

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590095

研究課題名(和文) 内在性マリファナ様物質の産生に関わる新規イノシトールリン脂質代謝経路の解明

研究課題名(英文) Research for the novel metabolic routes of endogenous marijuana-like substance, lysophosphatidylinositol.

研究代表者

山下 純 (Yamashita, Atsushi)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80230415

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)：マリファナの主要成分 9-テトラヒドロカンナビノールの作用は、カンナビノイドCB1、CB2の2つを介する。最近、第3の受容体としてGPR55が同定された。私たちはリゾホスファチジルイノシトール(LPI)、特にグリセロール骨格の2位にアラキドン酸を持つLPIが効率よい内因性アゴニストであることを発見した。本研究はLPIの産生経路を検討し、細胞内型ホスホリパーゼA1のDDHD1が2-アラキドノイルLPIの産生に関与することを明らかにした。また、リゾホスファチジルイノシトールアシルトランスフェラーゼの逆反応により2-ステアロイルLPIが産生する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： The actions of tetrahydrocannabinol are known to be mediated by two G-protein-coupled receptors CB1 and CB2. Recently, another receptor GPR55 has been proposed as a novel type of cannabinoid receptor. We identified lysophosphatidylinositol (LPI) as an agonist for GPR55, and found that the intracellular phospholipase A1 (DDHD1) was involved in the formation of 2-arachidonoyl LPI. We also found that 1-stearoyl LPI was formed by the reverse reaction of lysophosphatidylinositol acyltransferase (LPIAT/MBOAT7).

研究分野：医歯薬学

キーワード：リゾリン脂質、ホスホリパーゼA、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、遺伝性痙性対麻痺、カンナビノイド、GPR55

1. 研究開始当初の背景

マリファナ (大麻) は多くの国で禁止薬物に指定されており、マリファナおよび類似薬物の乱用は社会的な問題になっている。マリファナを摂取すると、時間感覚・空間感覚の混乱、多幸感、記憶の障害、痛覚の低下、幻覚など多彩な精神神経反応がみられる。一方、免疫系が抑制されることも知られ、その結果、マリファナ常習者は感染症や癌になりやすいと考えられている。マリファナの作用の多くは $\Delta 9$ -テトラヒドロカンナビノール ($\Delta 9$ -THC, Fig. 1-A) を初めとするカンナビノイドと総称される化合物によるものである。 $\Delta 9$ -THC などのカンナビノイドは、オピオイドなどの場合と同様に、特異的なレセプター (カンナビノイドレセプター) を介して作用していると考えられている。カンナビノイドレセプターは、7 回膜貫通型、G タンパク質 (Gi/Go) 共役型のレセプターである CB1 受容体と CB2 受容体の 2 つが同定されている (Fig. 2, CB1 と CB2)。CB1 受容体が脳などで多量に発現していること、一方、CB2 受容体が脾臓や扁桃腺など、免疫系の臓器や細胞に多く発現していることは、カンナビノイドが精神作用や免疫抑制作用を持つことを説明している。カンナビノイドレセプターリガンドはリモナバン (Fig. 1-B) の様に医薬品としての応用が期待されている。

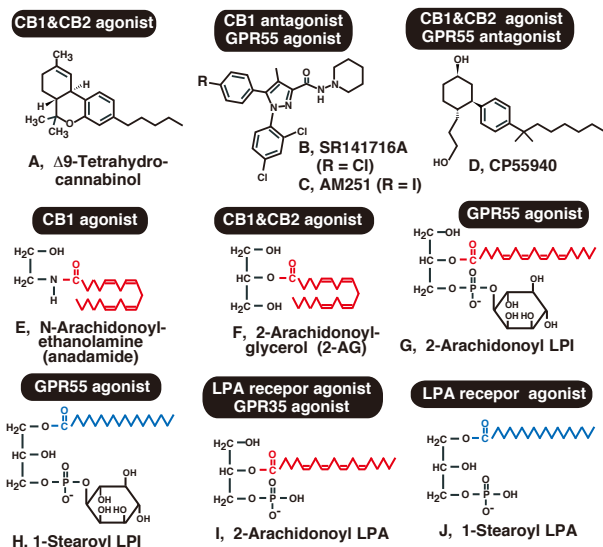


Fig. 1 カンナビノイドリガンドと内因性カンナビノイド

カンナビノイドレセプターが存在することから、内因性のリガンドが存在することが想定され、その検索が行われた。Devane らはブタの脳から、N-アラキドノイルエタノールアミン (アナンダミド) を単離した (Fig.1-E)。注目すべきことに、アナンダミドは CB1 レセプターに対して高い親和性を示すものの、アゴニストとして活性が弱く、部分作動薬として作用することが分かった。また、私たちのグループは、通常の組織にアナンダミドはごく少量しか存在しないこと、虚血など病的な状態の時に大量に産生されることを見いだした。その生合成ルートも、

通常ほとんど存在しないリン脂質のグリセロール sn-1 位のアラキドン酸が利用されることなど合理的なものでないことを証明した。この生合成ルートは他の脂肪酸を持つ N-アシルエタノールアミンを産生することが主の経路で、アナンダミドは副生成物である可能性が高い。

このような状況から、私たちのグループは、他の内在性リガンドを探索し、アナンダミドと構造的に類似する 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG, Fig.1-F) が、CB1 および CB2 レセプターのアゴニストとして作用することを発見した。生合成ルートもホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転が亢進した際に生じる、アラキドン酸含有ジアシルグリセロールがリパーゼで代謝されて生じることが想定される。これらのことから、カンナビノイドレセプター CB1、CB2 の本来の生理的なりガンドは、2-AG である可能性が高いことが示された。

一方、 $\Delta 9$ -THC もアナンダミドと同様、CB1、CB2 の部分作動薬であることが判明した。従って、その多彩な作用の一部は、カンナビノイドレセプターや生理的なりガンドである 2-AG の作用を攪乱することによるものである可能性がある。

しかし近年、マリファナの作用が CB1 および CB2 の 2 つのレセプターでは説明できないことが指摘されていた。最近、第 3 のレセプターとして、これまでリガンド未知のレセプターとして登録されていた G タンパク質共役型レセプター GPR55 が同定された。GPR55 は CB1 および CB2 に相同性は低く、Non-EDG タイプの LPA 受容体と近縁であった (Fig. 2)。

私たちは直ちに内因性アゴニストの探索に取組み、CB1 および CB2 レセプターの内因性アゴニストの 2-AG の GPR55 に対する作用を検討したが、2-AG は GPR55 のアゴニストとして作用しないことが分かった。そこで他の関連化合物にアゴニストとして作用するものはないかと探索した。様々な化合物を検討した結果、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトール (LPI, Fig. 1-F, G) がアゴニストであることを発見した。

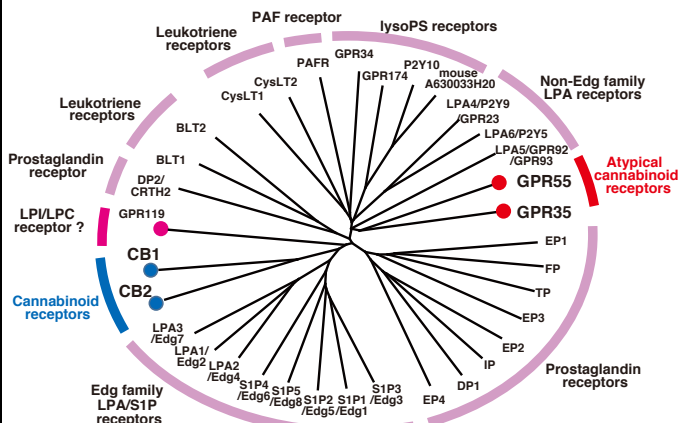


Fig. 2 脂質メディエーター受容体の樹形図

リゾホスファチジルイノシトールの構造-活性相関を検討したところ、グリセロール骨格の2位にアラキドン酸を持つ LPI が最も効率よいアゴニストであることを見いだした (Fig. 1-F)。

2. 研究の目的

リゾホスファチジン酸 (LPA) などのリゾリン脂質は特異的な受容体を介して様々な生理活性を発揮する (Fig. 2)。我々のグループではリゾリン脂質の一つであるリゾホスファチジルイノシトール (LPI) が、カンナビノイド受容体の一つとして報告されたオーファン GPCR の GPR55 にアゴニストとして作用することを発見した。LPI の構造活性相関を検討した結果、グリセロール骨格の sn-2 位にアラキドン酸を持つ LPI (2-アラキドノイル LPI) が最も活性が強いことを見いだした。ラット脳の LPI を分析すると、ラット脳に相当量の LPI (38 nmol/g tissue) が存在していることが分かった。その脂肪酸組成は、2-アラキドノイル LPI が 22%、1-ステアロイル LPI が 50%を占めていた。

ホスファチジルイノシトール (PI) の構成脂肪酸は特徴的で、sn-1 位にステアリン酸、sn-2 位にアラキドン酸を持つものが多く存在する (Fig. 3)。最も活性が高い 2-アラキドノイル LPI は、PI がホスホリパーゼ A1 (PLA1) の作用を受けたときに生じることが考えられる。一方、最も多量に存在する 1-ステアロイル LPI の生成にはホスホリパーゼ A2 (PLA2) が関与することが考えられる。

しかし、PLA1 に関する研究は非常に限られており、また、PI を基質とする PLA1 はほとんど知られていない。また、PI を基質とする PLA2 も明らかになっていない (Fig. 3)。

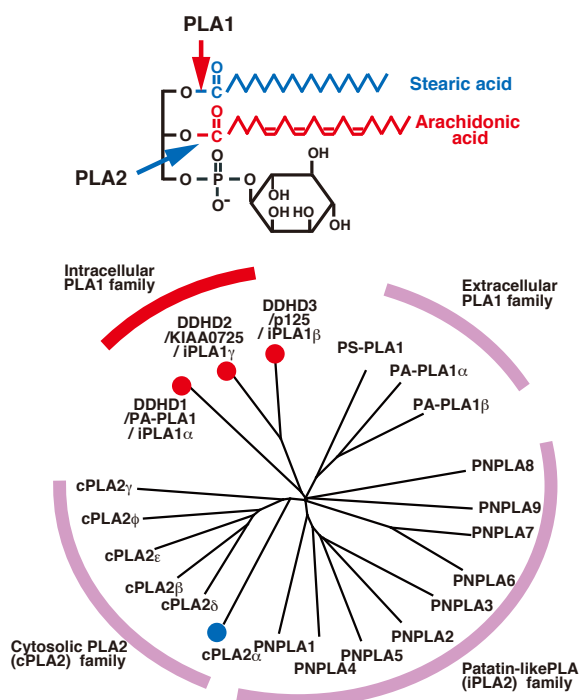


Fig. 3 LPIの産生とホスホリパーゼA

PLA2 と同様、PLA1 も細胞内型と細胞外型 (分泌型) の酵素が想定されている。PI の多くは細胞内に存在することが知られているので、細胞内型 PLA が LPI の産生に関与することが考えられる。

本研究は、2-アラキドノイル LPI の産生に関与する PLA1 の解明の手掛かりを得るべく、既知の PLA1 の性状・機能を再評価した。細胞内型 PLA1 としては、DDHD domain containing 1 (DDHD1)などが、NCBI データベースに登録されている。DDHD1 は、ホスファチジン酸 (PA) を基質として好む PLA1 (PA-preferential PLA1 (PA-PLA1))として同定された酵素であるが、その真の生理的な意義は明らかになっていない (Fig. 3)。酸性リン脂質の PA を基質とする DDHD1(PA-PLA1)が、同じく酸性リン脂質の PI を基質とすることを想定して、精製蛋白質および発現細胞を用いて、LPI 産生における DDHD1 の役割を調べた。また、1-ステアロイル LPI の生成酵素の探索を行った。

3. 研究の方法

遺伝子のクローニング、哺乳動物細胞への発現、ノックダウンなど、生化学、分子生物学の実験は、標準的な方法により行った。

4. 研究成果

1) DDHD1 の発現および発現抑制

FLAG-DDHD1 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し安定発現細胞を樹立した。また、組換えレトロウイルスによる発現によっても、DDHD1 野生型および S539A 活性変異酵素の発現細胞の取得にも成功した。各細胞の抽出画分を抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で解析すると、COS-7 細胞および HEK293 細胞の抽出画分に 120 kDa のタンパク質が検出された (Fig.4-A)。DDHD1 野生型および S539A 活性変異酵素の発現細胞が樹立されたことが示された。

miRNA 発現ベクターはターゲット配列を、human DDHD1 の遺伝子配列をもとにデザインし、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR に組換えた (①と②)。一方、mouse Ddhd1 の遺伝子配列をもとにデザインしたものも作成した (③と④)。FLAG-human DDHD1 発現させた HEK293 細胞に、各種 miRNA 発現ベクターをリポフェクションした (Fig.4-B)。

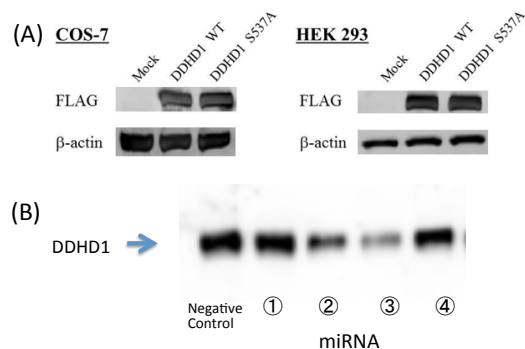


Fig. 4 DDHD1の発現(A)と発現抑制系(B)の構築

4 8時間培養後、細胞抽出画分を抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で解析した。miR①および miR④の効果は低かったが、miR②と miR③は効力が比較的高く、human DDHD1 の発現をタンパク質レベルで抑制した。miR③は mouse Ddhd1 の遺伝子配列をもとにデザインしたものであるが、ターゲット配列が human DDHD1 と共通であるため、human DDHD1 の発現抑制をしたことが示された。

2) FLAG-DDHD1 の PLA1 活性

FLAG-DDHD1 を安定発現した HEK293 細胞 (DDHD1/HEK293) を用いて、細胞レベルでの LPI 産生に対する DDHD1 の影響を調べた。DDHD1/HEK293 細胞を³Hアラキドン酸で標識した後、イオノマイシンで刺激したところ、³H LPI および³H LPA の産生が観察された (Fig. 5-A)。刺激をしない場合は、³H LPI/³H LPA の産生はほとんど観察されないことより、FLAG-DDHD1 は刺激に応答したリゾリン脂質の産生に関与することが示された。アラキドン酸含有 LPI または LPA が産生されたこと、アラキドン酸はリン脂質の sn-2 位に存在することから、DDHD1 は PLA1 活性を有することが示された。

精製酵素を用いて DDHD1 が PLA1 活性を持つかどうか調べた (Fig. 5-B)。¹⁴Cアラキドン酸または¹⁴Cステアリン酸で標識した PI を基質として、in vitro で活性を測定した。基質を精製 DDHD1 とインキュベートすると、¹⁴Cアラキドノイル LPI は生成するが、¹⁴Cステアロイル LPI はほとんど生成しなかった。アラキドン酸は PI の sn-2 位に、ステアリン酸は sn-1 位に存在することから、DDHD1 は PI-PLA1 活性を持つことが示された (Fig. 5-B)。

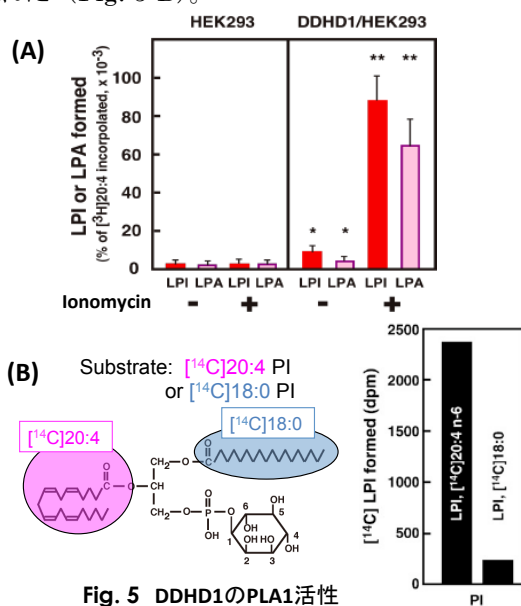


Fig. 5 DDHD1のPLA1活性

3) LPI アシルトランスフェラーゼの解析

LPI アシルトランスフェラーゼはアシル

CoA と LPI を基質とし、アシル CoA の脂肪酸を LPI に転移して PI を産生する酵素である。2-アシル型 LPI を基質とする LPIAT/MBOAT7 (Membrane bound O-acyltransferase 7) と 1-アシル型 LPI を基質とする AGPAT8 (Acylglycerophosphate acyltransferase 8) が存在する。私たちは、MBOAT7 を発現させた HEK293 細胞の膜画分を酵素として用いると、MBOAT7 がアラキドノイル CoA と 1-アシル型 LPI を良い基質とするが、ステアロイル CoA と 2-アシル型 LPI を基質としないことを示した。このことは MBOAT7 が PI の sn-2 位にアラキドン酸を選択的に導入することを示す (Fig. 6)。

一方、AGPAT8 を発現させた膜画分を酵素として用いると、AGPAT8 はステアロイル CoA の脂肪酸を、1-アシル型および 2-アシル型 LPI に転移し、脂肪酸の導入位置の選択性が低いことが示された (Fig. 6)。しかし、細胞レベルで解析すると、AGPAT8 を発現させた HEK293 細胞はステアリン酸の PI の sn-1 の導入を亢進したが、アラキドン酸の PI への導入には関わらなかった。

これらの結果は、MBOAT7 が PI の sn-2 位へのアラキドン酸を導入に、AGPAT8 が sn-1 位へのステアリン酸の導入に関与することを示す。これらの酵素などが協調して作用することで、1-ステアロイル-2-アラキドノイル PI が生成することが考えられる (Fig. 6)。1-ステアロイル-2-アラキドノイル PI の生成は、GPR55 のアゴニスト、2-アラキドノイル LPI および 1-ステアロイル LPI の産生のために必須のプロセスである。

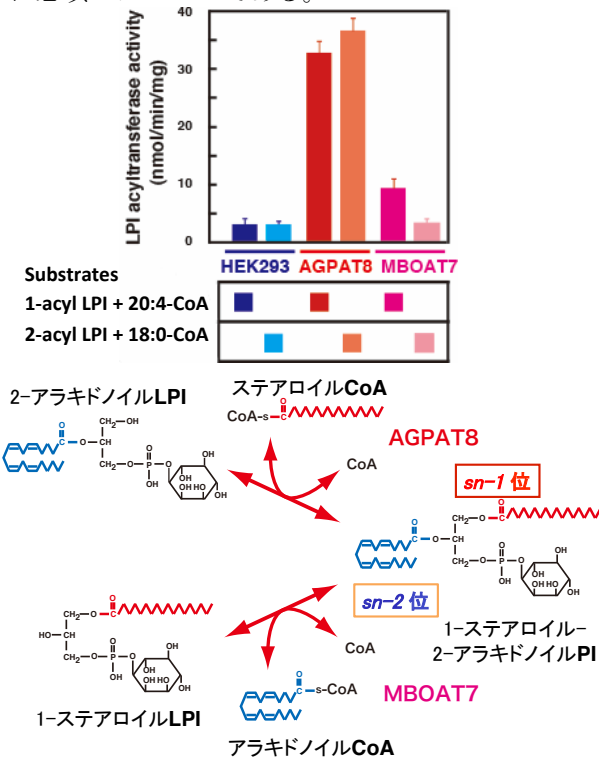


Fig. 6 LPIアシルトランスフェラーゼの基質特異性

4) LPI アシルトランスフェラーゼの逆反応

LPI アシルトランスフェラーゼは、前述したように、2-アラキドノイル LPI および 1-ステアロイル LPI の前提となる 1-ステアロイル-2-アラキドノイル PI の生成に関与する (Fig. 6)。しかし、LPI アシルトランスフェラーゼの性質を解析する過程で、LPI アシルトランスフェラーゼそのものが、2-アラキドノイル LPI および 1-ステアロイル LPI の産生に関与する可能性について気がついた。

MBOAT7 または AGPAT8 を発現させた HEK293 細胞の膜画分を酵素として、2-[¹⁴C]アラキドノイル PI、CoA、BSA とインキュベートした後、生成物を分析した。MBOAT7 の場合、2-[¹⁴C]アラキドノイル PI から [¹⁴C]アラキドノイル CoA が生成するのに対して、AGPAT8 の場合は 2-[¹⁴C]アラキドノイル LPI が生じた (Fig. 7-A)。一方、[¹⁴C]ステアロイル PI を基質とした場合は、MBOAT7 は 1-[¹⁴C]ステアロイル LPI を、AGPAT8 は [¹⁴C]ステアロイル CoA を生成した (Fig. 7-B)。これらの結果は、これらの LPI アシルトランスフェラーゼが逆反応を触媒し、それぞれ MBOAT7 は 1-ステアロイル LPI を、AGPAT8 は 2-アラキドノイル LPI を生成することを示している (Fig. 6 下段)。

脳などの組織に存在する 1-ステアロイル LPI および 2-アラキドノイル LPI の少なくとも一部は LPI アシルトランスフェラーゼの逆反応により生じる可能性が考えられた。

5) DDHD1 の変異が関与する遺伝病の発見

フランス INSERM の Darios、Stevanin 博士との共同研究で、DDHD1 遺伝子に変異が存在する家系を見だし、DDHD1 が欠損すると遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia, HSP) となることを明らかにした (Fig. 8)。遺伝性痙性対麻痺 HSP は下肢の痙縮と筋力低下を呈する神経変性疾患で

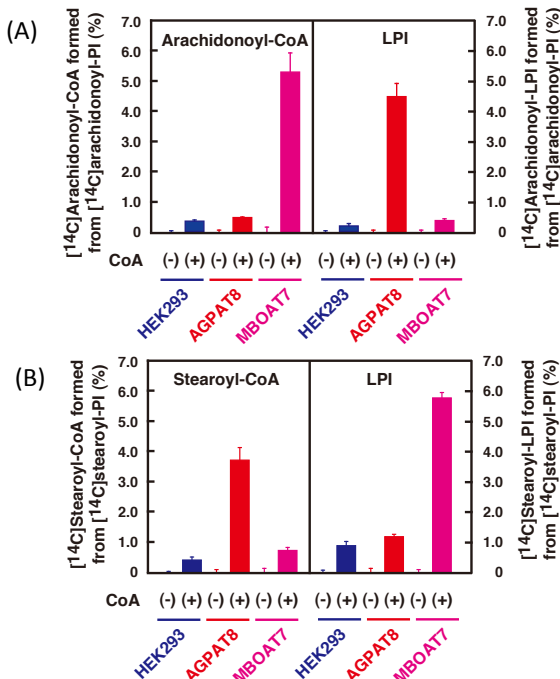


Fig. 7 LPIアシルトランスフェラーゼの逆反応によるLPIの生成

ある。遺伝性痙性対麻痺 HSP の原因遺伝子は様々なものがあり、SPG 亜型として分類されている。DDHD1 の変異は SPG28 と分類された。3つの家系を見だし、変異はエクソン4または10の途中にストップコドンを生じるもの、エクソン7と11の後にスプライシング異常を起こすものであった。これらは Truncate 型酵素を生じる。

SPG28 患者の血液からリンフォブラスト

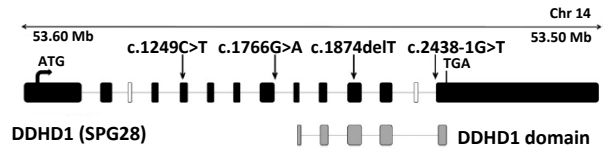


Fig. 8 DDHD1遺伝子の変異は遺伝性痙性対麻痺 (SPG28亜型) を引き起こすを樹立した。SPG28 患者からのリンフォブラストは、健常人からのものに比べて、酸素消費 (Fig. 9-A) およびミトコンドリア ATP 産生 (Fig. 9-B) の低下が観察された。DDHD1 の変異により、ミトコンドリア機能が低下す

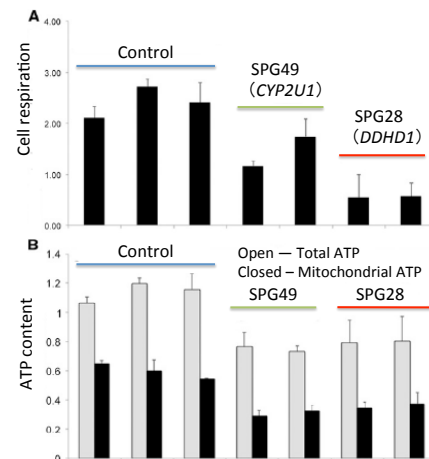


Fig. 9 DDHD1遺伝子の変異はミトコンドリア機能低下を引き起こすことが示唆された。

SPG28 (DDHD1) 変異と遺伝性痙性対麻痺の関係を検討した。ミトコンドリアは呼吸により酸化ストレスにさらされている。酸化による障害を避けるため、ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返す、その成分を更新している。最近、ミトコンドリアの融合にホスファチジン酸 (PA) が、その産生にミトコンドリアホスホリパーゼ D (MitoPLD) が関与することが報告された。MitoPLD による PA がミトコンドリア融合を促進し、一方、PA ホスファターゼ (Lipin) による PA の分解がミトコンドリアの分裂を促進する (Fig. 10 上段)。DDHD1 はミトコンドリア表面の PA の分解に関与することが考えられる。ミトコンドリアは分裂と融合のバランスが失われることが、ミトコンドリアの機能不全を引き起こし、これが神経変性の原因のひとつになる可能性が考えられた。

実際、HeLa 細胞に MitoPLD を発現させるとミトコンドリア融合を促進した (Fig. 11)。一方、DDHD1 を発現させるとミトコンドリアの断片化 (分裂) が促進された (Fig. 11)。これらの結果は DDHD1 の欠損により

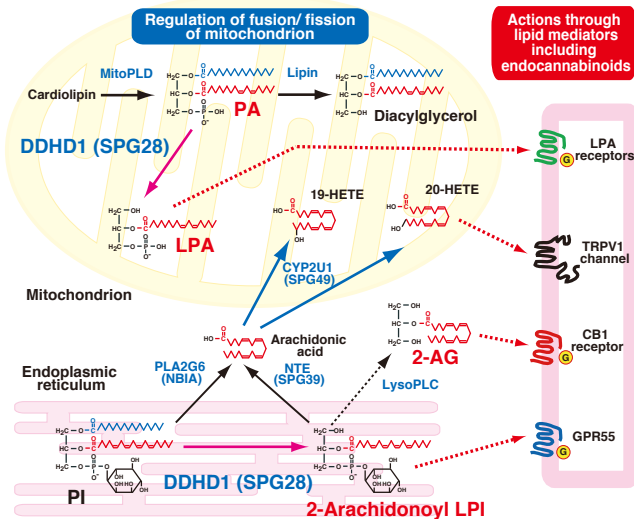


Fig. 10 DDHD1遺伝子の変異と遺伝性痙性対麻痺の関係(モデル) ミトコンドリアの融合が促進されることを示唆する。

一方、DDHD1の欠損は、カンナビノイド受容体 GPR55 のアゴニストの 2-アラキドノイル LPI の産生を欠失させる。LPI は細胞増殖や細胞の生存に関与しているので、このことも遺伝性痙性対麻痺 SPG28 の神経変性の原因となることが考えられた (Fig. 10 下段)。

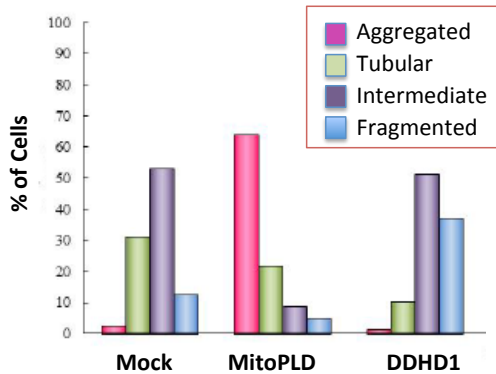


Fig. 11 MitoPLDとDDHD1のミトコンドリア形態への影響

まとめ 本研究は内在性カンナビノイド産生における新規ホスファチジルイノシトールの代謝系の一端を明らかにした (Fig. 12)。

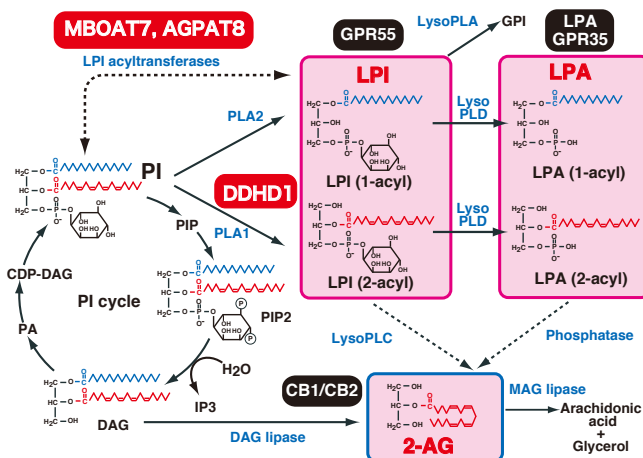


Fig. 12 内在性カンナビノイド産生における新規ホスファチジルイノシトールの代謝系

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., Sugiura, T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid Res.* 2014, **53**, 18-81.
- 2) Yamashita, A., Oka, S., Tanikawa, T., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Sugiura, T. The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013, **107**, 103-116.
- 3) Tesson, C., Yamashita, A., Darios, F., Stevanin, G., et al., Alteration of fatty acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 2012, **91**, 1051-1064.

[学会発表] (計 35 件)

- 1) 山下 純、古賀裕基、鈴木尚孝、伊藤真琴、林 康広、佐々木 洋子、杉浦 隆之
リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼによる CoA 依存性トランスアシルレーション反応の再構成、日本薬学会第 134 回年会 (2014 年 3 月 28~30 日、熊本)
- 2) 山下 純、古賀裕基、鈴木尚孝、林 康広、佐々木 洋子、岡 沙織、谷川 尚、杉浦 隆之
アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ 8 (AGPAT8) の逆反応と基質特異性 第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月 14~16 日、福岡)
- 3) Yamashita, A., Kumazawa, T., Koga, H., Oka, S., Nemoto-Sasaki, Y., Hayashi, Y., Tanikawa, T., Sugiura, T. Generation of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for novel cannabinoid receptor GPR55, by intracellular phospholipase A1. Fourth European Workshop on Lipid Mediators (September 27-28 2012, Pasteur Institute, Paris, France)

[その他] ホームページ

<http://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/460/16>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 純 (YAMASHITA ATSUSHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号: 80230415

(2) 連携研究者

佐々木 洋子 (NEMOTO-SASAKI YOKO)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号: 90324110

林 康広 (HAYASHI YASUHIRO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号: 70582857