

様式 C-19

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 12 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：21590076

研究課題名（和文）新しい生理活性脂質リゾホスファチジルイノシトールとその受容体の生理的役割の解明

研究課題名（英文）Physiological roles of a novel bioactive lipid lysophosphatidylinositol

研究代表者

杉浦 隆之 (SUGIURA TAKAYUKI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：40130009

研究成果の概要（和文）：

GPR55 は、マリファナの成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) に対する新しい受容体である可能性が指摘されている受容体である。その内在性リガンドは不明であったが、研究代表者はその内在性リガンドがリゾホスファチジルイノシトール (LPI) であることを明らかにした。今回の研究で、LPI が GPR55 を介してストレスファイバー形成の制御等において重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、GPR55 と約 30% のホモロジーを有する GPR35 のリガンドを探索した結果、2-アシル型のリゾホスファチジン酸 (LPA) が GPR35 の内在性リガンドとして機能している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

GPR55 is a novel cannabinoid receptor. We found that its endogenous ligand is lysophosphatidylinositol (LPI). In this study, we obtained evidence that LPI plays some essential roles in the regulation of stress fiber formation. We next searched for the endogenous ligand for GPR35 which has 30% homology with GPR55. We found that 2-acyl lysophosphatidic acid (LPA) may act as an endogenous ligand for GPR35.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	108,000	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：脂質生化学、カンナビノイド、G タンパク質共役型受容体、リゾリン脂質

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質の中には、リガンドが見つかっていないオーファン受容体がまだ多数存在している。GPR55 は 319 個のアミノ酸からなるクラス A (ロドプシン様) G タンパク質共役型受容体 (GPCR) サブファミリーに属するオーファン受容体であるが、その生理機

能や内在性リガンドは長い間不明であった。2000 年代前半に、GPR55 はマリファナの受容体として知られるカンナビノイド受容体の 1 つであるという報告が、2 つの製薬会社から特許の形でなされた。

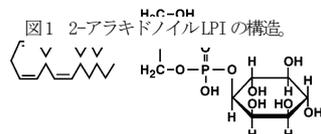
カンナビノイド受容体は、マリファナの主要活性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) を中心とする、カンナビノ

イドと呼ばれる一連の化合物に対する受容体で、これまでに、神経系に多量に発現している CB1 受容体と、主に免疫系に発現している CB2 受容体の二つが報告されている。CB1、CB2 受容体ともに、7 回膜貫通型の G タンパク質共役型の受容体で、その内在性リガンドは、モノアシルグリセロールの一種である 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) である。2-AG は、刺激に応じて速やかに細胞で産生され、細胞間メッセンジャーとして機能する。また、その構造もリゾリン脂質に似た構造 (分子内に疎水基が 1 つと親水部分が 1 つ) であることから、リゾホスファチジン酸 (LPA) やスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) と並ぶ、リゾ脂質性メディエーターの 1 つであると考えられている。

ところで、ノックアウトマウスの解析やアンタゴニストを用いた実験などから、カンナビノイドに反応する、CB1 及び CB2 受容体とは異なる新規の受容体が存在する可能性が以前から指摘されていた。GPR55 が、新しいタイプのカンナビノイド受容体であるとするれば、その内在性リガンドは、2-AG 又はその類縁化合物である可能性が高い。そこで研究代表者は、ヒト GPR55 コンストラクトを作製し、HEK293 細胞を用いてリガンドの探索を行った。その結果、2-AG は GPR55 に全く反応しないことが分かった。しかし、2-AG と同様にリゾ脂質系の物質であるリゾホスファチジルイノシトール (LPI) が、GPR55 を発現している細胞に作用して p42/44 MAP キナーゼの活性化及び細胞内カルシウムの上昇を引き起こすことを見出した。LPI に対する特異的な受容体が存在することを示したのは今回の研究が初めてである。

このほか、研究代表者はこれまでに、ラット脳に約 40 nmol/g tissue の LPI が含まれていること、種々の LPI 分子種のうち、グリセロール骨格の 1 位にステアリン酸が結合した LPI と 2 位にアラキドン酸が結合した LPI が大部分を占めていること、グリセロール骨格の 2 位にアラキドン酸をもつ LPI に極めて強い活性があることを明らかにしている。これらの結果は、GPR55 の真の内在性リガンドが、グリセロール骨格の 2 位にアラキドン酸を持つ LPI、つまり、2-アラキドノイル LPI (図 1) であるということを示唆するものである。

LPI の生理作用に関しては、これまでにいくつかのグループによって、細胞増殖活性やインスリンの放出促進、神経細胞におけるカルシウム応答などが報告されているが、作用点が明らかではなく、LPI の生物活性に関する情報はまだごく限られたものである。LPI



と GPR55 は、様々な系において重要な役割を担っている分子であると考えられるが、具体的にどのような生理的あるいは病態生理的な役割があるのか、LPI の作用の分子メカニズム、GPR55 が発現している細胞にはどのようなものがあるのかといった点など、詳しいことは全く分かっていない。また、LPI はどういった細胞が産生するのか、産生の引き金は何であるのか、更に LPI の産生機構やその調節機構、関与する酵素についても分かっていなかった。

2. 研究の目的

カンナビノイドには多彩な生理作用があるが、そのうち幾つかは GPR55 を介している可能性が高い。GPR55 とその内在性リガンドである LPI の生理的役割の解明は、疾患メカニズムの解明や制御につながる可能性がある。今回の研究は、新規カンナビノイド受容体 GPR55 と、その内在性リガンドである、リゾホスファチジルイノシトール (LPI) の生理的・病態生理的意義を明らかにすることを目的として行った。

また、GPR55 以外のカンナビノイドに反応する受容体の探索も行ったところ、GPR55 と約 30% のホモロジーを有する GPR35 が、マリファナの主要活性成分である Δ^9 -THC に反応することを見出した。興味深いことに、GPR35 遺伝子と GPR55 遺伝子は同一染色体上の比較的近い場所に位置している。これらの事実は、GPR35 の内在性リガンドと GPR55 の内在性リガンドとの間に、何らかの構造上の関連がある可能性を示唆するものである。今回の研究では、この点に注目し、脂質関連化合物の中から GPR35 の内在性リガンドの候補を探索した。

3. 研究の方法

(1) GPR55 を介した LPI の生理作用

- ① HEK293 細胞にプラスミドベクターを用いて遺伝子導入し、N 末端に FLAG タグをつけたヒト GPR55 を発現させ、GPR55 を安定的に発現した細胞を得た。
- ② RhoA に及ぼす影響は、細胞を LPI で刺激した後、アガロースビーズに結合させた GST-Rhotekin-RBD を用いて Pull-down アッセイを行い、RhoA の活性化を検出した。
- ③ 細胞骨格系に及ぼす影響を調べる実験では、GPR55 を発現させた HEK293 細胞にリガンドを加えて、細胞の形態に及ぼす影響を調べた。また、アクチンフィラメントを染色して、ストレスファイバーの形成に及ぼす影響を調べた。
- ④ p38 MAP キナーゼのリン酸化の検出は、細胞を LPI で刺激した後ライセートを調製し、ウェスタンブロット法により検出した。

⑤ ヒト各種臓器における GPR55 mRNA の発現は、市販のヒト各種臓器由来のトータル RNA から cDNA を合成し、これを鋳型として、リアルタイム PCR 法により調べた。検出方法としては SYBR Green I を用いたインターカレーター法を用い、解析方法としては相対定量法を用いた。

(2) GPR35 の内在性リガンドの探索

- ① N 末端に FLAG タグを付加したヒト GPR35 をプラスミドベクターに組み込み、HEK293 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を得た。
- ② 細胞内カルシウムイオン濃度への影響を調べる実験では、GPR35 を発現させた HEK293 細胞に、様々なリガンド候補物質を加え、CAF-100 アナライザーを用いて細胞内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響を調べた。
- ③ RhoA に及ぼす影響は、細胞をリガンドで刺激した後、アガロースビーズに結合させた GST-Rhotekin-RBD を用いて Pull-down アッセイを行い、RhoA の活性化を検出した。
- ④ GPR35 の細胞内へのインターナリゼーションを調べる実験では、細胞にリガンドを加えてインキュベートした後、細胞を固定し、抗 FLAG 抗体で染色して、GPR35 の細胞膜から細胞内への移行を共焦点蛍光顕微鏡を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) GPR55 を介した LPI の生理作用

RhoA に及ぼす影響を調べたところ、2-アラキドノイル LPI は、GPR55 を発現させた HEK293 細胞の RhoA を強く活性化することが分かった。一方、ベクターのみを導入した細胞では 2-アラキドノイル LPI は RhoA の活性化を引き起こさなかった。2-アラキドノイル LPI による RhoA の活性化は、刺激後 1 分から観察され、5 分でピークに達していた。

次に、RhoA を介して引き起こされる作用について調べた。RhoA は主に細胞内アクチン骨格系の制御を行い、細胞の形態変化、運動、細胞分裂に関与していることが知られている。実際に、GPR55 を発現した HEK293 細胞は、ベクターのみを導入した細胞とは異なった形態を示していた。そこで、GPR55 を発現した HEK293 細胞に、GPR55 の内在性リガンドである 2-アラキドノイル LPI を添加したところ、細胞が rounding を起こすということが分かった。一方、ベクターのみを導入した細胞においては、2-アラキドノイル LPI は rounding を全く引き起こさなかった。2-アラキドノイル LPI による rounding は添加後 1 分から観

察され、およそ 5 分でピークに達した後、1 時間ほどで元の形態に戻った。また、その活性は 1 nM から検出され、EC₅₀ は約 10 nM であった(図 2)。2-アラキドノイル LPI の分解産物である 2-アラキドノイルグリセロールや遊離のアラキドン酸には活性は全くなかった(図 3)。

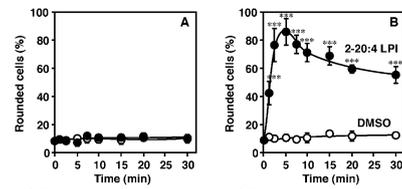


図2 ベクター又はGPR55を発現させたHEK293細胞の形態に及ぼす2-アラキドノイルLPIの影響。A、B、時間依存性。C、D、用量依存性。A、C、ベクターを発現させたHEK293細胞。B、D、GPR55を発現させたHEK293細胞。

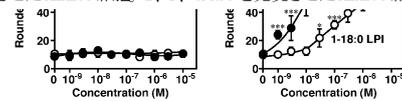
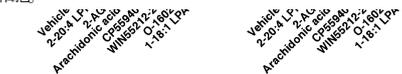
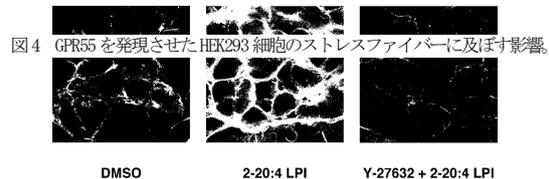


図3 ベクター又はGPR55を発現させたHEK293細胞の形態に及ぼす各種リガンドの影響。A、ベクターを発現させたHEK293細胞。B、GPR55を発現させたHEK293細胞。



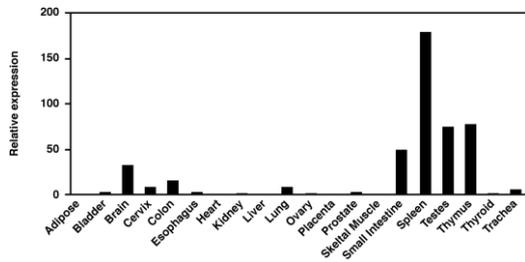
次に、各種阻害剤を用いた実験を行ったところ、C3 トキシン (RhoA 阻害剤) や Y-27632 (ROCK 阻害剤) が、2-アラキドノイル LPI による細胞の rounding を強く抑制することが分かった。更に、2-アラキドノイル LPI は、GPR55 を介してストレスファイバーの形成を引き起こすということも明らかとなった(図 4)。2-アラキドノイル LPI とその受容体である GPR55 は、細胞の形態や運動性の制御に深く関与している可能性がある。



一方、LPI は GPR55 を発現させた HEK293 細胞において、p38 MAP キナーゼのリン酸化を引き起こすことも明らかとなった。LPI による p38 MAP キナーゼのリン酸化は添加後 10 分でプラトーに達していた。また、EC₅₀ は約 300 nM であった。一方、ベクターのみを導入した細胞

においては、LPI は p38 MAP キナーゼのリン酸化を引き起こさなかったことから、LPI の作用は GPR55 を介していることが分かった。また、RhoA の阻害剤である C3 トキシンや、ROCK 阻害剤である Y-27632 で細胞を処理することにより、LPI によるリン酸化が強く抑制を受けたことから、LPI による p38 MAP キナーゼのリン酸化には Rho/ROCK 経路が関与していることが示唆された。また、LPI は、p38 MAP キナーゼの下流にある転写因子 ATF-2 の活性化を引き起こすことも分かった。LPI による ATF-2 の活性化も Y-27632 で抑制されたことから、p38 MAP キナーゼの場合と同様に、Rho/ROCK 経路を介していることが分かった。

次に、ヒト各種臓器における GPR55 mRNA の発現について調べた。その結果、脾臓、胸腺、精巣、小腸、脳などで高い発現が観察された。一方、肝臓、腎臓、心臓、骨格筋などでは発現はほとんど見られなかった (図 5)。

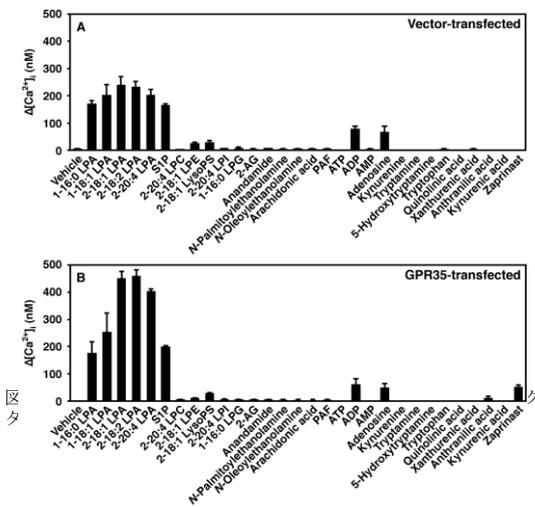


以上の結果から、LPI はこれらの組織で、G_{12/13} 及び RhoA を介して、細胞骨格系の制御やストレス応答等において何らかの役割を担っていると考えられた。

(2) GPR35 の内在性リガンドの探索

ベクターのみを導入した細胞または GPR35 を発現させた細胞に各種リガンド (1 μM) を添加したときの細胞内カルシウムイオン濃度の変化を調べた。まず、LPI の影響を調べたが、GPR35 を発現させた HEK293 細胞に LPI を加えても、細胞内カルシウムイオン濃度の変化は観察されなかった (図 6B)。次に、LPI 以外の各種リゾリン脂質の影響を調べた。各種 1-アシル型リゾホスファチジン酸 (1-アシル LPA) を加えた場合には、ベクターのみをトランスフェクトした細胞においても、GPR35 を発現させた細胞においても、ほぼ同程度の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察された (図 6)。これは、HEK293 細胞に元々発現している LPA 受容体 (LPA₁ 及び LPA₂) を介して起きたものと考えられる。これに対し、GPR35 を発現させた HEK293 細胞に各種の 2-アシル型リゾホスファチジン酸 (2-アシル LPA) を加えた場合には、ベクターのみをトランスフェクトした細胞の場合に比べて、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が著しく増大していた (図 6B)。一方、2-アシ

ル型リゾホスファチジルコリンや 2-アシル型リゾホスファチジルエタノールアミン、2-アシル型リゾホスファチジルセリンなど、その他の 2-アシル型のリゾリン脂質には、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性は認められなかった (図 6B)。スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) や ADP、アデノシンも GPR35 を発現した細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こしたが、ベクターのみを発現した細胞でも同程度の反応が観察されたことから、その作用は GPR35 を介したのではなく、HEK293 細胞に元々発現している S1P 受容体やプリン受容体を介したものであると考えられた (図 6)。これらの結果は、GPR35 発現細胞に対する 2-アシル LPA の作用が、特異的なものであることを強く示唆するものである。



処理しても、アデノシンに対する反応は影響を受けなかった。

次に、RhoA に及ぼす影響を調べた。その結果、GPR35 を発現させた細胞に zaprinast (1 μM)

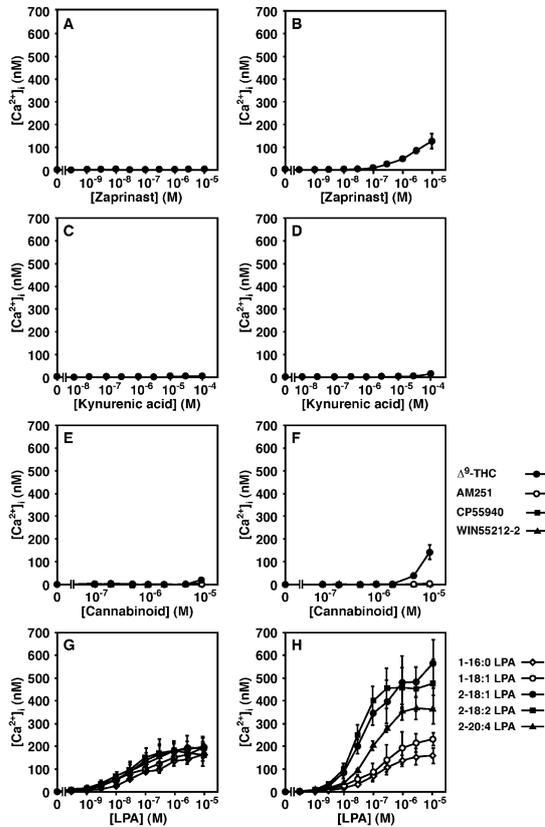


図7 細胞内カルシウムイオン濃度に対する各種LPAの影響。A, C, E, G, ベクターのみを導入した細胞。B, D, F, H, GPR35を発現させた細胞。n=4。

を加えると、RhoA の持続的な活性化が起こることが分かった (図8)。一方、1 μM の2-オレオイルLPAを加えた場合には、ベクターのみを導入した細胞では、速やかな一過的な活性化が見られたが、これは、HEK293細胞に元々発現しているLPA受容体を介して起きたものと考えられた。これに対し、GPR35を発現させた細胞では、速やかな活性化のあとに、zaprinastの場合にも観察された持続的なRhoAの活性化が起きていることが分かった (図8)。

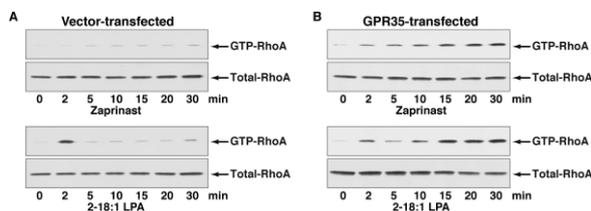
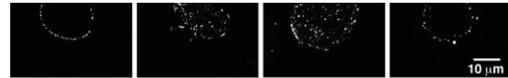


図8 Zaprinast及び2-オレオイルLPAのRhoAに及ぼす影響。A、ベクターのみを導入した細胞。B、GPR35を発現させた細胞。

細胞膜上の受容体にリガンドが結合すると、受容体分子の細胞内へのインターナリゼーションが起こることが知られている。そこで次に、GPR35の細胞内分布に及ぼす2-オレオイルLPAとzaprinastの影響を調べた。

GPR35を発現させたHEK293細胞に2-オレオイルLPAを加えてインキュベートしたところ、GPR35が細胞膜から細胞内に移行することが観察された。同様の結果はzaprinastを加えた場合にも観察されたが、GPR35の内在性リガンドとして既に報告されているキヌレン酸の場合には認められなかった (図9)。

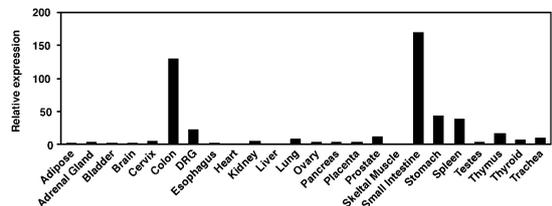
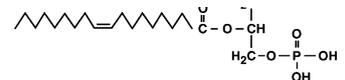
図9 受容体のインターナリゼーションに及ぼす、Zaprinast、2-オレオイルLPA及びキヌレン酸の影響。



この結果は、2-オレオイルLPAとzaprinastが、細胞膜上のGPR35にリガンドとして作用しているということを明確に示すものである。

本研究により、GPR35の内在性リガンドが、2-アシルLPA (図10) であるということがほぼ明らかとなった。GPR35の生理的役割はまだよく分かっていないが、欠損すると精神遅滞や骨異形成を引き起こす可能性が指摘されている。このほか、GPR35は胃がんや2型糖尿病、痛覚の調節、ある種の心疾患に関与しているのではないかと報告もある。2-アシルLPAはGPR35リガンドとして、細胞の正常な分化・増殖等に、あるいは様々な疾病の成立に深く関与している可能性が高い。

図10 2-オレオイルLPAの構造



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 *生化学* **83**, 525-535. (2011) 査読有

② Oka, S., Yamashita, A., Sugiua, T. *et al.* (他 3 人, 6 番目), Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293cells expressing GPR55 and IM-9

- lymphoblastoid cells. *J. Biochem.* **147**, 671-678. (2010) 査読有
- ③ Oka, S., Yamashita, A., Sugiura, T. et al. (他 2 人, 5 番目), GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 232-237. (2010) 査読有
- ④ Yamashita, A., Oka, S., Sugiura, T. et al. (他 3 人, 6 番目), Generation of lysophosphatidylinositol by DDHD domain containing 1(DDHD1): Possible involvement of phospholipase D/phosphatidic acid in the activation of DDHD1. *Biochem. Biophys. Acta* **1801**, 711-720. (2010) 査読有
- ⑤ Yamashita, A., Waku, K., Sugiura, T. et al. (他 5 人, 8 番目), Subcellular localization and lysophospholipase/transacylation activities of human group IVC phospholipase A2 (cPLA2 γ). *Biochem. Biophys. Acta* **1791**, 1011-1022. (2009) 査読有
- ⑥ Sugiura T. Physiological roles of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Biofactors.* **35**, 88-97. (2009) 総説 査読有
- ⑦ 杉浦隆之 内性カンナビノイド受容体リガンドとメタボリックシンドローム *The Lipid* **20**, 21-27. (2009) 総説
- ⑧ 杉浦隆之 生理活性脂質 油脂・脂質の基礎と応用-栄養・健康から工業まで (日本油学会編) (2009) 日本油化学協会
- ⑨ Kittaka, A., Sugiura, T., Chen, TC. et al. (他 13 人, 15 番目), Synthesis and biological activities of 14-*epi*-MART-10 and 14-*epi*-MART-11: implications for cancer and osteoporosis treatment. *Anticancer Res.* **29** 3563-3569. (2009) 査読有
- ⑩ Honzawa, H., Sugiura, T., Kittaka, A. (他 5 人, 4 番目), Synthesis of a 1 α -*C*-methyl analogue of 25-hydroxyvitamin D₃: interaction with a mutant vitamin D receptor Arg274Leu. *Tetrahedron* **65** 7135-7145. (2009) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 杉浦隆之 他、Lisophosphatidyl-inositol and related mediators. 2011 FASEB Summer Research Conference, 2011 年 8 月、招待講演、イタリア
- ② 杉浦隆之 他、GPR55 and GPR35, putative Δ^9 -tetrahydrocannabinol receptors, and their endogenous ligand. 第 26 回国際カンナビノイド学会 (ICRS2010)、2010 年 7 月 25 日、Scandic star (Sweden)
- ③ 杉浦隆之、Lysophosphatidylinositol: an endogenous ligand for GPR55, a putative novel cannabinoid receptor. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009)、2009 年 5 月 27 日、学術総合センター
- ④ 杉浦隆之、Lysophosphatidylinositol induces rapid cytoskeletal rearrangements and morphological changes in HEK293 cells expressing GPR55. 国際カンナビノイド会議 (ICRS)、2009 年 7 月 8 日、ST. CHARLES, (ILLINOIS, USA)

[その他]

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 隆之 (SUGIURA TAKAYUKI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：40130009

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：