

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790294

研究課題名（和文） 新規脂質代謝酵素群HRASLSファミリーの内因性基質の同定
およびそれらの機能解析研究課題名（英文） Identification of endogenous substrates for
HRASLS family members and their functional analysis

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 (HRASLS1-5) 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すことを明らかにし、HRASLS1-5 のそれぞれを phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT)-1-5 と名付けた。PLA/AT-3 を安定的に過剰発現する HEK293 細胞株 (PLA/AT-3 発現細胞) を樹立したところ、同細胞ではペルオキシソームが消失しており、それによってペルオキシソームで合成される一連のエーテル型脂質の劇的な減少が観察された。これより、PLA/AT-3 は細胞内においてリン脂質代謝酵素として機能することで、ペルオキシソームの細胞内含量を調節している可能性が示唆された。

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. We found that all of HRASLS family members possess lipid-metabolizing activities using glycerophospholipids as substrate. Thus, we termed the products of *HRASLS1-5* genes as phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT)-1-5, respectively. To analyze the biological functions of PLA/AT-3 in living cells, we generated HEK293 cells stably expressing PLA/AT-3. The examination of the cells revealed dysfunction of peroxisomes and a drastic decrease in the levels of ether-type lipids caused by the peroxisomal dysfunction. The results suggest that PLA/AT-3 regulates intracellular content of peroxisomes by functioning as a phospholipid-metabolizing enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：PLA/AT ファミリー、HRASLS ファミリー、脂質代謝酵素、ホスホリパーゼ A₁/A₂、アシル転移酵素、ペルオキシソーム、エーテル型脂質、リン脂質

1. 研究開始当初の背景

5つのメンバーからなる HRASLS ファミリー (HRASLS1-5) は、癌原遺伝子である Ras の機能を負に制御する分子として subtraction cloning によって見出され、癌抑制遺伝子として分類されていた。しかしながら、我々が研究を開始した当時、分子レベルでの機能解析はほとんど行われていなかった。我々のグループは、HRASLS ファミリーの一次構造がビタミン A の体内動態に関わ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) に相同性を示すことに着目し、同メンバーが脂質代謝酵素であるという仮説に基づき研究を開始した。その結果、メンバーのひとつである HRASLS5 (別名 iNAT) 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を開始するカルシウム非依存性ホスファチジルエタノールアミン *N*-アシル転移酵素活性を有することを世界に先駆けて見出した (Jin et al., *J. Biol. Chem.* 282, 3614-23, 2007; Jin et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 32-8, 2009)。さらに、同ファミリーに属する HRASLS2、HRASLS3 (別名 H-rev107) および HRASLS4 (別名 TIG3) が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 (PLA_{1/2}) 活性とアシル転移活性を示すことを明らかにした (Uyama et al., *J. Lipid Res.* 50, 685-93, 2009; Uyama et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 1114-24, 2009)。HRASLS2-5 の一次構造は、既存の PLA₁ や PLA₂ に相同性を全く示さず、酵素学的性質も異なることから、今まで知られていない新しいグループの PLA_{1/2} であることが判明した。我々の一連の研究より、現在知られている哺乳動物の HRASLS ファミリー・メンバーのうち4種が脂質代謝酵素活性を保有することが示された。

2. 研究の目的

我々は HRASLS ファミリーの性状解析を精製組換えタンパク質を用いて展開してきたが、生体内における機能は未だほとんど明らかになっていない。しかしながら、HRASLS ファミリーが脂質代謝酵素であるという知見を考慮すると、同メンバーの生体内における内因性基質自体またはその代謝産物のいずれかの脂質分子が生理活性を示し、上述のような Ras の活性などを調節している可能性が強く推察された。これより、HRASLS ファミリーの内因性基質の同定は、同ファミリーの生理機能を理解するための重要な鍵と考えられた。また、HRASLS1 (別名 A-C1) の性状は明らかになっていないが、他の HRASLS ファミリー・メンバーと同様に脂質代謝酵素であることが考えられた。これより本研究の目的は、HRASLS ファミリーに属する個々の分子の生体内における内因

性基質を同定し、それらの生理機能を細胞レベルで解析することとした。

3. 研究の方法

(1) HRASLS1 の精製組換えタンパク質を COS-7 細胞を用いて調製した。これを酵素源とし、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した。以上の実験は当研究室で確立された方法に従って実施した (Jin et al., *J. Biol. Chem.* 282, 3614-23, 2007)。HRASLS1 の細胞内での脂質代謝酵素活性を解析するため、同分子を COS-7 細胞で一過性に発現させ、¹⁴C]エタノールアミンによって代謝ラベルした。その後、脂質分子を Bligh & Dyer 法によって抽出し、薄層クロマトグラフィーによって解析した。(2) HRASLS3 を安定発現する細胞株を樹立するため、同分子の 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した。安定発現細胞株を樹立後、放射標識脂肪酸などで細胞を代謝ラベルし、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。

4. 研究成果

(1) HRASLS1 の精製組換えタンパク質を用いて酵素活性を測定したところ、リン脂質から脂肪酸とリゾリン脂質を生成する PLA_{1/2} 活性が検出された。アシル転移酵素活性について検討した結果、HRASLS1 はホスファチジルコリン (PC) のアシル基をホスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基に転移することで *N*-アシル-PE を生成する PE *N*-アシル化活性を示した。また、リゾ PC *O*-アシル化活性も示した。HRASLS1 を一過性に発現させた COS-7 細胞を ¹⁴C]エタノールアミンによって代謝ラベルしたところ、*N*-アシル-PE が生成され、HRASLS1 は生体内においても *N*-アシル-PE 生合成に関与していることが示唆された。これより、HRASLS ファミリー (HRASLS1-5) 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すことが明らかになったので、HRASLS1-5 をそれぞれ phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT)-1-5 と名付けた (Shinohara et al., *J. Lipid Res.* 52, 1927-35, 2011)。

(2) HRASLS3 (PLA/AT-3) を安定に発現する HEK293 細胞を樹立した。PLA/AT-3 発現細胞を ¹⁴C]パルミチン酸で代謝標識し、脂質抽出物を薄層クロマトグラフィーで解析したところ、エーテル型中性脂肪であるモノアルキルジアシルグリセロールの劇的な減少が観察された。LC-MS/MS によるリン脂質の解析からは、エーテル型グリセロリン脂質の

著しい減少が見られた。エーテル型脂質の前駆体はペルオキシソームで合成されることから、PLA/AT-3 発現細胞のペルオキシソーム局在タンパク質（カタラーゼおよび PMP70）の分布をショ糖密度勾配を用いた遠心分画によって検討したところ、ペルオキシソームの消失を強く示唆する結果が得られた。同様の結果が共焦点顕微鏡を用いた免疫染色によっても観察された。PLA/AT-3 の細胞内分布を解析したところ、大部分は細胞質に存在していたが、一部はペルオキシソームにも存在していた。エーテル型脂質の減少やペルオキシソームの消失は、酵素活性をもたない PLA/AT-3 の点変異体である C113S を発現させた細胞では見られなかった。これより、PLA/AT-3 は細胞内においてリン脂質代謝酵素として機能することでペルオキシソームの細胞内含量を調節し、その結果、エーテル型脂質の生合成を制御している可能性が示唆された (Uyama et al., *J. Biol. Chem.* 287, 2706-18, 2012)。今後、PLA/AT-3 がどのようにペルオキシソームの制御に関わっているかを解析する予定である。また、PLA/AT-3 の機能制御に関わる分子を two-hybrid システムによって探索する予定である。

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 10 件)]

① 宇山 徹

食餌によって制御された *N*-アシルエタノールアミンは線虫の寿命を決定する
Farmacologia, **48**, 241 (2012) 査読有り

② Toru Uyama, Ikuyo Ichi, Nozomu Kono, Asuka Inoue, Kazuhito Tsuboi, Xing-Hua Jin, Nobukazu Araki, Junken Aoki, Hiroyuki Arai, Natsuo Ueda.

Regulation of Peroxisomal Lipid Metabolism by the Catalytic Activity of the Tumor Suppressor H-rev107

Journal of Biological Chemistry, **287**, 2706-2718 (2012) 査読有り

③ 上田 夏生、坪井 一人、宇山 徹

食欲抑制メディエーターとしてのオレオイルエタノールアミド

Life Sciences, **85**, 604-607 (2011) 査読有り

④ 坪井 一人、宇山 徹、上田 夏生

三本鎖のリン脂質 *N*-アシルホスファチジルエタノールアミンの動物組織における代謝

Journal of Biological Chemistry, **83**, 485-494 (2011) 査読有り

⑤ Naoki Shinohara, Toru Uyama, Xing-Hua Jin, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, Hitoshi Houchi, and Natsuo Ueda.

Enzymological analysis of the tumor

suppressor A-C1 reveals a novel group of phospholipid-metabolizing enzymes

Journal of Lipid Research, **52**, 1927-1935 (2011) 査読有り

⑥ Kazuhito Tsuboi, Yasuo Okamoto, Natsuki Ikematsu, Manami Inoue, Yoshibumi Shimizu, Toru Uyama, Jun Wang, Dale G. Deutsch, Matthew P. Burns, Nadine M Ulloa, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda.

Enzymatic formation of *N*-acylethanolamines from *N*-acylethanolamine plasmalogen through *N*-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, **1811**, 565-577 (2011) 査読有り

⑦ Natsuo Ueda, Kazuhito Tsuboi, Toru Uyama, and Taira Ohnishi.

Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG)

BioFactors, **37**, 1-7 (2011) 査読有り

⑧ Natsuo Ueda, Kazuhito Tsuboi, and Toru Uyama.

Enzymological studies on the biosynthesis of *N*-acylethanolamines

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, **1801**, 1274-1285 (2010) 査読有り

⑨ Natsuo Ueda, Kazuhito Tsuboi, and Toru Uyama.

N-Acylethanolamine metabolism with special reference to *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA)

Progress in Lipid Research, **49**, 299-315 (2010) 査読有り

⑩ Anurag Purushothaman, Toru Uyama, Fumi Kobayashi, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara, Alan C. Rapraeger, and Ralph D. Sanderson.

Heparanase enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis

Blood, **115**, 2449-2457 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

① 池松 夏紀、坪井 一人、井上 愛美、清水 嘉文、宇山 徹、田中 保、上田 夏生、徳村 彰

マウス全脳におけるエタノールアミン含有脂質の分子種分析と関連酵素の基質特異性解析

第 50 回日本薬学会日本薬剤師会日本病院薬

剤師会中国四国支部学術大会・高松 (2011. 11. 12-13)

② 上田 夏生、**宇山 徹**、金星華、坪井一人、芳地 一、藤内 武春

レシチン・レチノール・アシルトランスフェラーゼにホモロジーを示すがん抑制遺伝子 HRASLS ファミリー・メンバーのリン脂質代謝酵素活性

第 332 回脂溶性ビタミン総合研究委員会・東京 (2011. 9. 30)

③ 坪井 一人、岡本 安雄、池松 夏紀、井上 愛美、清水 嘉文、**宇山 徹**、Dale G. Deutsch、徳村 彰、上田 夏生

N-アシル化プラズマローゲンリン脂質からの N-アシルエタノールアミンの生合成

第 84 回日本生化学会大会・京都 (2011. 9. 21-24)

④ **宇山 徹**、池松 夏紀、井上 愛美、篠原 尚樹、金星華、坪井 一人、藤内 武春、徳村 彰、上田 夏生

Phospholipase A/Acyltransferase (PLA/AT) ファミリーの細胞内における N-アシルホスファチジルエタノールアミン生合成への関与

第 84 回日本生化学会大会・京都 (2011. 9. 21-24)

⑤ Naoki Shinohara, **Toru Uyama**, Xing-Hua Jin, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, Hitoshi Houchi, and Natsuo Ueda.

The tumor suppressor A-C1 has an N-acyltransferase activity involved in NAPE formation

21st Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, St. Charles, IL (2011. 7. 6-9)

⑥ **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 に相同性を示すがん抑制遺伝子群 HRASLS ファミリーの脂質代謝酵素活性

日本ビタミン学会第 63 回大会・広島 (2011. 6. 4-5)

⑦ **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

がん抑制遺伝子群 HRASLS ファミリー・メンバー HRASLS1 のリン脂質代謝酵素活性

第 53 回日本脂質生化学会・東京 (2011. 5. 12-13)

⑧ **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・徳島大学薬学部 (2011. 1. 22)

⑨ 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

がん抑制遺伝子群 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・神戸 (2010. 12. 7-10)

⑩ **Toru Uyama**, Xing-Hua Jin, Naoki Shinohara, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai and Natsuo Ueda.

Human tumor suppressors have a NAPE-forming N-acyltransferase activity
20th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Lund, Sweden, (2010. 7. 24-27)

⑪ **宇山 徹**、金星華、篠原 尚樹、坪井一人、上田 夏生

ヒトがん抑制遺伝子 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・群馬 (2010. 6. 14-15)

⑫ **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

第 62 回日本ビタミン学会大会・岩手 (2010. 6. 11-12)

⑬ **Toru Uyama**, Xing-Hua Jin, Naoki Shinohara, Kazuhito Tsuboi and Natsuo Ueda.

Identification of the human tumor suppressors TIG3 and HRASLS2 as phospholipid-metabolizing enzymes

Keystone Symposia: Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases, Kyoto, Japan, (2010. 6. 6-10)

⑭ **宇山 徹**、金星華、篠原 尚樹、坪井一人、上田 夏生

ヒトがん抑制遺伝子 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・山口 (2010. 5. 14-15)

[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