

ラムノース結合性レクチンによるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) を介したシグナル伝達機構の調節

仁田一雄,* 河野 資, 菅原栄紀, 細野雅祐

Regulation of Globotriaosylceramide (Gb3)-mediated Signal Transduction by Rhamnose-binding Lectin

Kazuo NITTA,* Tasuku KAWANO, Shigeki SUGAWARA, and Masahiro HOSONO
Division of Cell Recognition Study, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology,
Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received January 5, 2007)

Silurus asotus (catfish) egg lectin (SAL) has potent affinity to Gal α -linked carbohydrate chains of not only glycoproteins but also glycosphingolipids such as globotriaosylceramide (Gb3). SAL selectively bound to Gb3 localized in glycosphingolipid-enriched microdomain (GEM) of Gb3-expressing (Gb3⁺) Burkitt's lymphoma cells. Since treatment of Gb3⁺ cells with SAL caused an increase in externalization of phosphatidylserine *via* activation of P-glycoprotein, and apoptotic volume decrease *via* activation of G-protein activated K⁺ channel-1, SAL may function as an inducer of early apoptotic signal; however, neither caspase-8 and -3 activation nor DNA fragmentation was observed. We therefore investigated whether cell proliferation and viability were altered in SAL-treated Raji cells. SAL caused reduction of Raji cell proliferation without cytotoxicity. Although SAL did not induce apoptotic cell death to Gb3-expressing cells, it functionally behaved as a regulator of cell proliferation. SAL activated the suppression system of cell proliferation, such as down-regulation of c-myc and cdk4, and up-regulation of p21 and p27, inducing G1 arrest of the cell cycle, and consequently inhibited cell proliferation of Raji cells. Therefore, we conclude that SAL leads the cells to early apoptotic status but not late apoptotic (necrotic) status *via* binding to Gb3 existing in GEM, and that this binding is a prerequisite condition to induce cell cycle stop signal.

Key words—rhamnose-binding lectin; fish eggs; catfish; globotriaosylceramide; Burkitt's lymphoma cells; anti-proliferative effect

1. はじめに

糖衣 (glycocalyx) で覆われた細胞は、隣接する細胞と接着し、あるいは細胞間物質に囲まれて生存している。セレクトイン (selectin) を発現している細胞と糖鎖リガンドを発現している細胞との間の接着は、細胞同士の接着の1つの形態である。セレクトインは細胞外領域にレクチン (糖結合性タンパク質) ドメインを持つ膜貫通タンパク質で、炎症性疾患の際に、血管内皮細胞あるいは白血球に発現することも知られている。^{1,2)} また、感染症は、微生物の細胞表面にあるレクチンあるいは糖鎖リガンドと宿主の

糖鎖あるいはレクチンとの相互作用により成立する場合が非常に多いことも知られている。^{3,4)} このように、レクチンは、疾患と糖鎖の関連の解析、糖鎖の検出・同定あるいは機能解析などのため、多くの研究領域で利用されている。

1960年代に、細胞表面の糖鎖構造の変化と細胞の癌化が関連していることが、小麦胚芽レクチン (WGA) やダイズレクチン (SBA) を用いて、証明されている。^{5,6)} これらの研究がきっかけとなり、糖鎖異常が細胞の癌化に応じて普遍的に起こること、単クローン抗体の作製技術が確立され、レクチンよりも糖鎖に対する特異性の高い抗体が得られ、腫瘍マーカーとしての糖鎖抗原が明らかにされてきた。癌細胞に特異的なレクチンあるいは糖鎖に対する単クローン抗体をイムノトキシン (immunotoxin) として、癌の治療に利用しようという試みも行われてき

東北薬科大学分子生体膜研究所分子認識学部門 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

*e-mail: knitta@tohoku-pharm.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウム S10 で発表したものを中心に記述したものである。

た。⁷⁾

われわれは、動物由来（カエル卵あるいは魚卵）の可溶性タンパク質に属するレクチンを題材に、癌の治療あるいは診断への応用を指向した研究を進めてきている。^{8,9)} アカガエル属のカエル卵由来のシアル酸結合性レクチンが、それらの糖結合活性と無関係に、リボヌクレアーゼ活性を持つことから、これらのレクチンをレクザイム (leczyme) と呼んでいる。^{10,11)} このレクザイムは様々な癌細胞に対してアポトーシスを誘導し、抗腫瘍作用を発揮するので、抗腫瘍薬への応用研究が急務である。

一方、魚卵から多く見いだされているラムノース結合性レクチン (RBL) は、動物レクチンの中では特異なカテゴリーを形成している。¹²⁾ 本論文では、RBL の 1 つであるナマズ (*Silurus asotus*) 卵由来レクチン (SAL) が、非常にユニークで、グロボトリアオシルセラミド (Gb3) を発現しているパーキットリンパ腫細胞に結合し、細胞縮小を引き起こすので、¹³⁻¹⁵⁾ この分子機構の解明と、それに基づく抗腫瘍薬開発への将来展望について述べる。

2. ラムノース結合性レクチンの一次構造と遺伝子の塩基配列

2-1. 一次構造

RBL は、2 個あるいは 3 個の類似した約 95 アミノ酸残基よりなる “domain” がタンデムに並んだ構造を持ち、各 domain にはよく保存された配列 (RBL motif), すなわち *N* 末端部位に “ANYGR” 配列及び *C* 末端部位に “DPC-KYL” 配列がみられ、この domain が RBL におけ

る carbohydrate recognition domain (CRD) であると推測されている (Fig. 1).¹⁴⁾ RBL は、一次構造の類似性、ヒト赤血球凝集活性及びラクトースによる阻害の有無から、5 つのサブグループ (Type IV はさらに a と b に区分) に分類することができる (Table 1). 3 個の domain からなる SAL 及び 2 個の domain からなるシシャモ (*Osmerus lanceolatus*) 卵由来 RBL (OLL26) は、それぞれ Type I 及び Type IVa に分類される。スチールヘッドマス (ニジマス) 由来の STL1,¹⁶⁾ アメマス由来 WCL1¹⁷⁾ 及びサケ由来 CSL1¹⁸⁾ は、分子サイズとしては Type I と同等であるが、*N* 末端の domain に RBL motif を持たない (Type II). 2 個の domain を持つものは、赤血球凝集活性と糖特異性の違いにより、Type III と IV に分類できる。また、ウニ卵から単離された SUEL は、*N* 末端の付加配列中に存在する Cys を介して homodimer を形成している (Type V).¹⁹⁾ SUEL は、ガレクチン (約 135 残基からなる S 型 CRD を持つ) とは異なるガラクトース結合性レクチンとして報告されたが、¹⁹⁾ RBL の CRD が保存されていること、また SUEL によるウサギ赤血球の凝集が低濃度のラムノースにより阻害されることから、RBL に分類するのが妥当である。¹⁴⁾

2-2. 遺伝子の塩基配列

OLL26 遺伝子は全長約 1.6 kb で、8 個のエキソンに分かれてコードされている。成熟タンパク質を構成する 2 個の domain はそれぞれ、互いに相同の 3 個ずつのエキソンでコードされていた。CRD をコードする 3 個

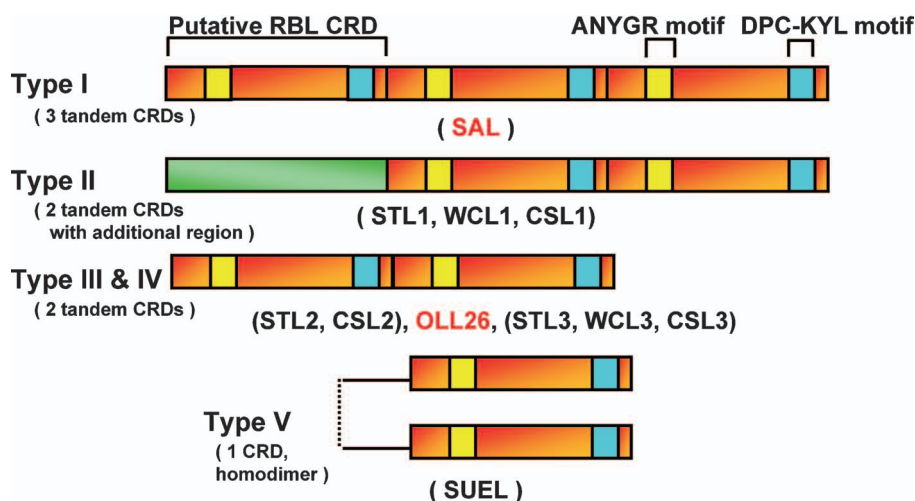


Fig. 1. Domain Structure Model of RBLs

Schematic models (I–V) were designed based on the deduced amino acid sequences of SAL and OLL26, and other related lectins cited in Table 1. *N*-terminal domain of Type II indicated by green column does not contain both RBL motifs.

Table 1. Classification of RBLs^{a)}

Group	RBL	Domain ^{b)}	Hemagglutinating activity for human erythrocytes ^{c)}	Inhibition by lactose ^{d)}
Type I	SAL	3	B (+), A, O (-)	(+)
Type II	STL1, WCL1, CSL1	2	A, B, O (-)	(-)
Type III	STL2, CSL2	2	B (\pm), A, O (-)	(+)/($-$) ^{d)}
Type IVa	OLL	2	A, B, O (+) ^{e)}	(+)
Type IVb	STL3, WCL3, CSL3	2	A, B, O (+) ^{e)}	(-)
Type V	SUEL	1 ^{f)}	ND ^{g)}	(+)

a) Cited from Refs. 13), 14) and 16–18). b) Number of putative CRD containing YGR- and DPC-region. c) Plus/minus sign (\pm) and minus sign ($-$) indicate that hemagglutination was observed at a concentration of 250 μ g/ml and was not observed at the same concentration, respectively. d) All RBLs listed can agglutinate rabbit erythrocytes. Minus sign ($-$) indicates that no inhibitory effect for hemagglutination of rabbit erythrocytes was observed at a concentration of 100 mM. STL2 : (+), CSL2 : ($-$). e) Predominantly for B, weakly for A and O. f) Intermolecular-linked homodimer. g) ND : not determined.

のエキソンを隔てているイントロンもまた、domain 間に対応するもの同士の長さはほぼ同じであり、全体としてアミノ酸配列のパターンと酷似したタンデムリピート構造を取っていることを明らかにしている (Hosono M., Matsuda A., Sugawara S., Nitta K., unpublished observation). これは、タンデムリピート型のガレクチン (galectin)-6 のゲノム構造と類似しているが、CRD 間に挿入配列がない点で異なっている.²⁰⁾ これらのことから、OLL26 は進化の過程において CRD をコードするエキソンの重複あるいは混成を伴って、今日の分子形態に至っている可能性が示唆される。SAL 遺伝子も OLL26 遺伝子と同様にタンデムリピート構造を取ることが推測される。

3. ラムノース結合性レクチンの糖特異性と細胞特異性

ガレクチンは、 β -ガラクトシドと結合性があり、還元剤の存在下で活性を発揮する。²¹⁾ RBL は、ラムノースに対して非常に高い親和性を有しているが、ガラクトースにも親和性を有している。^{13,22,23)} RBL の凝集活性は、還元剤や 2 価の陽イオンの添加によって影響を受けない。赤血球 (ヒト又はウサギ) を用いた凝集阻害反応の結果から、RBL に対する親和性は、L-ラムノース > L-マンノース > メリビオース > D-ガラクトース (=D-フコース) > ラクトースの順に低下した。すなわち、ガラクトシル α 結合糖鎖に対する親和性がガラクトシル β 結合糖鎖のそれよりも高い傾向にあることが示された。また、表面プラズモン共鳴スペクトルの解析結果からは、RBL がネオ糖タンパク質 [メリビオシル (Mel: Gal α 1-4Glc)-BSA, ラクトシル (Lac: Gal β 1-4Glc)

-BSA], 糖脂質 (Gb3: Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer, GalnLc4: Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) どちらの糖鎖をも認識することが明らかにされている。SAL のこれらの糖鎖に対する結合親和性は、Mel-BSA > Gb3 = GalnLc4 > Lac-BSA の順である。また、RBL の赤血球に対する特異性については、1) ガラクトシル α 結合糖鎖が多く存在するウサギ赤血球をよく凝集し、ヒト B 型赤血球も凝集すること、2) シアリダーゼ処理赤血球の被凝集性は大幅に増加することから、前述の結果が支持される。

一方、癌細胞に対する RBL の反応特異性については、相違が認められている。SAL は、Gb3 の発現が観察された細胞 [パーキットリンパ腫 (Raji あるいは Daudi), ACHN 及び P388] に結合するが、Gb3 を欠損している K562 細胞には結合しない。²⁴⁾ すなわち、SAL は細胞表面の Gb3 に選択的に結合することにより凝集を引き起こす。一方、1) OLL26 は Raji 及び K562 細胞の細胞表面に結合すること、2) Raji 細胞を抗 Gb3 抗体で前処理することにより、OLL26 は抗体未処理とほぼ同様に結合したのに対して、SAL の結合はほとんど認められなくなったこと、3) Raji 細胞に対する OLL26 及び SAL の結合を、ラクトース及びメリビオースはいずれも濃度依存的に阻害したが、OLL26 と SAL とを比較すると、メリビオースによる阻害の程度は 50% 阻害濃度でほぼ同等であるのに対し、ラクトースの場合、OLL26 において SAL と比較して低濃度で阻害した。これらのことから、OLL26 は Raji 細胞膜上の Gb3 以外のガラクトース含有糖鎖にも結合し、SAL と異なる変化を誘導しているものと考え

えられる。この結合能の差が両者のドメイン構成に起因するか否かについては現在検討中である。

4. SAL 処理で誘導されるホスファチジルセリンの細胞膜外層側への移行と細胞縮小

4-1. ホスファチジルセリンの細胞膜外層側への移行 志賀毒素は AB- 毒素の代表例で、A サブユニットに RNA *N*-glycosidase 活性があり、細胞内に取り込まれたのち、毒性を発揮する。また、B サブユニットにはレクチンとしての機能がある。志賀毒素のレセプターは Gb3 で、毒素の結合した細胞ではアポトーシスが誘導されることが知られている。²⁵⁾ また、志賀毒素の B サブユニット自身にアポトーシス誘導能があるか否かは、使用する細胞によっても相違があるため、B サブユニットの Gb3 への結合を介したシグナル伝達とアポトーシス誘導との関係については議論の余地がある。^{26,27)} 前述のように、SAL は Raji 細胞に結合するので、SAL 処理により Raji 細胞にアポトーシスを誘導できると考えられた。ホスファチジルセリン(PS)の細胞膜外層側への移行と細胞縮小という現象は、一般的にアポトーシスの初期に起こることが知られている。²⁸⁾ フローサイトメトリー解析で、SAL 処理 Raji 細胞において、PS の細胞膜外層側への移行 [アネキシン V (ANV) の結合で評価] と細胞縮小が観察されたので、これらの現象がどのような過程を経て引き起こされるのかを検討した。

SAL 処理により、Raji 細胞では ANV の結合増加とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みが急速に起こった。SAL の処理濃度と処理時間の検討から、SAL 処理により PS の細胞膜外層側への移行が先行し、続いて PI の取り込みが上昇した。どちらも陽性になった細胞集団が 50% を超えると、縮小した細胞の割合が有意に増加した。¹⁵⁾ すなわち、「SAL は PS の細胞膜外層側への移行を誘導したのち、細胞縮小を引き起こす」ことになる。しかし、後述するように、SAL 処理細胞ではアポトーシスは誘導されない。タンパク質導入試薬 Profect-1 (Targeting Systems 社製) を用いて SAL を Raji 細胞に導入しても、Profect-1 未処理の場合と同様の結果であったので、SAL の Gb3 への結合が重要である。また、OLL26 は SAL と同様に、Raji 細胞に結合し、細胞膜表面の変化 (ANV の結合及び PI の取り込み増加) と細胞縮小を引き起こした。それには

SAL の約 10 倍の濃度を必要とした。

これに類似の現象として、Cummings のグループは、ヒトガレクチン -1 (2 量体) が HL-60 や MOLT-4 細胞に対して PS の移行を誘導するが、細胞縮小を誘導しないことを報告している。²⁹⁾ また、彼らは、PS の細胞膜外層側への移行がアポトーシスといつも関連しているとは限らないとも主張している。³⁰⁾ これらのことから、PS の移行と細胞縮小に係わる分子の活性化には、自ずと順番のあることが明らかである。

細胞膜の脂質二重層を維持あるいは制御する分子として、phospholipid scramblase (PLS), aminophospholipid translocase (APTL) 及び ATP-binding cassette (ABC) transporter [multidrug resistance (MDR) 1 P-glycoprotein (MDR1 P-gp), MDR-associated protein 1 (MRP1) など] が知られている。³¹⁻³³⁾ Raji 細胞におけるこれらの分子の mRNA 及びタンパク質レベルの発現について調べたところ、PLS と MDR1 P-gp の発現は低く、APTL と MRP1 の発現は非常に高い結果であった。1-Palmitoyl-1-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] dodecanoyl] (NBD)-phosphatidylcholine や NBD-PS の取り込みを指標に検討した結果、PLS と APTL は SAL による PS の移行に関与しないことが明らかになった。¹⁵⁾

そこで、MDR1 P-gp と MRP1 が SAL による PS の移行に関与するか否かを、MDR1 P-gp の阻害剤であるシクロスポリン A (CsA) と MRP1 の阻害剤である MK571 を用いて検討した。CsA の前処理で PS の移行が抑制されたが、MK571 の前処理では抑制されなかったため、MDR1 P-gp が関与することが明らかになった。¹⁵⁾ Pohl らは、MDR1 P-gp を過剰発現しているヒト胃癌細胞 (EPG85-257) における PS の移行には MDR1 P-gp が関与していることを報告しているが、MRP1 の関与には言及していない。³⁴⁾ このようなことから、Raji 細胞において、SAL は MDR1 P-gp と MRP1 の中から発現量が非常に少ない MDR1 P-gp を選択的に活性化する能力を持つと考えられる。

Raji 細胞において、SAL 処理による PS の移行には、MDR1 P-gp が関与している。SAL は、glycosphingolipid-enriched microdomain (GEM) に局在している Gb3 に結合するので、SAL 処理によ

り MDR1 P-gp が活性化される場合には、Gb3 の近傍に MDR1 P-gp が局在しており、活性化を受けるものと考えられる。そこで、MDR1 P-gp が Gb3 とともに GEM に局在しているか否かを、シヨ糖密度勾配遠心分離法により検討した。Raji 細胞では、MDR1 P-gp は GEM に回収された。MRP1 の局在についても調べたところ、同様に GEM に局在することが観察された。¹⁵⁾ これらの結果から、Gb3、MDR1 P-gp 及び MRP1 はいずれも GEM に共局在するが、Gb3 に結合した SAL は選択的に MDR1 P-gp を活性化していることが示唆された。

4-2. 細胞縮小 糖脂質生合成阻害剤である D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP)³⁵⁾ で処理した Raji 細胞では、Gb3 発現量は減少し、また SAL の結合も低下し、縮小した細胞の割合も低下した。すなわち、SAL による細胞縮小は Gb3 の発現量に依存することが明らかになった。¹⁵⁾ 基本的に、細胞の大きさがいつも同じになるように調節機能が備わっている。細胞容積調節は、K⁺ channel と Cl⁻ channel が活性化して KCl が細胞外に出ることで水の排泄が起これば縮小に、purinergic ATP receptor や G protein-coupled Ca²⁺-sensing receptor への ATP や Ca²⁺ の結合で容積は増加する。³⁶⁾ SAL 処理により、cell size が減少した細胞集団が増加し、同時に細胞内 K⁺ 濃度が低下した。このことから、SAL 処理 Raji 細胞では K⁺ channel の活性化が起こるものと考えられる。そこで、数種類の K⁺ channel の発現を検討したところ、G-protein activated K⁺ channel (GIRK1), voltage-gated K⁺ channel (Kv) 1.3 及び 2.1 の発現が確認された。これらの中で、GIRK1 が GEM の画分に回収されるので、GIRK1 の活性化により K⁺ の放出が促進されるものと考えられる (Sugawara S., Kawano T., Hosono M., Taka H., Fujimura T., Murayama K., Hakomori S., Nitta K., unpublished observation).

アポトーシス初期に、アポトーシス性細胞容積減少 (apoptotic volume decrease, AVD) が起こることが知られているが、カスパーゼを中心とする細胞死実行反応が開始された結果として起こると考えられていた。³⁷⁾ SAL 処理により、K⁺ の放出を伴う AVD が観察されるが、カスパーゼの活性化も DNA 断片化も観察されなかった。Okada らは、

AVD がカスパーゼの活性化よりも前に起こること、AVD を抑制することで細胞死そのものが抑制できることを報告している。³⁸⁾ ネクロシス時には細胞内 ATP 濃度が著しく減少することはよく知られているが、Zamaraeva らはアポトーシス時の細胞質 ATP 濃度が上昇することを報告している。³⁹⁾ これは、アポトーシスの誘導の前後で、細胞内の ATP 含量はあまり変化しないが、細胞容積の減少のために細胞質 ATP 濃度が上昇することになる。この結果は、細胞容積変化をコントロールすることで、アポトーシスをコントロールできる可能性を示唆している。これらのことから、SAL の Gb3 への結合により、MDR1 P-gp の活性化を介して PS の細胞膜外層側への移行が起こり、ついで GIRK1 の活性化により K⁺ の放出が促進され AVD に至るが、アポトーシスを誘導はしないので、SAL はアポトーシスの誘導過程を調べるためのよいツールとして利用価値が高い。

5. SAL 処理により誘導される細胞増殖抑制と細胞周期の停止

5-1. 細胞増殖抑制 SAL 処理により、Raji 細胞の縮小が観察されたので、SAL は細胞の増殖に影響を及ぼしていると考え、生存率と増殖率を検討した。細胞増殖抑制に関する以下の作業仮説を立て、関連する分子の解析を行った。

- 1) SAL 処理により細胞増殖速度が遅くなる。
- 2) SAL 処理により細胞周期の進行が抑制される。
- 3) 細胞増殖因子あるいはそれらに関連する分子の発現抑制を引き起こす。

SAL24 時間処理で、Raji 細胞の生存率の大きな低下はなく、約 90% を維持していたのに対し、OLL26 処理では約 50% まで低下した。このことから、両者の Raji 細胞に対する作用は異なると考えられる。

次に、細胞の増殖率を測定したところ、SAL 未処理 Raji 細胞では、48 時間培養後、細胞数が 5.8 倍に増加するのに対し、SAL 処理 Raji 細胞では、濃度依存的に細胞増殖が抑制され、50 μ g/ml で増殖がほぼ停止した。このとき、Raji 細胞の生存率には顕著な変化が認められないことから、SAL は細胞毒性を示さずに増殖を抑制することが明らかになった。このような現象は、Gb3 に結合して細胞

毒性を示す志賀毒素では起こらないことから、SAL 特有の効果であると考えられる。⁴⁰⁾

5-2. 細胞周期の停止 細胞の増殖速度は、細胞周期の進行によって決まる。SAL により細胞増殖が抑制されたことから、この現象がどのような機構で起こるのかを調べるため、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)とPIを用い、細胞周期の測定を行った。⁴¹⁾チミジンアナログであるBrdUは、増殖中の細胞のDNAにのみ取り込まれることから、S期を特異的に検出することができる。その結果、Raji細胞の増殖が抑制される濃度のSAL処理により、G₂/M期においてあまり変化はみられなかったものの、G₁期の細胞が約10%増加し、反対にS期の割合が約10%減少することが明らかになった。このことから、SALは細胞周期のG₁期に作用し、細胞増殖を抑制することが示唆された。

細胞周期では、駆動因子[cyclin-dependent protein kinase(CDK)2, CDK4, サイクリンなど]^{42,43)}と抑制因子(p21, p27, p53など)⁴⁴⁻⁴⁷⁾が相互に係わり、増殖速度を調節している。そこで、SAL処理による細胞周期の抑制に、G₁期で作用するCDK2⁴²⁾とCDK4⁴³⁾の発現が関与しているか否かをRT-PCR法を用いて検討した。その結果、CDK4は、SALで24時間処理することにより、未処理の場合と比較して発現量が32%減少し、さらに48時間処理では51%減少した。一方、CDK2では、SAL処理しても発現量に変化はみられなかった。

次に、G₁期で細胞周期を抑制する役割を担うことが知られているCDK inhibitor (CKI)である、p21とp27の遺伝子⁴⁴⁾の発現量について検討した。p21はp53によって誘導され、CDKと相互作用して細胞増殖を遅らせる働きがあり、⁴⁸⁾またp27はCDK2の活性化を抑制し、RBタンパク質のリン酸化を減少させるタンパク質として見いだされ、細胞周期をG₁期で停止させることが報告されている。^{49,50)}両遺伝子とも、SAL24時間処理により、p21は1.3倍、p27は1.5倍にそれぞれ増加し、48時間処理では、p21が2.3倍、p27も1.8倍まで増加する結果が得られた。これらのことから、CDKの機能を阻害して、G₁期で細胞周期を停止させているものと考えられる。

以上のことから、SALはG₃に結合したのち、CDK4遺伝子発現を抑制し、細胞増殖の抑制を引き

起こすこと、また、p21とp27の発現を増加させることにより、CDKの機能を阻害して細胞増殖の抑制を引き起こすことが示唆された。

SALによる細胞増殖抑制は、CDK4の発現が抑制されることにより引き起こされている可能性が考えられた。そこで、SALによるCDK4の発現調節機構を解明するため、CDKの転写活性を制御していることが知られている*c-myc*⁵¹⁾の発現量をRT-PCR法を用いて検討した。*c-myc*はG₀期からS期の間で一過性に発現が上昇し、細胞周期への移行を決定することが知られている。^{52,53)}CDK4は、*c-myc*がCDK4上流のCANNTGサイトに結合することにより、転写活性化されることから、CDK4の発現抑制は*c-myc*の発現量に変化が起きたためであると考えられる。そこで、*c-myc*の発現量と*c-myc*により転写調節を受けることが知られているornithine decarboxylase (ODC)の発現量の変化を検討した。Raji細胞をSALで24時間処理することにより、未処理細胞と比較して、*c-myc*の発現量は48.1%まで減少した。また、ODC^{54,55)}の遺伝子発現量を同一条件下で調べた結果、50.2%減少した。*c-myc*の遺伝子発現はSAL処理により抑制され、さらに、*c-myc*により転写が調節されることが知られているODC遺伝子^{56,57)}の発現も減少した。これらのことから、SALは*c-myc*の発現を抑制し、CDK4の発現を抑制すると考えられる。

6. SALはどのようにしてサイトカインによる細胞増殖シグナルに拮抗するシグナルを発揮するか?

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)などのサイトカインは、レセプター分子のチロシン残基をリン酸化することによりキナーゼ活性を誘導し、Janus family tyrosine kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT)経路^{58,59)}やRas経路⁶⁰⁾などを活性化して下流へと情報を伝える。Differential display法を用いて、SAL処理により発現量が増加する遺伝子をスクリーニングした結果、発現が抑制される遺伝子としてmitochondria-associated GM-CSF signaling (Magmas)遺伝子を見いだしている。Magmas遺伝子は、GM-CSFによる細胞増殖刺激に呼応して発現増加が観察されている。⁶¹⁾このMagmasの発現がSAL処理Raji細胞では低下した。

GM-CSF により Stat 転写因子群の Stat 5 が活性化され、結果として遺伝子の転写調節、細胞機能や代謝の変化、増殖分化などが起こる。⁶²⁾ Magmas の発現も、GM-CSF 刺激により、このようなシグナル伝達を経て誘導されると考えられる。SAL は Gb3 に結合したのち、GM-CSF が伝えるシグナル伝達経路の中で起こるチロシン残基のリン酸化を抑制し、Magmas 遺伝子の発現を抑制する可能性がある。これらのことから、SAL 処理により、チロシン残基がリン酸化されたタンパク質が仲介する細胞増殖シグナルの阻害が起こり、転写活性化因子 *c-myc* の発現減少と、それに引き続き起こる CDK4 の減少により細胞増殖を抑制することが示唆される。

7. 結 論

RBL の 1 つである SAL は、1) Gb3 を発現しているバーキットリンパ腫細胞に結合し、2) ホスファチジルセリン (PS) の細胞膜外層側への移行を引き起こし、さらに 3) カリウムイオンの放出に伴う水の流出により、細胞縮小を引き起こす。しかし、アポトーシスは誘導しない。これらの現象は、SAL の Gb3 への結合に依存して起こるため、Gb3 に関連している分子の役割がクローズアップされる。Gb3 は、シグナル伝達に係わる分子が集中している GEM に局在するので、SAL の Gb3 への結合を介して、これらの GEM に存在する分子が活性化 (又は不活性化) されると考えられた。

SAL による PS の細胞膜外層側への移行には P-gp の、また、カリウムイオンの放出には GIRK-1

の関与が明らかになった。さらに、SAL の Gb3 への結合は、細胞周期を G₁ 期で停止させ、細胞増殖を抑制し、また GM-CSF 刺激により発現が誘導される Magmas 遺伝子の発現も抑制した。Magmas 遺伝子は、GM-CSF による細胞増殖刺激に呼応して発現が増加することから、SAL 処理による細胞増殖抑制はこの遺伝子の発現抑制シグナルに起因するものと思われる (Fig. 2)。しかし、Raji 細胞では GM-CSF レセプターが欠損しているため、Magmas 遺伝子の発現増加に関与する分子は未同定である。Gb3 と GM-CSF レセプターを介したシグナルとが、対立している現象を観察していることになるが、いまだ真相はブラックボックスの中である。

以上のように、Gb3 を介した SAL の cytostatic effect を基盤として、SAL のバーキットリンパ腫治療への応用を目指したシグナル伝達機構の解明をさらに進めたい。

REFERENCES

- 1) Hynes R. O., *Trends Biochem. Sci.*, **24**, M33–M37 (1999).
- 2) Renkonen R., Mattila P., Majuri M. L., Rabinna J., Toppila S., Renkonen J., Hirvas L., Niittymaki J., Turunen J. P., Renkonen O., Paavonen T., *Glycoconj. J.*, **14**, 593–600 (1997).
- 3) Dodson K. W., Pinkner J. S., Rose T., Magnusson G., Hultgren S. J., Waksman G., *Cell*, **105**, 733–743 (2001).

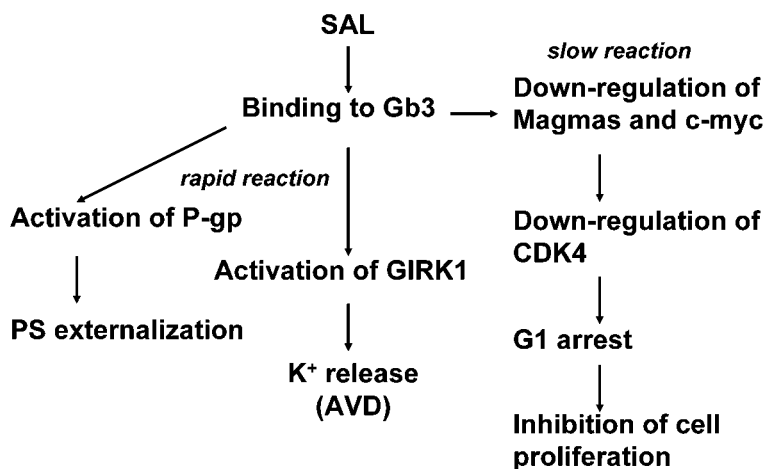


Fig. 2. Regulation of Gb3-mediated Signal Transduction by SAL

Binding of SAL to Gb3-expressing Burkitt's lymphoma cells caused apoptotic volume decrease (AVD) and inhibition of cell proliferation. The rapid and slow reactions proceeded within an hour and a day, respectively.

- 4) Karlsson K. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 309–350 (1989).
- 5) Aub J. C., Sanford B. H., Cote M. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 396–399 (1965).
- 6) Sela B. A., Lis H., Sharon N., Sachs L., *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 564–568 (1971).
- 7) “Immunotoxins,” ed. by Frankel A. E., Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988.
- 8) Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., Sasaki K., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 920–927 (1994).
- 9) Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Furusawa S., Ohkubo Y., Takimoto H., Murata R., Hosono M., Hikichi N., Sasaki K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 928–934 (1994).
- 10) Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Hosono M., Ogawa-Konno Y., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Int. J. Oncol.*, **9**, 19–23 (1996).
- 11) Nitta K., *Methods Enzymol.*, **341**, 368–374 (2001).
- 12) Krajhanzl A., “Advances in Lectin Research,” Vol. 3, ed. by Franz H., Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp. 83–131.
- 13) Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1–5 (1993).
- 14) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 668–675 (1999).
- 15) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 434–441 (2005).
- 16) Tateno H., Saneyoshi A., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 19190–19197 (1998).
- 17) Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1356–1365 (2002).
- 18) Shiina N., Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Saneyoshi M., Kamiya H., *Fisheries Sci.*, **68**, 1352–1366 (2002).
- 19) Ozeki Y., Yokota Y., Kato K. H., Titani K., Matsui T., *Exp. Cell Res.*, **216**, 318–324 (1995).
- 20) Gitt M. A., Xia Y. R., Atchison R. E., Lusic A. J., Barondes S. H., Leffler H., *J. Biol. Chem.*, **273**, 2961–2970 (1998).
- 21) Harrison L., “Lectin Reviews,” Vol. 1, eds. by Kilpatrick D. C., Van Driessche E., Bøgh-Hansen T. C., Sigma Chemical Company, St. Louis, 1991, pp. 17–39.
- 22) Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 239–243 (1993).
- 23) Hosono M., Matsuda K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., Nitta K., *Biomed. Res.*, **13**, 443–449 (1992).
- 24) Sugawara S., Sasaki S., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 327–334 (2005).
- 25) O’Brien A. D., Tesh V. L., Donohue-Rolfe A., Jackson M. P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A. A., Keusch G. T., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **180**, 65–94 (1992).
- 26) Mangeney M., Lingwood C. A., Taga S., Cailou B., Tursz T., Wiels J., *Cancer Res.*, **53**, 5314–5319 (1993).
- 27) Williams J. M., Lea N., Lord J. M., Roberts L. M., Milford D. V., Taylor C. M., *Toxicol. Lett.*, **91**, 121–127 (1997).
- 28) Walsh G. M., Dewson G., Wardlaw A. J., Levi-Schaffer F., Moqbel R., *J. Immunol. Methods*, **217**, 153–163 (1998).
- 29) Dias-Baruffi M., Zhu H., Cho M., Karmakar S., McEver R. P., Cummings R. D., *J. Biol. Chem.*, **278**, 41282–41293 (2003).
- 30) Stowell S., Karmakar S., Stowell C., Dias-Baruffi M., McEver R. P., Cummings R. D., *Blood* (DOI 10.1182/blood-2006-03-007153) (in press).
- 31) Fadeel B., Gleiss B., Hogstrand K., Chandra J., Wiedmer T., Sims P. J., Henter J. I., Orrenius S., Samali A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 504–511 (1999).
- 32) Bratton D. L., Fadok V. A., Richter D. A., Kailey J. M., Guthrie L. A., Henson P. M., *J. Biol. Chem.*, **272**, 26159–26165 (1997).
- 33) van Helvoort A., Smith A. J., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel A. H., Borst P., van Meer G., *Cell*, **87**, 507–517 (1996).
- 34) Pohl A., Lage H., Müller P., Pomorski T.,

- Herrmann A., *Biochem. J.*, **365**, 259–268 (2002).
- 35) Inokuchi J., Radin N. S., *J. Lipid Res.*, **28**, 565–571 (1987).
- 36) Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S., *J. Physiol.*, **532**, 3–16 (2001).
- 37) Bortner C. D., Cidlowski J. A., *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1549–1559 (1998).
- 38) Okada Y., Maeno E., *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **130**, 377–383 (2001).
- 39) Zamaraeva M. V., Sabirov R. Z., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Bessonava S.V., Okada Y., *Cell Death Differ.*, **12**, 1390–1397 (2005).
- 40) Nakajima H., Kiyokawa N., Katagiri Y. U., Taguchi T., Suzuki T., Sekino T., Mimori K., Ebata T., Saito M., Nakao H., Takeda T., Fujimoto J., *J. Biol. Chem.*, **272**, 29947–29953 (2001).
- 41) Li X., Darzynkiewicz Z., *Cell Prolif.*, **28**, 571–579 (1995).
- 42) Koepp D. M., Harper J. W., Elledge S. J., *Cell*, **97**, 431–434 (1999).
- 43) Amon A., Tyers M., Futcher B., Nasmyth K., *Cell*, **74**, 993–1007 (1993).
- 44) Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massague J., Pavletich N. P., *Nature*, **382**, 325–331 (1996).
- 45) Serrano M., Hannon G. J., Beach D., *Nature*, **366**, 704–707 (1993).
- 46) Serrano M., Hannon G. J., Beach D., *Trends Cell Biol.*, **7**, 95–98 (1997).
- 47) Albrechtsen N., Dornreiter I., Grosse F., Kim E., Wiesmuller L., Deppert W., *Oncogene*, **18**, 7706–7717 (1999).
- 48) el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B., *Cell*, **75**, 817–825 (1993).
- 49) Koff A., Ohtsuki M., Polyak K., Roberts J. M., Massague J., *Science*, **260**, 536–539, (1993).
- 50) Polyak K., Lee M. H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J. M., Tempst P., Massague J., *Cell*, **78**, 59–66 (1994).
- 51) Cole M. D., McMahon S. B., *Oncogene*, **18**, 2916–2924 (1999).
- 52) Persson H., Hennighausen L., Taub R., DeGrado W., Leder P., *Science*, **225**, 687–693 (1984).
- 53) Hann S. R., Thompson C. B., Eisenman R. N., *Nature*, **314**, 366–369 (1985).
- 54) Wagner A. J., Meyers C., Laimins L. A., Hay N., *Cell Growth Differ.*, **4**, 879–883 (1993).
- 55) Bush A., Dugan K., Mateyak M., Obaya A., Adachi S., Sedivy J., Cole M.D., *Genes Dev.*, **12**, 3797–3802 (1998).
- 56) Wolter F., Turchanowa L., Stein J., *Carcinogenesis*, **24**, 469–473 (2003).
- 57) Amati B., Dalton S., Brooks M. W., Littlewood T. D., Evan G. I., Land H., *Nature*, **359**, 423–426 (1992).
- 58) Darnel J. E., Kerr I. M., Stark G. R., *Science*, **264**, 1415–1421 (1994).
- 59) Leonard W. J., O’Shea J. J., *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 293–322 (1998).
- 60) Kinoshita T., Shirouzu M., Kamiya A., Hashimoto K., Yokoyama S., Miyajima A., *Oncogene*, **15**, 619–627 (1997).
- 61) Jubinsky P. T., Messer A., Bender J., Morris R. E., Ciruolo G. M., Witte D. P., Hawley R. G., Short M. K., *Exp. Hematol.*, **29**, 1392–1402 (2001).
- 62) Faderl S., Harris D., Van Q., Kantarjian H. M., Estrov Z., *Blood*, **102**, 630–637 (2003).