抄録

シアル酸結合レクチン (SBL) のマウス白血病細胞に対する アポトーシス誘導機構

小川由起子¹、藤井 佑樹¹、菅原 栄紀²、細野 雅佑²、立田 岳生²、
仁田 一雄²、小出 康裕³、Imtiaj Hasan³、大関 泰裕³

¹長崎国際大薬、²東北薬大分子認識、³横浜市大糖鎖生物

要旨：ウシガエル未受精卵に発見されたシアル酸結合レクチン (SBL) は、リボヌクレアーゼ活性を有し、がん細胞特異的に細胞に傷害を与える、興味深い作用を持ったレクチンである。SBL がマウス白血病 P388 細胞に起こした細胞死は、細胞表面のシアル酸を除くと失われ、がん細胞表面糖鎖のシアル酸を持つリガンド糖鎖との結合が必須と判明した。SBL はリガンドに結合すると細胞中のカスパーゼ-8 とカスパーゼ-3 を活性化させ核の凝縮と DNA の断片化を起こし細胞死に至らせることを証明した。細胞表面のスフィンゴ糖脂質リッチマイクロドメインに含まれる熱ショックタンパク質 (Hsp70、Hsc70) は SBL によるアポトーシス実行の直前に増加し、SBL と相互作用し本分子が SBL のアポトーシスに関与することを示した。リガンドを含むこれら結合分子の特定の重要や、糖鎖創薬としての SBL の実用可能性への期待を言及した。

キーワード：シアル酸、リボヌクレアーゼ、GEM、アポトーシス、熱ショックタンパク質

はじめに：ポストゲノム時代と糖鎖の重要性

現在われわれは、様々な生物のゲノムを解明し、遺伝子配列からタンパク質の立体や機能を容易に推定できるポストゲノム時代の中にいる。そこで得た成果のひとつに、タンパク質やその二次産物のスフィンゴ脂質には、単糖が共有結合した「糖鎖」とよぶ第 3 の生命鎖が付加した複合糖質として存在し、糖タンパク質やスフィンゴ糖脂質として働くことがあげられる。その糖鎖部分は酵素が合成し、単糖の配列順序や鎖の長さ、枝分かれ数の違いから、様々な糖鎖構造が作られる。ガン化により異常な糖鎖が出現し、iPS 化で細胞が幼若な糖鎖に変化したり、細胞の接着や他分子との結合に働き、何よりも細胞の情報伝達に糖鎖が重要に機能することが明らかにされた。これらの理由から、生体分子の機能研究には、糖鎖の役割解明が不可欠だと理解されている。

糖鎖と相互作用する代表的な分子に糖鎖結合性タ

ンパク質 (レクチン) が知られる。レクチンは全生物に普遍的に存在し、様々な糖鎖構造に特異的かつ可逆的に結合するレクチンが多種多様に存在する。本抄録は、両生類卵に含まれたシアル酸結合性レクチンによる白血病細胞へのアポトーシス活性を報じた。

Leczyme (レックザイム) としての SBL

両生類の未受精卵には、正常細胞には作用せず、がん細胞を特異的に凝集し強い抗腫瘍活性を示すタンパク質の存在が 1970 年代から知られていた。我々の研究グループは、アカガエル科の一種、ウシガエル (*Rana catesbeiana*) が大量の卵を産む利点に着目し、それを材料として抗腫瘍タンパク質を生化学的に単一に精製し性質を解明してきた。その一次構造は 111 個のユニークなアミノ酸配列から成り、アミノ末端はピログルタミン酸残基で修飾され、アルギニン残基とリジン残基が豊富な塩基性タ

ンパク質であった (Titani, Nitta, Hakomori et al. 1987)。本分子はがん細胞の特異的な凝集と細胞死を起こし、シアル酸を糖鎖の末端に持つムチンなどの糖タンパク質や脳に多量に含まれるシアル酸含有酸性スフィンゴ脂質のガングリオシドの共存で阻害されたことから、抗癌作用を持つシアル酸結合性レクチン (Sialic acid-binding lectin = SBL) として報告された。

やがてタンパク質構造のデータベース化が進み、当初新奇な一次構造と報じたSBLは、リボヌクレアーゼ (RNase) Aファミリーに属することが判明した。しかし、SBLを含む両生類卵のRNaseの一次構造には、他の生物のRNaseが有さないジスルフィド結合をC-末端近傍に持ち、これが優れた耐熱性の獲得などにつながり、SBLの糖鎖結合性もそこに由来すると考えている。さらにがん細胞のプログラム細胞死 (= アポトーシス) の考え方が広まり、SBLもがん細胞のDNAを傷害することが明らかになった (Tatsuta et al. 2013, Ogawa et al. 2014)。酵素活性ではピリミジン塩基特異的なリボヌクレアーゼ活性が証明された (Nitta et al. 1993)。これらの新知見により、SBLはがん細胞特異的に細胞死を起こすシアル酸結合性レクチンでしかもRNase酵素としての働きも持ち合わせることから、“レクチン+酵素”の意味で後年Leczyme (レックザイム) と命名された (Nitta et al. 2001)。

独自のユニークな視点から研究を進めてきたSBLだが、情報化が進む1990年代以降は、米国や台湾などの海外から注目され、創薬をめぐる研究の競争が加速化した。特に米国の研究グループはSBLと同等のRNaseを同アカガエル科の*Rana pipiens*卵から新たに分離し、Onconase (オンコナーゼ) と名づけアポトーシス活性や、NF- κ Bとマトリックスメタロプロテアーゼ-9の抑制など、がん化の抑制に関する研究が多数報じられた (Beck et al. 2008)。後年オンコナーゼは米国でフェーズⅢbの治験が行われて実用化も注目された。これら研究の国際競争が進む中、SBLは日本が世界に先駆け築いてきた糖鎖創薬の候補として、今後一層インパクトのある結果を発信していく義務がある。

SBLによる抗腫瘍効果の特徴

SBLは特に白血病細胞への強い抗腫瘍活性を示した。しかしバーキットリンパ腫Daudi、Raji細胞への抗腫瘍活性やヒト乳癌MCF細胞には効果がなく、抗腫瘍効果には細胞の選択性があると判明

Fig. 1 Cytotoxic activity and cell binding of SBL. A. Cell viability (%) (vertical axis) was quantified by WST-8 assay. Cancer cells: P388, K562, HL60 (leukemia), Raji, Daudi (Burkitt's lymphoma), and MCF7 (breast cancer). Normal cells: epidermal fibroblasts (NHDF), epidermal melanocytes (NHEK), and keratinocytes (NHEK). SBL (3 μ M) was administered to each cell line. Error bars: SE calculated from three different cell preparations assayed individually. *, $P < 0.01$ in comparison with control (white bar). B. Binding of SBL to cells as in Panel A was analyzed by flow cytometry. Cells were treated with 3 μ M SBL and incubated with anti-SBL polyclonal antibody and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, and fluorescence was detected by flow cytometry (FACS Calibur). Panel INC P388: incorporation of SBL into P388 cells (2×10^5) cultured with 3 μ M SBL for 1 h at 4°C. The cells were washed with PBS, incubated for 1 h at 4°C (dotted line) or 37°C (solid line), treated with anti-SBL antibody for 30 min at 4°C, washed twice with PBS, and incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody at a dilution of 1 : 500 in PBS (100 μ L) for 30 min at 4°C. The peak positions of the dotted and solid lines indicate cells before and after treatment with SBL (3 μ M) for 30 min, respectively.

した。さらに正常細胞のヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF)、皮膚繊維芽表皮角化細胞 (NHEK)、皮膚繊維芽表皮メラニン細胞 (NHEK) には全く毒性を示さず、がん細胞特異的な細胞死活性が確認できた (Fig. 1A)。SBLと細胞の結合をフローサイトメーターで分析すると、SBLはマウス白血病P388細胞、ヒト慢性骨髄性白血病K562細胞に強く結合したが、バーキットリンパ腫のRaji細胞、正常細胞のNHDF細胞には結合せず、SBLはがん細胞の表面物質に依存して結合の程度が異なることが強く示唆された (Fig. 1B)。細胞表面に結合したSBLは、細胞内に取り込まれ (Fig. 1B, INC P388)、ク

Fig. 2 Induction of nuclear condensation and DNA fragmentation (ladder formation) by SBL. **A.** Nuclei of P388 cells treated (right panel) or not treated (control; left panel) with $3\mu\text{M}$ SBL. Cells were cultured for 24 h and observed by Hoechst33342 staining using fluorescence microscopy (excitation and emission wavelengths 350 and 461 nm). **B.** Cells were treated with SBL ($3\mu\text{M}$) and cultured for 0–48 h (numbers at top). DNA ladders were detected by agarose-electrophoresis stained with ethidium bromide under UV light. Sia: sialidase-pretreated cells were incubated for 24 h with SBL ($3\mu\text{M}$). M: molecular marker for DNA fragment (100-bp DNA ladder). **C.** DNA electrophoresis pattern extracted from SBL-treated cells. Cancer cells (P388, K562, Raji) and normal cells (NHDF) were treated with SBL (3 or $20\mu\text{M}$) for 24 h. C: control (not treated with SBL).

ロマチンの凝縮を起こして、時間経過にともないDNAが断片化されアポトーシスを起こすことが観察された (Fig. 2A)。加えて興味深いことに、シアリダーゼでがん細胞を処理して表面のシアル酸を除いた後にSBLを加えると、DNAの断片化は抑制され、SBLが結合する細胞表面上の物質が必須だと判明した (Fig. 2B)。

SBLの細胞との結合が細胞死誘導の律速となることが判明したので、細胞表面のいずれの分子と結合しているか、阻害実験から推定し、シアル酸を含む酸性糖を持つ顎下腺ムチン (BSM)、ヘパリン、ヘパラン硫酸の共存で細胞死抑制とDNA断片化の抑制を確認した。上記のムチンのシアル酸を除去したアシアロムチンや、単糖のシアル酸では抑制は起きず、シアル酸を持った「糖鎖」にSBLは結合し、アポトーシスが誘導されると強く示唆された (Fig. 3A、3B)。この結果は、細胞をシアリダーゼで処

Fig. 3 Inhibition of the cytotoxic effect of SBL on P388 cells by co-treatment with free acidic glycoproteins or sialidase. **A.** White bar: negative control (no SBL treatment). Black bar: positive control (SBL treatment without glycoproteins). Hepa: heparin; HepS: heparan sulfate; Sia: sialic acid. Saccharides and glycoproteins were co-incubated with $3\mu\text{M}$ SBL with $25\mu\text{g/mL}$ glycoproteins (BSM, asialo-BSM) or $50\mu\text{g/mL}$ glycans (Hep, HepS). Sialic acid was administered at a concentration of $50\mu\text{g/mL}$. Error bars: SE from three independent experiments. *, $P<0.01$ from comparison with negative control. **, $P<0.01$ from comparison with positive control. **B.** Inhibition of SBL-induced DNA fragmentation by the co-presence of sialyl-glycoproteins. Abbreviations as in panel A. **C.** Recovery of cell viability against SBL by pretreatment with sialidase. Shaded bars: pretreatment with 1 U sialidase prior to administration of SBL (0– $3\mu\text{M}$). White bars: no sialidase pretreatment. Error bars: SE from three different cell preparations assayed individually. *, $P<0.05$.

理してもSBLの細胞死が抑制されたことで確認された (Fig. 3C)。

SBLリガンドはCholesterol-rich microdomain (GEM) に存在する

細胞のシグナル伝達に関わるスフィンゴ糖脂質、糖タンパク質は、細胞表面でコレステロールに富む「コレステロールリッチマイクロドメイン/スフィンゴ糖脂質リッチマイクロドメイン (=GEM)」と呼ぶ島状の脂質の塊に豊富に存在し、その膜の裏面にはキナーゼなど多くの情報伝達分子も存在している (Hakomori 2002)。SBLのリガンドとなる複合糖質もGEMに存在すると想定し、コレステロールを除去するメチル- β -シクロデキストリン (M β CD)

Fig. 4 Inhibition of the cytotoxic effect of SBL on P388 cells by pretreatment with MβCD. **A.** Cell viability (%) (vertical axis) was quantified by trypan blue exclusion assay. White bars: viability of cells nontreated with SBL and treated or not with MβCD. Black bar: SBL alone (control). Shaded bars: cells pretreated with MβCD (3.1 or 12.5 μg/mL) and then treated with SBL. **B.** Caspase-3 activity was measured by absorbance at 405 nm. Black bar: cells treated with SBL (3 μM) but not MβCD (positive control). Gray bars: cells pretreated with MβCD (3.1 or 12.5 μg/mL) and then treated with SBL (3 μM). White bars: caspase-3 activity of cells not treated with SBL (negative controls). Error bars: SE from three different cell preparations assayed individually. *, $P < 0.01$ from comparison with control (black bar).

を細胞に処理すると、その濃度に依存しがん細胞はSBLによる細胞死に耐性を示し (Fig. 4A)、リガンド候補がGEMに存在する可能性が示唆された。アポトーシス誘導の鍵分子と知られるセリンプロテアーゼのカスパーゼ-3がSBLの投与で活性化すると証明され、その活性化もMβCDの添加で抑制し、SBLとリガンドとの結合がカスパーゼの活性化に関与した (Fig. 4)。カスパーゼ-3の上位の酵素であるカスパーゼ-8もSBLにより活性化し (Fig. 5)、P388細胞をシアリダーゼで処理した細胞にSBLを加えるとその活性は抑制された (Fig. 5C)。これらの結果は、SBLはカスパーゼを経てアポトーシスを起こし、そのリガンドはGEMに存在すると考えられ、リガンドの同定が糖鎖創薬研究として重要なことが認識された。

SBLのアポトーシスは 熱ショックタンパク質が関与する

リガンドの探索を目指してP388細胞の細胞膜からGEMを分離しSBLと結合する分子を質量分析法

Fig. 5 Activation of caspases was induced by SBL administration. **A.** Time course of caspase-8 activity induced by administration of 3 μM SBL. **B.** Co-inhibition of caspase-3 and SBL-induced cytotoxicity by administration of caspase-8 inhibitor Z-IETD-fmk. White bars: viability of cells not treated with Z-IETD-fmk or SBL. Black bars: cells treated with SBL only. Gray bars: cells co-treated with SBL (3 μM) and Z-IETD-fmk (10–40 μM). *, $P < 0.01$ from comparison with control (black bar). **C.** Inhibition of SBL-induced caspase-8 activation by pretreatment with sialidase. Cells were pretreated or not with sialidase (1 U), then treated with SBL, and caspase-8 activity was measured as described above. *, $P < 0.01$ from comparison with negative control. **, $P < 0.01$ from comparison with positive control. Error bars: SE from three different cell preparations assayed individually.

によりスクリーニングすると、70 kDa熱ショックタンパク質 (Hsp70) とその同属分子 (Heat shock cognate protein = Hsc70) が新たに見つかった。P388細胞の表面にはHsp70とHsc70が共に存在し (Fig. 6B)、SBLとHsc70との共存も生化学的、細胞生物学的に明らかになった (Fig. 6)。SBLは膵臓RNaseに比べ、Hsp70との結合が3倍も強く、両分子間の結合は特異的なことが示唆された (Fig. 6C)。SBLがHsp70/Hsc70と結合したことから、Hsp70の阻害剤であるケルセチンをP388細胞に処理すると、SBLの細胞死が半減しDNA断片化も抑制された。これらの結果、SBLのアポトーシス誘

Fig. 6 Expression of Hsc70 and Hsp70 on the P388 cell surface. A. Results of western blotting. Following lysis of cells, detergent-insoluble fractions were obtained by sucrose density gradient centrifugation. Protein (10 μ g) from each fraction was subjected to SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. Left: detection of SBL receptor protein by treatment with SBL, anti-SBL antibody, and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG. Right: detection of Hsc70 by treatment with its primary and secondary antibody. B. Expression of Hsp70 and Hsc70 was quantified by flow cytometry. Cells were treated with anti-Hsc70 mAb or anti-Hsp70 mAb and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, and fluorescence was detected by flow cytometry (FACS Calibur). C. Specific binding of Hsp70 to SBL. Various concentrations of Hsp70 (0.1–10 μ g/mL) were placed on an ELISA plate, and SBL (circles) or bovine pancreatic RNase A (squares) (each 50 μ g/mL) was added. Bound RNases were detected by anti-SBL or anti-bovine pancreatic RNase A polyclonal antibody as primary antibody and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat antibody as secondary antibody. Absorbances from reaction products were detected using an ImmunoMini NJ-2300 plate recorder. D. Detection of SBL and Hsc70 on the cell surface. Cells were treated with SBL and anti-SBL antibody, anti-Hsc70 antibody, and Alexa 488 goat anti-rabbit IgG antibody or Alexa 568-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Merge: partial co-localization of SBL and Hsc70 on the cell surface.

導にはGEMに存在するHsp70/Hsc70が密接に関係していることが示唆され、今後のSBLの創薬研究としてのヒントにつながった (Fig. 7)。

おわりに

SBLやOnconaseが抗癌剤として高く注目された

Fig. 7 SBL-induced cytotoxicity was reduced by inhibition of Hsc70 and Hsp70 biosynthesis. A. Reduced expression of Hsc70 and Hsp70 on the P388 cell surface by culturing with the heat shock protein inhibitor quercetin (Quer). Gene expression levels of Hsc70 and Hsp70 were reduced after quercetin treatment, as detected by quantitative RT-PCR. B. The reduction in cell viability induced by 3 μ M SBL was recovered by co-culture with 5 μ M quercetin. C. Inhibition of SBL-induced DNA fragmentation by the co-presence of quercetin. The numbers of samples loaded onto agarose gel for electrophoresis are described in panel B. Error bars: SE from three different cell preparations assayed individually. *, $P < 0.01$.

理由に、本レクチンやRNaseががん細胞の細胞表面の特徴であるシアル酸を含む糖鎖をめぐり結合し、他の多くのDNA標的抗癌剤と異なり、細胞の生存に必須なRNAを強力に分解するRNaseの作用でがん細胞を死する多機能タンパク質としての利点があげられる。SBLは正常細胞への副作用が少なく、本編で紹介したがん細胞以外にも多剤耐性がん細胞や難治性がんの悪性中皮腫に抗腫瘍活性を示し (Tatsuta, Ogawa, Nitta et al. 2014)、日本で発見から構造解析が行われたオリジナリティを持つ、従来の抗癌剤に代わる、糖鎖を標的とした次世代の抗がん剤として期待される。

細胞膜のシアル酸は、がん細胞表面上に豊富に存在し分子間の認識と接着に重要な役割を担い転移や悪性化と密接に関わる。シアル酸に覆われ、酸性度の上がったがん細胞は、塩基性タンパク質であるRNaseとしてのSBLが結合しやすくなり抗癌作用を発揮するために有利だが、シアル酸を含むどのような糖鎖とSBLが強く親和性を示すか糖鎖アレイなどの方法でプロファイル化することが、糖鎖創薬

としてがん細胞の選択的な細胞死との関係を解明するために急務である。

文献

- Beck AK, Pass HI, Carbone M, Yang H (2008) Rnpirase as a potential antitumor ribonuclease treatment for mesothelioma and other malignancies, *Future Oncol.*, 4(3): 341-349
- Hakomori S, Handa K (2002) Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells:essential basis to define tumor malignancy, *FEBS Lett.*, 531(1): 88-92
- Nitta K, Oyama F, Oyama R, Sekiguchi K, Kawauchi H, Takayanagi Y, Hakomori S, Titani K (1993) Ribonuclease activity of sialic acid-binding lectin from *Rana catesbeiana* eggs, *Glycobiology*, 3(1): 37-45
- Nitta K (2001) Leczyme, *Methods Enzymol.*, 341: 368-374
- Ogawa Y, Sugawara S, Tatsuta T, Hosono M, Nitta K, Fujii Y, Kobayashi H, Fujimura T, Taka H, Koide Y, Hassan I, Matsumoto R, Yasumitsu H, Kanaly RA, Kawsar SM, Ozeki Y (2014) Sialyl-glycoconjugates in cholesterol-rich microdomains of P388 cells are the targets for apoptosis induced *Rana catesbeiana* oocyte ribonuclease, *Glycoconj. J.*, 31(2): 171-184
- Tatsuta T, Hosono M, Sugawara S, Kariya Y, Ogawa Y, Hakomori S, Nitta K (2013) Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells, *Int. J. Oncol.*, 43(5): 1402-1412
- Tatsuta T, Hosono M, Takahashi K, Omoto T, Kariya Y, Sugawara S, Hakomori S, Nitta K (2014) Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces apoptosis to malignant mesothelioma and exerts synergistic antitumor effects with TRAIL, *Int. J. Oncol.*, 44(2): 377-384
- Tatsuta T, Sugawara S, Takahashi K, Ogawa Y, Hosono M, Nitta K (2014) Cancer-selective induction of apoptosis by leczyme, *Front Oncol.*, 4: 139
- Titani K, Takio K, Kuwada M, Nitta K, Sakakibara F, Kawauchi H, Takayanagi G, Hakomori S (1987) Amino acid sequence of sialic acid binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs., *Biochemistry*, 26(8): 2189-2194

PROFILE

小川由起子 長崎国際大学薬学部微生物学研究室

〔経歴〕東北薬科大学大学院薬学研究科博士課程修了 博士(薬学) 長崎国際大学薬学部准教授

〔専門〕糖鎖生物学 がん細胞の増殖や細胞死を制御している種々の細胞情報伝達の調節に関わる糖鎖の役割について

〔E-mail〕yogawa@niu.ac.jp

A Sialic Acid-binding Lectin (SBL) Dependent Apoptosis is Triggered by Sialylated-glycoconjugates in GEM of P388 Cells

Yukiko Ogawa¹, Yuki Fujii¹, Shigeki Sugawara², Masahiro Hosono²,
Takeo Tatsuta², Kazuo Nitta², Yasuhiro Koide³,
Hasan Imtiaj³, Yasuhiro Ozeki³

¹Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagasaki International University

²Divisions of Cell Recognition Study, Institute of Molecular
Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Pharmaceutical University

³Laboratory of Glycobiology and Marine Biochemistry,
Graduate School of NanoBio Sciences, Yokohama City University

Abstract: SBL was originally isolated from frog (*Rana catesbeiana*) oocytes as a novel sialic acid-binding lectin (SBL) that displayed strong anti-cancer activity. SBL was later shown to be identical to a ribonuclease from oocytes of the same species. The administration of SBL induced apoptosis in mouse leukemia P388 cells but did not kill umbilical vein endothelial or fibroblast cells derived from normal tissues. The cytotoxicity of SBL was inhibited by desialylation of P388 cells and the co-presence of free bovine submaxillary mucin and heparan sulphate. SBL was observed to be incorporated into cells after attachment to cholesterol-rich microdomains and SBL induced apoptosis through the caspase-3 pathway following activation of caspase-8. Addition of the cholesterol remover, methyl- β -cyclodextrin reduced SBL-induced apoptosis with caspase-3 activity. Mass spectrometric and flow cytometric analyses appeared that both a heat shock cognate protein (Hsc70) and a heat shock protein (Hsp70) on the cell membrane bound to SBL and their inhibitor, quercetin significantly reduced SBL-induced apoptosis. Taken together, these findings suggest that sialyl-glycoconjugates present in cholesterol-rich microdomains form complexes with Hsc70 and/or Hsp70 that act as triggers for SBL to induce apoptosis through a pathway involving the activation of caspase-3 and caspase-8.

Key words: *sialic acid, ribonuclease, GEM, apoptosis, heat shock protein*