

ナマズ卵レクチンはドキソルビシンの細胞毒性を増強する

菅原栄紀, 佐々木智子, 小川由起子, 細野雅祐, 仁田一雄*

Catfish (*Silurus asotus*) Lectin Enhances the Cytotoxic Effects of DoxorubicinShigeki SUGAWARA, Satoko SASAKI, Yukiko OGAWA, Masahiro HOSONO, and Kazuo NITTA*
Cancer Research Institute, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima,
Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received November 21, 2004; Accepted December 22, 2004; Published online December 24, 2004)

Rhamnose-binding lectins are widely found in fish eggs. However, their biologic effects on cultured cells are still unknown. Since catfish (*Silurus asotus*) egg lectin (SAL) bound to globotriaosylceramide (Gb3) expressed on the surface of cells, we analyzed the relationship between Gb3 expression and SAL binding in tumor cell lines using Raji, Daudi, ACHN, P388, and K562 cells. Gb3 was highly expressed on Raji cells but not on K562 cells. SAL bound abundantly to Raji cells but not to K562 cells, and SAL binding depended on the amount of Gb3 on the cell surface. SAL caused a reduction in cell size and increased annexin-V binding to and propidium iodide (PI) incorporation into Raji cells. Although this effect on Raji cells might represent damage at the late apoptosis or necrosis stage, SAL-treated Raji cells remained alive. Thus SAL enhanced PI incorporation into Raji cells without induction of cell death. We examined whether the effects of chemotherapeutic agent(s) are influenced by SAL. SAL increased the incorporation of doxorubicin (Dox) into Raji cells and consequently enhanced the cytotoxic effects of Dox. These results indicate that SAL may induce cell permeability without cytotoxicity.

Key words—rhamnose-binding lectins; globotriaosylceramide; cell permeability; doxorubicin

緒 言

糖結合性タンパク質であるレクチンは、あらゆる生物種に存在しており、近年の生命科学の進歩によって、生体における情報素子として位置付けられる糖鎖の受け手として注目が集まってきている。動物レクチンは感染、生体防御、受精、細胞分化、細胞接着などの生体反応への関与が示唆されており、¹⁾ その生物学的機能の解明に関心が寄せられている。構造上の特徴、すなわち、糖結合ドメイン (carbohydrate recognition domain, CRD) の類似性から、動物レクチンは、主なものとして活性発現にカルシウムイオンを必要とする C 型レクチン類²⁾ と β -ガラクトシド結合糖鎖を認識するガレクチン類³⁾ のほか、数種のカテゴリーに分類されている。^{4,5)} 海洋脊椎動物である魚類にもこれらのレクチンが分布しており、電気ウナギ (*Electrophorus electricus*) の発電器官、⁶⁾ マアナゴ (*Conger myriaster*) の体表粘

液からは β -ガラクトシド結合性レクチンが、⁷⁾ ウナギ (*Anguilla japonica*) の皮膚からは C 型レクチンが発見されている。⁸⁾ 魚類で見いだされたこれらのレクチンは、上述した二大レクチンファミリーのいずれかに属するものであったが、魚類卵中に広く分布しているレクチンは、 β -ガラクトシドよりも α -ガラクトシドに対して親和性が高く、活性発現に 2 価金属イオンを必要とせず、L-ラムノースに親和性を有するという特徴を有している。このレクチンは、現在までにナマズ (*Silurus asotus*)、^{9,10)} シシャモ [*Osmerus (Spirinchus) lanceoratus*],¹¹⁾ ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、¹²⁾ シロサケ (*O. keta*)¹³⁾ を始めとし、多種の魚卵中に見いだされており、新規のレクチンファミリーを構成し得る可能性が示唆されている。これらの魚類卵レクチンはラムノース結合性レクチン (rhamnose-binding lectin, RBL) と呼ばれている。⁹⁾

RBL が細胞膜表面の糖鎖を認識して結合した場合、細胞に対して何らかの影響を及ぼすか否かはいまだ明らかにされていない。ナマズ卵より単離され

た RBL (*S. asotus* lectin, SAL) は表面プラズモン共鳴スペクトル法を用いた解析より、糖脂質の一種である globotriaosylceramide (Gb3) に結合することが見いだされている。¹⁴⁾ われわれは、この性質に着目して Gb3 を発現している腫瘍細胞に対する SAL の影響、特に化学療法剤の透過性の変化とその作用増強について検討した。

実験方法

1. 実験材料 ナマズ卵由来レクチン (SAL) は、既報の方法により精製した。⁹⁾ 抗 SAL 抗血清は既報の方法により SAL をウサギ (日本白色種) に対して免疫することにより作製した。¹⁰⁾ バーキットリンパ腫細胞株である Raji, Daudi, ヒト腎癌細胞株である ACHN 及びヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより、またマウス白血病細胞株 P388 は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank より供与されたものを用いた。これらの細胞は 10% 非働化ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地 (日水製薬社製) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養を行った。

2. 方法

2-1. 細胞膜表面の Gb3 の発現 細胞 (2×10⁵ 個) に対し、抗 Gb3 抗体 (生化学工業社製) を終濃度 10 µg/ml になるように加え、4°C、30 分間処理した。リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) にて洗浄後、Alexa Fluor (AF) 488 標識ヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes 社製) を終濃度 0.8 µg/ml で加え、4°C、30 分間処理したのち、FACScan (Becton Dickinson 社製) により蛍光強度を測定した。

2-2. SAL の細胞膜への結合 細胞 (2×10⁵ 個) に対し、SAL 溶液 (10 µg/ml) を 100 µl 加え、4°C、30 分間処理した。PBS にて洗浄後、PBS で 1000 倍に希釈した抗 SAL 抗血清を 100 µl 加え、さらに 4°C、30 分間処理した。PBS で洗浄後、AF546 標識ヤギ抗ウサギ IgG (終濃度 0.8 µg/ml) を加え、4°C、30 分間処理し、上記と同様に FACScan により SAL の結合量を測定した。

2-3. 細胞の大きさの測定 細胞 (2×10⁵ 個) に対し、SAL 溶液 (10 µg/ml) を 100 µl 加え、4

°C、30 分間処理した。FACScan において、細胞に照射されたレーザー光から検出される前方散乱光 (forward scatter light, FSC) は、細胞の表面積 (大きさ) に比例するので、この FSC 値を用いて細胞の大きさを測定した。

2-4. SAL 処理細胞へのアネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込み 細胞 (1×10⁵ 個) に対し、SAL 溶液 (10 µg/ml) を 100 µl 加え、4°C で 30 分間、あるいは 37°C で 30 分間、12 時間及び 24 時間処理した。アポトーシス細胞の検出には MEBCYTO apoptosis kit (MBL 社製) を用いた。Binding buffer に細胞を懸濁後、fluorescein isothiocyanate (FITC)-アネキシン V 及び PI を加えて FACScan により測定した。SAL 除去後のアネキシン V の結合及び PI の取り込み量の変化は、4°C、30 分間 SAL (終濃度 10 µg/ml) で処理した細胞を PBS で洗浄後、さらに 37°C で 24 時間培養し、同様の方法で測定した。

2-5. カスパーゼ -3 及び -8 活性の測定¹⁵⁾ 細胞 (5×10⁵ 個) に対して 10 µg/ml SAL 溶液 100 µl を加え、4°C では 30 分間、37°C では 22 時間処理した。カスパーゼ -3 及び -8 の測定には、CPP/caspase-3 colorimetric protease kit 又は FLICE/caspase-8 colorimetric protease kit (MBL) を用いて行った。細胞を SAL 処理後、細胞溶解液を加えて水中で 10 分間処理し、遠心分離後、上清液に 10 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む 2×reaction buffer を添加した。その後、基質 (カスパーゼ -3, DEVD-pNA; カスパーゼ -8, IETD-pNA; 終濃度 200 mM) を添加し、37°C で 2 時間培養後、波長 405 nm の吸光度を測定した。

2-6. ドキソルビシン (Dox) 取り込み量の測定 細胞を 1×10⁵ 個/200 µl になるように 96 well plate に播き、SAL (終濃度 100 µg/ml) を加え、37°C、24 時間培養したのち、Dox を終濃度 100 ng/ml になるように加え、さらに 37°C、30 分間培養後、FACScalibur (Becton Dickinson 社製) で細胞内に取り込まれた Dox の量を測定した。

2-7. SAL 及び Dox 処理による細胞生存率の測定 細胞を 5×10⁴ 個/200 µl になるように 96 well plate に播き、SAL (終濃度 100 µg/ml) を加え、37°C で 24, 48, 72 時間培養した。細胞の生存率は、トリパンブルーを用いた色素排除試験により測

定した。Doxの増殖抑制効果は、種々の濃度で60時間培養し、上記と同様の方法で測定した。SAL前処理によるDoxの細胞増殖抑制効果の増強は、細胞にSALを終濃度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間培養したのち、Doxを終濃度100 ng/ml になるように加え、さらに37 $^{\circ}\text{C}$ 、60時間培養し、同様の方法で測定した。

結 果

1. 腫瘍細胞のG_{b3}発現とSALの結合 細胞表面に存在する糖脂質の一種であるG_{b3}は、バークットリンパ腫細胞において高発現していることが既に知られている。¹⁶⁾そこで、G_{b3}の発現量とSALの結合量について調べたところ、G_{b3}を発現していないK562細胞ではSALの結合が見られないのに対し、G_{b3}の発現が認められる他の細胞(P388, ACHN, Daudi及びRaji)ではSALの結合が認められた。K562細胞のG_{b3}発現量とSALの結合量を各々1としたとき、蛍光強度の比較から、P388, ACHN, Daudi及びRaji細胞のG_{b3}発現量は各々2.5, 2.0, 2.0, 12.6倍で、SALの結合量は各々4.7, 11.8, 11.8, 62.3倍であった。これらの結果から、本研究で用いた細胞の中で最もG_{b3}の発現量が高いRaji細胞で、SALの結合量が最も高い結果が得られた(Fig. 1)。

2. SAL処理細胞へのアネキシンVの結合とPI取り込みの増加 Raji細胞に対するSALの細胞障害性の有無を調べることを目的として、被験細胞に対するアネキシンVの結合量とPIの取り込み量の変化について検討した。その結果、SAL(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、4 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間の処理で、81%の細胞がアネキシンVとPIともに陽性(共陽性)を示した(Fig. 2(A))。一方、37 $^{\circ}\text{C}$ での培養条件下では、SAL(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の処理時間に依存して共陽性率が上昇し、24時間処理で共陽性率は55%であった(Fig. 2(B))。

3. SAL除去によるアネキシンVの結合とPI取り込みの減少 SAL処理Raji細胞は、トリパンブルー染色法による細胞死は認められないものの、アネキシンVの結合及びPIの取り込みがともに陽性である。これらのことが、SAL処理細胞の培養液中からSALを除去したときに変化するか否かを検討した。共陽性を示した細胞培養液からSALを取り除き、37 $^{\circ}\text{C}$ でさらに培養を継続すると、共陽

性を示す細胞(Fig. 3(B)、共陽性率83.2%)の割合が約1/3に減少した(Fig. 3(C)、共陽性率29.6%)。また、SAL除去により共陽性率が低下した細胞の大きさは、未処理細胞と同等まで回復した(Fig. 3(D))。このことから、Raji細胞はSAL処理によりアネキシンVの結合及びPIの取り込みとともに陽性を示すものの、細胞死に至らないものと考えられる。

4. SAL処理により誘導される細胞死 SALのアポトーシスへの関与を検討する目的で、カスパーゼ-3及び-8の活性を測定した。SAL(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、4 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間及び37 $^{\circ}\text{C}$ 、22時間処理では、どちらの酵素活性の上昇も認められなかった(データは示さない)。また、細胞生存率を調べたところ、SAL(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、24時間処理ではコントロールと同程度であり、さらに72時間培養したとき、コントロールと比較して約30%減少した(Fig. 4)。

5. SAL前処理によるDoxの細胞膜透過性の亢進 SAL(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、37 $^{\circ}\text{C}$ 処理により、処理時間依存的にRaji細胞へのPIの取り込み量の増加が観察されたので(Fig. 2(B))、悪性リンパ腫に有効な化学療法剤の1つであるDoxの取り込みが増加するか否かを検討した。Doxの取り込み実験は、1) SAL(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、4 $^{\circ}\text{C}$ 処理時の共陽性を示す細胞は、前述のように、81%であったのに対し、37 $^{\circ}\text{C}$ 処理では55.2%であったこと、2) SAL(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で37 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間処理することにより、共陽性を示す細胞の割合が4 $^{\circ}\text{C}$ 処理時と同程度(74.7%)に上昇したこと(データは示さない)、3) SAL(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で24時間処理しても細胞の生存率はほとんど低下しないこと(Fig. 4)から、SALの前処理は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で行った。Figure 5に示したように、SAL(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で24時間前処理することにより、Doxの取り込み増加が認められた。Doxの取り込み増加率は、30min処理が最も高く50%増加したが(Fig. 5)、増加率の上昇は、1hまでしか観察されなかった(データは示さない)。また、SAL前処理細胞のDox取り込み量(30min処理時)は、SAL未処理細胞をDoxで5h処理したときの取り込み量に匹敵していた(データは示さない)。

6. SAL処理によるDoxの細胞障害性の増強 DoxのRaji細胞に対する影響を検討したところ、48時間処理で濃度依存的に細胞の生存率が低下し

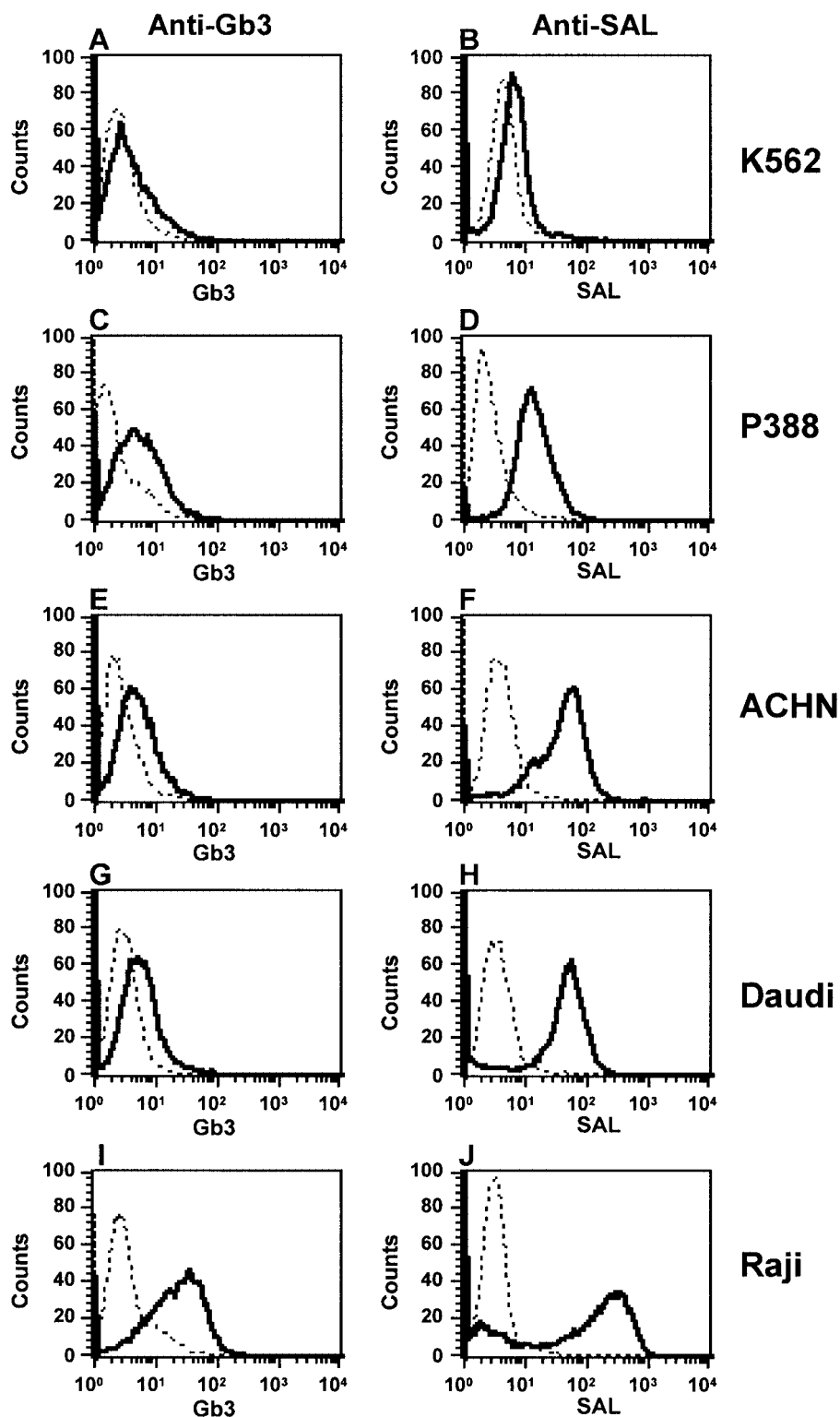


Fig. 1. Comparison of Gb3 Expression with SAL Binding on Tumor Cell Membranes

A, C, E, G and I: Cells were treated with anti-Gb3 monoclonal antibody (mAb) and polyclonal goat anti-mouse Ab coupled with AF488 (—). The degree of Gb3 expression on tumor cell membranes was determined by FACScan. Fluorescence intensity of control cells: (.....). B, D, F, H and J: Cells were incubated with SAL (10 μ g/ml) and anti-SAL antiserum, and then reacted with goat anti-rabbit Ab coupled with AF546 (—). The degree of SAL binding to tumor cells was analyzed in the same way as described above. Fluorescence intensity of control cells: (.....).

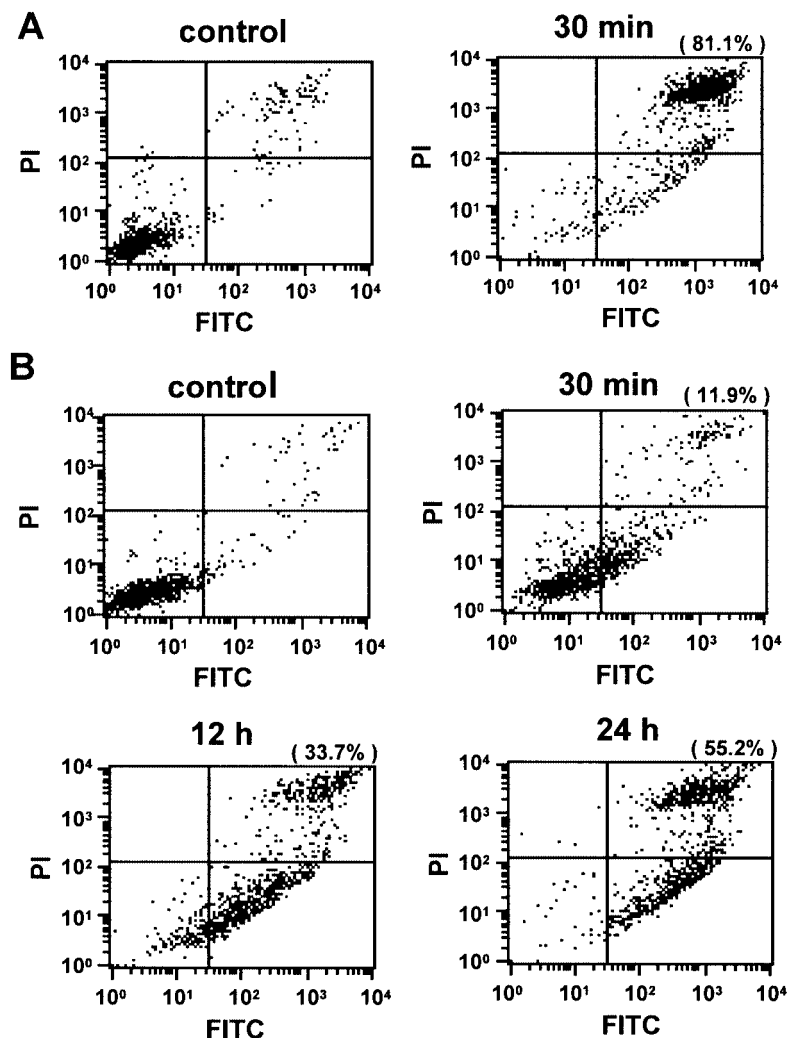


Fig. 2. Externalization of Phosphatidylserine (PS) and Incorporation of PI into Raji Cells

Cells (1×10^5) were treated with or without SAL ($10 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l}$) at 4°C for 30 min (A) or at 37°C for 30 min, 12 h, and 24 h (B). Analysis of annexin V-bound versus PI-incorporated cells was performed by FACScan.

た (Fig. 6). SAL で前処理することにより, 低濃度の Dox で細胞障害効果が認められるか否かを検討した. SAL ($100 \mu\text{g/ml}$) で 24 時間 (Raji 細胞の生存率に影響を与えない処理時間) 処理したのち, Dox (100ng/ml) でさらに 60 時間処理したところ, Dox 単独処理での生存率は 69% であるのに対し, SAL 前処理により, 生存率は 24% まで低下した (Fig. 6).

考 察

RBL は L- ラムノースに対して高い親和性を有し, また β - ガラクトシドよりも α - ガラクトシド糖鎖を優先的に認識するという, 他の動物レクチンには見られないユニークな糖結合特異性を示す.⁹⁾ こ

れまで明らかにされた一次構造上の情報から, RBL は 2—3 個のよく似たドメインがタンデムに並んだ構造をしており, またそれぞれのドメインには高度に保存されたコンセンサス配列が認められる.^{10,12,13)} このように RBL はレクチン分子としての性質や糖結合特異性などについて明らかになってはいるものの, 細胞に対して糖鎖を介した作用を引き起こすのか否かについては現在のところ解明されていない。

Gb3 は志賀毒素 (ペロ毒素) のレセプターとしての役割を持っている. それゆえ, この毒素は Gb3 発現細胞に結合して, アポトーシスを引き起こすことが可能になる.^{17,18)} また, Gb3 の α - ガラクトシダーゼによる代謝が, リソソームで円滑に進

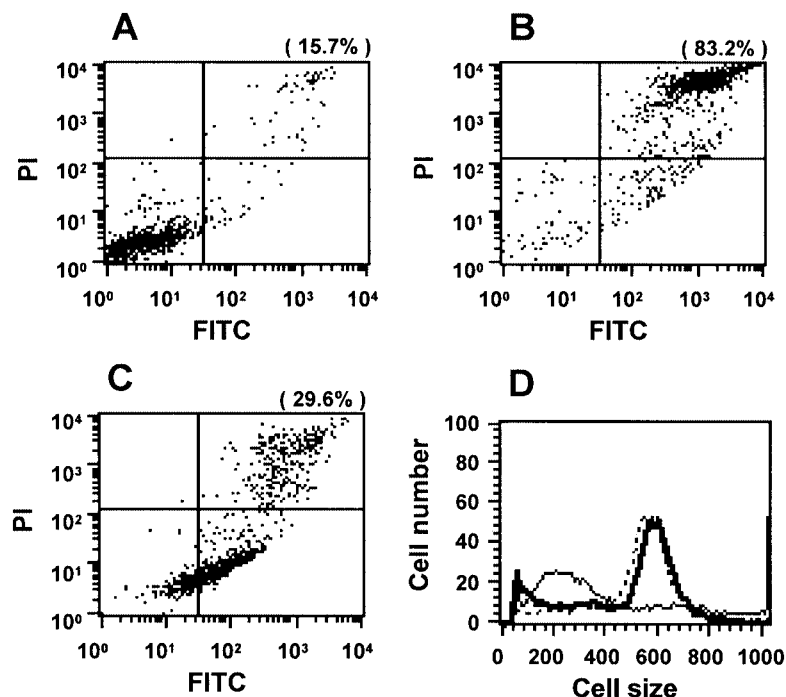


Fig. 3. Reversible Effect of SAL on Annexin-V Binding in Raji Cells

A and B: Cells (1×10^5) were treated without (A) or with (B) SAL ($10 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l}$) at 4°C for 30 min. C and D: After removing SAL from the medium, cells were incubated at 37°C for 24 h. Analysis of annexin V-bound versus PI-incorporated cells was performed by FACSscan (C). Cell size of SAL-removed and -unremoved cells is represented by bold line and light line, respectively (D). Untreated control (the same as A): dotted line.

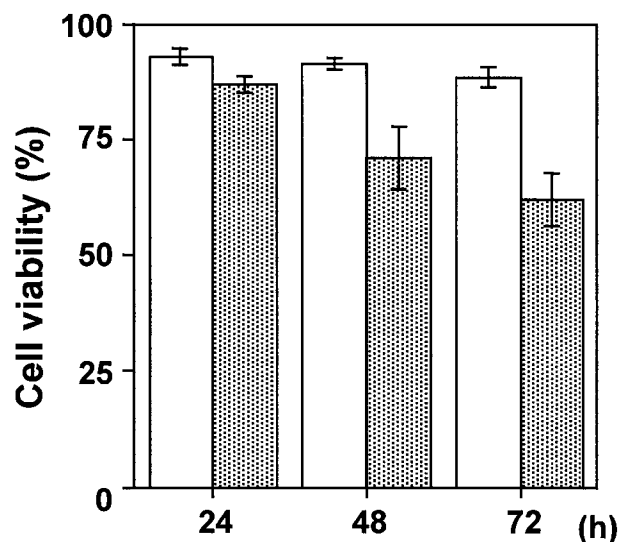


Fig. 4. Cytotoxic Effect of SAL

Cells (5×10^4) were treated with or without SAL ($100 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l}$) at 37°C for 24, 48 and 72 h. Cell viability was analyzed by trypan blue dye exclusion assay. White and dotted bars show SAL-untreated and -treated Raji cells, respectively. Data are representative of at least two independent experiments. The percentage of cell viability with the standard error indicated by a bar above each column.

行しない場合、Gb3が神経系や腎臓などの組織に異常に蓄積し、Fabry病を引き起こすことも知られている。¹⁹⁾ SALも志賀毒素と同様にGb3に結合す

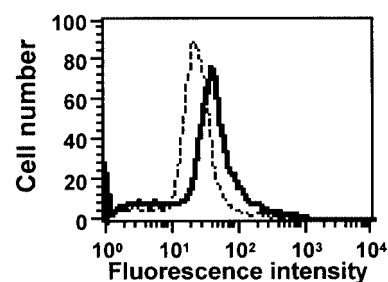


Fig. 5. Effect of SAL on Dox Uptake in Raji Cells

After treatment of cells (1×10^5) with SAL ($100 \mu\text{g/ml}$) at 37°C for 24 h, cells were treated with Dox (100 ng/ml) at 37°C for 30 min. Dox uptake was analyzed by FACSscalibur. Fluorescence intensity shows the amount of Dox incorporated into the cells. Dotted and bold lines show SAL-untreated and -treated cells, respectively.

ることから、腫瘍細胞上に発現しているGb3をターゲットとしてSALが結合した場合、どのような効果を示すのか検討した。種々の腫瘍細胞を用いてGb3の発現量とSALの結合との関係を調べたところ、Gb3の発現が認められないK562細胞ではSALの結合も認められなかった。これに対し、Gb3を高発現しているRaji細胞に対しては、SALは最も多く結合した。一方、Gb3の発現量が少ないP388、ACHN及びDaudi細胞では、SALの結合

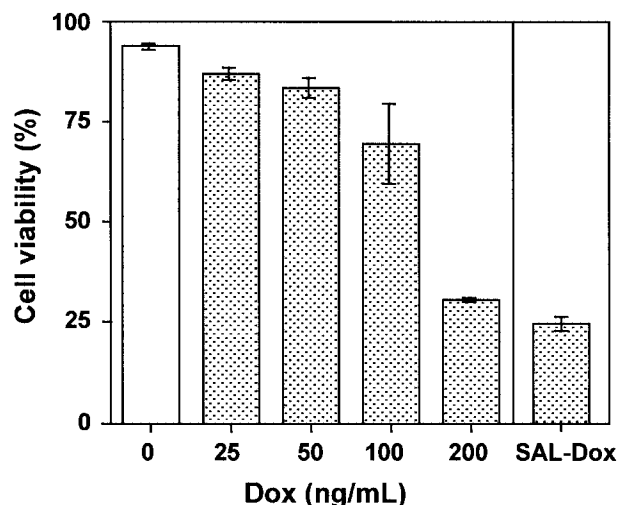


Fig. 6. Enhancement of Cytotoxic Effect of Dox by SAL

Cells (5×10^4) were treated with Dox (25, 50, 100 and 200 ng/ml) at 37°C for 60 h. In another experiment, after treatment with SAL (100 µg/ml) at 37°C for 24 h, the cells were treated with Dox (100 ng/ml) at 37°C for 60 h. Cell viability was analyzed by trypan blue dye exclusion assay. Control, without SAL and Dox; SAL-Dox, with SAL and Dox (100 ng/ml). The percentage of cell viability, with the standard error indicated by a bar above each column.

は Raji 細胞ほど高くはないことが示された (Fig. 1). これらのことから, SAL の腫瘍細胞への結合は主に Gb3 を介していると考えられる.

細胞のアポトーシス初期には, 通常膜の内側に存在するホスファチジルセリン (PS) が細胞膜外層側へ移行することが知られており,²⁰ PS に特異的に結合するアネキシン V の結合をフローサイトメーターで分析することにより検出できる. また, ネクロシスの際には, 細胞膜の崩壊を反映して, 細胞膜不透過性物質である PI が細胞内に取り込まれるようになり, これも同様にフローサイトメーターで検出できる. 一般に, アネキシン V 及び PI が共陽性である細胞群はアポトーシス後期若しくはネクロシス状態を示すと言われている. SAL 処理により Raji 細胞では, アネキシン V 並びに PI が共陽性となり, 同時にサイズの縮小が観察された (Fig. 2). 一般的に, この状態では細胞はアポトーシス後期, すなわち細胞死が進行していると判断される. しかし, Raji 細胞を SAL (100 µg/ml) で 24 時間処理しても細胞の生存率は, 未処理の細胞と大差ないことから, SAL は Raji 細胞に細胞死を誘導しない (Fig. 4). さらに, SAL 処理後, 培養液中から SAL を取り除いた状態で培養した細胞では, アネキシン V の結合及び PI 取り込みのレベルが減

少し, 細胞がより正常に近い状態に復帰しつつあることが示唆された (Fig. 3). SAL と結合した Raji 細胞が縮小し, アネキシン V 及び PI 共陽性になるにも拘らず, 細胞死に至らない理由についてはまだ不明であり, 今後さらに検討する必要がある.

SAL 処理により起こるアネキシン V の結合に関して, 最近, SAL が PS の細胞膜外層側への移行に関与する分子を制御する可能性を明らかにしている.²¹ しかし, 細胞膜不透過性物質である PI が, 細胞死の誘導されていない細胞に取り込まれる現象についてはまだ説明できない. PI が取り込まれる現象は, 前述したようにネクロシス状態で観察される細胞膜の崩壊によるか, あるいはある種のチャンネルのような孔が開いたときに非特異的に取り込まれることが考えられる. SAL はネクロシスを誘導しないので, SAL と Gb3 との結合が細胞膜の構造変化を引き起こし, PI の取り込みを増加させる可能性がある. 浸透圧性膨張や浸透圧収縮を起こした多くの細胞は, その細胞に発現しているイオンチャンネルを制御することによって, 細胞の容量を調整しホメオスタシスを維持していることが報告されている.^{22,23} SAL による細胞の縮小がこのようなイオンチャンネルの開閉を誘導し, 物質の透過性を変化させる可能性も考えられる. このことは, 実際に Dox の取り込みが SAL 処理によって起こる細胞膜の変化 (孔の開閉など) によって促進され, Raji 細胞における抗腫瘍効果が増強するという結果からも示唆される (Figs. 5, 6). レクチンが細胞にダメージを与えず (細胞死を誘導せず) に, 物質の透過性をコントロールできれば, 様々な細胞生物学の実験に応用できると期待される. 今後, SAL 処理によって起こる PI の取り込み機構をさらに検討することにより, Gb3 を介して引き起こされる SAL の細胞に対する効果のメカニズムを明らかにできるものと考えている.

REFERENCES

- 1) Gabius H. J., *Eur. J. Biochem.*, **243**, 543-576 (1997).
- 2) Drickamer K., *J. Biol. Chem.*, **263**, 9557-9560 (1988).
- 3) Barondes S. H., Cooper D. N. W., Gitt M. A., Leffler H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 20807-20810

- (1994).
- 4) Powell L. D., Varki A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 14243–14246 (1995).
 - 5) Margalit H., Fischer N., Ben-Sasson S. A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 19228–19231 (1993).
 - 6) Teichberg V. I., Silman I., Beitsch D. D., Resheff G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1383–1387 (1975).
 - 7) Muramoto K., Kagawa D., Sato T., Ogawa T., Nishida Y., Kamiya H., *Comp. Biochem. Physiol. B*, **123**, 33–45 (1999).
 - 8) Tasumi S., Ohira T., Kawazoe H., Suetake H., Suzuki Y., Aida K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 27305–27311 (2002).
 - 9) Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1–5 (1993).
 - 10) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 668–675 (1999).
 - 11) Hosono M., Matsuda K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., Nitta K., *Biomed. Res.*, **13**, 443–449 (1992).
 - 12) Tateno H., Saneyoshi A., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 19190–19197 (1998).
 - 13) Shiina N., Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Saneyoshi M., Kamiya H., *Fish. Sci.*, **68**, 1352–1366 (2002).
 - 14) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Trends Glycosci. Glycotech.*, **16** (Suppl.), S46 (2004).
 - 15) Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., *J. Immunol. Methods*, **184**, 39–51 (1995).
 - 16) Furukawa K., Yokoyama K., Sato T., Wiels J., Hirayama Y., Ohta M., Furukawa K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 11247–11254 (2002).
 - 17) Taguchi T., Uchida H., Kiyokawa N., Mori T., Sato N., Horie H., Takeda T., Fujimoto J., *Kidney Int.*, **53**, 1681–1688 (1998).
 - 18) Lingwood C., Law H., Richardoson S., Petric M., Buruton J. L., Grandis S. D., Karmali M., *J. Biol. Chem.*, **262**, 8834–8839 (1987).
 - 19) “The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,” 7th ed., eds. by Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., McGraw-Hill, New York, 1995.
 - 20) Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., Henson P. M., *J. Immunol.*, **148**, 2207–2216 (1992).
 - 21) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 434–441 (2005).
 - 22) Hoffmann E. K., *Alfred Benzon Symp.*, **11**, 397–417 (1978).
 - 23) Hoffmann E. K., Dunham P. B., *Int. Rev. Cytol.*, **161**, 173–262 (1995).