the role of PLAAT-3 in peroxisome metabolism. We also analyzed the N-acyltransferase involved in the biosynthesis of the rare phospholipid species, N-acylphosphatidylethanolamine.

研究分野：脂質生化学

キーワード：PLAATファミリー 脂質代謝酵素 ペルオキシソーム N-アシル-ホスファチジルエタノールアミン N-アシルエタノールアミン cPLA2 ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

Phospholipase A/acyltransferase (PLAAT) ファミリーはグリセロリン脂質を基質とする脂質代謝酵素で、PLAAT-1-5 の 5 分子が存在する (Shinohara et al., J. Lipid Res. 52, 1927-35, 2011)。これらはいずれもグリセロリン脂質から脂肪酸を遊離させるホスホリパーゼ A₁/A₂ 活性と、グリセロリン脂質からリゾリン脂質等にアシル基を転移するアシル基転移酵素活性を保有しているが、主たる酵素活性は分子間で異なる。最近の我々の研究から、PLAAT-3 (別名 H-rev107) を細胞内で過剰発現させるとペルオキシソームの消失を招くこと (Uyama et al., J. Biol. Chem. 287, 2706-18, 2012) や、PLAAT-1 や 2 が生理活性脂質である *N*-アシルエタノールアミンの生合成に関わっていることが明らかになった (Uyama et al., J. Biol. Chem. 287, 31905-19, 2012; Uyama et al., Biochim. Biophys. Acta 1831, 1690-701, 2013)。

2. 研究の目的

我々は性状未知の癌抑制遺伝子群であった PLAAT ファミリーが脂質代謝酵素であることを見出したが、これらの分子の生理機能に関しては未だほとんど不明である。PLAAT ファミリーの機能異常が癌や肥満などの疾病と深く関連している事実は、同ファミリーの基質となる内因性脂質分子の代謝異常によってこれらの疾病が誘発されている可能性を強く示唆する。本研究では、PLAAT ファミリーの脂質代謝酵素としての機能発現に焦点を当て、同ファミリーの発現を攪乱させた培養細胞を用いての内因性基質の同定、および遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの解析を展開し、同ファミリーの生理機能や疾病との関連における体系的な理解に迫る。また、最近見出した PLAAT-3 によるペルオキシソームの機能制御機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 以前に我々は、蛍光タンパク質によってペルオキシソームを可視化した細胞を樹立し、この細胞でテトラサイクリンの添加によって PLAAT-3 の発現を制御する系を構築した。本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。また、ペルオキシソーム形成に必須である Pex 分子群との相互作用を免疫沈降法で検討した。

(2) FLAG タグを付加したヒトおよびマウス cPLA_{2ε} を COS-7 細胞または HEK293 細胞で過剰発現させ、組換えタンパク質を抗 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。本組換え

タンパク質を酵素源として、性状解析を行った。また、同分子を安定発現する細胞を樹立した。放射標識脂肪酸などで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。

4. 研究成果

(1) PLAAT-3 とペルオキシソーム形成に関わる Pex 分子群との結合を調べたところ、PLAAT-3 は Pex3p および Pex19p と結合することがわかった。PLAAT-3 と Pex19p との結合を種々の変異体を用いてさらに解析したところ、PLAAT-3 の N 末端に存在する proline-rich ドメインと C 末端の疎水性ドメインが必要であり、PLAAT-3 の酵素活性には依存しなかった。さらに PLAAT-3 は、Pex19p が Pex3p や Pex11pβ のようなペルオキシソーム膜タンパク質と結合するのを酵素活性依存的に阻害した。これより、PLAAT-3 は新規 Pex19p 結合タンパク質であり、同分子のシャペロン活性を阻害することでペルオキシソームの形成を負に制御する可能性が示唆された。

(2) 我々は、PLAAT-1 や PLAAT-2 が *N*-アシル-ホスファチジルエタノールアミン (*N*-アシル-PE) と呼ばれる特殊なリン脂質を合成する *N*-アシル転移酵素活性を示すことを以前に見出した。最近、既報の細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の ε 型 (cPLA_{2ε}) が Ca²⁺ 依存的に *N*-アシル転移酵素活性を示すとして報告された。しかしながら、その詳細な性状解析は行われておらず、PLAAT-1 や PLAAT-2 との機能的な違いは不明であった。そこで本研究では、cPLA_{2ε} の精製組換えタンパク質を用い、同酵素の性状および機能解析を行った。まず、既報の cPLA_{2ε} の解析はマウスで行われたので、ヒトのオーソログについてデータベースを検索したところ、ヒトでは 2 種類のアイソフォームが存在していた。両アイソフォームの精製組換えタンパク質を用いた検討から、そのいずれもがマウス酵素と同様の活性を示すことが明らかになった。cPLA_{2ε} の一次構造には、Ca²⁺ 依存的なリン脂質への結合に関わるとされる C2 ドメインが N 末端側に存在する。種々のリン脂質による酵素活性への影響を検討したところ、Ca²⁺ 存在下でホスファチジルセリンによって強く活性化され、その効果は濃度依存的であった。以上の結果から、マウス及びヒトの cPLA_{2ε} の *N*-アシル転移酵素活性は、細胞内でホスファチジルセリンの存在下で Ca²⁺ によって制御されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Smriti Sultana Binte Mustafiz,

Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, and Natsuo Ueda

Phosphatidylserine-stimulated production of *N*-acyl-phosphatidylethanolamines by Ca^{2+} -dependent *N*-acyltransferase
Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1863, 493-502 (2018)
査読有 DOI: 10.1016/j.bbaliip.2018.02.002

Smriti Sultana Binte Mustafiz, Toru Uyama, Zahir Hussain, Kazuhito Tsuboi, and Natsuo Ueda

The Biosynthetic Pathways of *N*-acylethanolamines in Mammals
eLS, (2018)

査読有

<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a00277>
11

Zahir Hussain, Toru Uyama, Kazuhito Tsuboi, and Natsuo Ueda

Mammalian enzymes responsible for the biosynthesis of *N*-acylethanolamines
Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1862, 1546-1561, (2017)

査読有 DOI: 10.1016/j.bbaliip.2017.08.006

Toru Uyama, Kazuhito Tsuboi, and Natsuo Ueda

An involvement of phospholipase A/acyltransferase family proteins in peroxisome regulation and plasmalogen metabolism

FEBS Letters, 591, 2745-2760, (2017)

査読有 DOI: 10.1002/1873-3468.12787

Manami Inoue, Kazuhito Tsuboi, Yoko Okamoto, Mayumi Hidaka, Toru Uyama, Toshihiko Tsutsumi, Tamotsu Tanaka, Natsuo Ueda, and Akira Tokumura

Peripheral tissue levels and molecular species compositions of *N*-acyl-phosphatidylethanolamine and its metabolites in mice lacking *N*-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D

Journal of Biochemistry, 162, 449-458 (2017)

査読有 DOI: 10.1093/jb/mvx054

Yuma Sakura, Kazuhito Tsuboi, Toru Uyama, Xia Zhang, Rikiya Taoka, Mikio Sugimoto, Yoshiyuki Kakehi, and Natsuo Ueda

A quantitative study on splice variants of *N*-acylethanolamine acid amidase in human prostate cancer cells and other cells

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1861, 1951-1958 (2016)

査読有 DOI: 10.1016/j.bbaliip.2016.09.018

Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhito Tsuboi, Zahir Hussain, Ryouhei Yamashita, Yoko Okamoto, Toru Uyama, Naoshi Yamazaki, Tamotsu Tanaka, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Calcium-dependent generation of *N*-acylethanolamines and lysophosphatidic acids by glycerophosphodiesterase GDE7

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1861, 1881-1892 (2016)

査読有 DOI: 10.1016/j.bbaliip.2016.09.008

Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, and Natsuo Ueda

Comparative analyses of isoforms of the calcium-independent phosphatidylethanolamine *N*-acyltransferase PLAAT-1 in humans and mice
Journal of Lipid Research, 57, 2051-2060 (2016)

査読有 DOI: 10.1194/jlr.M071290

Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Nozomu Kono, Masahiro Watanabe, Kazuhito Tsuboi, Tomohito Inoue, Nobukazu Araki, Hiroyuki Arai, and Natsuo Ueda

Interaction of Phospholipase A/acyltransferase-3 with Pex19p: a Possible Involvement in the Downregulation of Peroxisomes
Journal of Biological Chemistry, 290, 17520-17534 (2015)

査読有 DOI: 10.1074/jbc.M114.635433

〔学会発表〕（計10件）

宇山 徹、坪井 一人、上田 夏生
脂溶性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機構
第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会合同大会・神戸（2017）

Toru Uyama, Zahir Hussain, Katsuhisa Kawai, Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda

Characterization of isoforms of the calcium-independent *N*-acyltransferase PLAAT-1 in humans and mice

27th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Montréal, Canada (2017)

Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda

Calcium-independent Generation of *N*-Acylphosphatidylethanolamines (NAPEs) by Phospholipase A/Acyltransferase-1 Isoforms in Humans and Mice

第59回日本脂質生化学会・京都（2017）

宇山 徹、Zahir Hussain、川合克久、Iffat Ara Sonia Rahman、坪井一人、荒木伸一、上田夏生
LRATファミリーに属するPLAAT-1の2つのアイソフォームの比較機能解析
日本ビタミン学会第69回大会・横浜 (2017)

Zahir Hussain, Toru Uyama, Katsuhisa Kawai, Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhiro Tsuboi, Nobukazu Araki and Natsuo Ueda
cDNA Cloning and Characterization of Long Isoform of Calcium-independent Phospholipase A/Acyltransferase-1 (PLAAT-1) that Produces N-Acyl-phosphatidylethanolamines
第58回日本生化学会中国・四国支部例会・高松 (2017)

Kazuhiro Tsuboi, Tatsuya Tai, Yoko Okamoto, Ryouhei Yamashita, Iffat Ara Sonia Rahman, Toru Uyama, Hitoshi Houchi, Tamotsu Tanaka, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda
A possible involvement of acid ceramidase in the degradation of N-acyl ethanolamines
26th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Bukovina, Poland (2016)

宇山 徹、渡邊政博、川合克久、河野 望、坪井一人、荒木伸一、新井洋由、上田夏生
PLAAT-3はPex19pを介してペルオキシソーム含量を制御する
第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会・神戸 (2015)

Kazuhiro Tsuboi, Yoko Okamoto, Iffat Ara Sonia Rahman, Toru Uyama, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda
Glycerophosphodiesterase GDE4 is a novel lysophospholipase D-type enzyme generating N-acyl ethanolamines
25th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Wolfville, Canada (2015)

宇山 徹、渡邊政博、川合克久、河野 望、坪井一人、荒木伸一、新井洋由、上田夏生
LRATに相同性を示す酵素PLA/AT-3によるペルオキシソーム形成の制御
日本ビタミン学会第67回大会・奈良 (2015)

宇山 徹、渡邊政博、川合克久、河野 望、坪井一人、荒木伸一、新井洋由、上田夏生
PLA/AT-3によるペルオキシソーム形成の制御にはPex19pが関与する
第57回日本脂質生化学会・東京 (2015)

〔図書〕(計1件)

Toru Uyama and Natsuo Ueda
Assay of NAT Activity

In Methods in Molecular Biology, 1412, Endocannabinoid Signaling (Mauro Maccarrone, ed.), Humana Press, USA., 113-122 (2016)
査読有 DOI: 10.1007/978-1-4939-3539-0_12

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

該当せず

研究者番号：

(3)連携研究者

上田 夏生 (UEDA, Natsuo)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：20193807

坪井 一人 (TSUBOI, Kazuhito)

香川大学・医学部・助教
研究者番号：80346642

(4)研究協力者

()

該当せず