

## 内在性カンナビノイド受容体リガンド—アナンダミドと 2-アラキドノイルグリセロール

和久 敬 蔵

**Endogenous Cannabinoid Receptor Ligands—Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol**

Keizo WAKU

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suarashi, Sagamiko,  
Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195, Japan*

(Received November 10, 2005)

Marijuana has been used as a traditional medicine and a pleasure-inducing drug for thousands of years around the world, especially in Asia.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, major psychoactive component of marijuana, has been shown to interact with specific cannabinoid receptors, thereby eliciting a variety of pharmacological responses in experimental animals and human. In 1990, the gene encoding a cannabinoid receptor (CB1) was cloned. This prompted the search for endogenous ligands. In 1992, *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) was isolated from pig brain as an endogenous ligand, and in 1995, 2-arachidonoylglycerol was isolated from rat brain and canine gut as another endogenous ligand. Both anandamide and 2-arachidonoylglycerol exhibit various cannabimimetic activities. The results of structure-activity relationship experiments, however, revealed that 2-arachidonoylglycerol, but not anandamide, is the intrinsic natural ligand for the cannabinoid receptor. 2-Arachidonoylglycerol is a degradation product of inositol phospholipids that links the function of the cannabinoid receptors with the enhanced inositol phospholipid turnover in stimulated tissues and cells. The possible physiological roles of cannabinoid receptors and 2-arachidonoylglycerol in various mammalian tissues such as those of the nervous and inflammatory cells are demonstrated. Furthermore, the future development of therapeutic drugs coming from this endocannabinoid system are discussed.

**Key words**—anandamide; arachidonic acid; 2-arachidonoylglycerol; cannabinoid; neuromodulator; inflammation

**1. はじめに**

マリファナは数千年の昔から医薬として、また、幻覚や多幸感を生じる物質として中央又は南アジアで用いられてきた。最近ではこのマリファナの乱用が世界的に問題になっていることは衆知の事実である。<sup>1)</sup> 幻覚を生じるマリファナの主成分は 1964 年に Mechoulum らにより  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Fig. 1) であることが示された。<sup>2)</sup>  $\Delta^9$ -THC を実験動物に投与すると、様々な薬理学的作用、例えば自発的運動量の低下、カタレプシー、体温低下、鎮痛、徐脈、免疫抑制などを引き起こす。これらの作用のメカニズムは長い間不明であったが、カンナビノイドに対する受容体が存在することが

1988 年 Devane ら<sup>3)</sup>によって放射標識した合成カンナビノイド ( $[^3\text{H}]$  CP55940) を用いた実験により明らかにされ、これらの薬理作用の多くは受容体を介するのではあると考えられるようになった。1990 年には Matsuda ら<sup>4)</sup>によりカンナビノイド受容体の 1 つである CB1 受容体が、1993 年には Munro ら<sup>5)</sup>により CB2 受容体がクローニングされ、その内在性リガンドの探索が行われた。1992 年には Devane ら<sup>6)</sup>によりブタの脳からアナンダミド (*N*-arachidonylethanolamine) (Fig. 1) を、1995 年には Sugiura ら<sup>7)</sup>がラット脳より、またほぼ同時に Mechoulum ら<sup>8)</sup>がイヌの小腸より 2-アラキドノイルグリセロール (2-arachidonoylglycerol) (Fig. 1) を内在性リガンドとして同定した。これら 2 つの化合物はカンナビノイド受容体に対して結合性を有しており、またカンナビノイド様作用を示すことから生体内でどちらが真の受容体リガンドであるか議論を呼んでいる。本稿では、これら 2 つの内在性カンナビノイド受容体リガンド(エンドカンナビノイド)

帝京大学薬学部 (〒199-0195 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1)

Present address: 3-36-8 Sengoku, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0011, Japan

e-mail: keiwaku@pharm.teikyo-u.ac.jp

本総説は、平成 16 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

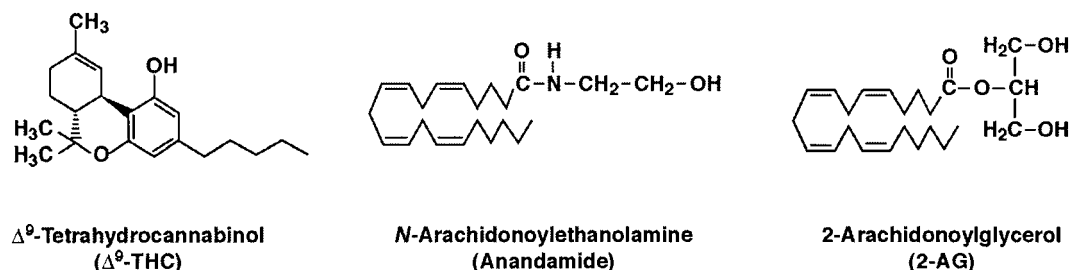


Fig. 1. Chemical Structures of  $\Delta^9$ -THC, Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol

を中心に、その作用、代謝、生理的役割、またその応用としての医薬品の開発について今まで知られている知見を紹介したい。

## 2. マリファナとカンナビノイド受容体

### 2-1. $\Delta^9$ テトラヒドロカンナビノール ( $\Delta^9$ -THC)

ヒトがマリファナを摂取すると意識が変化し、夢幻的陶酔状態となり、非現実感、多幸福感、空間及び時間感覚の歪曲など中枢神経に大きな影響がみられる。さらに薬理的には鎮痛、鎮吐、運動失調、頻脈、体温低下、眼圧低下、知覚変化、短期記憶の喪失など、様々な反応を引き起こす。1988年には $^3\text{H}$  CP55940 (合成カンナビノイド受容体アゴニスト)を用いて、ラット脳中のカンナビノイド受容体の分布が明らかにされた。特に淡蒼球、線条体、黒質、海馬、小脳の分子層、大脳皮質などで多く発現され、<sup>3)</sup> 運動、記憶、学習など、脳の高次機能に深く関わっていることが示された。また、特に強調すべきことは、この受容体の発現レベルは非常に高く、グルタミン酸受容体やGABA受容体とほぼ同程度の強さで発現していると言われている。

**2-2. CB1 受容体** 1990年にMatsudaら<sup>4)</sup>はラット脳cDNAライブラリーからのカンナビノイド受容体遺伝子(CB1)のクローニングを報告した。それまではカンナビノイドの作用が分子生物学的には明確ではなかったが、この発表以来カンナビノイドの研究は一気に進展した。CB1受容体は7回膜貫通、Gタンパク質共役型の受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)で、ヒトでは472個、ラットでは473個のアミノ酸からなっている。CB1受容体に共役しているGタンパク質はGo又はGiであり、リガンドが結合すると、アデニル酸シクラーゼ(adenylate cyclase)の阻害、電位依存性カルシウム( $\text{Ca}^{2+}$ )チャンネルの抑制、電位依存性カリウム( $\text{K}^+$ )チャンネルの活性化、MAPK

(mitogen-activated protein kinase)<sup>9)</sup>の上昇、海馬スライスのLTP(長期増強, long-term potentiation)の抑制<sup>10)</sup>などを引き起こす。CB1受容体は、シナプスではアデノシンA1受容体やGABA受容体と同様、主として前終末に存在しており、後に述べるように神経伝達物質(neurotransmitter)の放出を制御していると考えられている。CB1受容体ノックアウトマウス<sup>11)</sup>も作成されており、寿命が短く、運動量が低下し、カタレプシーの増加、痛覚の減少などが観察された。また、本受容体はLTD(長期抑制, long-term depression)にも関与している<sup>12)</sup>という報告もある。

なお、CB1受容体は脳以外にも精巣、輸精管、子宮、肺、小腸、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞など、様々な臓器、細胞で発現しており、 $\Delta^9$ -THCがその作用が脳に対するだけでなく、全身に及ぶものであることを考えるとこの分布とよく一致していると思われる。

**2-3. CB2 受容体** 1993年にはMunroら<sup>5)</sup>によりCB2受容体が前骨髄球性白血球HL-60細胞のcDNAライブラリーからクローニングされた。7回膜貫通でCB1と同様Go又はGiに共役し、360個のアミノ酸からなっておりCB1受容体とは44%の相同性を有するが膜貫通領域では68%の相同性がある。本受容体はCB1受容体と異なり、脾臓、扁桃腺、リンパ節に多く発現しており、さらにマクロファージ/単球、Bリンパ球、NK(natural killer)細胞、好酸球等の白血球系細胞に多く発現しており(T-リンパ球や好中球にはほとんど発現していない)、本受容体は免疫、炎症反応に関連するものと考えられている。CB2もCB1と同様、カンナビノイドと反応して種々の反応を引き起こすが、CB1受容体と異なり、研究の蓄積がまだまだ十分ではなく、これからの研究を待たねばならない。

### 3. 内在性カンナビノイド

**3-1. アナンドミドの発見**  $\Delta^9$ -THCは植物の一種である大麻に含まれる主要カンナビノイドであるが、動物の体内にはもともとこのような化合物は存在しない。1990年にCB1受容体がクローニングされたことにより内在性カンナビノイド受容体リガンドの存在が予想され、探索が行われた。1992年にはDevaneらによりアラキドン酸とエタノールアミンが酸アミド結合した物質である*N*-アラキドノイルエタノールアミン(アナンドミド)がブタ脳から単離された。<sup>6)</sup> アナンドミドとはサンスクリット語で至福を意味する“アナンド”にちなんだものである。アナンドミドはシナプトソームに存在するカンナビノイド受容体に強い結合性を持っており( $K_i = 52$  nM)、様々なカンナビノイド様作用を示す。*In vitro*の系では電気刺激した輸精管の収縮の抑制、アデニル酸シクラーゼの阻害、*N*型及び*P/Q*型電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルの阻害、 $K^+$ チャンネルの開口、MAPキナーゼの活性化、神経伝達物質遊離の抑制など、*in vivo*では「カンナビノイドの四徴(tetrad)」と呼ばれる自発運動の低下、痛み感受性の低下、体温低下、カタレプシー誘発などを引き起こす。

アナンドミドのアナログの構造活性相関はかなり詳しく調べられている。*N*-アシル部分については、飽和、monoenoic, dienoic 脂肪酸については活性は全く認められない。一方、trienoic, tetraenoic, pentaenoic, hexaenoic 脂肪酸についてはアナンドミドと同等、又は弱い活性が認められた。また、アラキドン酸以外の炭素数20のビスホモ- $\gamma$ -リノレン酸(20-3, n-6)、炭素数22のドコサテトラエン酸(22-4, n-4)にもアナンドミドとほぼ同様の活性が認められた。また、アナンドミドの*N*原子に隣接する*C*原子にメチル基を導入したメタンナミドにはアナンドミドよりも強い活性がある(後述)ことなどが明らかとなっている。<sup>13)</sup>

**3-2. アナンドミドの生合成と分解** アナンドミドの生合成機構としては、2つのルートが考えられている(Fig. 2)。1つは遊離のアラキドン酸とエタノールアミンが酵素的に縮合してできるルートで、<sup>14)</sup> ラット脳の場合、反応の至適pHは9、アラキドン酸やエタノールアミンに対するみかけの $K_m$ 値はそれぞれ153  $\mu$ M、135 mMと大きい値を示す<sup>15)</sup>

ことから、正常の生理的条件下ではアナンドミドは生成されないと考えられる。現在では、アナンドミドは後述する分解酵素である脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH, fatty acid amide hydrolase)の逆反応により生成すると考えられている。<sup>16)</sup> 現在生合成主要ルートと考えられているのはリン脂質の1位に結合しているアラキドン酸がホスファチジルエタノールアミン(PE)のアミノ基に転位していった*N*-アラキドノイルPEが生成し、これがさらにホスホジエステラーゼの作用によって分解を受け、アナンドミドとホスファチジン酸を生成するというもので、既にSchmidらによって*N*-パルミトイルエタノールアミンや*N*-オレオイルエタノールアミンの生成機構として報告<sup>17)</sup>されていたものである。われわれはラットの脳や精巣でこのルートの反応を触媒する基質や酵素活性が確かに存在することを示し、アナンドミドがこれらの臓器で生合成されることを証明した。<sup>15,18)</sup> しかし、通常、グリセロリン脂質の1位にはアラキドン酸はほとんど存在していない(ラット脳のホスファチジルコリン(PC)の1位にはわずか0.3%のアラキドン酸が存在するのみである)ことから、このルートからは*N*-パルミトイルエタノールアミンや*N*-オレオイルエタノールアミンに比べて、アナンドミドは極めて生成されにくい状況であると考えられる。最近、Okamotoら<sup>19)</sup>はこのホスホリパーゼD(PLD)型ホスホジエステラーゼ(NAPE-PLD)をラット心臓膜画分から精製し、その精製酵素の部分アミノ酸配列を決定し、データベースを利用してマウス、ラット、ヒトのNAPE-PLDのcDNAクローニングに成功した。その結果、NAPE-PLDの1次構造は既知のPLDとはホモロジーを示さず、 $\beta$ -lactamase fold familyに属することが明らかとなった。基質特異性をみると、ホスファチジルコリン(PC)やPEとは反応せず、また、*N*-アシルPEの*N*-アシル基の脂肪酸種が違っていてもほぼ同じ速度で加水分解が行われることが分かった。後述するようにラット脳中の*N*-アシルエタノールアミンのうち、アナンドミド含量はわずか0.7%<sup>18)</sup>であり、16:0, 18:0, 18:1がほとんどであってみれば、NAPE-PLDの基質特異性と考え合わせ、アナンドミドの生合成ルートは現在のところあまり合理的ではないとしか考えられない。逆に本酵素が新しいタンパクであったことを考える

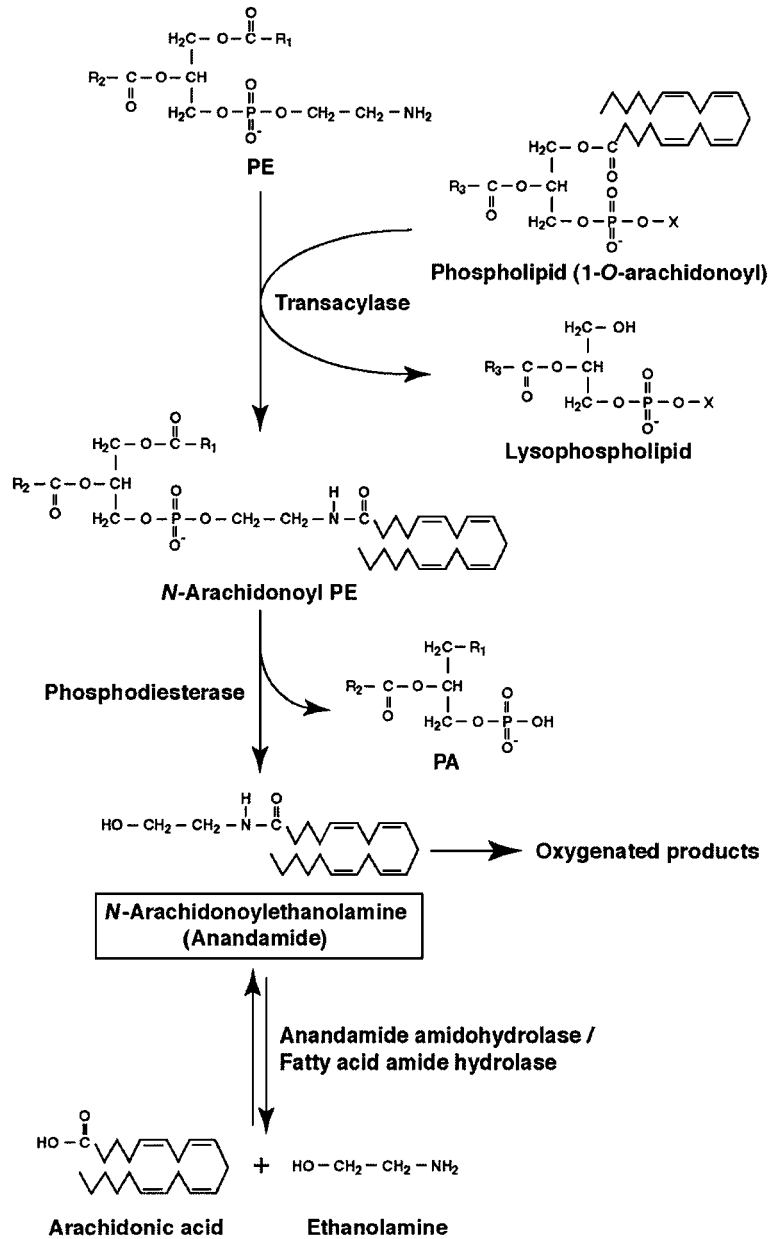


Fig. 2. Pathways for the Biosynthesis and Degradation of Anandamide

と、例えば *N*-パルミトイルエタノールアミンが生体内でなにか重要な役割を演じている可能性がある。

アナンダミドを分解する酵素活性は、前述した FAAH である。この酵素は種々の脂肪酸を *N*-アシル部分に持つ *N*-アシルエタノールアミンを分解するが、特にアナンダミドを効率よく分解する。酵素活性は肝臓、脳を始め、ほぼ全身に発現している膜酵素で、エステラーゼ活性を有し、2-アラキドノイルグリセロールを始めとする脂肪酸エステルを加水分解する。<sup>20)</sup> 至適 pH はアルカリ性で活性セリン残基が同定されている。1996 年には本酵素遺伝子

がクローニングされ、<sup>21)</sup> さらに 2001 年にはノックアウトマウスも作成され、<sup>22)</sup> 種々の実験に供されている。後述するように、本酵素欠損マウスでは脳中のアナンダミドが 15 倍に増加し、痛覚も低下し、また体外からアナンダミドを投与すると様々な薬理作用を示すので、本酵素はアナンダミド代謝において重要な働きをしていると考えられる。Ueda ら<sup>23,24)</sup> はもう 1 つの *N*-アシルエタノールアミンを分解する脂肪酸アミド加水分解酵素を見出し、クローニングを行った。本酵素は酸性側に至適 pH を持ち、リゾゾーム酵素の 1 つと考えられている。マ

クロファージで強い活性を示し、肺、脾臓などで高い比活性を示す。

**3-3. 組織中に存在するアナンダミド量** われわれはアナンダミドを含む各種 *N*-アシルエタノールアミンをアンスロイル誘導体に変換し、逆相 HPLC (high performance liquid chromatography) で分析することに成功し、ラット脳や精巢のアナンダミド量を分析した。<sup>15,18)</sup> ラット脳に含まれるアナンダミド量は 4.3 pmol/g 組織で、全 *N*-アシルエタノールアミン中の 0.7%、精巢の場合は 6.0 pmol/g 組織で、4.9%であった。*N*-アシルエタノールアミンの *N*-アシル部分の脂肪酸組成は、同じ組織に存在する *N*-アシル PE の *N*-アシル部分の脂肪酸組成や、PC の 1 位の脂肪酸組成と比較的よく似ていることから (Table 1)、アナンダミドを含む各種 *N*-アシルエタノールアミンは、主として前述した 2 つのルートのうち 2 番目のルート、すなわち、*N*-アシル PE を中間体として生成された可能性が高い。その当時の多くの研究者が脳のアナンダミドの分析を行っているが、多くは 4—30 pmol/g 組織と低い値を示している。ちなみに、アナンダミドが最初に発見されたブタの脳中の濃度は 380 pmol/g (0.13 mg/kg) とされ、<sup>6)</sup> かなり高い数値であったが、その後、アナンダミドの脳内濃度は組織を室温で放置すると著しく上昇する<sup>25)</sup> ことが報告され、その理由について議論されてきた。最近、前述の FAAH のノックアウトマウスが作成され、本マウ

スではこの上昇が少ないことから、以下のことが提唱されている。<sup>16)</sup> すなわち、組織の室温放置により細胞内のカルシウムが上昇し、PLD が活性化され、遊離エタノールアミン量が増加しアラキドン酸の多いリン脂質又はトリグリセリドに働いて、いわゆるアミノリシス (FAAH の逆反応) が起こってアナンダミド濃度が上昇するというものである。

#### 3-4. 2-アラキドノイルグリセロールの発見

前述したように、アナンダミドはカンナビノイド受容体に対して強い結合性 ( $K_i=99$  nM, エステラーゼ阻害薬の DFP, Diisopropyl fluorophosphate, 存在下) を有し、また種々のカンナビノイド様作用を示すが、以下の点でわれわれは疑問を持っていた。

1) 生体内濃度が非常に低い (ラット脳では 4 pmol/g)。2) 生合成ルートに前述したように合理的でない (合成には PC の 1 位にわずかに存在しているアラキドン酸を利用する)。3) アナンダミドはカンナビノイド受容体だけでなく唐辛子の成分であるカプサイシンの受容体であるパニロイド受容体にも作用する。4) 後に述べるようにカンナビノイド受容体 (CB1) に対し、部分作動薬としか作用せず、また CB2 にはほとんど作用しない。そこでわれわれはアナンダミド以外にリガンドとして作用するものがあるのではないかと考え検討を行った。これ以前に当研究室の杉浦助教授 (当時) が米国テキサス大学サン・アントニオ校の D.J. Hanahan 教授 (血小板活性化因子 (PAF) 発見者の 1 人) の許へ留学し、

Table 1. Fatty Acid Composition of *N*-Acylethanolamine and *N*-Acyl Moiety of *N*-AcylPtdEtn from Rat Brain

Acyl moiety	Composition of <i>N</i> -Acylethanolamine		<i>N</i> -AcylPtdEtn	
	pmol/g wet mass	%	pmol/g wet mass	%
14 : 0	6.3 ± 1.4	1.1 ± 0.2	54.6 ± 14.7	0.5 ± 0.1
16 : 0	302.5 ± 33.3	50.6 ± 5.6	8407.9 ± 2051.2	69.6 ± 17.0
16 : 1n-7	5.5 ± 1.4	0.9 ± 0.2	154.9 ± 43.1	1.3 ± 0.4
18 : 0	1156.7 ± 27.7	19.4 ± 4.6	1475.6 ± 399.3	12.2 ± 3.3
18 : 1n-7	75.2 ± 13.3	12.6 ± 2.2	974.4 ± 301.0	8.1 ± 2.5
18 : 1n-9	73.1 ± 44.1	12.2 ± 7.4	823.5 ± 318.4	6.8 ± 2.6
18 : 2n-6	4.6 ± 1.4	0.8 ± 0.2	93.3 ± 38.0	0.8 ± 0.3
20 : 4n-6	4.3 ± 1.1	0.7 ± 0.2	50.2 ± 27.8	0.4 ± 0.2
22 : 6n-3	6.1 ± 0.6	1.0 ± 0.1	25.8 ± 12.8	0.2 ± 0.1
Others	4.1 ± 2.4	0.7 ± 0.4	11.6 ± 10.0	0.1 ± 0.1
Total	597.3 ± 104.4	100	12071.8 ± 3143.4	100

*N*-Acylethanolamine and *N*-acylPtdEtn were obtained from rat brains. The data are the means of four determinations.

リゾホスファチジン酸 (LPA) と *N*-アシルエタノールアミンリン酸が LPA 受容体に作用して細胞応答を引き起こす<sup>26)</sup>ことを明らかにしていた。われわれはこの点に着目し、アナンダミドのアミンの代わりにグリセロール骨格を有する 2-アラキドノイルグリセロールにも、アナンダミドと同様カンナビノイド受容体リガンドとしての活性があるのではないかと考え、検討を行った。その結果、2-アラキドノイルグリセロールにもやや弱いながらもシナプトソームのカンナビノイド受容体に対し結合活性があり (2.4  $\mu$ M, DFP 存在下)、また、ラット脳にはアナンダミドの約 800 倍 (ラット脳で 3.25 nmol/g) という高いレベルのアラキドノイルグリセロールが存在し、その 71% は 2-アシル体であることが分かった。<sup>7)</sup>

われわれの報告とほぼ同時期にイスラエルの Mechoulam ら<sup>8)</sup>も 2-アラキドノイルグリセロールをイヌ小腸から単離し、2-アラキドノイルグリセロールが CB1 及び CB2 受容体に対する結合活性を有し、電気刺激したマウス輸精管の収縮を抑制し、アデニル酸シクラーゼの活性を阻害することなどを報告した。この 2-アラキドノイルグリセロールに関する 2 つの報告は 1995 年の国際神経化学会 (日本で行われた) の脂質に関するサテライトミーティング (筆者主催) で同時に発表され話題となった。後に Mechoulam が、地球の裏側でほとんど同じ発見がなされ、そのときまでそれぞれ自国では発表していたのにお互いに知らないとは、と述べていた。

2-アラキドノイルグリセロールとカンナビノイドは一見立体的に関係がないように思われたが、当時三共株式会社の平岡研究所長にお願いしてそれぞれのコンピューターグラフィックスを作成して頂き、それらの結果から両化合物は立体的に類似していることが判明した。われわれはさらに 2-アラキドノイルグリセロールが培養神経系細胞である neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を、速やかに一過的に上昇させることを見出した (この発見も幸運なことにこの neuroblastoma 細胞が maturation しておらず、 $Ca^{2+}$  チャンネルが形成されてないために細胞内部のわずかの  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を測定できたものである)。ちなみにテオフィリンやプロスタグランジン  $E_1$  等で maturation を起こさせると  $Ca^{2+}$  の上昇の

測定はできなくなる。この細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇がカンナビノイドによって生じていることはカンナビノイド受容体アゴニストである WIN55212-2 で認められ、カンナビノイド受容体アゴニストとして活性のない WIN55212-3 (WIN55212-2 の立体異性体) では活性がないことから明らかである (Fig. 3)。2-アラキドノイルグリセロールによって引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は、CB1 特異的アンタゴニストである SR141617A で完全に抑えられることから、CB1 受容体依存的であり (Fig. 3)、また pertussis toxin で阻害されること<sup>4)</sup>から G タンパク質依存的であることが明らかである。非常に興味あることに、この  $Ca^{2+}$  濃度の上昇はテトラヒドロカンナビノールやアナンダミドでは 2-アラキドノイルグリセロールに比べて弱く (Fig. 4)、2-アラキドノイルグリセロールが full agonist (完全作動薬) として働くのに反し、この 2 つの化合物は部分アゴニスト (partial agonist) としてのみ作用している

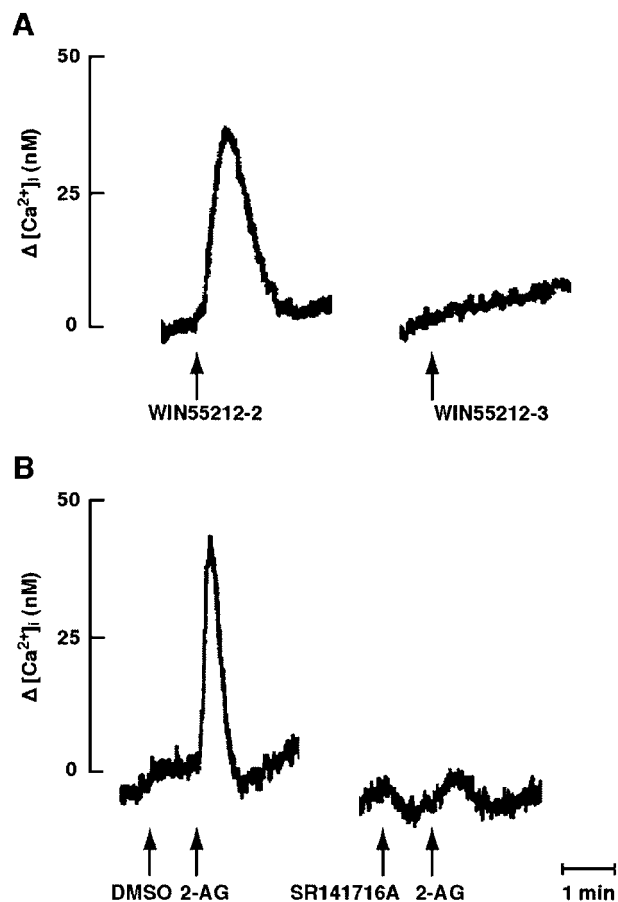


Fig. 3. Effects of WIN 55212-2 and 2-AG on  $[Ca^{2+}]_i$  in NG108-15 Cells, which Express the CB1 Receptor

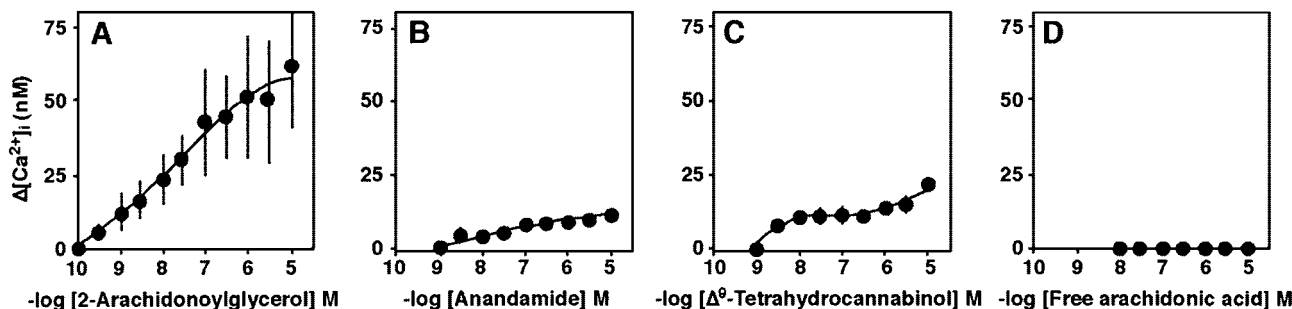


Fig. 4. Effects of 2-AG (A), Anandamide (B),  $\Delta^9$ -THC (C) and Arachidonic Acid (D) on  $[Ca^{2+}]_i$  in NG108-15 Cells, which Express the CB1 Receptor

Table 2. Structural Requirements for the CB1 Receptor

Acyl moiety	20 : 4 (n-6) $\geq$ 20 : 3 (n-9) $>$ 20 : 5 (n-3) > 20 : 3 (n-6) $>$ 20 : 3 (n-3) = 22 : 4 (n-6)
Bond	Ester $>$ ether $>$ amide
Backbone	Glycerol $>$ ethyleneglycol $\geq$ 1,3-propanediol
Position	2-isomer $>$ 1 (3)-isomer

ことが明らかとなった。また遊離のアラキドン酸は全く反応せず、2-アラキドノイルグリセロールの分解産物は関与していないことが分かる。また、2-アラキドノイルグリセロールに関する構造特異性について Table 2 に示した。まず、2-アラキドノイルグリセロールのアシル部分についてであるが、種々の脂肪酸のうち炭素数 16—18 は全く反応しない。炭素数 22 もほとんど反応せず、炭素数 20 が必須であることが分かる。二重結合はアラキドン酸の 5, 8, 11 が必須であり、14 は必須でないことが分かる。次に、アラキドン酸の結合形式であるが、エステル型が最良でエーテル型は活性は 1/10 程度である。アミド結合は活性が弱い。しかし、エーテル型は生体内で加水分解されないため、アラキドン酸のグリセロールの結合位置を決めるのに有用な手段となり、2 位結合型は 1 位結合型の 10 倍活性が強いことが証明された。また、エーテル型は生体内で安定であるため、2-アラキドノイルグリセロールの医薬品としての応用を考えると有用である。グリセロール骨格については、類似構造のプロパンジオールやエチレンジオールでは活性が低くグリセロール骨格が最もよい。結論として 2-アラキドノイルグリセロールは種々の類似構造物質の中で最良のものであり、その構造が受容体によって厳密に認識されており、CB1 受容体の真のリガンドである

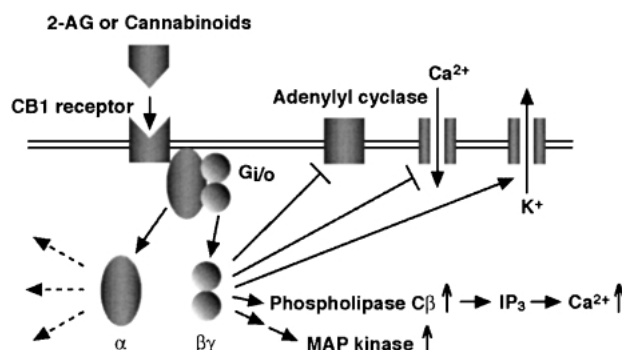


Fig. 5. Schematic Illustration of the Mechanism Underlying the Rapid Elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  Induced by 2-AG or Other Cannabinoids

ことが証明された。

2-アラキドノイルグリセロールによる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の一過的上昇の機構については、恐らく G タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニット及びホスホリパーゼ  $C\beta$  (phospholipase  $C\beta$ ;  $PLC\beta$ ) を介する細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  動員系が関与していると考えている (Fig. 5)。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の一過的上昇という現象自体の生理的な意義はまだ不明の点があるが、簡便かつ迅速に活性を測定できることから、この系はカンナビノイド受容体アゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニングに極めて有用と思われる。

### 3-5. 2-アラキドノイルグリセロールの代謝機構

2-アラキドノイルグリセロールは様々な細胞で比較的高いレベル (nmol/g 組織) で存在し、かつ細胞刺激により 2-アラキドノイルグリセロールのレベルは上昇すること、また新しく合成された 2-アラキドノイルグリセロールはかなりの量が細胞から流出することが分かっている。<sup>27)</sup> これらの現象は、刺激された細胞から流出する 2-アラキドノイルグリセロールによる細胞間の情報伝達に適していると

思われる。それではこの 2-アラキドノイルグリセロールはどのようにして細胞内で生合成されるのであろうか。

われわれリン脂質関係の研究に携わってきた研究者は細胞が刺激された際に phosphatidylinositol (PI) 代謝回転 (いわゆる PI turn over) が昂進することを観察してきた。例えば, Prescott と Majerus<sup>28)</sup> は血小板を活性化した際に phospholipase C 活性化に伴って PI 代謝が亢進し, 生じた diacylglycerol (DG) がさらに DG lipase により, アラキドン酸を多量に含むモノアシルグリセロールを生じることを報告している (ほ乳類では不思議なことに PI の 2 位にはアラキドン酸を高い割合で含んでいる)。Prescott らは当時, 2-アラキドノイルグリセロールの生理活性については特に注目していなかったが, その主な生合成ルートは観察していたことになる。われわれはこの 2-アラキドノイルグリセロールがイノシトールリン脂質から phospholipase C と DG lipase の働きにより, 又は phospholipase A<sub>1</sub> と phospholipase C の働きにより合成されることを提案している (Fig. 6)。第 1 のルートについては Stella ら<sup>10)</sup> も培養神経細胞においてイオノマイシンによる 2-アラキドノイルグリセロールの生成がこのルートで行われることを報告している。われわれもラット脳ホモジェネートを Ca<sup>2+</sup> で

刺激しても, またシナプトゾームで脱分極による 2-アラキドノイルグリセロールの生成にもこのルートが大切であることを確認している。

最近, Bisogno ら<sup>29)</sup> は 2003 年にこの diacylglycerol lipase の cDNA をクローニングした。相同性はあるが長さの異なる 2 種類のアイソザイム (DAGL $\alpha$  と  $\beta$ ) が存在し, ともに活性セリン残基を有し, 脳など種々の組織に分布する。本酵素はジアシルグリセロールの sn-1 位の脂肪酸を選択的に加水分解するので, アラキドン酸が豊富な 2-アシルグリセロールが生成する。

2-アラキドノイルグリセロール生成の第 2 のルートは, PI から phospholipase A<sub>1</sub> により生じた lysoPI の lysoPI 特異的な phospholipase C によるものである。Tsutsumi ら<sup>30)</sup> が示すように, このシナプトゾーム中の lysoPI に特異的な phospholipase C は他のイノシトールリン脂質に作用する phospholipase C とは異なっており, 2-アラキドノイルグリセロールのシナプトゾームにおける生成に関与している可能性が高い。上の 2 つのルート以外にも 2-アラキドノイル LPA<sup>31)</sup> や 2-アラキドノイル PA<sup>32)</sup> から 2-アラキドノイルグリセロールが生成される可能性が提唱されている。これら 2-アラキドノイルグリセロール生合成ルートは多く考えられているが, 組織や細胞の種類によって異なっている

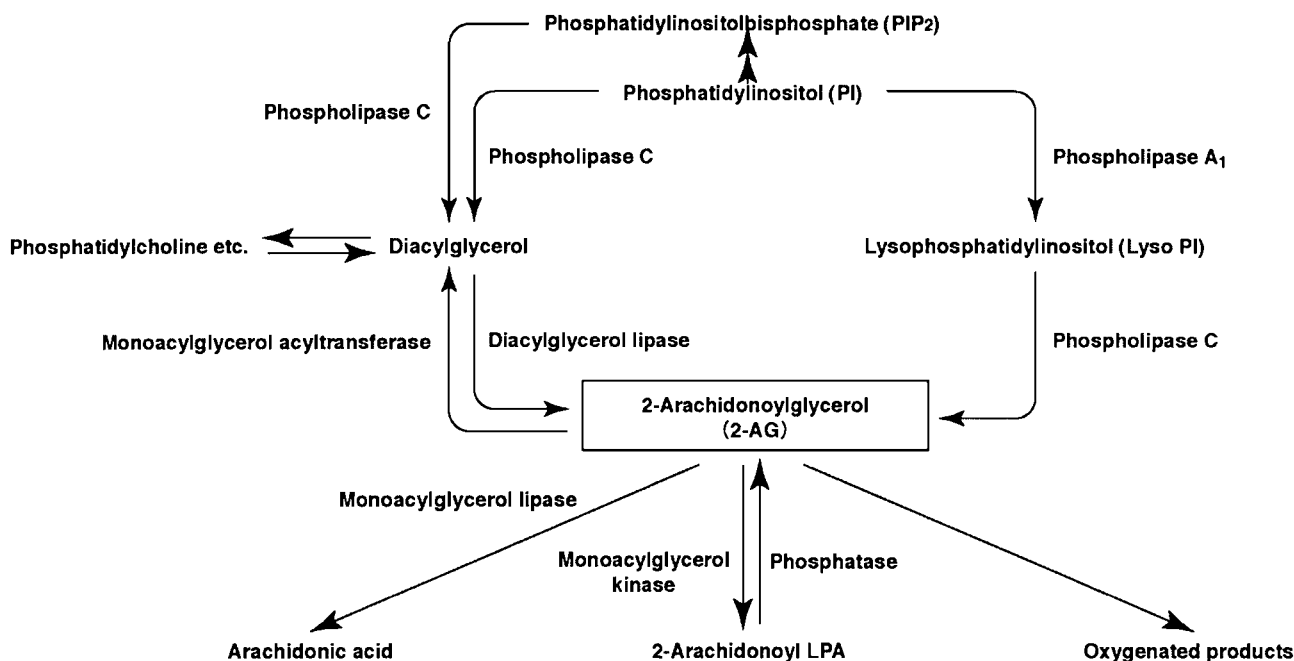


Fig. 6. Pathways for the Biosynthesis and Degradation of 2-AG



ことが考えられ、これからの研究に待たねばならない (Fig. 6).

2-アラキドノイルグリセロールのアラキドン酸とグリセロールへの酵素的加水分解については主としてモノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) が担っていると考えられる.<sup>33)</sup> MAGL はもともとトリアシルグリセロールの分解過程で生じるモノアシルグリセロールを分解する酵素として研究され、cDNA クローニングも報告されている.<sup>34)</sup> なお、モノアシルグリセロールを分解する酵素としては、アナンダミドアミドヒドロラーゼ/脂肪酸アミドアミドヒドロラーゼの存在が報告されているが<sup>35)</sup> その貢献度は明らかではない。

2-アラキドノイルグリセロールのエーテル結合型アナログは2-アラキドノイルグリセロールと同じ生理活性を有している (アゴニストとしての活性はエステル結合型の10%) 上に、生体内で分解されにくいことから、*in vivo* での2-アラキドノイルグリセロールの効力測定の実験研究に好都合である。Hanus ら<sup>36)</sup> は2-アラキドノイルグリセロールのエーテル型がブタの脳に存在していると報告している (Hanus らは *noladin ether* と命名) がほ乳動物中にグリセロールの2位にエーテル結合を有するものはみつかっておらず、<sup>37)</sup> また実際にわれわれが行った実験でもラットやブタの脳から2-アラキドノイルグリセロールのエーテル型のもの検出できなかったことから、Hanus らの報告は再検討が必要であると結論した。<sup>38)</sup>

#### 4. CB1 受容体とその内在性リガンドの生理的意義

4-1. アナンダミド アナンダミドは最初に発見された内在性カンナビノイド受容体リガンドであり、様々なカンナビノイド様作用が観察される。しかしながら、アナンダミドが受容体本来のリガンドと考えるには前述したようにいくつかの矛盾点があり、例えば、組織中のアナンダミドの量が非常に低い、効率よい生合成ルートが見い出されていない、 $\Delta^9$ -THC と同様、アナンダミドも部分作動薬としてのみ作用する、CB2 受容体にはほとんど作用しない、他の受容体、例えばバニロイド受容体のリガンドでもあることなどである。これらのことを考え合わせるとアナンダミドがカンナビノイド受容体本来のリガンドと考えるのは無理があるのではなからう

か。しかしながら、アナンダミドにカンナビノイド様作用があることは事実であり、上述の種々の問題点についてはさらに研究が必要である。

4-2. 2-アラキドノイルグリセロール アナンダミドと異なり、2-アラキドノイルグリセロールはカンナビノイド CB1 受容体や CB2 受容体に対し、完全作動薬として作用する。さらに、2-アラキドノイルグリセロールは細胞刺激の際に速やかに生成され、細胞外に遊離されて他の細胞に作用を及ぼす。またアナンダミドと異なり、バニロイド受容体に作用しない。これらのことから2-アラキドノイルグリセロールはカンナビノイド受容体の真のリガンドであると考えられる。

それでは2-アラキドノイルグリセロールの生理的役割はなんだろうか。2-アラキドノイルグリセロールは生体内において  $\Delta^9$ -THC が示すような陶酔感、幻覚、時間感覚・空間感覚の混乱、視覚・聴覚の鋭敏化などを生じることはないと考えられる。2-アラキドノイルグリセロールはカンナビノイド受容体発現細胞のアデニル酸シクラーゼを阻害し、サイクリック AMP を低下させる。また、2-アラキドノイルグリセロールは分化した NG108-15 細胞の脱分極に伴う細胞内  $Ca^{2+}$  イオン濃度の上昇を抑制し、<sup>39)</sup> またラット海馬スライスでの長期増強 (LTP) を抑制する。このほか、電気刺激したマウス精管の収縮の抑制や、体温低下、自発運動量の低下などが報告されている。<sup>8)</sup> また、視床下部における食欲の調節において、2-アラキドノイルグリセロールなどの内在性カンナビノイド受容体リガンドが関与している<sup>40)</sup> と言われており、肥満との関係が注目されている。

2-アラキドノイルグリセロールの生理活性は上述したように多岐に渡るが、われわれはさらに大きな生理的役割を想定した。それは2-アラキドノイルグリセロールが受容体を介してシナプス伝達に抑制的に働くことと、神経が興奮した際にイノシトールリン脂質などのリン脂質代謝が亢進して2-アラキドノイルグリセロールが生成されることの2つの現象を結び付け、次のような生理学的機構を1998年に世界に先駆けて提案した。<sup>41)</sup> 神経が興奮して脱分極・神経伝達物質であるグルタミン酸の放出などが起こると、後シナプスの G タンパク質が活性化され、又は電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルから  $Ca^{2+}$

が細胞内に流入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が局所的に上昇し、ホスホリパーゼ C が活性化され、イノシトールリン脂質などから 2-アラキドノイルグリセロールが速やかに生成される。2-アラキドノイルグリセロールは膜透過性物質なのでシナプス間隙に放出され、神経前終末に存在する（90%以上は前終末に存在すると言われている）カンナビノイド CB1 受容体に作用して、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを阻害することにより、神経伝達物質の放出を抑制し、神経の興奮を抑制する（Fig. 7）。2-アラキドノイルグリセロールは上述した通り神経の興奮に伴って生成する物質であるが、それがフィードバックして神経の興奮を抑制するとすれば、神経興奮の遮断機構として生理学上極めて意味のあるものであるとすることができる。もしこの機構が働かなければ、神経は長く続く興奮で細胞が弱ったり、死んだりすることになる。

さて、われわれの 1998 年発表<sup>41)</sup>の 3 年後（2001）に、日本と米国の電気生理学の 3 つのグループが、同時に、海馬や小脳を用いて内在性の CB1 受容体リガンドが逆行的に作用して神経伝達を抑制的に制御する（depolarization-induced suppression of inhibition, DSI 及び depolarization-induced suppression of excitation, DSE）という報告がなされた。<sup>42-44)</sup> この後、日本の狩野グループの前島（現岡崎生理研）はわれわれとの共同研究で、この CB1 受容体リガンドが 2-アラキドノイルグリセロールであることをホスホリパーゼ C $\beta$  ノックアウトマウスを用いて証明した。<sup>45)</sup>

以上のように、われわれの主として生化学的研究から得た結論と電気生理学者の得た結論が同じであったことから、現在ではこの retrograde signaling の説が世界的に認められている。

## 5. CB2 受容体とその内在性リガンドの生理的役割

前述したように、CB1 受容体は神経系を中心に全身に広く分布し、研究もかなり進んでいるが、炎症、免疫系細胞に発現している CB2 受容体についてはいまだ免疫を助長するのか抑制するのかもよく分かっていなかった。この原因の 1 つとして、 $\Delta^9$ -THC を動物に投与すると免疫低下がみられることから、CB2 受容体は免疫抑制に関与していると考えられてきたことが挙げられる。しかしながら、前

述したように  $\Delta^9$ -THC はカンナビノイド受容体（CB1, CB2 ともに）に対し部分作動薬として作用すること<sup>46,47)</sup>やあるいは CB2 に対してアンタゴニストとしても作用することが明らかになったこと<sup>48)</sup>で、CB2 受容体が単に免疫に対して抑制的に働いているとすることには疑問が出てきた。われわれはまず、CB2 を発現している HL-60 細胞などを用いて 2-アラキドノイルグリセロールの作用を調べ、2-アラキドノイルグリセロールが p42/44 MAP kinase, p38 MAP kinase, c-Jun N-terminal kinase などを活性化する<sup>49,50)</sup>こと、IL-8 や MCP-1 などのケモカインの産生を増大させること、<sup>51)</sup>マクロファージ様に分化させた細胞を遊走させること、<sup>52)</sup>アクチンの重合を促進すること、<sup>53)</sup>ヒト好酸球<sup>54)</sup>やナチュラルキラー細胞（未発表）が 2-アラキドノイルグリセロールによって効率よく遊走することも明らかにした。これらの実験結果から CB2 受容体や 2-アラキドノイルグリセロールが、免疫応答に関してむしろ促進的に働いていることが考えられた。さらにわれわれはいくつかの炎症モデルにおける CB2 受容体と 2-アラキドノイルグリセロールの役割について調べ、TPA で誘発したマウス耳介の急性炎症モデル<sup>55)</sup>やオキサゾロン塗布によるマウス耳介の遅延型アレルギー性炎症モデルにおいて、2-アラキドノイルグリセロールの速やかな増大がみられること、アナンダミドの量は 2-アラキドノイルグリセロールの量に比べ著しく少なく、また、増加などの変化はほとんどみられないことなどを明らかにした。また、CB2 アンタゴニストである SR144528 を耳介に塗布することにより、TPA による耳介の腫脹や  $\text{LTB}_4$  の産生、好中球の浸潤は強く抑制を受けた。一方、マウス耳介に 2-アラキドノイルグリセロールそのものを塗布することにより一過的に腫脹が観察されるが、この腫脹は SR144528 によって完全に抑制された。これらの事実は、CB2 受容体とその内在性リガンドである 2-アラキドノイルグリセロールが、急性あるいはアレルギー性の炎症反応において促進的役割を演じていることを強く示唆するものである。

これらの実験結果から CB2 と 2-アラキドノイルグリセロールの炎症・免疫反応に関する役割は次のように考えることができる。生体内に細菌等の異物が侵入したり、あるいは傷害等により炎症・免疫系

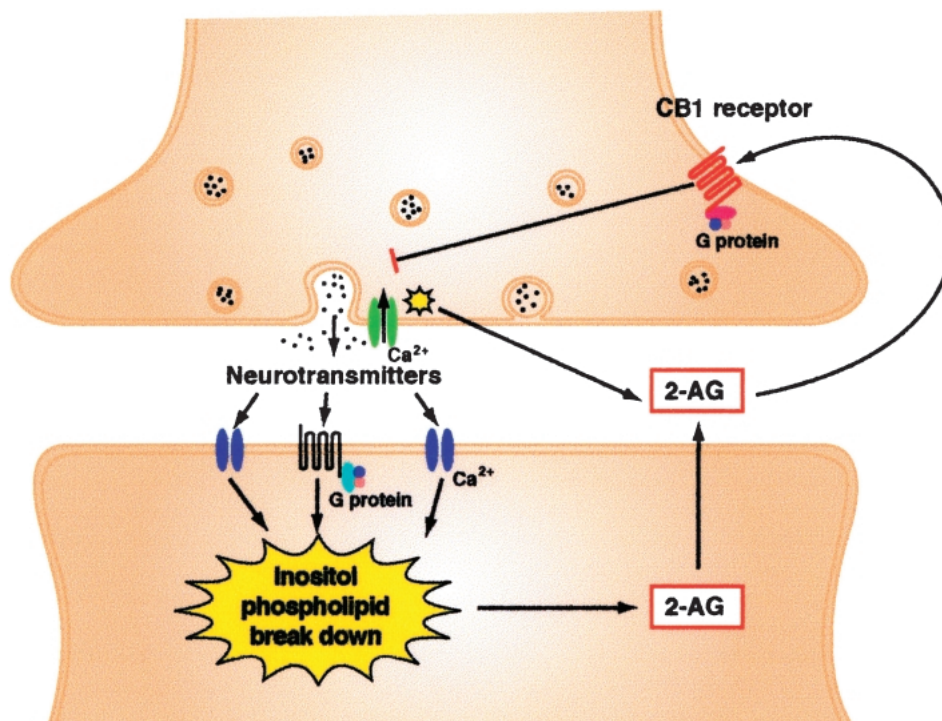


Fig. 7. A Possible Regulatory Role of 2-AG in Neurotransmission

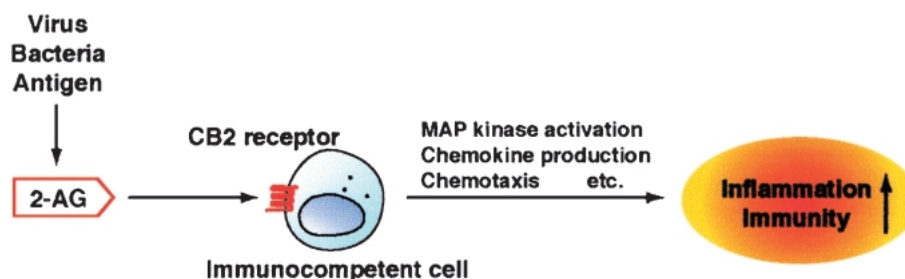


Fig. 8. A Possible Physiological Role of 2-AG and CB2 Receptor in Inflammatory Reaction

の細胞が活性化され、リン脂質の代謝が亢進し、2-アラキドノイルグリセロールの合成と放出が起こる。放出された2-アラキドノイルグリセロールはCB2受容体を発現している他の炎症・免疫系の細胞に作用してIL-8などのケモカインの産生を増大させることにより、あるいはこれらの細胞を直接遊走させることにより、炎症反応をエスカレートさせたり、進行させたりすることになる (Fig. 8)。

CB2受容体に関する研究はCB1受容体に関する研究と比べるとまだそれほど進んだとは言えない。しかし、われわれの研究室での研究は恐らく最も進んでいるのではなからうか。特に、薬学の領域で免疫・炎症に関するものだけに医薬品の開発に結びつく可能性が大きい。

## 6. エンドカンナビノイド関連化合物の医薬品としての開発

カンナビノイドは昔から医薬品として用いられ、現在でも癌患者の鎮痛などに用いられている。しかしカンナビノイドには前述したように幻覚作用などの副作用があり、医薬品としては問題があった。1990年にカンナビノイド受容体 (CB1) がクローニングされ、その受容体リガンドが見い出され、またその代謝関連酵素が研究されてくるとその関連化合物の医薬品としての応用が進められるようになった。特に、今まで、エンドカンナビノイドとして研究されてきた2-アラキドノイルグリセロールやアナンドアミドにはこれら幻覚作用などの副作用は認められず、これら関連化合物の医薬品としての応用が

期待される。

現在最も開発が進んでいるのは選択的 CB1 受容体アンタゴニスト(正確にはインバースアゴニスト)であるリモナバント(SR141716A)(Fig. 9)である。

既に食欲とカンナビノイド受容体との関係(CB1受容体アンタゴニストで食欲は減少する)は2001年にDiMarzoらによって報告されている<sup>42)</sup>が、リモナバントは既に肥満及びニコチン依存症に対する治療薬として臨床試験のPhase IIが終了し、<sup>56)</sup>両疾患への適用へ向けて研究が進められている。また、動物実験でパーキンソン病やアルツハイマー病の緩和、早期流産の治療にも可能性が示されている。ちなみに、ハンチントン舞踏病患者の脳では早期段階で基底核のCB1受容体の減少、またパーキンソン

病ではCB1受容体の増大が報告されており、<sup>57)</sup>これからの受容体を対象とした研究開発に期待が持たれている。また、エンドカンナビノイド生合成経路の特異的阻害剤の開発も重要な課題であるが、これもカンナビノイド受容体アンタゴニストと同様の治療効果が期待できる。

また、CB2受容体アンタゴニストあるいはインバースアゴニストであるSR144528やJTE907(Fig. 9)が、カラゲニンで誘発したマウス足底の浮腫を強く抑制することが報告されている。<sup>58)</sup>また、CB2受容体選択的作動薬が炎症性及び神経性の疼痛の治療薬として期待され、これまでにHU-308(Fig. 9)などいくつかの化合物が開発されている。<sup>59)</sup>これらの化合物はグリオーマと悪性リンパ腫に用いられる

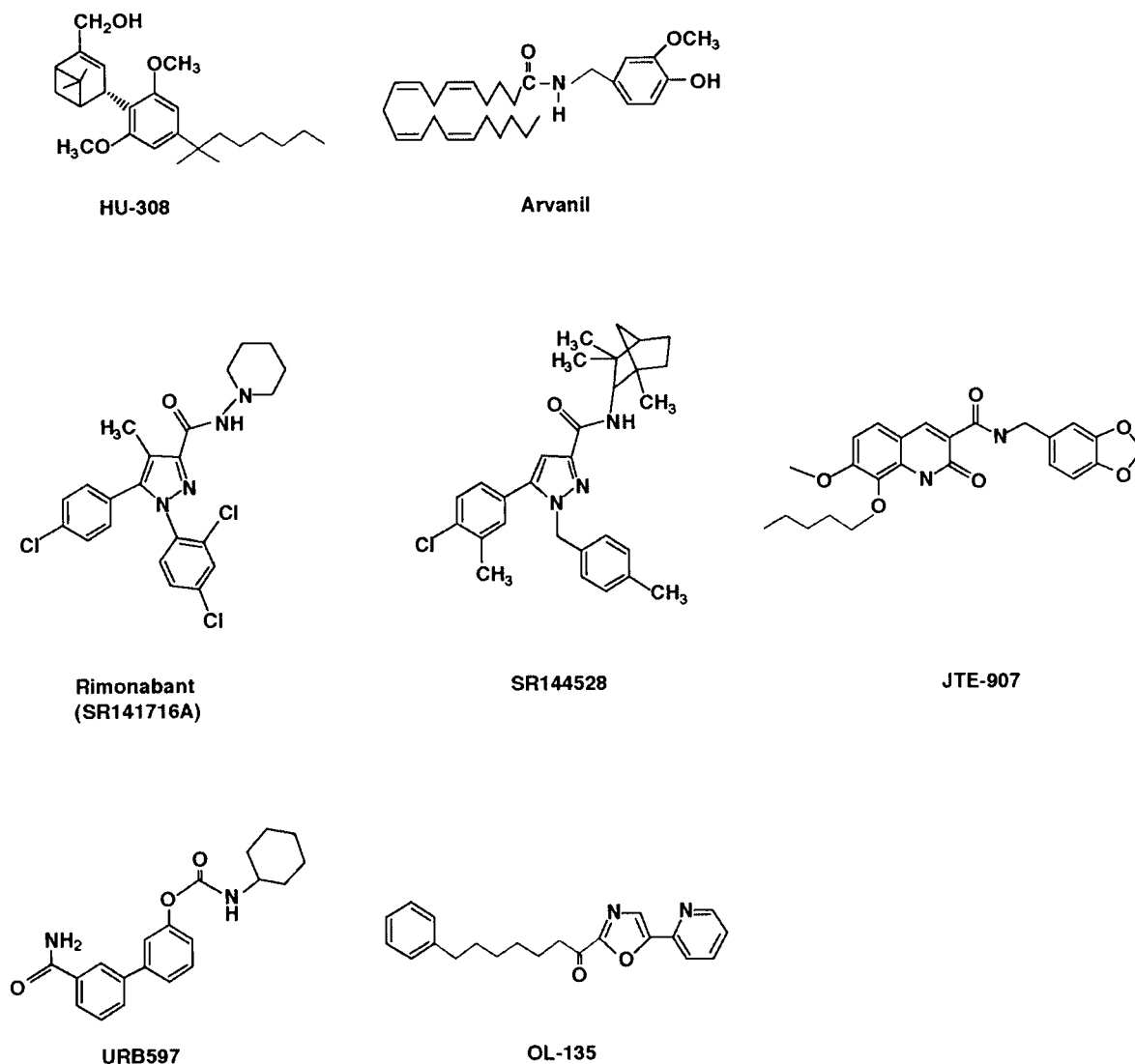


Fig. 9. Chemical Structures of the Synthetic Compounds Acting on the Endocannabinoid System

可能性が示唆されている。さらに、興味深い化合物として、アナンダミドがカンナビノイド受容体以外にもバニロイド受容体のリガンドとして作用することで、アナンダミドとカプサイシン（バニロイド受容体リガンド）の両者に類似の構造を有するアルヴァニル（Fig. 9）が合成された。これは両受容体のアゴニストとして働くハイブリッド化合物であり、鎮痛、抗炎症、抗痙攣作用を示す。<sup>60)</sup>

さらに、開発が進められているもう1つの領域はFAAHのようなエンドカンナビノイド分解酵素の特異的阻害剤であり、*in vivo*でも有効な選択的FAAH阻害剤が報告されている（URB597, OL135）（Fig. 9）。*N*-アシルエタノールアミンは生体内において例えば脳や心臓でischemiaを生じさせた状態のとき蓄積が起き、これが生体防衛的役割をしていると言われており、<sup>61)</sup>この現象をFAAH阻害剤を用いて生体内のエンドカンナビノイドの濃度を増加させ、治療効果を期待するものである。動物実験の結果から、急性疼痛、てんかん、多発性硬化症、パーキンソン病、下痢などに対する治療薬としての可能性が検討されている。また、ごく最近子宮のアナンダミド含量が卵子の接着に関与している<sup>62)</sup>という報告も出た。一方、これら蓄積された*N*-アシルエタノールアミンはアナンダミドのみではなく、パルミトイルエタノールアミンなど、カンナビノイド受容体に作用しないものも多く含まれており、これらはまた違った機構での薬理作用が考えられている。

## 7. おわりに

カンナビノイド受容体の1つがクローニングされたのが1990年、いまから十数年前のことであるが、それ以来カンナビノイド受容体とエンドカンナビノイドの分子学的研究は目覚ましいものがある。われわれの研究室では開設以来脂質の代謝研究をその主要テーマとしてきたが、PAFやLPAなどの生理活性脂質の研究のなかで2-アラキドノイルグリセロールという新しいエンドカンナビノイドを発見し、それ以来本物質を中心として研究を行ってきた。最初にDevaneらによって見いだされたアナンダミドはカンナビノイドの真のリガンドとは言いがたいこともあって、2-アラキドノイルグリセロールの研究は、受容体リガンドとして順調に発展した。特に、本物質は金沢大学の狩野グループとの共同研究により前述したretrograde signalingに重要

な物質であることが確定したことは大きな成果であり、生理学的見地からも重要な知見であると考えられている。これからの研究の進展としては、生理・生化学的現象のもの、薬理的に興味あるもの、病態との関連があるもの、また最近進歩の著しいカンナビノイド関連化合物による医薬品の開発など多岐に渡って期待されている。特にハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病など現在よい治療法がない病気に対して応用される可能性が出てきたことは研究者として大変うれしいことである。また、われわれのグループで研究が進んでいるCB2受容体と炎症・免疫関連の分野では新しい考え方に基づいた炎症・免疫関連の薬の開発が期待されている。

また、カンナビノイド受容体が血管系や生殖系においてなんらかの重要な役割を演じているとされており、この方面からも医薬品の開発と結びつくかも知れない。ちなみにわれわれもヒトの血管内皮細胞からCB1受容体mRNAと2-アラキドノイルグリセロールを同定している。<sup>63)</sup>

従来、カンナビノイド関連化合物を医薬品として用いるときは、かならず、幻覚などの副作用を考慮しなくてはならなかったが、エンドカンナビノイドについてはその心配がなく開発できることは大きなadvantageであると考えられる。

これからの研究でカンナビノイド受容体とその内在性リガンドの生理的意義がより詳しく解明され、またそれが新薬の開発へと繋がっていくことを願って止まない。

なお、本研究は衛生化学研究室の杉浦隆之教授、岸本成史講師、岡 沙織教務職員、五香麻衣研究員の協力によったものであり、ここに厚く感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Yamamoto I., "Taima No Bunka To Kagaku," Hirokawa Shoten, 2001.
- 2) Gaoni Y., Mechoulam R., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1646-1647 (1964).
- 3) Devane W. A., Dysarz III F. A., Johnson M. R., Melvin L. S., Howlett A. C., *Mol. Pharmacol.*, **34**, 605-613 (1988).
- 4) Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I., *Nature*, **346**, 561-

- 564 (1990).
- 5) Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M., *Nature*, **365**, 61–65 (1993).
  - 6) Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulum R., *Science*, **258**, 1946–1949 (1992).
  - 7) Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89–97 (1995).
  - 8) Mechoulum 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., *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 83–90 (1995).
  - 9) Wartmann M., Campbell D., Subramanian A., Burnstein S. H., Davis R. J., *FEBS Lett.*, **359**, 133–136 (1995).
  - 10) Stella N., Schweitzer P., Piomelli D., *Nature*, **388**, 773–778 (1997).
  - 11) Zimmer A., Zimmer A. M., Hohmann A. G., Herkenham M., Bonner T. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5780–5785 (1999).
  - 12) Watabe A. M., Carlisle H. J., O'Dell T. J., *J. Neurophysiol.*, **87**, 1395–1403 (2002).
  - 13) Abadji V., Lin S., Taha G., Griffin G., Stevenson L. A., Pertwee R. G., Makriyannis A., *J. Med. Chem.*, **37**, 1889–1893 (1994).
  - 14) Deutsch D. G., Chin S. A., *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 791–796 (1993).
  - 15) Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Ishima Y., Waku K., *Eur. J. Biochem.*, **240**, 53–62 (1996).
  - 16) Pater S., Carrier E. J., Ho W.-S. V., Rademacher D. J., Cunningham S., Reddy D. S., Falck J. R., Cravatt B. F., Hillard C. J., *J. Lipid Res.*, **46**, 342–349 (2005).
  - 17) Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarayan V., *Prog. Lipid Res.*, **29**, 1–43 (1990).
  - 18) Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Tonegawa T., Nakane S., Yamashita A., Waku K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 113–117 (1996).
  - 19) Okamoto Y., Morishita J., Tsuboi K., Tonai T., Ueda N., *J. Biol. Chem.*, **279**, 5298–5305 (2004).
  - 20) Katayama K., Ueda N., Kurahashi N., Suzuki Y., Yamamoto S., Kato I., *Biochim. Biophys. Acta*, **1347**, 212–218 (1997).
  - 21) Cravatt B. F., Giang D. K., Mayfield S. P., Boger D. L., Lerner R. A., Gilula N. B., *Nature*, **384**, 83–87 (1996).
  - 22) Cravatt B. F., Demarest K., Patricelli M. P., Bracey M. H., Giang D. K., Martin B. R., Lichtman A. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 9371–9376 (2001).
  - 23) Ueda N., Yamanaka K., Yamamoto S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 35552–35557 (2001).
  - 24) Tsuboi K., Sun Y-X, Okamoto Y., Araki N., Tonai T., Ueda N., *J. Biol. Chem.*, **280**, 11082–11092 (2005).
  - 25) Schmid P. C., Krebsbach R. J., Perry S. R., Dettmer T. M., Maasson J. L., Schmid H. H. O., *FEBS Lett.*, **375**, 117–120 (1995), Erratum *FEBS Lett.*, **385**, 124–130 (1996).
  - 26) Sugiura T., Tokumura A., Gregory L., Nouchi T., Weintraub S. T., Hanahan D. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 358–368 (1994).
  - 27) Sugiura T., Arai S., Oka S., Waku K. (Unpublished results).
  - 28) Prescott S. M., Majerus P. W., *J. Biol. Chem.*, **258**, 764–769 (1983).
  - 29) Bisogno T., Howell F., Williams G., Minassi A., Cascio M. G., Ligresti A., Matias I., Schiano-Moriello A., Paul P., Williams E.-J., Gangadharan U., Hobbs C., Di Marzo V., Doherty P., *J. Cell Biol.*, **163**, 463–468 (2003).
  - 30) Tsutsumi T., Kobayashi T., Miyashita M., Watanabe S., Homma Y., Okuyama H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 331–336 (1995).
  - 31) Nakane S., Oka S., Waku K., Ishima Y., Tokumura A., Sugiura T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **402**, 51–58 (2002).
  - 32) Bisogno T., Melck D., De Petrocellis L., Di Marzo V., *J. Neurochem.*, **72**, 2113–2119 (1999).
  - 33) Bisogno T., Sepe N., Melck D., Maurelli S., De Petrocellis L., Di Marzo V., *Biochem. J.*, **322**, 671–677 (1997).
  - 34) Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., Kathuria S., Piomelli D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A.*, **99**, 10819–10824 (2002).
- 35) Goparaju S. K., Ueda N., Yamaguchi H., Yamamoto S., *FEBS Lett.*, **422**, 69–73 (1998).
- 36) Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D. E., Kustanovich I., Mechoulum R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 3662–3665.
- 37) Sugiura T., Waku K., “Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators,” ed. by Snyder F., Plenum, New York, 1987, pp. 55–85.
- 38) Oka S., Tsuchie A., Tokumura A., Muramatsu M., Suhara Y., Takayama H., Waku K., Sugiura T., *J. Neurochem.*, **85**, 1374–1381 (2003).
- 39) Sugiura T., Kodaka T., Kondo S., Tonegawa T., Nakane S., Kishimoto S., Yamashita A., Waku K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 207–210 (1997).
- 40) Di Marzo V., Goparaju S. K., Wang L., Liu J., Batkai S., Jarai Z., Fezza F., Miura G. I., Palmiter R. D., Sugiura T., Kunos G., *Nature*, **410**, 822–825 (2001).
- 41) Sugiura T., Kondo S., Kodaka T., Nakane S., Yamashita A., Kishimoto S., Waku K., “Essential Fatty Acids and Eicosanoids,” eds. by Riemasma R. A., Armstrong R., Kelly W., Wilson R., AOCS Press, Champaign, IL, 1998, pp. 380–384.
- 42) Ohno-Shosaku T., Maejima T., Kano M., *Neuron*, **29**, 729–738 (2001).
- 43) Wilson R. I., Nicoll R. A., *Nature*, **410**, 588–592 (2001).
- 44) Kreitzer A. C., Regehr W. G., *Neuron*, **29**, 717–727 (2001).
- 45) Maejima T., Oka S., Hashimoto Y., Ohno-Shosaku T., Aiba A., Wu D., Waku K., Sugiura T., Kano M., *J. Neuroscience*, **25**, 6826–6835 (2005).
- 46) Sugiura T., Kodaka T., Nakane S., Miyashita T., Kondo S., Suhara Y., Takayama H., Waku K., Seki C., Baba N., Ishima Y., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2794–2801 (1999).
- 47) Sugiura T., Kondo S., Kishimoto S., Miyashita T., Nakane S., Kodaka T., Suhara Y., Takayama H., Waku K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 605–612 (2000).
- 48) Bayewitch M., Rhee M. H., Avidor-Reiss T., Breuer A., Mechoulum R., *J. Biol. Chem.*, **271**, 9902–9905 (1996).
- 49) Kobayashi Y., Arai S., Waku K., Sugiura T., *J. Biochem.* (Tokyo), **129**, 665–669 (2001).
- 50) Sugiura T., Kishimoto S., Oka S., Gokoh M., Waku K., “Arachidonate Remodeling and Inflammation,” eds. by Fonteh A. N., Wykle R. L., 2004, pp. 211–237.
- 51) Kishimoto S., Kobayashi Y., Oka S., Gokoh M., Waku K., Sugiura T., *J. Biochem.* (Tokyo), **135**, 517–524 (2004).
- 52) Kishimoto S., Gokoh M., Oka S., Muramatsu M., Kajiwara T., Waku K., Sugiura T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 24469–24475 (2003).
- 53) Gokoh M., Kishimoto S., Oka S., Mori M., Waku K., Ishima Y., Sugiura T., *Biochem. J.*, **386**, 583–589 (2005).
- 54) Oka S., Ikeda S., Kishimoto S., Gokoh M., Yanagimoto S., Waku K., Sugiura T., *J. Leukoc. Biol.*, **76**, 1002–1009 (2004).
- 55) Oka S., Yanagimoto S., Ikeda S., Gokoh M., Kishimoto S., Waku K., Sugiura T., *J. Biol. Chem.*, **280**, 18488–18497 (2005).
- 56) Fernandez J. R., Allison D. B., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **5**, 430–435 (2004).
- 57) Fernandez-Ruiz I., Lastres-Becker A., Carbranes A., Gonzalez S., Ramos J. A., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**, 257–267 (2002).
- 58) Iwamura H., Suzuki H., Ueda Y., Kaya T., Inaba T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 420–425 (2001).
- 59) Palmer S. L., Thakur G. A., Makriyannis A., *Chem. Phys. Lipids*, **121**, 3–19 (2002).
- 60) Melck D., Bisogno T., De Petrocellis L., Chuang H., Julius D., Bifulco M., Di Marzo V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **262**, 275–284 (1999).
- 61) Hansen H. H., Schmid P. C., Bittigau P., Lastres-Becker I., Berrendero F., Manzanares J., Ikonomidou C., Schmid H. H. O., Fernandez-Ruiz J. J., Hansen H. S., *J. Neurochem.*, **78**, 1415–1427 (2001).
- 62) Guo Y., Wang H., Okamoto Y., Ueda N., Kingsley P. J., Marnett L. J., Schmid H. H. O., Das S. K., Dey S. K., *J. Biol. Chem.*, **280**, 23429–23432 (2005).
- 63) Sugiura T., Kodaka T., Nakane S., Kishimoto S., Kondo S., Waku K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 838–843 (1998).