

## 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 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590075

研究課題名（和文） 新規内在性カンナビノイド・リゾホスファチジルイノシトールの産生及び消去機構の解明

研究課題名（英文） Research for the biosynthesis and degradation of lysophosphatidylinositol, a novel endogenous cannabinoid ligand.

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

研究成果の概要（和文）：

マリファナの主要成分  $\Delta^9$ -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。しかし、LPI の産生機構は明らかでない。本研究では、細胞内型ホスホリパーゼ A1 の DDHD1 が、刺激に応答した LPI の産生に関与することを明らかにした。

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. We identified lysophosphatidylinositol (LPI) as an agonist for GPR55, found that the intracellular phospholipase A1 (DDHD DDHD1) is involved in the formation of 2-arachidonoyl-LPI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リゾリン脂質、リゾホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトール、ホスホリパーゼ A、カンナビノイド、マリファナ、GPR55

## 1. 研究開始当初の背景

マリファナ（大麻）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）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。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が存在することから、内在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）。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）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（Fig.1）。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の本来の生理的なリガンドは、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リガンドである 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。

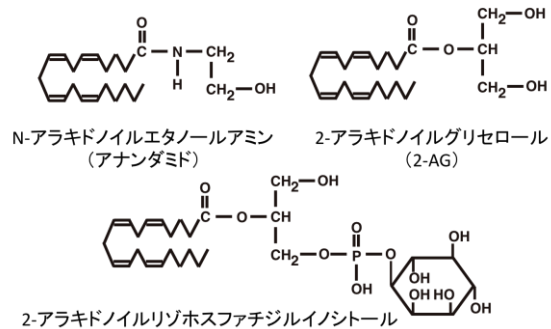


Fig. 1 内在性カンナビノイド

しかし、マリファナの作用は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。私たちは直ちに内因性アゴニストの探索に取り組み、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。しかし、2-AGはGPR55のアゴニストとして作用しないことが分かり、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、リゾリン脂質のひとつである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が効率よいアゴニストであることを発見した（Fig. 1）。

## 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。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-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphoinositol）が最も活性が強いことを見いだした。

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。sn-2位にアラキドン酸を持つ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。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。

ホスホリパーゼA2（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が、PLA2の研究に比べ、その進展が遅れている。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PLA1が関与することが考えられる。

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。本研究は、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。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。

### 3. 研究の方法

#### (1) FLAG-DDHD1(PA-PLA1)発現系の構築と安定発現細胞の樹立

ヒトDDHD1 ORF 全長を含む遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA4/TOにサブクローニングした。その際にN末端にFLAGタグに相当する配列を挿入した。プラスミドをHEK293細胞に導入した後、Zeocinにより遺伝子導入細胞を選択し、FLAG-DDHD1を安定発現したHEK293細胞 (DDHD1/HEK293) を樹立した。

#### (2) FLAG-DDHD1の精製

DDHD1/HEK293細胞の可溶性画分を調製し、抗FLAG抗体カラムにアブライした。カラムを緩衝液でよく洗浄した後、FLAG-DDHD1を100 mM glycine (pH 3)を用いて溶出した。ただちに1M Tris-HCl (pH7.4)で中和し精製標品を得た。

#### (3) $[^3\text{H}]\text{PI}$ を基質としたPLA活性(PI-PLA活性)の測定

細胞抽出物または精製FLAG-DDHD1を $[^3\text{H}]\text{PI}$ と1% Triton X-100の混合ミセルとインキュベートした。反応をクロロホルム:メタノール混液を加えて停止した後、2N塩酸酸性下でBligh & Dyer法を用いて脂質を抽出した。TLCで基質 $[^3\text{H}]\text{PI}$ と生成物 $[^3\text{H}]\text{LPI}$ を分離した後、放射活性を測定しPLA活性を求めた。 $[^{14}\text{C}]\text{PA}$ を基質とした場合のPLA活性(PA-PLA活性)も同様の方法で求めた。

#### (4) FLAG-DDHD1のリン脂質への結合活性の解析

PAなどのリン脂質を1% Triton X-114に溶解した後、精製FLAG-DDHD1と水中5分間インキュベートした。25°Cに加温しTriton X-114を凝集させた後 (Triton X-114の曇点およそ20°C)、遠心分離しTriton X-114相と水相に分離した。Triton X-114相

に分配されるリン脂質に結合したFLAG-DDHD1を、SDS-PAGEと抗FLAG抗体を用いたWestern blottingにより解析した。

#### (5) 細胞レベルでの $[^3\text{H}]\text{LPI}/[^3\text{H}]\text{LPA}$ の産生の測定

HEK293細胞またはDDHD1/HEK293細胞を $[^3\text{H}]\text{arachidonic acid}$ で標識した。細胞を1 $\mu\text{M}$ イオノマイシンで刺激した後、Bligh & Dyer法を用いて脂質を抽出した。Bligh & Dyer抽出の上層に回収される $[^3\text{H}]\text{LPI}/[^3\text{H}]\text{LPA}$ を2N塩酸酸性下、クロロホルムで抽出した後、二次元TLCで精製した。LPIまたはLPAに相当する部分の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) FLAG-DDHD1のHEK293細胞への発現

FLAG-DDHD1発現プラスミドをHEK293細胞に導入し安定発現細胞 (DDHD1/HEK293) を樹立した。

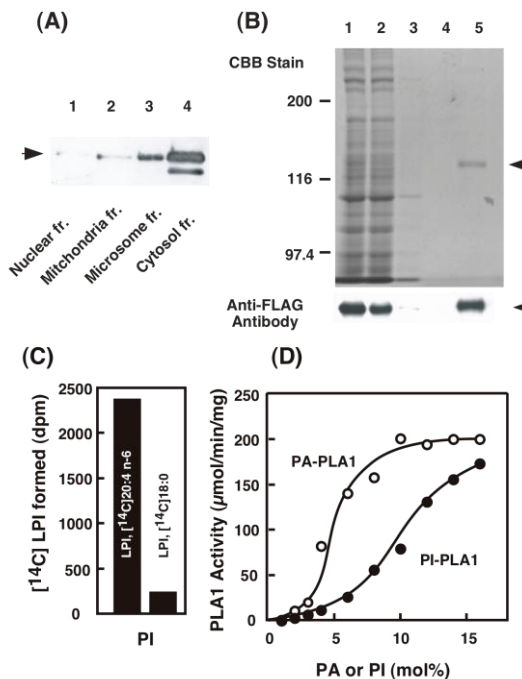
FLAG-DDHD1発現細胞の細胞分画を行ない、核画分、粗ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分 (小胞体)、可溶性画分 (サイトソル) を調製した。各画分をSDS-PAGEで分画した後、抗FLAG抗体を用いたWestern blottingで解析すると、FLAG-DDHD1は大部分、可溶性画分 (サイトソル) に存在した (Fig. 2-A)。細胞抽出液を酵素源としてPI-PLA1活性を測定したところ、活性はFLAG-DDHD1の発現により増大した (結果省略)。

#### (2) FLAG-DDHD1の精製

DDHD1/HEK293細胞の可溶性画分を材料として、抗FLAG抗体カラムを用いて精製した。SDS-PAGEを行ないCBBで染色すると、約120 kDaにタンパク質の単一バンドがみられ、ほぼ均一に精製されていることが示された (Fig. 2-B)。このバンドは抗FLAG抗体を用いたWestern blottingで認識され、FLAG-DDHD1であることが確かめられた。

#### (3) 精製FLAG-DDHD1のPLA1活性

HEK293細胞に $[^{14}\text{C}]\text{アラキドン酸}$ または $[^{14}\text{C}]\text{ステアリン酸}$ を取込ませ、リン脂質を標識した。これの細胞から $[^{14}\text{C}]\text{PI}$ を抽出、精製した。 $[^{14}\text{C}]\text{PI}$ と1% Triton X-100との混合ミセルを基質とし、精製DDHD1とインキュベートすると、 $[^{14}\text{C}]\text{arachidonoyl-LPI}$ は生成するが、 $[^{14}\text{C}]\text{stearoyl-LPI}$ 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活性を持ち、少なくともin vitroで2-arachidonoyl-LPIを産生することが示された (Fig. 2-C)。



**Fig. 2 Expression and purification of FLAG-DDHD1.**

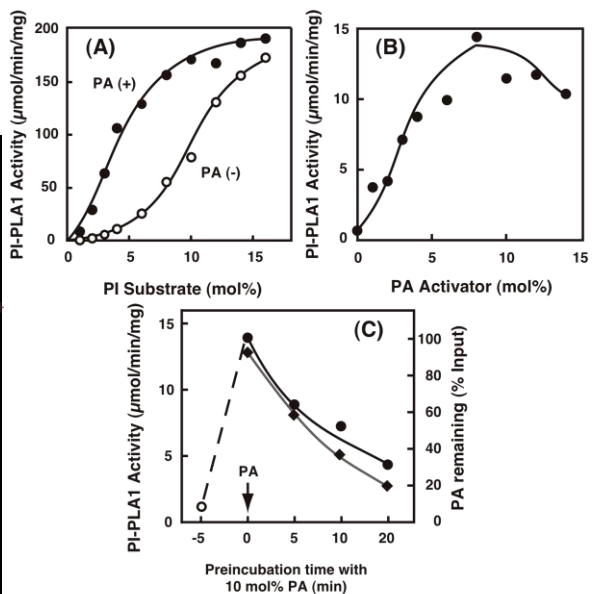
A: Subcellular distribution of DDHD1. DDHD1 levels in nuclei, mitochondria, microsomes and cytosol from HEK293 cells expressing FLAG-tagged DDHD1 were analyzed by immunoblotting with anti-FLAG antibody. Each lane was loaded with 10  $\mu$ g of total protein.

B: Purification of DDHD1. The purification of DDHD1 by immunoaffinity chromatography was assessed by SDS-PAGE and Coomassie staining (upper) or immunoblotting with anti-FLAG antibody (lower). Lane 1, cytosol; lane 2, flow-through fraction; lane 3, STE buffer / 1% Triton X-100 wash; lane 4, STE buffer wash; lane 5, glycine-HCl eluate (purified FLAG-DDHD1).

C: The specificity of DDHD1. The purified DDHD1 (20 ng) was incubated with [ $^{14}$ C]arachidonic acid-containing PI (left) or [ $^{14}$ C]stearic acid-containing PI (right), and the amount of [ $^{14}$ C]LPI formed was determined. The values are averages of three determinations.

D: Kinetic study of DDHD1-catalyzed PLA1 activity. The PI-PLA1 or PA-PLA1 activity of purified FLAG-DDHD1 (20 ng) was measured at the indicated molar ratios of [ $^3$ H]PI (closed circles) or [ $^{14}$ C]PA (open circles) in 16 mM Triton X-100 micelles. The values are averages of three determinations.

[ $^3$ H]PI を基質として Kinetics を検討した (Fig. 2-D)。酵素反応は単純な Michaelis-Menten の Kinetics には従わなかったが、PI に対するみかけの  $K_m$  および  $V_{max}$  を見積ると、それぞれ 10 mol%、190  $\mu$ mol/min/mg であった。同様に PA に対する活性を評価すると、 $K_m$  および  $V_{max}$  はそれぞれ 4 mol%、200  $\mu$ mol/min/mg であった。DDHD1 は PI に比べ PA に対する親和性が高いことが示された。また、一方で両基質に対してほぼ同様な  $V_{max}$  値を与え、PI が基質となりうるということが確かめられた。両活性はメチルアラキドノイルフルオロリン酸 (MAFP) により不活化された。



**Fig. 3 Activation of PI-PLA1 catalysis by PA.**

A: The effect of PA on PI-PLA1 activity. The PI-PLA1 activity of purified FLAG-DDHD1 (20 ng) was measured using 16 mM Triton X-100 micelles with the indicated molar ratios of [ $^3$ H]PI in the absence (open circles) or presence (filled circles) of 10 mol% PA. The values are averages of three determinations.

B: Dose-dependence of PA for the augmented PI-PLA1 activity. The PI-PLA1 activity of purified FLAG-DDHD1 (20 ng) was measured in the presence of the indicated levels of PA. The values are averages of three determinations.

C: Reversal of the activated state of DDHD1 during the preincubation of PA. Purified FLAG-DDHD1 (20 ng) was preincubated for the indicated periods with 10 mol% [ $^{14}$ C]PA before the PI-PLA1 activity was measured using 1 mol% [ $^3$ H]PI in 16 mM Triton X-100 micelles (closed circles). The amount of [ $^{14}$ C]PA remaining was also measured (diamonds). Open circle indicates the PI-PLA1 activity in the absence of PA. The values are averages of three determinations.

#### (4) PA による DDHD1 の活性化

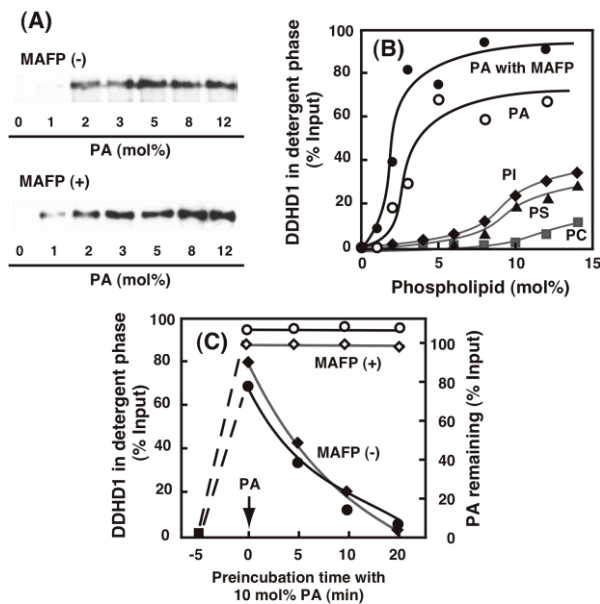
PI-PLA1 活性を測定する際に、反応系に PA を添加すると、PI に対する  $K_m$  を著しく低下させた (3 mol%) (Fig. 3-A)。PA が PI に対する親和性を増加させること、その結果、低濃度の PI を基質とした場合、PA が PI-PLA1 活性を活性化することを示す。

PA の活性化効果は、添加する PA の濃度に依存しており、最大活性化は 8 mol% で得られた (Fig. 3-B)。PA による DDHD1 の活性化は可逆的で、PA と DDHD1 をプレインキュベーションすると、自身の PA-PLA1 活性により PA が消去され、PI-PLA1 の活性化の効果は消失した (Fig. 3-C)。

#### (5) DDHD1 の PA 結合活性

PA が DDHD1 の PI-PLA1 活性を促進する活性を持つことが分かったが、PA が DDHD1 に直接結合することにより活性化作用を示すかどうかを調べた。





**Fig. 4 Binding of purified DDHD1 to phospholipids.**

**A, PA-binding activity of FLAG-DDHD1 and effect of MAFP on the binding.**

Purified FLAG-DDHD1 was preincubated with or without 5  $\mu$ M MAFP for 30 min on ice, and then incubated with the indicated levels of PA in 16 mM Triton X-114 at 25  $^{\circ}$ C for 2 min. After phase separation, DDHD1 bound to PA in the detergent phase was visualized by immunoblotting with anti-FLAG antibody.

**B, Binding of FLAG-DDHD1 to various phospholipids.**

Purified FLAG-DDHD1 was incubated with the indicated levels of various phospholipids in the presence of 16 mM Triton X-114 at 25  $^{\circ}$ C for 2 min. After phase separation, DDHD1 bound to phospholipids in the detergent phase was visualized by immunoblotting with anti-FLAG antibody, quantitated by densitometry and expressed as % of FLAG-DDHD1 added. Open circles, PA; closed circles, PA with MAFP; diamonds, PI; triangles, PS; and squares, PC. The values are averages of two determinations.

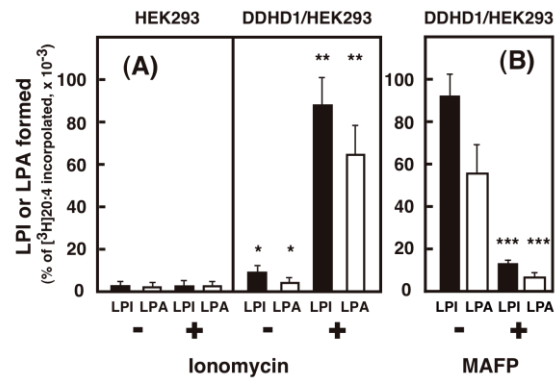
**C, Effect of the preincubation of PA with FLAG-DDHD1 on the distribution of the enzyme to the detergent phase.**

Purified FLAG-DDHD1 was preincubated with (open circles) or without (closed circles) 5  $\mu$ M MAFP for 30 min on ice, and then incubated with 10 mol% PA in 16 mM Triton X-114 at 25  $^{\circ}$ C for the indicated periods before phase separation and quantitation of DDHD1 in the detergent phase as described above. Square indicates the distribution of the enzyme to the detergent phase in the absence of PA.

Purified FLAG-DDHD1 was preincubated with (open diamonds) or without (closed diamonds) 5  $\mu$ M MAFP for 30 min on ice, and then incubated with 10 mol% PA in 16 mM Triton X-114 at 25  $^{\circ}$ C for the indicated periods before the amount of [ $^{14}$ C]PA remaining was measured. The values are averages of two determinations.

Triton X-114 による相分離法を用いて、DDHD1 の PA に対する結合活性を調べた。

Fig. 4 に示すように、DDHD1 は PA が存在しない場合は、相分離後に Triton X-114 相に分配せず、全てが水相に分配された。この結果は DDHD1 が可溶性の蛋白質であることを示し、細胞分画の結果と一致していた。反応液に PA を添加すると、PA の濃度に依存して、Triton X-114 相への分配が増加した。この結果は、DDHD1 が PA と結合した結果、PA とともに Triton X-114 相に分配されたことを示している。DDHD1 は PA に対する結



**Fig. 5 Generation of [ $^3$ H]arachidonic acid-containing LPI and LPA in HEK293 cells expressing DDHD1.**

**A: DDHD1-involved and ionomycin-evoked generation of [ $^3$ H]LPI and [ $^3$ H]LPA.** Control HEK293 cells (left panel) and cells expressing FLAG-DDHD1 (right panel) were prelabeled with [ $^3$ H]arachidonic acid, and incubated for 30 min with or without ionomycin (1  $\mu$ M). The amount of [ $^3$ H]LPI (closed columns) and [ $^3$ H]LPA (open columns) produced were determined. The values are the average + SD of three determinations. \* $P < 0.05$  (vs control HEK293 cells). \*\* $P < 0.001$  (vs unstimulated cells).

**B: Inhibition of the generation of [ $^3$ H]LPI and [ $^3$ H]LPA by MAFP.** HEK293 cells expressing DDHD1 were pre-incubated with 25  $\mu$ M MAFP for 1 h, and then incubated with 1  $\mu$ M ionomycin for 30 min before the quantitation of [ $^3$ H]LPI (closed columns) or [ $^3$ H]LPA (open columns). The values are average + SD of three determinations. \*\*\* $P < 0.001$  (vs without MAFP).

合活性を持っていることが示された。MAFP により、触媒に重要なセリン残基を修飾しても PA への結合は観察されることから、結合は触媒部位以外の領域で起こることが考えられた。また、MAFP 処理は DDHD1 の Triton X-114 相への分配を促進した。MAFP が DDHD1 の PA-PLA1 活性を阻害した結果、PA の分解が減少し、Triton X-114 相への分配が促進されたことが考えられた。このことは、PA と DDHD1 をプレインキュベーションすると、DDHD1 の Triton X-114 相への分配が、PA の残存量に対応して減少することからも確かめられた (Fig. 4-C)。PA の DDHD1 への結合は、DDHD1 自身の PA-PLA1 活性により調節されていることが考えられた。

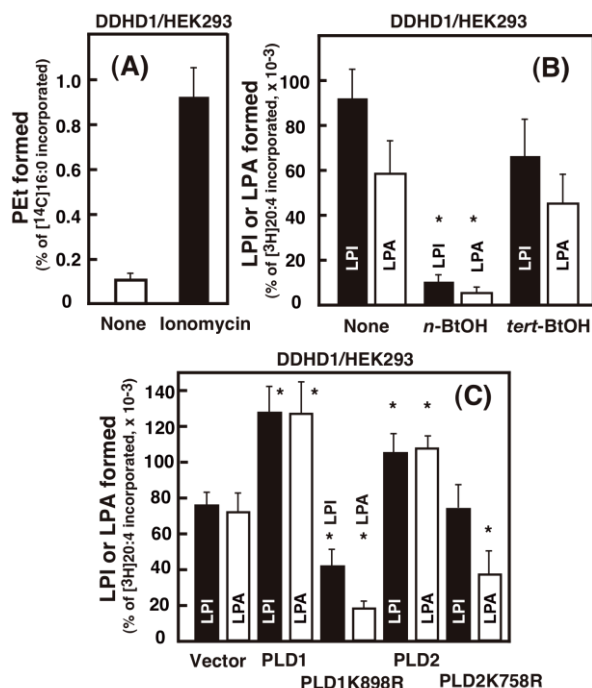
同様な方法で、DDHD1 の他のリン脂質への結合を検討したが、PI や PS への結合は弱く、PC にはほとんど結合しなかった。

#### (6) イオノフォア刺激による [ $^3$ H]LPI/ [ $^3$ H]LPA の産生

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 [ $^3$ H]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、[ $^3$ H]LPI および [ $^3$ H]LPA の産生が観察された (Fig. 5-A)。刺激をしない場合は、[ $^3$ H]LPI/[ $^3$ H]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。細胞を DDHD1 に対する阻害作用を示す MAFP で処理すると  $[^3\text{H}]\text{LPI}/[^3\text{H}]\text{LPA}$  の産生は阻害された (Fig. 1-B)。



**Fig. 6** Involvement of PLD in ionomycin-evoked generation of LPI and LPA

A: Activation of PLD by ionomycin in HEK293 cells expressing DDHD1. HEK293 cells expressing FLAG-DDHD1 were prelabeled with  $[^{14}\text{C}]$ palmitic acid, and subsequently incubated with (closed column) or without  $1 \mu\text{M}$  ionomycin (open column) for 30 min in the presence of 1% ethanol.  $[^{14}\text{C}]\text{PEt}$  was extracted and the radioactivity was determined. The values are the average + SD of three determinations.

B: Inhibition by *n*-butanol of ionomycin-evoked generation of  $[^3\text{H}]\text{LPI}$  and  $[^3\text{H}]\text{LPA}$  in HEK293 cells expressing DDHD1. HEK293 cells expressing FLAG-DDHD1 were prelabeled with  $[^3\text{H}]\text{arachidonic acid}$  and then incubated for 30 min with  $1 \mu\text{M}$  ionomycin alone (left) or with ionomycin and *n*-butanol (*n*-BuOH, middle) or *tert*-butanol (*tert*-BuOH, right) before quantitation of  $[^3\text{H}]\text{LPI}$  (filled columns) or  $[^3\text{H}]\text{LPA}$  (open columns). The values are the average + SD of three determinations. \* $P < 0.01$  (vs control (no addition)).

C: Effect of PLD isoforms on ionomycin-evoked generation of  $[^3\text{H}]\text{LPI}$  and  $[^3\text{H}]\text{LPA}$  in HEK293 cells expressing DDHD1. PLD1, PLD2, or an inactive mutant (PLD1K898R or PLD2K758R) was expressed in HEK293 cells expressing FLAG-DDHD1. The ionomycin-evoked generation of  $[^3\text{H}]\text{LPI}$  (closed columns) and  $[^3\text{H}]\text{LPA}$  (open columns) were quantified. The values are the average + SD of three determinations. \* $P < 0.01$  (vs vector control).

MAFP に感受性の酵素、すなわち DDHD1 が関与することが示された。産生された LPI の 45%、LPA の 30% が細胞外に放出されることが示された (結果省略)。

#### (7) DDHD1 の活性化におけるホスホリパーゼ D (PLD) の関与

*in vitro* で DDHD1 の PI-PLA1 活性が PA により活性化されることが分かったが、これ

が細胞レベルでも起っているかを検討した。

1% のエタノールの存在下、DDHD1/HEK293 細胞をイオノマイシンで刺激すると、ホスファチジルエタノール (PEt) が産生した (Fig. 6-A)。イオノマイシン処理により PLD が活性化されることが示された。

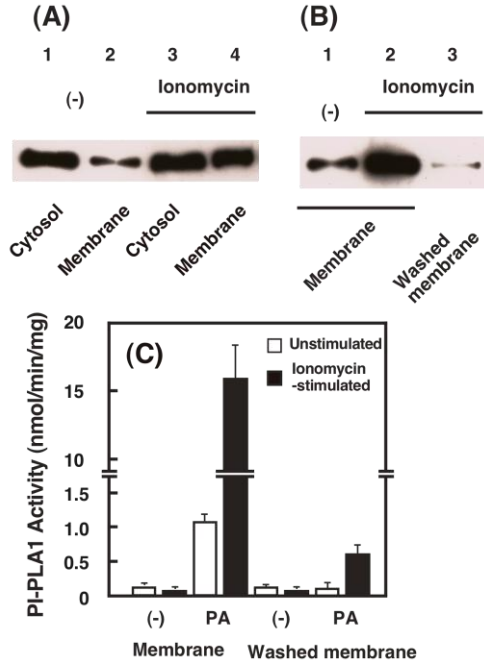
DDHD1/HEK293 細胞をイオノマイシンで刺激する際に、1% の *n*-ブタノールで前処理すると、 $[^3\text{H}]\text{LPI}/[^3\text{H}]\text{LPA}$  の産生は著しく阻害された (Fig. 6-B)。*ter*-ブタノールの前処理はほとんど影響を与えなかったことより、*n*-ブタノールの効果は、有機溶媒の非特異的な作用ではなく、PLD によるホスファチジン酸 (PA) の産生の阻害によることが示された。この結果は、イオノマイシン刺激にตอบสนองした DDHD1 の活性化に PLD-PA 系が関与することを示唆する。

PLD には PLD1 と PLD2 の2つのアイソフォームが知られているが、PLD1 と PLD2 のどちらの酵素が関与するかを検討した (Fig. 6-C)。DDHD1/HEK293 細胞に、野生型 PLD1 と PLD2 を発現させると、 $[^3\text{H}]\text{LPI}/[^3\text{H}]\text{LPA}$  の産生は増大した。PLD が DDHD1 の活性化に関与することが確かめられた。

次に、PLD1 と PLD2 の不活性変異体でドミナントネガティブ効果を持つ変異酵素 (PLD1K898R と PLD2K758R) を発現させた場合の影響も調べた。PLD1K898R を発現させた場合は  $[^3\text{H}]\text{LPI}$  と  $[^3\text{H}]\text{LPA}$  の両方の産生は著しく阻害された。一方、PLD2K758R を発現させた場合は、 $[^3\text{H}]\text{LPA}$  の産生は阻害されたが、 $[^3\text{H}]\text{LPI}$  の産生に影響がなかった。これらの結果は、DDHD1 の活性化に PLD1 の寄与が大きいことを示している。

#### (8) イオノマイシン刺激による DDHD1 のトランスロケーション

DDHD1/HEK293 細胞をイオノマイシンで刺激した後、膜画分とサイトソルを調製し、FLAG-DDHD1 を Western blotting で検出した (Fig. 7-A)。刺激をしない細胞の場合は、膜画分の DDHD1 は非常に少ないものであったが、イオノマイシンで刺激すると、膜画分の DDHD1 が増加した。この結果は刺激により、DDHD1 がサイトソルから膜画分へトランスロケーションしたことを示す。膜画分へトランスロケーションした DDHD1 は、膜画分を緩衝液で洗浄すると減少したことより、DDHD1 の膜結合は可逆的であることが示された (Fig. 7-B)。イオノマイシンで刺激により、膜画分に PI-PLA1 活性が上昇するかを調べたが、膜画分の活性は上昇しなかった (Fig. 7-C)。しかし、膜画分に PA を添加して活性を測定すると、刺激による膜画分の PI-PLA1 活性の上昇が観察された。この結果



**Fig. 7** Translocation of DDHD1 from cytosol to membrane by ionomycin

A: Ionomycin-evoked translocation of FLAG-DDHD1. HEK293 cells expressing FLAG-DDHD1 were incubated for 30 min with (lanes 3 and 4) or without 1  $\mu$ M ionomycin (lanes 1 and 2), and cytosol (lanes 1 and 3) and membranous (lanes 2 and 4) fractions were prepared. Each fraction was analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibody.

B: The effect of washing membranes. HEK293 cells expressing FLAG-DDHD1 were incubated for 30 min with (lanes 2 and 3) or without 1  $\mu$ M ionomycin (lane 1), and membranous fractions were prepared. The membranous fraction from stimulated cells was further washed with buffer (lane 3). Each fraction was analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibody.

C: Translocation of DDHD1 assessed by PI-PLA1 activity. PI-PLA1 activity of DDHD1 in membranes or washed membranes from the cells cultured with (closed columns) or without (open columns) ionomycin was measured in the presence or absence of 1 mol% PA. The values are the average + SD of three determinations.

は、DDHD1の活性化にPAが必要であること、刺激によりDDHD1は膜画分にトランスロケーションするものの、膜画分の調製後に不活性化されることが示された。また、PAを加えると再活性化することも考えられた。DDHD1の不活性化は自身のPA-PLA活性によりPAが除去されることが原因であることが考えられた。

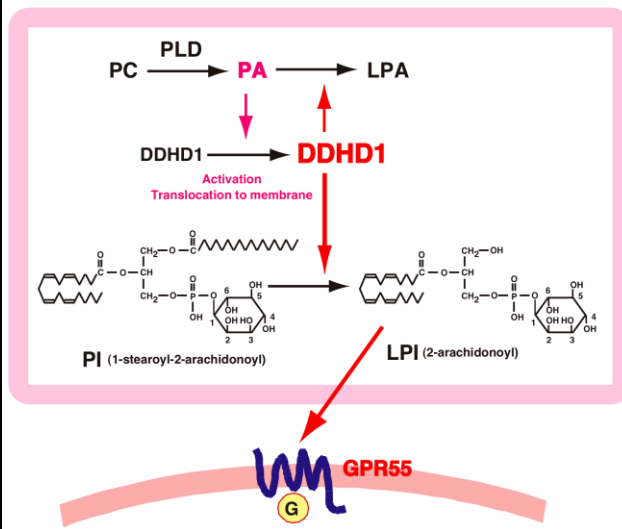
#### (9) 神経系培養細胞を用いた解析

DDHD1は脳に多く存在することが知られているので、神経系の培養細胞でも同様な2-アラキドノイルLPIの産生が見られるかどうかを検討した。

ニューロblastoma SK-N-SH細胞にDDHD1は比較的多く発現していた。この細胞をイオノマイシンで刺激すると2-アラキドノイルLPIの産生が観察された。LPIの産生はMAFPでほぼ完全に阻害された(結果省略)。これらの結果はモデル細胞(DDHD1/HEK293細胞)の結果と非常に類似しており、神経系の細胞においても、DDHD1が2-アラキドノイルLPIの産生に関

与することが考えられた。

【考察】DDHD1はPAを好むPLA1として同定されたが、今までこの酵素の生理的な役割は明らかでなかった。本研究で、DDHD1がLPI産生酵素として働きうることが示された。また、DDHD1の活性化にPLD、特にPLD1が関与することも示された。PLDによるPAの産生は、DDHD1の膜へのトランスロケーションおよび活性化を引起し、膜に存在するPIを基質として、LPIの産生につながることを考えられた(Fig. 8)。今後は、本研究で提案した仮説を検証するとともに、DDHD1の産生したLPIが実際にGPR55のアゴニストとして働きうるかを検証する必要がある。



**Fig. 8** Hypothetical pathway for inter-cellular signaling via LPI and GPR55, showing the proposed roles of DDHD1.

#### 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10件)

1. 杉浦隆之、山下 純、岡 沙織、脂質メディエーターとしてのリゾホスファチジルイノシトールとその受容体、生化学(2011)83、pp525-535 (査読あり)

2. Takashi Okura, Sayaka Kato, Yusuke Takano, Takenori Sato, Atsushi Yamashita, Riyo Morimoto, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki, and Yoshiharu Deguchi, Functional characterization of rat plasma membrane monoamine transporter (PMAT) in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers, J. Pharm. Sci. (2011) 100, 3924-3938 (査読あり)

3. Yosuke Demizu, Aki Nakatsu, Yukiko Sato, Shinobu Honzawa, Atsushi Yamashita, Takayuki Sugiura, Atsushi Kittaka, Shigeaki Kato, Haruhiro Okuda and Masaaki Kurihara, Facile synthesis of stereoisomers of the non-secosteroidal ligand LG190178 and their evaluation using the mutant vitamin D receptor. *Lett. Org. Chem.* (2011) 8, 43-47 (査読あり)

4. 原義令、松岡聡、原弘志、山下 純、松本幸次、細菌のホスファチジン酸合成に関与するアシルトランスフェラーゼの多様性—アシルリン酸をアシルドナーとする新規アシルトランスフェラーゼの発見から、化学と生物、48, 301-304, 2010 (査読あり)

5. Atsushi Yamashita, Tsukasa Kumazawa, Hiroki Koga, Naotaka Suzuki, Saori Oka, and Takayuki Sugiura, Generation of lysophosphatidylinositol by DDHD domain containing 1 (DDHD1). Possible involvement of phospholipase D/ phosphatidic acid in the activation of DDHD1. *Biochim. Biophys. Acta* (2010) 1801, 711-720 (査読あり)

6. Saori Oka, Ryo Ota, Mitsuru Shima, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura, GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010) 395, 232-237 (査読あり)

7. Saori Oka, Shinji Kimura, Toshinobu Toshida, Ryo Ota, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura, Lysophosphatidyl inositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J. Biochem.* (2010) 147, 671-678 (査読あり)

8. Atsushi Yamashita, Ken Tanaka, Ryo Kamata, Tsukasa Kumazawa, Naotaka Suzuki, Hiroki Koga, Keizo Waku, and Takayuki Sugiura, Subcellular localization and lysophospholipase / transacylation reactions of human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). *Biochim. Biophys. Acta* (2009) 1791, 1011-1022 (査読あり)

9. Shinobu Honzawa, Naoyuki Takahashi, Atsushi Yamashita, Takayuki Sugiura, Masaaki Kurihara, Midori A. Arai,

Shigeaki Kato, and Atsushi Kittaka, Synthesis of a  $1\alpha$ -C-methyl analogue of 25-hydroxy vitamin D3: interaction with a mutant vitamin D receptor Arg274Leu. *Tetrahedron* (2009) 65, 7135-7145 (査読あり)

10. Saori Oka, Toshinobu Toshida, Kanako Maruyama, Keisuke Nakajima, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura, 2-Arachidonyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J. Biochem.* (2009) 145, 13-20. (査読あり)

[学会発表] (計 53 件)

1. 脳関門における plasma membrane monoamine transporter の輸送機能  
黄倉 崇、加藤清香、森本理代、油井 聡、山下 純、寺崎哲也、出口芳春 (帝京大・薬、東北大院・薬)  
第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (平成 23 年 11 月 24 日 25 日、岡山)

2. アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ 8 (AGPAT8) によるホスファチジルイノシトール分子種の生合成  
古賀裕基、林 康広、佐々木洋子、鈴木尚孝、岡 沙織、杉浦隆之、山下 純  
第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月 21 ~24 日、京都)

3. 膜結合アシルトランスフェラーゼ MBOAT7 による ATP 非依存的なアシル CoA 産生反応  
山下 純、鈴木尚孝、古賀裕基、佐々木洋子、林 康広、岡 沙織、荒井斉祐、和田郁夫、杉浦隆之  
第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月 21 ~24 日、京都)

4. 新規内在性カンナビノイドリガンド・リゾホスファチジルイノシトールの産生機構  
山下 純、古賀裕基、熊澤司紗、佐々木洋子、林康広、岡沙織、杉浦隆之  
第 16 回アディポサイエンス研究会シンポジウム (2011 年 8 月 20 日(土)、大阪)

5. Lysophosphatidylinositol and related lipid mediators.  
Takayuki Sugiura, Atsushi Yamashita  
Takashi Tanikawa and Saori Oka  
FASEB Summer Research Conference,  
Lysophospholipid Mediators in Health and Disease  
(August 14-19, 2011, Il Ciocco Hotel & Resort, Lucca, Italy)



6. Oleate-induced dephosphorylation of CCT $\beta$  is mediated by protein phosphatase 2C $\epsilon$  upon translocation to the ER membranes.

Seisuke Arai, Atsushi Yamashita, Ikuo Wada

第 63 回日本細胞生物学会大会 (The 63rd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology) (2011 年 6 月 27 日~29 日、札幌)

7. 膜結合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

山下 純、鈴木尚孝、古賀裕基、佐々木洋子、林 康広、岡 沙織、杉浦隆之

脂質生化学研究 Vol. 53, p48-51, 2010  
第 53 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 23 年 5 月 12 日、13 日、東京)

8. 膜結合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

山下 純、鈴木尚孝、古賀裕基、佐々木洋子、林 康広、岡 沙織、杉浦隆之  
日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 28~31 日、静岡)

9.  $\Delta 9$ -テトラヒドロカンナビノール受容体としての GPR35

岡 沙織、島 充、山下 純、杉浦 隆之  
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 10 月 7~10 日、神戸)

10. GPR55 発現細胞に及ぼすリゾホスファチジルイノシトールとカンナビノイド受容体リガンドの影響

島 充、岡 沙織、山下 純、杉浦 隆之  
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 10 月 7~10 日、神戸)

11. アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ 8 (AGPAT8) によるホスファチジルイノシトール分子種の生合成

古賀 裕基、林 康広、佐々木 洋子、鈴木 尚孝、岡 沙織、杉浦 隆之、山下 純  
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 10 月 7~10 日、神戸)

12. 膜結合アシルトランスフェラーゼ MBOAT5 および MBOAT7 による CoA 依存性トランスアシルレーション反応

山下 純、鈴木尚孝、古賀裕基、佐々木洋子、林康広、岡沙織、荒井斉祐、和田郁夫、杉浦隆之

BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 10 月 7~10 日、神戸)

13. 細胞内型ホスホリパーゼ A1 のホスファチジン酸による活性調節

古賀 裕基、熊澤 司紗、岡 沙織、林 康広、佐々木 洋子、杉浦 隆之、山下 純

BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 10 月 7~10 日、神戸)

14. 細胞質ホスホリパーゼ A2  $\gamma$  の細胞内局在の解析

山下 純、佐々木洋子、古賀裕基、熊澤司紗、田中 健、林 康広、岡 沙織、杉浦隆之

BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 10 月 7~10 日、神戸)

15. 細胞質ホスホリパーゼ A2 $\gamma$  の細胞内局在とリゾホスホリパーゼ/トランスアシルレーション反応

山下 純、佐々木洋子、古賀裕基、熊澤司紗、田中 健、林 康広、岡 沙織、杉浦隆之  
第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (平成 22 年 11 月 29 日 30 日、富山)

16. GPR35 発現細胞に及ぼす  $\Delta 9$ -テトラヒドロカンナビノールの影響

島 充、岡 沙織、山下 純、杉浦隆之  
第 54 回日本薬学会関東支部大会 (2010 年 10 月 2 日 (土) 東京薬科大学)

17. 膜結合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

古賀裕基、鈴木尚孝、佐々木洋子、林 康広、岡 沙織、杉浦隆之、山下 純  
第 54 回日本薬学会関東支部大会 (2010 年 10 月 2 日 (土) 東京薬科大学)

18. アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ AGPAT1 および AGPAT2 の C 末端トポロジーとホスファチジン酸の生成トポロジーの関係

山下 純、古賀裕基、鈴木 啓、鈴木尚孝、岡 沙織、杉浦隆之  
第 15 回アディポサイエンス研究会シンポジウム (2010 年 8 月 21 日(土)、大阪)

19. GPR55 and GPR35, putative  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol receptors, and their endogenous ligands.

Takayuki Sugiura, Ryo Ota, Mitsuru Shima, Atsushi Yamashita and Saori Oka  
20th Annual symposium on the Cannabinoids, International Cannabinoid

Research Society (ICRS), Lund, Sweden  
(July 24 - 27, 2010)

20. Biological activities of lyso  
phosphatidylinositol and several  
cannabinoid receptor ligands and related  
molecules as GPR55 ligands.

Saori Oka, Shinji Kimura, Mitsuru Shima,  
Ryo Ota, Atsushi Yamashita, and Takayuki  
Sugiura

20th Annual symposium on the  
Cannabinoids, International Cannabinoid  
Research Society (ICRS), Lund, Sweden  
(July 24 - 27, 2010)

21. Novel lysophospholipid receptors:  
identification and signaling pathways.

岡 沙織, 山下 純, 杉浦隆之

第27回 内藤コンファレンス (2010年6月  
29日—7月2日、札幌)

22. Gタンパク質共役型受容体 GPR35 の内  
在性リガンドの同定

岡 沙織, 太田 遼, 島 充, 山下 純, 杉浦  
隆之

第11回ファーマコヘマトロジーシンポジウ  
ム (東京、2010年6月18日、19日)

23. S2-01 リゾリン脂質アシルトランスフ  
ェラーゼの酵素学的性状解析

山下 純, 古賀裕基, 岡 沙織, 和久敬蔵,  
杉浦隆之

脂質生化学研究 Vol. 52, p16, 2010

第52回日本脂質生化学会・研究集会 (平成  
22年6月14日、15日、伊香保温泉)

24. Gタンパク質共役型受容体 GPR35 の内  
在性リガンドの同定

岡 沙織, 太田 遼, 島 充, 山下 純, 杉浦  
隆之

脂質生化学研究 Vol. 52, p217-220, 2010

第52回日本脂質生化学会・研究集会 (平成  
22年6月14日、15日、伊香保温泉)

25. Topology of acyltransferase motifs  
and substrate specificity/accessibility in  
AGPAT1 and AGPAT2.

Atsushi Yamashita, Hiroki Koga, Naotaka  
Suzuki, Hiroshi Suzuki, Saori Oka, and  
Takayuki Sugiura

Keystone Symposia: Bioactive Lipids:  
Biochemistry and Diseases (June 6-11,  
2010, Kyoto)

26. ホスファチジルコリン合成経路による  
分泌系タンパク質の機能調節

荒井 齊祐, 西山亜里砂, 山下 純, 和田郁夫

第62回日本細胞生物学会大会 (The 62nd  
Annual Meeting of the Japan Society for  
Cell Biology) (2010年5月19日~21日、  
大阪)

27. 細胞内ホスホリパーゼ A1 による 2-アシ  
ル型リゾホスファチジルイノシトールの産  
生

古賀裕基, 山下 純, 熊澤司紗, 鈴木尚孝,  
岡 沙織, 杉浦隆之

日本薬学会第130年会 (2010年3月28~30  
日、岡山)

28. アシルグリセロリン酸アシルトランス  
フェラーゼ酵素群の膜トポロジーおよび基  
質、生成物のトポロジーの関係

山下 純, 鈴木尚孝, 鈴木啓, 古賀裕基, 岡  
沙織, 杉浦隆之

日本薬学会第130年会 (2010年3月28~30  
日、岡山)

29. Gタンパク質共役型受容体 GPR35 の内  
在性リガンド

岡 沙織, 太田 遼, 島 充, 山下 純, 杉浦  
隆之

日本薬学会第130年会 (2010年3月28~30  
日、岡山)

30. Gタンパク質共役型受容体 GPR55 とカ  
ンナビノイド受容体リガンド

島 充, 岡 沙織, 木村真二, 山下 純, 杉浦  
隆之

日本薬学会第130年会 (2010年3月28~30  
日、岡山)

31. アシルグリセロリン酸アシルトランス  
フェラーゼ 2 (AGPAT2) の膜トポロジーお  
よび基質のアクセスの検討—AGPAT1 との  
比較

山下 純, 鈴木尚孝, 鈴木 啓, 古賀裕基,  
熊澤司紗, 杉浦隆之

第82回日本生化学会大会 (2009年10月21  
~24日、神戸)

32. アシルグリセロリン酸アシルトランス  
フェラーゼ 1 (AGPAT1) 膜貫通領域の活性  
および局在における意義

鈴木尚孝, 山下 純, 鈴木 啓, 古賀裕基,  
熊澤司紗, 杉浦隆之

第82回日本生化学会大会 (2009年10月21  
~24日、神戸)

33. DDHD domain containing 1 による 2-  
アシル型リゾホスファチジルイノシトール  
の産生

古賀裕基, 熊澤司紗, 山下 純, 鈴木尚孝,  
岡 沙織, 杉浦隆之

第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 21 ~24 日、神戸)

3 4.新規リゾリン脂質受容体の探索

岡 沙織、太田 遼、島 充、木村真二、山下 純、杉浦隆之

第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 21 ~24 日、神戸)

3 5.GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトールの細胞骨格系に及ぼす影響

太田 遼、岡 沙織、木村真二、山下 純、杉浦隆之

第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 21 ~24 日、神戸)

3 6.GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトールによる p38 MAP キナーゼの活性化

木村真二、岡 沙織、土志田敏伸、太田 遼、山下 純、杉浦隆之

第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 21 ~24 日、神戸)

3 7.アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ 2 (AGPAT2) の膜トポロジーおよび基質のアクセスの検討—AGPAT1 との比較

鈴木尚孝、山下 純、鈴木 啓、古賀裕基、熊澤司紗、杉浦隆之

第 53 回日本薬学会関東支部大会(2009 年 10 月 3 日 (土) 城西大学)

3 8.GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトールの細胞骨格系に及ぼす影響

太田 遼、岡 沙織、木村真二、山下 純、杉浦隆之

第 53 回日本薬学会関東支部大会(2009 年 10 月 3 日 (土) 城西大学)

3 9.GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトールによる p38 MAP キナーゼの活性化

木村真二、岡 沙織、土志田敏伸、太田 遼、山下 純、杉浦隆之

第 53 回日本薬学会関東支部大会(2009 年 10 月 3 日 (土) 城西大学)

4 0.アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ 2 (AGPAT2) の膜トポロジーおよび基質のアクセスの検討—AGPAT1 との比較

山下 純、鈴木尚孝、鈴木 啓、古賀裕基、熊澤司紗、杉浦隆之

第 14 回アディポサイエンス研究会シンポジ

ウム (2009 年 8 月 22 日(土)、大阪)

4 1.アシルグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼ 2 (AGPAT2) の膜トポロジーおよび基質のアクセスの検討—AGPAT1 との比較

山下 純、鈴木尚孝、鈴木啓、古賀裕基、杉浦隆之

脂質生化学研究 Vol. 51, pp47-50, 2009

第 51 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 21 年 7 月 30 日、31 日、名古屋)

4 2.acyl-phosphate をアシルドナーとする新規 glycerol-3-phosphate acyltransferase である枯草菌 PlsY の機能解析

原 義令、山下 純、松岡聡、原弘志、松本幸次

脂質生化学研究 Vol. 51, pp61-64, 2009

第 51 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 21 年 7 月 30 日、31 日、名古屋)

4 3.GPR55 発現細胞のリゾホスファチジルイノシトール (LPI) による Rho を介した活性化

岡 沙織、木村真二、太田遼、山下 純、杉浦隆之

脂質生化学研究 Vol. 51, pp215-218, 2009

第 51 回日本脂質生化学会・研究集会 (平成 21 年 7 月 30 日、31 日、名古屋)

4 4.Lysophosphatidylinositol induces rapid cytoskeletal rearrangements and morphological changes in HEK293 cells expressing GPR55: Further evidence that Lysophosphatidylinositol is the natural ligand for GPR55.

Takayuki Sugiura, Atsushi Yamashita, and Saori Oka,

19th Annual symposium of the International Cannainoid Reaserch Society (ICRS), St. Charles, Illinois USA (July 7 – 11, 2009)

4 5.Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in HEK293 cells expressing GPR55.

Saori Oka, Shinji Kimura, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura

19th Annual symposium of the International Cannainoid Reaserch Society (ICRS), St. Charles, Illinois USA (July 7 – 11, 2009)

4 6.細胞質ホスホリパーゼ A2 $\gamma$ によるリゾホスホリパーゼ/トランスアシルレーション反応

山下 純、田中 健、古賀裕基、熊澤司紗、鈴木尚孝、鎌田 怜、杉浦隆之  
第10回ファーマコヘマトロジーシンポジウム (東京、2009年6月19日、20日)

47.G タンパク質共役型受容体 GPR55 発現細胞のリゾホスファチジルイノシトール (LPI) による Rho を介した活性化  
岡 沙織、木村真二、太田遼、山下 純、杉浦隆之  
第10回ファーマコヘマトロジーシンポジウム (東京、2009年6月19日、20日)

48.Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity/accessibility in AGPAT1 and AGPAT2.  
Atsushi Yamashita, Naotaka Suzuki, Hiroshi Suzuki, and Takayuki Sugiura,  
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, PLM2009 (May 25-28, 2009, Tokyo)

49.Lysophosphatidylinositol: An endogenous ligand for GPR55, a putative novel cannabinoid receptor.  
Takayuki Sugiura, Atsushi Yamashita, and Saori Oka  
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, PLM2009 (May 25-28, 2009, Tokyo)

50.Biosynthesis of lysophosphatidyl inositol by DDHD domain containing 1.  
Naotaka Suzuki, Atsushi Yamashita, Tsukasa Kumazawa, Saori Oka, and Takayuki Sugiura  
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, PLM2009 (May 25-28, 2009, Tokyo)

51.Effects of 2-arachidonoyl lysophosphatidylinositol on HEK293 cells expressing GPR55.  
Saori Oka, Shinji Kimura, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura  
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, PLM2009 (May 25-28, 2009, Tokyo)

52.Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 MAP kinase in HEK293 cells expressing GPR55.  
Shinji Kimura, Saori Oka, Toshinobu Toshida, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura  
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators,

PLM2009 (May 25-28, 2009, Tokyo)

53.GPR55 and its endogenous ligand lysophosphatidylinositol in the brain.  
Ryo Ota, Saori Oka, Kanako Maruyama, Atsushi Yamashita, and Takayuki Sugiura  
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, PLM2009 (May 25-28, 2009, Tokyo)

〔図書〕 (計1件)

1. ビタミン総合事典 (日本ビタミン学会編、朝倉書店、2010年11月25日) 分担執筆  
山下 純、「6. 活性リン脂質、6.2. イノシトール含有リン脂質とその代謝物」の項を執筆する。

〔その他〕

ホームページ等

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

<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)研究分担者

該当無し

### (3)連携研究者

杉浦隆之 (SUGIURA TAKAYUKI)  
帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号：40130009

岡 沙織 (OKA SAORI)  
帝京大学・薬学部・講師  
研究者番号：80439562