

特集：リン脂質代謝と脂質メディエーター研究の最新の成果  
第2部 リゾリン脂質を中心とした脂質メディエーター

## 脂質メディエーターとしての酸化遊離脂肪酸 —G2A の役割を中心に—

岸本幸治<sup>1)</sup>, 大日方英<sup>1)</sup>, 岸美紀子<sup>1),2)</sup>, 大嶋紀安<sup>1)</sup>  
立井一明<sup>1)</sup>, 和泉孝志<sup>1)</sup>

プロスタグランジン類やロイコトリエン類などのアラキドン酸代謝物が種々の炎症反応や免疫応答を引き起こすことは良く知られている。我々は、アラキドン酸の酸化物と、アラキドン酸よりも生体内に豊富に存在するリノール酸の酸化物が、Gタンパク質共役受容体であるG2Aを介して様々なシグナルを細胞に伝えることを見いだした。この酸化遊離脂肪酸-G2Aシステムは細胞に起こった危機的環境、すなわちDNA損傷や酸化ストレスを感知するアラームシグナルとして機能しているという仮説を提唱している。例えば、ヒト皮膚角化細胞が日常環境程度の紫外線に暴露されると、G2Aを介してその分裂や増殖が制御される。本稿では、脂質の酸化代謝物、とりわけリノール酸由来の酸化遊離脂肪酸の生成、及びヒトG2Aについて述べる。

### 1. はじめに

脂肪酸は細胞の脂質二重膜を形成するリン脂質の重要な構成要素であると同時に、ミトコンドリアで酸化されて細胞のエネルギー源となる。一方、脂肪酸及びその代謝物は、細胞に様々な情報を伝えるメディエーターとしての役割をもつ。例えば、リン脂質のsn-2位のアラキドン酸残基は、遊離後にシクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼによって酸素分子が添加され、さらにエイコサノイド(プロスタグランジン類やロイコトリエン類)に変換後、それ

らに特異的なGタンパク質共役受容体(GPCR)を介して多彩な生理機能及び炎症反応や免疫応答などのシグナルを細胞に伝える。

一方、脂質は生体物質の中で活性酸素種の最も良い標的である。炎症や免疫、がんなどの酸化ストレス環境下では、その代謝過程において活性酸素種が誘導される。活性酸素種は脂質、タンパク質、核酸などの細胞構成物を修飾してそれらの物性を変化させる。また、活性酸素種そのものやそれによる修飾物が情報を伝えることにより、様々な細胞応答が引き起こされる。脂質の中でも多価不飽和脂肪酸は特に酸化されやすい。

我々は、これまで様々なリポキシゲナーゼ、エイコサノイド受容体及びGPCRの一つであるG2Aの研究を行ってきた。本稿では酸化遊離脂肪酸に焦点をあて、それらがどのように産生されるのか、また、どのように生体機能に関わっているのかを、リノール酸の酸化物とG2Aを中心に述べてみたい。

<sup>1)</sup>群馬大学大学院医学系研究科生化学分野(〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22)

<sup>2)</sup>桐生大学医療保健学部栄養学科

Oxidized free fatty acids as lipid mediators and functions of G2A as their receptor

Koji Kishimoto<sup>1)</sup>, Hideru Obinata<sup>1)</sup>, Mikiko Kishi<sup>1),2)</sup>, Noriyasu Ohshima<sup>1)</sup>, Kazuaki Tatei<sup>1)</sup>, and Takashi Izumi<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup>Department of Biochemistry, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511 Japan. <sup>2)</sup>Department of Nutrition, Faculty of Health Care, Kiryu University)

## 2. 脂肪酸の酸化

### (1) 活性酸素種

ミトコンドリアで消費される酸素の一部(2~5%)はスーパーオキシド(スーパーオキシドアニオンラジカル) ( $O_2^{\cdot-}$ ) になるとされる。さらに、動脈硬化症、虚血再還流障害、及びがんの浸潤や転移などの病態においては、活性酸素種が病態の誘導、進展に関与している。生体内における活性酸素種の標的となる主な脂質は、細胞膜や細胞内膜を構成するリン脂質、コレステロール、血漿リポタンパク質中の血中脂質であるコレステロールエステルである。それら脂質の(過)酸化に関与する活性酸素にはラジカルとしてヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ )、アルコキシラジカル ( $LO\cdot$ )、ヒドロペルオキシラジカル ( $HOO\cdot$ )、スーパーオキシドが、非ラジカル性のものには脂質ヒドロペルオキシド ( $LOOH$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ )、オゾン ( $O_3$ ) 及び過酸化水素水 ( $H_2O_2$ ) などが存在する。

### (2) 酸化の始まり：メチレン水素の引き抜き

生体内の多価不飽和脂肪酸はシス型の二重結合を複数もっており、二つ以上の二重結合の間には極めて反応性に富むメチレン ( $-CH_2-$ ) が挟まれている。このメチレン水素が引き抜かれることにより過酸化が開始されるが、その様式は(1)酵素的過酸化と(2)非酵素的過酸化の二つに大別される。さらに、非酵素的過酸化は(a)フリーラジカル依

存、あるいは(b)フリーラジカル非依存に分類されるため、異なる三つの様式が存在することになる。まず、メチレン水素の引き抜きにより脂質ラジカル ( $L\cdot$ ) が生じ、次いで二重結合の移動と酸素分子の添加が起こり脂質ペルオキシラジカル ( $LOO\cdot$ ) が生じる。脂質ペルオキシラジカルはさらに近傍の脂質メチレン基の水素原子を引き抜き自らは脂質ヒドロペルオキシド ( $LOOH$ ) となる。この機序が繰り返されると、脂肪酸の酸化が連鎖反動的に進むことになる。生じた脂質ペルオキシドは、後に述べる還元反応により脂質ヒドロキシド ( $LOH$ ) となる。図1にリノール酸を例にこの一連の反応を示した。

一部のリポキシゲナーゼ反応を除いて、一般的に酵素的酸化では遊離の脂肪酸が基質となり、リン脂質やコレステロールエステルなどのエステル型脂質は良い基質とはならない。脂質ペルオキシドは細胞膜の構築を乱して、流動性<sup>1)</sup>や透過性<sup>2)</sup>を変化させ、イオンの移動や代謝に影響を与える。また、脂質過酸化によるミトコンドリアの障害は、更なる活性酸素種の生成を惹起し、重篤な細胞機能障害を引き起こす<sup>3)</sup>。脂肪酸酸化物は、遺伝子発現の制御因子、受容体の活性化因子、及び適応反応に対する誘導因子などとして様々な生体機能を調節しており、特定の病態におけるバイオマーカーにもなっている<sup>4)</sup>。最近では、これら酸化物が必ずしも細胞毒性を与えるばかりではなく、アテローム、炎症、アポトーシスなどに対して、細胞保護作用

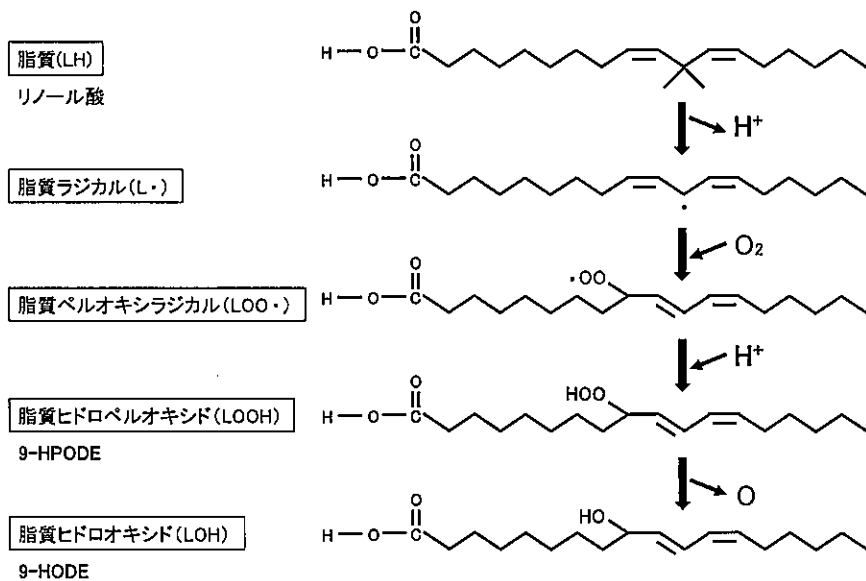


図1 脂質酸化の過程

脂質が酸化される過程をリノール酸を例に示す。二つのシス二重結合に挟まれた11位のメチレン水素は反応性に富み、活性酸素種や酵素により容易に引き抜かれて脂質ラジカルとなる。次に、9位もしくは13位に酸素の添加が起こり脂質ペルオキシラジカルとなる。その後、他の脂質のメチレン水素を引き抜くなどして、自らは脂質ヒドロペルオキシドとなる。最後に還元されて脂質ヒドロキシドとなる。9-HPODE：9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸、9-HODE：9-ヒドロキシオクタデカジエン酸

表1 リノール酸の酸化によるヒドロペルオキシ酸の産生

酸化のタイプ	反応の特徴	ヒドロペルオキシ酸の異性体		
		酸化位置	立体異性	鏡像異性
酸素的酸化 (15-リポキシゲナーゼ)	特異的触媒	(9), 13	<i>cis, trans</i>	S
非酵素的 フリーラジカル依存的 (LOO <sup>•</sup> :ペルオキシラジカル)	ランダム連鎖	9, 13	<i>cis, trans</i> <i>trans, trans</i> 9-ZE=13-ZE 9-EE=13-EE	R=S (ラセミ体)
非酵素的 非ラジカル ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> :一重項酸素)	化学量論的	9, 10, 12, 13	<i>cis, trans</i>	

(文献6より改変引用)

をもつこともわかってきたが<sup>9)</sup>、これらの相反する作用機序に関する詳細なメカニズムは明らかになっていない。

### (3) リノール酸の酸化様式

リノール酸は不飽和脂肪酸の一種で必須脂肪酸である。炭素数は18で、9位と12位にシス型二重結合を二つもつ。リノール酸はアラキドン酸に比べるとフリーラジカルに対する反応性は劣るが、生体中に最も多く存在する多価不飽和脂肪酸であることを考慮すれば、脂肪酸酸化物の生体作用を考える上で重要な脂肪酸である。リノール酸やそのエステル体には不対電子が9位と13位に等しい頻度で存在することから、ラジカル連鎖反応を介して、一次反応物である共役ジエンヒドロペルオキシド(ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸, HPODE)となるが、酸化様式の違いにより表1に示すような異性体を生じる<sup>9)</sup>。フリーラジカルを仲介する反応では等量の9-*cis,trans*-と13-*cis,trans*-HPODE, 等量の9-*trans,trans*と13-*trans,trans*-HPODEの四つのヒドロペルオキシドを定量的に産生する。一重項酸素を介するリノール酸の非ラジカル反応では9位と12位の二重結合を形成する炭素に直接<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が結合するため、9-, 10-, 12-, 13-HPODEの4種の異性体を生じる<sup>7)</sup>。

### (4) 酵素による不飽和脂肪酸の酸化

ヒトには6種類のリポキシゲナーゼと2種類のシクロオキシゲナーゼがある。15-リポキシゲナーゼ(慣例としてアラキドン酸を基質としたときの酸素添加部位の番号で呼ばれる)はリノール酸を13-HPODEに変換するが、同時に少量の9-HPODEも産生される<sup>9)</sup>。12-リポキシゲナーゼと15-リポキシゲナーゼは両者の間でその基質特異性に揺らぎが存在する。例えば、好塩基性白血球細胞の12-リポキシゲナーゼは15-リポキシゲナーゼ活性を有するためリノール酸から13-HPODEを産生しうる<sup>9)</sup>。また網状赤血球の15-リポキシゲナーゼは、アラキドン酸を基質にす

ると12-HPETE(ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸)を産生しうる<sup>10,11)</sup>。9-HPODE産生に関わるリポキシゲナーゼについてマウスではリノール酸を9-HPODEに変換する8-リポキシゲナーゼが同定されているが、ヒトでは見いだされていない。そのホモログである15-リポキシゲナーゼ2がヒトで見つかっているが、リノール酸からの9-HPODE産生に関わっていない<sup>12)</sup>。ジャガイモなどの植物の5-リポキシゲナーゼはリノール酸を9-HPODEに変換する活性が高いが、ヒト5-リポキシゲナーゼにはその活性はほとんどない。シトクロムP450(CYP)ファミリーやシクロオキシゲナーゼはそのリポキシゲナーゼ様反応によってリノール酸やアラキドン酸の各種ヒドロペルオキシ酸を生成することが知られているが、それらの反応に生理的な意味があるかどうかは検討の余地がある。11-HPETEはアラキドン酸がシクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジンG<sub>2</sub>に代謝される際の副生成物として報告されているが、リポキシゲナーゼによって特異的に産生されるという報告はない。

### (5) 過酸化脂質の還元

生体内では脂質ペルオキシドは比較的速やかに還元される。この反応には、3種類の還元酵素が知られている。すなわち、グルタチオンペルオキシダーゼやグルタチオンS-トランスフェラーゼ、ペルオキシレドキシニンである<sup>13)</sup>。リノール酸のヒドロペルオキシ酸は9-及び13-HODE(ヒドロキシオクタデカジエン酸)に、アラキドン酸のヒドロペルオキシ酸は5-, 8-, 9-, 11-, 12-及び15-HETE(ヒドロキシエイコサテトラエン酸)へと還元される。後述するように、9-HODEはG2Aのリガンドとして働き、また9-HODEと13-HODEは核内受容体であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR) $\gamma$ の内在性アゴニストとして脂質代謝等に関与する。さらに、9-HODEや13-HODEとその代謝物の9-oxoODE(オキソオクタデカジエン),

及び 13-oxoODE は細胞膜受容体である transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の内在性のアゴニストとして痛み等に関与する<sup>14,15)</sup>。このように、リノール酸の酸化物がもつ生物学的意義が明らかになりつつある。

#### (6) LDL の酸化

低密度リポタンパク質 (LDL) は、中心部にコレステロールエステルとトリグリセリドを含み、外殻にはリン脂質と遊離コレステロールを豊富に含む。コレステロール以外の LDL 中の脂質はリノール酸などの高度不飽和脂肪酸を含み、活性酸素種やフリーラジカルの標的となって、主に動脈血管内壁で酸化される。この結果、酸化 LDL 中には豊富に過酸化脂質が含まれることになり、これがアテローム性動脈硬化症の発症、進展の原因とされている。LDL における酸化連鎖反応とフリーラジカルの直接攻撃は LDL 粒子の球形構造を消失させて、粒子全体の陰性荷電を増加させるために、酸化 LDL は LDL 受容体に認識されなくなるが<sup>16)</sup>、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれて泡沫化が開始される。動脈硬化の重症度と動脈組織内の過酸化脂質量は相関しており、動脈硬化病変部には 9-HODE や 13-HODE などの酸化リノール酸や酸化コレステロールが蓄積している<sup>17,18)</sup>。また、酸化 LDL には 13-HODE, 7-ケトコレステロール及び 25-ヒドロキシコレステロールなどの様々な酸化脂質が豊富に含まれ、単球-マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、Tリンパ球などに様々な細胞応答を誘起することが知られている。アテローム性動脈硬化症の発症、進展には酸化 LDL の受容体に誘起される細胞応答の発現以外にも、酸化遊離脂肪酸、酸化リン脂質、リゾリン脂質及びアルデヒドの関

与が考えられ、実際、血管内皮細胞、白血球や血小板にはこれらの存在が確認されている。このような脂質の酸化から生じる酸化ストレスはアテローム性動脈硬化症、糖尿病、老化、及び神経変性疾患など多くの病態と深く関わっていると考えられている。

### 3. 酸化脂肪酸の遊離

生体内の多くの高度不飽和脂肪酸は、リン脂質やコレステロールエステルにエステル体として存在する。この項ではエステル体のまま酸化された脂肪酸が、どのようにして遊離するかについて述べる (図 2)。

膜やリポタンパク質中のリン脂質の主に *sn*-2 位に存在する不飽和脂肪酸はホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) のエステル結合水解反応の作用で遊離される。特に PLA<sub>2</sub> は、炎症性細胞において膜リン脂質からのアラキドン酸の遊離反応を担っており、プロスタグランジンやロイコトリエンの産生過程における初発酵素として重要である。刺激応答細胞での受容体刺激に伴うアラキドン酸遊離反応はカルシウム依存性細胞質型 PLA<sub>2</sub>α (cPLA<sub>2</sub>α, グループ IVA PLA<sub>2</sub>)、及び分泌型 PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)、あるいはその両者に担われていることが多い。この他、酸化 LDL を貪食したマクロファージのアラキドン酸遊離や、コレステロールの再エステル化に必要なアシル鎖の供給を担う酵素としても PLA<sub>2</sub> の作用は重要である。実際、ヒトのアテローム性プラークでは cPLA<sub>2</sub>α や sPLA<sub>2</sub> (グループ IIA, 及びグループ X) の発現が増加しており、その発現部位はマクロファージや血管平滑筋細胞の局在と一致することが示されている<sup>19-21)</sup>。ヒトのグループ V 及び X の sPLA<sub>2</sub> が LDL や形質膜のホス

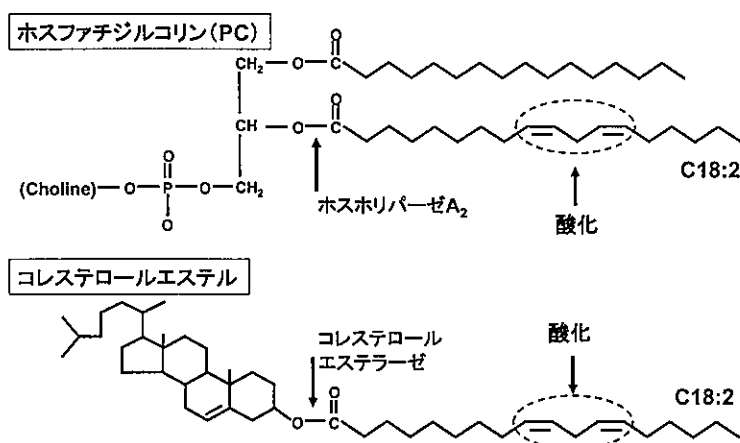


図 2 リノール酸エステルの酸化と酸化物の遊離

不飽和脂肪酸であるリノール酸は、細胞膜においてはホスファチジルコリンなどのリン脂質の *sn*-2 位にエステル結合している。血液中のリポタンパク質 LDL においてはコレステロールにエステル結合している。酵素的もしくは非酵素的な酸化を受けた後、リン脂質にホスホリパーゼ A<sub>2</sub> が、コレステロールエステルにコレステロールエステラーゼが作用することによって、リノール酸酸化物が遊離する。

ファチジルコリンの加水分解に関与しているとの報告もあり、アテローム性動脈硬化病変発症の一端を cPLA<sub>2</sub>α や sPLA<sub>2</sub> が担っていることが示されている。また、酸化 LDL やリノール酸の酸化物である 13-HODE をマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞に作用させておくと、cPLA<sub>2</sub>α の作用を介してアラキドン酸やオレイン酸遊離が促進される<sup>22)</sup>。このことは、酸化遊離脂肪酸が脂肪酸代謝を調節していることを示している。

コレステロールエステルにアシル基として存在する脂肪酸はコレステロールエステラーゼによって切り出される。この酵素はマクロファージや動脈壁細胞に存在し、血中にも分泌される。その役割はエステラーゼ活性を通じて LDL に構造的な変化を与え、LDL 受容体との相互作用に変化を及ぼし、細胞への取り込みに影響を与えることであり、コレステロールの吸収や代謝を調節する側面が強いとされる。しかし、本酵素が酸化 LDL 中の酸化コレステロールエステルを非酸化型のものよりも選択的に基質とすることを考慮すると<sup>23)</sup>、酸化遊離脂肪酸の生成に積極的に関与する酵素と考えることもできる。

lipoprotein-associated PLA<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) は分子量 45 kDa のカルシウム非依存性の分泌型 PLA<sub>2</sub> であり、当初、血小板活性化因子 (PAF) の分解活性を有する酵素として同定されたことから PAF-acetylhydrolase としても知られている。この PLA<sub>2</sub> の最大の特徴は、他の PLA<sub>2</sub> と異なり細胞膜リン脂質中の長鎖脂肪酸に対する活性は欠失しているものの、水溶性リン脂質の sn-2 位に存在する酸化的に短縮された脂肪酸を選択的基質とすることである<sup>24)</sup>。このような性質から、本酵素は酸化 LDL 中に含まれる酸化リン脂質からの酸化遊離脂肪酸産生を通じて、血管内皮細胞における炎症反応を引き起こす中心的酵素と考えられており、アテローム性動脈硬化発症に関与する分子の一つとして着目されている。

#### 4. 酸化遊離脂肪酸と PPAR ファミリー

核内受容体は脂溶性ホルモンや脂肪酸などをリガンドとする転写因子である。多くの高度不飽和脂肪酸や一部の飽和脂肪酸及びそれらの代謝物は、脂肪組織、肝臓、骨格筋などに発現する PPAR ファミリー (PPARα, PPARβ/δ, PPARγ) のリガンドとして働き、ミトコンドリアの生合成や脂質代謝関連酵素の発現を誘導する。PPAR アゴニストはメタボリックシンドロームや糖尿病、脂質異常症の治療薬として既に臨床応用されているものもある。PPARα は肝臓、腎臓、心臓、褐色脂肪細胞に発現し、リガンド刺激により β 酸化を亢進させる。PPARβ/δ は様々な組織に分布している。PPARγ は白色脂肪組織、骨髄、免疫系、胎盤などに発現しており、脂肪細胞の分化決定因子であることがわかっている。PPARγ には PPARγ1 と PPARγ2 のアイ

ソフォームが存在するが、その転写活性化機構は同じと考えられている。いずれのサブタイプも内在性アゴニストとしてリノール酸やアラキドン酸などの不飽和脂肪酸のみならず、酸化 LDL の構成酸化脂質の 15-HETE, 9-HODE 及び 13-HODE で活性化されることが知られており、その発現は動脈硬化巣、特にマクロファージの浸潤部位に強く認められる<sup>25,26)</sup>。PPARγ が単球やマクロファージのサイトカイン産生を制御して、抗炎症作用を発揮するという報告がなされて以来、抗炎症治療の標的分子として着目されており<sup>26)</sup>、さらにがん、骨形成などにも関与していることが明らかになってきている。また、PPARγ はプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) の酸化体である 15-デオキシ-D<sup>12,14</sup>-プロスタグランジン J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) を高親和性のリガンドとする<sup>27)</sup>。しかし、15d-PGJ<sub>2</sub> には PPARγ リガンドに依存しない抗炎症作用も報告されている。15d-PGJ<sub>2</sub> の生体内における濃度を考えると実際にリガンドとして作用しているかどうか、今後の解析を待たなければならない。

#### 5. 酸化遊離脂肪酸と G2A

ヒト白血病がん遺伝子 (BCR-ABL チロシンキナーゼ) の標的遺伝子産物 G2A は、酸化ストレスや様々な DNA 損傷刺激によって誘導され、細胞周期を G<sub>2</sub>/M 期で停滞させる GPCR として 1998 年に報告された<sup>28)</sup>。マクロファージ及びリンパ球での発現が高く、アポリポタンパク質 E ノックアウトマウスのアテローム性動脈硬化病巣の観察結果から、動脈硬化の発症、進展において G2A がマクロファージ-血管内皮細胞の両者の相互作用と何らかの関係があることが示唆されていた<sup>29)</sup>。

##### (1) G2A のリガンド

我々はオーファン GPCR の脂質リガンドを同定する目的でそれらを CHO 細胞に発現させ、約 200 種の候補リガンドに対する細胞内カルシウムの上昇を指標としてスクリーニングを行い、ヒト G2A 発現細胞においていくつかの酸化遊離脂肪酸がカルシウム上昇反応を引き起こすことを見いだした<sup>17)</sup>。特に 9-HODE は最も高い反応性を示し、その EC<sub>50</sub> は 0.5 μM であった。9-HODE に対する反応性は 9-HODE よりもわずかに低く、それらの立体異性体である 13-HODE や 13-HODE に対する反応性は更に低かった。光学異性体の関係にある 9(S)-HODE と 9(R)-HODE は、ほぼ同程度の活性を示した。アラキドン酸由来の酸化脂肪酸である 11-HETE は 9-HODE と同等の反応性を示した。他の HETE 類である 5-, 8-, 9-, 12-及び 15-HETE は、9-HODE や 11-HETE より低いものの有意な反応性を示した。図 3 に G2A のリガンド特異性を示す。なお、エステル化された酸化脂肪酸は、G2A のリガンドとしては機能しなかった。リノール酸やアラキドン酸は前述した通り、フリーラジカルを介した経路、一重項酸素を介した経路、

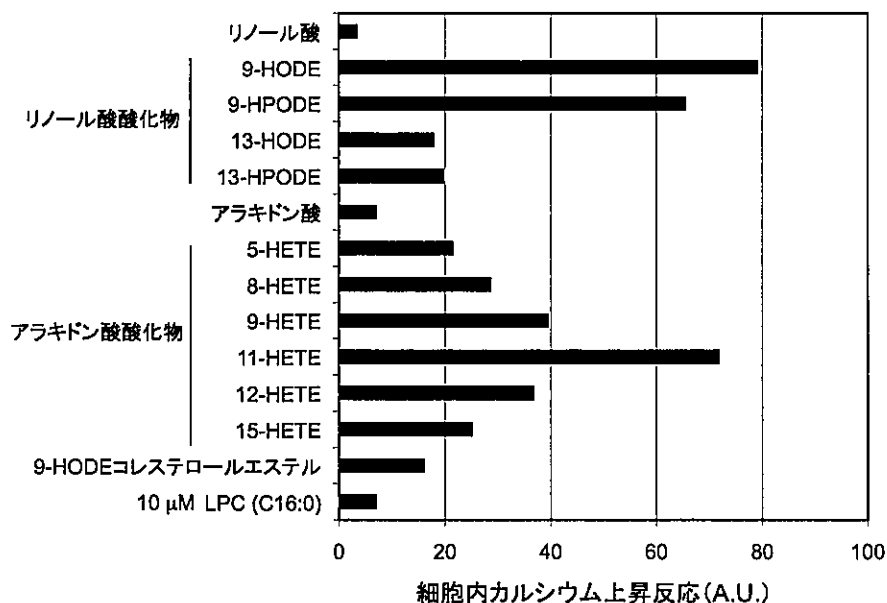


図3 G2Aのリガンド特異性

G2AとG $\alpha$ qiを共発現しているCHO細胞において、種々のリノール酸酸化物及びアラキドン酸酸化物(1 $\mu$ M)に対する細胞内カルシウム上昇反応を測定した。リゾホスファチジルコリン(LPC)は10 $\mu$ Mでも有意な反応を示さなかった。HODE:ヒドロキシオクタデカジエン酸, HPODE:ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸, HETE:ヒドロキシエICOSAテトラエン酸(文献17より改変引用)

そして酵素反応を介した経路で酸化されるが、程度の差こそあれG2Aはこれらの酸化遊離脂肪酸全体をリガンドにしている受容体と考えられる。

G2Aのリガンドとして、一時リゾホスファチジルコリン(LPC)やスフィンゴシルホスホリジルコリン(SPC)が報告されたが、判断の根拠とされたリガンド結合の再現性が示されなかったことからその報告は撤回された<sup>30)</sup>。しかし、その後もLPCなどのリゾリン脂質がG2Aを介する各種細胞応答を起こす因子としての報告が続いている。Tリンパ球・マクロファージのLPCへの遊走<sup>31)</sup>や、LPCによる神経突起伸展反応への関与<sup>32)</sup>、リゾリン脂質刺激によりG2Aの局在が細胞内顆粒から細胞表面へ変化するという報告<sup>33)</sup>などである。これらは、LPC等が何らかのモジュレーターとしてG2Aの機能を修飾している可能性を示唆している。

## (2) プロトン感知性受容体ファミリー

G2AとOGR1(ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1), GPR4, TDAG8(T-cell death-associated gene 8)は40-50%のアミノ酸相同性を有しており、プロトン感知性受容体ファミリーを形成する。しかし、G2Aのプロトン感知性は、OGR1, GPR4, TDAG8と比べて弱い。G2A発現細胞では酸性pH下でイノシトールリン酸(IPs)産生の増加が観察されたが、9-HODE刺激に比べるとわずかであっ

た<sup>17)</sup>。

G2A以外のプロトン感知性GPCRでは、N末端細胞外領域と細胞外ループにある数個のヒスチジン残基のプロトン化の程度により構造変化を起こして活性化されると推測されている<sup>34)</sup>。ヒスチジン残基側鎖の酸解離定数はpH 6.04で生理的pHからやや酸性側の範囲の微妙なpHの変化に反応しうる。これに対して、G2AではN末端細胞外領域の対応するアミノ酸がリシンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸と置き換わっている。これらのアミノ酸残基の酸解離定数は10より高く、生理的pHではほとんどがプロトン化を受けている。このことが、G2Aのプロトン感知性がOGR1, OGR4やTDAG8と異なり、生理的pH条件におけるプロトン感知性は低いものの定常状態で既に活性化している理由かも知れない<sup>34,35)</sup>。

## (3) ヒトG2AとマウスG2A

マウスG2Aの受容体特性はヒトG2Aといくつかの点において異なっている。我々の検定系では、マウスG2Aの9-HODEや11-HETEに対する応答は認められなかった(未発表データ)。また、ヒトG2Aが酸性域のpHに反応するのに対して、マウスG2Aには反応性が観察されず、この両者にはプロトン感知性に関しても違いがある。アミノ酸の一次配列は全体を通して両者の間で67%、膜貫通領域においては79%の相同性を示し、決して低い数値ではな

い。しかし、N末端の細胞外領域では21%、細胞内ループでは67%、細胞外ループでは50%、C末端の細胞質尾部では41%となり、その相同性は減少している。G2Aのノックアウトマウスでは遅発性の自己免疫疾患や<sup>36)</sup>、動脈硬化病巣の進展抑制<sup>37)</sup>が観察されるなどの表現型が報告されている。マウスG2Aのリガンドの同定とその機能の解明が待たれる。

#### (4) 9-HODEが引き起こす細胞内情報伝達

ヒトG2Aを過剰発現させたCHO細胞において、9-HODEは濃度依存的に細胞内カルシウムを上昇させるが、百日咳毒素(PTX)はこの反応を約半分に減少させた。G2AとG<sub>i</sub>を共発現させたHEK293細胞の膜画分とGTPアナログであるGTPγSを用いてそれらの結合能を調べたところ、GTPγSの結合が9-HODE依存的に観察された。同様の結合能はG<sub>15</sub>を共発現させた場合でも観察されたが、G<sub>16</sub>では認められなかった。これらの結果はヒトG2AがGαタンパク質のG<sub>i</sub>、G<sub>q</sub>及びG<sub>15</sub>と共役していることを示している。ただし、どのタイプのGαタンパク質と共役するかは、細胞の種類に依存すると考えられる。G2Aを過剰発現させたCHO細胞では主なMAPキナーゼのうち、JNKの活性化が確認されたが、その生物学的意味はこれからの解析を待たなければならない。

#### (5) 遺伝子構造とmRNA

G2A遺伝子(NCBI Gene ID: 29933)は染色体14q32.3に存在し、四つのエクソンを有する遺伝子構造をもつ。主なコーディング領域はエクソン4に存在する。我々はエクソン3が欠失しているG2Aのスプライシングバリエントが存在することを見いだした<sup>38)</sup>。5'-RACEと3'-RACEの結果から、同じ転写開始点を共用する二つの選択的スプライシングバリエントであることがわかった。このG2AのスプライシングバリエントをG2A-bと名付け、従来のG2AをG2A-aとした。G2A-a(380残基)のN末端の11アミノ酸残基がG2A-b(371残基)では2個の別なアミノ酸残基に置き換わっている。

G2A-aとG2A-bの発現量をmRNAレベルで解析するとG2A-b mRNAのほうがやや多く存在していた。ヒトでの組織分布では、いずれも末梢血白血球に最も多い発現がみられ、続いて脾臓、肺、心臓の順であり、ほとんどの臓器に発現が認められた。HL-60細胞株において、DNA合成の阻害剤(ヒドロキシウレア、及びシトシンアラビノシド)、及び分化誘導剤(all-trans-レチノイン酸)によって両者とも同程度に発現が誘導された。

アクチノマイシンDで処理したHL-60細胞株においてmRNAの安定性を調べたところ、どちらのmRNAとも半減期は1時間以内と極めて不安定であることが明らかとなった。G2A mRNAの3'非翻訳領域にはAUUUA配列及びGUUUの5回繰り返し配列があった。このようなAU

に富む配列は初期応答遺伝子に特徴的であり、mRNAの不安定性の原因となる。G2Aが誘導性のGPCRであることと合わせて考えると、刺激によって発現誘導されるが不必要になると速やかにその数が減少する受容体であることを示している。

G2A-aとG2A-bのN末端のわずかなアミノ酸配列の違いがリガンド刺激による細胞応答の違いを生じるか否かの検討を行ったが、9-HODE刺激に対する細胞内カルシウムの上昇や、GTPγS結合には相違は見られなかった。ところが、両受容体を強制発現させたCOS-7細胞において、イノシトールリン脂質代謝を解析したところ、G2A-b発現細胞ではG2A-a発現細胞に比べてpH 6.2-8.2のいずれのpHにおいてもわずかに高いIPsの蓄積が観察された。

このようにG2A-aとG2A-bではその発現や9-HODE刺激に対する応答性に顕著な違いはないが、プロトン感受性にわずかな違いがあることが観察された。通常は、G2A-aとG2A-bを区別する必要はないと考えられる。本稿では特に記載しない限りG2Aは、G2A-aもしくはG2A-aとG2A-bを併せたものを指すものとする。

#### (6) 酸化LDLとG2A

G2Aは酸化LDL中で産生される9-HODE/11-HETEをリガンドとすること、その発現は白血球系の細胞で高いことから、アテローム性動脈硬化症の発症、進展に関与していると考えられる。実際、ヒトでも、アポリポタンパク質Eのノックアウトマウスでもアテローム性プラークの泡沫化マクロファージにG2Aが高発現していることや<sup>29)</sup>、G2AとLDL受容体のダブルノックアウトマウスではアテローム領域の程度が軽減していることが示されている<sup>39)</sup>。しかし前述したように、マウスG2AはヒトG2Aと異なり9-HODEに反応しないことから、G2Aノックアウトマウスの表現型に関しては注意深く考察しなければならない。

#### (7) 表皮角化細胞でのG2Aの役割と生物学的意義

我々は酸化遊離脂肪酸とG2Aの生物学的意義を調べるために、表皮に着目してG2Aの機能の検討を行った<sup>40)</sup>。表皮最外層の角質層細胞間脂質にはリノール酸がセラミドやコレステロールエステルにエステル体として多量に含有されており、角化細胞の細胞膜リン脂質にもリノール酸が含まれる割合が多い。また、表皮は絶えず紫外線照射や細菌感染などの酸化ストレスに曝されており、脂質過酸化反応により産生された9-HODEがG2Aのリガンドとして作用することが推測されたためである。

ヒト正常表皮組織、及び初代培養の表皮角化細胞(NHEK細胞)を用いた免疫組織化学的な検討により、G2Aの表皮における発現が確認された<sup>40)</sup>。表皮角化細胞に9-HODE刺激を加えると、濃度依存的な細胞内カルシウム濃度の上昇、細胞増殖の抑制、インターロイキン(IL)-6、-8などのサイトカイン類の産生上昇が観察された。G2A過

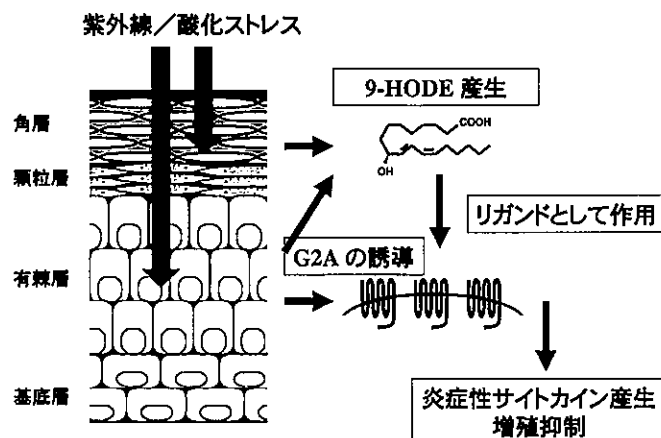


図4 皮膚における酸化遊離脂肪酸-G2A系の役割(仮説)

表皮において紫外線などの酸化ストレスは、有棘層の角化細胞のG2A発現を誘導する。一方、酸化ストレスは皮膚の脂質中に様々な形で多量に含まれるリノール酸(多くはエステル体)を酸化してそのリガンドである9-HODEエステルを産生する。その後、遊離した9-HODEはG2Aのリガンドとして働く。その結果、角化細胞の増殖が抑制され、周囲に炎症性サイトカインが放出されて炎症像が形成される。

剰発現やG2Aに対するsiRNAを用いた検討により、これらの反応がG2Aを介したものである可能性が高いことが示された。また、紫外線照射によるリノール酸の9-HODEへの変換を検討したところ、我々が日常的に曝されている程度の紫外線量で、9-HODEが産生されることが観察された。これらのことから、表皮において紫外線照射などの酸化ストレスで産生される9-HODEに反応して、角化細胞において誘導されたG2Aは細胞増殖の抑制を引き起こすとともに、炎症性サイトカインを放出して周囲に炎症を惹起させる役割を担っているのではないかと考えられた(図4)。皮膚角化細胞からみれば、酸化ストレスにより障害を受けた細胞は一旦、分裂と分化を停止させて障害からの回復を待つが、障害を受けた細胞と置き換わるようにして、基底層より新しい細胞の分化と分裂が促進されるという側面もある。実際、9-HODE刺激で産生が増加したIL-6とIL-8は皮膚角化細胞の分化を刺激する作用をもつことが知られており、9-HODE自体もラットを用いた外傷治療実験において強力な炎症性メディエーターであることが報告されている。皮膚疾患の乾癬では、IL-6とIL-8の異常増加が皮膚角化細胞の過分化及び好中球の集積を誘導することは病態の特徴になっている<sup>41)</sup>。表皮において、G2Aは角化細胞からのサイトカイン産生を通じて炎症や乾癬などの様々な病態に関与している可能性が考えられる。

#### (8) G2Aによる細胞周期制御

G2AはNIH 3T3細胞において、細胞周期をG<sub>2</sub>/M相で停滞させるストレス誘導性の受容体として同定された。ただし、この細胞周期の停滞はG2Aを過剰発現させた際に

観察されたもので、リガンド非依存的なものであった<sup>28)</sup>。また、このG2A発現に関わるG<sub>2</sub>/M期での停滞が、p53機能に関与するのかが、p53ノックアウトマウスの繊維芽細胞を用いて調べられたが、G2A依存の細胞周期停滞はp53非依存的なものであった<sup>28)</sup>。皮膚角化細胞においては、9-HODE依存性のG<sub>1</sub>相で停滞する分裂抑制が観察された<sup>40)</sup>。NHEK細胞を用いて細胞周期制御因子を解析したところ、9-HODE刺激4時間後以内に、サイクリンDの発現レベルが減少した(未発表データ)。G2Aがどのようなメカニズムで細胞分裂を制御しているのか、細胞によってG<sub>1</sub>相での停滞誘導とG<sub>2</sub>/M相における停滞誘導が生ずるのは何故かなどを解明することは今後の大きな課題である。

## 6. おわりに

G2Aは非酵素的酸化反応で生じる酸化遊離脂肪酸を認識するGPCRとして初めての例である。生体中の多価不飽和脂肪酸であるリノール酸やアラキドン酸に加えて、リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸も活性酸素分子種によって種々の酸化遊離脂肪酸に酸化され、リガンドとして働く可能性がある。酸化ストレスに暴露されると、複数の分子種の酸化遊離脂肪酸が同時に産生されると考えられる。複数のリガンドによる同時刺激によって、シグナルが変化するかどうか興味のあるところである。また、培養細胞における実験系では、G2Aを発現させただけで増殖停止やイノシトールリン脂質代謝を引き起こす。リガンド非依存的に受容体からのシグナルが漏れ出ているのか、それとも酸化遊離脂肪酸以外の“真の”リ



グンドがあるのか等の謎が残る。

誘導性の GPCR という点でも興味深い。G2A mRNA の半減期が1時間以内であることを考え併せると、同様の性質をもつシクロオキシゲナーゼ2と同じく、必要とされる時に誘導され作用する分子と言える。その意味では、G2A は抗炎症剤などの薬剤開発の標的分子となる可能性がある。

我々は皮膚角化細胞を用いた解析から得られた知見を元に、G2A は生体内において酸化ストレスセンサーとして働いているのではないかと仮定している。酸化ストレスは G2A の発現、及びそのリガンドの産生を促す。この相乗的な作用により、障害を受けた細胞では増殖を抑制し、近傍の細胞に対してはパラクリンのシグナルを伝達して、分裂や炎症を惹起しているであろう。この意味において、アテローム性動脈硬化症において G2A が果たす役割を見いだすことは意義が大きい。酸化 LDL はアテローム性動脈硬化症の発症や、進展における重要な因子であり、G2A のリガンドを内包している。アテローム性プラークでは、マクロファージ、リンパ球、血管内皮細胞などが複合体を形成しているが、動脈硬化症の病態に G2A が関与している可能性がある。

最近、我々はヒト G2A が神経系腫瘍細胞において、その腫瘍細胞としての特質や幹細胞性の制御に関わっているという知見を見いだしつつある。腫瘍組織内部の飢餓、及び低酸素状況を考慮すれば、酸化ストレスによる G2A の発現の変動、脂肪酸の酸化とそのメディエーターとしての役割を見いだすことは重要であり魅力的である。これまで述べてきた酸化 LDL の産生を発端として動脈内壁上で起こっている現象や、表皮で一種の酸化ストレス防御機構として起こっている現象とは違った側面から、酸化遊離脂肪酸と G2A の役割を見いだすことができるのではないかと考えている。

## 謝辞

本稿は群馬大学大学院医学研究科生化学分野において得られた研究成果と、多くの研究者がこれまで積み重ねてこられた遊離酸化脂肪酸とその受容体に関する研究の成果を基に執筆しました。また、ヒト G2A に関する研究は、大日方英助教を中心に、群馬大学大学院皮膚病態学の服部友保、小川愛両博士の協力によってなされたものです。

## 文 献

- Petrescu, A.D., Gallegos, A.M., Okamura, Y., Strauss, J.F., 3rd, & Schroeder, F. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 36970-36982.
- Kunimoto, M., Inoue, K., & Nojima, S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 646, 169-178.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) *Science*, 281, 1309-1312.
- Niki, E. & Yoshida, Y. (2005) *J. Med. Invest.*, 52 Suppl, 228-230.
- Zmijewski, J.W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D.A., Noguchi, N., & Darley-Usmar, V.M. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, 33, 1385-1389.
- Niki, E. (2009) *Free Radic. Biol. Med.*, 47, 469-484.
- Minami, Y., Yokoyama, K., Bando, N., Kawai, Y., & Terao, J. (2008) *Free Radic. Res.*, 42, 197-204.
- Izumi, T., Radmark, O., Jornvall, H., & Samuelsson, B. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 202, 1231-1238.
- Yokoyama, C., Shinjo, F., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Oates, J.A., & Brash, A.R. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 16714-16721.
- Yamamoto, S., Kishimoto, K., Arakawa, T., Suzuki, H., Nakamura, M., Yoshimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y., & Tanabe, T. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 407, 191-196.
- Yoshimoto, T. & Takahashi, Y. (2002) *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 245-262.
- Brash, A.R., Boeglin, W.E., & Chang, M.S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6148-6152.
- Chen, J.W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K., & Fisher, A.B. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 28421-28427.
- Patwardhan, A.M., Scotland, P.E., Akopian, A.N., & Hargreaves, K.M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 18820-18824.
- Patwardhan, A.M., Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Diogenes, A., Weintraub, S.T., Uhlson, C., Murphy, R.C., & Hargreaves, K.M. (2010) *J. Clin. Invest.*, 120, 1617-1626.
- Jayaraman, S., Gantz, D.L., & Gursky, O. (2007) *Biochemistry*, 46, 5790-5797.
- Obinata, H., Hattori, T., Nakane, S., Tatei, K., & Izumi, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 40676-40683.
- Wentworth, P., Jr., Nieva, J., Takeuchi, C., Galve, R., Wentworth, A.D., Dilley, R.B., DeLaria, G.A., Saven, A., Babior, B.M., Janda, K.D., Eschenmoser, A., & Lerner, R.A. (2003) *Science*, 302, 1053-1056.
- Elinder, L.S., Dumitrescu, A., Larsson, P., Hedin, U., Frostegard, J., & Claesson, H.E. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 2257-2263.
- Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Peilot, H., Oorni, K., & Kovannen, P. (2001) *Circ. Res.*, 89, 298-304.
- Hanasaki, K., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Saiga, A., Ono, T., Ikeda, M., Notoya, M., Kamitani, S., & Arita, H. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 29116-29124.
- Akiba, S., Yoneda, Y., Ohno, S., Nemoto, M., & Sato, T. (2003) *J. Lipid Res.*, 44, 1676-1685.
- Belkner, J., Stender, H., Holzhauser, H.G., Holm, C., & Kuhn, H. (2000) *Biochem. J.*, Pt. 1, 125-133.
- Kriska, T., Marathe, G.K., Schmidt, J.C., McIntyre, T.M., & Girotti, A.W. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 100-108.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., & Evans, R.M. (1998) *Cell*, 93, 229-240.
- Tontonoz, P. & Spiegelman, B.M. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 289-312.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., & Lehmann, J.M. (1995) *Cell*, 83, 813-819.
- Weng, Z., Fluckiger, A.C., Nisitani, S., Wahl, M.I., Le, L.Q., Hunter, C.A., Fernald, A.A., Le Beau, M.M., & Witte, O.N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12334-12339.
- Rikitake, Y., Hirata, K., Yamashita, T., Iwai, K., Kobayashi, S., Itoh, H., Ozaki, M., Ejiri, J., Shiomi, M., Inoue, N., Kawashima, S., & Yokoyama, M. (2002) *Arterioscler.*

- Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 2049-2053.
- 30) Witte, O.N., Kabarowski, J.H., Xu, Y., Le, L.Q., & Zhu, K. (2005) *Science*, 307, 206.
- 31) Yang, L.V., Radu, C.G., Wang, L., Riedinger, M., & Witte, O. N. (2005) *Blood*, 105, 1127-1134.
- 32) Ikeno, Y., Konno, N., Cheon, S.H., Bolchi, A., Ottonello, S., Kitamoto, K., & Arioka, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 28044-28052.
- 33) Frasci, S.C., Zenski-Berry, K., Murphy, R.C., Borregaard, N., Henson, P.M., & Bratton, D.L. (2007) *J. Immunol.*, 178, 6540-6548.
- 34) Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T., & Shimizu, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 42484-42491.
- 35) Tobo, M., Tomura, H., Mogi, C., Wang, J.Q., Liu, J.P., Komachi, M., Damirin, A., Kimura, T., Murata, N., Kurose, H., Sato, K., & Okajima, F. (2007) *Cell Signal.*, 19, 1745-1753.
- 36) Le, L.Q., Kabarowski, J.H., Weng, Z., Satterthwaite, A.B., Harvill, E.T., Jensen, E.R., Miller, J.F., & Witte, O.N. (2001) *Immunity*, 14, 561-571.
- 37) Parks, B.W., Gambill, G.P., Lusic, A.J., & Kabarowski, J.H. (2005) *J. Lipid. Res.*, 46, 1405-1415.
- 38) Ogawa, A., Obinata, H., Hattori, T., Kishi, M., Tatei, K., Ishikawa, O., & Izumi, T. (2010) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 332, 469-478.
- 39) Parks, B.W., Lusic, A.J., & Kabarowski, J.H. (2006) *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 2703-2709.
- 40) Hattori, T., Obinata, H., Ogawa, A., Kishi, M., Tatei, K., Ishikawa, O., & Izumi, T. (2008) *J. Invest. Dermatol.*, 128, 1123-1133.
- 41) Schroder, J.M., Gregory, H., Young, J., & Christophers, E. (1992) *J. Invest. Dermatol.*, 98, 241-247.

脂質メディエーターとしての酸化遊離脂肪酸—G2A の役割を中心に—  
岸本幸治(きしもと こうじ)



群馬大学助教 (大学院医学研究科生化学分野)。博士 (医学)。

略歴 1964年兵庫県に生る。89年徳島大学工学部卒業。91年同大学院工学研究科修士課程修了。95年同大学院医学研究科博士課程単位取得退学。同年大阪バイオサイエンス研究所特別研究員。96年JST, JSPS研究員。2000年CREST研究員 (清水孝雄先生)。04年ジョーンズ・ホプキンス大学博士研究員。09年より現職。

研究テーマと抱負 脳腫瘍細胞の形質変化に関わる G2A 受容体の機能解析を行っている。細胞の幹細胞性に関わる酸化遊離脂肪酸を始めとするリピッドメディエーターの役割を明らかにしたい。

ホームページ [http://www2.med.gunma-u.ac.jp/fmi/xsl/bioreg/index.xsl?db=courase.fp7&-lay=set\\_web&order=16&-find](http://www2.med.gunma-u.ac.jp/fmi/xsl/bioreg/index.xsl?db=courase.fp7&-lay=set_web&order=16&-find)

趣味 読書, 音楽鑑賞。