

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790264

研究課題名 (和文) 新規リゾリン脂質アシル転移酵素の生化学的、生物学的解析

研究課題名 (英文) Biochemical and biological analyses of novel lysophospholipid acyltransferases

研究代表者

進藤 英雄 (SHINDOU HIDEO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10401027

研究成果の概要 (和文)：

生体膜はグリセロリン脂質からなる。そのグリセロリン脂質の中には、生理活性を持つ血小板活性化因子 (PAF) など存在する。グリセロリン脂質は一度ホスホリパーゼによって脂肪酸が切り出され、再びリゾリン脂質アシル転移酵素によって再アシル化して生合成される。この経路は、1950年代にランズ回路と名付けられた。それから約50年を経て、ようやくリゾリン脂質アシル転移酵素が複数同定され、我々も6種類同定に成功している。中にはPAFを生合成するリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 (LPCAT) 2も含まれた。LPCAT2は主にマクロファージに発現しリポポリサッカライド (LPS) 刺激で活性化されることがわかった。本研究で、その活性化メカニズムはリン酸化によることがわかった。PAF生合成メカニズムに一端が解明されたことにより、新たな創薬へとつながるだろう。

研究成果の概要 (英文)：

Membrane glycerophospholipids are synthesized through the Lands' cycle. Lysophospholipids are synthesized by phospholipases and reacylated by lysophospholipid acyltransferases. Platelet-activating factor (PAF) is also glycerophospholipid and has a potent activity. The Lands' cycle was proposed in the 1950. Recently, several groups including us identified lysophospholipid acyltransferases. Among them, lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) 2 is a PAF synthetic enzyme. LPCAT2 is mainly expressed in macrophages and activated by lipopolysaccharide stimulation. In this study, we identified phosphorylation site. The identification of LPCAT2 activation mechanism may be useful for novel drug development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：細胞医化学

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜リン脂質は一度ケネディー経路で合成される。後に Lands' cycle で成熟すると考えられている。Lands' cycle ではホスホリパーゼの働きにより、脂肪酸が切り出されリゾリン脂質ができる。できたリゾリン脂質はリゾリン脂質アシル転移酵素によって再びリン脂質に変換される。これまで、ホスホリパーゼの研究は進んできたが、リゾリン脂質アシル転移酵素は膜タンパク質ということもあり、Lands' cycle 提唱から 50 年を経てようやく複数分子同定されている。中には血小板活性化因子 (PAF) の生合成酵素であるリゾ PAF アセチル転移酵素 (リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 2 (LPCAT2)) も含まれた。PAF もリン脂質の一種で強力な生理活性を持つ。LPCAT2 は主にマクロファージに発現し、リポポリサッカライド (LPS) 刺激で活性化されることがわかっていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、その活性化メカニズムの解明を目指して研究を進めた。

### 2. 研究の目的

PAF 生合成酵素である LPCAT2 はマクロファージにおいて、LPS 刺激で 30 分後に活性化される。しかし、その活性化メカニズムは不明であった。リゾリン脂質アシル転移酵素の解析の一つとして LPCAT2 活性化メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

マクロファージ系細胞株 RAW264.7 細胞に LPCAT2 を過剰発現させ LPS で 30 分間刺激した。試料を phos-tag SDS-PAGE で解析し、LPCAT2 がリン酸化されていることを確認した。phos-tag SDS-PAGE ではリン酸化タンパク質のバンドがシフトする。シフトしたバンドを切り出し LC-MS で解析した結果 Ser34 がリン酸化部位と推測された。Ser34 で点変異体を作製して酵素活性や phos-tag SDS-PAGE 解析を行った。続いて、LPS 受容体である toll-like 受容体 4 (TLR4) 下流分子の阻害

剤を用いて、LPCAT2 の変動を調べた。

### 4. 研究成果

phos-tag SDS-PAGE でシフトしたバンドを切り出し、LC-MS で解析した結果 Ser34 がリン酸化部位と推測された。S34A 変異体と S34D 変異体を作製すると、LPCAT2 は活性化されなかった。S34D は無刺激の活性が上昇していた。リン酸化状態を模倣している。TLR4 下流分子の様々な阻害剤を検討した結果、LPCAT2 は TAK1、p38 MAPK、MK2 を介してリン酸化されることがわかった。LPCAT2 は MK2 基質となるコンセンサス配列も持つため直接リン酸化されている可能性もある。

### 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 3 件)

(1) Morimoto R, Shindou H, Oda Y, Shimizu T. (2010) Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages J Biol Chem. 285, 29857-29862 査読有り

(2) Koeberle A., Shindou H., Harayama T., and Shimizu T. (2010) Role of lysophosphatidic acid acyltransferase 3 for the supply of highly polyunsaturated fatty acids in TM4 Sertoli cells FASEB J 24, 4929-4938 査読有り

(3) Harayama T., Shindou H., and Shimizu T.. (2009) Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. J. Lipid Res., 50, 1824-1831 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

(2) 進藤英雄、森本亮、小田吉哉、清水孝雄  
LPCAT2 活性化メカニズムの解明解析 日本  
生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 9 日  
神戸ポートアイランド 兵庫

(3) 原山武士、進藤英雄、衛藤樹、清水孝雄  
生体膜リモデリングによる肺サーファクタ  
ント脂質の生合成 日本生化学会大会合同  
大会 2010 年 12 月 9 日 神戸ポートアイラ  
ンド 兵庫

(4) 森本亮、進藤英雄、小田吉哉、清水孝雄  
MK2 を介した Ser34 リン酸化による PAF 生合  
成酵素 (LPCAT2) 活性化 日本生化学会大会  
合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸ポートア  
イランド 兵庫

(5) 原山武士、進藤英雄、清水孝雄、「LPCAT1  
は急性肺障害に対して保護的に働く」、  
東京呼吸器リサーチフォーラム 東京 帝人  
株式会社グループ東京本社 2010 年 11 月 6  
日

(1) Ryo Morimoto, Takeshi Harayama,  
Hideo Shindou, and Takao Shimizu.  
Lysophospholipid acyltransferases; AGPAT  
and MBOAT families. FASEB Phospholipid  
Metabolism: disease, signal transduction  
and membrane dynamics. 2010 年 6 月 30 日  
Steamboat CO USA

(6) Andreas Koeberle 進藤英雄 清水孝雄  
脂質生化学会 Role of lysophosphatidic  
acid acyltransferase 3 in sertoli cell  
function 群馬 森秋旅館 2010 年 6 月 15  
日

(7) 清水孝雄 進藤英雄 脂質生化学会  
AGPAT ファミリーと MBOAT ファミリーのリゾ  
リン脂質アシル転移酵素; LPCAT2 の活性調節  
群馬 森秋旅館 2010 年 6 月 15 日

(8) 進藤英雄 第 8 回肺フォーラム 21 肺サ  
ーファクタント脂質生合成酵素 (LPCAT1) の  
発見と解析 2010 年 4 月 24 日 京都 グラン  
ドプリンスホテル京都

(9) 進藤英雄、衛藤樹、森本亮、原山武士、

菱川大介、結城公一、清水孝雄、リゾリン脂  
質アシル転移酵素: AGPAT と MBOAT ファミリー  
日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日シ  
ンポジウム CD 神戸ポートアイランド 兵庫

(10) 森本亮、進藤英雄、小田吉哉、田口良、  
清水孝雄、LPCAT2 活性化メカニズムの解析  
Molecular mechanism of LPCAT2 activation  
日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 CD  
神戸ポートアイランド 兵庫

(11) 原山武士、進藤英雄、北芳博、守田麻由  
子、田口良、清水孝雄、「質量分析計を用い  
たリゾリン脂質アシル基転移酵素の基質特  
異性解析」、『日本生化学会大会』、2P-095、  
神戸 2009 年 10 月 22 日 CD 神戸ポートア  
イランド 兵庫

(12) 進藤英雄 新規リゾリン脂質アシル転  
移酵素群の発見と解析 日本生化学会大会  
2009 年 10 月 21 日奨励賞講演 CD 神戸ポ  
ートアイランド 兵庫

(13) 原山武士、進藤英雄、清水孝雄  
ヒト型リゾホスファチジルコリンアシル基  
転移酵素 LPCAT1 の生化学的解析 日本脂質  
生化学会 2009 年 7 月 30 日 名古屋 愛知  
p. 55-57 ウィル愛知

(14) 進藤英雄、結城公一、清水孝雄 (東大・  
院医・細胞情報) 新規 LPAAT3 の同定と解析 日  
本脂質生化学会 2009 年 7 月 30 日 名古屋  
愛知 p. 51-54 ウィル愛知

(15) Hideo Shindou, Yuki Koichi, Takeshi  
Harayama, Daisuke Hishikawa, and Takao  
Shimizu. Acyl-CoA:lysophospholipid  
acyltransferase: the AGPAT and the MBOAT  
Families, Identification of LPAAT3. 『4th  
INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOSPHOLIPASE  
A2 AND LIPID MEDIATORS』 (PLM2009) 2009  
年 5 月 26 日 Tokyo, National Center of  
Science, Japan p. 12

(16) Takeshi Harayama, Hideo Shindou,  
Rie Ogasawara, Akira Suwabe, and Takao  
Shimizu ANALYSIS OF A NOVEL PAF  
BIOSYNTHETIC

ENZYME, LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE  
ACYLTRANSFERASE 1 『4th INTERNATIONAL  
CONFERENCE ON PHOSPHOLIPASE A2 AND LIPID  
MEDIATORS』、(PLM2009) 2009年5月26日  
Tokyo, National Center of Science, Japan  
p. 75

(17) Takeshi Harayama, Hideo Shindou, Rie  
Ogasawara, Akira Suwabe, and Takao Shimizu  
Platelet-activating factor biosynthetic  
activity of Lysophosphatidylcholine  
Acyltransferase 1 『The 5th Takeda Science  
Foundation Symposium on PharmaSciences  
BIOACTIVE LIPID MOLECULES AND  
TRANSPORTERS』、No. 34、Tokyo グランドブ  
リンスホテル高輪 Japan 2009年5月25日  
p. 82

(18)Hideo Shindou. Discovery of several  
lysophospholipid acyltransferases  
involved in the Lands' cycle RIKEN seminar  
第11回ケミカルバイオロジー領域勉強会  
2009年5月20日 和光 埼玉 理研

(19) 進藤英雄 第1回 DBELS JUNIOR  
SEMINAR (Disease Biology Excellent  
Lecture Series) 血小板活性化因子 (PAF)  
生合成酵素と肺サーファクタント脂質生合  
成酵素 - 炎症性メディエーターと呼吸必  
須因子 - 2009年4月24日 東京 東大病  
院

〔図書〕(計4件)

(1) 進藤英雄、菱川大介、原山武士、清水  
孝雄 生体膜リン脂質多様化メカニズム  
(2010) 実験医学 羊土社 p35-p41

(2) 進藤英雄 生化学会 レビュー 新規  
リゾリン脂質アシル転移酵素群の発見と解  
析 (2010) 生化学 p1091-p1102

(3) 進藤英雄、清水孝雄 「レビュー：リ  
ゾリン脂質アシル転移酵素研究の新展開蛋  
白質核酸酵素」(2009) Vol. 54 No. 2. 156-166

(4) 進藤英雄、原山武士 「II型肺胞上皮細  
胞における非炎症性PAF生合成酵素の同定」、  
分子呼吸器病、先端医学社、(2009) Vol. 13  
No. 1. 120-124

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/hshindou/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

進藤 英雄 (SHINDOU HIDEO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10401027

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし