

報告番号

香大医博甲 第 786号

様式107

学位論文審査の結果の要旨

令和 2022年 2月 1日

審査委員	主査	和 田 佳 司 (和)		
	副主査	中 村 隆 範 (中)		
	副主査	神 鳥 成 弘 (神)		
願出者	専攻	医学	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)
	学籍 番号	18D710	氏名	GUO YIMAN
論文題目	Involvement of the γ Isoform of cPLA ₂ in the Biosynthesis of Bioactive <i>N</i> -Acylethanolamines			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

〔要旨〕

Introduction:

Long-chain fatty acyl ethanolamides (*N*-acylethanolamines, NAEs) are lipid molecules widely present in animal and plant tissues and exhibit various biological activities. In mammalian tissues, NAEs are biosynthesized from membrane phospholipids in two enzyme reactions. In the first reaction, *N*-acyl-phosphatidylethanolamines (NAPEs), a class of phospholipids with three fatty acyl chains, are produced by the catalysis by *N*-acyltransferase. In the second reaction, NAEs are directly produced from NAPEs by the phospholipase D-type enzyme NAPE-PLD or by a combination of two or more hydrolases via *N*-acyl-lysophosphatidylethanolamines (lysoNAPEs).

The cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) family is a group of phospholipid-metabolizing enzymes, consisting of six isoforms (α , β , γ , δ , ϵ , and ζ). Among them, the ϵ isoform (cPLA₂ ϵ , also referred to as PLA₂G4E) is known to function as a Ca²⁺-dependent *N*-acyltransferase to produce NAPEs. However, it remained unclear whether other five isoforms are also involved in the biosynthesis of NAEs.

Aim:

In this study, we investigated whether the isoforms (α , β , γ , δ , and ζ) other than ϵ in the cPLA₂ family could be involved in the biosynthesis of NAEs using cells overexpressing recombinant enzymes as well as purified enzymes.

Methods and Results:

Vectors expressing each of the six isoforms of mouse cPLA₂ and transiently overexpressed recombinant isoform proteins were constructed alone or in combination in HEK293 cells. These cells were metabolically labeled with [¹⁴C]ethanolamine, followed by the stimulation with Ca²⁺ ionophore. Radiolabeled lipids were then extracted, separated by thin-layer chromatography, and quantified.

Firstly, when the cells overexpressing one of the isoforms were analyzed, the increase in the production of [¹⁴C]NAPE was observed only with the ϵ isoform-expressing cells. Secondly, when the cells co-expressing ϵ and one of the other isoforms were analyzed, the increase in [¹⁴C]lysoNAPE

and [¹⁴C]NAE was seen with the combination of ϵ and γ isoforms. Furthermore, the purified preparation of recombinant γ isoform hydrolyzed not only NAPE to lysoNAPE (by phospholipase A₁/A₂ activity), but also lysoNAPE to glycerophospho-*N*-acylethanolamine (by lysophospholipase activity), which could be further hydrolyzed to NAE by another enzyme, glycerophosphodiesterase 1.

Conclusion:

These results suggested that five isoforms (α , β , γ , δ , and ζ) other than ϵ do not have *N*-acyltransferase activity but the γ isoform is involved in the biosynthesis of NAE by its phospholipase A₁/A₂ and lysophospholipase activities.

令和4年2月1日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

1. 遺伝子欠損マウスについて *N*-アシルエタノールアミン合成に関わる酵素の報告の有無は如何 (倉原)。

回答: *N*-アシル-PE から *N*-アシルエタノールアミンを生成する NAPE-PLD の遺伝子欠損マウスが作成されており、肥満との関連が報告されている。

2. ABHD4 にどのような役割を想定しているのか (倉原)。

回答: RT-PCR の結果から脳における cPLA₂ γ の発現は低く、cPLA₂ γ は末梢組織において *N*-アシルエタノールアミン合成への関与が考えられる。

3. 薄層クロマトグラフィーにおける solvent として 2 種類用いているが、違いはあるのか (倉原)。

回答: 今回用いた 2 種類の solvent は pH が異なり、分離する脂質に合わせて使用した。

4. マウスの cPLA₂ γ をヒトの細胞で発現させている理由は何か (神鳥)。

回答: HEK293 細胞は様々な目的で当研究室をはじめ幅広く使用されている。

5. cPLA₂ ファミリーがもつ C2 ドメインの機能は何か (神鳥)。

回答: cPLA₂ ファミリーの酵素活性はカルシウム依存的で、C2 ドメインによって担われている。cPLA₂ γ は C2 ドメインを有さず、酵素活性もカルシウム依存性を示さない。

6. ウェスタンブロッティングの図で複数のバンドが認められる (神鳥)。

回答: 今回用いた組み換えタンパク質は N 末端に FLAG タグを付加しており、FLAG タグに対する抗体で検出している。複数見られるバンドは本来の分子量よりも小さく、分解産物と考えられる。

7. *N*-アシルエタノールアミンは細胞内のどこに局在しているのか (中村)。

回答: *N*-アシルエタノールアミンの生理機能はアシル基によって異なっており、細胞膜で合成された後、核内受容体に作用する場合は細胞質に移行し、細胞膜受容体に作用する場合は細胞外に放出された後に作用すると考えられている。

8. cPLA₂ γ は ABHD4 よりも細胞内での発現量が多い。活性への発現量の影響の有無は如何 (中村)。

回答: その可能性も考えられる。今後、発現させる方法や異なる細胞を用いて検討する必要がある。

9. cPLA₂ γ の *N*-アシル-PE に対する *K*_m はどの程度か (中村)。

回答: 今回 *K*_m の検討は行っていない。今後、精製酵素を用いた性状解析が必要である。

10. 今後 cPLA₂ ファミリーの他の分子 (cPLA₂ β , δ , ζ) の解析を進めるとある。その方法は如何 (和田)。

回答: cPLA₂ β , δ , ζ の精製酵素等を用いて、*N*-アシルエタノールアミンの合成への関与を検討する。*N*-アシルエタノールアミン合成の過程で生成する複数の中間体の活性も検討する。

11. cPLA₂ ファミリーの構造は類似しているか (和田)。

回答: 触媒ドメインであるリパーゼドメインはすべての分子に共通しており、酵素活性に重要な Ser や Asp が保存されている。また、cPLA₂ γ を除くすべての分子がカルシウムとの結合に重要である O2 ドメインを保有している。

12. cPLA₂ γ は基質である *N*-アシル-PE に対してアシル基特異性を示すか (和田)。

回答: 今回の実験では *N*-パルミトイル-PE のみを対象としており、基質特異性は不明である。今後、他のアシル基をもつ *N*-アシル-PE についても検討する。

以上のように申請者はいずれの質疑に的確に回答した。本論文はcPLA₂ γ が、ホスホリパーゼA₁/A₂およびリゾホスホリパーゼ活性によってNAEの合成に関与する可能性を示した点で学術的価値が高い。本審査委員会では審査員全員一致で博士(医学)論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲 載 誌 名	Molecules 第26巻、第17号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2021年 8月	出版社(等)名	Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。