

201023046B

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新規生体膜生合成酵素と生理活性脂質 (PAF) 生合成  
酵素の機能解析  
(H20-免疫-若手-028)

平成20-22年度 総合研究報告書

研究代表者 進藤 英雄

平成23 (2011) 年 4月



I.	総括研究報告 新規生体膜生合成酵素と生理活性脂質 (PAF) 生合成酵素の機能解析 進藤英雄	1
II.	分担研究報告 なし	
2	III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 1
	IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 13

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
（総括）総合研究報告書

新規生体膜生合成酵素と生理活性脂質（PAF）生合成酵素の機能解析

研究代表者 進藤 英雄 東京大学大学院医学系研究科 助教

生体膜の主成分はリン脂質であり、細胞の形態や機能に影響を与えていると考えられる。その生体膜は組織によって多種多様であり、約1000種類あると考えられている。1950年代に、この多様なリン脂質の一部はリゾリン脂質アシル転移酵素によって形成されることが報告され、その生合成経路はランズ回路と呼ばれた。それから50年間その遺伝子群は不明であったが、近年私達はリゾリン脂質アシル転移酵素ファミリーを発見した。また、強力な免疫アレルギーのメディエーターである血小板活性化因子（PAF）もリン脂質であり、その生合成酵素も私達は初めて同定し、LPCAT1とLPCAT2と名付けた。これらもリゾリン脂質アシル転移酵素である。これら新規に同定されたリゾリン脂質アシル転移酵素を解析し、マクロファージなどの炎症細胞における生体膜生合成やPAF生合成メカニズムの解明を目指す。

#### A. 研究目的

生体膜の主成分であるリン脂質は組織や細胞によって多種多様であり、血小板活性化因子（PAF）のような炎症性物質も含まれる。PAFは炎症や免疫を惹起する強力なメディエーターである。この生体膜の多様性は、脂肪酸を再結合させるリゾリン脂質アシル転移酵素によるリン脂質の代謝回転によって作られ、50年前にランズ回路と名付けられている。ランズ回路発見以来進展が難しかった分野であるが、近年リゾリン脂質アシル転移酵素分子が次々と同定され、急展開をみせている。私達はそのうち6種類の同定に成功した。中には血小板活性化因子（PAF）生合成酵素を含んだ。さらに、このうち3種類は新たなアシル転移酵素遺伝子ファミリーを形成していた。PAF生合成酵素は2種類存在し、リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素（LPCAT）1とLPCAT2である。LPCAT2はマクロファージにおいて

リポポリサッカライド（LPS）刺激で活性化や遺伝子誘導されることもわかった。これらの酵素群の機能解析を行うことによって、マクロファージなどの炎症細胞での生体膜形成メカニズムやPAF産生メカニズムを解明する。そして、免疫、アレルギーに強い細胞環境（膜）の解明やPAF関連疾患の治療を目指す。

#### B. 研究方法

リゾリン脂質アシル転移酵素はリゾリン脂質にアシルCoAから脂肪酸を転移する活性を持つ。例えばリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素（LPCAT）はリゾホスファチジルコリン（LPC）からホスファチジルコリン（PC）を生合成する酵素である。これまで、我々が同定したリゾリン脂質アシル転移酵素は、（i）肺に多くPAFと呼吸に必須な肺サーファクタント脂

質を合成するLPCAT1と (ii) マクロファージに多いPAF生合成酵素であるLPCAT2、 (iii) 精巣に多くアラキドン酸を貯蔵するリゾホスファチジン酸アシル転移酵素3 (LPAAT3)、さらに、新規に発見した遺伝子ファミリーからは恒常的に生体膜を合成すると考えられる酵素 (iv) LPCAT3、(v) LPCAT4、(vi) リゾホスファチジルエタノールアミンアシル転移酵素1 (LPEAT1)である。これら6分子を中心に、全てのリゾリン脂質アシル転移酵素をターゲットとして研究を進めている。

1年目として以下の実験を行った  
(1-1) 2番目のPAF生合成酵素 (リゾPAFアセチル転移酵素) の同定  
これまで、PAF生合成酵素 (リゾPAFアセチル転移酵素) は反応にCaを要求することが酵素遺伝子を特定しない実験 (組織抽出タンパク質) から報告されていた。実際に我々が同定したLPCAT2はCa要求性のPAF生合成酵素であった。しかし、今回Ca非要求性のPAF生合成酵素活性を主にマウス肺で見つけた。肺のミクロソーム画分を界面活性剤であるBIGCHAPで可溶化し陰イオン交換カラムであるDEAEセファロースカラム (GE) で部分精製した。分離にはAKTA explorer 10S (GE)を用いた。

(1-2) LPCAT1の酵素学的解析  
LPCAT1の基質 (アシルCoA) 結合部位や活性中心の推定を目的とし、保存性の高いモチーフを中心に詳細な点変異解析を行った。また、マウスマクロファージにおいてtoll-like受容体4 (TLR4)、TLR3、TLR9アゴニストによる自然免疫刺激が酵素の活性や遺伝子発現に与える影響を調べた。

(2) 新規リゾリン脂質アシル転移酵

## 素の発見

既知のアシル転移酵素モチーフを基に候補遺伝子が複数見つけられている。その中から1-acylglycerol-3-phosphate 0-acyltransferase 3 (AGPAT3)に注目し、網羅的にアシル転移酵素活性測定を行った。さらにAGPAT3の高発現組織やmRNA発現誘導などを調べた。

2年目として以下の実験を行った

(1) ヒト恒常型PAF生合成酵素 (リゾPAFアセチル転移酵素) LPCAT1の解析

これまで、PAF生合成酵素 (リゾPAFアセチル転移酵素) はリポポリサッカライドによって活性化や誘導されるLPCAT2と、そのような調節を受けないLPCAT1があった。また、LPCAT1は呼吸に必須な肺サーファクタント脂質の生合成も行う。我々はマウスやラットLPCAT1で生化学的な解析を行ってきたが、米国のグループからヒトLPCAT1が酵素活性を持たないと報告があった。そこで、詳細に検討した。

方法としてはヒトLPCAT1をクローニングし、酵素活性測定方法の詳細な検討、また、ヒトmRNAを用いた発現解析、点変異解析、データベースを利用した進化系統樹解析を行った。

(2) 活性に必要なMBOATモチーフの探索

リゾリン脂質アシル転移酵素として1-acylglycerol-3-phosphate 0-acyltransferase (AGPAT)ファミリーがよく知られており、活性必要なモチーフや基質結合部位が予測されていた。しかし、我々が、新規に発見したMBOATファミリーはそのような情報がほとんどなかった。遺伝子群に保存性の高い領域を選び21カ所以上 (論文



では21カ所) のアミノ酸をAlaに置換し、酵素活性を調べた。代表としてLPCAT3を選びLPCAT、LPEAT、LPSAT活性を調べた。

### 3年目として以下の実験を行った LPCAT2のリン酸化の解析

RAW264.7細胞にLPCAT1とLPCAT2を過剰発現させてリポポリサッカライド(LPS)で30分間刺激した。これらの試料をphos-tag SDS-PAGEで解析した。phos-tagはリン酸化タンパク質と結合しSDS-PAGE上バンドをシフトさせるものである。

シフトしたバンドを切り出し回収し、質量分析計で解析し、リン酸化部位を34番目のSerと特定した。34番目のSer近辺の配列はほ乳動物に非常に良く保存されていた。S34A変異体とS34D変異体を作製しリン酸化と酵素活性を調べた。酵素の発現量に差は無かった。

LPCAT2をリン酸化する分子を調べるためLPSシグナル下流分子であるTAK1、p38 MAPK、MK2の阻害剤の効果を調べた。MK2 siRNAも用いて同様に調べた。

酵素活性測定は放射ラベルされた基質を用いて反応し、Bligh-Dyer法で反応産物であるリン脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離後、放射活性をカウントした。遺伝子変動はtotal RNAを抽出し定量的PCRを行い解析した。

## C. 研究結果

1年目

### (1-1) 2番目のPAF生合成酵素(リゾPAFアセチル転移酵素)の同定

マウス肺のミクロソーム画分からAKTA explorer 10Sを用いて部分精製した。陰イオン交換カラムであるDEAEセファロースカラムに酵素は吸着し、NaClにより容出された。既知のPAF生合成酵素であるLPCAT2と最も相同性が高く肺に強く発現するアシル転移酵素はLPCAT1であったため、各画分を抗LPCAT1抗血清を用いて発現を調べると酵素活性と抗LPCAT1抗血清による検出パターンがほぼ一致した。そこで生化学的にLPCAT1の基質特異性を詳しく調べると、LPCAT1もPAF生合成酵素活性をもつことがわかった。この活性はLPCAT2と異なり、Ca非要求性であった。また、MgやMnも酵素活性に必要としなかった。

### (1-2) LPCAT1の酵素学的解析

今回、LPCAT1は2種類の活性を持つことがわかった。一つは肺サーファクタント脂質合成活性(アシル転移活性; PC生合成)、もう一つはPAF生合成活性(アセチル転移活性; 炎症メディエーター)。それぞれの活性に必要なアミノ酸も点変異解析により同定した。特に、Ile160はアシル転移活性に、Phe174、Val175、Arg177はアセチル転移活性必須であった。Arg177はCoAと結合すると予測できた。

さらに、マウスチオグリコレートマクロファージをTLR4、TLR3、TLR9アゴニストで長時間(16時間程度)刺激するとLPCAT2の発現が約9倍に上昇したがLPCAT1は誘導されなかった。また、短時間刺激(30分程度)でもLPCAT2が活性化されたが、LPCAT1活性は変動しなかった。

### (2) 新規リゾリン脂質アシル転移酵

## 素の発見

AGPAT3はリゾホスファチジン酸アシル転移酵素(LPAAT)活性とリゾホスファチジルイノシトールアシル転移酵素(LPIAT)活性をアラキドノイルCoA(20:4-CoA)をドナーとして示した。これはグリセロール骨格sn-2位にアラキドン酸を持つホスファチジン酸(PA)とホスファチジルイノシトール(PI)を合成することになる。酵素活性からAGPAT3をLPAAT3に改名した。アシル転移酵素モチーフの一部をAlaに置換した変異体では両活性が認められなかった。マウス組織でのmRNA発現は主に精巣であった。さらにマウス精巣において週齢に応じてLPAAT3の発現量が上昇した。さらに精巣培養細胞TM4をエストラジオール17βで刺激するとLPAAT3 mRNA発現量が4倍に上昇した。

## 2年目

### (1) ヒト恒常型PAF合成酵素(リゾPAFアセチル転移酵素) LPCAT1の解析

ヒトLPCAT1をクローニングした。ヒト培養細胞A549、HEK293、Hela細胞に弱いながら発現していることをmRNAとタンパク質レベルで確認した。我々が作製した抗LPCAT1抗血清はヒトLPCAT1もマウスLPCAT1も認識できる。また、糖鎖修飾を予測するAsn169があったが、そのような修飾はなされていなかった。次にアシル転移酵素活性を調べた。マウスやラットのLPCAT1と同様にヒトLPCAT1もLPCAT活性、リゾホスファチジルグリセロール(LPGAT)活性、PAF合成活性(リゾPAFアセチル転移酵素活性)を持った。LPGAT活性はPGを合成し、肺サーファクタント脂質のPCに次いで2番目に多いリン脂質である。これらの酵素活性はCa非要求性であった。

次にLPCAT1が属するAGPATファミリー遺伝子を比較し、LPCAT活性として重要と思われるCys211変異体を作製した。LPCAT活性とLPGAT活性を失った。実際に、ヒトLPCAT1はリゾリン脂質アシル転移酵素として働くことがわかった。

ヒトcDNAを鋳型にLPCAT1の発現分布を調べると、マウスと同様に肺に高い発現が認められた。さらに、ゲノムデータベースを利用して、各動物種におけるLPCAT1の保存性を調べると、肺または肺の相同器官を持つ動物種にLPCAT1が保存されていることがわかった。

### (2) 活性に必要なMBOATモチーフの探索

リゾリン脂質アシル転移酵素ファミリーはAGPATファミリーとMBOATファミリーの2種類である。これまで、詳細に検討されていたAGPATファミリーはそのモチーフなども解析されており阻害剤から創薬へ向けて研究が進んでいる。一方のMBOATファミリーは我々が2008年に発見した新しいファミリーで情報が少ない。そこで、このファミリーに保存性の高いアミノ酸21カ所をAlaに置換して酵素活性を測定した。結果、LPCAT3においてモチーフA(<sup>313</sup>WD)、モチーフB(<sup>373</sup>WHGxxxGYxxxF)、モチーフC(<sup>434</sup>YxxxxF)、モチーフD(<sup>451</sup>YxxxYFxxH)の4カ所のモチーフを決定できた。タンパク質を基質とするアシル転移酵素にはモチーフA、C、Dは保存されていないことからリゾリン脂質の認識に重要だと推測できた。

## 3年目

### LPCAT2のリン酸化の解析

LPCAT1はLPSによって活性化されな



ったがLPCAT2は活性が上昇した。phos-tag SDS-PAGE上でもLPCAT2は刺激依存的にバンドシフトを示した。S34A変異体は活性が低下し、LPSによる活性化もされなかった。S34D変異体は無刺激の活性が上昇し、活性化されなかった。PAF生合成活性（リゾPAFアセチル転移活性）とPC生合成活性（リゾPAFアシル転移活性）とで同様の結果が得られた。

TAK1の阻害剤でp38 MAPK、MK2、LPCAT2のリン酸化が阻害された。p38 MAPKの阻害剤SB203580でも、MK2、LPCAT2のリン酸化が抑制された。MK2の阻害剤でもLPCAT2リン酸化が阻害された。MK2 siRNAも同様の効果を示し、LPCAT2リン酸化が抑制された。PAF生合成活性（リゾPAFアセチル転移活性）はコントロールでは活性化されたが、MK2 siRNAでは変動しなかった。PAF生合成活性（リゾPAFアセチル転移活性）とPC生合成活性（リゾPAFアシル転移活性）とで同様の結果が得られた。

#### D. 考察

1年目

##### (1) 2番目のPAF生合成酵素；LPCAT1の解析

LPCAT1とLPCAT2の解析から、発現場所が限局されているが、LPCAT1（主に肺）は恒常的に働く酵素で、LPCAT2（主にマクロファージ）は誘導型のPAF生合成酵素であることがわかった。これらはアラキドン酸からプロスタグランジンH2を合成するシクロオキシゲナーゼ(COX)-1（恒常型）とCOX-2（誘導型）の関係に似ている。これまで、PAFの生合成経路は2種類（de novo経路とリモデリング経路）報告されており、リゾPAFアセチル転移酵素はリモデリング経路の酵素である。定常時のPAF量はde novo経路で維持され、炎症時

はリモデリング経路で産生されると考えられてきたが、LPCAT1については定常時にリモデリング経路でPAFを産生することがわかり、新しいPAF合成経路の発見となった。今後はLPCAT1とLPCAT2の生体内での誘導やPAF産生における役割分担、さらにPAFによるアレルギーメカニズムの解明が必要になる。また、細菌感染時における、生体膜変化やPAFの役割解明も必要となる。

##### (2) 新規リゾリン脂質アシル転移酵素の発見

LPAAT3はPAとPIを生合成する活性を持った。PAはPIの前駆体にもなりうるためLPAAT3は2種類のステップを触媒してアラキドン酸を含有するPIを効率よく合成していることになる。また、マウス精巣においてLPAAT3のmRNA発現量は週齢と相関して上昇し、さらに精巣培養細胞TM4でもエストラジオール17β刺激で発現上昇した。ヒト男性でも年齢とともにエストラジオール量が増加することは報告されている。LPAAT3の発現はエストラジオールによって調節され、精巣の成熟と関連しているかもしれない。また、グリセロール骨格sn-2位にアラキドン酸を持つリン脂質を増やすことは、アラキドン酸由来の生理活性脂質（ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）の産生にも寄与しているであろう。

2年目

##### (1) 恒常型PAF生合成酵素（リゾPAFアセチル転移酵素）LPCAT1の解析

ヒトLPCAT1はin vitroにおいて肺サーファクタント脂質とPAFを生合成できる活性を有していた。米国のグループがLPCAT1は活性を持たないと発表したが、反応条件が適切でなく、我々の条件（反応液中にPCを加える）であれば強い活性を確認できた。また、点

変異体では活性を失うことからヒトLPCAT1はこれらの活性を持つと言える。さらに、本酵素は肺の進化と同調している可能性が示唆された。呼吸と炎症性メディエーターPAFの相関があるのかもしれない。

これまでのLPCAT1とLPCAT2の解析から、発現場所が限局されているが、LPCAT1（主に肺）は恒常的に働く酵素で、LPCAT2（主にマクロファージ）は誘導型のPAF生合成酵素であることがわかった。これらはアラキドン酸からプロスタグランジンH<sub>2</sub>を合成するシクロオキシゲナーゼ(COX)-1（恒常型）とCOX-2（誘導型）の関係に似ている。LPCAT1については定常時にリモデリング経路でPAFを産生することがわかり、新しいPAF合成経路の発見となった。今後はLPCAT1とLPCAT2の生体内での誘導やPAF産生における役割分担、さらにPAFによるアレルギーメカニズムの解明が必要になる。また、細菌感染時における、生体膜変化やPAFの役割解明も必要となる。

## (2) 活性に必要なMBOATモチーフの探索

今回モチーフを同定できた意義は大きい。このファミリー遺伝子がマクロファージの生体膜生合成に重要だと言う報告もある。モチーフ同定により、特異的な阻害剤が開発されれば、マクロファージ等を標的とした創薬を行える。また、炎症免疫時にこれらの遺伝子レベルや活性が変動すれば、傷害を受けた細胞のみをターゲットにできる可能性がある。

3年目

### LPCAT2のリン酸化の解析

LPCAT2の活性化はリン酸化によるものであり、その部位がSer34だとわかった。また、LPS刺激によるリン酸化

はMK2依存的な経路で起こることもわかった。保存性の高いコンセンサス配列からMK2によって直接リン酸化されている可能性が高い。LPCAT2の結晶構造の解明が待たれる。

活性化型LPCAT2がわかり、創薬のターゲットになるであろう。活性化型LPCAT2のみを認識する阻害剤等が対象となる。また、もう一つのPAF生合成酵素であるLPCAT1は活性化も誘導もされない。LPCAT1とLPCAT2の比較も興味深い。本研究でPAF生合成メカニズムの一端が解明された。

## **E. 結論**

本研究では生体膜生合成酵素とそれに類似したPAF生合成酵素の機能解析から、炎症性細胞等の感染時における生体膜変化の解明を目的としている。一年目は、恒常的に働く新規PAF生合成酵素の発見や、活性中心の同定等に成功した。また、PAF生合成酵素の自然免疫応答による誘導の解明も進んだ。2種類のPAF生合成酵素（恒常型LPCAT1と誘導型LPCAT2）のそれぞれに特異的な阻害剤などの開発が望まれる。PAFの生合成メカニズムの解明は炎症やアレルギーの新しい治療方法の開発につながられるであろう。

また、今回新たに発見したLPAAT3は精巣の成熟に関係する可能性がわかった。生理活性脂質の貯蔵の役割も考えられる。今後は細胞やマウス、ヒトレベルでの解析を進める。酵素欠損細胞だけでなく、作製が進んでいる複数種類の酵素欠損マウスの解析を行うことにより、より臨床応用できる成果を目指す。二年目にはヒトLPCAT1の解析から肺と同じような進化を遂げていることがわかり、PAF



生合成能との関係が興味深いことがわかった。

また、今回新たに発見したMBOATモチーフも生理活性脂質の貯蔵や多くの細胞での生体膜生合成メカニズム解明につなげられる。今回の情報も創薬開発に大きく貢献できるであろう。

また、三年目には新たにLPCAT2のリン酸化部位が明らかになった。活性化型LPCAT2の解明によりLPCAT2活性化メカニズムが解析された。

今後は細胞やマウス、ヒトレベルでの解析を進める。酵素欠損細胞だけでなく、作製が進んでいる複数種類の酵素欠損マウスの解析を行うことにより、より臨床応用できる成果を目指す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Yuki, K., **Shindou, H.**, Hishikawa, D., and Shimizu, T. (2009) Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: An enzyme with dual functions in the testis. *J. Lipid Res.*, 50, 860-869

(2) **Shindou H.**, Hishikawa D., Harayama T., Yuki K., and Shimizu T. (2009) Recent progress on Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase research. *J. Lipid Res.* 50, S46-S51

(3) **Shindou H.** and Shimizu T. (2009) Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 284, 1-5

(4) Harayama T., **Shindou H. (corresponding author)**, and Shimizu T.. (2009) Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. *J. Lipid Res.*, 50, 1824-1831

(5) **Shindou H. (corresponding author)**, Eto M., Morimoto R., and Shimizu T.. (2009) Identification of membrane O-acyltransferase family motifs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383, 320-325

(6) Koeberle A., **Shindou H. (corresponding author)**, 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

(7) Morimoto R, **Shindou H (corresponding author)**, 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

### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### 国内学会

(1) **進藤英雄**、菱川大介、清水孝雄 (東大・院医・細胞情報) リゾリン脂質アシル転移酵素LPEAT1とLPCAT4の機能解析 日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会 神戸2008

年12月9-12日 BMB2008 Abstracts P. 338

(2) 菱川大介、**進藤英雄**、清水孝雄  
(東大・院医・細胞情報) リゾリン脂質アシル転移酵素LPCAT3の機能解析  
日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会 神戸2008年12月9-12日 BMB2008 Abstracts P. 338

(3) 原山武士、**進藤英雄**、清水孝雄  
(東大・院医・細胞情報) ヒトLPCAT1のクローニングと解析 日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会 神戸2008年12月9-12日 BMB2008 Abstracts P. 338

(4) 清水孝雄、**進藤英雄** (東大・院医・細胞情報) 生体膜リン脂質の多様性と非対称性を決める酵素ファミリー 日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会 神戸2008年12月9-12日 BMB2008 Abstracts P. 66

(5) 木原泰行、石井聡、**進藤英雄**、北芳博、清水孝雄「多発性硬化症モデルマウスにおける血小板活性化因子の代謝機構」日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会 神戸2008年12月9-12日 BMB2008 Abstracts P. 342

(6) **進藤英雄**1、菱川大介1、小林早織1、中西広樹2、田口良2、清水孝雄1  
(1東大・院医・細胞情報) (2東大・院医・メタボローム寄附講座) 新規リゾリン脂質アシル転移酵素LPEAT1とLPCAT4の同定と解析  
脂質生化学会 2008 6/5-6 徳島  
『脂質生化学研究』、日本脂質生化学会、50号、pp. 191-194 2008

(7) 菱川大介1、**進藤英雄**1、小林早

織1、中西広樹2、田口良2、清水孝雄1  
(1東大・院医・細胞情報) (2東大・院医・メタボローム寄附講座) 新規リゾリン脂質アシル転移酵素LPEAT1とLPCAT4の同定と解析  
脂質生化学会 2008 6/5-6 徳島  
『脂質生化学研究』、日本脂質生化学会、50号、pp. 195-197 2008

(8) 原山武士1、**進藤英雄**1、小笠原理恵2、諏訪部章2、清水孝雄1  
1東大・院医・細胞情報  
2岩手医大・医・臨床検査医学  
リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素LPCAT1は非炎症時において血小板活性化因子を合成する  
脂質生化学会 2008 6/5-6 徳島  
『脂質生化学研究』、日本脂質生化学会、50号、pp. 198-200 2008

(9) **進藤英雄**、原山武士、清水孝雄  
題名：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  
札幌医科大学記念ホール 2008年7月5日(土)  
分子呼吸器病、先端医学社、(2009) Vol. 13 No. 1. 120-124 (1)**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 10月21-24日奨励賞講演 CD

(10) **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 10月21-24日シンポジウム CD

(11) 森本亮、**進藤英雄**、小田、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 10月22日 CD

(12)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) CD

(13)原山武士、進藤英雄、清水孝雄 日本脂質生化学会 2009 7/30-31 名古屋 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 p. 55-57

(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 7/30-31 名古屋 p. 51-54

(15)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 5/20 和光

(16)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 4/24 東京

(17)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 12月7-10日

(18)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 12月7-10日

(19)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 12月7-10日

(20)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 2010年11月6日

(21)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 2010年6月14-15日

(22)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 2010年6月14-15日

(23)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

国際学会

(1) **Hideo Shindou**, Hishikawa Daisuke, and Takao Shimizu. Identification of lysophospholipid acyltransferases, LPEAT1 and LPCAT4. FASEB Phospholipid Metabolism: disease, signal transduction and membrane dynamics. July 20-25, 2008 **Oral Presentation** New Haven, Connecticut

(2) Hishikawa Daisuke, **Hideo Shindou**,

and Takao Shimizu. Identification of lysophospholipid acyltransferases, LPCAT3. FASEB Phospholipid Metabolism: disease, signal transduction and membrane dynamics. July 20-25, 2008  
New Haven, Connecticut

(3) Takao Shimizu and **Hideo Shindou**. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 and 2. FASEB Phospholipid Metabolism: disease, signal transduction and membrane dynamics. July 20-25, 2008  
New Haven, Connecticut (1) 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) 5/25-27. 2009  
Tokyo **Oral Presentation** p. 12

(4) 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) 5/25-27. 2009  
Tokyo p. 75

(5) 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 LIPI

D MOLECULES AND TRANSPORTERS』、No. 34、東京 (2009年5月) p. 82

(6) Ryo Morimoto, Takeshi Harayama, **Hideo Shindou**, and Takao Shimizu. Lysophospholipid acyltransferases: AGPAT and MBOAT families. FASEB Phospholipid Metabolism: disease, signal transduction and membrane dynamics. June 27-July 2, 2010 Steamboat CO

H. 知的財産権の出願・登録状況      なし



研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuki, K., <b>Shindou, H.</b> , Hishikawa, D., and Shimizu, T.	Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: An enzyme with dual functions in the testis.	<i>J. Lipid Res.</i>	50	860-869	2009
<b>Shindou H.</b> , Hishikawa D., Harayama T., Yuki K., and Shimizu T.	Recent progress on Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase research.	<i>J. Lipid Res.</i>	50	S46-S51	2009
<b>Shindou H.</b> and Shimizu T.	Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases.	<i>J. Biol. Chem.</i>	284	1-5	2009
Harayama T., <b>Shindou H.</b> , and Shimizu T.	Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1.	<i>J. Lipid Res.</i>	50	1824-1831	2009
<b>Shindou H.</b> , Etomoto M., Morimoto R., and Shimizu T.	Identification of membrane O-acyltransferase family motifs.	<i>BBRC</i>	383	320-325	2009
Morimoto R, <b>Shindou H.</b> , Oda Y, Shimizu T.	Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	29857-29862	2010
Koeberle A., <b>Shindou H.</b> , Harayama T., and Shimizu T.	Role of lysophosphatidic acid acyltransferase 3 for the supply of highly polyunsaturated fatty acids in TM4 Sertoli cells	<i>FASEB J.</i>	24	4929-4938	2010

# Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: an enzyme with dual functions in the testis<sup>1</sup> [S]

Koichi Yuki, Hideo Shindou,<sup>2</sup> Daisuke Hishikawa, and Takao Shimizu

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

**Abstract** Glycerophospholipids are structural and functional components of cellular membranes as well as precursors of various lipid mediators. Using acyl-CoAs as donors, glycerophospholipids are formed by the *de novo* pathway (Kennedy pathway) and modified in the remodeling pathway (Lands' cycle). Various acyltransferases, including two lysophosphatidic acid acyltransferases (LPAATs), have been discovered from a 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase (AGPAT) family. Proteins of this family contain putative acyltransferase motifs, but their biochemical properties and physiological roles are not completely understood. Here, we demonstrated that mouse LPAAT3, previously known as mouse AGPAT3, possesses strong LPAAT activity and modest lysophosphatidylinositol acyltransferase activity with a clear preference for arachidonoyl-CoA as a donor. This enzyme is highly expressed in the testis, where CDP-diacylglycerol synthase 1 preferring 1-stearoyl-2-arachidonoyl-phosphatidic acid as a substrate is also highly expressed. Since 1-stearoyl-2-arachidonoyl species are the main components of phosphatidylinositol, mouse LPAAT3 may function in both the *de novo* and remodeling pathways and contribute to effective biogenesis of 1-stearoyl-2-arachidonoyl-phosphatidylinositol in the testis. Additionally, the expression of this enzyme in the testis increases significantly in an age-dependent manner, and  $\beta$ -estradiol may be an important regulator of this enzyme's induction. [S] Our findings identify this acyltransferase as an alternative important enzyme to produce phosphatidylinositol in the testis.—Yuki, K., H. Shindou, D. Hishikawa, and T. Shimizu. Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: an enzyme with dual functions in the testis. *J. Lipid Res.* 2009. 50: 860–869.

**Supplementary key words** 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase • phosphatidic acid • phosphatidylinositol •  $\beta$ -estradiol

This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (T.S.). T.S. and H.S. were supported by the Center for NanoBio Integration at the University of Tokyo. H.S. was supported by Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Allergic Disease and Immunology) supported by the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan, Mitsubishi Pharma Research Foundation, and Ono Medical Research Foundation.

Manuscript received 2 September 2008 and in revised form 7 November 2008 and in re-revised form 12 December 2008 and in re-re-revised form 26 December 2008.

Published, JLR Papers in Press, December 29, 2008.  
DOI 10.1194/jlr.M800468-JLR200

Tissues maintain distinct content and composition of various glycerophospholipids, such as phosphatidic acid (PA), phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine, and cardiolipin (1–4). They are formed by two pathways using acyl-CoAs as donors. One is the *de novo* pathway (Kennedy pathway) in which glycerophospholipids are formed from glycerol 3-phosphate (5). The other is the remodeling pathway (Lands' cycle), where the concerted activation of phospholipase A<sub>2</sub>s and lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) occurs (6–10). These pathways are the basis of membrane asymmetry and diversity. In general, saturated and monounsaturated fatty acids are esterified at the *sn*-1 position, whereas polyunsaturated fatty acids are at the *sn*-2 position. The combinations of fatty acids at the *sn*-1 and *sn*-2 positions vary among different classes of phospholipids. In the rat liver and brain, for example, PA possesses a low arachidonic acid content (11–13), whereas arachidonic acid is a major component of PI (4, 13, 14).

Extensive studies of acyltransferases have been conducted over the last decade, mostly using homology searches (6, 7, 15–35). Several acyltransferase families have been proposed, including the 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase (AGPAT) family. At least seven AGPAT family members have been identified in mouse (21, 36, 37), and each of them contains a highly conserved putative catalytic motif (NHX<sub>4</sub>D) and putative substrate binding motif (EGTR) (38–40) (Fig. 1A). Some of the AGPAT family members

Abbreviations: AGPAT, 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase; CDP-diacylglycerol, cytidine diphosphodiacylglycerol; CHO, Chinese hamster ovary; DDBJ, DNA Data Bank of Japan; ER, endoplasmic reticulum; LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; LPIAT, lysophosphatidylinositol acyltransferase; LPLAT, lysophospholipid acyltransferase; NCBI, National Center for Biotechnology Information; PA, phosphatidic acid; PI, phosphatidylinositol.

<sup>1</sup> Nucleotide sequence data are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers AB377215 (mouse).

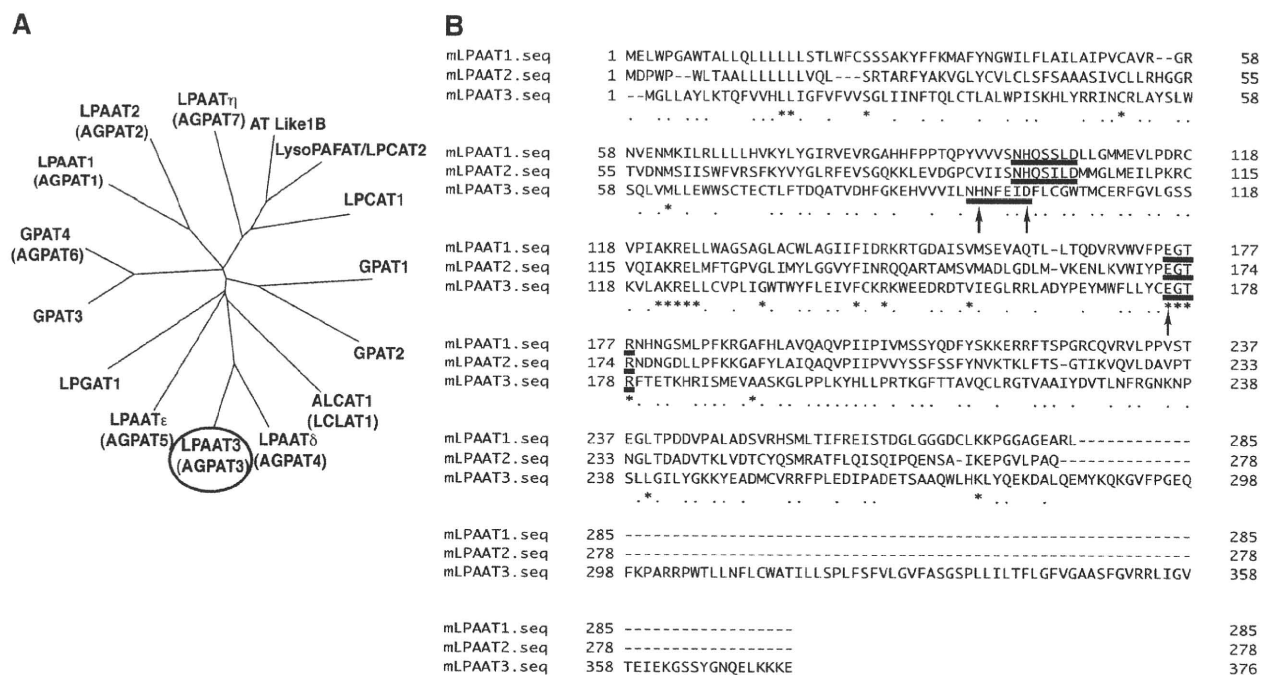
<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.

e-mail: hshindou-ky@umin.ac.jp

[S] The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of one table and three figures.

Copyright © 2009 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of AGPAT family members and alignment of mLPAAT1, 2, and 3. **A:** A phylogenetic tree was drawn by using ClustalW, DDBJ (<http://www.clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>). Sequences of mouse acyltransferases are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases. mLPAAT3 is circled. **B:** mLPAAT1, mLPAAT2, and mLPAAT3 sequences were aligned using Genetic-Mac software. Conserved putative catalytic motif NHX<sub>4</sub>D and binding motif EGTR are underlined. Mutated amino acids are indicated by arrows (see Fig. 5). The accession numbers are shown as follows: GPAT1 (NP\_032175), GPAT2 (NP\_001074558), GPAT3 (NP\_766303), GPAT4 (NP\_061213), LPAAT1 (NP\_061350), LPAAT2 (NP\_080488), LPAAT3 (AB377215), LPGAT1 (NP\_758470), ALCAT1 (acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase 1; also called as LCLAT1) (Q3UN02), LPCAT1 (BAE94687), LysoPAFAT/LPCAT2 (BAF47695), LPAATδ (NP\_080920), LPAATε (NP\_081068), LPAATη (NP\_997089), and AT Like 1B (NP\_081875).

are relatively well characterized. Lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) activity of mouse LPAAT1 (previously known as mouse AGPAT1) and mouse LPAAT2 (or mouse AGPAT2) is well documented (21, 37), and mutations in human LPAAT2 cause congenital generalized lipodystrophy (41). Recently, mouse AGPAT6 was shown to have glycerol-3-phosphate acyltransferase activity (33). Mouse AGPAT3 has been investigated in the past, but the characterization was far from being done (37). The existence of at least seven members in AGPAT family raises questions as to the specific role of each member. Therefore, investigation of their tissue distributions or biochemical properties will be important in understanding their biological roles.

We present here, to our knowledge, the first detailed biochemical and biological characterization of mouse AGPAT3 (mAGPAT3). Surprisingly, mAGPAT3 possesses both LPAAT and lysophosphatidylinositol acyltransferase (LPIAT) activities and prefers arachidonoyl-CoA as a donor, indicating its dual roles in the *de novo* and remodeling pathways. Point mutations in highly conserved motifs NHX<sub>4</sub>D or EGTR completely suppressed both LPAAT and LPIAT activities. The enzyme was localized in the endoplasmic reticulum (ER) and expressed in the liver, kidney, and testis. In the testis, cytidine diphosphodiacylglycerol (CDP-diacylglycerol) synthase 1 is highly expressed and particularly converts 1-stearoyl-2-arachidonoyl-PA to CDP-diacylglycerol, a phospholipid precursor (42, 43). This might suggest that mLPAAT3

produces PI effectively. Additionally, mAGPAT3 expression in the testis increases significantly in an age-dependent manner. Since  $\beta$ -estradiol induced this enzyme in testicular cell line, mAGPAT3 may play an important role in the testis coupled with sex hormone. We renamed this enzyme as LPAAT3 according to a proposal for the standardization of LPLAT nomenclature by Shindou and Shimizu (6).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

DMEM, 12F-HAM, and RPMI1640 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TLC silica gel plates (type 5721) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Various lysophospholipids and acyl-CoAs were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). [<sup>1-14</sup>C]Oleoyl-CoA (1.924 GBq/mmol), [<sup>1-14</sup>C]Linoleoyl-CoA (2.035 GBq/mmol), and [<sup>1-14</sup>C]Arachidonoyl-CoA (2.035 GBq/mmol) were purchased from Moravec Biochemicals (Mercury Lane, CA). [<sup>1-14</sup>C]Palmitoyl-CoA (2.22 GBq/mmol) and [<sup>3</sup>H]acetyl-CoA (185 GBq/mmol) were obtained from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

### Cloning of mLPAAT1 and mLPAAT3

The entire coding region of mLPAAT3 [DNA Data Bank of Japan (DDBJ) accession number AB377215] was identified in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. A 1.1 kb cDNA clone encoding the full-length mLPAAT3 was



obtained by PCR amplification using a forward primer designed to encode FLAG epitope (DYKDDDDK) in frame with the start codon of target DNA coding region (5'-CTAGCTAGCCACCATG-GATTACAAGGATGACGATGACAAGGGCCTGCTTGCTACCT-GAAGACCC), and a reverse primer (CCGCTCGAGTTATTCCT-TTTTCTTAAGCTCTTGGTTGCC-3'). Mouse heart cDNA was used as a template. Amplified PCR products were cloned into the pCXN2.1 vector (44) and sequenced. Similarly, mLPAAT1 (DDBJ accession number NM\_018862) was identified in NCBI, and full-length mLPAAT1 was obtained by PCR amplification using a forward primer designed to encode FLAG epitope in frame (CTAGCTAGCCACCATGGATTACAAGGATGACGATGACAAG-GAGCTGTGGCCCGGGGCTGG) and a reverse primer (CCGCT-CGAGTCAGAGCCCGGCTTCGCCCGCTCCCC).

### Mutagenesis of mLPAAT3

mLPAAT3 constructs with single mutations in the highly conserved motif NHX<sub>4</sub>D (His→Ala or Asp→Ala) or EGTR (Glu→Ala) were made using cloned mLPAAT3 cDNA as a template. Amplified PCR products were cloned into the pCXN2.1 vector and sequenced. Details of the method have been described previously (39).

### Expression of FLAG-mLPAAT3 in Chinese hamster ovary-K1 cells

Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells were seeded onto 10 cm dishes, at a density of  $3 \times 10^6$  cells/dish 1 day before transfection. Twelve micrograms each of pCXN2.1 vector or FLAG-mLPAAT3-pCXN2.1 was transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). At 48 h after transfection, transfected cells were scraped into 1 ml of ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM sucrose, and a proteinase inhibitor cocktail Complete (Roche Applied Science) and sonicated three times on ice for 30 s each time. Cell lysates were centrifuged at 9,000 *g* for 15 min. Supernatants were then centrifuged at 100,000 *g* for 1 h. Pellets were suspended in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM sucrose, and 1 mM EDTA. The protein concentration was measured by the method of Bradford (45) using a commercially prepared protein assay solution (Bio-Rad) and BSA (fraction V, fatty acid-free; Sigma-Aldrich) as a standard.

### Production of anti-mLPAAT3 antiserum

Antiserum was generated at SCRUM (Tokyo, Japan). C-terminal peptides were used for immunization of rabbits (EKGSSYGNQELK and FPGEQFKPARRPWT). Specificity of the antiserum was examined by Western blot analysis using microsomes from vector- and mLPAAT3-transfected cells. Microsomal fractions from mAGPAT4- or AGPAT5-transfected cells were also used as negative controls.

### Western blot analysis

Cell lysates were centrifuged at 800 *g* for 10 min. Supernatants were centrifuged at 9,000 *g* for 15 min. Supernatants were then centrifuged at 100,000 *g* for 1 h. Initial 9,000 *g* pellets were homogenized again and centrifuged at 9,000 *g*. The pellets were used as 9,000 *g* pellets. Two micrograms each of 9,000 *g* pellets, 100,000 *g* pellets, and 100,000 *g* supernatants were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare UK). The membrane was blocked with 5% skim milk, incubated with anti-FLAG M2 mAb (IBI/Kodak) or anticytochrome c oxidase antibody (Invitrogen), and washed and incubated with horseradish-peroxidase-labeled anti-mouse IgG (GE Healthcare UK). After washing, the membrane was exposed to ECL reagents (GE Healthcare UK) and X-ray film (GE Healthcare UK) to visualize immunoreactive proteins. Expression of the FLAG-tagged target protein was confirmed. For the examination of endogenous mLPAAT3 subcellular localization,

rabbit anti-mLPAAT3 antiserum and horseradish-peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (GE Healthcare UK) were used as primary and secondary antibodies, respectively.

### Confocal microscopy

CHO-K1 cells transfected with pCXN2.1 vector or FLAG-mLPAAT3-pCXN2.1 cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with methanol/acetone solution (1:1, v/v). Cells were incubated with 10 μg/ml primary antibody for 30 min. As a marker, M5 anti-FLAG mouse mAb or anti-FLAG rabbit antibody (Sigma-Aldrich) for FLAG epitope, anti-calnexin antibody (BD Biosciences) for ER, anticytochrome c oxidase antibody (Invitrogen) for mitochondria, and anti-GM130 (Invitrogen) for Golgi were used. Cells were blocked with 1% BSA and then incubated with 10 μg/ml Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (Eugene, OR) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Eugene, OR). Confocal microscopy was performed using an LSM510 laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a ×63 water immersion objective lens (numerical aperture = 1.2). Cells were observed by excitation at 543 nm with a He/Ne laser and emission through a 585-nm long-pass filter for the detection of red fluorescence. For the detection of green fluorescence, the excitation was at 488 nm with an argon laser, and emissions were collected using a 505 to 550 nm band-pass filter.

### Assay of LPLAT activity

Acyltransferase activity was measured by the transfer of [<sup>14</sup>C]acyl-CoAs or [<sup>3</sup>H]acetyl-CoA to lysophospholipids to form phospholipids. Reaction mixtures contained 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, and indicated concentrations of acyl-CoA, lysophospholipids, and enzyme (100,000 *g* pellets) in a total volume of 100 μl. The amount of total protein and concentrations of acceptors and donors are described in corresponding figure legends. After incubation at 37°C for 10 min, reactions were stopped by the addition of 300 μl of chloroform:methanol (1:2, v/v). The reaction progressed linearly at least for 10 min. Total lipids were extracted using the Bligh-Dyer method (46) and subsequently analyzed by TLC in chloroform:methanol:acetic acid:water (50:25:8:4, v/v/v/v). Bands at positions corresponding to the expected products were visualized with I<sub>2</sub> vapor, cut off the plate, placed in Microscinti-O (Perkin-Elmer Life Sciences), and analyzed in an LS6500 liquid scintillation counter (Beckman).

### Quantitative real-time PCR

Total RNA was prepared using RNeasy Mini Kit (Qiagen). First-strand cDNAs were synthesized using Superscript II (Invitrogen). PCR was conducted in microcapillary tubes, in 20 μl reaction volumes consisting of 2 μl of cDNA solution, 1× FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science), and 0.5 μM each of the forward and reverse primers. Sequences of primers used in PCR are shown in supplementary Table I.

### Stimulation of testicular cell line TM4 cells with various sex hormones

Testicular cell line TM4 cells were cultured in F12-HAM:DMEM (1:1,v/v) containing 5% horse serum (Gibco) and 2.5% FBS. Cells ( $1 \times 10^5$ ) were incubated with either mock, 100 nM β-estradiol (Sigma-Aldrich), dihydrotestosterone (Sigma-Aldrich), or testosterone (Sigma-Aldrich) for 24 h and collected.

### Animals

C57BL/6J mice were obtained from Clea Japan (Tokyo, Japan). Mice were maintained at 21°C in a light-dark cycle with light from 08:00 to 20:00. Mice were fed with a standard laboratory diet and

water ad libitum. All animal studies were conducted in accordance with the guidelines for Animal Research at the University of Tokyo and were approved by the University of Tokyo Ethics Committee for Animal Experiments.

### Statistics

Data are presented as mean + SD. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. All statistical calculations were performed using Prism 4 (GraphPad Software).

## RESULTS

### Cloning of mLPAAT3

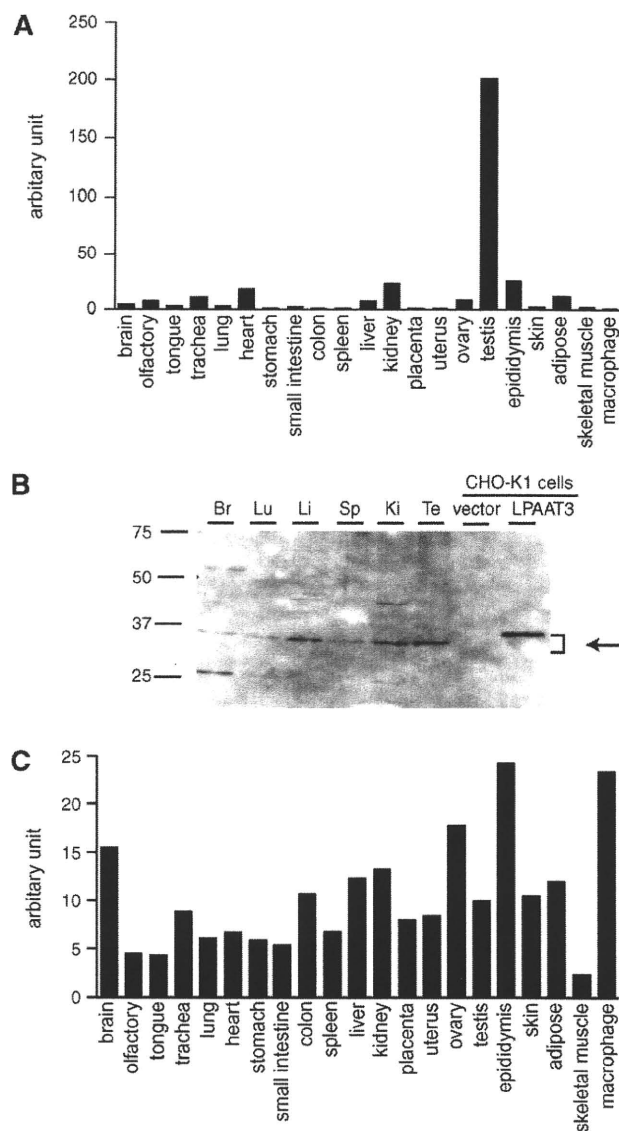
To identify novel LPLATs, we focused on AGPAT family proteins. A phylogenetic tree was drawn by pairwise comparisons of the amino acid sequences of LPAAT family members using ClustalW, DDBJ (<http://www.clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) (Fig. 1A) (47). The amino acid sequences of mLPAAT1, mLPAAT2, and mLPAAT3 are shown in Fig. 1B. A 1.1 kb cDNA clone encoding the full-length mLPAAT3 enzyme was obtained by PCR amplification. mLPAAT3 encodes a 376 amino acid protein of 43.3 kDa, containing four transmembrane domains, predicted by ConPred II (48), and the conserved motifs (NHX<sub>4</sub>D and EGTR) found in members of AGPAT family (Fig. 1B). The protein also possesses the C-terminal sequence motif KKXX (49), suggesting that mLPAAT3 localizes to the ER, similar to LPCAT1 and LysoPAFAT/LPCAT2 (15, 16).

### Tissue distribution of mLPAAT3 and mMBOA7

The tissue distribution of mLPAAT3 mRNA was analyzed by quantitative real-time PCR analysis. mLPAAT3 was predominantly expressed in the testis (Fig. 2A), whereas mMBOA7 was ubiquitously expressed (Fig. 2C). We examined mLPAAT3 expression profile in protein level by Western blot analysis using rabbit anti-mLPAAT3 antiserum. mLPAAT3 was highly expressed in the testis (Fig. 2B). mLPAAT3 was also expressed in the liver and kidney (Fig. 2B). Discrepancy between mRNA and protein expression level of mLPAAT3 may possibly be due to the difference in translational efficiency from mRNA into protein and/or half-life of this enzyme within tissues.

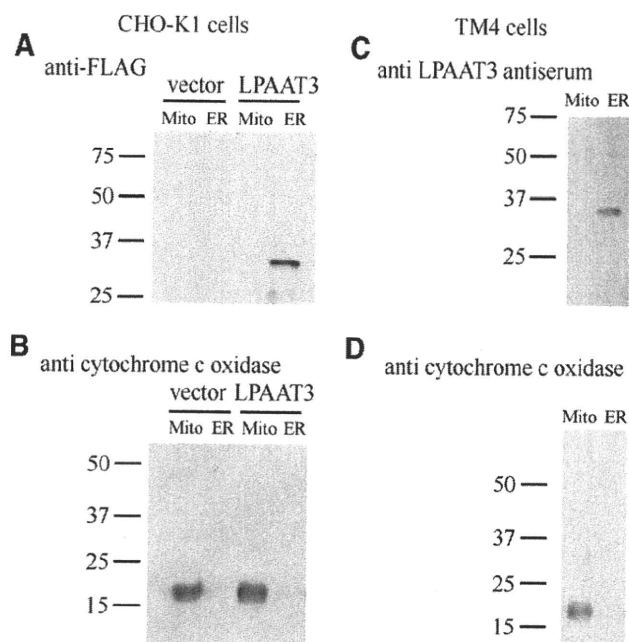
### Subcellular localization of FLAG-mLPAAT3 and endogenous mLPAAT3

To facilitate immunocytochemical and Western blot analyses of mLPAAT3, we constructed an mLPAAT3 fusion protein that contains the FLAG epitope fused in frame to the N terminus of mLPAAT3. FLAG-mLPAAT3 was transfected into CHO-K1 cells, and the subcellular localization was examined by confocal microscopy after 48 h. Cells were stained for ER (anticalsexin N-terminal), Golgi (anti-GM130), or mitochondrial (anticytochrome c oxidase) markers. The subcellular distribution pattern of FLAG-mLPAAT3 was similar to that of calnexin N-terminal (see supplementary Fig. 1). Neither Golgi nor mitochondrial marker protein distributions overlapped with mLPAAT3 (data not shown). To confirm these observations, CHO-K1



**Fig. 2.** Expression profile of mLPAAT3 and mMBOA7 (LPIAT1) in mice. Expression levels of mLPAAT3 mRNA (A) and mMBOA7 (LPIAT1) mRNA (C) in 21 tissues from C57BL/6J mice were analyzed using quantitative real-time PCR. mLPAAT3 (A) was expressed predominantly in the testis, whereas mMBOA7 (LPIAT1) (C) was ubiquitously expressed. Similar results were obtained in a separate independent experiment. B: Expression of mLPAAT3 was analyzed at the protein level by Western blots using anti-mLPAAT3 antiserum. Three micrograms of 100,000 *g* pellets from various tissues were loaded in each lane. Br, Lu, Li, Sp, Ki, and Te stand for brain, lung, liver, spleen, kidney, and testis, respectively. mLPAAT3 was highly expressed in the testis. High expression was noted in the liver and kidney as well. The results are representative of three independent experiments.

cells were transiently transfected with FLAG-mLPAAT3 and homogenized, and differential subcellular fractions were collected using an ER extraction kit (Sigma-Aldrich). When the subcellular fractions were analyzed by Western blots using anti-FLAG M2 antibody, the enzyme was found in ER fraction (Fig. 3A), consistent with the data obtained by confocal microscopy (see supplementary Fig. 1). FLAG-



**Fig. 3.** Subcellular localization of FLAG-mLPAAT3 in CHO-K1 cells and endogenous mLPAAT3 in TM4 cells. **A:** At 48 h after transfection, proteins from CHO-K1 cells were subjected to Western blot analysis using anti-M2 FLAG antibody. Expression of FLAG-mLPAAT3 was confirmed by Western blots. Homogenates of pCXN2.1 vector or FLAG-mLPAAT3-pCXN2.1-transfected CHO-K1 cells were separated by differential centrifugation using an ER extraction kit (Sigma-Aldrich) as described in Materials and Methods. Two micrograms of 9,000 *g* pellets (indicated as Mito) and 100,000 *g* pellets (ER) were loaded in the lanes indicated. Molecular sizes are indicated on the left in kilodaltons. Results are representative of two independent experiments. **B:** As a marker of mitochondria, anticytochrome c oxidase antibody was used. Molecular sizes are indicated on the left in kilodaltons. Results are representative of two independent experiments. **C:** Subcellular localization of endogenous mLPAAT3 in testicular cell line TM4 cells was confirmed by Western blots. One and a half micrograms of 9,000 *g* pellets (Mito) and 100,000 *g* pellets (ER) were loaded in the lanes indicated. mLPAAT3 was detected using rabbit anti-mLPAAT3 antiserum. Results are representative of two independent experiments. **D:** As a marker of mitochondria, anticytochrome c oxidase antibody was used. Molecular sizes are indicated on the left in kilodaltons. Results are representative of two independent experiments.

mLPAAT3 had an apparent molecular mass of  $\sim 37$  kDa, slightly less than the predicted molecular mass of 43.3 kDa. The discrepancy in molecular mass was observed in other acyltransferases possessing multiple membrane spanning domains as previously described (17). To examine subcellular localization of endogenous mLPAAT3, subcellular fractions of testicular cell line TM4 cells were analyzed by Western blots using rabbit anti-mLPAAT3 antiserum. Consistent with the finding in the FLAG-mLPAAT3 overexpression system, endogenous mLPAAT3 was predominantly localized to the ER fraction (Fig. 3B).

#### Substrate selectivity of mLPAAT3

Using [ $^{14}\text{C}$ ]arachidonoyl-CoA as an acyl donor, we analyzed the substrate specificity of mLPAAT3 using a variety of lysophospholipid acceptors (Fig. 4A). The microsomal

fraction from CHO-K1 cells transfected with mLPAAT3 had detectable LPLAT activity for LPA, LPC, and LPI (Fig. 4A). However, its LPC acyltransferase activity was not pursued further because of its very limited activity. We also checked substrate selectivity using [ $^{14}\text{C}$ ]oleoyl-CoA as an acyl donor and did not observe any significant LPLAT activity of mLPAAT3 (data not shown).

Next, we examined the preference of mLPAAT3 for various LPA acceptors using [ $^{14}\text{C}$ ]oleoyl-CoA or [ $^{14}\text{C}$ ]arachidonoyl-CoA as acyl donors. As seen in Fig. 4B, mLPAAT3 exhibited strong LPAAT activity using arachidonoyl-CoA as a donor with palmitoyl-LPA, stearoyl-LPA, oleoyl-LPA, and octadecenyl-LPA as acceptors (Fig. 4B). We then examined the acyl-CoA selectivity of mLPAAT3 using palmitoyl-LPA as an acceptor. mLPAAT3 demonstrated a clear preference for arachidonoyl-CoA as a donor (Fig. 4C). We also examined the acyl-CoA selectivity of mLPAAT3 using 1-acyl-LPI as an acceptor. mLPAAT3 showed LPIAT activity using arachidonoyl-CoA as a donor (Fig. 4D). Other LPI acyltransferases, such as MBOA7, would explain the high endogenous activity with vector-transfected cells.

#### Kinetics of mLPAAT3 expressed in CHO-K1 cells

We examined the acyltransferase activity of mLPAAT3 using palmitoyl-LPA and arachidonoyl-CoA. The pH optimum for the reaction was between 7.4 and 10, and the reaction did not require  $\text{Ca}^{2+}$  (data not shown). A kinetic analysis was conducted by measuring acyltransferase activity in the microsomal fraction derived from vector- and mLPAAT3-transfected CHO-K1 cells, using increasing concentrations (1.5–100  $\mu\text{M}$ ) of [ $^{14}\text{C}$ ]arachidonoyl-CoA in the presence of 50  $\mu\text{M}$  palmitoyl-LPA or using increasing concentrations (6.25–100  $\mu\text{M}$ ) of palmitoyl-LPA in the presence of 25  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]arachidonoyl-CoA (see supplementary Fig. IIA, B). The  $K_m$  values of mLPAAT3 were 15.9  $\mu\text{M}$  for arachidonoyl-CoA and 26.3  $\mu\text{M}$  for palmitoyl-LPA. The corresponding  $V_{max}$  values were 50.4 and 21.8 nmol/min/mg.

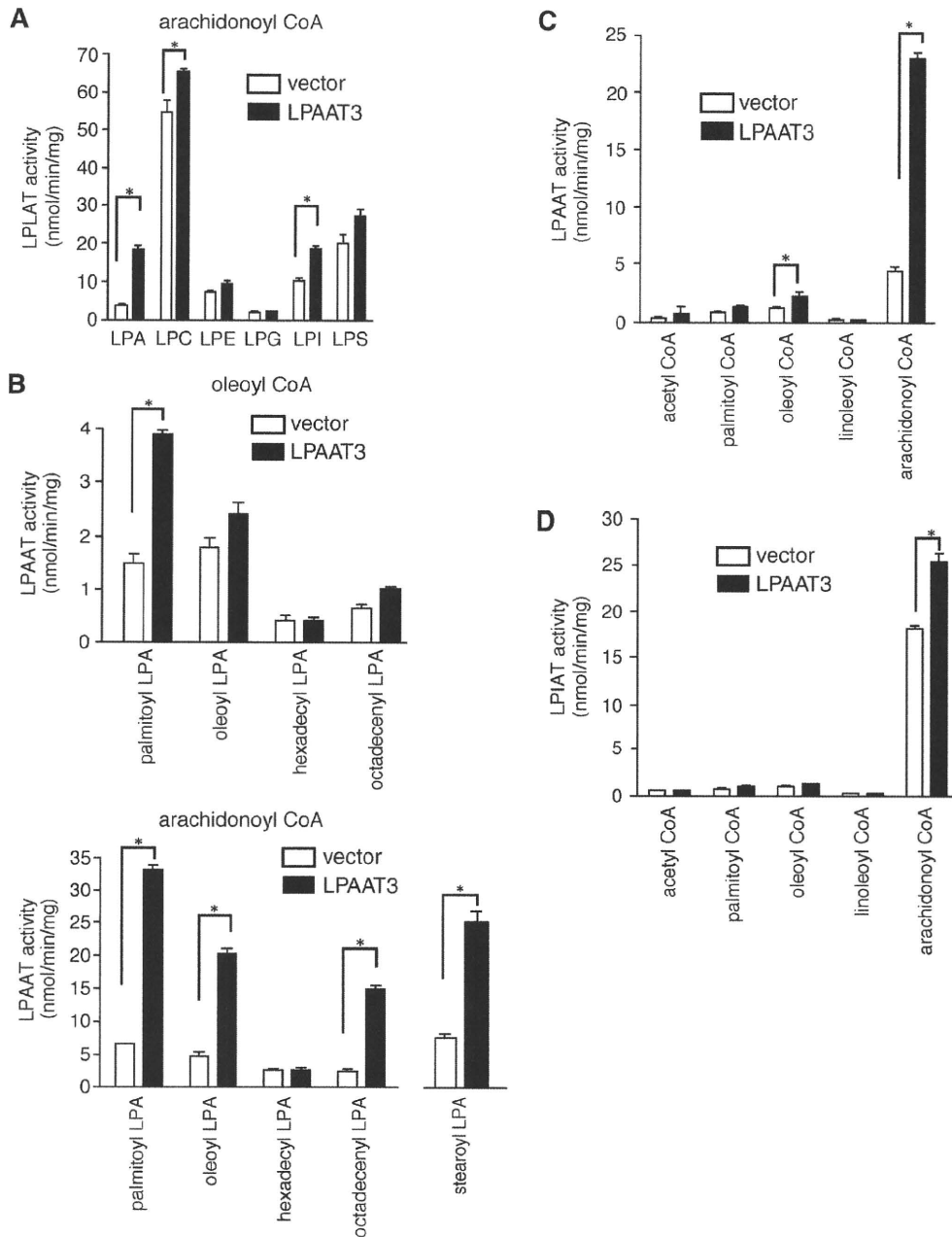
#### The role of the highly conserved motifs NHX<sub>4</sub>D and EGTR on enzymic activity

We constructed three single point mutants of mLPAAT3 (H96A, D101A, and E176A; arrows in Fig. 1B). Both LPAAT and LPIAT activities of mLPAAT3 were completely suppressed by these mutations (Fig. 5A). Expression of wild-type, H96A, D101A, and E176A mutants was confirmed by Western blot analysis (Fig. 5B). These results indicate that the motifs are critical for the enzymic activity and that both enzymic activities (LPAAT and LPIAT) reside on a single protein.

#### Age-dependent mLPAAT3 expression and LPAAT activity in the testis

Total RNA of the testis was prepared from C57BL/6J mice at various ages. Interestingly, mLPAAT3 mRNA level was upregulated significantly until 15 weeks and then increased only slightly (Fig. 6A). In another independent experiment, after 15 weeks, mLPAAT3 expression level decreases slightly (data not shown). The trend of this





**Fig. 4.** Substrate selectivity of mLPAAT3. A: Lysophospholipid preferences of mLPAAT3 were determined. Acyltransferase activity was examined using 2  $\mu$ g protein (100,000 *g* pellet), 25  $\mu$ M [ $^{14}$ C]arachidonoyl-CoA (33,000 dpm), and 50  $\mu$ M lysophospholipids. Data are shown as mean + SD of triplicate measurements. Statistical significance was analyzed using ANOVA with Tukey post hoc pairwise comparisons. \* $P$  < 0.05. B: The preference of mLPAAT3 for various LPA acceptors was examined using oleoyl-CoA or arachidonoyl-CoA as a donor. Acyltransferase activity was examined using 2  $\mu$ g protein, 25  $\mu$ M [ $^{14}$ C]oleoyl-CoA (33,000 dpm), and 50  $\mu$ M lysophospholipids. Data are shown as mean + SD of triplicate measurements. Statistical significance was analyzed using ANOVA with Tukey post hoc pairwise comparisons. Only for stearoyl-LPA group, *t*-test was used for analysis. \* $P$  < 0.05. C: The acyl-CoA selectivity of mLPAAT3 was examined using palmitoyl-LPA as an acceptor. Acyltransferase activity was examined using 2  $\mu$ g protein, 25  $\mu$ M acyl-CoAs (33,000 dpm), and 50  $\mu$ M palmitoyl-LPA, with the exception that 100  $\mu$ M acetyl-CoA (111,000 dpm, 185MBq / mmol) was used. Data are shown as mean + SD of triplicate measurements. Statistical significance was analyzed using ANOVA with Tukey post hoc pairwise comparisons. \* $P$  < 0.05. D: The acyl-CoA selectivity of mLPAAT3 was examined for LPIAT activity. Acyltransferase activity was examined using 2  $\mu$ g protein, 25  $\mu$ M acyl-CoAs (33,000 dpm), and 50  $\mu$ M LPI with exception of acetyl-CoA. The concentration of acetyl-CoA used was 100  $\mu$ M (111,000 dpm, 185MBq/mmol). Data are shown as mean + SD of triplicate measurements. Statistical significance was analyzed using ANOVA with Tukey post hoc pairwise comparisons. \* $P$  < 0.05. In A–D, results are representative of two independent experiments.