

平成23年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590284

研究課題名（和文）アナンダミド生成に係わる新規リン脂質代謝酵素の生理機能解析

研究課題名（英文）Analysis of physiological function of novel phospholipid-metabolizing enzymes involved in the formation of anandamide

研究代表者

金星華（JIN XINGHUA）

香川大学・医学部・外国人研究者

研究者番号：50457339

研究成果の概要（和文）：*N*-アシルトランスフェラーゼは、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に関与する酵素であり、ホスファチジルエタノールアミン（PE）に別のグリセロリン脂質から脂肪酸鎖を転移して *N*-アシル-PE を合成する。我々はこの反応を触媒する新規酵素を発見し、同酵素の cDNA をラット、マウス、ヒトからクローニングし、組換えタンパク質の性状を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*N*-Acyltransferase is an enzyme involved in the biosynthesis of anandamide (an endogenous ligand of cannabinoid receptors) and related fatty acid amide compounds in animal tissues, and transfers a fatty acyl chain from a glycerophospholipid molecule to phosphatidylethanolamine (PE) to form *N*-acyl-PE. We found a novel enzyme catalyzing this reaction, cloned its cDNA from rat, mouse, and human, and characterized its recombinant proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、カンナビノイド、酵素、*N*-アシルトランスフェラーゼ、リン脂質

1. 研究開始当初の背景

アナンダミドは高度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) の別名であり、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 (Pacher et al., *Pharmacol. Rev.* **58**, 389-462, 2006)。

一方、パルミチン酸やステアリン酸のような飽和脂肪酸やオレイン酸などのモノエン脂肪酸のエタノールアミド（以下、長鎖脂肪酸のエタノールアミドをまとめて*N*-アシルエタノールアミンと総称する）については、カンナビノイド受容体に対するリガンド活性は示さないものの、抗炎症作用、鎮痛作用、食欲抑制作用などの生物活性を示す。最近、ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (PPAR) α のリガンドとして働くことが報告されている (Fu et al., *Nature* **425**, 90-3, 2003)。しかしながらこのような多数の報告にもかかわらず、アナンダミドを含む*N*-アシルエタノールアミンの生理的意義は十分には明らかになっていない。

N-アシルエタノールアミンは刺激にตอบสนองし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、その体内レベルは合成速度と分解速度のバランスで決定されていると考えられる。組織変性部位や炎症部位では*N*-アシルエタノールアミンの著増することが知られており、病態時の生理的意義に興味を持たれる。以上の理由から細胞内での合成経路と関与する酵素の実体を明らかにすることは、*N*-アシルエタノールアミンの生理的役割を解明する上で不可欠である。アナンダミドを含む *N*-アシルエタノールアミンは生体膜のグリセロリン脂質を出発材料にして、主として(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ものとされてきたが (Ueda et al., *Curr. Med. Chem.* **12**, 1413-22, 2005)、関与する酵素の実体は長い間不明であった。我々の研究室では、生合成の第二段階を触媒する新規 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)。さらに申請者は、レシチン・レチノール・アシル転移酵素とホモロジーを有する新規ラットタンパク質がこの第一段階の反応を触媒することを発見し、「Ca²⁺

非依存性 *N*-アシル転移酵素」と命名した (Xing-Hua Jin et al., *J. Biol. Chem.* **282**, 3614-23, 2007)。しかしながら、本酵素は脳等で第一段階の反応を触媒する Ca²⁺依存性酵素とは別の酵素タンパク質であることが明らかになり、その生理的役割は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、ラットに加えてマウスとヒトの「Ca²⁺非依存性 *N*-アシル転移酵素」の cDNA クローニングと機能解析を行ない、同酵素の生理的及び病態生理学的役割を明らかにすることを目的とした。あわせて脳の Ca²⁺依存性 *N*-アシル転移酵素を精製し、cDNA クローニングを行なうことを目標とした。具体的には以下の3項目についての研究を実施した。(1) マウス及びヒトから Ca²⁺非依存性 *N*-アシル転移酵素の cDNA クローニングを行ない、動物細胞で組換え酵素を発現させ、その触媒活性をラットの酵素と比較する。(2) 部位特異的変異法等により、酵素の構造、触媒機能、活性調節機構を解析する。(3) ラット脳を用いて Ca²⁺依存性 *N*-アシル転移酵素の精製を試みる。

3. 研究の方法

(1) マウス及びヒトから Ca²⁺非依存性 *N*-アシル転移酵素の cDNA クローニングを行ない、動物細胞で組換え酵素を発現させ、その触媒活性をラットの酵素と比較した。既にデータベースの検索により、ラット酵素のホモログと想定される遺伝子をマウス及びヒトのゲノムで見出していた。アミノ酸レベルでラット酵素とマウスまたはヒトの酵素との同一性はそれぞれ 85%と 68%であった。この塩基配列に基づきプライマーをデザインし、マウス及びヒトの総 RNA から RT-PCR 法により cDNA を単離した。塩基配列が正しいことを確認した後、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で確認した。次に細胞のホモジネートを用いて *N*-アシル転移酵素活性の有無を検討した。酵素活性測定法については、[¹⁴C]ホスファチジルコリ

ンと非放射標識ホスファチジルエタノールアミンを基質に用いて酵素と反応させ、生成した^[14C]NAPEを薄層クロマトグラフィーで分離後、バイオイメージングアナライザーで定量した。以上の方法は、ラット酵素について申請者が既に確立した方法 (Xing-Hua Jin et al., *J. Biol. Chem.* **282**, 3614-23, 2007) に従って実施した。さらに、ラット、マウス、ヒト由来の組換え酵素を抗 FLAG 抗体親和性カラムクロマトグラフィーにより高度に精製した。精製酵素の触媒活性、基質特異性などについて三者の差異の有無を検討した。

(2) 部位特異的変異法等により、酵素の構造、触媒機能、活性調節機構を解析した。本酵素は、レシチン・レチノール・アシル転移酵素とホモロジーを有する。また申請者は同じファミリーに属する他の遺伝子もいくつか見出した。ファミリー内の遺伝子の比較により、活性発現にかかわると推定されるアミノ酸残基を標的とし、PCR法を用いて部位特異的変異体を作製した。変異体を上述の方法により動物細胞で発現させ、組換え体の酵素活性を測定した。また、本酵素はファミリー内の他の遺伝子と比較してN末端側が長いので、順次短縮した変異体を作製し、触媒活性や膜親和性の変化を観察した。以上の方法は、当研究室でNAPE-PLDの構造解析を行なった際に確立した方法に準じて実施した (Wang et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 12325-35, 2006)。

(3) Ca²⁺依存性 *N*-アシル転移酵素の精製は以下のように実施した。生後2日のラットの脳から膜画分を調製し、0.5%の界面活性剤 Nonidet P-40 を用いて可溶化した。次に HiTrap Q HP 陰イオン交換クロマトグラフィーと HiTrap SP HP 陽イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせにより部分精製を行った。

4. 研究成果

(1) Ca²⁺非依存性 *N*-アシル転移酵素の 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の性質とは異なっていた。3種の動物の酵素間で明らかな性質の違いは認められなかった。3種の動物における臓器分布を RT-PCR 法で検討したところ、種々の臓器で同酵素の mRNA が検出されたが、いずれの動物においても精製で断然強く発現していた。

Ca²⁺非依存性 *N*-アシル転移酵素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を変異させた Ca²⁺非依存性 *N*-アシル転移酵素の変異体では触媒活性が消失することから、これらの残基の触媒活性における重要性が示唆された。N 末端側を順次短縮した変異体を3種類作製し、触媒活性や膜親和性の変化を観察した結果、本領域は酵素の膜結合に重要であることが判明したが、活性発現への影響はほとんど認められなかった。

(2) Ca²⁺依存性 *N*-アシル転移酵素についてはラット脳で比較的強い活性を示すことが既に報告されているが、高度の精製や cDNA クローニングについての報告はない。我々は生後2日のラットの脳から膜画分を調製し、0.5%の界面活性剤 Nonidet P-40 を用いて可溶化した。次に HiTrap Q HP 陰イオン交換クロマトグラフィーと HiTrap SP HP 陽イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせにより精製度を高め、部分精製することに成功した。引き続き、同酵素のいっそうの精製を検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3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. *Biochimica et*

Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 1791: 32-38, 2009. 査読有

2. Uyama, T., Jin, X.-H., Tsuboi, K., Tonai, T., and Ueda, N. Characterization of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791: 1114-1124, 2009. 査読有
3. Uyama, T., Morishita, J., Jin, X.-H., Okamoto, Y., Tsuboi, K., and Ueda, N. The tumor suppressor gene H-Rev107 functions as a novel Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase $A_{1/2}$ of the thiol hydrolase type. *Journal of Lipid Research* 50: 685-693, 2009. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 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
2. 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. 2010.12.7-10, 神戸
3. Uyama, T., Jin, X.-H., Shinohara, N., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N., Human tumor suppressors have a NAPE-forming N-acyltransferase activity. 20th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, 2010.7.23-27, Lund, Sweden
4. 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.

2010.6.14-15, 渋川

5. 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. 2010.6.11-12, 盛岡
6. Uyama, T., Jin, X.-H., Shinohara, N., Tsuboi, K., Ueda, N., Identification of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes. Keystone Symposia: Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases, 2010.6.6-11, Kyoto
7. 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. 2010.5.14-15, 山口
8. 宇山 徹, 金星華, 坪井一人, 藤内武春, 上田夏生. がん抑制遺伝子 TIG3 と HRASLS2 の脂質代謝酵素としての同定. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.21-24, 神戸
9. Uyama, T., Morishita, J., Jin, X.-H., Okamoto, Y., Tsuboi, K., Ueda, N., The tumor suppressor H-rev107 functions as phospholipase $A_{1/2}$ with a low N-acyltransferase activity. 19th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, 2009.7.7-11, St. Charles, Illinois, USA
10. Uyama, T., Morishita, J., Jin, X.-H., Okamoto, Y., Tsuboi, K., Ueda, N., Characterization of the tumor suppressor H-rev107 as a novel Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase $A_{1/2}$. 4th International Conference on Phospholipase A_2 and Lipid Mediators, 2009.5.25-28, Tokyo
11. Ueda, N., Jin, X.-H., Zhao, L.-Y., Wang, J., Uyama, T., Enzymes involved in the metabolism of anandamide. 4th International Conference on Phospholipase A_2 and Lipid Mediators

2009. 5. 25-28, Tokyo

12. Uyama, T., Morishita, J., Jin, X.-H., Okamoto, Y., Tsuboi, K., Ueda, N., The tumor suppressor H-rev107 functions as a novel Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase $A_{1/2}$. The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences: Bioactive Lipid Molecules and Transporters, 2009. 5. 25-26, Tokyo
13. 宇山 徹, 森下 淳, 金星華, 岡本 安雄, 坪井 一人, 上田 夏生. がん抑制遺伝子 H-rev107 のホスホリパーゼ $A_{1/2}$ としての同定. 第 50 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2009. 5. 15-16, 鳥取
14. 上田夏生, 宇山 徹, 森下 淳, 金星華. がん抑制遺伝子 H-Rev107 の Ca^{2+} -非依存性ホスホリパーゼ A_1/A_2 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
15. 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 Ca^{2+} 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

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

金星華 (JIN XINGHUA)

香川大学・医学部・外国人研究者

研究者番号 : 50457339

(2) 連携研究者

宇山 徹 (UYAMA TORU)

香川大学・医学部・助教

研究者番号 : 30457337