

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24590355
 研究課題名(和文)新規脂質代謝酵素群PLA/ATファミリーの内因性基質の同定とそれらの生理機能解析

 研究課題名(英文)Functional analysis of PLA/AT family members functioning as lipid-metabolizing enzymes

 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

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：5種類からなる脂質代謝酵素群Phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT) ファミリーの内、PLA/AT-1と-2の機能解析を細胞レベルで行った。これらの分子を安定発現するHEK293細胞株を樹立し、脂質組成を分析した結果、N-アシル-ホスファチジルエタノールアミン(N-アシル-PE)という3本の脂肪酸を含む特殊なリン脂質が増加していた。N-アシル-PEは脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの前駆体として機能していることから、PLA/AT-1と-2はN-アシルエタノールアミンの生合成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated possible lipid-metabolizing activities of PLA/AT (HRASLS) family members which were originally identified as tumor suppressor genes. We found that the expression of PLA/AT-1, -2, -4 and -5 causes the formation of N-acylphosphatidylethanolamine in living cells. To further examine their roles, HEK293 cells expressing PLA/AT-1 or PLA/AT-2 stably were established. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmed significant increases in N-acylphosphatidylethanolamine levels in these cells. These results suggest that PLA/AT-1 and -2 are enzymes responsible for the generation of N-acylphosphatidylethanolamine in mammalian cells.

研究分野：脂質生化学

キーワード：PLA/ATファミリー HRASLSファミリー 脂質代謝酵素 アシル転移酵素 ホスホリパーゼA1/A2 リン脂質 N-アシルホスファチジルエタノールアミン ペルオキシソーム

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 Ras の機能を負に制御する癌抑制遺伝子群として単離されていたが、その性状は長い間不明であった。しかしながら、我々は、HRASLS ファミリーに属する5分子すべてがグリセリン脂質を基質とする脂質代謝酵素であることを世界に先駆けて見出してきた (Jin et al., *J. Biol. Chem.* 282, 3614-23, 2007; Jin et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 32-8, 2009; Uyama et al., *J. Lipid Res.* 50, 685-93, 2009; Uyama et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 1114-24, 2009; Shinohara et al., *J. Lipid Res.* 52, 1927-35, 2011)。これらの分子はいずれもリン脂質から脂肪酸を切り出すホスホリパーゼ A_{1/2} (PLA_{1/2}) 活性と、リン脂質からアシル基を他の脂質分子に転移するアシル転移酵素活性を保有していたが、主たる酵素活性は HRASLS ファミリー分子間で異なっていた。これらの分子の一次構造は既存の PLA_{1/2} と全く相同性を示さず、かつ酵素学的性質も異なることから、新しいグループに分類される脂質代謝酵素群であることが判明した。これより、HRASLS1-5 をそれぞれ phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT)-1-5 と呼ぶことを提唱した。これら一連の成果は、PLA/AT ファミリーが生体内において脂質代謝酵素として機能しているという今まで予想もされなかった可能性を提起し、同ファミリーの生理機能解析を行う上での新しい方向性をもたらした。

2. 研究の目的

我々は性状未知の癌抑制遺伝子群であった HRASLS (PLA/AT) ファミリーが脂質代謝酵素であることを見出したが、これらの分子の生理機能に関しては未だほとんど不明である。PLA/AT ファミリーの機能異常が癌や肥満などの疾病と深く関連している事実は、同ファミリーの基質となる内因性脂質分子の代謝異常によってこれらの疾病が誘発されている可能性を強く示唆する。本研究では、PLA/AT ファミリーの脂質代謝酵素としての機能発現に焦点を当て、同ファミリーの発現を攪乱させた培養細胞を用いての内因性基質の同定、および遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの解析を展開し、同ファミリーの生理機能や疾病との関連における体系的な理解に迫る。

3. 研究の方法

(1) PLA/AT-1-5 をそれぞれ COS-7 細胞で一過性に発現させ、放射標識脂肪酸などで細胞を代謝ラベルし、総脂質を Bligh & Dyer 法によって抽出後、薄層クロマトグラフィーで脂質分子の組成を解析した。また、PLA/AT-2 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。樹立した細胞の脂質分子を解析した。

(2) PLA/AT-1 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) PLA/AT-1-5 発現細胞での脂質組成を薄層クロマトグラフィーによって解析したところ、PLA/AT-1、-2、-4 および-5 で *N*-アシルホスファチジルエタノールアミン (*N*-アシル-PE) と呼ばれる 3 本の脂肪酸を含む特殊なリン脂質が増加していた。また、*N*-アシル-PE から生成する脂質メディエーターである *N*-アシルエタノールアミンも増加していた。中でも PLA/AT-2 発現細胞が最も顕著であった。そこで、PLA/AT-2 安定発現細胞の脂質組成を分析したところ、一過性発現の場合と同様に、*N*-アシル-PE と *N*-アシルエタノールアミンが増加していた (Uyama et al., *J. Biol. Chem.* 287, 31905-31919, 2012)。

(2) PLA/AT-1 の *N*-アシル-PE 生合成への関与を調べるため、PLA/AT-1 安定発現細胞を樹立し、脂質組成を分析した。その結果、PLA/AT-2 安定発現細胞と同様に *N*-アシル-PE と *N*-アシルエタノールアミンが増加していた (Uyama et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1690-1701, 2013)。

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7件)

Kazuhiro Tsuboi, Yoko Okamoto, Iffat Ara Sonia Rahman, Toru Uyama, Tomohito Inoue, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda
Glycerophosphodiesterase GDE4 as a novel lysophospholipase D: a possible involvement in bioactive *N*-acylethanolamine biosynthesis
Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1851, 537-548 (2015) 査読有り DOI: 10.1016/j.bbali.2015.01.002

Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhiro Tsuboi, Toru Uyama, and Natsuo Ueda
New players in the fatty acyl ethanolamide metabolism
Pharmacological Research, 86, 1-10 (2014) 査読有り DOI: 10.1016/j.phrs.2014.04.001

Toru Uyama, Manami Inoue, Yoko Okamoto,

Naoki Shinohara, Tatsuya Tai, Kazuhito Tsuboi, Tomohito Inoue, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Involvement of phospholipase A/acyltransferase-1 in *N*-acylphosphatidylethanolamine generation
Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1831, 1690-1701 (2013) 査読有り DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.08.017

Natsuo Ueda, Kazuhito Tsuboi, and Toru Uyama.

Metabolisms of endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines: Canonical and alternative pathways
FEBS Journal, 280, 1874-1894 (2013) 査読有り DOI: 10.1111/febs.12152

Kazuhito Tsuboi, Natsuki Ikematsu, Toru Uyama, Dale G. Deutsch, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Biosynthetic pathways of bioactive *N*-acylethanolamines in brain
CNS & Neurological Disorders – Drug Targets, 12, 7-16 (2013) 査読有り

Toru Uyama, Natsuki Ikematsu, Manami Inoue, Naoki Shinohara, Xing-Hua Jin, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Generation of *N*-Acylphosphatidylethanolamine by Members of the Phospholipase A/Acyltransferase (PLA/AT) Family
Journal of Biological Chemistry, 287, 31905-31919 (2012) 査読有り DOI: 10.1074/jbc.M112.368712

Tatsuya Tai, Kazuhito Tsuboi, Toru Uyama, Kim Masuda, Benjamin Cravatt, Hitoshi Houchi, and Natsuo Ueda

Endogenous Molecules Stimulating *N*-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase (NAAA)
ACS Chemical Neuroscience, 3, 379-385 (2012) 査読有り DOI: 10.1021/cn300007s

〔学会発表〕(計 26 件)

Toru Uyama, Masahiro Watanabe, Katsuhisa Kawai, Nozomu Kono, Kazuhito Tsuboi, Nobukazu Araki, Hiroyuki Arai, and Natsuo Ueda

Regulation of peroxisome levels by PLA/acyltransferase-3
6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015), Tokyo, Japan (2015. 2. 10-12)

Toru Uyama, Manami Inoue, Yoko Okamoto, Naoki Shinohara, Tatsuya Tai, Masahiro Watanabe, Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhito

Tsuboi, Tomohito Inoue, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Peroxisomal dysfunction by PLA/AT family proteins is not related to their NAPE-forming *N*-acyltransferase activity
24th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Baveno, Italy (2014. 6. 28-7. 3)

宇山 徹, 井上愛美, 岡本蓉子, Iffat Ara Sonia Rahman; 坪井一人, 井上智人, 徳村 彰, 上田夏生

LRAT に相同性を示す新規リン脂質代謝酵素 PLA/AT-1 の機能解析
日本ビタミン学会第 66 回大会・姫路商工会議所 (姫路) (2014. 6. 13-14)

宇山 徹, 篠原尚樹, 田井達也; Iffat Ara Sonia Rahman, 坪井一人, 上田夏生, 井上愛美, 岡本蓉子, 徳村 彰, 井上智人

LRAT に相同性を示す新規リン脂質代謝酵素による *N*-アシルホスファチジルエタノールアミンの生成
第 341 回脂溶性ビタミン総合研究委員会・奈良女子大学 (奈良) (2013. 12. 6)

宇山 徹, 井上 愛美, 岡本 蓉子, 篠原 尚樹, 田井 達也, Iffat Ara Sonia Rahman, 坪井 一人, 井上 智人, 藤内 武春, 徳村 彰, 上田 夏生

Phospholipase A/acyltransferase-1 による動物細胞における *N*-アシルホスファチジルエタノールアミンの生成
第 86 回日本生化学会大会・パシフィコ横浜 (横浜) (2013. 9. 11-13)

Toru Uyama, Manami Inoue, Yoko Okamoto, Naoki Shinohara, Tatsuya Tai, Iffat Ara Sonia Rahman, Kazuhito Tsuboi, Takeharu Tonai, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Generation of *N*-acylphosphatidylethanolamine by PLA/AT-1 in mammalian cells
23rd Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Vancouver, Canada (2013. 6. 21-26)

宇山 徹, 井上 愛美, 岡本 蓉子, 篠原 尚樹, 田井 達也, Iffat Ara Sonia Rahman, 坪井 一人, 井上 智人, 徳村 彰, 上田 夏生

Phospholipase A/acyltransferase-1 による *N*-アシルホスファチジルエタノールアミンの生成
第 55 回日本脂質生化学会・ホテル松島大観荘 (松島) (2013. 6. 6-7)

宇山 徹, 市 育代, 河野 望, 井上 飛鳥, 坪井 一人, 荒木 伸一, 青木 淳賢, 新井 洋由, 上田 夏生

LRATに相同性を示す新規リン脂質代謝酵素によるペルオキシソームの機能調節
日本ビタミン学会第 65 回大会・一橋講堂 (東京) (2013. 5. 17-18)

宇山 徹、市 育代、河野 望、井上 飛鳥、井上 愛美、坪井 一人、金 星華、荒木 伸一、青木 淳賢、徳村 彰、新井 洋由、上田 夏生

Phospholipase A/Acytransferase ファミリーによる細胞内ペルオキシソーム含量の制御
第 85 回日本生化学会大会・福岡国際会議場 (福岡) (2012. 12. 14-16)

宇山 徹、坪井 一人、金 星華、上田 夏生、市 育代、河野 望、新井 洋由、井上 飛鳥、青木 淳賢、荒木 伸一

LRAT にホモロジーを示す新規リン脂質代謝酵素による細胞内ペルオキシソーム含量の調節

第 337 回脂溶性ビタミン総合研究委員会・新樺川ホテル (高松) (2012. 11. 30)

Toru Uyama, Natsuki Ikematsu, Manami Inoue, Naoki Shinohara, Xing-Hua Jin, Kazuhiro Tsuboi, Takeharu Tonai, Akira Tokumura, and Natsuo Ueda

Generation of *N*-acylphosphatidylethanolamine by members of phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT) family

22nd Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Freiburg, Germany (2012. 7. 22-27)

宇山 徹、市 育代、河野 望、井上 飛鳥、坪井 一人、金 星華、荒木 伸一、青木 淳賢、新井 洋由、上田 夏生

新規脂質代謝酵素 H-rev107 の発現はペルオキシソームの機能異常を引き起こす

第 54 回日本脂質生化学会・九州大学医学部百年講堂 (福岡) (2012. 6. 7-8)

宇山 徹、市 育代、河野 望、井上 飛鳥、坪井 一人、金 星華、荒木 伸一、青木 淳賢、新井 洋由、上田 夏生

新規脂質代謝酵素 H-rev107 によるペルオキシソームの機能制御

第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会・岡山大学創立五十周年会館 (岡山) (2012. 5. 18)

〔図書〕(計 1 件)

Natsuo Ueda, Kazuhiro Tsuboi, and Toru Uyama.

Metabolic Enzymes for Endocannabinoids and Endocannabinoid-Like Mediators

In The Endocannabinoidome (Vincenzo Di Marzo and Jenny Wang, ed.), Elsevier, UK., 111-135

(2015) 査読有り

〔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

(2)研究分担者

()

該当せず

研究者番号：

(3)連携研究者

上田 夏生 (UEDA, Natsuo)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20193807

坪井 一人 (TSUBOI, Kazuhito)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80346642