

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590282
 研究課題名（和文）アナンダミドと関連脂肪酸アミド化合物の体内動態及び生理機能の解析
 研究課題名（英文）Analysis on the metabolism and physiological function of anandamide and related fatty acid amide compounds
 研究代表者
 上田 夏生 (UEDA NATSUO)
 香川大学・医学部・教授
 研究者番号：20193807

研究成果の概要：カンナビノイド受容体の内在性リガンドとして知られるアナンダミドと関連脂肪酸アミド化合物の動物組織における生合成および分解に関与する3種類の酵素の解析を行った。その結果、(1) 新規 *N*-アシルトランスフェラーゼを発見し、(2) *N*-アシルホスファチジルエタノールアミン・ホスホリパーゼ D のリン脂質による活性化を見出し、(3) *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼの触媒機能に重要なアミノ酸残基を同定するなどの成果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：*N*-アシルエタノールアミン、アナンダミド、エンドカンナビノイド、酵素、脂質
 メディエーター、リン脂質

1. 研究開始当初の背景

(1) アナンダミドは不飽和脂肪酸のアラキドン酸のエタノールアミド (*N*-アラキドノイルエタノールアミン) の慣用名であり、哺乳動物組織でカンナビノイド受容体の内因性リガンドとして発見された (Devane et al., *Science* **258**, 1946-9, 1992)。その後、アナンダミドが実際に種々のマリファナ様生物活性を示すことが報告されている (Di Marzo, *Biochim. Biophys. Acta* **1392**, 153-75, 1998)。一方、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン

酸などの飽和もしくはモノエン脂肪酸のエタノールアミド (*N*-アシルエタノールアミン、以下 NAE) についても、カンナビノイド受容体に対するリガンド活性は認められないものの、抗炎症作用・鎮痛作用・食欲抑制作用などの生物活性が知られ、またペルオキシソーム増殖薬活性化レセプター (PPAR) のリガンドとして働くことが報告されている (Lambert et al., *Curr. Med. Chem.* **9**, 663-74, 2002)。しかしながら、アナンダミドを含む NAE の生理的意義は十分には明らかになっていない。

(2) NAE は細胞刺激に応じて細胞内で合成されて細胞外へ放出される一方で、比較的速やかに細胞に取込まれて分解されると考えられている。したがってその体内レベルは合成速度と分解速度のバランスで規定されているとされる。また、炎症や変性疾患のモデル動物で病変部位に NAE の蓄積することが知られている。以上の理由から細胞内での合成・分解経路を確立し、関与する酵素の実体を明らかにすることは、NAE の生理的役割を解明する上で不可欠である。アナンドミドを含む NAE は生体膜のグリセロリン脂質を出発材料にして、①ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基へのアシル基転移反応による *N*-アシルホスファチジルエタノールアミン (NAPE) の合成と、②それに続くホスホリパーゼ D (PLD) 型加水分解反応の二段階の反応により生成することが提唱されていたが (Schmid, *Chem. Phys. Lipids* **108**, 71-87, 2000)、我々は②の反応を触媒する PLD 型酵素 (NAPE-PLD) の cDNA クローニングを世界に先駆けて報告した (Okamoto et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 5298-305, 2004)。このことによりアナンドミドの生合成の研究に分子生物学的手法を導入することが可能になったが、①の反応を触媒するアシル基転移酵素の実体が不明であるなど、生合成経路の全貌は未だ明らかではない。一方、NAE の分解経路については、脂肪酸とエタノールアミンへの加水分解が主たる経路と考えられており、この反応を触媒する脂肪酸アミドヒドロラーゼの解析が進んでいる。我々は同じ反応を触媒するリソソーム酵素を発見し、cDNA クローニングを行い、NAE 酸性アミダーゼ (NAAA) と命名した (Tsuboi et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 11082-92, 2005)。しかしながら本酵素の構造や機能については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

動物組織におけるアナンドミドを含む NAE の生合成経路に関する未解決の諸問題を生化学的および分子生物学的アプローチにより解決することにより、NAE の生理的及び病態生理学的役割を明らかにすることを本研究課題の目的とした。具体的には、(1) 新規 *N*-アシルトランスフェラーゼの cDNA クローニングと機能解析、及び(2) NAPE-PLD の活性化因子の探索を行なった。(3) 同時に NAE の分解経路の酵素学的研究も進め、部位特異的変異法により NAAA の構造と機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 新規 *N*-アシルトランスフェラーゼの

cDNA クローニングと機能解析：哺乳動物のゲノムのデータベースを用いて BLAST サーチ等により、脂質代謝と関連する既知のアシル基転移酵素とホモロジーを有する遺伝子で機能未知のものを探索した。候補遺伝子 (仮称 RLP-1) の cDNA を RT-PCR 法を用いてクローニングし、哺乳動物の発現ベクターに組み込み、このベクターをリポフェクション法で COS-7 細胞に導入し、組換えタンパク質を過剰発現させた。発現は組換えタンパク質の末端に連結した FLAG タグをウエスタン・ブロッティングで検出することにより確認した。次に細胞のホモジネートを用いて *N*-アシル基転移酵素活性を測定した。活性測定は、酵素を 1,2-¹⁴C]ジパルミトイル-ホスファチジルコリン及び非放射標識ホスファチジルエタノールアミンと反応させ、生成した *N*-¹⁴C]パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミンを薄層クロマトグラフィーで分離し、放射能をバイオイメージング・アナライザー BAS1500 (Fujix) で定量することにより行なった。

(2) NAPE-PLD の活性化因子の探索：申請者が以前に確立した方法 (Wang et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 12325-35, 2006) に従って組換え NAPE-PLD を大腸菌で発現させ、高度に精製した。脳組織や培養細胞の膜画分、リン脂質などの存在下で精製酵素を *N*-¹⁴C]パルミトイル-ホスファチジルエタノールアミンと反応させ、生成した *N*-¹⁴C]パルミトイルエタノールアミンを定量することで NAPE-PLD 活性を測定した。

(3) 部位特異的変異法を用いた NAAA の構造・機能解析：ヒト NAAA の種々の変異体を作製し、HEK293 細胞で発現させ、酵素活性を野生型と比較した。活性測定は、*N*-¹⁴C]パルミトイルエタノールアミンから生じる ¹⁴C]パルミチン酸を定量することにより行なった (Tsuboi et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 11082-92, 2005)。また、培地に放出された NAAA の前駆体タンパク質を用いて、*in vitro* でのペプチド鎖の限定分解をウエスタン・ブロッティング法で測定した。

4. 研究成果

(1) RLP-1 の cDNA をラット・マウス・ヒトからクローニングした。推定一次構造は 279-294 個のアミノ酸から構成されていた。組換えタンパク質を COS-7 細胞で一過性に発現させたところ、いずれもホスファチジルコリンの *sn*-1 位または *sn*-2 位の脂肪酸鎖をホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に転移して NAPE を生成する反応を触媒した。しかしながら、この反応は Ca²⁺-非依存的であ

るなど、従来脳などでNAPEの生成に関わると考えられてきたCa²⁺依存性*N*-アシルトランスフェラーゼとは異なる酵素タンパク質であることが明らかになり、Ca²⁺非依存性*N*-アシルトランスフェラーゼ (iNAT) と命名した。iNATは一次構造上、レシチン・レチノール・アシルトランスフェラーゼとホモロジーを示すが、同酵素の活性発現に必須であることが知られているヒスチジン及びシステイン残基に相当する残基がiNATの触媒活性においても重要であることが、変異体の活性測定により示唆された。また、ラット・マウス・ヒトにおける臓器分布をRT-PCR法で検討したところ、種々の臓器でiNATのmRNAが検出されたが、いずれの動物においても精巢で強く発現していた。

(2) NAPE-PLDは膜結合タンパク質であるが、膜成分が本酵素の活性に及ぼす影響については不明であった。そこで組換えNAPE-PLDの精製標品を、COS-7細胞と脳組織からそれぞれ調製した膜画分の存在下でNAPEと反応させると、酵素活性は5倍程度まで上昇した。しかしながら、膜画分の存在下ではCa²⁺の活性化作用は明らかに減弱していた。種々のリン脂質が活性に及ぼす影響を検討したところ、ホスファチジルエタノールアミンがもっとも強力な活性化作用を示した。以上の結果から、細胞内のNAPE-PLDはCa²⁺濃度に拘らずホスファチジルエタノールアミンを含む膜成分によって恒常的に活性化型に保たれていることが示唆された。

(3) NAAAはリソソームに存在する糖タンパク質のひとつであり、触媒活性の特徴として至適pHを4.5付近に有する。本酵素には4カ所の糖鎖結合部位があることを部位特異的変異法により決定した。また、NAAAを過剰発現させたHEK293細胞において前駆体タンパク質が培地中に放出されること、及び前駆体タンパク質はペプチド鎖の限定分解により活性化されることを見出した。この前駆体タンパク質の限定分解の至適pHも4-5であった。ヒト酵素のグルタミン酸-195の変異により触媒活性や限定分解のpH-活性曲線が変化したことから同アミノ酸残基がpH依存性の決定因子のひとつである可能性が示唆された。さらに変異体の解析により、触媒活性に重要であると推定されるシステイン-126、アルギニン-142、アスパラギン酸-145が限定分解にも必須であることが明らかになり、限定分解が自己触媒的に生じることが強く示唆された。また、NAAAの免疫組織化学的検討により、ラット組織中では肺胞マクロファージなどマクロファージで非常に強く発現していること、またRT-PCR法でヒト組織においては前立腺組織や前立腺がん細胞で豊

富に発現していることが明らかになった。

(4) 以上のようにNAEの生合成・分解経路に関わる酵素の性状解析について、多くの成果が得られた。NAPE-PLD遺伝子欠損マウスについては、作製に成功し、飼育を続けているが、これまでのところ目立った表現型は観察されておらず、引き続き解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計15件)

- ① Jin X-H, Uyama T, Wang J, Okamoto Y, Tonai T, Ueda N, cDNA cloning and characterization of human and mouse Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine *N*-acyltransferases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1791: 32-38, 2009 査読有
- ② Shiratsuchi A, Ichiki M, Okamoto Y, Ueda N, Sugimoto N, Takuwa Y, Nakanishi Y, Inhibitory effect of *N*-palmitoylphosphatidylethanolamine on macrophage phagocytosis through inhibition of Rac1 and Cdc42. *J Biochem* 145: 43-50, 2009 査読有
- ③ Wang J, Zhao L-Y, Uyama T, Tsuboi K, Wu X-X, Kakehi Y, Ueda N, Expression and secretion of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in human prostate cancer cells. *J Biochem* 144: 685-690, 2008 査読有
- ④ Wang J, Zhao L-Y, Uyama T, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N, Amino acid residues crucial in pH regulation and proteolytic activation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1781: 710-717, 2008 査読有
- ⑤ Placzek EA, Okamoto Y, Ueda N, Barker EL, Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology* 55: 1095-1104, 2008 査読有
- ⑥ Placzek EA, Okamoto Y, Ueda N, Barker EL, Mechanisms for recycling and biosynthesis of endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol. *J Neurochem* 107: 987-1000, 2008 査読有
- ⑦ Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V, Di Marzo V, Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 151: 955-968,

- 2008 査読有
- ⑧ Wang J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueda N, The stimulatory effect of phosphatidylethanolamine on *N*-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD). *Neuropharmacology* 54: 8-15, 2008 査読有
- ⑨ Wang J, Ueda N, Role of the endocannabinoid system in metabolic control. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 1-10, 2008 査読有
- ⑩ 宇山徹, 上田夏生, エンドカンナビノイド: 生理機能、代謝、および医薬品開発. *分子心血管病* 9: 610-616, 2008 査読無
- ⑪ Tsuboi K, Takezaki N, Ueda N, The *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Chem Biodivers* 4: 1914-1925, 2007 査読有
- ⑫ Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N, Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers* 4: 1842-1857, 2007 査読有
- ⑬ Tsuboi K, Zhao L-Y, Okamoto Y, Araki N, Ueno M, Sakamoto H, Ueda N, Predominant expression of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages revealed by immunochemical studies. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*, 1771: 623-632, 2007 査読有
- ⑭ Zhao L-Y, Tsuboi K, Okamoto Y, Nagahata S, Ueda N, Proteolytic activation and glycosylation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a lysosomal enzyme involved in the endocannabinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*, 1771: 1397-1405, 2007 査読有
- ⑮ 坪井一人, 上田夏生, エンドカンナビノイドの生理的機能と生合成・分解. *細胞工学* 26: 1264-1268, 2007 査読無

[学会発表] (計 25 件)

- ① 王俊, 趙麗穎, 宇山徹, 坪井一人, 上田夏生. ヒト前立腺癌細胞で発現している *N*-アシルエタノールアミン関連酵素. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009.3.16-18, 横浜市
- ② 王俊, 趙麗穎, 岡本安雄, 宇山徹, 坪井一人, 上田夏生. 膜成分およびホスファチジルエタノールアミンはアナンダミド生成ホスホリパーゼDを活性化する. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009.3.16-18, 2009, 横浜市
- ③ 王俊, 趙麗穎, 宇山徹, 坪井一人, 上田夏

- 生. *N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼのpH依存性におけるグルタミン酸-195の重要な役割. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009.3.16-18, 2009, 横浜市
- ④ 上田夏生, 宇山徹, 森下淳, 金星華. がん抑制遺伝子H-Rev107のCa²⁺-非依存性ホスホリパーゼA₁/A₂としての解析. 第 323 回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 2009.3.6, 東京都千代田区
- ⑤ 金星華, 宇山徹, 王俊, 岡本安雄, 藤内武春, 上田夏生. ヒト及びマウスのCa²⁺非依存性ホスファチジルエタノールアミン *N*-アシル転移酵素の機能解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.9-12, 神戸市
- ⑥ Uyama T, Zhao L-Y, Wang J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N, Identification of amino acid residues regulating pH dependency and proteolytic activation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.9-12, 神戸市
- ⑦ 上田夏生, 趙麗穎, 宇山徹, 坪井一人, 藤内武春. *N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼの翻訳後修飾. 第 29 回日本炎症・再生医学会, 2008.7.8-10, 東京都千代田区
- ⑧ Uyama T, Zhao L-Y, Tsuboi K, Okamoto Y, Nagahata S, Ueda N, Regulation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA) by proteolysis and glycosylation. 18th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, 2008.6.25-29, Aviemore, Scotland, UK
- ⑨ Petrosino S, Karsak M, Cristino L, Gaffal E, Tuting T, Ueda N, Zimmer A, Bisogno T, Di Marzo V, Protective role of palmitoylethanolamide in keratinocytes and its involvement in contact allergic dermatitis. 18th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, 2008.6.25-29, Aviemore, Scotland, UK
- ⑩ 上田夏生. *N*-アシルエタノールアミン産生・分解酵素の分子生物学的解析. 第 50 回日本脂質生化学会, 2008.6.5-6, 徳島市.
- ⑪ 趙麗穎, 宇山徹, 坪井一人, 藤内武春, 上田夏生. エンドカンナビノイド代謝に関与するリソソーム酵素である *N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼのタンパク分解による活性化と糖鎖修飾. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2008.5.16-17, 高松市
- ⑫ 金星華, 岡本安雄, 森下淳, 坪井一人, 宇山徹, 藤内武春, 上田夏生. レチノール・アシル転移酵素構造類似タ

- ンパク質のホスファチジルエタノールアミン*N*-アシル転移酵素としての同定. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007.12. 11-15, 横浜市
- ⑬ 王俊, 岡本安雄, 坪井一人, 上田夏生. 生体膜成分とリン脂質による*N*-アシルホスファチジルエタノールアミン水解ホスホリパーゼD (NAPE-PLD) の活性化. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007.12. 11-15, 横浜市
- ⑭ 趙麗穎, 坪井一人, 岡本安雄, 荒木伸一, 上野正樹, 阪本晴彦, 上田夏生. *N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼの免疫化学的解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007.12.11-15, 横浜市
- ⑮ 上田夏生, 趙麗穎, 坪井一人, 岡本安雄, 荒木伸一, 上野正樹. 新規リソソーム酵素としての*N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼの性状解析. 第318回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 2007.12.7, 香川県さぬき市
- ⑯ Ueda N, Calcium-independent *N*-acyltransferase, a novel enzyme involved in the anandamide formation. 17th Neuropharmacology Conference Cannabinoid Signaling in the Nervous System, 2007.10.31-11.2, San Diego, USA
- ⑰ Ueda N, Enzymes involved in the formation of anandamide and related amide compounds. 10th International Conference Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases, 2007.9.16-19, Montreal, Canada
- ⑱ 上田夏生. アナンダミドと関連アミド化合物の生合成と分解に関与する酵素. 平成19年度北陸大学学術フロンティア公開シンポジウム カンナビノイド—毒変じて薬となる?—, 2007.9.13-14, 金沢市
- ⑲ 上田夏生, 坪井一人, 趙麗穎, 岡本安雄, 荒木伸一, 上野正樹, 阪本晴彦. 抗炎症脂質*N*-アシルエタノールアミンを加水分解する酸性アミダーゼのマクロファージにおける発現. 第28回日本炎症・再生医学会, 2007.8.2-3, 東京都新宿区
- ⑳ Ueda N, Jin X-H, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Discovery of a calcium-independent phosphatidylethanolamine *N*-acyltransferase (iNAT). International Cannabinoid Research Society 17th Annual Symposium on the Cannabinoids, 2007.6.26-30, Saint-Sauveur, Quebec, Canada
- 21 Tsuboi K, Zhao L-Y, Okamoto Y, Araki N, Ueno M, Sakamoto H, Ueda N, Immunochemical studies reveal predominant expression of lysosomal *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages. International Cannabinoid Research Society 17th Annual Symposium on the Cannabinoids, 2007.6.26-30, Saint-Sauveur, Quebec, Canada
- 22 岡本安雄, 金星華, 森下淳, 坪井一人, 藤内武春, 上田夏生. *N*-アシルPEを生成する新規*N*-アシル転移酵素の同定と性状解析. 第49回日本脂質生化学会, 2007.6.5-6, 札幌市
- 23 一木万奈美, 白土明子, 岡本安雄, 上田夏生, 中西義信. アナンダミド前駆体*N*-アシルホスファチジルエタノールアミンのマクロファージ食抑制効果. 日本生化学会北陸支部第25回例会, 2007.5.26, 金沢市
- 24 金星華, 岡本安雄, 森下淳, 坪井一人, 藤内武春, 上田夏生. 内因性マリファナ様物質アナンダミドの生合成に係わる新規*N*-アシル転移酵素の同定と性状解析. 第48回日本生化学会中国・四国支部例会, 2007.5.19-20, 高知市
- 25 Ueda N, Enzymes responsible for the biosynthesis of the endocannabinoid anandamide. 3rd International Conference on Phospholipases A₂ and Lipid Mediators, 2007.5.9-12, Sorrento, Italy
- [その他]
- ホームページ
<http://www.kms.ac.jp/%7Ebiochem/index.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
 上田 夏生 (UEDA NATSUO)
 香川大学・医学部・教授
 研究者番号：20193807
- (2)連携研究者
 岡本 安雄 (OKAMOTO YASUO)
 金沢大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80293877