

氏名	ENDANG RINAWATI PURBA
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第157号(文部科学省への報告番号甲第539号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2014年12月17日
学位論文題目	Phosphatase activity of soluble Epoxide Hydrolase (sEH)
論文審査委員	(主査) 教授 大谷 清 (副査) 教授 今岡 進 准教授 関 由行

可溶性エポキシド加水分解酵素 (soluble Epoxide Hydrolase, sEH) は生体中で反応性の高いエポキシドを加水分解する酵素として発見された。この酵素の生体内基質として、アラキドン酸から生成するエポキシドである epoxyeicosatrienoic acid (EET) が見出された。EET は血管内皮由来過分極因子 (EDHF) の候補として報告されるなど、その生理活性が注目されている物質である。一方、この酵素の最近の構造研究から、sEH の C-末端ドメインがエポキシド加水分解活性を、N-末端が脱リン酸化 (phosphatase) 活性を持つことが報告された。研究室の先行研究において、この酵素の脱リン酸化活性の内在性の基質として、lysophosphatidic acid (LPA) が発見された。さらに、先行研究において、EET や LPA ががん細胞の増殖に関わっていることや sEH の活性が同様にがん細胞の増殖や増殖因子の発現量に変化を与えることを明らかにしている。これらのことから、sEH は発生過程における細胞の分化・増殖に関わっている可能性や人の病気に関わっている可能性が示唆された。そこで、本研究では、発生のモデル動物であるアフリカツメガエル sEH cDNA を単離して、大腸菌で発現・精製し、その酵素活性をヒトのものと比較した。一方ヒトにおいて報告されている変異体 sEH について、その活性を検討した。

## 論文内容の要旨

この論文は2章から成る。第1章ではアフリカツメガエルの sEH の酵素活性の検討と発生過程における発現量や部位の検討を行った。第2章ではヒトの sEH 遺伝子多型による活性の違いの検討を行った。第1章ではアフリカツメガエルの sEH の酵素活性を検討した。エポキシドヒドロラーゼは、その名前の通り、化学反応性の高いエポキシドを加水分解しジオールにする酵素として発見された。エポキシドヒドロラーゼには小胞体膜に存在するものと細胞質に存在する sEH があり、膜に存在するタイプはいわゆる発がん性のエポキシ体の代謝に関わっている。sEH は外来性のエポキシドも代謝するが、先に述べたように内在性の生理活性を持つエポキシドを代謝することやリン脂質である LPA を代謝することから、その生理作用が注目されている。最近、研究室の先行研究によって sEH が血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現調節やがん細胞の増殖に関わっていることを明らかにした。このことから sEH が発生・分化に関わっている可能性が示唆されるが、これまでは明らかにされていない。そこで本研究において、発生のモデル動物であるアフリカツメガエルの sEH について、その酵素学的性質を明らかにした。まずアフリカツメガエルのエンブリオ (オタマジャクシ) からアフリカツメガエル sEH (*Xenopus* sEH, xsEH) cDNA を単離し、大腸菌でタンパク質を発現してから精製した。精製酵素について活性を測定したところ、合成基質である 3-phenyl-cyano

(6-methoxy-2-naphthalenyl) methyl ester-2-oxiraneacetic acid (PHOME) に対するエポキシドヒドロラーゼ活性は有するものの、合成基質である4-methylumbelliferyl phosphate に対する脱リン酸化活性は検出されなかった。そこで GenBank のデータベースから xsEH cDNA の配列を検索したところ、すでに報告されている塩基配列から予想されるアミノ酸配列と29番目 Thr が Asn に、146番目の Arg が His に置換されていることが明らかとなった。研究室で使用している何匹かの個体について cDNA 塩基配列を決定したが、すべて今回単離したものと同一であり、今回使用したコロニーは、今回単離した配列の sEH を持つことが予想された。一方ですでに報告されている配列を有する xsEH もアミノ酸置換によって作成し、活性を測定したが、脱リン酸化活性は検出されなかった。さらに、脱リン酸化活性を有するヒト sEH とのアミノ酸配列比較によって脱リン酸化活性に必要な11番目の Gly から Asp への置換が見られたため、同様にアミノ酸置換体を作成したが、脱リン酸化活性は検出されなかった。4-methylumbelliferyl phosphate については反応緩衝液の種類、塩濃度、pH をさまざまに変えて検討したが、やはり活性は検出されなかった。一方、内在性の基質である EET, LPA についても同様に活性を検討したが EET についてはヒトと同等の活性があるにもかかわらず、LPA については活性が検出されなかった。このことから xsEH はリン酸化活性を持たないかまたはヒトとは異なる基質を有していることが示唆された。一方、発生過程における xsEH の発現量の変化や発現部位についても検討した。mRNA レベル、タンパク質レベルにおいても、受精時 stage 0 から尾芽胚 stage 38 までに、発現が増加していた。一方、尾芽胚 stage 30 における発現部位の検討を WISH で行ったところ、嗅板、咽頭腔、心臓、眼胞、耳胞、脊索に発現が見られ、特に頭部付近に強い発現が見られた。

第2章では、ヒト sEH の遺伝子多型による活性の違いを検討した。ヒトの遺伝子多型変異体には K55R, R103C, C154Y, R287Q, V422A, E470G の6種類が報告されている。この中で、R287Q においてはII型糖尿病患者におけるインスリン抵抗性の増大や、脳梗塞のリスクが低いことなどが報告されている。本研究ではこれら遺伝子多型変異体を大腸菌で発現・精製して、遺伝子多型が LPA に対する脱リン酸化活性に与える影響を検討した。その結果 R103C と R287Q において、Stearoyl-LPA, Arachidonoyl-LPA に対する活性が顕著に低下していた。一方これらの遺伝子多型変異体をがん細胞に過剰発現して VEGF の発現量変化を検討した。その結果、野生型では VEGF 発現抑制が見られ、V422A 以外の変異体では同様の影響が見られた。以上の結果から、これらの遺伝子多型と病態との関係には、LPA 代謝活性の低下が関わっている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文では可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) の酵素活性及び機能について検討した。これまでヒトの sEH はがんの増殖や血管新生に関わることが報告されており、発生過程においても何らかの働きをしていることが考えられる。しかし、この酵素は EET, LPA などの生理活性物質を代謝しているものであり、これらの物質の合成系も同時に検討する必要がある、ノックアウトなどの単純な手法ではその機能の解析が難しい。本研究では発生のモデル動物であるアフリカツメガエルの sEH について、酵素活性と発生過程における発現量の変化および各組織における発現を初めて明らかにした。この成果は第1章に述べられている。さらに、ヒトの sEH の機能については、sEH の遺伝子多型変異体について活性を検討している。sEH の遺伝子多型と糖尿病や虚血性脳梗塞などの病態との関係性については数多くの報告があるが、そのメカニズムについては明らかではない。そこでこれまで報告されている6種類の sEH の遺伝子多型変異体を作成し、すでに明らかにされている基質である EET 類, LPA 類についてその代謝活性を明らかにした。さらにがん細胞に sEH の遺伝子多型変異体を過剰発現して、血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を検討した。この成果は第2章に述べている。第1章の成果は査読付き論文である *Biochimica et Biophysica Acta Molecular*

and Cell Biology of Lipids に報告し、第2章の成果は査読付き論文 Drug Metabolism and Phamacokinetics に報告した。さらに、これらの成果は国内外の学会においても報告している。審査委員は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容や用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認した。以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定する。