

リゾホスファチジン酸による細胞増殖の制御

室伏きみ子

細胞は外部からの情報刺激を受け取って、それに対応した特異的な応答を示す。情報は形質膜を介して細胞内へと伝達されるが、最近、その伝達系において、リゾホスファチジン酸 (LPA) が、セカンドメッセンジャーとして働く可能性が示された。LPA は、細胞を増殖因子で処理することによって産生され、またそれ自身でも強い細胞増殖作用をもち、細胞内 Ca^{2+} 動員を誘起する。本稿では、LPA の機能に関する最近の知見を紹介し、また、真性粘菌 *Physarum polycephalum* より単離された LPA のユニークな構造と作用、さらに考えられる生理的意義について概説する。

はじめに リゾホスファチジン酸 (LPA) は、最も簡単な構造をもつリン脂質で、ホスファチジン酸 (PA; 1, 2-ジアシルグリセロール 3-リン酸) からグリセロールの 1 位あるいは 2 位の脂肪酸が 1 個はずれたものである (それぞれ、2-アシルグリセロール 3-リン酸、1-アシルグリセロール 3-リン酸に相当する; 図 1)。天然にはごく微量しか存在せず、細胞の全リン脂質中に占める割合は、せいぜい PA の数%である。PA は普通、全リン脂質の 1~5% であるから、LPA 含量は全リン脂質の高々 0.5% 程度にすぎない。抽出操作や分離操作中のロスが大きいことから、1989 年に Das と Hajra が、合成アイソマーを内部標準として用いて、ラットの種々の組織中に含まれる LPA を効率よく定量するまでは、有意な定量はなされてこなかった。彼らの方法によって測定された LPA 含量を表 1 に示す。

リゾ体中のアシル基は、1 位、2 位の間で簡単に転位することが知られているが、天然では、1-アシルグリセロール 3-リン酸がその大部分を占めている。これは、人工的には 1-アシルリゾホスファチジルコリンからホスホリパーゼ D (PLD) によってコリンをはずしたり、PA の 2 位のアシル基をホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) で

はずしたり、また 1-アシルグリセロールをリン酸化することによって得ることができる。細胞内では、ミトコンドリアやミクロソームにおけるグリセロール 3-リン酸 (G-3-P) のアシル化、ペルオキシソームにおけるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) のアシル化および還元によってつくられることがわかっており²⁻⁴⁾、また他のリン脂質の分解によってもつくられるといわれている⁵⁾。この分解経路についてははっきりしたことはわかっていないが、増殖因子などの刺激によって PLD の活性化が引き起こされ、細胞内に PA と LPA が同時に産

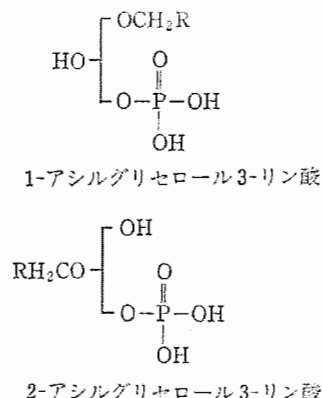


図 1. LPA の構造

Kimiko Murofushi, お茶の水女子大学理学部生物学科 (〒112 東京都文京区大塚 2-1-1) [Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan]

Regulation of Cell Proliferation by Lysophosphatidic Acid

[Key word] 【リゾホスファチジン酸】【細胞増殖】【情報伝達】

表 1. ラット組織中の LPA 含量

組 織		LPA (nmol/g)
肝	臓	60.3
腎	臓	46.4
精	巢	30.6
心	臓	22.3
肺		19.3
脳		86.2

生されることを考えると, PLD によって産生された PA に PLA₂ が働いてつくられるという経路が最も妥当かもしれない。また, 腎臓髓質のミクロソーム画分で, 生理活性リン脂質である血小板活性化因子 (PAF) からアセチルヒドロラーゼによってつくられたリゾ PAF が, リゾホスホリパーゼ D によってコリンを遊離して, LPA を生じることも報告されている⁹⁾。

近年まで, LPA は単に他のリン脂質の代謝中間物質や分解産物であると位置づけられていて, 積極的な役割をもつ物質とは考えられてこなかった。ところが, これが血小板凝集作用⁷⁾や平滑筋収縮作用⁸⁾, 強い細胞増殖促進作用^{9,10)}をもつことが報告され, また 1990 年代になって, それまでに知られていたセカンドメッセンジャーとしての PA の働きの多くの部分が, PA 標品中に混入していた微量の LPA によるところが大きいとの報告¹¹⁾もなされて, LPA の働きについての関心が高まった。そして, LPA が新しいセカンドメッセンジャーとして働く可能性が示唆され, 現在精力的に研究が進められている。LPA の作用機序についての全容が明らかになるのも遠い将来ではないであろう。本稿では, 筆者らが真性粘菌 *Physarum polycephalum* のミクソアメーバから分離・精製した新しい LPA である PHYLPA^{*1)}とその生理作用に関する知見を含めて, LPA の細胞内情報伝達系における役割について概説する。

I. LPA の細胞増殖促進作用

1989 年に, van Corven ちによって, LPA が強い増殖促進作用をもつことが報告された⁹⁾。彼らは静止期にある動物繊維芽細胞 (Rat-1 細胞や HF 細胞) に外から LPA を与えると, その DNA 合成が著しく促進されることを見いだした (図 2)。そしてその際, 少なくとも次の独立した 3 つの情報伝達カスケードが活性化させられることを示した。(1) 百日咳毒素に非感受性の G 蛋白質によって仲介されるホスホイノシチド (PI) 分解系

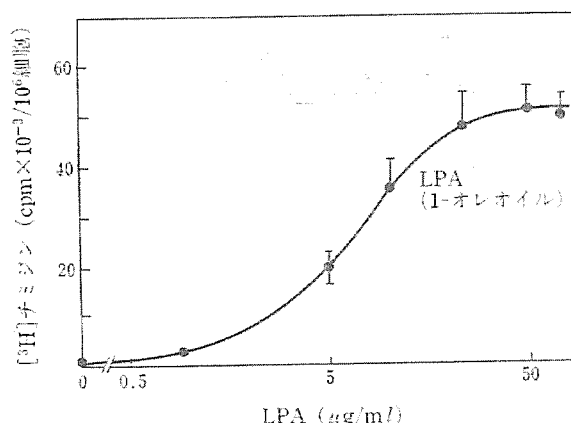


図 2. LPA による DNA 合成の促進

の活性化と, それに伴って起こる Ca²⁺ 動員, およびプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化, (2) PI 分解とは無関係な GTP 依存性のアラキドン酸 (AA) 放出, (3) アデニル酸シクラーゼを抑制する GTP 結合蛋白質 (G_i 蛋白質; これは百日咳毒素感受性) の活性化。これらのうち, (1) と (2) の応答は, 活性ペプチド・ブラジキニンを作用させることによって引き起こすことができるが, (3) および DNA 合成は引き起こされない。また, PKC をダウンレギュレートしたり, 外来性のアラキドン酸を添加しても, DNA 合成は促進されない。これらの実験事実は, LPA が G_i 蛋白質-cAMP 系を介して細胞増殖を促進し, PI 分解-PKC の経路はそれには関与しないことを示唆しており, G 蛋白質によって仲介される情報伝達系における LPA の新しい役割を示すものであろう。彼らの報告は, 静止期にある細胞に外から LPA を加えたときに, その DNA 合成が誘導されることを見ているだけで, 実際に細胞の増殖が起こっているかについては観察していない。だが, 筆者らがヒトの繊維芽細胞で確かめたところでは, LPA は DNA 合成のみならず, 間違いなく細胞数の増加を起こさせ, 増殖を促進する因子として働いている。

生理活性を有する LPA が, 細胞内でどのような経路で代謝されるかについては, van der Bend ちの報告がある。彼らは, Rat-1 細胞に [¹⁴C-グリセロール] LPA を添加して, それが速やかにモノアシルグリセロール (MG) に変化することを示した。外から加えた MG には生物学的活性はみられない。また, 少量のジアシルグリセロール (DG) の産生もみられたが, これは LPA 濃度を 100 μM にしたとき (この濃度で, 増殖促進が最大となる) にも, 細胞中のリン脂質 1 μmol あたり

*1 *Physarum* から分離されたことから PHYLPA (“フィルパ”と読んでいただきたい) と名づけた。

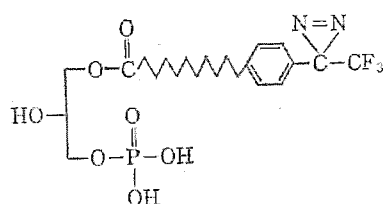
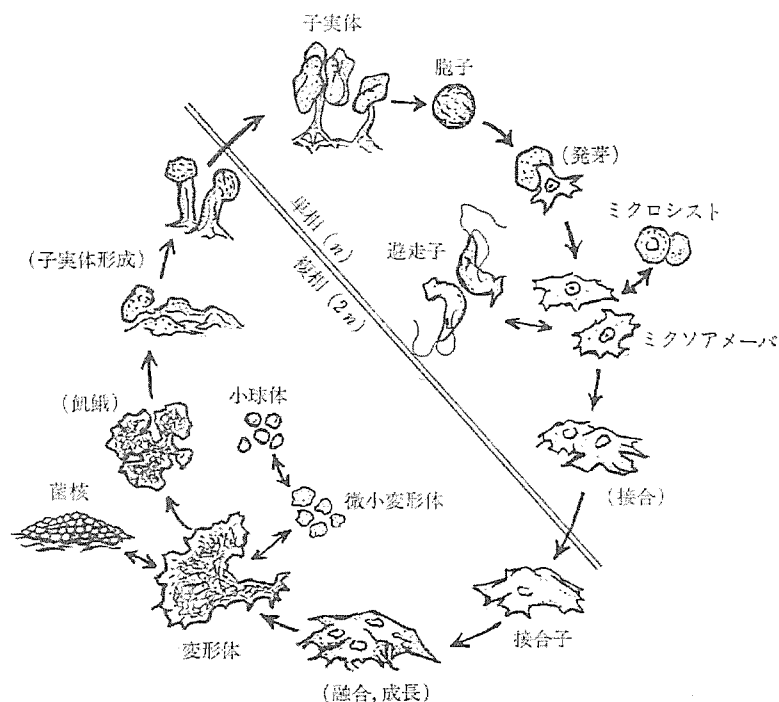


図 3. ジアジリン LPA の構造

0.8 nmol にしかすぎず、この量は静止期の細胞に含まれる全 DG の 10% でしかない¹²⁾。

彼らはまた、Rat-1 細胞で、LPA によってホスファチジルコリン (PC) の分解が促進されることを示し、それが PLD の活性化の結果であることを明らかにした¹³⁾。この活性化は、ホルボールエステルによる長時間の前処理、すなわち PKC のダウンレギュレーションによって抑制されるので、PKC 依存性の機構によって起こるものと考えられる。

1991 年に、LPA の生理作用が細胞によって異なること、LPA によって誘導される細胞内の情報伝達、ことに Ca^{2+} の動員が、ブラジヤニンなどの生理活性ペプチドによって引き起こされるものと区別されないこと、LPA を過剰に加えることによって LPA に対する反応性が脱感作されることが報告され、LPA に対する細胞の反応が受容体に仲介されるという考えが示された¹⁴⁾。翌 1992 年には、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の卵母細胞の外側に LPA を添加すると、ただちに内向き電流が生じることが示され、*Xenopus* の卵母細胞の表面に LPA の受容体が存在する可能性が示唆された¹⁴⁾。同年、同じグループが、神経細胞や癌細胞、白血病細胞や繊維芽細胞で、細胞表面に存在する 38~40 K の分子量をもつ蛋白質が、フォトアフィニティラベル用の [^{32}P]ジアジリン LPA (図 3) で標識されることを示し、これが LPA の受容体であると結論した¹⁵⁾。しかし、ジアジリンを含む脂肪酸をもったリン脂質は、これまでトポロジカルな性質や構造についての研究に用いられてきたが、細胞膜中では側方拡散して、特異的な蛋白質を標識することは困難であるとの報告がある¹⁶⁾。また、このジアジリン LPA の生理作用については、従来の LPA のそれとの詳しい比較検討もなされておらず、また、後述する PHYLPA の構造と作用とを考慮すると、脂肪酸部分に特異な構造をもったジアジリン LPA が、LPA と同じ作

図 4. 真性粘菌 *Physarum polycephalum* のライフサイクル

用をもつとは考えにくい。したがって、38~40 K 蛋白質が真に受容体であるという保証はない。細胞膜脂質の分解産物として LPA が細胞内に放出されるとしたら、LPA 受容体は、細胞膜というより細胞内に存在すると考えるほうが無理がないのではあるまいか。

しかし、活性化された血小板中で LPA が速やかに産生され^{17,18)}、他の生理活性脂質、たとえば血小板活性化因子 (PAF) やプロスタグランジンなどの脂質性アゴニストとともに細胞外に分泌されるとの報告もあり¹⁹⁾、膜の外に出た LPA がオートクライン的あるいはパラクライン的に働いて、セカンドアゴニストとして膜上の受容体を刺激するという図式も考えられなくはない。

II. 真性粘菌 *Physarum polycephalum* より分離された新規 LPA—PHYLPA

外部環境の変化に応じて、種々の形態的变化を示す真性粘菌 *Physarum polycephalum* (図 4) は、その増殖・分化に伴って膜リン脂質の組成と代謝に著しい変化をみせる。とくに、ミクソアメーバから変形体への分化に伴う PLD の活性変化は著しく、“分化”という細胞の長期的な応答に、PLD の関与する反応が重要な役割を果たしている可能性が示された²⁰⁾。また、*Physarum* の細胞周期において、PLD の活性上昇と DNA の合成反応とが同調していることがわかり、PLD の活性化に伴って

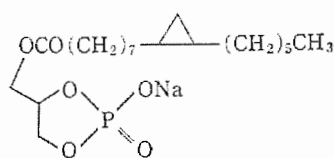


図 5. PHYLPA の構造

産生される PA や LPA が、DNA 合成の開始機構において、重要な鍵を握っている可能性が示唆された²¹⁾。PLD の細胞増殖における役割については、最近数多くの論文が発表されており、また総説も多く著されている²²⁻²⁴⁾。細胞の情報伝達系におけるこの酵素の役割が脚光をあびている。*Physarum* の増殖・分化の調節における PLD の役割については別の機会に譲ることとして、ここでは、筆者らが *Physarum* の単相体（配偶子）であるミクソアメーバから分離した新しい LPA について、その構造と働きについて述べたいと思う。

Physarum のミクソアメーバは、真核細胞の複製酵素である DNA ポリメラーゼ α と、動物培養細胞の増殖に、阻害的に働くごく微量なリン脂質を産生する。筆者らは、このリン脂質を分離・精製し、FAB/MAS (fast atom bombardment mass spectroscopy), MS/MS (tandem mass spectroscopy), IR (infrared spectroscopy), 二次元 NMR (two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy) などによって分析し、そのリン脂質がシクロプロパンを含むヘキサデカン酸をグリセロールの 1 位にもち、2 位と 3 位で環状になったリン酸をもつ新規の LPA であることを明らかにした²⁵⁾ (図 5)。PHYLPA と名づけられたこの物質は、種々の真核細胞から精製した DNA ポリメラーゼ α の活性を特異的に阻害し、修復酵素である DNA ポリメラーゼ β やミトコンドリアの酵素である DNA ポリメラーゼ γ 、さらに、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I には、まったく阻害効果を示さなかった (表 2)。阻害様式の解析の結果、PHYLPA が鋳型 DNA との間で酵素を競合することによって、DNA ポリメラーゼ α の活性を抑制することが明らかとなった (図 6)。デオキシヌクレオチドに対する親和性には何ら影響を与えなかった。

ここで、グリセロール 1 位にパルミチン酸あるいはオレイン酸をもつ従来の LPA (リン酸基はグリセロール 3 位の炭素についている) について、それらが DNA ポリメラーゼに対してどんな影響を示すかを試してみたが、DNA ポリメラーゼ α , β , γ および大腸菌 DNA

表 2. 種々の DNA ポリメラーゼに対する PHYLPA の阻害効果

DNA ポリメラーゼ	活 性 (pmol)		阻害 (%)
	-PHYLPA	+PHYLPA	
α (ヒト Raji 細胞)	50.5	6.1	88
α (仔ウシ胸腺)	44.7	4.6	90
α (<i>Xenopus</i> 卵巣)	18.6	3.0	84
α (<i>P. polycephalum</i>)	32.0	12.1	62
β (仔ウシ胸腺)	15.3	15.2	1
β (ラット卵巣)	27.9	27.1	3
γ (ヒト Raji 細胞)	12.7	11.5	9
I (<i>E. coli</i>)	67.2	62.5	7

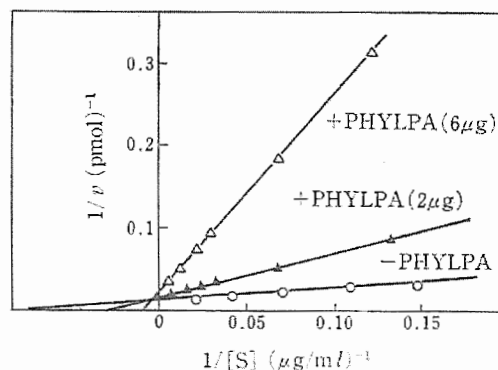
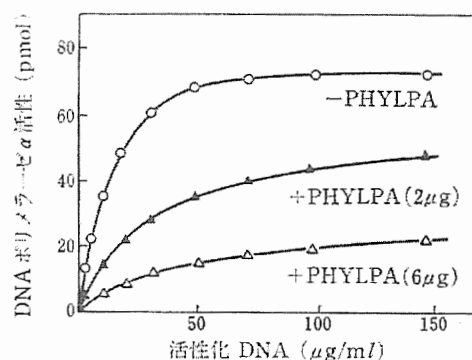


図 6. PHYLPA と鋳型 DNA との競合

ポリメラーゼ I のいずれに対しても、PHYLPA が示すような阻害効果はほとんどみられなかった (DNA ポリメラーゼ α の結果のみ図 7 に示す)。ジパルミトイル、あるいはジオレオイル PA の効果についても検討したが、それぞれ PHYLPA の 10 倍量を加えても、種々の DNA ポリメラーゼに対する顕著な阻害効果は観察されなかった。

なお、最近発見された真核細胞由来の複製酵素である DNA ポリメラーゼ δ や ϵ に対する PHYLPA の効果を調べてみたところ、DNA ポリメラーゼ α の場合と同様な結果を得た²⁶⁾。真核細胞由来の一群の複製酵素に対しては、PHYLPA はおそらく同じような作用機序で働くのであろう。現在、さらに、それらの酵素への作用の詳

細胞を検討している。

また, PHYLPA を動物の培養細胞に添加すると, 多くの細胞でその増殖が阻害される²⁷⁾ (図 8)。阻害の機構

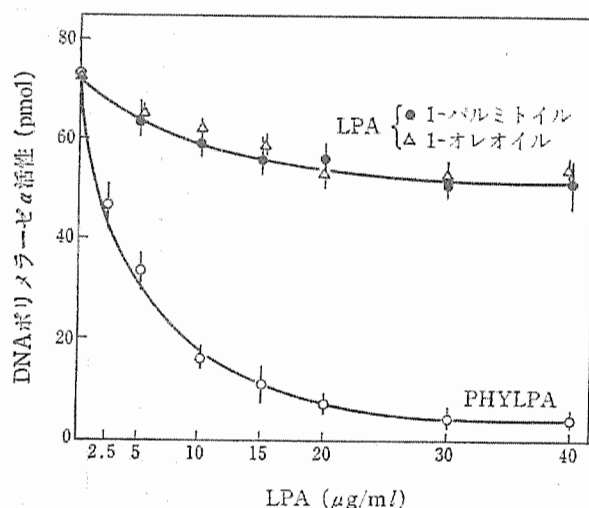


図 7. PHYLPA と従来の LPA の DNA ポリメラーゼ α 活性に及ぼす効果

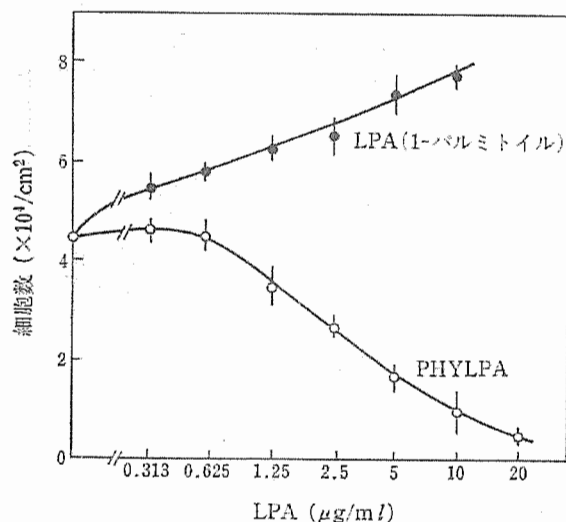


図 8. PHYLPA と従来の LPA の細胞増殖に及ぼす効果

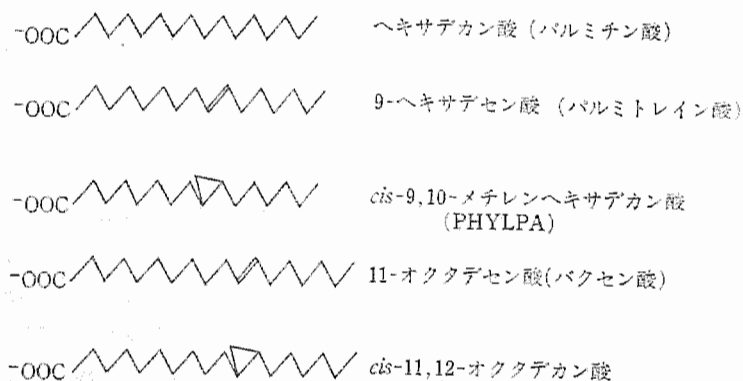


図 9. *Physarum* ミクソアメーバ由来 LPA のおもな脂肪酸分子種

についての詳細な検討はまだなされていないが, PHYLPA を細胞の外から加えると, 細胞膜を通過して細胞内へと増殖阻害の情報を伝達するのではないかと考えられる。ここでもおもしろいのは, 従来知られている LPA^{9,10)} と PHYLPA が, 細胞増殖に対してまったく異なる働きを示すことである。LPA が細胞の増殖を促進するのとはほぼ同程度の濃度で, PHYLPA は細胞増殖を阻害する (図 8 参照)。この作用の違いは, おそらく PHYLPA の非常に特異な構造 (シクロプロパンを含む脂肪酸と環状リン酸基) に由来するのであろう。これらの疑問を解くために, 筆者らは現在, PHYLPA の種々の異性体の作製を試みている。予備的な結果では, シクロプロパンを含む脂肪酸が, これらの反応において重要な働きをすることが示唆されている。また, PHYLPA の細胞内における動態や, PHYLPA の添加に伴って起こる細胞内での種々の代謝の変化についても, 明らかにする必要があろう。

Physarum ミクソアメーバは, 以上述べてきた PHYLPA とは脂肪酸部分が異なった, いくつかの LPA 分子種を産生する (図 9)²⁸⁾。また, ミクソアメーバは種々のストレスにさらされると, 細胞壁を形成して休眠状態のミクロシストに変化するが (図 4 参照), この変化に伴って, 粘菌細胞で産生される LPA の分子種に変化がみられることもわかっている。他の LPA 分子種の働きや, 細胞の状態によって分子種に違いを生ずる機序についてはまだ明らかになっておらず, 今後の研究の進展が望まれる。

おわりに LPA の機能に関するここ 2, 3 年の研究の進展はめざましく, それまで PA の夾雑物程度にしか考えられていなかったこの微量成分に人々の目が注がれ, いまやセカンドメッセンジャーの一員としての位置を確

立しつつある。また, PA や LPA を産生する酵素である PLD の活性化に関する研究も進んで, 細胞の情報伝達系におけるこれらの脂質代謝の役割がしだいに明らかになりつつある。いずれ純粋な PLD 標品が得られるであろうし, そうすれば PLD の活性化の機構を分子レベルで解析し, さらに PLD を介した情報伝達システムを遺伝子レベルで解析することも可能となるであろう。

この分野における研究は, 今後数年の

間に長足の進歩を遂げるに違いない。筆者らもその進歩にできるだけ寄与をしたいと考えている。

なお、つねに筆者らの研究に有益な助言を与えてくださる東京大学薬学部の井上圭三先生に、誌面をお借りして厚く御礼申しあげます。

文 献

- 1) Das, A. K., Hajra, A. K.: *Lipids*, **24**, 329-333 (1989)
- 2) Bell, R. M., Coleman, P. A.: *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 459-487 (1980)
- 3) Hajra, A. K., Ghosh, M. K., Webber, K. O., Datta, N. S.: in *Enzymes of Lipid Metabolism II* (eds. Freysz, L., Dreyfus, H., Massarelli, R., Gatt, S.), pp.199-207, Plenum Press, New York (1986)
- 4) Halder, D., Tso, W. W., Pullmann, M. E.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 4502-4509 (1979)
- 5) Billah, M. M., Lapetina, E. G., Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 5399-5403 (1981)
- 6) Kawasaki, T., Snyder, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **920**, 85-93 (1987)
- 7) Benton, A. M., Gerrard, J. M., Michiel, T., Kindom, S. E.: *Blood*, **60**, 642-649 (1982)
- 8) Tokumura, A., Fukuzawa, K., Yamada, S., Tsukatani, H.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **245**, 74-83 (1980)
- 9) Van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., Moolenaar, W. H.: *Cell*, **59**, 45-54 (1989)
- 10) Van Corven, E. J., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R. L., van Blitterswijk, W. J., Moolenaar, W. H.: *Biochem. J.*, **281**, 163-169 (1992)
- 11) Jalink, K., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 12232-12239 (1990)
- 12) van der Bend, R. L., de Widt, J., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., van Blitterswijk, W. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1125**, 110-112 (1992)
- 13) van der Bend, R. L., de Widt, J., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., van Blitterswijk, W. J.: *Biochem. J.*, **285**, 235-240 (1992)
- 14) Fernhout, B. J. H., Dijcks, F., Moolenaar, W. H., Ruight, G. S. F.: *Eur. J. Pharmacol.*, **213**, 313-315 (1992)
- 15) van der Bend, R. L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., van Blitterswijk, W. J.: *EMBO J.*, **11**, 2495-2501 (1992)
- 16) Brunner, J.: *Methods Enzymol.*, **172**, 628-687 (1989)
- 17) Watson, S. P., McConnell, R. T., Lapetina, E. G.: *Biochem. J.*, **232**, 61-66 (1985)
- 18) Gerrard, J. M., Robinson, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1001**, 282-285 (1989)
- 19) Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 17381-17384 (1990)
- 20) Minowa, A., Kobayashi, T., Shimada, Y., Maeda, H., Murakami-Murofushi, K., Ohta, J., Inoue, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1043**, 129-133 (1990)
- 21) Murakami-Murofushi, K., Sasaki, N.: 準備中
- 22) 金保安則・加納宏行・山田浩司: 本誌, **36**, 608-614 (1991)
- 23) 金保安則・野沢義則: 神経進歩, **36**, 466-475 (1992)
- 24) 野沢義則: 生化学, **65**, 25-29 (1993)
- 25) Murakami-Murofushi, K., Shioda, M., Kaji, K., Yoshida, S., Murofushi, H.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 21512-21517 (1992)
- 26) Murakami-Murofushi, K., Yoshida, S., Shioda, M., Murofushi, H.: 準備中
- 27) Murakami-Murofushi, K., Kaji, K., Kanou, K., Shioda, M., Murofushi, H.: 準備中
- 28) Takahashi, Y., Shimada, Y., Murakami-Murofushi, K.: *Nat. Sci. Rep. Ochanomizu Univ.*, **43**, 97-102 (1992)