

132 iPLA₂の酸化脂質分解の分子基盤解明とその応用 林 大輝

【目的】 Phospholipase A₂ (PLA₂) は、生体膜の主要な構成要素であるリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸を加水分解する酵素群である。中でも、Group VIA calcium-independent PLA₂ (GVIA iPLA₂, iPLA₂ β, PLA2G6, PNPLA9とも呼ばれる) は、神経疾患や癌をはじめとする様々な疾患との関連が報告されている。これまでに、GVIA iPLA₂ が、酸化リン脂質を分解することで、癌細胞を、フェルトーシスと呼ばれる細胞死から保護していることが報告されており、GVIA iPLA₂ 阻害剤のフェルトーシス増強作用が注目されている。これまでの研究において、ヒトの主要な PLA₂ の中でも GVIA iPLA₂ が特定の酸化リン脂質にのみ高い活性を示すことが分かってきている。そこで本研究では、GVIA iPLA₂ の酸化リン脂質に対する特異性の分子基盤を、分子動力学 (MD) シミュレーションによって検証した。また、その特異性を阻害剤開発に応用することで、より効果及び選択性の高い化合物が設計できると考え研究を行った。

【方法】 GVIA iPLA₂ の酸化脂質に対する基質特異性の分子基盤を解明するために、全原子 MD シミュレーションを行った。GVIA iPLA₂ の基質結合領域に種々の酸化脂質を配置し、酵素-基質-脂質二重膜複合モデルを構築した。シミュレーションは NAMD 3.0 ソフトウェアを使用し、310.15 K、1 気圧の条件で CHARMM 36 m 力場を用いて 1 μsec 実施した。さらに、GVIA iPLA₂ の酸化脂質に対する特異性を基に、阻害剤をデザインし、合成した。合成した阻害剤の、種々の PLA₂ に対する阻害効果を、質量分析計を用いた *in vitro* 活性測定系により評価した。また、これらの阻害剤のフェルトーシス促進効果を検証するために、阻害剤とフェルトーシス誘導剤である RSL-3 を共作用させた際のヒト結腸癌細胞由来 HCT116 細胞の細胞生存率を測定した。

【結果】 全原子 MD シミュレーションの結果、GVIA iPLA₂ の酸化リン脂質、特に、酸化切断された脂肪酸を持つリン脂質に対する基質特異性は、GVIA iPLA₂ の基質結合部位の疎水的環境が重要であることが明らかになった。そこで、酸化リン脂質と同様、カルボキシ基、アルデヒド基、ヒドロキシ基を持つ酸化修飾化合物を合成し、GVIA iPLA₂ に対する阻害効果を検証したところ、ヒドロキシ基を持つ化合物が最も高い阻害活性を有することを見出した。そこで、既存の阻害剤をヒドロキシ基によって修飾し、ドッキングシミュレーションにより GVIA iPLA₂ との結合を評価したところ、既存の化合物よりも結合の親和性を示すスコアが向上した。この酸化修飾体を合成し、GVIA iPLA₂ に対する阻害効果を既存のものと比較したものの、阻害効果の向上は認められなかった。一方で、酸化修飾体は既存のものに比べて GVIA iPLA₂ に対する選択性が向上することが明らかとなった。また、培養癌細胞を用いて、これらの阻害剤のフェルトーシス促進効果を検証したところ、酸化修飾体の方がより強くフェルトーシスによる細胞死を促進することが明らかとなった。本研究により、酸化修飾による阻害効果の向上は見られなかったものの、その選択性や細胞系における効果の向上が見られた。本研究は、酵素の基質特異性を応用した阻害剤開発が有効であることを示すものであり、今後修飾条件の検討により、さらなる阻害剤の改良が見込まれる。また本アプローチは、他の様々な酵素への応用が可能である。

本研究の研究アプローチと成果の概要

