

Assay System for *N*-acylethanolamines Degradation Enzyme, *N*-acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase

Dae-Woong Kim¹, Gun-Joong Kim², Hae-Jo Kim² and Sung-Ho Ghil^{1,†}

¹Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

²Department of Chemistry, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea

N-acylethanolamines (NAEs) including endocannabinoids, anandamide, are long chain fatty acid ethanolamines and express ubiquitously in animal and plant tissues. NAEs have several pharmacological effects including anti-inflammatory, analgesic and anorexic effects. The levels of NAEs in tissues are strictly regulated by synthesizing and hydrolyzing enzymes because NAEs are not stored in the cell but rather made on demand. NAEs are hydrolyzed to free fatty acids and ethanolamines by fatty acid amide hydrolase and *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). Here, we suggest the fluorescence-based assay system for NAAA. We developed *N*-(4-methy-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)palmitamide (PAAC) as a fluorogenic substrate for NAAA and we also generated NAAA stably expressing COSM6 cell line. When extracts of cells expressing NAAA were incubated with PAAC, NAAA specifically hydrolyzed PAAC to palmitic acids and fluorogenic dye, coumarin. Release of coumarin was monitored by using fluorometer. NAAA hydrolyzed PAAC with an apparent K_m of 20.05 μ M and V_{max} of 32.18 pmol/mg protein/min. This assay system can be used to develop inhibitors or activators of NAAA.

Key Words: Coumarin, Endocannabinoid, *N*-acylethanolamines, *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, Substrate

본 문

N-acylethanolamines (NAEs)은 긴 지방산 사슬을 가진 ethanolamine이며, 동물 및 식물 조직에 존재하는 생활성 지질의 일종이다. 동물에서는 *N*-palmitoylethanolamine (NPE)이 처음 난자의 난황으로부터 분리됐고(Kuehl et al., 1957), 처음으로 알려진 이들의 약리학적 효과는 항염증효과였다(Ganley et al., 1958). NAEs는 불포화(polyunsaturated) NAEs, 포화(saturated) NAEs 그리고 단일불포화(monounsaturated) NAEs로 구분된다. 포유동물 조직에서 많은 량 발현되는 대표적인 NAEs는 NPE, *N*-stearoylethanolamine (NSE), *N*-oleoylethanolamine (NOE), *N*-

linoleoylethanolamine (NLE) 그리고 *N*-arachidonoyl-ethanolamine (anandamide) 등이다(Ueda et al., 2010). 불포화 NAEs의 대표적인 물질인 anandamide는 내인성카나비노이드(endocannabinoids)의 일종이며, G-단백질 연결수용체(G-protein coupled receptor, GPCR)인 카나비노이드수용체(cannabinoid receptor, CB)에 결합하여 G-단백질을 활성화시킴으로서 그 정보를 세포 내로 전달한다(Sugiura et al., 2006). CB와 결합하지 않는 NAEs인 NPE는 항염증효과 및 진통효과 등을 나타내며(Lambert et al., 2002), NOE는 식욕억제효과를 보인다(Rodriguez de Fonseca et al., 2001; Lo Verme et al., 2005). 또한 이들은 모두 peroxisome proliferator-activated receptor- α 와 GPCR인 GPR119와 결합하여 그 활성을 나타낸다(Overton et al., 2006).

Anandamide를 비롯한 NAEs는 세포에 저장되지 않고, 필요에 의해(on demand) 이들의 합성 및 분해효소에 의해 그 양이 조절된다. 따라서 최근에는 이들의 약리학적 효과를 밝히는 연구와 더불어 NAEs의 합성 및 분해를 조절하는 효소들의 활성 기전 연구, 이들 효소들의 활성 분석법 연구 그리고 이를 이용한 활성 조절제 개발 연구

*Received: August 21, 2012 / Revised: September 21, 2012

Accepted: September 21, 2012

†Corresponding author: Sung-Ho Ghil. Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea.

Tel: +82-31-249-9646, Fax: +82-31-249-9646

e-mail: shghil@kgu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

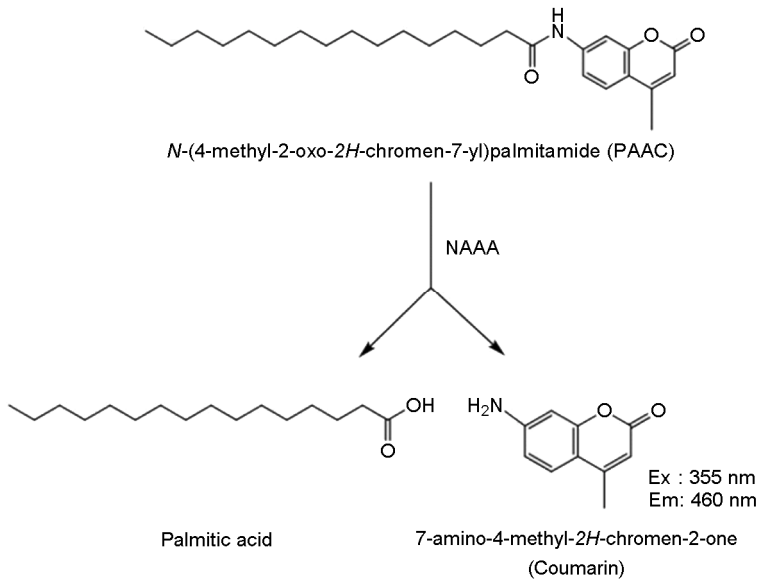


Fig. 1. Mechanism schematic of NAAA reaction which catalyzes the hydrolysis of PAAC into palmitic acid and coumarin. Reaction was monitored by fluorometer with excitation at 355 nm and emission at 460 nm.

들이 중요한 연구주제로 대두되고 있다(Di Marzo, 2008). NAEs의 분해효소로 가장 잘 알려진 효소는 fatty acid amide hydrolase (FAAH)이며, 주로 anandamide의 분해효소로 잘 알려져 있다(Ahn et al., 2007). 또한 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 NAEs 분해효소 중 하나가 N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA)이며, 2005년 일본 Ueda 그룹에서 생쥐와 인간의 유전자로부터 클로닝되었다. 특히, NAAA는 FAAH와 상동성을 가지지 않는 전혀 다른 유전자로 보고되었다(Tsuboi et al., 2005). NAAA는 주로 탄소 개수 12개에서 20개를 갖는 NAEs의 가수분해를 유도하며 특히 NPE에 대한 활성이 가장 높았다. 또한 NOE와 anandamide에 대해서도 활성을 나타낸다(Ueda et al., 2010).

최근 FAAH의 활성 억제제 발굴을 위한 연구가 많이 진행되어 잠재력 있는 활성 억제제가 개발되었으나(Di Marzo, 2008; McKinney and Cravatt, 2005; Cravatt and Lichtman, 2003), NAAA의 억제제 개발은 아직 초기단계에 머무르고 있다. 그 이유는 아직까지 NAAA의 효과적인 활성 분석법이 개발되지 못한데 기인한 것이라 생각된다.

본 연구에서는 NAAA의 활성 분석법을 개발하기 위해 다음과 같은 방법으로 형광기질[N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl) palmitamide, PAAC]을 제작하였다. 질소 환경 하에서 palmitic acid (128.2 mg, 0.5 mmol), oxalyl chloride (50 ml, 0.6 mmol)와 dimethylformamide (4.6 ml, 0.06 mmol)를 dichloromethane (2 ml)와 혼합한 후, 상온에서 1시간

동안 교반하였다. 이 용액을 7-Amino-4-methylcoumarin (87.6 mg, 0.5 mmol)과 triethylamine (70 ml, 0.5 mmol)가 혼합되어 있는 dichloromethane (1 ml)과 재차 혼합하고, 0°C에서 24시간 동안 교반하였다. 이 혼합물에서 ethyl acetate/hexane (v/v, 1:1)을 전개용매로한 컬럼 크로마토그래피를 이용해 원하는 화합물을 확보하였다(161 mg, 78% yield). 확보된 화합물은 자기공명장치를 이용하여 합성여부를 확인하였다. 이와 같이 제작된 PAAC가 NAAA와 반응하게 되면, palmitic acid와 형광물질인 coumarin으로 분해될 것이며[Fig. 1], 반응 후 형광강도기를 이용해 생성된 coumarin의 형광강도를 측정하면 NAAA의 활성 정도를 추적할 수 있다. 본 연구에서 기질로 palmitic acid를 사용한 이유는 이전 타 연구자의 보고에서 NAAA는 NAEs 중 탄소 16개를 가진 포화 지방산인 NPE에 가장 효과적으로 작용했기 때문이다(Ueda et al., 2010).

본 연구에서 NAAA의 활성 분석법을 개발하기 위해, NAAA를 영구적으로 발현되는 세포주(stable cell line)의 추출액을 이용하고자 하였다. 이를 위해 먼저 세포에 NAAA를 발현시킬 수 있고 발현여부를 검증할 수 있도록 발현벡터를 제작하였다. 인간 NAAA cDNA를 포함하는 발현벡터(pcDNA3.1-NAAA)는 일본 Kagawa 대학의 Ueda박사로부터 공여받았다(Tsuboi et al., 2005). FLAG epitope이 NAAA의 N-말단에 inframe으로 발현되는 발현 벡터(pcFLAG-NAAA)를 제작하기 위해, pcDNA3.1-NAAA 발현벡터를 주형으로 하고, 프라이머(5'-AAA GGA TCC ATG CGG ACC GCC GAC CGG GAG-3'과 5'-AAA GAA

TTC TTA CTT TCT ACT CGG GTT TCT-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생성물을 pcFLAG 발현벡터에 *Bam*HI과 *Eco*RI 제한효소를 사용하여 삽입하였다.

본 연구에서 사용된 세포는 293T와 COSM6이며, 다음과 같이 배양하고 발현벡터를 각각의 세포에 transfection

하였다. 두 세포 모두 DMEM (Hyclone, South Logan, UT)에 10% 우태아혈청, 100 U/ml penicillin, 그리고 100 µg/ml streptomycin이 포함된 배지에서 37°C와 5% CO₂ 존재 하에서 배양하였으며, 293T 세포의 transfection은 calcium-phosphate 방법을 이용하였다(Kim et al., 2010). 이를 간단

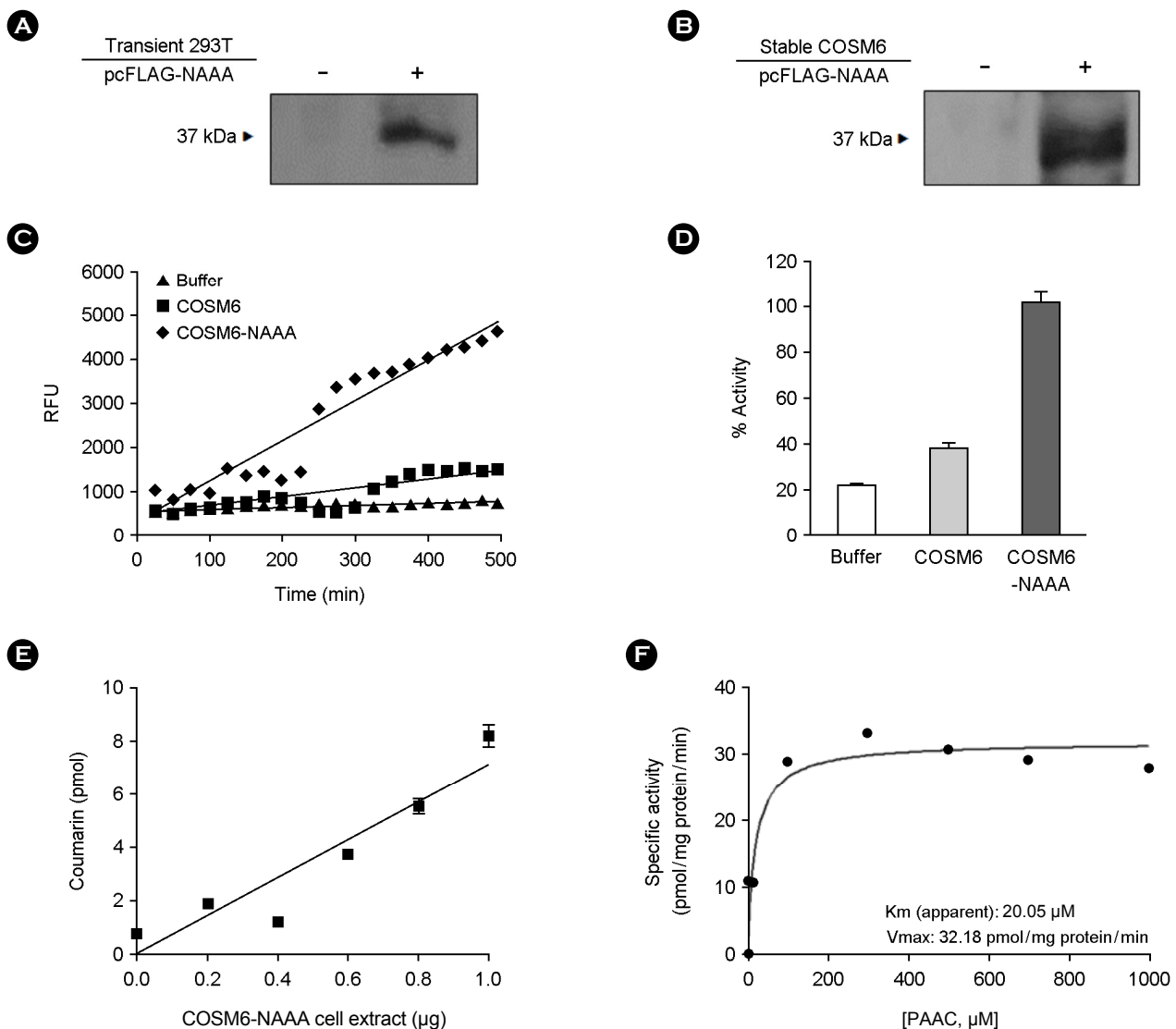


Fig. 2. Activity assay for NAAA. (A) Lysates (50 µg) of 293T cells transiently transfected with 10 µg of pcFLAG-NAAA plasmid were subjected into Western blot analysis using FLAG antibodies. (B) COSM6 cells were transfected with 10 µg of pcFLAG-NAAA. After 40 h transfection, the cells were treated with 1.2 mg/ml of Geneticin. After incubation for 2 weeks, 50 µg of lysates were subjected into Western blot analysis using FLAG antibodies. (C) Either COSM6 extracts (1 µg, COSM6) or FLAG-NAAA expressing COSM6 extracts (1 µg, COSM6-NAAA) were added into reaction buffer containing in 300 µM of PAAC in total volume of 21 µl in 384-well black plate. The reaction was carried out at 25°C for 495 min in fluorometer. The reaction buffer (Buffer) was used for negative control for reaction. (D) At 495 min of reaction time, the relative activities of buffer and COSM6 were calculated based on setting COSM6-NAAA activity at 100%. (E) PAAC (300 µM) was incubated with increasing amounts (ranging from 0 to 1 µg) of cell extracts of COSM6-NAAA in reaction buffer at 25°C for 495 min. (F) NAAA activity was measured in reaction buffer containing COSM6-NAAA cell extracts (1 µg) and indicated concentration of PAAC (ranging from 0 to 1,000 µM) at 25°C for 495 min. Released of fluorescence at 460 nm was monitored. The data were analyzed using Microsoft Excel and Graphpad prism (version 5.01) based on the Michaelis-Menten equation.

히 설명하면, 먼저 세포를 100 mm 배양용기에 1.5×10^6 세포수가 되도록 분주하여 18~24시간 동안 배양하였다. 발현백터를 62 μ l의 2 M CaCl_2 와 혼합하고 동량의 2X HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4)와 다시 혼합하였다. 이 DNA 혼합용액을 30분간 상온에 정치한 후, 세포 배양액에 첨가하여 반응시켰다. COSM6 세포의 경우, polyethylenimine (PEI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)을 이용하여 transfection 하였다. 발현백터를 DMEM과 혼합하여 800 μ l가 되도록 한 후, 20 μ g의 PEI를 첨가했다. 이 용액을 30분간 상온에서 방치한 후, 세포 배양액에 첨가하였다.

pcFLAG-NAAA 발현백터(10 μ g)을 293T 세포에 일시적으로 발현시키고 세포를 수거하여 PBTX 용액(1% TritonX-100과 단백질 분해효소 억제제가 포함된 인산염 완충액)에 4°C에서 1시간 반응시킨 후, 세포 추출액 50 μ g을 이용하여 단백질 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 단백질을 poly-vinyl difluoride membrane에 옮겨 FLAG에 대한 항체(Sigma-Aldrich)를 사용하여 Western blot 분석을 수행한 결과, FLAG-NAAA 단백질이 37 kDa 부근에서 정상적으로 발현되었다[Fig. 2A]. 다음은 COSM6 세포에 FLAG-NAAA를 안정적으로 발현하는 세포주를 제작하기 위해, pcFLAG-NAAA 발현백터(10 μ g)를 COSM6 세포에 transfection하고 40시간 후 1.2 mg/ml의 Geneticin (GIBCO, Carlsbad, CA)을 처리하였다. 2주 후에 세포를 수거하여 FLAG 항체를 이용해 Western blot 분석을 수행하여 FLAG-NAAA가 COSM6 세포에 안정적으로 발현됨을 확인하였다[Fig. 2B].

FLAG-NAAA 단백질이 안정적으로 발현된 세포주(COSM6-NAAA) 추출액과 형광기질을 반응시켰을 때, 형광기질이 분해되어 형광을 발현하는지를 확인하기 위해, 반응액(Buffer), COSM6 세포(COSM6)의 추출액(1 μ g) 및 COSM6-NAAA (1 μ g)의 추출액 각각을 형광기질 (300 μ M)과 반응시켜 형광기질의 분해 정도를 반응시간 별로 형광강도 측정기를 이용하여 확인하였다. 이때, 세포 추출액은 각각의 세포로부터 다음과 같은 방법으로 분리하였다. COSM6와 COSM6-NAAA 세포를 각각 인산염완충 용액을 사용하여 수거하고 초음파분쇄기로 15초 동안 3회 초음파를 가하였다. 분쇄된 세포용액을 원심분리하고 (12,000 X g, 4°C, 30분), 상등액을 얻어, 액화질소를 이용하여 급속 냉동과 해동을 2회 반복하였다. 세포 추출액 분리를 위해 재차 원심분리(105,000 X g, 4°C, 50분)하고 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. 세포 추출액과 기

질의 반응에 사용했던 반응용액은 50 mM Tris pH 8.0 용액에 0.1% NP-40가 첨가된 용액이었으며, 서로 다른 농도의 세포 추출액과 각기 다른 농도의 PAAC 기질을 첨가하여 용액의 총 부피가 21 μ l가 되도록 384 black plate에 조성하고 형광강도 측정기(VICTOR™X2, Perkinelmer, Waltham, MA)를 이용하여 25°C에서 형광강도를 측정하였다. 결과값에 대한 분석은 Microsoft Excel과 Graphpad prism (version. 5.01) 프로그램을 이용하였다.

COSM6-NAAA 세포 추출액과 형광기질을 반응시킨 경우, 반응시간이 증가할수록 형광강도의 세기(RFU)가 증가하는 양상을 보였다. 그러나 반응액 및 COSM6 추출액을 반응시킨 경우 반응시간이 증가하여도 RFU는 큰 변화를 보이지 않았다[Fig. 2C]. Fig. 2C의 결과에서 반응시간 495분에서 나타난 COSM6-NAAA 세포 추출액의 RFU를 100%로 하여 동일시간대의 대조군들의 RFU와 비교한 결과, COSM6-NAAA 세포 추출액을 사용했을 경우, 대조군들에 비해 월등히 높은 결과를 보였다[Fig. 2D]. 이는 COSM6-NAAA 세포 추출액에 포함된 NAAA가 특이적으로 PAAC와 반응하여 coumarin을 생성하였음을 의미한다. 다음은, COSM6-NAAA 세포 추출액 농도를 증가시키면서(0~1 μ g) 동량의 PAAC (300 μ M)와 반응시켜, 세포 추출액 내에 존재하는 NAAA에 의해 PAAC가 분해되어 얼마나 많은양의 coumarin이 생성되지를 확인하였다[Fig. 2E]. 이 실험을 위해, 먼저 coumarin의 농도에 따른 형광강도를 형광강도 측정기를 이용하여 측정하고 표준곡선을 그린 후, 실험상 나타난 형광강도를 coumarin 농도로 치환하여 그래프로 나타내었다. 반응시킨 세포 추출액의 농도가 증가할수록 효소 반응에 의해 생성된 coumarin의 농도가 증가함을 확인하였다. 따라서 세포 추출액에 포함된 NAAA의 농도가 증가할수록 더 많은 양의 coumarin이 반응 생성물로 나타남을 확인하였다. 이상의 실험결과로 PAAC가 NAAA의 활성을 측정할 있는 적절한 형광기질임을 확인하였다. 또한 PAAC 자체는 형광을 발현하지 않고, NAAA에 의해 분해되었을 경우에만 형광을 발현하는 것을 알 수 있었다.

PAAC가 NAAA에 의해 분해되는 동역학적인 특성을 분석하기 위해, 1 μ g의 COSM6-NAAA 세포 추출액과 서로 다른 농도의 PAAC 기질(0~1,000 μ M)을 495분 동안 반응시켜 Michaelis-Menten 방정식을 이용해 Km 및 Vmax 값을 산출한 결과, 각각 20.05 μ M과 32.18 pmol/mg protein/min 이었다[Fig. 2F].

효소의 활성 측정법을 개발하기 위해 우선 고려해야

할 것은 기질의 화학적 구조가 효소의 활성부위에 적절하게 결합하여 생성물을 만들어 낼 수 있는가 일 것이며, 또한 중요한 사항 중에 하나가 기질의 특성이 효소의 활성 측정에 용이하며 그 실험방법이 간단한가 일 것이다. 특히 최근에는 고속처리검색(high throughput screening)이 가능한 기질을 개발하는 것이 효소의 활성 조절제 개발에 큰 화두이므로 형광기질은 그 좋은 재료가 되고 있다. FAAH의 활성분석 시스템의 경우, 동위원소 및 발색기질 등을 이용한 활성분석 시스템이 개발되어 문헌에 보고되어 있으나(Deutsch and Chin, 1993; Omeir et al., 1995; Maccarrone et al., 1999; Patricelli and Cravatt, 2001; Wilson et al., 2003; Boldrup et al., 2004), 실제로 이들은 고속처리검색에 적합하지 않기 때문에 응용적인 측면에서 그 실효성이 낮은 것으로 보고되고 있다. 2005년 Wyeth 연구소 Clark 그룹에서 형광기질인 arachidonoyl 7-amino-4-methylcoumarin amide (AAMCA)를 이용한 FAAH 활성분석 시스템을 개발하였고(Ramarao et al., 2005), 그 후, AAMCA는 여러 문헌에서 활성 억제제를 탐색 및 발굴할 수 있는 기질로 이용되었다(Wang et al., 2006; Rahn et al., 2011). 또한 최근 본 연구팀에서도 FAAH의 형광기질을 이용하여 활성분석 시스템을 개발하여 보고한 바 있다(Kim et al., 2010). 본 연구를 통해 개발된 활성분석 시스템 역시 형광기질을 이용하여 측정방법이 간단하고, 많은 량의 시료를 동시에 분석할 수 있어 고속처리검색이 가능하다.

FAAH는 1996년 클로닝되어(Cravatt et al., 1996), 내인성 카나비노이드 분해효소로 알려졌다. 특히 내인성 카나비노이드는 매우 다양한 약리학적 효과를 가지고 있기 때문에 이 분해효소의 활성을 조절할 수 있는 약제의 개발은 큰 의미를 갖게 되므로 지금까지 상당히 많은 연구가 진행된 바 있다. FAAH와는 다르게, NAAA의 경우 2005년 클로닝되었고(Tsuboi et al., 2005), 내인성 카나비노이드를 분해할 수 있는 기능도 가지고 있으나, FAAH보다는 그 효과가 적다고 알려졌다(Tsuboi et al., 2007). 지금까지 NAAA는 불포화 NAEs인 내인성 카나비노이드보다는 포화 및 단일불포화 NAEs의 분해에 더 좋은 활성을 지닌다고 알려졌다. 그러나 내인성 카나비노이드에 비해 이들의 약리학적 효과는 비교적 잘 알려지지 않았기 때문에 NAAA의 활성 조절제에 대한 개발 연구는 아직 초기단계에 머물고 있다. 그러나 최근 몇몇 문헌에서 포화 및 단일불포화 NAEs가 항염증작용, 세포사멸작용, 신경보호작용 등의 약리학적 효과가 알려지면서 NAAA의 활성

조절제의 필요성에 대해 언급되고 있다(Calignano et al., 2001; Terrazzino et al., 2004; Darmani et al., 2005; Solorzano et al., 2009). 따라서 NAAA의 활성분석 시스템을 제안한 본 연구는 의미있는 연구라 사료된다.

본 연구에서 세포 추출액과 PAAC를 반응시켜, 반응 시간에 따른 효소활성도를 측정하였다[Fig. 2C]. 반응액과 COSM6 세포 추출액을 사용하였을 경우, 시간에 따라 RFU값은 변화를 보이지 않았으나, COSM6 세포 추출액의 경우, 반응시간에 따른 RFU값의 뚜렷한 증가 양상을 확인할 수 있었다. 그러나 반응시간 250여분까지는 대조군과 큰 차이를 보이지 않다가 250여분 이상 반응시킬 때, RFU가 증가하는 양상을 보였다. 이전에 수행된 본 연구팀의 FAAH 활성분석 시스템 구축 연구와 비교하면, 본 연구에서는 초기 반응시간에 큰 차이를 보이지 못했다(Kim et al., 2010). 이런 결과가 나타난 이유를 추정해보면, 반응액의 조성에 다소 문제가 있어 효소-기질의 반응을 다소 지연시킬 가능성과 PAAC가 NAAA의 기질로서 다소 적합하지 않을 가능성이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 반응액의 조성에 변화를 주어 최적의 반응조건을 선별해야 할 것이며, PAAC 외에 다른 형광기질을 사용하는 연구도 필요할 것이다. 예를 들면, PAAC의 경우 포화 지방산이므로 용해도가 다소 낮기 때문에 용해도를 높이기 위해 단일불포화 지방산을 사용하거나, 탄소의 개수를 줄여 사용하는 방법이 있을 수 있을 것이다.

최근 본 연구의 선행 연구에서, FAAH의 활성분석 시스템으로 고안된 DAEC의 경우(Kim et al., 2010), Km 값이 548.8 μM 인 반면, 본 연구에서는 PAAC에 대한 NAAA의 Km 값이 20.05 μM 로 나타났다. 비록 같은 효소와 기질을 대상으로 비교하진 않았으나, 다른 문헌들과도 비교해 보았을 때, 본 연구결과에서 보인 효소-기질 친화도는 비교적 만족할 만한 수준이었다.

정리하면, 본 연구를 통해 개발된 NAAA 활성분석 시스템은 형광기질을 사용하여 그 실험방법이 간단하고 동시에 많은 시료를 처리할 수 있어 고속처리검색이 가능하다. 이러한 활성분석 시스템은 향후 NAAA의 활성 조절제 개발에 직접 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2009-0072938).

REFERENCES

- Ahn K, Johnson DS, Fitzgerald LR, Liimatta M, Arendse A, Stevenson T, Lund ET, Nugent RA, Nomanbhoy TK, Alexander JP, Cravatt BF. Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry* 2007. 46: 13019-13030.
- Boldrup L, Wilson SJ, Barbier AJ, Fowler CJ. A simple stopped assay for fatty acid amide hydrolase avoiding the use of a chloroform extraction phase. *J Biochem Biophys Methods*. 2004. 60: 171-177.
- Calignano A, La Rana G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol*. 2001. 419: 191-198.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996. 384: 83-87.
- Cravatt BF, Lichtman AH. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Curr Opin Chem Biol*. 2003. 7: 469-475.
- Darmani NA, Izzo AA, Degenhardt B, Valenti M, Scaglione G, Capasso R, Sorrentini I, Di Marzo V. Involvement of the cannabimimetic compound, *N*-palmitoyl-ethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: review of the available pre-clinical data, and first human studies. *Neuropharmacology* 2005. 48: 1154-1163.
- Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol*. 1993. 46: 791-796.
- Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*. 2008. 7: 438-455.
- Ganley OH, Graessle OE, Robinson HJ. Anti-inflammatory activity on compounds obtained from egg yolk, peanut oil, and soybean lecithin. *J Lab Clin Med*. 1958. 51: 709-714.
- Kim DW, Kim GJ, Kim HJ, Ghil SH. Fluorescence-based assay system for endocannabinoid degradation enzyme, fatty acid amide hydrolase. *J Exp Biomed Sci*. 2010. 16: 279-285.
- Kuehl Jr FA, Jacob TA, Ganley OH, Ormond RE, Meisinger MAP. The identification of *N*-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J Am Chem Soc*. 1957. 79: 5577-5578.
- Lambert DM, Vandevorde S, Jonsson KO, Fowler CJ. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem*. 2002. 9: 663-674.
- Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci*. 2005. 62: 708-716.
- Maccarrone M, Bari M, Agrò AF. A sensitive and specific radiochromatographic assay of fatty acid amide hydrolase activity. *Anal Biochem*. 1999. 267: 314-318.
- McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*. 2005. 74: 411-432.
- Omeir RL, Chin S, Hong Y, Ahern DG, Deutsch DG. Arachidonoyl ethanolamide-[1,2-¹⁴C] as a substrate for anandamide amidase. *Life Sci*. 1995. 56: 1999-2005.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MCT, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*. 2006. 3: 167-175.
- Rahn EJ, Thakur GA, Wood JA, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG. Pharmacological characterization of AM1710, a putative cannabinoid CB2 agonist from the cannabiolactone class: antinociception without central nervous system side-effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011. 98: 493-502.
- Ramarao MK, Murphy EA, Shen MW, Wang Y, Bushell KN, Huang N, Pan N, Williams C, Clark JD. A fluorescence-based assay for fatty acid amide hydrolase compatible with high-throughput screening. *Anal Biochem*. 2005. 343: 143-151.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001. 414: 209-212.
- Solorzano C, Zhu C, Battista N, Astarita G, Lodola A, Rivara S, Mor M, Russo R, Maccarrone M, Antonietti F, Duranti A, Tontini A, Cuzzocrea S, Tarzia G, Piomelli D. Selective *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition reveals a key role for endogenous palmitoylethanolamide in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106: 20966-20971.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*. 2006. 45: 405-446.
- Terrazzino S, Berto F, Dalle Carbonare M, Fabris M, Guiotto A, Bernardini D, Leon A. Stearoylethanolamide exerts anorexic effects in mice via down-regulation of liver stearyl-coenzyme

- A desaturase-1 mRNA expression. *FASEB J.* 2004. 18: 1580-1582.
- Tsuboi K, Sun Y-X, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem.* 2005. 280: 11082-11092.
- Tsuboi K, Takezaki N, Ueda N. *Chem Biodivers.* The *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). 2007. 4: 1914-1925.
- Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. *N*-acylethanolamine metabolism with special reference to *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog Lipid Res.* 2010. 49: 299-315.
- Wang Y, Ramirez F, Krishnamurthy G, Gilbert A, Kadakia N, Xu J, Kalgaonkar G, Ramarao MK, Edris W, Rogers KE, Jones PG. High-throughput screening for the discovery of inhibitors of fatty acid amide hydrolase using a microsome-based fluorescent assay. *J Biomol Screen.* 2006. 11: 519-527.
- Wilson SJ, Lovenberg TW, Barbier AJ. A high-throughput-compatible assay for determining the activity of fatty acid amide hydrolase. *Anal Biochem.* 2003. 318: 270-275.
-