

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 4 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890193

研究課題名（和文）内因性カンナビノイドを産生する新規ホスファチジルイノシトール代謝経路の解明

研究課題名（英文）Study on the novel metabolic pathway of phosphatidylinositol to produce endogenous cannabinoid.

研究代表者

林 康広 (HAYASHI YASUHIRO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号 70582857

研究成果の概要（和文）：

G タンパク質共役型レセプターである GPR55 はカンナビノイド受容体として同定された。近年、我々は lysophosphatidylinositol (LPI) が、G タンパク質共役型レセプター GPR55 のリガンドであることを明らかにした。本研究では、GPR55 アゴニストの産生に関わる PI-PLA1, PI-PLA2 の同定を試みた。また、細胞融合アッセイを用いてリン脂質代謝酵素の新規機能を探索した。すると、いくつかのリン脂質代謝酵素の過剰発現・ノックダウン細胞においてコントロール細胞よりも膜融合が増加、減少した。この結果はリン脂質代謝酵素が膜融合に関与していることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：

GPR55 is a seven-transmembrane G-protein-coupled receptor that has been proposed as a novel type of cannabinoid receptor. Previously, we identified lysophosphatidylinositol (LPI), in particular 2-arachidonoyl-LPI, as an agonist for GPR55. In the present study, we tried to identify PI-PLA1 and PI-PLA2 to clear the novel metabolic pathway of PI. To clear the novel function of phospholipid-metabolic enzymes, we examined the efficiency of Cell-Cell fusion of overexpressed or knockdown cells. The cell-cell fusion activity were increased in these cells. These results suggest that phospholipid-metabolic enzymes are involved in cell-cell fusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：リン脂質

1. 研究開始当初の背景

GPR55 は脳よりカンナビノイド第 3 の受容体として同定された。近年、我々は sn-2 位にアラキドン酸を持つ 2-arachidonoyl-LPI,

sn-1 位にステアリン酸を持つ 1-stearoyl-LPI が、G タンパク質共役型レセプター GPR55 のリガンドであることを明らかにした。しかしながらこれまで PI を基質とする PLA1, PLA2

は明らかになっておらず、GPR55 のアゴニスト産生メカニズムは謎である。

多剤併用療法の導入により、先進国におけるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者の死亡者数は減少したが、薬剤耐性株の出現、肝炎ウイルスとの合併感染により、人類は HIV を完全には克服できていない。

2. 研究の目的

GPR55 ノックアウトマウスの解析より、GPR55 は神経性の痛覚過敏に関わることが明らかになり、創薬のターゲットとして注目を集めている。PI を基質とする PLA1, PLA2 は明らかになっておらず、GPR55 のアゴニスト産生メカニズムは謎である。このミッシングリンクを繋ぎ合わせるために 2-arachidonoyl-LPI, 1-stearoyl-LPI 産生メカニズムを解明することを本研究の目的とする。

既存の薬剤がターゲットとする分子 (HIV 逆転写酵素、プロテアーゼ) とは異なる新しい作用機序を持つ抗 HIV 剤の開発が望まれている。全てのウイルスは生体膜脂質二重層を介して侵入・粒子形成・出芽することから、脂質二重層の構成分子は新たな抗ウイルス剤のターゲットとして期待できる。本研究は、既存の抗 HIV 剤とは異なる脂質二重層という分子を標的としており、薬剤耐性 HIV 株のみならず、肝炎ウイルスとの合併症にも効果が期待できる新しい抗ウイルス剤開発の礎となるものである。

3. 研究の方法

PI に対する活性が不明な既知の PLA1, 2, そしてリパーゼ領域を持つ未だクローニングされていない遺伝子を PI-PLA1, PI-PLA2 の候補遺伝子とした。PI は細胞膜内膜に局在することから、細胞内に局在するタンパク質を、更に標的遺伝子として絞り込みを行った。それらの遺伝子を発現ベクターに組み込み、動物細胞で発現し、その細胞破碎液を酵素液とし PI-PLA1, PI-PLA2 活性を測定した。

リン脂質代謝酵素の過剰発現・ノックダウン細胞における膜融合の実験では、HIV 構成タンパク質 (gp160, Tat) を発現した HEK293T 細胞と、HIV 受容体 (CD4/CCR5) とルシフェラーゼを発現したリン脂質代謝酵素の過剰発現・ノックダウン細胞を培養し、両細胞の膜融合活性を測定する。

4. 研究成果

本研究では、PI を基質とする PLA1, PLA2 の候補遺伝子の発現ベクターを構築し、その過剰発現細胞で PI-PLA1, PI-PLA2 活性を測定した。しかしながら、優位な PI-PLA1, PI-PLA2

活性の上昇は見られなかった。引き続き、その他の候補遺伝子についても同様の実験を行っているところである。

リン脂質代謝酵素ノックアウト細胞に HIV 受容体の CD4 と CCR5 を発現 (Target 細胞) させ、HEK293T 細胞に HIV エンベロープタンパク質を発現 (Effector 細胞) させ、ルシフェラーゼレポーター法にて膜融合活性を調べた。すると、あるリン脂質代謝酵素発現細胞において、コントロール細胞と比較して膜融合活性が上昇した。この細胞における膜表面の HIV 受容体の CD4, CCR5 発現量を FACS で解析した。すると、全ての細胞で CD4, CCR5 ともに発現量に違いは見られなかった。これらの結果はリン脂質代謝酵素発現細胞における膜融合活性の上昇は形質膜での HIV 受容体数の増減によるものではなく、リン脂質代謝酵素そのもの、あるいは代謝産物が何らかの機構で HIV 感染 (膜融合) に関与していることを強く示唆するものである。今後は以下のことについて調べていく。

HIV 感染は HIV エンベロープ gp120 と HIV 受容体 CD4 の結合により始まる。そこで、リン脂質代謝酵素の導入・欠損細胞において結合に変化があるか調べる。

HIV 受容体 CD4, CCR5 はラフトに局在し、CXCR4 は刺激に応じてラフトへ移行する。リン脂質代謝酵素の増加・減少が HIV 受容体局在に与える影響を調べる。

HIV 受容体である CD4, CCR5, CXCR4 は多量体 (ホモダイマー、ヘテロダイマー) を形成し、HIV 感染受容体と機能することが報告されている。そこで、HIV 受容体の二量体化におけるリン脂質代謝酵素の効果を調べる HIV エンベロープ gp120 刺激をし、CD4, CCR5, CXCR4 の FRET 値を測定する。

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 2 件)

- 1) Kazuko H. Nomura, Daisuke Murata, Yasuhiro Hayashi, Dejima Katsufumi, Souhei Mizuguchi, Eriko Kage-Nakadai, Keiko G. Ando, Shohei Mitani, Yoshio Hirabayashi, Makoto Ito, and Kazuya Nomura., Ceramide glucosyltransferase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is involved

in oocyte formation and in early embryonic cell division.

Glycobiology (2011) 21:834-848. 査読有

- 2) Yasuhiro Hayashi, Nozomu Okino, and Makoto Ito

Klotho 関連蛋白質 KLRP を介した新しい
グルコシルセラミド代謝経路. 生化学会
誌 (2010) 82: 47-53. 査読無

〔学会発表〕 (計 1 件)

林康広、伊東信「Klotho 関連タンパク質 KLRP
を介した新しいスフィンゴ糖脂質代謝経路」
糖鎖機能研究会 口頭発表 (2010) 7月1日
-2日生理学研究所 (愛知)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/seika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 康広 (Hayashi Yasuhiro)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：70582857

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし