

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790231
 研究課題名（和文）
 NlpC/p60ファミリーに属する新規リン脂質代謝酵素群の機能解析
 研究課題名（英文）
 Functional analysis of novel lipid-metabolizing enzymes belonging to the NlpC/p60 family
 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

研究成果の概要（和文）：癌抑制遺伝子群として以前に単離されていた HRASLS ファミリーの脂質代謝酵素活性の検討を行った。その結果、同ファミリー・メンバーに含まれる H-rev107、HRASLS2 および TIG3 のすべてがグリセロリン脂質を基質とする脂質代謝酵素活性を示した。また、PCR によって発現分布を解析した結果、H-rev107 と TIG3 は調べた組織すべてにおいて発現が検出された。とりわけ、H-rev107 は脂肪組織において高発現していた。一方、HRASLS2 は肝臓や腎臓で強く発現しており、他の臓器での発現レベルは低かった。

研究成果の概要（英文）：We investigated possible lipid-metabolizing activities of HRASLS family members which were originally identified as tumor suppressor genes. H-rev107, HRASLS2 and TIG3, which are included in the HRASLS family members, showed lipid-metabolizing activities using glycerophospholipids as substrate. PCR analysis revealed that H-rev107 and TIG3 are expressed in all the tissues examined, with the highest expression of H-rev107 in adipose tissue. On the other hand, the expression of HRASLS2 was dominant in liver and kidney with low levels in other tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：基礎医学・医化学一般

キーワード：H-rev107, HRASLSファミリー, 癌抑制遺伝子, グリセロリン脂質, ホスホリパーゼA₁, ホスホリパーゼA₂, アシル転移酵素, レシチン・レチノール・アシル転移酵素

1. 研究開始当初の背景

NlpC/p60 ファミリーに含まれる H-rev107 は、癌原遺伝子 Ras の機能を負に制御する分子として単離された癌抑制遺伝子である (Sers

et al., *J. Cell Biol.* 136, 935-44, 1997; Anantharaman and Aravind, *Genome Biol.* 4, R11.1-12, 2003)。その後の研究から、H-rev107 に相同性を示す複数の分子が存在

することが明らかになり、これらはまとめて HRASLS ファミリーと呼ばれ、ほ乳類では 5 分子 (H-rev107, iNAT, HRASLS2, TIG3, A-C1) が存在する。しかしながら、我々が研究を開始した当時、HRASLS ファミリーの発現が癌細胞で低いことや癌原遺伝子 Ras を負に制御するなどの現象は観察されていたが、タンパク質としての性状解析はほとんど行われておらず、同ファミリーが癌抑制作用などを示す分子メカニズムは全く不明であった。

2. 研究の目的

HRASLS ファミリーの一次構造は、ビタミン A の体内動態を制御する脂質代謝酵素である レシチン・レチノール・アシル転移酵素 (LRAT) に相同性を示し、LRAT の酵素活性に必要とされる複数のアミノ酸残基が保存されていることから、同ファミリーが脂質代謝酵素である可能性が考えられた (Hughes et al., *J. Gen. Virol.* 81, 201-7, 2000)。ごく最近、当研究室の Jin らは、同ファミリーに含まれる iNAT が生理活性脂質の一つである *N*-アシルエタノールアミン合成に関与するホスファチジルエタノールアミン (PE) *N*-アシル転移酵素活性を保有していることを見出し、同ファミリー・メンバーの酵素活性を世界に先駆けて報告した (Jin et al., *J. Biol. Chem.* 282, 3614-23, 2007)。一方、HRASLS ファミリーの他の 4 分子 (H-rev107, HRASLS2, TIG3, A-C1) の性状には不明な点が多く残されていた。そこで、これらの分子も脂質代謝酵素であると想定し、以下の目的を設定した。(1) HRASLS ファミリー・メンバーの脂質代謝酵素活性を解析する。(2) 同ファミリー・メンバーの一次構造で高度に保存されているアミノ酸に関して点変異体や部分欠損変異体を作製し、構造解析を行う。(3) 同ファミリー・メンバーの安定発現細胞株を樹立し、内因性基質の同定を試みる。(4) 同ファミリーの安定発現細胞株を用いて、癌抑制作用のメカニズムを検討する。(5) 同ファミリー・メンバーの生体内での発現分布を RT-PCR によって解析する。

3. 研究の方法

(1) HRASLS ファミリー・メンバーの精製組換えタンパク質を COS-7 細胞を用いて調製する。これらを酵素源とし、種々の脂質代謝酵素活性の検討を行い、基質特異性などの性状を解析する。以上の実験は当研究室で確立された方法に従って実施する (Jin et al., *J. Biol. Chem.* 282, 3614-23, 2007)。(2) HRASLS ファミリーの構造解析を行うため、ラット H-rev107 を用いて変異体を作製する。点変異体として、酵素活性に重要と予想されるヒスチジン-21 とシステイン-111 に変異を導入した点変異体を PCR によって作製する。

また、酵素活性に必要とされるドメインを解析するため、ラット H-rev107 の N 末端および C 末端を段階的に欠損させた変異体を作製する。これらを用いて酵素活性を検討する。

(3) 同ファミリー・メンバーを安定発現する細胞株を樹立するため、それぞれの cDNA を含む発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、薬剤存在下で遺伝子導入された細胞を選択する。安定発現細胞株を樹立後、放射標識リン脂質でラベルし、リン脂質を抽出後、二次元薄層クロマトグラフィーで種々のリン脂質の組成を解析する。

(4) 樹立した同ファミリー安定発現細胞株の細胞増殖やコロニー形成能を検討する。Ras のシグナル伝達構成成分に変化が生じているかを解析する。

(5) ラットから調製した種々の cDNA、および市販のヒトの cDNA を用いて PCR を行い、同ファミリーの組織分布を解析する。

4. 研究成果

(1) HRASLS ファミリーに含まれる H-rev107 の cDNA をヒト、マウスおよびラットから単離し、それらを用いて酵素活性を測定した。その結果、いずれの分子においてもリン脂質から脂肪酸とリゾリン脂質を生成するホスホリパーゼ A₁/A₂ (PLA_{1/2}) 活性が検出された。ラット H-rev107 の精製組換えタンパク質を酵素源とし、種々のリン脂質を基質として用いたところ、H-rev107 はホスファチジルコリン (PC) や PE を基質とした。また、いずれの場合においても、PLA₁ 活性が PLA₂ 活性よりも優位であった。既存の阻害剤を検討したところ、SH 阻害剤であるヨード酢酸によって濃度依存的に PLA_{1/2} 活性が阻害された。同ファミリー・メンバーである HRASLS2 と TIG3 についても、精製組換えタンパク質を用いて酵素活性の検討を行った。その結果、いずれの分子も PLA_{1/2} 活性を示し、H-rev107 の場合と同様、PLA₁ 活性が PLA₂ 活性よりも優位であった。アシル転移酵素活性について検討した結果、HRASLS2 は PC のアシル基を PE のアミノ基に転移する PE *N*-アシル化活性を示した。また、リゾ PC *O*-アシル化活性を検討したところ、H-rev107、HRASLS2 および TIG3 のいずれの分子も活性を示し、特に HRASLS2 は高い活性を示した。H-rev107 については PLA₂ 活性を示すことが Duncan らによっても報告された (Duncan et al., *J. Biol. Chem.* 283, 25428-36, 2008)。

(2) ラット H-rev107 の点変異体を作製し、酵素活性を測定した結果、HRASLS ファミリー内で高度に保存されているヒスチジン-21 とシステイン-111 が酵素活性に必須であることが明らかになった。また、部分欠損変異体の解析から、N 末端の 8 アミノ酸、もしくは C 末端の 25 アミノ酸を欠損させた変異体では、

酵素活性が全く検出されず、これらの領域が酵素活性やタンパク質の構造の維持などに必要であることが示唆された。

(3) HRASLS ファミリーのそれぞれを安定発現する HEK293 細胞株を樹立した。現在、これらの細胞株を放射標識脂肪酸およびエタノールアミンでラベルし、脂質解析を展開中である。

(4) (3) で HRASLS ファミリーを安定発現する細胞株を樹立したので、現在、細胞増殖と同ファミリー分子の関連を解析している。また、Ras との関連についても検討する予定である。

(5) ラットの種々の臓器から調製した cDNA を用いて PCR を行った結果、H-rev107 は調べた組織すべてにおいて発現していた。特に、脂肪組織では高い発現が検出された。また、市販の種々のヒト cDNA を用いた PCR から、H-rev107 と TIG3 は調べた組織すべてにおいて発現が見られた。一方、HRASLS2 は肝臓や腎臓に強く発現するなど組織特異的な発現パターンを示した。また、ラットの場合と同様に、ヒト H-rev107 は脂肪組織において高発現していた。最近、H-rev107 欠損マウスの解析結果が報告され、脂肪細胞において脂肪分解への関与が示された (Jaworski et al., *Nat. Med.* **15**, 159-68, 2009)。我々の結果から、ヒトでも同様の働きをしている可能性が考えられた。さらに、市販の種々のヒト癌細胞株由来 cDNA を鋳型にした PCR の結果より、いくつかの癌細胞で同ファミリー・メンバーの発現が認められず、癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆された。

以上の結果から、癌抑制遺伝子群として単離された HRASLS ファミリーの性状解析を行い、同ファミリーのうち H-rev107、HRASLS2 および TIG3 が脂質代謝酵素活性を保有していることを明らかにした。これらの分子はいずれもグリセロリン脂質を基質とする脂質代謝酵素であった。今後、同ファミリーの内因性基質の同定や、脂質代謝酵素活性と癌抑制作用の関連などについて解析を進めていく。また、残された同ファミリー・メンバーである A-C1 についても脂質代謝酵素活性の検討を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Toru Uyama, Xing-Hua Jin, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, and Natsuo Ueda
Characterization of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes
Biochimica et Biophysica Acta, **1791**, 1114-1124 (2009) 査読有り
- ② Toru Uyama, Jun Morishita, Xing-Hua Jin,

Yasuo Okamoto, Kazuhito Tsuboi, and Natsuo Ueda

The tumor suppressor gene H-Rev107 functions as a novel Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase $\text{A}_{1/2}$ of the thiol hydrolase-type

Journal of Lipid Research, **50**, 685-693 (2009) 査読有り

③ Xing-Hua Jin, Toru Uyama, Jun Wang, Yasuo Okamoto, Takeharu Tonai, and Natsuo Ueda

cDNA cloning and characterization of human and mouse Ca^{2+} -independent phosphatidylethanolamine *N*-acyltransferases

Biochimica et Biophysica Acta, **1791**, 32-38 (2009) 査読有り

④ Jun Wang, Li-Ying Zhao, Toru Uyama, Kazuhito Tsuboi, Xiu-Xian Wu, Yoshiyuki Kakehi, and Natsuo Ueda

Expression and secretion of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in human prostate cancer cells

Journal of Biochemistry, **144**, 685-690 (2008) 査読有り

⑤ Jun Wang, Li-Ying Zhao, Toru Uyama, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, and Natsuo Ueda

Amino acid residues crucial in pH regulation and proteolytic activation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase

Biochimica et Biophysica Acta, **1781**, 710-717 (2008) 査読有り

⑥ 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
分子心臓病, **9**, 610-616 (2008) 査読無し

[学会発表] (計 16 件)

① 宇山 徹、金星華、坪井 一人、藤内武春、上田 夏生

Characterization of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes
第 82 回日本生化学会大会、神戸市・神戸国際展示場 (2009. 10. 21-24)

② Toru Uyama, Jun Morishita, Xing-Hua Jin, Yasuo Okamoto, Kazuhito Tsuboi and Natsuo Ueda

Tumor suppressor gene H-rev107 encodes a Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase $\text{A}_{1/2}$ with a low phosphatidylethanolamine *N*-acyltransferase activity

Gordon Research Conferences: Cannabinoid Function in the CNS, University of New

England, Biddeford, ME, USA (2009. 8. 2-7)

③ Toru Uyama, Jun Morishita, Xing-Hua Jin, Yasuo Okamoto, Kazuhito Tsuboi and Natsuo Ueda
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, Pheasant Run, St. Charles, IL, USA (2009. 7. 7-11)

④ Natsuo Ueda, Jun Wang, Li-Ying Zhao, Toru Uyama, Kazuhito Tsuboi and Takeharu Tonai
Amino acid residues important for pH dependency and proteolytic maturation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA)
19th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Pheasant Run, St. Charles, IL, USA (2009. 7. 7-11)

⑤ Natsuo Ueda, Jun Wang, Li-Ying Zhao, Toru Uyama and Kazuhito Tsuboi
Expression of anandamide-related enzymes in human prostate cancer cells
19th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Pheasant Run, St. Charles, IL, USA (2009. 7. 7-11)

⑥ Toru Uyama, Jun Morishita, Xing-Hua Jin, Yasuo Okamoto, Kazuhito Tsuboi, and Natsuo Ueda
Characterization of the tumor suppressor H-rev107 as a novel Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase $A_{1/2}$
The 4th International Conference on Phospholipase A_2 and Lipid Mediators, 学術総合センター, Tokyo, Japan (2009. 5. 25-28)

⑦ 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、鳥取市・とりぎん文化会館 (2009. 5. 15-16)

⑧ 王 俊, 趙 麗穎, 宇山 徹, 坪井 一人, 上田 夏生
The important role of glutamic acid-195 in pH-dependency of *N*-acylethanolamine hydrolyzing acid amidase
第 82 回日本薬理学会年会、横浜市・パシフィコ横浜 (2009. 3. 16-18)

⑨ 王 俊, 趙 麗穎, 岡本 安雄, 宇山 徹, 坪井 一人, 上田 夏生
Membrane components and phosphatidylethanolamine activate anandamide-generating phospholipase D
第 82 回日本薬理学会年会、横浜市・パシ

ィコ横浜 (2009. 3. 16-18)

⑩ 王 俊, 趙 麗穎, 宇山 徹, 坪井 一人, 上田 夏生
N-Acylethanolamine-related enzymes expressed in human prostate cancer cells
第 82 回日本薬理学会年会、横浜市・パシフィコ横浜 (2009. 3. 16-18)

⑪ 上田 夏生, 宇山 徹, 森下 淳, 金星華
癌抑制遺伝子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、東京都千代田区 (2009. 3. 6)

⑫ Toru Uyama, Li-Ying Zhao, Jun Wang, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, and Natsuo Ueda
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、神戸市・神戸国際展示場 (2008. 12. 9-12)

⑬ 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、神戸市・神戸国際展示場 (2008. 12. 9-12)

⑭ 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、東京都千代田区・都市センターホテル (2008. 7. 8-10)

⑮ Toru Uyama, Li-Ying Zhao, Kazuhito Tsuboi, Yasuo Okamoto, and Natsuo Ueda
Regulation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA) by proteolysis and glycosylation
18th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, MacDONALD AVIEMORE HIGHLAND RESORT, Aviemore, Scotland, UK (2008. 6. 25-29)

⑯ 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、高松市・香川県県民ホール (2008. 5. 16-17)

[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