

蛍光基質を用いた簡便なグリセロホスホジエステラーゼ GDE4 および GDE7 の活性測定法

北風 圭介, 坪井 一人

1. はじめに

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、真核生物の組織や血漿中に存在する脂質メディエーターとして知られている。LPA は、少なくとも 8 種類の G タンパク質共役型受容体を介して、細胞増殖、血小板凝集、平滑筋収縮、がんの浸潤・転移などさまざまな生物学的過程を制御している。LPA 生合成酵素としてはリゾホスホリパーゼ D (lyso-PLD) 型酵素である血漿中のオートタキシン (ATX) がよく知られており、リゾホスファチジルコリン (LPC) などのリゾリン脂質を加水分解することで LPA を生成する (図 1)。一方、グリセロホスホジエステラーゼ (GDE) ファミリーのメンバーである GDE4 および GDE7 は、細胞内の lyso-PLD 型酵素であり、ATX と同様の LPA 生成活性を有する。特筆すべきこととして、GDE4 と GDE7 は、酵素活性にそれぞれ Mg^{2+} と Ca^{2+} を必要とすることがあげられる。ATX, GDE4 および GDE7 は共通して LPA を産生するが、局在、二価金属イオン依存性、基質特異性などの違いから、それぞれ独自の役割を担っている可能性がある。本稿では、GDE4 および GDE7 の活性を選択的かつ簡便に測定するために我々が最近開発した、蛍光基質を用いたアッセイ系について紹介する。

2. 従来の GDE4 および GDE7 の活性測定法

近年、ATX は、がん、肝硬変、特発性肺線維症などの病態との関連で注目されていることから、ATX 阻害薬の

スクリーニングが盛んに行われている。実際に、FS-3 や CPF-4 などの蛍光基質を用いたハイスループットスクリーニングにより、多くの ATX 阻害薬が同定されている^{1,2)}。一方、GDE4 は網膜色素変性症³⁾、GDE7 は脂肪肝⁴⁾、がん再発⁵⁾、騒音性難聴⁶⁾ などへの関与が報告されている。また、GDE7 をコードする *GDPD3* 遺伝子は染色体 16p11.2 領域のブレークポイント 4-5 間に位置し、この部分のコピー数変異は精神神経疾患や肥満関連症候群の発症リスクを増大させることが知られている⁷⁾。選択的阻害薬はこうした疾患の病態理解に有用なツールになりうるが、これまでに GDE4 や GDE7 に対する阻害薬は報告されていない。阻害薬が未開発である一因として、これらの酵素活性が薄層クロマトグラフィー、遊離コリンの定量あるいは質量分析といった一度に測定できるサンプル数が限られる手法により測定されていることがあげられる⁸⁻¹⁰⁾。たとえば、筆者らが汎用している放射標識脂質を用いた測定系は感度が高いものの、酵素反応に続き、反応停止・脂質抽出、薄層クロマトグラフィー、放射線画像解析といった手順で構成されており、阻害薬探索のようなハイスループット解析への適用は難しいという問題があった。

3. 蛍光基質 FS-3 を用いた活性測定法の原理と手法

筆者らはこうした問題を解決するため、蛍光基質を用いた酵素活性測定系の確立を試み、FS-3 に着目した (図 2)。FS-3 は市販の ATX 活性測定用蛍光基質であり、分子内蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による蛍光消光モチーフを持つことを特徴とする¹¹⁾。すなわち、FS-3 に含まれる蛍光基フルオレセインは近接する消光基 DABCYL によってその蛍光が抑えられているが、ATX によって FS-3 が加水分解されると FRET が解消されて蛍光性を示すようになる。この原理により、蛍光強度の時間変化から ATX 活性をリアルタイムで定量することができる。筆者らは FS-3 がリゾリン脂質アナログであることから、この化合物は GDE4 や GDE7 の基質としても作用する可能性があると考えた。

実験に用いた酵素源としては、HEK293T 細胞にヒト

川崎医科大学薬理学教室 (〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577)
A simple enzyme assay for glycerophosphodiesterase GDE4 and GDE7 using fluorescent substrate

Keisuke Kitakaze and Kazuhito Tsuboi (Department of Pharmacology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama 701-0192, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940923

© 2022 公益社団法人日本生化学会

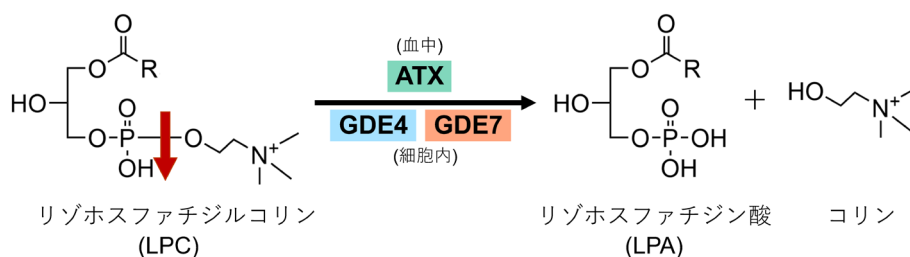


図1 オートタキシン、グリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7によるリゾホスファチジン酸産生

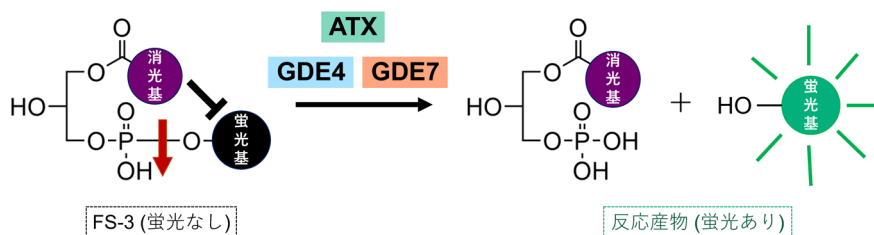


図2 FS-3による酵素活性測定の実理

GDE4あるいはGDE7を一過性に過剰発現させ、105,000gの超遠心分離により得た膜画分を用いた。また、筆者らは内在性のGDE4あるいはGDE7を高発現するヒト前立腺がん細胞株LNCaP、ヒト乳がん細胞株MCF-7の膜画分でもFS-3分解活性を測定できることを確認しており、これらの細胞株ではCRISPR-Cas9系でそれぞれGDE4あるいはGDE7をノックアウトするとFS-3分解活性は顕著に低下する。

FS-3分解活性測定の実験条件を以下に示す。1~5μgの酵素タンパク質をトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中で5μM FS-3と37℃で反応させる (図3)。筆者らは黒色の96穴プレート中で反応させており、試薬を節約するために1ウェルあたり60μLで実施している。GDE4とGDE7にはそれぞれMg²⁺あるいはCa²⁺要求性があることを利用し、GDE4活性を測りたい場合は2mM塩化マグネシウムを、GDE7活性を測りたい場合は2mM塩化カルシウムを加えることでそれぞれの活性を選択的に測定することができる。また、GDE7のFS-3分解活性は、0.1% Nonidet P-40 (NP-40) を加えることで最大5倍程度上昇することを見いだしている。一方、GDE4のFS-3分解活性は同濃度のNP-40によりほぼ完全に阻害される。なお、NP-40はGDE7の [¹⁴C] LPC分解活性に対してはむしろ阻害的に働くことを確認しており、FS-3分解活性に限定的な作用であることには注意が必要である。また、標準物質としてフルオレセインを段階希釈して用いている (50pM~5μM)。これらのサンプルと試薬の混合直後を実験時間としてプレートリーダーで蛍光 (励起波長490nm, 蛍光波長520nm) を測定し、37℃で3時間静置する。その後、プレートリーダーで再度蛍光強度を測定し、それぞれのウェルごとに3時間と

反応液組成

	GDE4	GDE7
500 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)	6 μL	6 μL
20 mM 塩化マグネシウム	6 μL	-
20 mM 塩化カルシウム	-	6 μL
1% NP-40	-	6 μL
50 μM FS-3	6 μL	6 μL
超純水	32 μL	26 μL
酵素タンパク質	10 μL	10 μL
総量	60 μL	60 μL

図3 GDE4およびGDE7の活性測定に用いる反応液の組成

0時間の蛍光強度の差をとることでFS-3分解活性を算出することができる¹²⁾。既存の手法と比較した際の長所として、(1)短時間・短工程で活性を測定できること、(2)反応停止操作が不要であり、活性をリアルタイムでもモニターできること、(3)汎用機器 (蛍光プレートリーダー) と市販の試薬で実験が行えることがあげられる。感度は放射標識脂質を用いた薄層クロマトグラフィーの方が優れているものの、本法は導入へのハードルが低く、内在性酵素の活性も十分に測定可能な感度を持っている。以上から本法はGDE4およびGDE7の活性測定における有用な選択肢といえる。

4. GDE4およびGDE7阻害薬の同定

筆者らは本FS-3分解活性測定系を用いてGDE4およびGDE7の阻害薬を探索した。種々のLPCアナログや既知のATX阻害薬を評価した結果、LPA誘導体であるBrP-

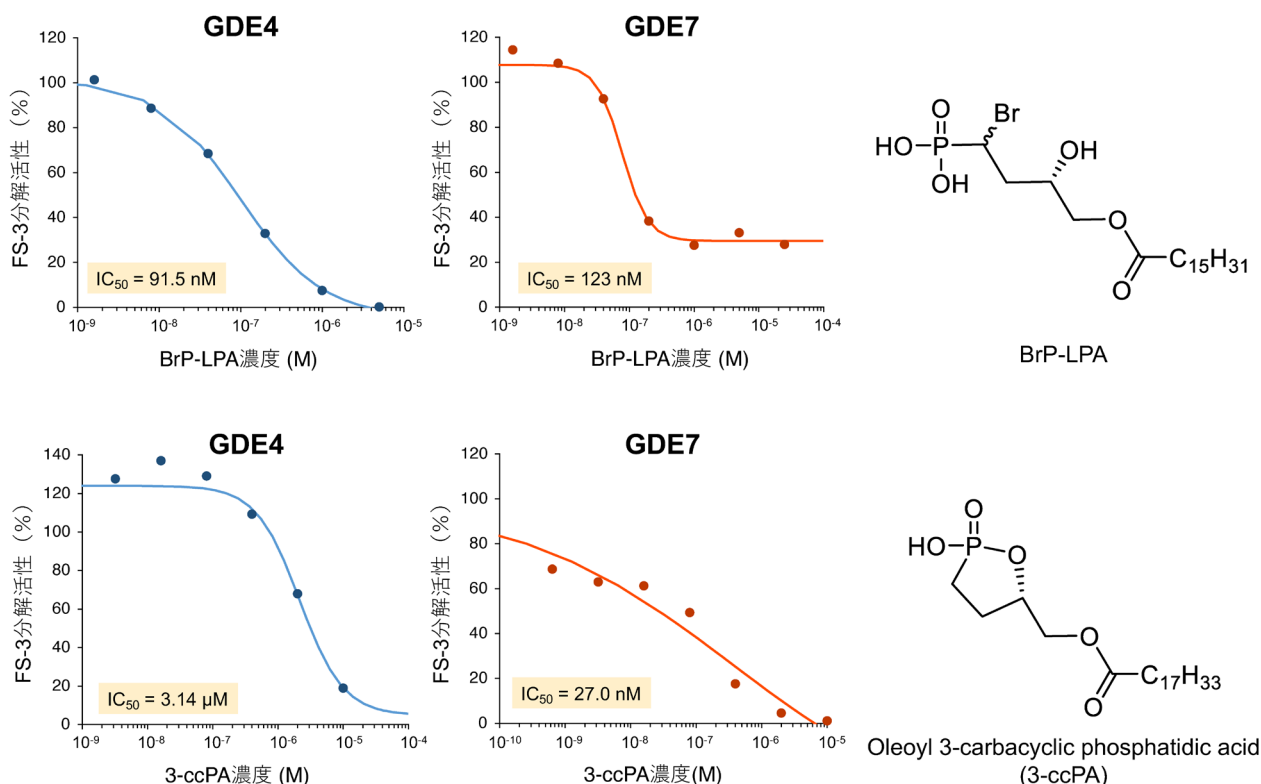


図4 BrP-LPA および 3-ccPA の構造および GDE4/7 活性の阻害 (阻害薬なしの FS-3 分解活性を 100% とした)

LPA^{13, 14)} および 3-carba-環状ホスファチジン酸 (3-ccPA)¹⁵⁾ が GDE4 と GDE7 の両者を阻害する活性を持つことを見いだした。BrP-LPA の GDE4 と GDE7 に対する IC_{50} 値は、それぞれ 91.5 nM と 123 nM であり、3-ccPA ではそれぞれ 3.14 μM と 27.0 nM であった (図4)。これらの阻害薬の ATX に対する IC_{50} 値は BrP-LPA で 22~165 nM, 3-ccPA で 294 nM と報告されている。今後、これらの阻害薬を陽性対照とすることで、より特異的に GDE4 あるいは GDE7 を阻害する化合物の発見につながる事が期待される。

5. 注意すべき点

蛍光基質 FS-3 はリゾリン脂質アナログであり、GDE4/7 以外のリゾPLDに加えて、リゾPLA₁ あるいはリゾPLC 活性をもつ酵素によっても分解され、蛍光を発する可能性がある。本法では膜画分を用いることや二価金属イオン依存性の違いを利用することで GDE4 および GDE7 への選択性を実現しているが、用いる細胞株や組織によっては他の酵素の影響も考慮すべきであろう。特に血中の遊離型 ATX が混入している可能性がある場合には、5 μM S32826¹⁶⁾ (ATX 阻害薬, IC_{50} 値 198 nM) を加えることで、GDE4/7 活性に影響することなく ATX を阻害することができる。また、阻害薬のスクリーニングの対象となる化合物の溶媒にはジメチルスルホキシド、メタノールあるいはエタノール

等が頻用されるが、FS-3 分解活性への影響を考慮し、各有機溶媒の終濃度は 0.1% 以下にすることを推奨している。加えて、FS-3 分解活性測定は一次スクリーニングとして実施し、引き続いて生体内基質である LPC などの分解活性に対する阻害効果を確認しておくのがよいだろう。

6. 今後の展望

本アッセイ系で見いだした GDE4/7 阻害薬はこれらの酵素の *in vitro* での特性評価や生物学的役割の理解を推進する上で有用なツールになりうる。これまでに、ATX により血中で生成された LPA はがんの浸潤・転移等に関与することが知られている。一方、細胞内で産生された LPA も腫瘍の表現型に影響を与えることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。近年、ATX の蛍光基質は *in vivo* 活性イメージングなどにも活用されており、本アッセイ系を発展させることで、腫瘍組織においてどの LPA 産生酵素がどの程度活性化しているかを明らかにできれば、診断や治療に貢献できるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Fells, J.I., Lee, S.C., Fujiwara, Y., Norman, D.D., Lim, K.G., Tsukahara, R., Liu, J., Patil, R., Miller, D.D., Kirby, R.J., et al. (2013) Hits of a high-throughput screen identify the hydropho-

- bic pocket of autotaxin/lysophospholipase D as an inhibitory surface. *Mol. Pharmacol.*, **84**, 415–424.
- 2) Balupuri, A., Lee, M.H., Chae, S., Jung, E., Yoon, W., Kim, Y., Son, S.J., Ryu, J., Kang, D.-H., Yang, Y.-J., et al. (2018) Discovery and optimization of ATX inhibitors via modeling, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **148**, 397–409.
 - 3) de Bruijn, S.E., Fiorentino, A., Ottaviani, D., Fanucchi, S., Melo, U.S., Corral-Serrano, J.C., Mulders, T., Georgiou, M., Rivolta, C., Pontikos, N., et al. (2020) Structural variants create new topological-associated domains and ectopic retinal enhancer-gene contact in dominant retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.*, **107**, 802–814.
 - 4) Key, C.-C., Bishop, A.C., Wang, X., Zhao, Q., Chen, G.-Y., Quinn, M.A., Zhu, X., Zhang, Q., & Parks, J.S. (2020) Human GPD3 overexpression promotes liver steatosis by increasing lysophosphatidic acid production and fatty acid uptake. *J. Lipid Res.*, **61**, 1075–1086.
 - 5) Naka, K., Ochiai, R., Matsubara, E., Kondo, C., Yang, K.-M., Hoshii, T., Araki, M., Araki, K., Sotomaru, Y., Sasaki, K., et al. (2020) The lysophospholipase D enzyme Gdpd3 is required to maintain chronic myelogenous leukaemia stem cells. *Nat. Commun.*, **11**, 4681.
 - 6) Beaulac, H.J., Gilels, F., Zhang, J., Jeoung, S., & White, P.M. (2021) Primed to die: an investigation of the genetic mechanisms underlying noise-induced hearing loss and cochlear damage in homozygous Foxo3-knockout mice. *Cell Death Dis.*, **12**, 682.
 - 7) Chung, W.K., Roberts, T.P., Sherr, E.H., Snyder, L.G., & Spiro, J.E. (2021) 16p11.2 deletion syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **68**, 49–56.
 - 8) Tsuboi, K., Okamoto, Y., Rahman, I.A.S., Uyama, T., Inoue, T., Tokumura, A., & Ueda, N. (2015) Glycerophosphodiesterase GDE4 as a novel lysophospholipase D: A possible involvement in bioactive *N*-acylethanolamine biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 537–548.
 - 9) Ohshima, N., Kudo, T., Yamashita, Y., Mariggiò, S., Araki, M., Honda, A., Nagano, T., Isaji, C., Kato, N., Corda, D., et al. (2015) New members of the mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterase family: GDE4 and GDE7 produce lysophosphatidic acid by lysophospholipase D activity. *J. Biol. Chem.*, **290**, 4260–4271.
 - 10) Rahman, I.A.S., Tsuboi, K., Hussain, Z., Yamashita, R., Okamoto, Y., Uyama, T., Yamazaki, N., Tanaka, T., Tokumura, A., & Ueda, N. (2016) Calcium-dependent generation of *N*-acylethanolamines and lysophosphatidic acids by glycerophosphodiesterase GDE7. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 1881–1892.
 - 11) Ferguson, C.G., Bigman, C.S., Richardson, R.D., van Meeteren, L.A., Moolenaar, W.H., & Prestwich, G.D. (2006) Fluorogenic phospholipid substrate to detect lysophospholipase D/autotaxin activity. *Org. Lett.*, **8**, 2023–2026.
 - 12) Kitakaze, K., Tsuboi, K., Tsuda, M., Takenouchi, Y., Ishimaru, H., & Okamoto, Y. (2021) Development of a selective fluorescence-based enzyme assay for glycerophosphodiesterase family members GDE4 and GDE7. *J. Lipid Res.*, **62**, 100141.
 - 13) Jiang, G., Xu, Y., Fujiwara, Y., Tsukahara, T., Tsukahara, R., Gajewiak, J., Tigyi, G., & Prestwich, G.D. (2007) α -Substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem*, **2**, 679–690.
 - 14) Zhang, H., Xu, X., Gajewiak, J., Tsukahara, R., Fujiwara, Y., Liu, J., Fells, J.L., Perygin, D., Parrill, A.L., Tigyi, G., et al. (2009) Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration *in vitro* and causes tumor regression *in vivo*. *Cancer Res.*, **69**, 5441–5449.
 - 15) Baker, D.L., Fujiwara, Y., Pigg, K.R., Tsukahara, R., Kobayashi, S., Murofushi, H., Uchiyama, A., Murakami-Murofushi, K., Koh, E., Bandle, R.W., et al. (2006) Carba analogs of cyclic phosphatidic acid are selective inhibitors of autotaxin and cancer cell invasion and metastasis. *J. Biol. Chem.*, **281**, 22786–22793.
 - 16) Ferry, G., Moulharat, N., Pradere, J.-P., Desos, P., Try, A., Genton, A., Giganti, A., Beucher-Gaudin, M., Lonchampt, M., Bertrand, M., et al. (2008) S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **327**, 809–819.
 - 17) Bektas, M., Payne, S.G., Liu, H., Goparaju, S., Milstien, S., & Spiegel, S. (2005) A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *J. Cell Biol.*, **169**, 801–811.
 - 18) Stewart, J.D., Marchan, R., Lesjak, M.S., Lambert, J., Hergenroeder, R., Ellis, J.K., Lau, C.-H., Keun, H.C., Schmitz, G., Schiller, J., et al. (2012) Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8155–8160.
 - 19) Marchan, R., Büttner, B., Lambert, J., Edlund, K., Glaeser, I., Blaszkewicz, M., Leonhardt, G., Marienhoff, L., Kaszta, D., Anft, M., et al. (2017) Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 promotes tumor cell migration and poor survival in ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, **77**, 4589–4601.

著者寸描

●北風 圭介（きたかぜ けいすけ）



川崎医科大学医学部薬理学 助教。博士（薬科学）。

■略歴 2011年徳島大学薬学部卒業。16年同大学院博士後期課程修了。同年徳島大学先端酵素学研究所特任研究員。19年より現職。

■研究テーマと抱負 小胞体におけるストレス応答や脂質代謝の破綻が疾患発症にどのように関わるのかを解明したい。

●坪井 一人（つばい かずひと）



川崎医科大学医学部薬理学 准教授。博士（薬学）。

■略歴 1974年奈良市に生る。96年京都大学薬学部卒業。2001年同大学院薬学研究科博士課程修了。香川大学医学部（助手，助教），米国イリノイ大学シカゴ校（学振海外特別研究員）を経て，17年より川崎医科大学医学部講師。21年より現職。

■研究テーマと抱負 受容体・代謝・シグナル伝達と，脂質メデイエーターの生理的役割の解明を目指して様々な側面からアプローチしてきました。日々の研究が人類の健康増進に貢献出来ることを願っております。

■ウェブサイト <https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=205>

<https://kms-pharmacol.wixsite.com/website>

■趣味 昼休みエクササイズ。