

論文要旨

The biological functions of cyclic phosphatidic acid and its derivatives

(環状ホスファチジン酸とその誘導体の生物学的機能)

野崎 絵美

環状ホスファチジン酸(cyclic phosphatidic acid, cPA)は、真性粘菌 *Physarum polycephalum* からはじめて単離・同定された、グリセロール骨格の *sn*-2 位と *sn*-3 位に環状リン酸基を持つ脂質メディエーターである。これまでの研究から、cPA のがんの浸潤・転移の抑制、C 線維を介した侵害受容性疼痛の抑制、脳虚血が引き起こす海馬の遅発性神経細胞死の抑制など、多様な生理活性があることが分かっている。我々はそれらの知見に基づいて、cPA を制がん剤や鎮痛薬、脳虚血疾患予防薬などとして開発すべく、新規 cPA 誘導体の合成や、生理活性の作用機序の解明を目指した研究を進めてきた。

cPA の生理活性には特徴的な環状構造が欠かせないことが示されている。そこで我々は、環状リン酸基の加水分解を防ぐために *sn*-2 位の酸素原子をメチレン基に置換した不斉炭素を 1 つ持つ cPA 誘導体 2-*O*-carba-cPA (2ccPA) を合成した。2ccPA は、cPA が持つ種々の生理活性において cPA より高い活性を持つ。しかし、これらの研究は 2ccPA のラセミ体を用いて行われたものであり、創薬の観点からは、2ccPA の光学異性体の違いが種々の生理作用に対してどのように影響するかを検討することが強く求められている。

また 2ccPA 以外にも、加水分解酵素による分解を防ぐことを目的として、酸素原子を硫黄原子に置換した cPA 誘導体 3-*O*-thia-cPA (3ScPA) を新たに合成した。これまでに、cPA や 2ccPA においてアシル鎖の長さの違いが生理活性に影響することが報告されているため、アシル鎖長の異なる 3ScPA の生理活性の比較を行う必要がある。また 2ccPA と同様に、光学異性体の違いが種々の生理作用に対してどのように影響するかを検討することが求められている。

さらに、cPA の細胞内における生成経路や作用メカニズムは長らく未解明であったが、近年、cPA が動物細胞内でホスホリパーゼ D2 (PLD2) によって生成されることが確認された。しかし、細胞内で生成された cPA の持つ生理活性は十分に明らかにされてはいない。

これらのことを背景に、本研究では、(1) cPA 誘導体の生理活性の検討および光学異性体の活性の比較、(2) PLD2 強制発現がん細胞における cPA 生成能と細胞運動能の検討 を行った。

(1) cPA 誘導体の生理活性の検討および光学異性体の活性の比較

(1-1) 2ccPA 光学異性体の活性の比較

新たに合成された 2ccPA の *R* 体と *S* 体について、①がんの浸潤・転移を促進することが示されている酵素オートタキシン (ATX) の活性阻害、②がんの浸潤抑制、③C 線維を介した侵害受容性反射の抑

制 の検討を行った。その結果、*R* 体と *S* 体の生理活性に差はなく、ラセミ体と同様に天然体 cPA より高い活性を示した。

(1-2) 3ScPA の生理活性の検討および光学異性体の活性の比較

アシル鎖の長さが異なる 4 種類の 3ScPA (16:0, 16:1, 18:0, 18:1) について、①ATX の活性阻害、②がんの浸潤抑制 を比較した。その結果、アシル鎖長の違いは 3ScPA の生理活性に影響しないことが分かった。また、3ScPA (16:1) について、(i) ATX の活性阻害、(ii) がんの浸潤抑制、(iii) C 線維を介した侵害受容性疼痛の抑制、(iv) 脳虚血が引き起こす海馬の遅発性神経細胞死の抑制 についても検討した結果、3ScPA は cPA よりも高い活性を持つことが示された。さらに、3ScPA の *R* 体と *S* 体には活性の強さに差はなく、ラセミ体と同様に cPA よりも高い活性を示した。

(1-3) 計算化学による cPA および誘導体の生理活性の解析

cPA および誘導体の ATX 結合強度について、量子化学/古典力学 (QM/MM) 計算を用いて比較・検討を行った。QM/MM 計算の結果、2ccPA は cPA や他の cPA 誘導体と比べて ATX に対する結合エネルギーが高いことが推察された。また、結合形成時に電子ドナーとなる 2ccPA の HOMO 軌道と電子アクセプターとなる ATX の LUMO 軌道のギャップ値 (HOMO/LUMO gap) も、cPA や他の誘導体と比べて小さく、阻害効果が高いことが示唆された。また、cPA および誘導体の光学異性体は、ATX に対する結合エネルギーや HOMO/LUMO gap において有意な差はなく、それぞれの光学活性部位は ATX との結合に大きく関与しないことが示唆された。

(2) PLD2 強制発現がん細胞における cPA 生成能と細胞運動能の検討

PLD2 を強制発現したヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 における①cPA 生成能、および②細胞運動能を検討した。対照細胞と PLD2 を強制発現させた細胞からそれぞれ細胞抽出液を調製し、その cPA 生成能を測定した結果、PLD2 強制発現細胞の抽出液は、対照細胞の抽出液と比べて、顕著に高い cPA 生成能を示した。また、対照細胞と PLD2 強制発現細胞の運動能を測定したところ、PLD2 強制発現細胞は、対照細胞と比べて著しく運動能が低下した。しかし、PLD2 強制発現細胞に PLD2 活性の阻害剤を添加すると、低下した運動能は対照細胞と同程度にまで回復した。

以上の結果から、2ccPA や 3ScPA は cPA よりも高い生理活性を持つことが示された。これらの cPA 誘導体は構造内に不斉炭素を持つが、それぞれの *R* 体と *S* 体間には活性の強さに有意な差は認められなかった。従って、これらの cPA 誘導体を創薬開発に向けて発展させる研究を行う上で、合成の容易なラセミ体を用いることが可能である。

また、がん細胞に PLD2 を強制発現させることで、細胞内で生成された cPA が、がん細胞の浸潤・転移を抑制する可能性を示した。これらの結果は、cPA の作用点が細胞内にも存在することを示唆しており、今後に向けて、細胞内受容体の特定を含めた詳細な機序の解明が期待される。