

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：23790101

研究課題名(和文)新規生理活性リゾリン脂質受容体GPR55及びGPR35の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of GPR55 and GPR35, novel lysophospholipid receptors

研究代表者

岡 沙織 (Oka, Saori)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：80439562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：GPR55は、新規カンナビノイド受容体(マリファナ受容体)として報告された受容体で、その内在性リガンドは、リゾホスファチジルイノシトール(LPI)である。今回の研究で確立したLC-MS/MSの測定系を用いて様々な系におけるLPIの産生を調べたところ、マウス脾細胞をマイトジェン刺激した際や血漿を加温した時、アレルギー性炎症において、2-アラキドノイルLPIが選択的に産生されることが分かった。GPR55は免疫系に多く発現していること、種々のLPI分子種のうち、2-アラキドノイルLPIが最も強い活性を示すことから、2-アラキドノイルLPIは炎症・免疫応答に深く関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：GPR55 is a putative novel cannabinoid receptor and its endogenous ligand is lysophosphatidylinositol (LPI). This study demonstrated that the level of 2-arachidonoyl LPI was predominantly elevated in mouse splenocytes stimulated with mitogen, mouse plasma, and the site of allergic inflammation using LC-MS/MS analysis. Because GPR55 is expressed mainly in the immune system and the biological activity of 2-arachidonoyl LPI is higher than those of other molecular species, 2-arachidonoyl LPI may play important roles in inflammation and immunity.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リゾリン脂質 GPR55 アラキドン酸 カンナビノイド リゾホスファチジルイノシトール

1. 研究開始当初の背景

GPR55 は、ヒトでは 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。長い間その生理機能や内在性リガンドは不明であったが、数年前に、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一つであるという報告が、二つの製薬会社 (アストラゼネカ及びグラクソスミスクライン) 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、その内在性リガンドは、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様であることから、リゾホスファチジン酸 (LPA) やスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) と同様に、リゾリン脂質性メディエーターの一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 受容体とは異なる受容体が存在することが以前から示唆されていた。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、予想に反して、2-AG は GPR55 に全く反応しなかった。しかし、2-AG と同様にリゾリン脂質性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 ERK の活性化及び細胞内カルシウム応答を引き起こすことを見出した (Oka *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007))。

LPI による細胞応答は、細胞を LPI で前処理することにより脱感作されること、一方、他のリゾリン脂質で前処理した場合には影響を受けないこと、GPR55 に対する siRNA により活性が消失すること、また、LPI の分解産物には活性が全くないことから、LPI 自身が、GPR55 を介して引き起こしているものと考えられた。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、この研究が初めてである。前述した以外にも、研究代表者は、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持つ LPI、2-アラキドノイル LPI に極めて強い活性があることも明らかにしている。 (Oka *et al.*, *J. Biochem.* 145 (2009))。

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 はどのような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。ところで、LPI は代謝回転の早い不安定な化合物である。そのため、刺激に応じて速やかに産生され、代謝されると考えられるが、具体的なことは分かっていない。様々な系における LPI の産生及び分解を調べるために、微量分析の実験系が必要である。そこで今回の研究では、LC-MS/MS を用いた LPI の定量系の確立を試みた。また、様々な系で LPI が産生されるかどうかを調べた。

3. 研究の方法

(1) LPI の LC-MS/MS による分析系の確立

- ① LPI の分析は、Accela HPLC (Thermo) 及び TSQ Quantum Ultra (Thermo) を用いて次の通り行った。カラム: CAPCELL PAK C18 MGII (Shiseido) (ϕ 3 μ m, 2 mm x 150 mm)、移動相: 5 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.0) とアセトニトリルのグラジエント、流速: 200 μ l/min、イオン化モード: ESI ネガティブイオンモード (SRM)、Tube lens: -165 V、Collision Energy: 34 V
- ② 検量線およびイオン化効率は、種々の量の LPI に対し、一定量の 17:1 LPI (1 pmol) を加え、LC-MS/MS で測定した。ピーク面積を算出してプロットした。

(2) 生体内における LPI の産生

- ① マウス脾細胞における LPI の産生量は、マウス脾細胞 (1×10^7 cells) をコンカナバリン A (ConA) (5 μ g/ml) で刺激し、Bligh

& Dyer 抽出液中で LPI を抽出した。クロロホルムと水を加えて二層にしたのち、上層を Sep Pak カートリッジで精製・濃縮した後 LC-MS/MS で測定した。

- ② 血漿中の LPI 量は、ポストヘパリン採血により調整したマウス血漿を 37°C で一定時間インキュベートした後、メタノールを加えソニケーションした後、LC-MS/MS で測定した。
- ③ マウスオキサゾロン誘発アレルギー性炎症モデルを作製し、炎症を起こした耳介をメタノール中でホモジナイズして脂質を抽出し、LC-MS/MS で測定した。

4. 研究成果

(1) LPI の LC-MS/MS による分析系の確立

LPI は、ネガティブイオンモードで検出できた。それぞれの分子種の親イオン及びプロダクトイオンの m/z は図 1 の通りである。種々の量の LPI に対し、一定量の 17:1 LPI (1 pmol) を加え、LC-MS/MS で測定した。ピーク面積を算出してプロットしたところ、30 pmol まで良好な直線性を有する検量線が得られた。また、検出限界は 30 fmol であった (図 2)。また、17:1 LPI のイオン化効率を 1 としたときの各 LPI 分子種のイオン化効率を求めたところ、高度不飽和脂肪酸を持つ LPI はイオン化効率が悪いことが分かった (図 3)。また、逆相カラム上で 1-アシル体と 2-アシル体が分離することも分かった (図 4)。

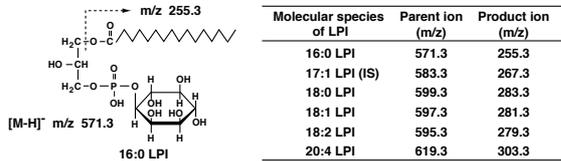


図 1 MS/MS で検出するリポホスファチジルイノシトール (LPI) の親イオンおよびプロダクトイオン

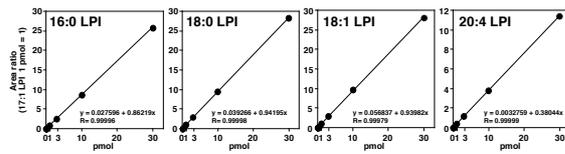


図 2 種々の LPI についての検量線

Molecular species of LPI	Ionization efficiency	Fatty acyl moiety
16:0 LPI	0.947	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
17:1 LPI (IS)	1.000	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC</chem>
18:0 LPI	1.081	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
18:1 LPI	0.977	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCCC</chem>
18:2 LPI	0.537	<chem>CCCCCCCC=CCCCC=CCCC</chem>
20:4 LPI	0.401	<chem>CCCC=CCCC=CCCC=CCCC</chem>

図 3 種々の LPI についてのイオン化効率

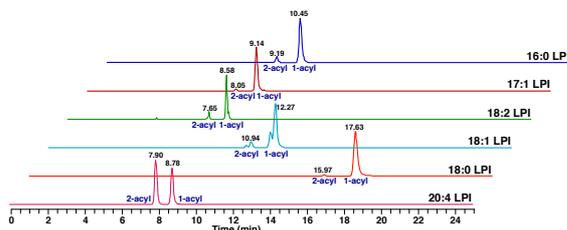


図 4 クロマトグラムの例

(2) 生体内における LPI の産生

マウス脾細胞 (1×10^7 cells) を ConA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激し、一定時間後に Bligh & Dyer 抽出液でホモジナイズした。一定量の 17:1 LPI (1 pmol) を加え、LC-MS/MS で測定したところ、2-20:4 LPI の一過的な増加が見られた。1-20:4 LPI もやや増加していたが、これはアッセイ中または分析中に 1 位に転位したものと考えられる。一方、1-18:0 LPI には大きな変化は見られなかったことから、ConA 刺激によってホスホリパーゼ A₁ が活性化していることが考えられた (図 5)。

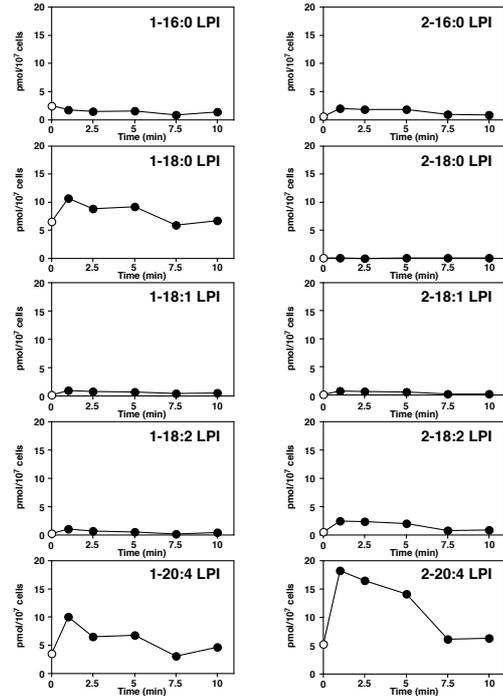


図 5 マウス脾細胞における LPI の産生

次に、マウス血漿における LPI の産生を調べた。抗凝固剤としてヘパリンを加えた血漿を 37°C で一定時間インキュベートしたところ、2-アラキドノイル LPI の量が著しく増加することが分かった。一方、他の分子種の LPI の量に大きな変化はなかった。このことから、血漿中の PI に作用するホスホリパーゼ A₁ が関与していることが示唆された (図 6)。また、循環血中では、アラキドノイル LPI が常に産生・分解が起こっていることが考えられた。

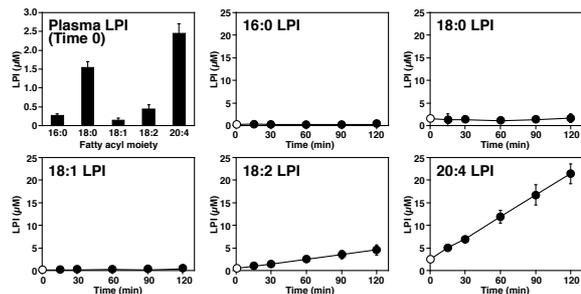


図 6 マウス血漿における LPI の産生

次に、アレルギー炎症におけるLPIの役割を明らかにするために、オキサゾロン誘発マウス耳接触性皮膚炎モデルを作製し、アレルギー炎症部位でLPIが産生されるかどうかを調べた。その結果、アレルギー炎症を起こしたことにより、アラキドン酸含有のLPI量が大きく増加することが分かった。リノール酸含有LPI量も増加していたが、他の分子種では大きな変化は見られなかった(図7)。

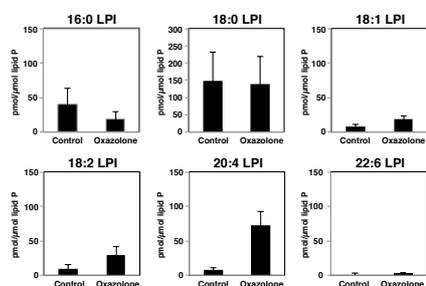


図7 オキサゾロン誘発マウスアレルギー炎症におけるLPIの産生

今回の研究で確立したLC-MS/MSの測定系を用いて様々な系におけるLPIの産生を調べたところ、マウス脾細胞をマイトジェン刺激した際や血漿を加温した時、アレルギー炎症において、2-アラキドノイルLPIが選択的に産生されることが分かった。GPR55は免疫系に多く発現していること、種々のLPI分子種のうち、2-アラキドノイルLPIが最も強い活性を示すことから、2-アラキドノイルLPIは炎症・免疫応答に深く関与している可能性がある。

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 3 件)

- ① Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases. Atsushi Yamashita, Yasuhiro Hayashi, Naoki Matsumoto, Yoko Nemoto-Sasaki, Saori Oka, Takashi Tanikawa, and Takayuki Sugiura, *Biology (Basel)*. 2014 **3(4)**: 801-830. DOI: 10.3390/biology3040801 査読有
- ② Sphingomyelin Synthase 2, but Not Sphingomyelin Synthase 1, Is Involved in HIV-1 Envelope-mediated Membrane Fusion. Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Takashi Tanikawa, Saori Oka, Kiyoto Tsuchiya, Kouta Zama, Susumu Mitsutake, Takayuki Sugiura and Atsushi Yamashita, *J. Biol. Chem.* 2014 **289(44)**:30842-56. DOI: 10.1074/jbc.M114.574285 査読有
- ③ Involvement of the endogenous cannabinoid 2 ligand 2-arachidonyl

glycerol in allergic inflammation. Takayuki Mimura, Saori Oka, Hiroyuki Koshimoto, Yoshifumi Ueda, Yoshihiro Watanabe, Takayuki Sugiura, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012;**159**:149-156. DOI: 10.1159/000336167 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 岡 沙織 他、G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトール (LPI) の LC-MS/MS による定量、第 86 回日本生化学回大会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ② 岡 沙織 他、G タンパク質共役型受容体 GPR55 の内在性リガンド・リゾホスファチジルイノシトール (LPI) の LC-MS/MS による定量、日本薬学会第 133 年会、2012 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：