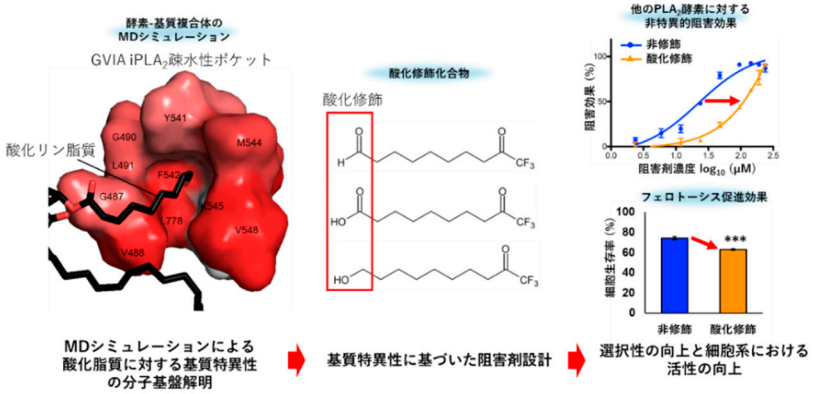
| 132　iPLA$_2$の酸化脂質分解の分子基盤解明とその応用 | 林　大輝 |
|---|---|

**【目的】**Phospholipase A$_2$（PLA$_2$）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 PLA$_2$（GVIA iPLA$_2$、iPLA$_2\beta$、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 iPLA$_2$が、酸化リン脂質を分解することで、癌細胞を、フェロ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 iPLA$_2$阻害剤のフェロ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 PLA$_2$の中でも GVIA iPLA$_2$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 iPLA$_2$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 iPLA$_2$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 iPLA$_2$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 $\mu$ sec 実施した。さらに、GVIA iPLA$_2$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 PLA$_2$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ロトーシス促進効果を検証するために、阻害剤とフェロ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 iPLA$_2$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 iPLA$_2$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 iPLA$_2$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 iPLA$_2$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 iPLA$_2$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と比べて GVIA iPLA$_2$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ロ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ロ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



# 132. iPLA$_2$の酸化脂質分解の分子基盤解明とその応用

林　大輝

神戸大学 大学院農学研究科 生命機能科学講座

Key words：Phospholipase A$_2$，酸化リン脂質，分子動力学シミュレーション，フェロトーシス

## 緒　言

Phospholipase A$_2$（PLA$_2$）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 PLA$_2$（GVIA iPLA$_2$、iPLA$_2\beta$、PLA$_2$G6、PNPLA9 とも呼ばれる）は、細胞質型の PLA$_2$で、厳格な基質特異性を持たない分子種であり、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。近年、複数の PLA$_2$分子種が、リン脂質代謝を介して、フェロトーシスと呼ばれる細胞死に関与することが報告されている。フェロトーシスは、細胞膜リン脂質の過酸化が原因で引き起こされる細胞死であり、アポトーシスとは異なるメカニズムの細胞死であることや、抗癌剤耐性の癌細胞がフェロトーシスに対する感受性が高いことなどから、新規抗癌剤のターゲットとして高い注目を集めている［1］。これまでに GVIA iPLA$_2$が、酸化リン脂質を分解することで癌細胞をフェロトーシスから保護していることが報告されており、その阻害剤のフェロトーシス増強作用が期待される［2，3］。実際に、GVIA iPLA$_2$の阻害剤である(*S*)-BEL がフェロトーシスによる細胞死を促進することが報告されているが［4］、(*S*)-BEL は高い細胞毒性を持ち、他の酵素へのオフターゲット効果が報告されていることから、GVIA iPLA$_2$をターゲットとするフェロトーシス促進剤としての応用ができない。

先行研究において GVIA iPLA$_2$は、*sn*-2 鎖がアルデヒド基を持つ 9'-オキソノナン酸であるリン脂質（PONPC）にのみ高い活性を示す一方で、アルデヒド基の代わりにカルボキシ基を持つアゼライン酸（PAzePC）に対する活性が低いことが分かっている。一方で、ヒトの主要な PLA$_2$分子種である cytosolic PLA$_2$（cPLA$_2$）及び、secreted PLA$_2$（sPLA$_2$）は、これらの酸化リン脂質に対しては良い活性を示さないことも明らかになっている。

そこで本研究では、GVIA iPLA$_2$の酸化リン脂質に対する特徴的な基質特異性の分子基盤を全原子分子動力学（AA-MD）シミュレーションによって検証した。その結果、GVIA iPLA$_2$の基質結合ポケットの疎水的環境が酸化リン脂質に対する特異性に寄与することを明らかにした。また、その基質特異性を基にデザイン・合成した阻害剤の阻害効果及び選択性を *in vitro* の実験系により検証したところ、阻害剤の選択性を向上させることに成功した。さらに、得られた阻害剤について、結腸癌細胞株を用いてフェロトーシス促進効果を検証したところ、その効果の向上が見られた。

## 方　法

### 1. AA-MD シミュレーション

ホモロジーモデリングにより構築した GVIA iPLA$_2$触媒ドメインの基質結合部位に、1-palmitoyl-2-azelaoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine（PAzePC）あるいは、1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine（PONPC）を配置した。この酵素-リガンド複合体を、CHARMM-GUI に実装されている Membrane Builder 機能を用いて脂質二重膜上に配置し、TIP3P 水分子モデルを用いて水和後、150 mM NaCl で中和した。分子動力学シミュレーションは NAMD 3.0 ソフトウェアを用い、310.15 K で 1 $\mu$sec 実施した。タイムステップは SHAKE アルゴリズムを用いて 2 fsec/step とした。シミュレーションには、CHARMM36 m 力場を使用した。

**2. 質量分析計を用いた $PLA_2$活性測定**

基質であるリン脂質 100 μM と、界面活性剤である C12E8 400 μM、内部標準である 17：0 リゾリン脂質 2.5 μM からなる混合ミセルを作製し、基質溶液として用いた。種々の 6×His タグ付き $PLA_2$を昆虫細胞あるいは、大腸菌発現系を用いて発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した。精製 $PLA_2$と基質溶液を混合し、30 min、40℃の条件で反応を行い、生じたリゾリン脂質を、質量分析計を用いて測定した。阻害剤の効果を検証する際は、基質溶液に種々の濃度の阻害剤を添加した。

**3. 細胞生存率の測定**

ヒト結腸癌由来 HCT116 細胞を、96 well プレートに播種し、24 時間後、フェロトーシス誘導剤である RSL-3 を種々の濃度で含む培地に交換した。さらに 24 時間後の細胞生存率を、クリスタルバイオレット法を用いて検証した。阻害剤の効果を検証する場合は、阻害剤を RSL-3 と同時に細胞に添加した。

## 結　果

**1. AA-MD シミュレーションによる GVIA $iPLA_2$の酸化リン脂質に対する特異性の分子基盤解明**

GVIA $iPLA_2$は、酸化リン脂質である PONPC に対して PAzePC の約 9 倍高い活性を持つことが分かっている（図 1a）。この特徴的な基質特異性の分子メカニズムを解明するために、GVIA $iPLA_2$-PONPC あるいは、PAzePC 複合体の AA-MD シミュレーションを行った。シミュレーション中の GVIA $iPLA_2$の触媒残基と、加水分解を受ける *sn*-2 位のカルボニル基との距離を測定したところ、PONPC は比較的近い距離で安定していたのに対し、PAzePC の場合その距離は安定せず、触媒残基から遠ざかってしまうことが示された（図 1b）。GVIA $iPLA_2$の基質特異性は *sn*-2 位の脂肪酸を収容する疎水領域によって規定されることが先行研究により分かっている[5]。そこで、*sn*-2 位の酸化により生じたアルデヒド基やカルボキシ基と、疎水領域との水素結合が基質特異性に寄与すると考え、シミュレーション中に形成された水素結合を解析した。しかし、PONPC のアルデヒド基と疎水性結合領域との有意な水素結合は認められなかったものの、疎水性領域に長時間留まっていることが明らかとなった（図 1c）。一方、PAzePC の *sn*-2 鎖は、シミュレーション開始直後に疎水領域から外れ、比較的親水性の高い領域で水素結合を形成し保持されていることが明らかとなった（図 1d）。これらの結果から、GVIA $iPLA_2$の酸化リン脂質に対する特徴的な選択性は、*sn*-2 鎖を収容する領域の疎水的環境から生み出されていることが示唆された。

**2. 酸化修飾による GVIA $iPLA_2$阻害効果の変化**

これまでに、GVIA $iPLA_2$阻害剤としてトリフルオロメチルケトン系化合物が報告されている。これらの化合物は、リン脂質の極性部位を模したトリフルオロメチルケトン基と、脂肪酸鎖を模した疎水性部から構成されており、その疎水部が阻害剤の作用及び選択性に重要であることが知られている［6］。そこで、GVIA $iPLA_2$の酸化リン脂質に対する特徴的な基質特異性を、効果及び選択性の高い阻害剤の開発に応用できると考え実験を行った。まず、基本となるトリフルオロメチルケトン系化合物の疎水部にアルデヒド、カルボキシあるいはヒドロキシ基を付加した化合物（GK753~755、図 2a）を合成した。それぞれの化合物の GVIA $iPLA_2$に対する阻害効果を検証したところ、カルボキシ基で修飾した化合物（GK754）の阻害効果は、アルデヒド基で修飾したもの（GK753）よりも有意に低かった（図 2b）。興味深いことに、本研究において作成した 3 種類の酸化修飾体の中ではヒドロキシ基による修飾（GK755）が最も阻害効果が高かった。しかし、これらの化合物の阻害活性は、既存の阻害剤よりも低かったため、次に、既存の GVIA $iPLA_2$阻害剤に対する酸化修飾を試みることとした。

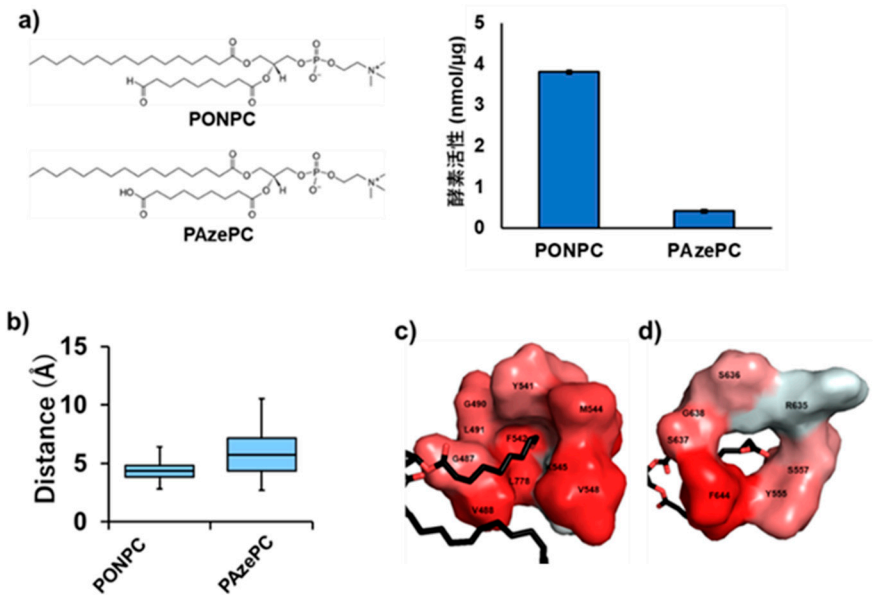



図 1. GVIA iPLA$_2$の酸化リン脂質に対する基質特異性とその分子基盤

a）PONPC と PAzePC の構造とそれぞれに対する GVIA iPLA$_2$の活性。

b）MD シミュレーションにおける各基質の *sn*-2 位カルボニル基と触媒残基の距離。

c）PONPC の *sn*-2 位脂肪酸鎖を収容する疎水性領域。

d）PAzePC の *sn*-2 位脂肪酸鎖を保持する領域。

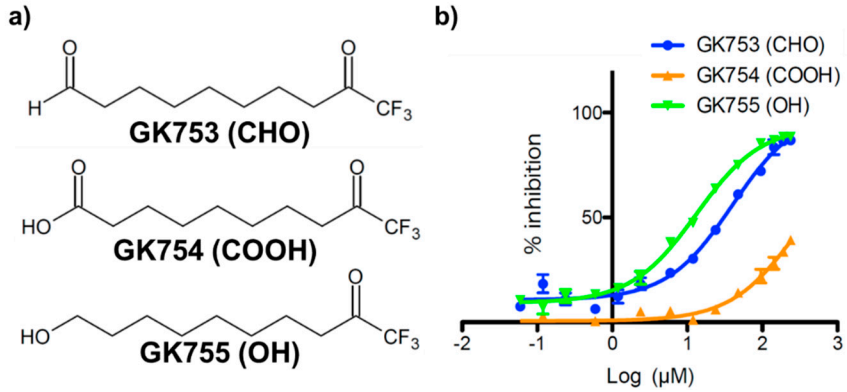



図 2. 酸化修飾したトリフルオロメチルケトン系化合物とその阻害効果

a）酸化修飾したトリフルオロメチルケトン系化合物の構造。

b）GK753、754 及び 755 の GVIA iPLA$_2$に対する阻害効果。

### 3. 既存の GVIA iPLA$_2$阻害剤への酸化修飾の効果

これまでに報告されているトリフルオロメチルケトン系阻害剤に、種々の酸化修飾を行い、ドッキングシミュレーションによりその結合能を推定したところ、先述の結果同様、ヒドロキシ基修飾体において非修飾体に比べて高いドッキングスコアを示した。そこで、高いスコアを示した化合物（GK766）を合成し、GVIA iPLA$_2$に対する阻害活性を評価した。しかし、GK766 は、GVIA iPLA$_2$に対する比較的高い阻害効果を示したものの、その IC$_{50}$は非酸化体よりも 3.7 倍高く、酸化修飾による阻害効果の増強は認められなかった。そこで次に、GK766 の cPLA$_2$及び、sPLA$_2$に対するオフターゲット効果を検証したところ、GK766 はどちらの PLA$_2$分子種に対して

も、非修飾体よりも阻害効果が低かった。GK766 の cPLA$_2$に対する IC$_{50}$は非修飾体の 4.6 倍であり、これは GK766 の GVIA iPLA$_2$に対する阻害活性の低下よりも高い値であった。このことから、既存の阻害剤のヒドロキシ基修飾により、GVIA iPLA$_2$に対する特異性が向上することが明らかとなった。

**4. GK766 のフェロトーシス促進効果**

先述の通り、GVIA iPLA$_2$はフェロトーシスによる細胞死に抑制的に働くことが明らかになっており、その阻害剤のフェロトーシス促進効果が期待される。そこで、GK766 のフェロトーシス促進効果を、HCT116 細胞を用いて検証することとした。はじめに GK766 の細胞毒性を検証したところ、50 μM の投与においても細胞毒性を示さないことが明らかとなった。非修飾体 25 μM とフェロトーシス誘導試薬である RSL-3 を共に作用させると、RSL-3 単独で投与したもの（Control）よりも有意に細胞生存率が低下し、GVIA iPLA$_2$の阻害がフェロトーシスを促進することが確認できた（図 3）。さらに、GK766 25 μM と RSL-3 を共投与した際には、非修飾体よりも高いフェロトーシス促進効果が見られたことから（図 3）、GK766 は細胞系において非修飾体よりも優れた GVIA iPLA$_2$阻害活性を発揮することが示唆された。

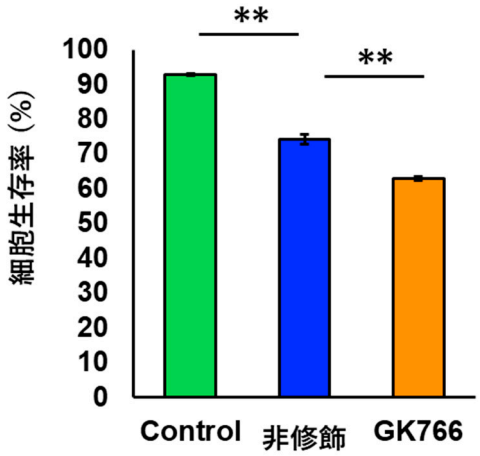



図 3. RSL-3 と GK766 の共投与によるフェロトーシス細胞死の増強
**$P$＜0.001（Tukey-Kramer multiple comparison test）。

## 考　察

本研究において、AA-MD シミュレーションを実施することにより GVIA iPLA$_2$の酸化リン脂質、特に、酸化切断されたリン脂質に対する基質特異性の分子基盤の一端を解明することができた。GVIA iPLA$_2$は PONPC に対して最良の *sn*-2 鎖であるリノール酸よりも高い活性を示すことが分かっているものの、その高い活性の分子基盤は未だに不明瞭であるため、さらなる検討が必要である。また、酸化修飾を導入することにより既存の阻害剤の阻害効果を増強することはできなかったが、他の PLA$_2$分子へのオフターゲットを改善することができた。また、GK766 は非修飾のものよりも強いフェロトーシス促進効果を示し、細胞系での有効性が向上しており、これには選択性の向上が関与していると推察されるが、細胞系で GVIA iPLA$_2$の活性を測定することができていないため、今後さらなる検証が必要である。本研究において検討することができた酸化修飾のパターンは限られたものであり、実際に合成した化合物は 5 種類であった。本研究のアプローチにより一定の成果が得られたことから、今後さらなる酸化修飾の検討によって、効果・選択性の高い阻害剤が開発できると確信している。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、他の様々な酵素への応用も期待できる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科の篠原正和教授、National and Kapodistrian University of Athens, Department of Chemistry の George Kokotos 教授である。本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団ならびに関係の諸先生方に心より感謝申し上げます。

## 文　献

1） Wu Y, Yu C, Luo M, Cen C, Qiu J, Zhang S, et al. Ferroptosis in Cancer Treatment: Another Way to Rome. Vol. 10, Frontiers in Oncology. 2020. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.571127

2） Chen D, Chu B, Yang X, Liu Z, Jin Y, Kon N, et al. iPLA2β-mediated lipid detoxification controls p53-driven ferroptosis independent of GPX4. Nat Commun [Internet]. 2021;12(1):1–15. Available from: https://doi.org/10.1038/s41467-021-23902-6

3） Wang Y, Song H, Miao Q, Wang Y, Qi J, Xu X, et al. PLA2G6 Silencing Suppresses Melanoma Progression and Affects Ferroptosis Revealed by Quantitative Proteomics. Front Oncol. 2022;12(March):1–12. PMID: 35340268 PMCID: PMC8948425 DOI: 10.3389/fonc.2022.819235

4） Oh M, Jang SY, Lee JY, Kim JW, Jung Y, Kim J, et al. The lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor Darapladib sensitises cancer cells to ferroptosis by remodelling lipid metabolism. Nat Commun. 2023;14(1). https://doi.org/10.1038/s41467-023-41462-9

5） Hayashi D, Mouchlis VD, Dennis EA. Omega-3 Versus Omega-6 Fatty Acid Availability is Controlled by Hydrophobic Site Geometries of Phospholipase A2s. J Lipid Res [Internet]. 2021;100113. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100113

6） Mouchlis VD, Morisseau C, Hammock BD, Li S, McCammon JA, Dennis EA. Computer-aided drug design guided by hydrogen / deuterium exchange mass spectrometry: A powerful combination for the development of potent and selective inhibitors of Group VIA calcium-independent phospholipase A2. Bioorg Med Chem [Internet]. 2016;24(20):4801–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.009