

特集：リン脂質代謝と脂質メディエーター研究の最新の成果
第1部 リン脂質代謝酵素

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

坪井 一人, 宇山 徹, 上田 夏生

N-アシル-ホスファチジルエタノールアミン (PE) は PE のアミノ基にもう 1 本の脂肪酸鎖が結合した三本鎖のリン脂質であり, 微量ではあるが自然界に広く分布する. アナンダミドを初めとする種々の脂肪酸のエタノールアミド (*N*-アシルエタノールアミン) が多様な生物活性を示すことからその前駆体である *N*-アシル PE の代謝が注目され, 関与する酵素の研究が活発に展開されている. 動物組織での生合成経路はグリセロリン脂質の *sn*-1 位の脂肪酸鎖を PE に転移させる *N*-アシル化反応であり, *N*-アシルトランスフェラーゼが触媒する. 一方, *N*-アシル PE から *N*-アシルエタノールアミンを一段階で遊離させる反応には特殊なホスホリパーゼ D 型酵素が関与する. 最近の研究により複数の加水分解酵素が関与する多段階経路の存在も明らかになった.

1. はじめに

ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルセリン (PS) など一般的なグリセロリン脂質はグリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位に各 1 本, 計 2 本の脂肪酸鎖を有し, 生体膜の主要構成成分である. 細菌やミトコンドリア膜に豊富なカルジオリピンはグリセロリン脂質 2 分子が結合した構造をとっており, 計 4 本の脂肪酸鎖を有する. 一方, 脂肪酸鎖を 1 本しか持たないリゾリン脂質では脂質メディエーター, すなわち G タンパク質共役型レセプターのリガンドとして働くものが多い. ところが自然界にはこの他にも 3 本の脂肪酸鎖を有するグリセロリン脂質が微量ではあるが普遍的に存在する. それは PE や PS のアミノ基にもう 1 本の脂肪酸

鎖がアミド結合でつながった「*N*-アシル化グリセロリン脂質」である (図 1)^{1,2)}. そのうち *N*-アシル PE は 1965 年に小麦粉から最初に単離され³⁾, 後に種々の動物組織でも見出されたが⁴⁾, イヌの心筋梗塞部位で多量に蓄積することが特に注目された⁴⁾. *sn*-1 位と *sn*-2 位にそれぞれ脂肪酸鎖を有するジアシル型に加えて *sn*-1 位にアルケニル鎖またはアルキル鎖を有するものも相当量存在する点は PE と同様である⁴⁾. これらの分子の総称としては「*N*-アシルエタノールアミンリン脂質」が適当であるが, 本稿では便宜的に *N*-アシル PE と呼ぶことにする. *N*-アシル PS についてもヒツジ赤血球で総リン脂質の数%を占める等, 動物組織で検出されている⁵⁾. *N*-アシル PE の主要代謝物である脂肪酸のエタノールアミド (*N*-アシルエタノールアミン) については, 1957 年に *N*-パルミトイルエタノールアミンが卵黄から単離されたのが最初である⁶⁾. その後 Schmid らのグループが *N*-アシル PE と *N*-アシルエタノールアミンの代謝に関する研究を精力的に進めたが⁷⁾, これらの脂質分子が生化学の領域で広く注目を集めることはなかった.

転機となったのは 1990 年代初頭のカンナビノイドレセプター CB1 の cDNA クローニングの成功⁷⁾とそれに引続く同レセプターの内在性リガンドとしての *N*-アラキドノイ

香川大学医学部生体分子医学講座生化学 (〒761-0793 香川県木田郡三木町大字池戸 1750-1)

Metabolism of *N*-acylphosphatidylethanolamine, a phospholipid molecule with three acyl chains, in animal tissues
Kazuhiro Tsuboi, Toru Uyama, and Natsuo Ueda (Department of Biochemistry, Kagawa University School of Medicine, 1750-1 Ikenobe, Miki, Kagawa 761-0793, Japan)

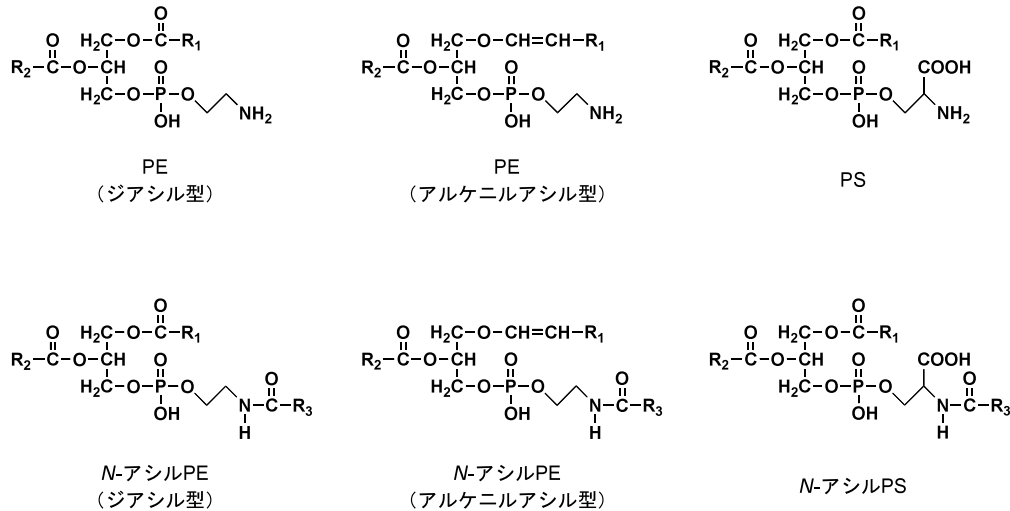


図1 PE, PS と *N*-アシル化グリセロリン脂質の構造

ジアシル型 PE (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), アルケニルアシル型 PE (1-alkenyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), PS (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine) とそれらの *N*-アシル化誘導体であるジアシル型 *N*-アシル PE (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho(*N*-acyl) ethanolamine), アルケニルアシル型 *N*-アシル PE (1-alkenyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phospho(*N*-acyl) ethanolamine), *N*-アシル PS (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho(*N*-acyl) serine) の構造式を示す。

構造式			
名称	アナンダミド (<i>N</i> -アラキドノイル エタノールアミン)	<i>N</i> -パルミトイル エタノールアミン	<i>N</i> -オレオイル エタノールアミン
主なレセプター	CB1 TRPV1	PPAR α	PPAR α GPR119
主な生物作用	エンドカンナビノイド エンドバニロイド	抗炎症作用 鎮痛作用	食欲抑制作用

図2 生物作用を示す *N*-アシルエタノールアミン

ルエタノールアミン(アナンダミド)の発見である⁸⁾(図2)。その結果, *N*-アシル PE の一つである *N*-アラキドノイル PE もアナンダミドの前駆体として注目されるようになった⁹⁾。またアナンダミドは, バニロイドレセプター TRPV1 の内在性リガンドとしても報告されている¹⁰⁾。ところで生体内に存在する *N*-アシルエタノールアミンで量的に多いのはパルミチン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸のエタノールアミドであり, アナンダミドが全 *N*-アシルエタノールアミンに占める割合は5%に満たない¹¹⁾。また, カンナビノイドレセプターの内在性リガンドとしては, 後に見出された2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) の方が, より重要な役割を果たしていることが明らかになっている¹²⁾。その一方で *N*-パルミトイルエタノール

アミンには抗炎症作用や鎮痛作用が認められ^{13,14)}, *N*-オレオイルエタノールアミンは食欲抑制作用を示すことで最近注目されている¹⁵⁾(図2)。これらの *N*-アシルエタノールアミンはペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター PPAR α のリガンドとして機能することが報じられているが¹⁶⁾, *N*-オレオイルエタノールアミンについては GPR119 レセプターのリガンドとしても機能する¹⁷⁾。 *N*-アシル PE それ自体の生物作用については生体膜の安定化作用が以前から知られていたが¹⁸⁾, 最近, 食欲抑制作用¹⁹⁾や Rac1 および Cdc 42 の阻害によるマクロファージ食能低下作用²⁰⁾を示すことが報告されている。本稿では *N*-アシル PE の主として動物組織における代謝について, 著者らの成果を交えて最新の知見を紹介したい。なお, アナンダミドを初めとする *N*-

アシルエタノールアミンを脂肪酸とエタノールアミンに分解する加水分解酵素（脂肪酸アミドヒドロラーゼと *N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼ）の研究も活発に進められており^{21,22}，特異的阻害剤の医薬品としての開発も期待されているが²³，本稿では省かせて頂く。

2. *N*-アシル PE の生合成

(1) Ca^{2+} 依存性 *N*-アシルトランスフェラーゼ

心筋梗塞部位で *N*-アシル PE が著明に増加するとき PE が減少し，互いの分子種が似通っていることから，PE が *N*-アシル PE の前駆体であることが示唆された⁴。すなわち図 3 に示すように PE のエタノールアミン部分のアミノ基に脂肪酸鎖が結合する *N*-アシル化反応が *N*-アシル PE の生合成経路であると考えられた。このようなアシル基転移反応におけるアシル基供与体としてはアシル CoA とグリセロリン脂質が想定されるが，以下に詳述するように，これまでのところ動物組織ではグリセロリン脂質を，植物組織ではアシル CoA をアシル基供与体基質とする酵素反応が見出されている²⁴。

1980 年以降，イヌの心臓や脳，ラットの脳や精巣など *N*-アシル PE 含量の高い動物組織を用いて明らかにされてきたことをまとめると^{22,25,26}，これらの組織には本反応を触媒する膜結合酵素「*N*-アシルトランスフェラーゼ」が発現している。同酵素の可溶化には Nonidet P-40 のような界面活性剤を要する。酵素活性は 0.1-1 mM 程度の Ca^{2+} で著しく増加する。PC，1-アシル-リゾ PC，PE，カルジオリピンなど種々のグリセロリン脂質がアシル基供与体基質となる一方，アシル CoA や遊離脂肪酸は利用されなかった。また，グリセロリン脂質の *sn*-1 位と *sn*-2 位の脂肪酸鎖のうち，もっぱら *sn*-1 位の脂肪酸鎖が利用される点が特徴的であった。転移される脂肪酸鎖の分子種については明らかな特異性が認められないので，*N*-アシル PE の *N*-アシル

鎖の分子種はアシル基供与体基質の *sn*-1 位のアシル鎖の組成を反映し，結果的に *N*-アシルエタノールアミンの分子種にも影響する。アラキドン酸鎖は一般に *sn*-2 位に多く *sn*-1 位に少ないが，このことが総 *N*-アシルエタノールアミンのうちでアナンドミドの占める割合が小さい理由であると考えられている。一方，アシル基受容体基質としては，ジアシル型，アルケニルアシル型（プラスマローゲン型），アルキルアシル型の PE およびリゾ PE のいずれれもが利用可能であった。著者らはラット脳から同酵素を部分精製し， Ca^{2+} 依存性や PC の *sn*-1 位からの選択的脂肪酸引抜きを確認している²⁷。

Ca^{2+} 非依存的に同じ反応を触媒する酵素（後述）と区別するために，本酵素は Ca^{2+} 依存性 *N*-アシルトランスフェラーゼとも呼ばれる。高度な精製や cDNA クローニングは達成されていない。*N*-アシル PE と *N*-アシルエタノールアミンは心筋梗塞部位のみならず種々の変性組織や炎症部位で増加することが知られている。細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加により本酵素は活性化されるものと考えられているが，単離した酵素の活性化に必要な Ca^{2+} 濃度が前述のように比較的高いことから細胞内での活性化の分子機構には不明な点が多い。ラットにおける本酵素の活性の臓器分布が調べられており，脳で最も高く，次いで精巣，筋肉の順で，その他の臓器では低値であった²⁸。脳の部位別では脳幹で最も高く，大脳皮質，線条体，小脳，海馬，延髄で中等度，嗅結節，視床，視床下部，嗅球で低値であった²⁸。興味深いことに脳における活性は成長に伴って低下した^{29,30}。

植物における *N*-アシル PE の生合成については，「*N*-アシル PE シンターゼ」の存在が以前から知られていたが³¹，最近，同酵素の cDNA がシロイヌナズナからクローニングされた³²。一次構造は 284 個のアミノ酸からなり，出芽酵母のリゾ PC アシルトランスフェラーゼ (Ypr140wp) やシロイヌナズナのリゾホスファチジン酸アシルトランス

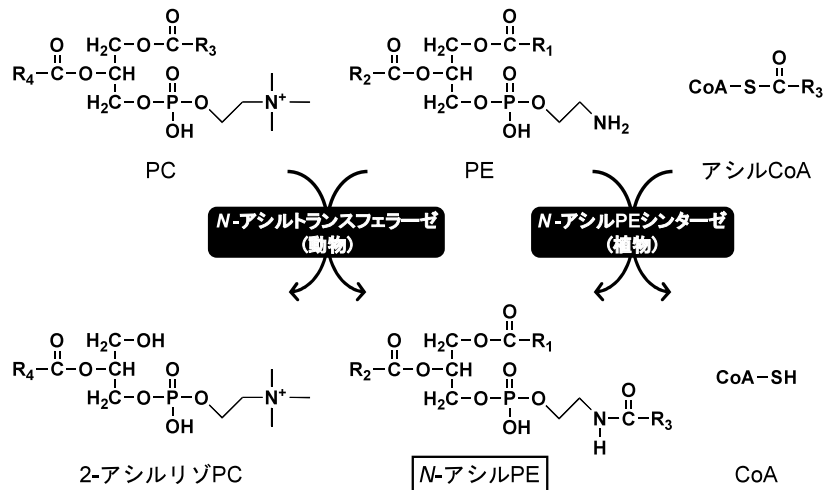


図 3 *N*-アシル PE の生合成経路

フェラーゼ (Slc1) のようなグリセロ脂質アシルトランスフェラーゼと相同性を示した。大腸菌で発現させた組換え体の精製標品を用いて検討したところ、アシル基供与体基質は従来言われていた遊離脂肪酸ではなく、アシル CoA であることが明らかになった。

(2) HRASLS ファミリー

HRAS-like suppressor (HRASLS) ファミリーは、がん原遺伝子 *Ras* の機能を負に制御する分子として単離されたがん抑制遺伝子群で、ヒトでは5分子 (遺伝子名 *HRASLS 1-5*) が存在する^{33,34)} (図 4A)。HRASLS ファミリーは様々ながん細胞においてその発現が著しく低下、もしくは消失しており、II型がん抑制遺伝子として位置付けられている。HRASLS ファミリーの中で最初に見出された分子は H-rev107 (*HRASLS3*) で、Hajnal らによって1994年にクローニングされた³⁵⁾。がん原遺伝子産物 H-Ras による形質転換に感受性が高い線維芽細胞と抵抗性を示す線維芽細胞の間で subtraction cloning を行い、H-rev107 が単離された。H-Ras で形質転換された線維芽細胞に H-rev107 を発現させると細胞の増殖やコロニー形成能が抑制されることから、同分子が H-Ras の機能を負に制御することが示された³⁶⁾。その後、一次構造の類似した分子として TIG3 (*HRASLS4*)³⁷⁾、A-C1 (*HRASLS1*)³⁸⁾、HRASLS2³⁹⁾ が順次見出され、同様に H-Ras で形質転換された細胞の増殖を抑制することが報告されている。精巢で強く発現している *HRASLS5* 産物に関してはそのような報告はない。最近、TIG3 と HRASLS2 が Ras の下流のシグナル伝達を抑制することで Ras の活性を制御することが報告されたが³⁹⁾、具体的なメカニズムは明らかになっていない。

HRASLS ファミリーの遺伝子産物は N 末端側からプロリンに富んだ proline rich domain, H ボックス, NC ドメインおよび疎水性アミノ酸がクラスターし、膜結合に関わる疎水性ドメインから構成されている⁴⁰⁾ (図 4A)。とりわけ、NC ドメインと H ボックスは高度に保存されている。HRASLS ファミリーはビタミン A の体内動態を制御するレチニン・レチノール・アシルトランスフェラーゼ (LRAT) とホモロジーを示し、LRAT ファミリー内のサブファミリーとして位置付けられている³⁴⁾ (図 4B)。LRAT において、NC ドメインに含まれるシステインと H ボックスのヒスチジンは活性中心を形成している^{41,42)}。proline rich domain と疎水性ドメインについては Ras の機能制御に重要であると報告されている³⁶⁾。

LRAT は PC の *sn-1* 位のアシル基を all-*trans*-レチノールに転移してレチニルエステルを生成する酵素である^{41,42)}。Ca²⁺ 依存性 *N*-アシルトランスフェラーゼと LRAT は、アシル基供与体であるグリセロリン脂質の *sn-1* 位のアシル基を用いる点で共通している。上述のように HRASLS

ファミリーは LRAT の活性中心を形成するアミノ酸残基を保有していることから、*N*-アシルトランスフェラーゼ活性を示す可能性が考えられた。そこで著者らは、ラット、ヒト、マウスから *HRASLS5* の cDNA を単離し、COS-7 細胞で組換え体を発現させたところ、予想通りの酵素活性が検出された^{27,43)}。ラット脳から部分精製した Ca²⁺ 依存性 *N*-アシルトランスフェラーゼと比較すると、mM 濃度域のジチオスレイトールや Nonidet P-40 で活性化される点は共通していたが、活性発現に Ca²⁺ を必要としない点、PC の *sn-1* 位のみならず *sn-2* 位からもアシル基を引き抜く点、主として可溶性画分に局在する点、脳での発現レベルが相対的に低い点で、Ca²⁺ 依存性酵素とは異なっていた。これより *HRASLS5* 産物を Ca²⁺ 非依存性 *N*-アシルトランスフェラーゼ (iNAT) と名付けた。iNAT の NC ドメインのシステインと H ボックスのヒスチジンの点変異体をそれぞれ作製したところ不活性であった。このことと一致して、SH ブロッカーのヨード酢酸で濃度依存的に阻害された。また、iNAT は Ca²⁺ 非依存的にリン脂質から脂肪酸を遊離させるホスホリパーゼ (PL)A_{1/2} 活性を併せ持っていた。

続いて H-rev107, TIG3, HRASLS2 についても同様に検討を行ったところ、これらの組換えタンパク質も Ca²⁺ 非依存性 PLA_{1/2} 活性を示した^{44,45)}。PLA₁ 活性の方が PLA₂ 活性よりも数倍高値を示し、異なる脂肪酸鎖を有する PC や PE に対して作用した。Duncan らは H-rev107 が PLA₂ 活性を有することを報告している⁴⁶⁾。また、PE の存在下で HRASLS2 には比較的強い *N*-アシルトランスフェラーゼ活性が、H-rev107 と TIG3 には弱い同活性が検出された。さらにこれらのタンパク質は PC のアシル基をリゾ PC に転移するリゾ PC *O*-アシル化活性も保有していた。酵素活性の発現には iNAT の場合と同様に mM オーダーのジチオスレイトールが不可欠で、ヨード酢酸で濃度依存的に阻害された。H-rev107 においても NC ドメインのシステインや H ボックスのヒスチジンの変異体は不活性であった。以上の結果から HRASLS ファミリーメンバーの触媒する反応機構は LRAT のそれと類似していると考えられた。すなわち、図 5 に示すように、同メンバーはアシル基供与体であるグリセロリン脂質から脂肪酸鎖を NC ドメインのシステイン残基に転移してアシル酵素中間体を形成し、その後、共存するアシル基受容体基質が水、PE もしくはリゾリン脂質であるかによって PLA_{1/2}、*N*-アシルトランスフェラーゼもしくは *O*-アシルトランスフェラーゼとして機能し、それぞれ遊離脂肪酸、*N*-アシル PE、グリセロリン脂質を生成するものと想定された。また、proline rich domain と疎水性ドメインをそれぞれ欠失した H-rev107 の変異体も酵素活性を示さなかったことから、これらのドメインは Ras の機能制御に加えて酵素活性発現にも必要であること

A

A-C1	1	-----	1
HRASLS2	1	-----	1
H-rev107	1	-----	1
TIG3	1	-----	1
iNAT	1	MGLSPGAEGEYALRLPRIPPLPKPASRTAGTGPKDQPPALRRSAVPHSGLNSISPLELE	60
A-C1	1	-----MAFND	5
HRASLS2	1	-----	1
H-rev107	1	-----	1
TIG3	1	-----	1
iNAT	61	ESVGFAALVQLPAKQPPPGTLEQGRSIQQGEKAVVSLETTSPQKADWSSIPKPENEGKLI	120
A-C1	6	CFSLNYPGNPCPGDLIEVFRPGYCHWALYLGDGYVINIAPVDGIP-ASFTSAKSVFSSKA	64
HRASLS2	1	--MALARPRPRLGDLIEISRFGYAHWAIYVGDGYVHLAPASEIAGAGAASVLSALTNKA	58
H-rev107	1	--MRAPIPEPKPGDLIEIFRPFYRHWAIYVGDGYVHLAPPSEVAGAGAASVMSALTDKA	58
TIG3	1	--MASPHQEPKPGDLIEIFRLGYEHWALYIGDGYVIHLAPPSEYPCAGSSVFSVLSNSA	58
iNAT	121	KQAAEGKPRPRPGDLIEIFRIGYEHWAIYVEDDCVHLAPPSEEFVGG--SITSIFS NRA	178
A-C1	65	LVKMQLLKD VVGNDTYRINNKYDETPPLPVEEILKRSEFVIGQEVAYNLLVMNCEHFVT	124
HRASLS2	59	IVKKEILLSVAGGDNYRVNKHDDRYTPLPSNKIVKRAEELVGQELPYSLSLSDNCEHFVN	118
H-rev107	59	IVKKEILLYDVAGSDKYQVNNKHDDKYSPLPCSKTIQRAEELVGQEVLYKLTSENCEHFVN	118
TIG3	59	EVKRERLEDVVGCCYRVNNSLDHEYQPRPVEVILSSAKEMVGQKMKYSIVSRNCEHFVT	118
iNAT	179	VVKYSRILEDVHLGCSWKVNNKLDGTYLPLPVDKILQRTKKMVNKKIVQYSLIEGNCHEHFVN	238
A-C1	125	LLRYGEGVSEQANRAISTVEFVTAAVGVFSFLG-LFPKGQRAKYY--	168
HRASLS2	119	HLRYGVSRSDDQVTGAVTTVGVAAAGLLAAASLVGILLARSKRERQ---	162
H-rev107	119	ELRYGVARSDQVRDVI IAASVAGMGLAAMSLIGVMFSRNKRQKQ---	162
TIG3	119	QLRYGKSRCKQVEKAKVEVGVATA-LGILVVAGCSFAIRRYOKKATA	164
iNAT	239	GLRYGVPRSQQVEHALMEGAKAAGAVISAVVDSIKPKPITA-----	279

B

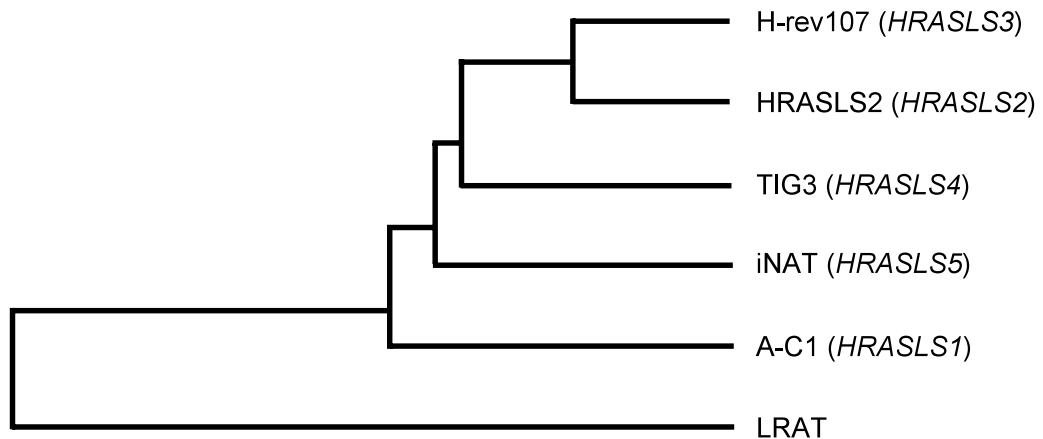


図4 HRASLS ファミリーの一次構造(A)と進化系統樹(B)

(A) proline rich domain (二重下線), H ボックス (下線), NC ドメイン (破線) および疎水性ドメイン (ボックス) を示す。*は活性中心を形成するヒスチジンとシステインを示す。(B) ヒト HRASLS ファミリーメンバーと LRAT の系統樹を示す。

が示唆された⁴⁾。著者らは A-C1 にも他のメンバーと同様の脂質代謝酵素活性を検出している(データ未発表)、ヒトで発現している5種類の HRASLS ファミリーメン

バーのすべてがグリセロリン脂質を基質とする酵素であることが明らかとなった。

上述のように HRASLS ファミリーは複数の脂質代謝酵

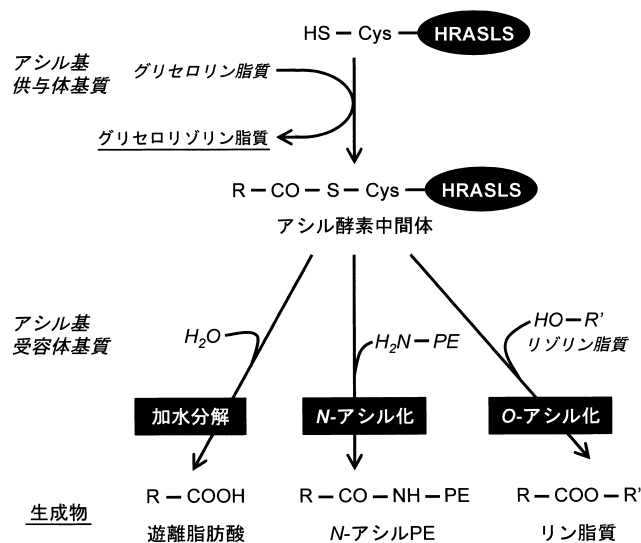


図5 HRASLSファミリーの推定反応機構

素活性を保有していることから、生体内でのN-アシルPEの生合成にどの程度関わっているかは不明であり、さらなる検討が必要である。また、同ファミリーはRasの機能を負に制御すると報告されているが、これに脂質代謝酵素活性が関与するの否かは現時点ではわかっていない。最近、H-rev107欠損マウスが作製されたが、同マウスでは脂肪組織における脂肪滴の蓄積が著しく減少していた⁴⁷⁾。高脂肪食摂取による肥満に耐性があり、同分子は脂肪組織で何らかの生理機能を発揮していると考えられる。今後、細胞レベルや個体レベルでのこれらの分子の詳細な機能解析が必要である。

3. N-アシルPEからN-アシルエタノールアミンへの変換

(1) NAPE-PLD

N-アシルPEの分解経路としては後述するようにPLA_{1/2}, C, Dによる加水分解や、その結果生じた代謝物のさらなる加水分解が報告されているが、PLDにより一段階でN-アシルPEからN-アシルエタノールアミンを切り出す反応がN-アシルエタノールアミンの主たる生合成経路と考えられてきた(図6)。植物ではPLDのβおよびγイソフォームが一般的なグリセロリン脂質に加えてN-アシルPEを基質とするが⁴⁸⁾、N-アシルPEに特異的に作用する酵素は見つかっていない³¹⁾。市販されている放線菌*Streptomyces chromofuscus*のPLDもPEと同程度にN-パルミトイルPEを加水分解する⁴⁹⁾。一方、動物組織での解析は1981年の報告に始まり⁵⁰⁾、ラットの心臓・脳やイヌの脳由来の粗酵素標品等を用いた結果からN-アシルPEを特異的に水解する新規PLDが膜画分に存在することが示され^{51~54)}、既知のPLDに特徴的なトランスホスファチジレーション(一級アルコールの存在下でグリセロリン脂質

からホスファチジルアルコールを生成する反応)を触媒しないことも報告された⁵⁴⁾。こうして本酵素はN-アシルPE水解PLD(NAPE-PLD)と呼ばれるようになったが、その実体は長らく不明であった。

著者らはNAPE-PLDをラット心臓の膜画分からオクチルグルコシドを用いて可溶化した後に部分精製し、可溶化後の本酵素がmM濃度のCa²⁺、Mg²⁺などの二価陽イオンやポリアミン類で20-30倍程度まで活性化されることを見出した^{55,56)}。さらに精製を進めて酵素タンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、データベースからマウス、ラット、ヒトにおける候補遺伝子を推定することができた。そして各cDNAをCOS-7細胞に導入して組換え酵素を発現させたところ、いずれも強いNAPE-PLD活性を認めた⁵⁷⁾。

NAPE-PLDの一次構造は推定アミノ酸数391-396からなり、分子量は45-46 kDaである。データベースで検索すると、ヒト、ラット、マウス以外にも、霊長類、ジャイアントパンダ、ウマ、ウシ、ウサギにホモログが存在し、ヒトNAPE-PLDとの比較においてアミノ酸の同一性は89%以上であった。一次構造より本酵素はメタロ-β-ラクタマーゼファミリーに属する。本ファミリーには多種類の加水分解酵素が含まれており、ファミリー内のタンパク質間で高度に保存されたヒスチジン残基とアスパラギン酸残基を含むモチーフをNAPE-PLDも有している^{49,57)}。PLD1やPLD2等のHKD/ホスファチジルトランスフェラーゼファミリーのPLD型酵素とはホモロジーを示さない。

著者らはさらに本酵素の組換え体を大腸菌で発現させて高度に精製した。精製酵素を用いた解析により、PC、PE等一般的なグリセロリン脂質とはほとんど反応せずN-アシルPEに極めて特異的であること、N-アシルリゾPEなどN-アシルPEの代謝物との反応性も低いこと、N-アシルPEのN-アシル鎖の分子種については炭素数が4以上であれば大差なく反応することが明らかになった⁴⁹⁾。すなわち、本酵素が生物作用の異なるアナンダミド、N-パルミトイルエタノールアミン、N-オレオイルエタノールアミンを区別することなく生成することが示された。この結果は生体試料中のN-アシルPEとN-アシルエタノールアミンに含まれるN-アシル鎖の分子種の存在比が類似していることと一致した。また、メタロ-β-ラクタマーゼファミリーの多くのタンパク質と似て、活性発現に必須の亜鉛を含有していた。

NAPE-PLDの体内分布については発現レベルの違いはあっても多くの臓器に広く分布していた^{56,57)}。脳では動物種に係わらず相対的に高い発現レベルが認められたが、本酵素の精製に用いた心臓での発現レベルは動物種により大きく異なっていた⁵⁸⁾。ラットの脳内での局在を検討したところ、視床で最も高値を示したがその他のすべての部位でも発現していた⁵⁹⁾。マウス脳の組織化学的観察においても

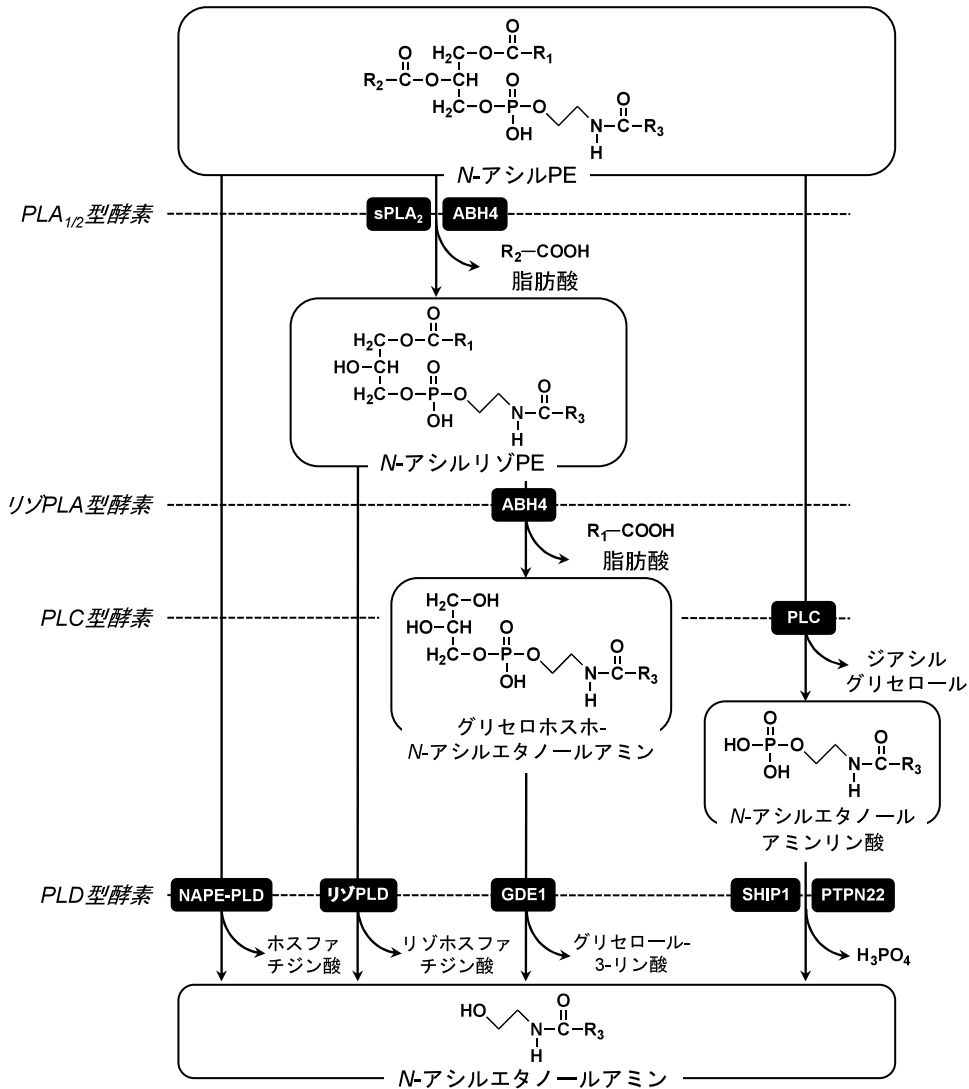


図6 N-アシル PE から N-アシルエタノールアミンへの変換経路

広範な発現が確認されたが、海馬歯状回の顆粒細胞層での発現が際立っていた⁶⁰。また軸索での強い発現は、CB1 カンナビノイドレセプターを介してシナプスの逆行性シグナルとして作用する 2-AG がシナプス後細胞で生成するのは対照的であることが注目された⁶⁰。脳内の NAPE-PLD の発現レベルは、出生直後は極めて低いですが14日目を過ぎると急激に上昇した^{59,61}。前述の N-アシルトランスフェラーゼの活性が出生直後に高く、その後低下するのは対照的であり、実際、脳虚血モデルにおける N-アシル PE の含量は出生直後のラットで著しく高値を示した³⁰。このような現象の生理的意義はわかっていない。

著者らは二価陽イオンや PE 等の生体膜成分が本酵素を活性化することを報告したが⁶¹、*in vivo* での活性調節機構は不明である。発現調節については、マクロファージ細胞 RAW264.7 をリポ多糖 (LPS) で処理すると NAPE-PLD の mRNA レベルが低下することが知られていた⁶²。最近、

LPS が NAPE-PLD 遺伝子のプロモーター領域に結合しているヒストンの脱アセチル化を促進することによって NAPE-PLD の発現レベルを抑制することが示された⁶³。併せて Sp1 が定常時の転写調節に関与することも示唆された⁶³。

NAPE-PLD の遺伝子欠損マウスの解析が Leung らによって報告されたが、マウスには明らかな表現型の異常を認めなかった⁶⁴。遺伝子欠損マウスにおける N-アシル PE と N-アシルエタノールアミンの脳内レベルを N-アシル鎖の分子種ごとに測定して野生型マウスと比較したところ、飽和脂肪酸鎖とモノエン脂肪酸鎖を有するものでは有意な N-アシル PE の増加と N-アシルエタノールアミンの減少が認められ、本酵素が確かに脳内で N-アシル PE から N-アシルエタノールアミンの生成を担っていることが証明された。ところがアナンドアミドとその前駆体の N-アラキドノイル PE のようなポリエン脂肪酸鎖を有するものでは有意

な変化は認められなかった。また遺伝子欠損マウスにおいて *N*-アシル PE から *N*-アシルエタノールアミンを生成する活性が残存していることも示された。以上の結果から、生体内での *N*-アシルエタノールアミン、とりわけアナンダミドの生成には NAPE-PLD 以外の酵素が関与する代謝経路の存在することが明らかになった。

(2) NAPE-PLD 非依存性経路

NAPE-PLD 非依存性経路の提唱は 1984 年にさかのぼる⁵²⁾。すなわち、イヌ脳のホモジネートにより *N*-アシル PE から *N*-アシルエタノールアミンが生成する際に、*sn*-1 位または *sn*-2 位の脂肪酸鎖が脱離 (*O*-脱アシル化) した *N*-アシルリゾ PE や、その両方が脱離したグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンが代謝中間体として生成することが報告された (図 6)。本報告ではこれらの代謝中間体から *N*-アシルエタノールアミンを遊離するホスホジエステラーゼ活性を検出しているが、関与する酵素の解析は行われなかった。

著者らは 2004 年に *N*-アシル PE の *O*-脱アシル化を触媒するほ乳類の PLA_{1/2} 様酵素について初めて報告した⁶⁵⁾。この活性はラットの種々の臓器に分布していたが、胃で最も高い活性を示した。タンパク質精製の結果、胃の酵素は分泌性 PLA₂ (sPLA₂)-IB であることが判明した。さらに組換え酵素を用いた検討により、IB, IIA, V 型の sPLA₂ に *N*-アシル PE 水解活性を認めたが、X 型 sPLA₂ や細胞質 PLA₂α ではほとんど認められなかった。PLA₂ によって生成される *sn*-2 位の脂肪酸鎖を欠いた *N*-アシルリゾ PE を *N*-アシルエタノールアミンに変換する“リゾ PLD”活性は、ラットの様々な組織において認められたが、脳と精巣で最も高い活性を示した。NAPE-PLD 自体も弱いリゾ PLD 活性を示すが、本活性とは酵素学的性質が異なることからそれ以外の酵素の関与が想定された。しかしながら酵素タンパク質の同定には至らなかった。

2006 年には前述の NAPE-PLD 欠損マウスの解析によって、*N*-アシル PE の *sn*-1 位と *sn*-2 位の脂肪酸鎖が順次脱離することで *N*-アシルリゾ PE を介してグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンが生成し、その後 *N*-アシルエタノールアミンが遊離される経路が再び提唱された⁶⁶⁾。*sn*-1 位と *sn*-2 位からの脂肪酸の脱離はメチルアラキドニルフルオロホスホネート (MAFP) によって阻害されることから、セリン加水分解酵素の関与が示唆された。フルオロホスホネート-ビオチンプローブを用いたプロテオミクス解析により、それまで機能が不明であった α/β ヒドロラーゼ 4 (ABH4) が責任酵素として同定された。本酵素の組換え体は *N*-アシル PE や *N*-アシルリゾ PE の *O*-脱アシル化を触媒したが、リゾ PE, リゾ PC, リゾ PS といった他のリズリン脂質には活性を示さなかった。マウスにお

いて *N*-アシルリゾ PE 水解活性は脳、脊髄、精巣で高値を示し、ABH4 の mRNA 分布とよく一致した。このことから本酵素が NAPE-PLD 非依存性経路に含まれ、*N*-アシルリゾ PE の加水分解を担う主要な酵素と考えられる。

グリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンからの *N*-アシルエタノールアミンの生成を触媒する酵素については、2008 年に初めて報告がなされた⁶⁷⁾。マウスの脳におけるグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンの含量が *N*-アシルエタノールアミン含量の約 1/10 に過ぎないことから、グリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンの分解活性の高いことが示唆された。脳ホモジネートを EDTA の存在下でインキュベートするとグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンが蓄積することから、EDTA 感受性の酵素の関与が示唆された。グリセロホスホジエステラーゼ (GDE)1 は GDE ファミリーのメンバーの一つであり、グリセロホスホイノシトールを水解する酵素として知られる⁶⁸⁾。GDE ファミリーのうち 5 種類 (GDE1-4, 7) の組換え体を検討したところ、GDE1 のみがグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンから *N*-アシルエタノールアミンを遊離する活性を持ち、この活性は Mg²⁺ で増強し、EDTA や Ca²⁺ で阻害された。一連の酵素学的特徴はマウス脳におけるグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミン水解活性のそれとよく一致した。また、マウスにおいて本活性は脳、脊髄、肝臓、腎臓、精巣で比較的高値を示し、GDE1 の mRNA 分布とよく一致した。以上の結果から本酵素がグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンから *N*-アシルエタノールアミンを遊離させる責任酵素であると考えられた。しかしながら、ABH4 や GDE1 は *N*-アシル基の分子種を区別しないことから、この NAPE-PLD 非依存性経路はアナンダミドのようなポリエン脂肪酸を含有する *N*-アシルエタノールアミンの生成に特異的に関与する経路ではなさそうであった。

2010 年に GDE1 の欠損マウスが報告された⁶⁹⁾。本マウスの脳ホモジネートには、*N*-アシルリゾ PE やグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンからの *N*-アシルエタノールアミンの生成活性がほとんど見られず、*in vitro* の系において本酵素が *N*-アシルリゾ PE からグリセロホスホ-*N*-アシルエタノールアミンを介して *N*-アシルエタノールアミンを生成する過程に貢献することが確認された。しかしながら、脳での *N*-アシルエタノールアミンの含量は GDE1 欠損マウスと野生型の間で変わらず、また NAPE-PLD 欠損マウスと NAPE-PLD/GDE1 二重欠損マウスの間でも差は見られなかった。さらに、この二重欠損マウスの脳の初代培養系においても放射標識 *N*-アシル PE からの *N*-アシルエタノールアミンの生成が認められたことから、GDE1 にも NAPE-PLD にも依存しない新たな経路の存在が示唆された。

今一つの経路として、*N*-アシル PE から PLC 型の反応で *N*-アシルエタノールアミンリン酸が遊離し、引き続いて起こる脱リン酸化により *N*-アシルエタノールアミンが生成する経路が示唆されている (図 6)。この経路は主にマクロファージ細胞 RAW264.7 で解析されているが、マウスの脳にも存在すると考えられている。RAW264.7 では LPS の刺激により NAPE-PLD 非依存性のアナンダミド産生が亢進する^{62,70)}。PLC 阻害剤であるネオマイシンによってこの産生亢進が阻害されることから、このアナンダミド産生に PLC 型酵素の関与が示唆されたが、それ以上の解析はなされていない。アナンダミドリン酸の脱リン酸化反応へのチロシンホスファターゼ PTPN22 の関与が、RAW 264.7 での siRNA を用いた実験や、PTPN22 欠損マウスの脳の解析により報告されている⁶²⁾。加えて、イノシトールリン酸 5-ホスファターゼ SHIP1 も同様の脱リン酸化反応を触媒した⁷⁰⁾。NAPE-PLD 欠損マウスの脳ホモジネートを用いて *N*-アラキドノイル PE からのアナンダミドの生成経路を検討したところ、10 分以内の短いインキュベーションでは PLC を介する経路が優位であり、60 分程度の長いインキュベーションでは ABH4 を介する経路が優位であった⁷⁰⁾。

4. おわりに

1980 年代に Schmid らのグループが確立した *N*-アシル PE の代謝経路については、著者らのグループが報告した NAPE-PLD の cDNA クローニングを契機として分子生物学的解析が急速に進んだ。その結果、当初考えられていた以上に多種類の酵素が *N*-アシル PE の生成と分解に関与していることが明らかになりつつある。一方、動物組織における主要な合成酵素と考えられる Ca²⁺ 依存性 *N*-アシルトランスフェラーゼの実体が未だに不明であるなど解決すべき重要な課題が残されていて、今後の進展が待たれる。また、*N*-アシルエタノールアミンの前駆体として注目されることの多い *N*-アシル PE であるが、それ自体の生体内での役割についての解明も急がれる。

文 献

- Schmid, H.H.O., Schmid, P.C., & Natarajan, V. (1990) *Prog. Lipid Res.*, **29**, 1-43.
- 小林哲幸 (1992) 生化学, **64**, 41-45.
- Bomstein, R.A. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 49-54.
- Epps, D.E., Natarajan, V., Schmid, P.C., & Schmid, H.H.O. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 420-430.
- Nelson, G.J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 261-265.
- Kuehl, Jr., F.A., Jacob, T.A., Ganley, O.H., Ormond, R.E., & Meisinger, M.A.P. (1957) *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5577-5578.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., & Bonner, T.I. (1990) *Nature*, **346**, 561-564.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992) *Science*, **258**, 1946-1949.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., & Piomelli, D. (1994) *Nature*, **372**, 686-691.
- van der Stelt, M. & Di Marzo, V. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1827-1834.
- Hansen, H.S. & Diep, T.A. (2009) *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 553-560.
- Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., & Gokoh, M. (2006) *Prog. Lipid Res.*, **45**, 405-446.
- Lambert, D.M., Vandevoorde, S., Jonsson, K.-O., & Fowler, C. J. (2002) *Curr. Med. Chem.*, **9**, 663-674.
- LoVerme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., & Piomelli, D. (2005) *Life Sci.*, **77**, 1685-1698.
- Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gómez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., Murillo-Rodríguez, E., Giuffrida, A., LoVerme, J., Gaetani, S., Kathuria, S., Gall, C., & Piomelli, D. (2001) *Nature*, **414**, 209-212.
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., & Piomelli, D. (2003) *Nature*, **425**, 90-93.
- Overton, H.A., Babbs, A.J., Doel, S.M., Fyfe, M.C.T., Gardner, L.S., Griffin, G., Jackson, H.C., Procter, M.J., Rasamison, C. M., Tang-Christensen, M., Widdowson, P.S., Williams, G.M., & Reynet, C. (2006) *Cell Metab.*, **3**, 167-175.
- Sandoval, J.A., Huang, Z.H., Garrett, D.C., Gage, D.A., & Chapman, K.D. (1995) *Plant Physiol.*, **109**, 269-275.
- Gillum, M.P., Zhang, D., Zhang, X.-M., Erion, D.M., Jamison, R.A., Choi, C., Dong, J., Shanabrough, M., Duenas, H.R., Frederick, D.W., Hsiao, J.J., Horvath, T.L., Lo, C.M., Tso, P., Cline, G.W., & Shulman, G.I. (2008) *Cell*, **135**, 813-824.
- Shiratsuchi, A., Ichiki, M., Okamoto, Y., Ueda, N., Sugimoto, N., Takuwa, Y., & Nakanishi, Y. (2009) *J. Biochem.*, **145**, 43-50.
- McKinney, M.K. & Cravatt, B.F. (2005) *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 411-432.
- Ueda, N., Tsuboi, K., & Uyama, T. (2010) *Prog. Lipid Res.*, **49**, 299-315.
- Di Marzo, V. (2008) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 438-455.
- Ueda, N., Tsuboi, K., & Uyama, T. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**, 1274-1285.
- Hansen, H.S., Moesgaard, B., Hansen, H.H., & Petersen, G. (2000) *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 135-150.
- Schmid, H.H.O. (2000) *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 71-87.
- Jin, X.-H., Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 3614-3623.
- Cadas, H., di Tomaso, E., & Piomelli, D. (1997) *J. Neurosci.*, **17**, 1226-1242.
- Natarajan, V., Schmid, P.C., & Schmid, H.H.O. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **878**, 32-41.
- Moesgaard, B., Petersen, G., Jaroszewski, J.W., & Hansen, H. S. (2000) *J. Lipid Res.*, **41**, 985-990.
- Kilaru, A., Blancaflor, E.B., Venable, B.J., Tripathy, S., Mysore, K.S., & Chapman, K.D. (2007) *Chem. Biodivers.*, **4**, 1933-1955.
- Faure, L., Coulon, D., Laroche-Traineau, J., Le Guedard, M., Schmitter, J.M., Testet, E., Lessire, R., & Bessoule, J.J. (2009)

- J. Biol. Chem.*, **284**, 18734–18741.
- 33) Hughes, P.J. & Stanway, G. (2000) *J. Gen. Virol.*, **81**, 201–207.
- 34) Anantharaman, V. & Aravind, L. (2003) *Genome Biol.*, **4**, R 11.
- 35) Hajnal, A., Klemenzen, R., & Schäfer, R. (1994) *Oncogene*, **9**, 479–490.
- 36) Sers, C., Emmenegger, U., Husmann, K., Bucher, K., Andres, A.C., & Schäfer, R. (1997) *J. Cell Biol.*, **136**, 935–944.
- 37) DiSepio, D., Ghosn, C., Eckert, R.L., Deucher, A., Robinson, N., Duvic, M., Chandraratna, R.A., & Nagpal, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 14811–14815.
- 38) Akiyama, H., Hiraki, Y., Noda, M., Shigeno, C., Ito, H., & Nakamura, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 32192–32197.
- 39) Shyu, R.-Y., Hsieh, Y.-C., Tsai, F.-M., Wu, C.-C., & Jiang, S.-Y. (2008) *Amino Acids*, **35**, 129–137.
- 40) Nazarenko, I., Schäfer, R., & Sers, C. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 1393–1404.
- 41) Jahng, W.J., Xue, L., & Rando, R.R. (2003) *Biochemistry*, **42**, 12805–12812.
- 42) Xue, L. & Rando, R.R. (2004) *Biochemistry*, **43**, 6120–6126.
- 43) Jin, X.-H., Uyama, T., Wang, J., Okamoto, Y., Tonai, T., & Ueda, N. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 32–38.
- 44) Uyama, T., Morishita, J., Jin, X.-H., Okamoto, Y., Tsuboi, K., & Ueda, N. (2009) *J. Lipid Res.*, **50**, 685–693.
- 45) Uyama, T., Jin, X.-H., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 1114–1124.
- 46) Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Jaworski, K., Ahmadian, M., & Sul, H.S. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 25428–25436.
- 47) Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., Lee, H.Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Kim, K.H., de Val, S., Kang, C., & Sul, H.S. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 159–168.
- 48) Pappan, K., Austin-Brown, S., Chapman, K.D., & Wang, X. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **353**, 131–140.
- 49) Wang, J., Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Miyatake, A., & Ueda, N. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 12325–12335.
- 50) Natarajan, V., Reddy, P.V., Schmid, P.C., & Schmid, H.H.O. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 445–448.
- 51) Schmid, P.C., Reddy, P.V., Natarajan, V., & Schmid, H.H.O. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 9302–9306.
- 52) Natarajan, V., Schmid, P.C., Reddy, P.V., & Schmid, H.H.O. (1984) *J. Neurochem.*, **42**, 1613–1619.
- 53) Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Tonegawa, T., Nakane, S., Yamashita, A., Ishima, Y., & Waku, K. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **240**, 53–62.
- 54) Petersen, G. & Hansen, H.S. (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 41–44.
- 55) Ueda, N., Liu, Q., & Yamanaka, K. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1532**, 121–127.
- 56) Liu, Q., Tonai, T., & Ueda, N. (2002) *Chem. Phys. Lipids*, **115**, 77–84.
- 57) Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 5298–5305.
- 58) Moesgaard, B., Petersen, G., Mortensen, S.A., & Hansen, H.S. (2002) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **131**, 475–482.
- 59) Morishita, J., Okamoto, Y., Tsuboi, K., Ueno, M., Sakamoto, H., Maekawa, N., & Ueda, N. (2005) *J. Neurochem.*, **94**, 753–762.
- 60) Egertová, M., Simon, G.M., Cravatt, B.F., & Elphick, M.R. (2008) *J. Comp. Neurol.*, **506**, 604–615.
- 61) Wang, J., Okamoto, Y., Tsuboi, K., & Ueda, N. (2008) *Neuropharmacology*, **54**, 8–15.
- 62) Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.-Y., & Kunos, G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 13345–13350.
- 63) Zhu, C., Solorzano, C., Sahar, S., Realini, N., Fung, E., Sassone-Corsi, P., & Piomelli, D. (2011) *Mol. Pharmacol.*, **79**, 786–792.
- 64) Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M., & Cravatt, B.F. (2006) *Biochemistry*, **45**, 4720–4726.
- 65) Sun, Y.-X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., & Ueda, N. (2004) *Biochem. J.*, **380**, 749–756.
- 66) Simon, G.M. & Cravatt, B.F. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 26465–26472.
- 67) Simon, G.M. & Cravatt, B.F. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 9341–9349.
- 68) Zheng, B., Berrie, C.P., Corda, D., & Farquhar, M.G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 1745–1750.
- 69) Simon, G.M. & Cravatt, B.F. (2010) *Mol. Biosyst.*, **6**, 1411–1418.
- 70) Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., Razdan, R.K., & Kunos, G. (2008) *Neuropharmacology*, **54**, 1–7.