ナマズ卵レクチンのがん治療への応用を目指した基礎研究

菅原 栄 紀

Application of Lectin from Catfish Eggs to Cancer Therapy: A Fundamental Study

Shigeki Sugawara

Division of Cell Recognition Study, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Medical and Pharmaceutical University; 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan.

(Received June 3, 2018)

Silurus asotus egg lectin (SAL) is an α -galactoside-binding protein, isolated from the egg of catfish. It belongs to the rhamnose-binding lectin family that binds to Gb3 glycan (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc). SAL has resulted in the induction of early apoptosis in the Raji cell line, which is a Burkitt's lymphoma cell line expressing Gb3. The apoptosis was characterized by i) increased externalization of phosphatidylserin *via* multidrug resistance 1 P-glycoprotein (MDR1 P-gp), and ii) reduced cell size through the activation of voltage-gated potassium channel Kv1.3. Although the incorporation of propidium iodide (PI) was observed, SAL did not cause apoptosis in Raji cells. This event may be due to an increased expression of membrane-anchored tumor necrosis factor α (TNF α) and TNF receptor 1 (TNFR1) after the binding of SAL to Gb3. Moreover, SAL arrested the cell cycle at the G_{0/1} phase, thus inhibiting cell proliferation. The suppression of cell proliferation by SAL was likely due to the enhanced expression of p21 caused by the phosphorylation of ERK_{1/2} through the Ras-MEK-ERK_{1/2} pathway. Combination of SAL with anti-cancer drugs was also examined in this study. Interestingly, SAL increased the incorporation of doxorubicin (Dox) into Raji cells, consequently enhancing its cytotoxic effect. Similarly, the cytotoxic effects of vinblastine and irinotecan were also significantly increased in Raji cells treated with SAL. These studies demonstrate that SAL may be applied to cancer therapy.

Key words—*Silurus asotus* egg lectin; globotriaosylceramide; cell cycle arrest; anti-cancer drug

1. はじめに

ヒトにおける糖鎖形成では、数種類の糖が単純に連結した直鎖構造ではなく、多種の結合様式により枝分かれした構造を有することから、糖鎖は情報分子として、多様性という点で核酸やアミノ酸よりも優れていることが示唆されてきた。¹⁾しかし、一方でその多様性が、タンパク質などの機能解明と比較して糖鎖の持つ情報機能の解析を困難にしている一因になっている。糖鎖の機能を理解する試みに、動物から植物まで生物界全体に普遍的に存在し、特定の糖に対して特異的に結合する性質を持つレクチンが利用されてきた。現在まで、受精、発生、免疫、ウイルス感染などのメカニズムの一部は、いずれも糖鎖とそれを認識するタンパク質であるレクチンと

の特異的な相互作用に起因することが明らかにされている。^{2,3)}近年の生命科学の進歩において、レクチンは、生体における情報分子として位置づけられる糖鎖の受け手として注目されている。細胞内で作られるタンパク質のおよそ半分が糖鎖修飾を受けているとされ、糖タンパク質の機能解析を行うにあっても、糖鎖及び糖鎖を認識するレクチンの重要性が再認識されている。

古くから動物レクチンの原材料として卵が重用されており、筆者の研究室ではウシガエル卵より単離・精製したシアル酸結合性レクチン (cSBL) に、正常中皮細胞に対しては効果を示さず、悪性中皮腫細胞選択的に細胞死を誘導する効果があることを見出した。⁴⁻⁶⁾

一方、魚卵には動物レクチンの二大ファミリーであるガレクチンや C-タイプレクチンとは異なるユニークな糖特異性を有するレクチンが多数見つまっている。^{7,8)}このレクチンの特徴は、L-ラムノースや α -ガラクトシドに対して非常に高い親和性を示し、

東北医科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: ssuga@tohoku-mpu.ac.jp

本総説は、平成 29 年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

かつ後述する特徴的な糖認識配列を共有することである。⁹⁾このような性質を持つレクチンを総称して、ラムノース結合性レクチン (rhamnose-binding lectin; RBL) という呼称が現在使用されている。⁹⁻¹⁴⁾ RBL の中には、がん細胞膜に発現しているスフィンゴ糖脂質の一種でセラミドに結合している三糖の非還元末端にガラクトシル α 結合を持つグロボトリアオシルセラミド (Gb3) に結合することにより細胞死を引き起こすものが報告されている。¹⁵⁻¹⁷⁾

本稿では、RBL の一種であるナマズ卵より得られたレクチン (*Silurus asotus* egg lectin; SAL) に着目し、Gb3 を高発現しているパーキットリンパ腫細胞株 Raji に対する作用を検討した結果を中心に詳述するとともに、がん治療への応用の可能性を概説する。

2. 魚卵由来ラムノース結合性レクチンについて

サケ目、ナマズ目、キュウリウオ目、スズキ目及びコイ目に属する多くの魚の未受精卵より RBL が発見されている。^{10-14,18-22)} これらのタンパク質のアミノ酸配列を比較すると類似した約 95 アミノ酸残基よりなるドメインが 2 あるいは 3 つ並んだタンデムリピート構造を持つという特徴を持つことが明らかとなっている。このドメインには、RBL モチーフと呼ばれている、よく保存された配列が存在し、N-末端部に ANYGR 配列、C 末端部に DPC-KYL 配列がみられ、このドメインが RBL における糖結合ドメイン (RBL-carbohydrate recognition domain; RBL-CRD) であると報告されている。¹¹⁾ Nitta らは、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、RBL ファミリーを 5 つのタイプに分類し、²³⁾ その後、Ogawa らにより、タンパク質配列データベースを利用した包括的な解析がなされ、RBL ファミリーが有する RBL-CRD を進化的相同性の観点から 6 つに分類し (RBL-CRD1-6)、この RBL-CRD の組み合わせから 13 のサブタイプに分類された。²⁴⁾ SAL は、RBL-CRD が 3 つ並んだタイプ Ia (CRD: 5-3-3) に分類される。これまで、魚卵からは、1 つの RBL-CRD よりなる RBL の報告はなされていないが、ウニ卵からは、タンデムリピートではなく二量体としての RBL が見つかった。また、魚卵より単離・精製されたという報告ではないが、2014 年に Thongda らにより、RNA-sequencing (RNA-seq) データ

を利用し構築されたアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) データベースから、このナマズには 6 つの異なる推定アミノ酸配列を有する RBL (IpRBL1a, 1b, 1c, 3a, 3b, 5a) が存在することを示し、このうち IpRBL5a は、1 つの RBL-CRD からなるものであることが報告された。²⁵⁾

3. SAL によるホスファチジルセリン (phosphatidylserine; PS) の細胞膜外層側への移行及び細胞縮小に関する分子機構

細胞毒性を有するガラクトース結合性レクチンである ricin, abrin 及び misletoe (ヤドリギ) レクチンは、細胞に PS の外層側への移行などアポトーシス様の変化をもたらし、最終的に細胞死を引き起こすことが知られている。²⁶⁻²⁸⁾ 一方、2 量体化したガレクチン-1 (dGal-1) は、PS の外層側への移行を誘導するものの、アポトーシスを誘導しない。²⁹⁾ これらのレクチンによる PS の細胞膜外層側への移動に係わる分子機構はまだ明らかにされておらず、それぞれ異なる機構により引き起こされるものと考えられている。また、RNA *N*-glycosidase 活性を持つ A サブユニット及びレクチンとして機能を有する B サブユニットから構成される AB-毒素の代表例である志賀毒素 (Shiga toxin; Stx) は、細胞膜上に発現している Gb3 に結合することにより、アポトーシスを誘導することが知られている。³⁰⁾ SAL も Gb3 に結合することから [Fig. 1 (A)], Gb3 発現細胞に対して細胞死を誘導できるのではないかと考えたが、実験の結果、Raji 細胞において SAL 処理による細胞死は認められなかった。しかし、一般的にアポトーシス初期に起こることが知られている PS の細胞膜外層側への移行 (アネキシン V の結合で評価) 及び細胞縮小が認められたため [Figs. 1 (B) and (C)], 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、またなぜ細胞死が誘導されないのかという点について検討した。

PS の細胞膜外層側への移行に関する分子を同

菅原栄紀

2000 年東北薬科大学薬学部卒業。2002 年東北大学大学院薬学研究科修士課程修了。2005 年東北薬科大学大学院薬学研究科博士課程修了。同年同大学助手。2007 年同助教。2017 年東北医科薬科大学薬学部講師、現在に至る。研究テーマと抱負：魚卵レクチンのがん治療への応用を目指した研究。

Fig. 1. Effect of SAL on Raji Cells

(A) Expression of Gb3 in Raji cells (green) and binding of SAL (red). (B) Externalization of phosphatidylserine (PS) and incorporation of propidium iodide (PI) in Raji cells. (C) Flow cytometry based data to shown shrinkage of Raji cells induced by SAL. (D) Reduction of proliferation of Raji cells by SAL as measured by trypan blue dye exclusion assay. Control (○); 1 $\mu\text{g/mL}$ (△); 5 $\mu\text{g/mL}$ (□); 50 $\mu\text{g/mL}$ (■); 100 $\mu\text{g/mL}$ (●).

定するため、細胞膜脂質二重層を維持あるいは制御する分子として知られている phospholipid scramblase (PLS), aminophospholipid translocase (APTL), ATP-binding cassette (ABC) transporter に属する MDR1 P-gp 及び multidrug resistance protein (MRP) 1 に着目して検討を行った。³¹⁻³⁴⁾ Raji

における PLS の発現レベルは非常に低く phospholipid 1-palmitoyl-1-[6-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] dodecanoyl]-PC (NBD-PC) の取り込みがほとんど認められなかったため、Raji における PS の細胞膜外層側への移行に、PLS が関与している可能性は低いと考えた。³⁵⁾ 一方、Raji 細胞では、

Fig. 2. An Insight into the Molecular Mechanism of Antiapoptotic Effect Caused by SAL

Treatment of Gb3 expressing Raji cells with SAL causes binding of TNF α to TNFR1, resulting in translocation of NF- κ B, thus inducing an anti-apoptotic effect.

PS やホスファチジルエタノールアミン (PE) の細胞膜外層から内層側への移行に参与している APTL の発現が非常に高いことが報告されていたが、こちらも SAL 処理 Raji 細胞における APTL 活性の減少は観察されなかった。以上のことから、PLS と APTL は SAL が誘導する PS の移行には関与していないと考えられた。次に、MRP1 及び MDR1 P-gp の関与について検討した。Raji 細胞においては、MRP1 の発現が高く、反対に MDR1 P-gp 発現は非常に低いものであった。次に、MDR1 P-gp 阻害剤であるシクロスポリン A (cyclosporin A; CsA) 及び MRP1 阻害剤である MRK16 を用いた実験を行った結果、SAL 処理により PS の細胞膜外層側への移行が CsA でのみ阻害された。これらの結果から、SAL は Raji 細胞膜上に発現している Gb3 に結合し、選択的に MDR1 P-gp を活性化していることが示唆された。³⁵⁾

細胞膜には、膜内外の電位差の変化によって開閉する電位依存型カリウムチャンネル (voltage-gated potassium channel; Kv)、カルシウムイオン又は他のシグナル分子により開閉するカルシウム依存型カリウムチャンネル及び G タンパク質共役型の内向き整流カリウムチャンネルが発現している。このような

カリウムチャンネルは、カリウムを選択的に細胞内に流入あるいは排出することにより細胞の大きさを常に一定に保つように働いている。³⁶⁾ また、アポトーシスによる細胞縮小は、カリウムチャンネルからのカリウムイオンの流出によって起こることも知られている。³⁷⁾ SAL 処理した Raji 細胞でみられる細胞縮小も同様な機構により起こるのかを検討した結果、SAL の処理時間及び濃度依存的に細胞内カリウムイオンの減少が認められた。一方、Gb3 を発現していない K562 細胞ではこのような現象はみられないことから、これらの現象は SAL の Gb3 への結合が引き金となって引き起こされていることを示している。したがって、Gb3 に SAL が結合することによりこのチャンネルが活性化し、細胞外へのカリウムイオンの放出と同時に水分子が流出するため、腫瘍細胞の縮小が引き起こされるというストーリーが推測される。³⁸⁾

4. SAL は tumor necrosis factor (TNF) α 及び TNF receptor (TNFR) の発現を増加させる

SAL は、Raji 細胞をアポトーシス初期状態に変化させるが、結果的に細胞死を引き起こさない。なぜ細胞死を誘導しないのか、その原因については不明であった。Watanabe らは魚由来の培養細胞であ

る RTM5 (繊維芽細胞) 及び RTG-2 (腹腔内マクロファージ細胞) に対して CSL は, サイトカインの一種である $\text{TNF}\alpha$ と interleukin (IL) -8 の発現を誘導することを報告し,³⁹⁾ 筆者のデータからも SAL 処理 Raji 細胞において $\text{TNF}\alpha$ が上昇するという結果が得られている. $\text{TNF}\alpha$ には membrane form (膜結合型) と soluble form (可溶型) が存在することが知られているが, SAL は膜結合型 $\text{TNF}\alpha$ の発現を上昇させる効果を示す.¹⁶⁾ 後述にするように, SAL は, ERK シグナル伝達機構を活性化するため, 膜結合型 $\text{TNF}\alpha$ の発現上昇もこの機構により引き起こされている可能性を考えている. また $\text{TNF}\alpha$ は, 細胞膜上に発現している TNFR に結合することにより細胞内にシグナル伝えるが, SAL は, $\text{TNF}\alpha$ の発現上昇だけではなく, その受容体である TNFR1 及び TNFR2 の発現も上昇させる. $\text{TNF}\alpha$ が TNFR に結合すると nuclear factor- κ B (NF- κ B) が活性型に変化し, この NF- κ B が核内に移行することにより様々な遺伝子の発現が誘導されることから, SAL 処理により活性型 NF- κ B が核内に核移行することが明らかとなった.¹⁶⁾ Qin らにより, $\text{TNF}\alpha$ が TNFR1 に結合することにより抗アポトーシス作用を誘導することが報告されている.⁴⁰⁾ このことから, SAL 処理により細胞死が誘導されないのは, 膜結合型 $\text{TNF}\alpha$ 及び TNFR1 の発現上昇によりこれらの分子を介して細胞同士が結合することによる NF- κ B の抗アポトーシス効果が原因ではないかと推察している (Fig. 2). 現在, NF- κ B の核移行が抗アポトーシスに関与しているのか否かを直接的に証明する実験に取り組んでいる.

5. SAL はバーキットリンパ腫細胞の増殖を抑制する

上記のように, Raji 細胞を SAL 処理しても細胞死は起きない. そこで, SAL の細胞増殖におよぼす影響を検討したところ, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SAL 処理で細胞増殖が止まることが分かった [Fig. 1 (D)]. さらに, この現象は, ハプテン糖により Gb3 に結合した SAL を解離させると解除されることから, SAL の糖結合能が直接関与していると考えられる. そこで, この細胞増殖抑制が細胞周期の停止によるのか否かを検討したところ, SAL は細胞周期を G1 期で停止させることにより細胞増殖を抑制している可能性が示された. 細胞周期の G1 期から S

Fig. 3. SAL Alters the Expression of Proteins CDK4, c-MYC, cyclin D3, p21, and p27

Cells (1×10^6) were treated with SAL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C for 0, 12, or 24 h. Whole cell extract was subjected to western blotting using antibodies against CDK4, c-MYC, cyclin D3, p21, and p27.

Fig. 4. SAL Causes Activation of Ras-MEK-ERK Pathway

Cells (1×10^6) were treated with SAL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C for various durations from 0 to 24 h. Whole cell extracts were subjected to western blotting using antibodies directed against Ras, pMEK_{1/2}, MEK_{1/2}, pERK_{1/2}, and ERK₁.

期への移行には, cyclin-dependent kinase (CDK) 4, c-myc, cyclin D3, p21 及び p27 が関与していることが知られている. SAL 処理によるこれらのタンパク質発現量の変化を検討した結果, CDK4, c-myc, 及び cyclin D3 の発現が減少し, 反対に p21 と p27 は SAL 処理により発現が上昇することが明らかとなった (Fig. 3).⁴¹⁾ 次に, ERK 経路に着目してこれらの分子の制御機構について検討したところ, SAL 処理により Ras-MEK-ERK 経路が活性化するという結果が得られた (Fig. 4). この結果を単純に解釈すると細胞を増殖させる方向に働くことになり, SAL が細胞増殖を抑制する, という事実と相反することからメカニズム解明を悩ませた. し

Fig. 5. Cytotoxic Effect of Anti-cancer Drugs in Raji Cells Pre-treated with SAL

(A) Cells (5×10^4) were treated with Dox (25, 50, 100, 200 ng/mL) at 37°C for 60 h. Raji cells pre-treated with 100 µg/mL SAL at 37°C for 24 h, were subjected to treatment with Dox (100 ng/mL) at 37°C for 60 h. (B) Raji cells pre-treated with SAL (5, 10, 20 and 50 µg/mL) at 37°C for 24 h were treated with vinblastine (25 ng/mL) at 37°C for 48 h. (C) Raji cells pre-treated with SAL (5, 10, 20 and 50 µg/mL) at 37°C for 24 h were treated with irinotecan (5 µM) at 37°C for 48 h. Cell viability was measured by trypan blue dye exclusion assay. Each value represents the mean $\pm$ S.E. for three independent experiments. * $p < 0.05$ versus doxorubicin, vinblastine, or irinotecan-treated cells.

かし、2011年にMoonらにより、JNK阻害剤SP600125で処理された細胞では、ERKのリン酸化レベル上昇に伴い、転写因子であるSp1が活性化することにより、p21の発現が上昇し細胞増殖を抑制するという報告がなされた。⁴²⁾ SALもこれと同様の作用機序を持つとすれば、一連の結果を矛盾なく説明できるかもしれない。現在、この仮説を証明するエビデンスを得るための実験が進行中である。

6. SALと抗がん剤との併用効果

ヨウ化プロピジウム(propidium iodide; PI)は、細胞膜が健全な生細胞には取り込まれず、細胞死により細胞膜が崩壊した細胞に取り込まれることが知られている。先にも述べたように、SALは細胞死を誘導しない。しかし、理由は分からないが、細胞膜不透過物質であるPIがSAL処理細胞には促進的に取り込まれるという興味深い現象を見出した

[Fig. 1 (B)]. この現象をがん治療に応用できないと考え、PI を抗がん剤に置き換えて SAL と抗がん剤との併用効果について検討した。

まずはじめに、ドキソルビシン (doxorubicin; Dox) との併用効果を検討した。Dox の持つ自家蛍光を利用して細胞内の取り込み量を測定した結果、SAL 処理により増加していることが示された。⁴³⁾ Dox は、処理濃度依存的に Raji 細胞の生存率を低下させるが、SAL を前処理することにより生存率がさらに低下し、100 ng/mL の Dox と SAL の併用により、200 ng/mL の Dox 処理と同程度まで生存率を低下させることが示された [Fig. 5 (A)]. さらに、他の抗がん剤との併用も検討したところ、25 ng/mL ビンブラスチン (vinblastine; Vin) 単独処理時の Raji 細胞の生存率は 85% であったが、SAL を併用することにより生存率が 55% まで低下した [Fig. 5 (B)]. イリノテカン (irinotecan; Iri) も同様に SAL 併用時における生存率の変化を調べたところ、5 μ M Iri 単独処理では生存率が 74% であったが、SAL との併用により生存率が 59% に低下した [Fig. 5 (C)].⁴⁴⁾ これらの結果から、抗がん剤を SAL と併用することにより薬剤の濃度を下げても高濃度と同じ効果を得られることが分かった。抗がん剤治療で最も問題となるのは副作用の発現であるが、SAL は、がん細胞の薬剤感受性を高める効果を発揮することでこの問題を解決できる可能性を有している。また、パーキットリンパ腫のみならず Gb3 を発現しているがん細胞であれば、SAL は併用する抗がん剤の用量低減に貢献できる可能性を有するものと考えている。

7. おわりに

RBL のがん細胞に対する作用は、前述した CSL3 と SAL では異なり、前者は cytotoxic に、また後者は cytostatic に働く。この要因が、レクチン分子の CRD 組成による (それぞれ 2 個及び 3 個) か否かを証明するエビデンスはまだ得られていないが、CSL3 と同様に 2 個の CRD からなる OLL は、SAL と異なり cytotoxic な作用を示すことを確認している。表面プラズモン共鳴スペクトル (surface plasmon resonance; SPR) 解析により、SAL と OLL の糖結合性を速度論的に比較したところ、Gal α 結合及び Gal β 結合に対する親和性は、SAL が Gal α $\gg$ Gal β である一方、OLL は Gal α $\geq$ Gal β

で、若干の相違が認められた。この傾向は、レクチンの Raji 細胞への結合性が、SAL の場合抗 Gb3 抗体の前処理でほぼ完全に阻害されるのに対し、OLL では同じ処理でも結合が一部残存するという結果にもあらわれている。すなわち、Gb3 のみを介する SAL の cytostatic な作用は、同時に Gal β 結合を介する他の糖鎖との相互作用の追加により cytotoxic な方向に舵を切るようになるのではない。また、Gb3 発現のみられない K562 細胞に Gb3 を強制発現させると、SAL の結合は観察されるものの、Raji 細胞でみられるような細胞縮小や増殖抑制は起こらない。そもそも Gb3 は膜貫通分子ではないので、SAL のシグナルを細胞内に伝達するためのアダプター分子の存在が推測されたことから、現在 Gb3 の近傍に存在し、かつ RBL の結合によりシグナルを仲介する分子を、enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) 法などを駆使して探索中である。⁴⁵⁾ さらに最近、がん細胞の種類により Gb3 の分子組成 (主にセラミド部分を構成しているアシル鎖の違い) が異なり、それに伴って SAL の効果も変化するという興味ある知見も得ている。

抗腫瘍戦略にレクチンを参入させる新しい試みが最近報告された。2017 年に筑波大学と産業技術総合研究所のグループが *Burkholderia cenocepacia* 由来の BC2LC-N レクチンに緑膿菌外毒素である PE38 を融合させた lectin drug conjugate (LDC) を開発し、膵がんを標的とした抗腫瘍薬創製の可能性を示した。この LDC の膵がん細胞株に対する効果は、既存の抗体-薬剤融合体 (antibody-drug conjugate; ADC) よりも 1000 倍高く、かつマウスを用いた *in vivo* の実験でもその効果が確認された。⁴⁶⁾ これはレクチンが標的細胞を捕捉する能力において抗体を凌駕している点で、従来の認識を覆す重要な知見である。またこの報告は、レクチンのがん治療への応用に道を拓くものであり、今後 LDC の応用研究が加速されていくことになろう。一方で、筆者のナマズ卵レクチンによる、「がん細胞の薬剤感受性を高め、副作用を軽減する」戦略も、LDC とはコンセプトが異なるが、これまでにないユニークなものであると考えている。細胞膜ラフト画分における Gb3 の機能解明あるいは未同定の仲介タンパク質の解析など課題は山積しているが、「レクチンに

よるがん治療」実現に向けて研究を進めていきたい。

謝辞 本研究は東北医科薬科大学薬学部分子認識学教室 細野雅祐教授並びに仁田一雄名誉教授の指導により行われた研究成果であります。この場を借りて御礼申し上げます。本総説中で述べた当研究室関連の研究の一部は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の助成により行われたものです。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- Varki A., "Essential of Glycobiology," ed. by Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1999.
- Dodson K. W., Pinkner J. S., Rose T., Magnusson G., Hultgren S. J., Waksman G., *Cell*, **105**, 733–743 (2001).
- Karlson K. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 309–350 (1989).
- Krajhanzl A., *Adv. Lectin Res.*, **3**, 83–131 (1990).
- Satoh T., Tatsuta T., Sugawara S., Hara A., Hosono M., *Oncotarget*, **8**, 42466–42477 (2017).
- Tatsuta T., Satoh T., Sugawara S., Hara A., Hosono M., *PLoS One*, **13**, e0190653 (2018).
- Barondes S. H., Castronovo V., Cooper D. N. W., Cummings R. D., Drickamer K., Feizi T., Gitt M. A., Hirabayashi J., Hughes C., Kasai K., Leffler H., Liu F. T., Lotan R., Mercurio A. M., Monsigny M., Pillai S., Poirer F., Raz A., Rigby P. W. J., Rini J. M., Wong J. L., *Cell*, **76**, 597–598 (1994).
- Barondes S. H., Cooper D. N. W., Gitt M. A., Leffler H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 20807–20810 (1994).
- Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 239–243 (1993).
- Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochem. Biophys. Acta*, **1472**, 668–675 (1999).
- Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1–5 (1993).
- Hosono M., Matsuda K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., Nitta K., *Biomed. Res.*, **13**, 443–449 (1992).
- Tateno H., Saneyoshi A., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 19190–19197 (1998).
- Shiina N., Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Saneyoshi M., Kamiya H., *Fish. Sci.*, **68**, 1352–1366 (2002).
- Hosono M., Sugawara S., Matsuda A., Tatsuta T., Koide Y., Hasan I., Ozeki Y., Nitta K., *Fish. Physiol. Biochem.*, **40**, 1559–1572 (2014).
- Shirai T., Watanabe Y., Lee M., Ogawa T., Muramoto K., *J. Mol. Biol.*, **391**, 390–403 (2009).
- Hatakeyama T., Ichise A., Unno H., Goda S., Oda T., Tateno H., Hirabayashi J., Sakai H., Nakagawa H., *Protein Sci.*, **26**, 1574–1583 (2017).
- Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1356–1365 (2002).
- Terada T., Watanabe Y., Tateno H., Naganuma T., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., *Biochem. Biophys. Acta*, **1770**, 617–629 (2007).
- Watanabe Y., Shiina N., Shiozaki F., Yokoyama H., Kominami J., Nakamura-Tsuruta S., Hirabayashi J., Sugahara K., Kamiya H., Matsubara H., Ogawa T., Muramoto K., *Dev. Comp. Immunol.*, **32**, 487–499 (2008).
- Jimbo M., Usui R., Sakai R., Muramoto K., Kamiya H., *Comp. Biochem. Physiol.*, **B147**, 164–171 (2007).
- Yu H., Murata K., Hedrick J. L., Almaraz R. T., Xiang F., Franz A. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **463**, 1–11 (2007).
- Nitta K., Kawano T., Sugawara S., Hosono M., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 553–561 (2007).
- Ogawa T., Watanabe M., Naganuma T., Muramoto K., *J. Amino Acid*, 838914 (2011).
- Thongda W., Li C., Luo Y., Beck B. H., Peatman E., *Dev. Comp. Immunol.*, **44**, 320–331

- (2014).
- 26) Kageyama A., Kusano I., Tamura T., Oda T., Muramatsu T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 835–839 (2000).
- 27) Ohba H., Moriwaki S., Bakalova R., Yasuda S., Yamasaki N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **195**, 182–193 (2004).
- 28) Hajtó T., Berki T., Boldizsár F., Németh P., *Immunol. Lett.*, **86**, 23–27 (2003).
- 29) Dias-Baruffi M., Zhu H., Cho M., Karmakar S., McEver R. P., Cummings R. D., *J. Biol. Chem.*, **278**, 41282–41293 (2003).
- 30) Katagiri Y. U., Mori T., Nakajima H., Katagiri C., Taguchi T., Takeda T., Kiyokawa N., Fujimoto J., *J. Biol. Chem.*, **274**, 35278–35282 (1999).
- 31) Fadeel B., Gleiss B., Höglstrand K., Chandra J., Wiedmer T., Sims P. J., Henter J. I., Örenius 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) Borst P., Zelcer N., van Helvoort A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1486**, 128–144 (2000).
- 35) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 434–441 (2005).
- 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) Kawano T., Sugawara S., Hosono M., Tatsuta T., Ogawa Y., Fujimura T., Taka H., Murayama K., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 345–353 (2009).
- 39) Watanabe Y., Tateno H., Nakamura-Tsuruta S., Kominami J., Hirabayashi J., Nakamura O., Watanabe T., Kamiya H., Naganuma T., Ogawa T., Naudé R. J., Muramoto K., *Dev. Comp. Immunol.*, **33**, 187–197 (2009).
- 40) Qin J., Shang L., Ping A. S., Li J., Li X. J., Yu H., Magdalou J., Chen L. B., Wang H., *Arthritis. Res. Ther.*, **14**, R242 (2012).
- 41) Sugawara S., Im C., Kawano T., Tatsuta T., Koide Y., Yamamoto D., Ozeki Y., Nitta K., Hosono M., *Glycoconj. J.*, **34**, 127–138 (2017).
- 42) Moon D. O., Choi Y. H., Kim G. Y., *Cell. Mol. Life. Sci.*, **68**, 3249–3260 (2011).
- 43) Sugawara S., Sasaki S., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 327–334 (2005).
- 44) Sugawara S., Araya K., Hosono M., Tatsuta T., Nitta K., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **58**, 41–46 (2011).
- 45) Kotani N., Gu J., Isaji T., Udaka K., Taniguchi N., Honke K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7405–7409 (2008).
- 46) Shimomura O., Oda T., Tateno H., Ozawa Y., Kimura S., Sakashita S., Noguchi M., Hirabayashi J., Asashima M., Ohkohchi N., *Mol. Cancer Ther.*, **17**, 183–195 (2018).