

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 リゾホスファチジルイノシトールとその受容体

杉 浦 隆 之, 山 下 純, 岡 沙 織

GPR55は、Gタンパク質共役型のオーファン受容体として1999年にクローニングされた受容体である。最近、我々は、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) に、GPR55アゴニストとしての活性があることを見出した。GPR55を発現させたHEK293細胞にLPIを作用させると、 $G_{12/13}$ を介して、RhoAの活性化、形態変化、p38 MAPキナーゼやERK、転写因子であるATF-2のリン酸化などが引き起こされる。各種脂肪酸を持つLPIの活性を比較した結果、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)の活性が最も強いことが判明した。GPR55の生理的なりガンドは、2-アラキドノイルLPIである可能性が高い。LPIやGPR55の生理的役割にはまだ不明の点が多いが、免疫応答や痛覚の調節、骨代謝の調節等に関与している可能性が示唆されている。新しい脂質メディエーターであるLPIとその受容体の生理的役割の全容の解明は、今後の大きな課題である。

1. はじめに

リゾホスファチジルイノシトール (LPI) は、リゾリン脂質の一種で、有機溶媒にも水にも溶ける両親媒性の化合物である。イノシトール環を持っているため親水性が高く、通常のBligh & Dyer法による脂質抽出では、クロロホルム層ではなく、水-メタノール層に分配される。LPIに生物活性があるという報告は以前からあったが、界面活性作用等によると考えられるものも多く、LPIは生理活性脂質の一つとは見なされていなかった。最近、我々のグループは、カンナビノイド受容体の内在性リガンドに関する研究の過程で、LPIに対する特異的な受容体が存在する

こと、LPIはこの受容体を介して様々な細胞応答を引き起こすことを見出した。

本稿では、生理活性脂質としてのLPIとその受容体に関して、これまでに得られている知見を紹介する。

2. カンナビノイド受容体

大麻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) (図1)などのカンナビノイドは、特異的な受容体 (カンナビノイド受容体) を介して作用することが知られている¹⁾。カンナビノイド受容体としては、これまでに二つの受容体が同定されている (表1)。一つは、1990年にMatsudaらによってラット脳のcDNAライブラリーからクローニングされたCB1受容体で、ヒトの場合、472個のアミノ酸からなっており、 $G_{i/o}$ と共役している²⁾。CB1受容体は、脳などの中枢神経系に多く発現している。特に多く発現している部位は、黒質、線条体、淡蒼球、小脳の分子層、海馬、大脳皮質などで、神経前終末に発現しており、神経伝達物質の放出を $G_{i/o}$ を介して抑制的に制御していると考えられている³⁾。

帝京大学薬学部 (〒252-5195 神奈川県相模原市緑区寸沢嵐 1091-1)

Lysophosphatidylinositol as a novel lipid mediator
Takayuki Sugiura, Atsushi Yamashita, and Saori Oka (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Suwarashi, Midori-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5195, Japan)

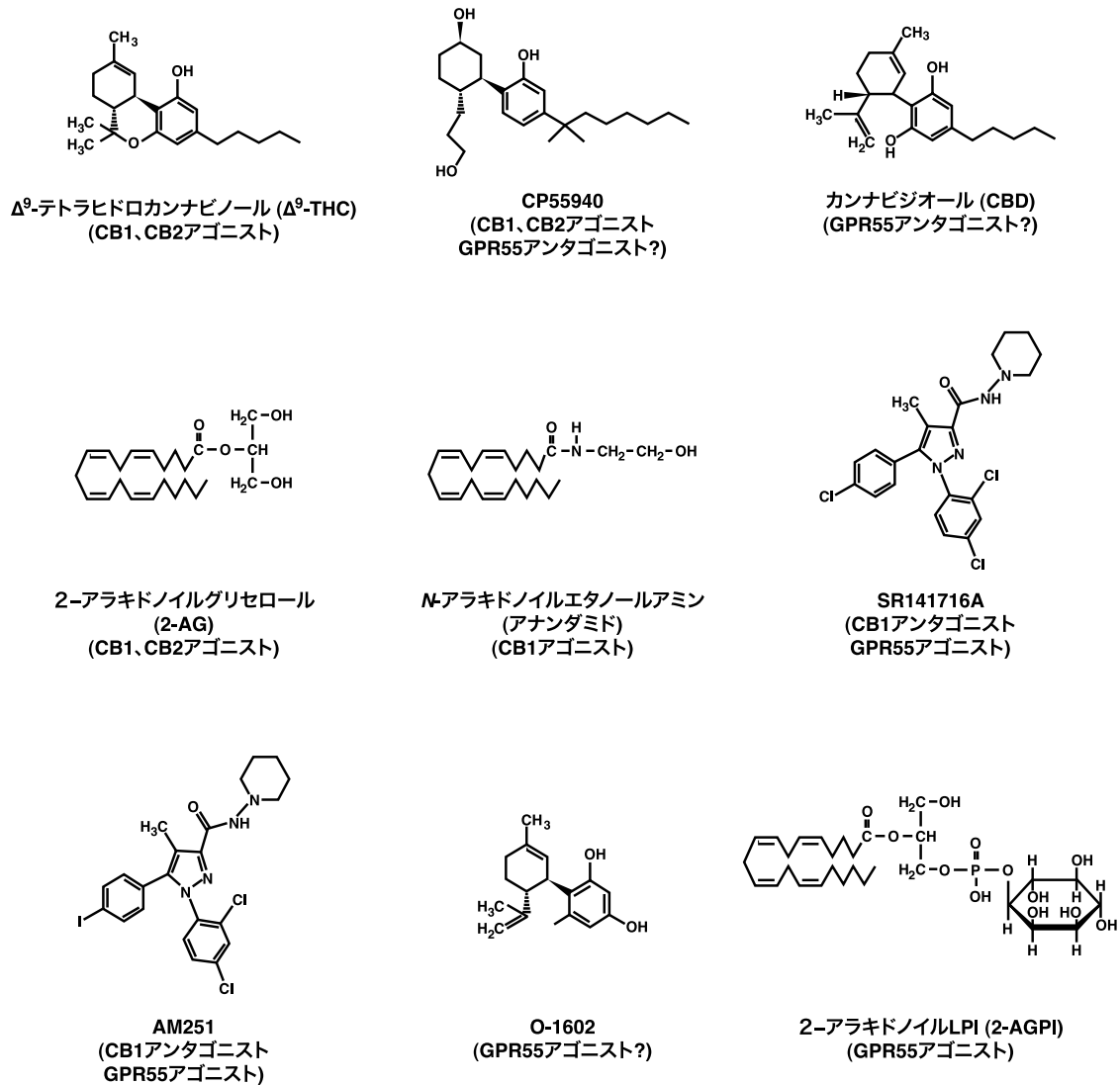


図1 カンナビノイド受容体 (CB1, CB2) リガンドと GPR55 リガンドの構造

表1 カンナビノイド受容体 (CB1, CB2) と GPR55

	CB1	CB2	GPR55
型	7 回膜貫通 G タンパク質共役型	7 回膜貫通 G タンパク質共役型	7 回膜貫通 G タンパク質共役型
アミノ酸	472 (ヒト)	360 (ヒト)	319 (ヒト)
G タンパク質	G _i /G _o	G _i /G _o	G ₁₂ /G ₁₃
発見	Matsuda <i>et al.</i> (1990)	Munro <i>et al.</i> (1993)	Sawzdargo <i>et al.</i> (1999)
内在性リガンド	2-AG, アナндаミド?	2-AG	LPI
分布	全身, 特に脳	脾臓, リンパ節	脾臓, 胸腺, 小腸, 脳
役割	神経伝達の調節等	炎症・免疫の調節	?

もう一つの受容体は、1993年に Munro らによってヒト急性前骨髄球性白血病細胞である HL-60 細胞の cDNA ライブラリーからクローニングされた CB2 受容体で、ヒトの場合、360 個のアミノ酸からなっており、 $G_{i/o}$ と共役している⁴⁾。ヒト CB1 受容体と CB2 受容体のアミノ酸配列には 44% のホモロジーがあり、膜貫通部分では 68% のホモロジーがある。CB2 受容体は、脾臓や扁桃腺、リンパ節などの免疫組織に多く発現しており、炎症反応や免疫応答の調節などの役割を担っていると考えられている。

受容体の存在が明らかとなったことから、カンナビノイド受容体に結合する内在性リガンドの探索が行われた。その結果、1992年に Devane らによって、最初の内在性リガンドとして、*N*-アラキドノイルエタノールアミン (アナンダミド) (図 1) がブタの脳から単離された⁵⁾。この物質は、アラキドン酸とエタノールアミンが酸アミド結合したもので、様々な生物活性を持っている。しかし、アナンダミドの生合成ルートとして効率的なものが見つかっていないこと⁶⁾、 Δ^9 -THC とよく似た作用を示すものの、活性は概して弱く、部分アゴニストとして作用すること⁶⁾などから、真の内在性リガンドではないのではないかと、一部の研究者の間では考えられるようになった。

一方、1995年に、我々のグループとイスラエルの Mechoulam のグループは、2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) (図 1) という一種のモノアシルグリセロールが、もう一つの内在性カンナビノイド受容体リガンドであるということを報告した^{7,8)}。2-AG はアナンダミドとは異なり、刺激によって速やかに産生されること、アナンダミドが受容体に対して部分アゴニストとして作用するのに対し、2-AG は受容体に対し完全アゴニストとして作用することなどから、カンナビノイド受容体の真の内在性リガンドは、アナンダミドではなく 2-AG であると考えられるようになってきている^{9~11)}。

3. GPR55

内在性リガンドの発見や、ノックアウトマウスの開発によって、CB1 受容体や CB2 受容体に関する研究は、1990年代の後半から 2000 年代の初めにかけて大きく進展したが、その結果、CB1 受容体や CB2 受容体とは異なるカンナビノイド受容体の存在が示唆されるようになった。2000 年代の半ばには、G タンパク質共役型受容体の一つで、オーファン受容体である GPR55 が新規のカンナビノイド受容体である可能性を示す報告が二つのグループによって特許の形でなされた^{12,13)}。GPR55 は、脳や脾臓、腸管などに発現している受容体で、ヒトの場合、319 個のアミノ酸からなっており、 $G_{12/13}$ と共役していると考えられている (表 1)。ヒト GPR55 遺伝子はイントロンを含まない遺伝子で、2q37 に位置している。GPR55 は、GPR35 との間に

33%、P2Y5 との間に 30% のホモロジーがある。注目すべきことに、GPR55 と CB1 受容体との間には 13.5%、CB2 受容体との間には 14.4% のホモロジーしかない。また、GPR55 は、CB1 受容体や CB2 受容体に存在する cannabinoid binding pocket を含んでいないことも明らかとなった¹⁴⁾。二つのグループの実験結果や結論が必ずしも一致しなかったこと、論文の形でなかなか発表されなかったこともあって、GPR55 が本当にカンナビノイド受容体であるのかどうか、内在性リガンドは何なのか、はっきりとしない混沌とした状態がしばらく続いていた。

4. GPR55 リガンドとしてのリゾホスファチジルイノシトール (LPI)

我々のグループは、GPR55 がカンナビノイド受容体であるとするならば、その内在性リガンドは、他のカンナビノイド受容体の場合と同様に 2-AG である可能性が高いとまず考えた。安定的に GPR55 を発現している HEK293 細胞を用い、様々な実験系で 2-AG の影響を調べたが、残念ながらこの仮説を支持する結果は得られなかった。そこで次に、ERK (p42/44 MAP キナーゼ) のリン酸化に及ぼす影響等を指標にして GPR55 の内在性リガンドのスクリーニングを開始した。ERK のリン酸化を選んだ理由は、感度が比較的鋭敏であること、様々な刺激によってリン酸化が引き起こされることなどである。様々なリガンド候補物質で細胞を刺激したが、結果は 2-AG の場合と同様、ネガティブであった。最後に、これまでほとんど注目されていなかった LPI を試しに加えてみた。その結果、GPR55 を発現させた細胞において、LPI が ERK のリン酸化を引き起こすことを見出した¹⁵⁾。同様の結果は、GPR55 を一過的に発現させた HEK293 細胞でも観察された。一方、ベクターのみをトランスフェクトした細胞においては、LPI による ERK のリン酸化は全く観察されなかった。次に、細胞内 Ca イオン濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、GPR55 を発現させた細胞に LPI を作用させると、細胞内 Ca イオン濃度が速やかに一過的に上昇することが分かった (図 2)。ERK の場合と同様、LPI はベクターのみをト

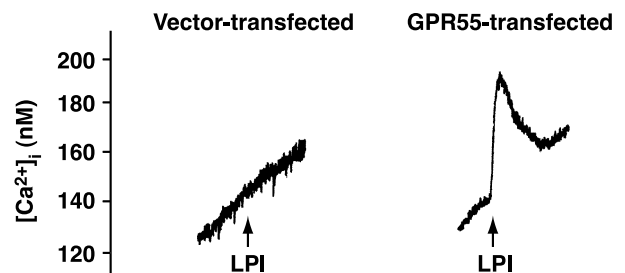


図 2 LPI の細胞内 Ca イオン濃度に及ぼす影響
ベクターのみをトランスフェクトした HEK293 細胞 (左) と GPR55 を発現させた HEK293 細胞 (右) に、LPI (2-アラキドノイル, 1 μ M) を加え、細胞内 Ca イオン濃度を測定した。

表2 ラット脳に存在する LPI の脂肪酸組成

Fatty acid	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	22:6	Total
nmol/g tissue	4.8±4.1	0.5±0.7	18.9±8.9	5.0±2.2	trace	8.3±6.0	trace	37.5±18.1
(%)	(12.8)	(1.3)	(50.5)	(13.3)	(—)	(22.1)	(—)	100

16:0, パルミチン酸; 16:1, パルミトレイン酸; 18:0, ステアリン酸; 18:1, オレイン酸+*cis*-バクセン酸; 18:2, リノール酸; 20:4, アラキドン酸; 22:6, ドコサヘキサエン酸. LPI量 (nmol/g tissue) は七つの検体の平均±SD, %は七つの検体の平均.

ランスフェクトした細胞には影響を与えなかった. LPI による GPR55 発現細胞の細胞内 Ca イオン濃度の上昇は, 細胞を LPI で前処理することにより消失したことから, 非特異的な作用によるものではなく, 受容体を介したものであると考えられた. このことは, GPR55 に対する siRNA で細胞を処理することにより, LPI の作用が強く抑制を受けたことから確認された. リゾホスファチジルコリン (LPC) などの各種リゾリン脂質や, CP55940 や HU210 などの合成カンナビノイド, 界面活性剤などには活性は全く認められなかった. リゾホスファチジン酸 (LPA) やスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は GPR55 を発現させた細胞の ERK のリン酸化を引き起こしたが, ベクターのみを発現した細胞でも全く同じ現象が観察されたことから, その作用は, この細胞に元々発現している LPA 受容体や S1P 受容体を介したものと考えられた. 一方, リゾホスファチジルグリセロール (LPG) には, 弱いながら GPR55 発現細胞の細胞内 Ca イオン濃度を上昇させる活性が認められた. この事実は, グリセロールがイノシトール環の半分の構造であることを考えると興味深い. なお, LPI をホスホリパーゼ C (PLC) やリゾホスホリパーゼで分解したときに生成する物質 (イノシトールリン酸や脂肪酸など) には, 活性は全く認められなかったことから, 活性は LPI 自体によるもので, 分解産物によるものである可能性は低いと考えられた. このほか, LPI は GPR55 を発現させた細胞の膜画分に対する [³⁵S] GTPγS の結合を濃度依存的に促進することも分かった. これらの結果は, GPR55 が LPI に対する特異的な受容体であることを強く示唆するものであった¹⁵⁾.

LPI が GPR55 を発現させた細胞において細胞内 Ca イオン濃度の上昇や ERK のリン酸化を引き起こすことは, 我々の報告のあと, いくつかのグループによって確認されている^{16~18)}. また, LPI が GPR55 リガンドとして作用することは, βアレスチンアッセイ^{18,19)}や, 受容体のインターナリゼーションによっても確認された^{17,18)}.

LPI が GPR55 の内在性リガンドであることが明らかになったので, 我々のグループは次に, 動物の体内に存在する LPI の分析を行った. まず, ラットの脳に含まれている LPI について調べた²⁰⁾. その結果, 37.5 nmol/g 組織の LPI が含まれていることが分かった. 分子種としてはステアリン酸 (18:0) を持つものが最も多く (50.5%), 次いでア

ラキドン酸 (20:4) を持つ分子種であった (22.1%) (表 2). 興味深いことに, グリセロール骨格の 2 位にアラキドン酸を持つ LPI は, 1 位にステアリン酸を持つ LPI より, はるかに強い生物活性を示した (10~20 倍). GPR55 の生理的なリガンドは, 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, 2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol, 2-AGPI) (図 1) である可能性が高い²⁰⁾.

GPR55 は G_{12/13} と共役していると考えられている. そこで, G_{12/13} の下流にある RhoA とその下流に及ぼす影響を調べた. その結果, GPR55 を発現している HEK293 細胞に LPI を作用させることにより, RhoA のリン酸化を引き起こされること, 細胞の形態変化 (rounding) (図 3) やストレスファイバーの形成が引き起こされること, p38 MAP キナーゼ及び転写因子である ATF-2 (activating transcription factor 2) のリン酸化²¹⁾が引き起こされることなどが明らかとなった. 細胞の形態変化やストレスファイバーの形成, p38 MAP キナーゼや ATF-2 のリン酸化は, RhoA の阻害剤である C3 toxin や RhoA の下流に位置する ROCK の阻害剤である Y-27632 によって強く阻害されたことから, RhoA を介したものと考えられた. 同様の結果は, 他のグループによっても確認されている¹⁷⁾. LPI に関しては, このほか, CREB (cAMP response element binding protein) のリン酸化²²⁾や, NFAT (nuclear factor of activated T-cells)^{17,22)}, NF-κB (nuclear factor-κB) の活性化²²⁾, GPR55 を発現させた MCF-7 細胞の遊走の促進²³⁾, 血管内皮細胞の過分極²⁴⁾などを引き起こすことが報告されている. LPI

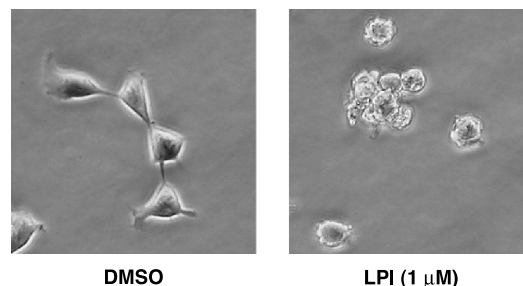


図3 LPIの細胞の形態に及ぼす影響

GPR55 を発現させた HEK293 細胞に, DMSO (ジメチルスルホキシド) (左) または DMSO に溶解した LPI (2-アラキドノイル, 1 μM) (右) を加え, 細胞の形態に及ぼす影響を観察した. 写真は DMSO や LPI を添加して 5 分後の細胞.

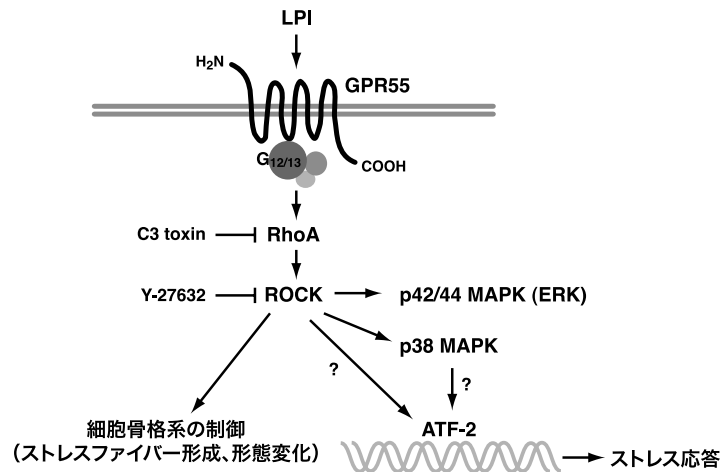


図4 GPR55発現細胞のLPIによる活性化機構

LPIは、G_{12/13}、RhoA、ROCK等を介して、ストレスファイバーの形成、形態変化、p38 MAPキナーゼやERK、転写因子であるATF-2のリン酸化などを引き起こす。

は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重要な関与をしている可能性がある(図4)。

5. GPR55の生理的役割

GPR55は脾臓、胸腺、精巣、小腸、脳などにおいて高いレベルで発現している^{21,25)}。この事実は、GPR55とその内在性リガンドであるLPIが、免疫組織において、あるいは消化管や神経組織において何らかの重要な役割を演じていることを強く示唆するものである。今日までに得られている情報はまだ極く限られたものでしかないが、我々は、ヒトBリンパ芽球であるIM-9細胞がGPR55を発現していること、LPIで刺激することによりp38 MAPキナーゼやATF-2のリン酸化を引き起こすことなどを見出している²¹⁾。Pietrらは、ミクログリアにGPR55が発現していること、LPIがGPR55を介してERKのリン酸化を引き起こすことなどを報告した²⁶⁾。一方、GPR55ノックアウトマウスに関しては、アジュバントで惹起した炎症局所におけるIL-4、IL-10、IFN- γ 、GM-CSFなどのレベルが上昇していることが明らかにされている²⁷⁾。メカニズムは不明であるが、GPR55はある種のサイトカインの産生調節に関与している可能性が高い。

GPR55は後根神経節(DRG)に比較的高いレベルで発現していることが知られており、痛覚の調節にも関与している可能性が指摘されている。GPR55のノックアウトマウスは、アジュバント注射や座骨神経部分結紮によって生じる機械的刺激に対する痛覚過敏が欠損している²⁷⁾。一方、ホットプレートテストなど痛覚に関する一般的な試験に関しては、GPR55ノックアウトマウスにおいて値がやや低下している傾向にあるが、正常マウスとの間の差はそ

れほど顕著ではない。GPR55は、痛覚の中でも炎症性や神経性の痛覚過敏に関与している可能性がある。

GPR55と神経系に関しては、このほか、LPIがDRGのニューロンにおいて細胞内Caイオン濃度の上昇を引き起こすこと¹⁶⁾、 Δ^9 -THCがGPR55およびKチャンネルであるKCNQ2、KCNQ3を発現させたHEK293細胞において、M電流を抑制することなどが報告されている¹⁶⁾。

GPR55は破骨細胞に高いレベルで発現しており、骨代謝に関与している可能性が指摘されている²⁸⁾。破骨細胞に発現しているGPR55 mRNAのレベルは、血中の単球のレベルの8倍に達する。LPIや合成カンナビノイドであるO-1602で破骨細胞を刺激すると、ERKのリン酸化やRhoAの活性化、アクチンの重合などが観察される。また、LPIやO-1602は骨髄マクロファージからの破骨細胞の生成を抑制した。これらのLPIやO-1602の効果は、GPR55ノックアウトマウスから得られた破骨細胞や骨髄マクロファージでは全く認められなかった。注目すべきことに、雄のGPR55ノックアウトマウスにおいて、海綿骨の骨量の増加が観察された²⁸⁾。これに対し、雌の場合、GPR55ノックアウトマウスと正常マウスの間で骨量に顕著な差は認められなかった。どうして雌雄の間でこのような違いが生じるのか、その理由は分かっていないが、内分泌系の影響等が考えられる。欠損マウスで骨量に変化が見られたことから、GPR55はヒトにおいても何らかの骨疾患に関与している可能性が考えられるが、これを示す知見は今のところ得られていない。

血管系にCB1受容体やCB2受容体とは異なる未知のカンナビノイド受容体が存在していること、アナンダミドやアブノーマルカンナビジオール(abn-CBD)はこの受容体を介して血圧を低下させることなどが、CB1/CB2ダブル

ノックアウトマウスに関する研究などから示唆されていた。このため、GPR55も、当初から、血圧調節因子としての可能性が注目された。しかし、アナンダミドやabn-CBDは、GPR55に対してアゴニストとして作用しないことから、GPR55が上記の新規のカンナビノイド受容体である可能性は低い。ところで、GPR55のノックアウトマウスの血圧に関しては、変化が見られないという報告と、高血圧を呈するという報告の二つがある^{29,30}。どうしてこのような違いが生じたのか、その理由は明らかではない。GPR55が血管内皮細胞に発現していることはすでに確認されている。GPR55とその内在性リガンドは、血圧の調節に関わる主要な因子ではないかもしれないが、場合によって影響を与えうるものである可能性がある。

GPR55は消化管、特に小腸に多く発現していることが知られている^{20,25}。GPR55とその内在性リガンドは、小腸における消化・吸収や、腸管免疫等において何らかの重要な役割を担っている可能性があるが、詳しいことは分かっていない。

GPR55は新規のカンナビノイド受容体候補として注目を集めた受容体である。 Δ^9 -THCは、 μ Mオーダーという高濃度でGPR55を発現させた細胞の細胞内Caイオン濃度を上昇させる。一方、合成カンナビノイドであるCP55940やカンナビノイド受容体アゴニストであるWIN55212-2には、GPR55アゴニストとしての作用は全く認められなかった。なお、前にも述べたように、合成カンナビノイドであるO-1602にはアゴニストとしての活性があるという報告²⁸があるが、これに否定的な報告もある^{20,22}。また、CP55940やカンナビジオール(CBD)に関しては、GPR55アンタゴニストとして作用するという報告もなされているが、正確なところは不明である。いずれにしても、仮にGPR55がカンナビノイド受容体として機能するとしても、CB1受容体やCB2受容体の場合とは異なり、高濃度の Δ^9 -THCが存在するなど特殊な状況のときに限られるであろう。

興味深いことに、CB1受容体のアンタゴニストであるAM251やSR141716Aには、GPR55アゴニストとしての活性が認められた^{18,19,22}。様々なアッセイ系で、AM251やSR141716AはLPIと同様の作用を示した。これまで、動物に投与した際に観察されたAM251やSR141716Aの様々な影響の中には、CB1受容体アンタゴニストとしての作用によるものだけでなく、GPR55アゴニストとしての作用によるものも含まれている可能性がある。

CB1受容体のアンタゴニストであるAM251やSR141716Aが、GPR55のアゴニストとして作用するのは不思議であるが、このことは内在性リガンドの構造が似ている(CB1受容体は2-AG、GPR55はアラキドン酸を2位に持つLPI(2-アラキドノイルLPI, 2-AGPI))とことと無関係

ではないだろう。

6. LPIのその他の生物活性

LPIが様々な生物活性を有していることは以前より知られていた。例えば、LPIは膵臓におけるインスリン分泌を促進し³¹、メサンギウム細胞においてERKのリン酸化を引き起こす³²。また、グルタミン酸によって引き起こされる小脳顆粒細胞の細胞死を抑制する³³。このほか、陽イオンチャンネルTRPV2(transient receptor potential V2)の活性化³⁴や、PC12細胞における顆粒放出³⁵、精子の先体反応³⁶を引き起こすことなども報告されている。しかし、これらの効果はLPCなど他のリズリン脂質でも観察されること、効果を発揮するには高濃度のLPIが必要なことなどから、非特異的な物理化学的影響によるものが含まれている可能性がある。一方、FalascaとCordaは、ラット甲状腺上皮由来細胞であるFRTL5細胞やKiKi細胞にLPIを加えると、イノシトールリン脂質の代謝亢進と細胞内Caイオン濃度の上昇、アラキドン酸の遊離、細胞増殖などが引き起こされることを報告した^{37,38}。これらのLPIの作用がLPI自身によるものなのか、LPIの分解産物によるものなのか不明であるが、彼らは受容体を介したものである可能性を指摘している。一方、Cordaらは、ホスファチジルイノシトール4-リン酸の代謝産物であるグリセロホスホイノシトール4-リン酸(GPI4P)が、繊維芽細胞等においてRac1等を介してアクチンの重合や膜のラフリングを起こすことを示した^{39,40}。注目すべきことに、GPI4Pの活性に比べると、グリセロホスホイノシトール(GPI)など他のGPI類の活性は弱いものでしかない。GPI4Pは、このほか、アデニル酸シクラーゼの阻害や、細胞増殖促進、Tリンパ球の遊走促進、がん細胞の浸潤能の低下などを引き起こす^{39,41}。GPI類を選択的に分解するホスホジエステラーゼ(GDE3)やトランスポーターが存在していることも考え合わせると、GPI4Pは、細胞内における新しい情報伝達分子である可能性がある。

LPIも細胞内情報伝達分子として機能しているという可能性が指摘されている。Bondarenkoらは、LPIが大コンダクタンスCaイオン活性化Kチャンネル(BK_{Ca})の活性を直接的に制御しうることを示した²⁴。LPIの作用は両方向性で、活性化の状態にあるBK_{Ca}は抑制し、不活性の状態にあるBK_{Ca}は活性化するという。ただ、LPIのこの効果が、LPIに特異的なものであるかどうかは明らかではない。

最近、LPIとある種のがんとの関係が注目されている。卵巣がんの患者の血中では、LPAやLPIのレベルが上昇している⁴²。血中のLPAやLPIは卵巣がんの診断のマーカーとして利用できる可能性がある。

注目すべきことに、GPR55はある種のがん細胞の増殖に関与していることが報告されている^{43,44}。がん組織で生

成したLPIの一部はオートクリンに作用して、がん細胞の増殖に促進的に作用している可能性がある。このようなことが、実際に生体内で起きているかどうか、今後、詳しく調べていく必要があるだろう。

LPIが生理活性脂質の一つであることは、最近の研究によって疑いようのないものになったが、LPIの生理的意義や作用メカニズム等は、まだ十分明らかになっていない。生理活性脂質としてのLPIの役割の解明は、今後の研究に待つところが大きい。

なお、市販のLPIの中には、微量のLPAやリゾホスファチジルセリンを含んでいるものがある。使用するLPIによっては、得られた実験データ（特に生物活性に関するもの）の解釈に注意を要する。

7. LPIの生成機構と分解機構

動物組織に存在するホスファチジルイノシトール (PI) は、主に1-ステアロイル-2-アラキドノイル分子種からなっている。GPR55の生理的なりガンドで、脳などで存在が確認されたアラキドン酸を2位に含むLPI (2-アラキドノイルLPI, 2-AGPI) は、PIがホスホリパーゼA₁ (PLA₁) の作用を受けた結果生じたものである可能性が高い。PIは大部分が細胞内に存在することから、この反応

には細胞内型PLA₁が関与していると考えられる。

Glomsetらは、ウシ精巣サイトゾルからホスファチジン酸 (PA) を良い基質とするPLA₁ (PA-preferring PLA₁) を精製、遺伝子クローニングを行い、PA-PLA₁として報告した^{45,46}。我々は、この酵素のLPI産生酵素としての役割を検討した⁴⁷。Glomsetらも指摘しているように、この酵素はPA以外に様々なリン脂質を基質とすることから、PA-PLA₁という名称は酵素の実際の性質を反映していない。そこで、この酵素を便宜的にNCBIのデータベースにおける登録名DDHD domain containing 1 (DDHD1) で表した。DDHD domainは、KIAA0725p/DDHD2、膜結合性PI輸送タンパク質、網膜変性症タンパク質などに保存されている機能未知のドメインである。

HEK293細胞およびヒトDDHD1を発現させたHEK293細胞を [³H] アラキドン酸で標識し、 [³H] LPIのレベルを比較したところ、DDHD1を発現させた細胞において、 [³H] LPIのレベルの上昇が認められた (図5)。次に、この細胞をイオノマイシンで刺激したところ、 [³H] LPIの著しい生成が観察された。特異的な阻害剤ではないが、DDHD1を不可逆的に阻害するメチルアラキドノイルフルオロリン酸 (MAFP) を添加したところ、 [³H] LPIの産生は阻害された。これらの結果から、DDHD1が [³H] LPI

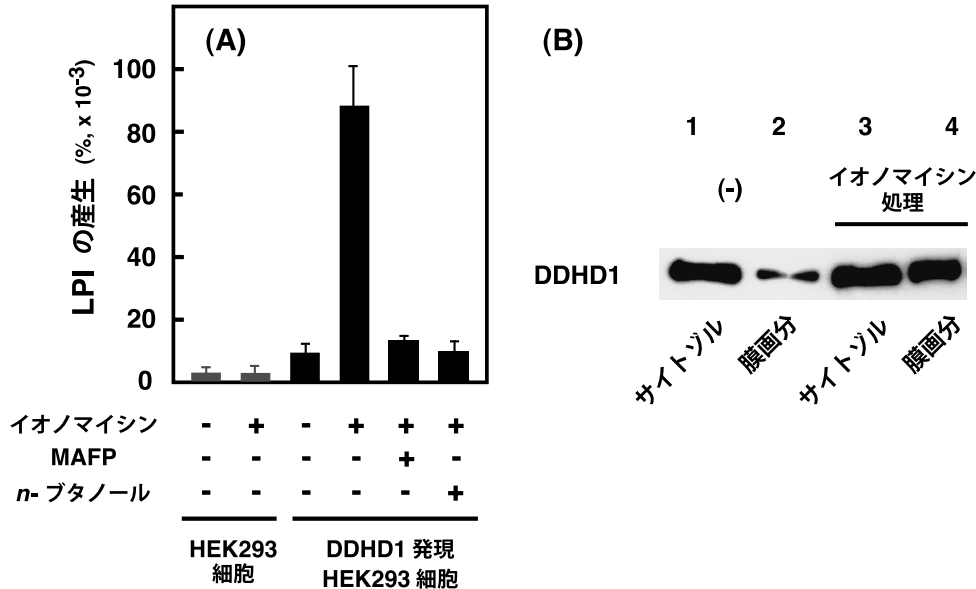


図5 DDHD1によるLPIの産生(A)とDDHD1の膜への移行(B)

(A) HEK293細胞またはDDHD1を発現させたHEK293細胞を [³H] アラキドン酸で標識した後、種々の条件で細胞を刺激し、生成した [³H] LPIを分析した。 [³H] LPIは細胞に取込まれた [³H] アラキドン酸に対する割合 (%) で表した。DDHD1を発現させると [³H] LPI産生が増加した。1 μMのイオノマイシンで刺激すると顕著な [³H] LPI産生増大が観察された。 [³H] LPI産生増大は、25 μMメチルアラキドノイルフルオロリン酸 (MAFP) や1% n-ブタノールで前処理することで阻害された。

(B) DDHD1を発現させたHEK293細胞をイオノマイシンで刺激した後、膜画分とサイトゾル画分を調製した。各画分に存在するDDHD1をウエスタンブロッティングにより調べた。1 μMのイオノマイシンで刺激すると、DDHD1の膜画分への移行が観察された。

の産生に関与すること, $[^3\text{H}]$ LPI の産生には DDHD1 の発現増加だけでは不十分で, DDHD1 が活性化されることが必要であることが分かった. DDHD1 は刺激に応答した LPI の産生に関与する可能性がある.

イオノマイシン刺激が, どのような機構によって DDHD1 を活性化するかを次に調べた. 当初, Ca 依存性のプロテインキナーゼによるリン酸化を介して DDHD1 が活性化されるのではないかと予想したが, DDHD1 が CK2 や ERK など複数のキナーゼによりリン酸化されること, リン酸化により PA に対する PLA_1 活性が減少すること⁴⁸⁾などが明らかになったことで, リン酸化によって PI の分解活性の上昇が起きている可能性は低いと考えられた.

我々は, イオノマイシン刺激によって生成する物質, 特に脂質が DDHD1 を活性化するのではないかという仮説のもとに研究を進めた. 実際, DDHD1 は可溶性の酵素で, PLA_1 として機能するためには基質の存在する膜に結合する必要がある. 細胞をイオノマイシンで刺激したところ, DDHD1 の一部が膜画分に確かに移行することが確認された (図 5). DDHD1 がリン脂質に結合するかどうかを, 精製酵素を用いて確認したところ, DDHD1 はホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) にはほとんど結合しないが, PA には強く結合することが

分かった. また, イオノマイシンで刺激した細胞においてホスホリパーゼ D (PLD) の活性が亢進していること, PLD の作用を阻害する n-ブタノールを培地に添加すると, イオノマイシンで刺激した細胞の $[^3\text{H}]$ LPI 生成亢進がほぼ完全に阻害されたことなどから, DDHD1 の活性化に PLD による PA の産生系が関与していることが分かった (図 5). 精製 DDHD1 に PA を添加したところ, PI に対する PLA_1 活性は顕著に上昇し, PA が DDHD1 を直接活性化することも明らかになった. なお, DDHD1 は PA に対する PLA_1 活性も持つため, PA が分解されて減少すると DDHD1 の活性化は減衰することになる.

以上の結果をまとめると次のようになる. 1) DDHD1 は PLD により膜で産生された PA に結合することにより膜に移行し, 活性化される. 2) 移行した DDHD1 は膜に存在する PI などのリン脂質を分解し, LPI などのリゾリン脂質を産生する. 3) DDHD1 自身が持つ PA 分解活性により PA が減少し, それに伴って活性は低下する (図 6). DDHD1 は脳を始めとする各臓器に広く発現しており, アラキドン酸を 2 位に持つ LPI の産生酵素として実際に機能している可能性が高い.

細胞内型 PLA_1 としては, DDHD1 (PA-PLA_1) のほか DDHD2 (KIAA0725p), p125 などが存在している. p125

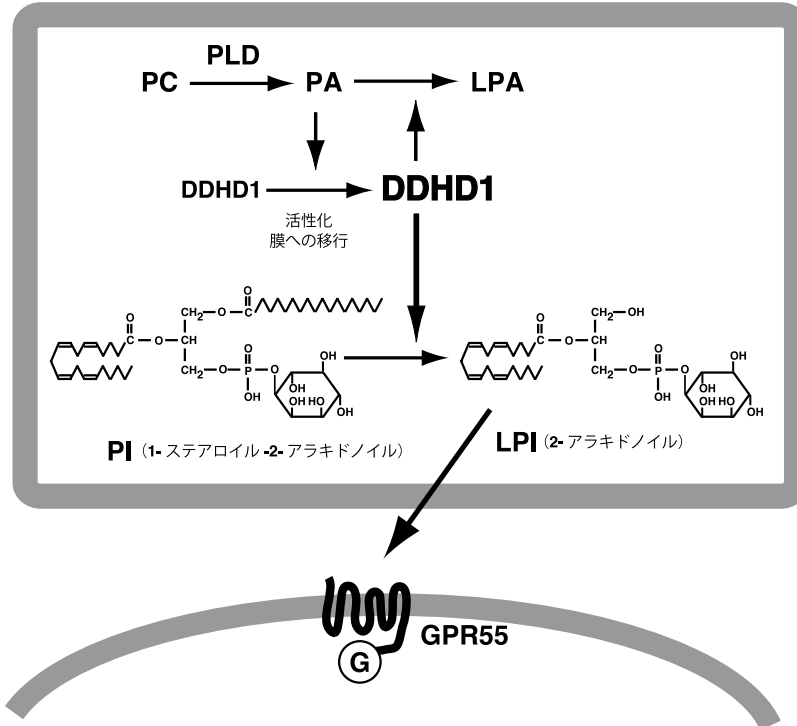


図 6 DDHD1 による LPI の産生とその調節機構

DDHD1 はサイトゾルに存在する酵素であるが, PLD の作用によって膜で産生された PA に結合することにより膜に移行し, 活性化される. 移行した DDHD1 は膜に存在する PI を分解し, 2-アラキドノイル LPI を産生する. 一方, DDHD1 自身が持つ PA 分解活性によって PA が減少し, それに伴って活性は低下する.

は Sec23p (Sar1p の GTPase-activating protein) に結合するタンパク質として同定され、ER exit site (小胞体搬出部位) に存在すること、小胞輸送を調節することなどが報告された^{49,50}。KIAA0725p/DDHD2 は p125 の類似タンパク質として同定され、ERGIC (小胞体-ゴルジ-中間領域) などの膜画分に存在することが知られている⁵¹。DDHD2 は *in vitro* で、PA, ホスファチジルセリン (PS), PC, PE, PI に対する PLA₁ 活性を示すことが確認されている^{51,52}。一方、p125 については、リパーゼのコンセンサス配列は保存されているものの、活性の存在は確認されていない⁴⁹。今後、これらの酵素が動物細胞における LPI の産生に、実際に関わっているかどうかを明らかにすることが必要である。

ラットの脳には、アラキドン酸を 2 位に持つ LPI (2-アラキドノイル LPI, 2-AGPI) のほかに、ステアリン酸を 1 位に持つ LPI (1-ステアロイル LPI) が多量に存在している。この事実は、ラットの脳には PI を基質とするホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) が存在することを示唆するものである。今のところ、PI に特異的な PLA₂ は知られていないが、Mariggio らは、細胞質 PLA₂α (cPLA₂α) が PI を段階的に分解し、1-アシル LPI, GPI を生成することを報告している⁵³。cPLA₂α は脳を始めとする様々な臓器に広く発現しているので、ステアリン酸を 1 位に持つ LPI の産生酵素として、動物の体内で実際に機能している可能性がある。

LPI の生成酵素に関しては、このようにいくつかの報告がなされているが、まだ十分な量の情報は蓄積していない。LPI の生成機構を完全に理解するためには、今後の更なる研究が必要である。

LPI は前述した cPLA₂α やリゾホスホリパーゼによって分解され、GPI と脂肪酸になる。一方、LPI はホスホリパーゼ C (PLC) によって分解され、モノアシルグリセロールとイノシトールリン酸になる。どちらが主要な分解経路であるのかは、今のところよく分かっていない。主要な分解経路は細胞や組織によって異なっている可能性がある。

ところで、ラットの脳には LPI に特異的な PLC が存在していることが報告されている^{54,55}。興味深いことに、この酵素は、シナプトソームの膜画分に局在しており、PI や PC, PE はほとんど分解しない (LPI の 1/50 程度)。基質となる LPI が、アラキドン酸を 2 位に持つ LPI (2-アラキドノイル LPI, 2-AGPI) の場合には、生成するのはカンナビノイド受容体の内在性リガンドである 2-AG とイノシトールリン酸である。従って、この酵素は LPI の分解酵素であるとともに、2-AG の生成酵素の一つでもあることになる。LPI 特異的 PLC は、別々の受容体に作用する二つの脂質メディエーターをリンクさせる重要な鍵酵素であり、その実体の分子レベルでの解明が待たれる。

8. おわりに

様々なリゾリン脂質の中で、強い生物活性を有するということが最初に報告されたのは LPA で、1970 年代後半のことである。LPA に関しては、これまでに数多くの研究がなされ、LPA が持つ多彩な生理作用・生物学的意義が次々と明らかにされてきた。SIP は 1990 年代の半ばに生理活性脂質であることが明らかにされたリゾリン脂質であるが、これまでの研究により、その生物学的重要性は揺るぎないものになっている。リゾホスファチジルセリンは、肥満細胞や好塩基球を活性化することが以前から知られていたが、最近、特異的な受容体が同定され、注目を集めている。LPC も、生理活性脂質である可能性がこれまでしばしば指摘されてきた。しかし、LPI が生理活性脂質として注目されることは最近までほとんどなかった。これは恐らく、PI などのイノシトールリン脂質は、PLA₂ や PLA₁ ではなく、主に PLC によって分解されると考えられてきたためであろう。実際、イノシトールリン脂質の PLC による分解産物とそれに由来する誘導体の中には、ジアシルグリセロールやイノシトール三リン酸、2-AG など、生理的に重要な物質がいくつも含まれている。しかし、PI などのイノシトールリン脂質の生理活性物質供給源としての役割には想像以上のものがあり、PLC による分解産物だけでなく、PLA₁ あるいは PLA₂ による分解産物にも、また別の生理機能・生物活性があったということになる。

LPI とその受容体に関する研究は始まったばかりであり、まだ多くの点が不明のまま残されている。例えば、LPI の最も主要な生理機能は何なのか、LPI はどのような時に産生され放出されるのか、GPR55 以外に LPI 受容体が存在しているのかなどは、今のところ明らかになっていない。LPI の生成機構や分解機構に関しても、まだよく分かっていない部分が多い。このように、今後検討しなければならない事柄は多々残されているが、始まって間もない研究テーマだけに、予想もしなかったことがこれから見つかるという可能性も十分あると思われる。脂質メディエーターとしての LPI とその受容体の全容が、それほど遠くない将来に解明されることを期待したい。

最後に、筆者らの帝京大学薬学部における共同研究者である和久敬蔵名誉教授、岸本成史教授、佐々木洋子博士、林 康広博士、大学院および卒研生の皆さんに深謝します。

文 献

- 1) Devane, W.A., Dysarz, F.A. III, Johnson, M.R., Melvin, L.S., & Howlett, A.C. (1988) *Mol. Pharmacol.*, 34, 605-613.
- 2) Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., &

- Bonner, T.I. (1990) *Nature*, **346**, 561–564.
- 3) Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998) *Trends Neurosci.*, **21**, 521–528.
 - 4) Munro, S., Thomas, K.L., & Abu-Shaar, M. (1993) *Nature*, **365**, 61–65.
 - 5) Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992) *Science*, **258**, 1946–1949.
 - 6) Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., & Waku, K. (2002) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**, 173–192.
 - 7) Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89–97.
 - 8) Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., & Vogel, Z. (1995) *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 83–90.
 - 9) Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K., Seki, C., Baba, N., & Ishima, Y. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 2794–2801.
 - 10) Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H., & Waku, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 605–612.
 - 11) Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., & Gokoh, M. (2006) *Prog. Lipid Res.*, **45**, 405–446.
 - 12) Brown, A.J. & Wise, A. (2001) GlaxoSmithKline. WO 0186305.
 - 13) Drmota, T., Greasley, P., & Groblewski, T. (2004) AstraZeneca. WO2004074844.
 - 14) Petitot, F., Donlan, M., & Michel, A. (2006) *Chem. Biol. Drug Des.*, **67**, 252–253.
 - 15) Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., & Sugiura, T. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 928–934.
 - 16) Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.Y., Lu, H.C., Hille, B., & Mackie, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 2699–2704.
 - 17) Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Ford, L.A., Ross, R.A., Waldhoer, M., & Irving, A.J. (2009) *FASEB J.*, **23**, 183–193.
 - 18) Kapur, A., Zhao, P., Sharir, H., Bai, Y., Caron, M.G., Barak, L.S., & Abood, M.E. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 29817–29827.
 - 19) Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F., Nguyen, D.G., Caldwell, J.S., & Chen, Y.A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 12328–12338.
 - 20) Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A., & Sugiura, T. (2009) *J. Biochem.*, **145**, 13–20.
 - 21) Oka, S., Kimura, S., Toshida, T., Ota, R., Yamashita, A., & Sugiura, T. (2010) *J. Biochem.*, **147**, 671–678.
 - 22) Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Schröder, R., Kargl, J.K., Platzer, W., Martini, L., Arthur, S., Penman, J., Whistler, J.L., Kostenis, E., Waldhoer, M., & Irving, A.J. (2010) *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 604–614.
 - 23) Ford, L.A., Roelofs, A.J., Anavi-Goffer, S., Mowat, L., Simpson, D.G., Irving, A.J., Rogers, M.J., Rajnicek, A.M., & Ross, R.A. (2010) *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 762–771.
 - 24) Bondarenko, A.I., Malli, R., & Graier, W.F. (2011) *Pflugers Arch.*, **461**, 177–189.
 - 25) Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P.J. (2007) *Br. J. Pharmacol.*, **152**, 1092–1101.
 - 26) Pietr, M., Kozela, E., Levy, R., Rimmerman, N., Lin, Y.H., Stella, N., Vogel, Z., & Juknat, A. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 2071–2076.
 - 27) Staton, P.C., Hatcher, J.P., Walker, D.J., Morrison, A.D., Shapland, E.M., Hughes, J.P., Chong, E., Mander, P.K., Green, P.J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H.C., Smith, J.C., Bailey, L.T., Wise, A., Brown, A.J., Richardson, J.C., & Chessell, I.P. (2008) *Pain*, **139**, 225–236.
 - 28) Whyte, L.S., Ryberg, E., Sims, N.A., Ridge, S.A., Mackie, K., Greasley, P.J., Ross, R.A., & Rogers, M.J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 16511–16516.
 - 29) Johns, D.G., Behm, D.J., Walker, D.J., Ao, Z., Shapland, E.M., Daniels, D.A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P.C., Green, P., Shabon, U., Bao, W., Aiyar, N., Yue, T.L., Brown, A.J., Morrison, A.D., & Douglas, S.A. (2007) *Br. J. Pharmacol.*, **152**, 825–831.
 - 30) Greasley, P., Astrand, A., Linblom, A., Sjoqvist, P., Hjorth, S., & Sjogren, S. (2008) 18th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Scotland.
 - 31) Metz, S.A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 720–727.
 - 32) Bassa, B.V., Roh, D.D., Vaziri, N.D., Kirschenbaum, M.A., & Kamanna, V.S. (1999) *Am. J. Physiol.*, **277**, F328–337.
 - 33) Blondeau, N., Lauritzen, I., Widmann, C., Lazdunski, M., & Heurteaux, C. (2002) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 821–834.
 - 34) Monet, M., Gkika, D., Lehen'kyi, V., Pourtier, A., Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Juvin, V., Rassendren, F., Humez, S., & Prevarsakaya, N. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 528–539.
 - 35) Ma, M.T., Yeo, J.F., Farooqui, A.A., Zhang, J., Chen, P., & Ong, W.Y. (2010) *J. Neural Transm.*, **117**, 301–308.
 - 36) Llanos, M.N., Morales, P., & Riffo, M.S. (1993) *J. Exp. Zool.*, **267**, 209–216.
 - 37) Falasca, M. & Corda, D. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **221**, 383–389.
 - 38) Falasca, M., Silletta, M.G., Carvelli, S., Di Francesco, A.L., Fusco, A., Ramakrishna, V., & Corda, D. (1995) *Oncogene*, **10**, 2113–2124.
 - 39) Corda, D., Zizza, P., Varone, A., Filippi, B.M., & Mariggiò, S. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3449–3467.
 - 40) Filippi, B.M., Mariggiò, S., Pulvirenti, T., & Corda, D. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 2311–2322.
 - 41) Corda, D., Iurisci, C., & Berrie, C.P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1582**, 52–69.
 - 42) Sutphen, R., Xu, Y., Wilbanks, G.D., Fiorica, J., Grendys, E.C. Jr, LaPolla, J.P., Arango, H., Hoffman, M.S., Martino, M., Wakeley, K., Griffin, D., Blanco, R.W., Cantor, A.B., Xiao, Y. J., & Krischer, J.P. (2004) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **13**, 1185–1191.
 - 43) Piñeiro, R., Maffucci, T., & Falasca, M. (2011) *Oncogene*, **30**, 142–152.
 - 44) Andradas, C., Caffarel, M.M., Pérez-Gómez, E., Salazar, M., Lorente, M., Velasco, G., Guzmán, M., & Sánchez, C. (2011) *Oncogene*, **30**, 245–252.
 - 45) Higgs, H.N. & Glomset, J.A. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 10874–10883.
 - 46) Higgs, H.N., Han, M.H., Johnson, G.E., & Glomset, J.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5468–5477.
 - 47) Yamashita, A., Kumazawa, T., Koga, H., Suzuki, N., Oka, S., & Sugiura, T. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**, 711–720.
 - 48) Han, M. H., Han, D.K., Aebersold, R.H., & Glomset, J.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27698–27708.

- 49) Tani, K., Mizoguchi, T., Iwamatsu, A., Hatsuzawa, K., & Tagaya, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20505–20512.
- 50) Shimoi, W., Ezawa, I., Nakamoto, K., Uesaki, S., Gabreski, G., Aridor, M., Yamamoto, A., Nagahama, M., Tagaya, M., & Tani, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 10141–10148.
- 51) Nakajima, K., Sonoda, H., Mizoguchi, T., Aoki, J., Arai, H., Nagahama, M., Tagaya, M., & Tani, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 11329–11335.
- 52) Morikawa, R., Tsujimoto, M., Arai, H., & Aoki, J. (2007) *Methods Enzymol.*, **434**, 1–13.
- 53) Mariggìò, S., Sebastià, J., Filippi, B.M., Iurisci, C., Volonté, C., Amadio, S., De Falco, V., Santoro, M., & Corda, D. (2006) *FASEB J.*, **20**, 2567–2569.
- 54) Ueda, H., Kobayashi, T., Kishimoto, M., Tsutsumi, T., & Okuyama, H. (1993) *J. Neurochem.*, **61**, 1874–1881.
- 55) Tsutsumi, T., Kobayashi, T., Ueda, H., Yamauchi, E., Watanabe, S., & Okuyama, H. (1994) *Neurochem. Res.*, **19**, 399–406.
-