

シアリダーゼによる細胞機能の制御とその異常

宮城 妙子

シアリダーゼは糖鎖の非還元末端からシアル酸残基を遊離するエキソ型糖分解酵素で、動物細胞内には細胞内局在や基質特異性が異なる4種のシアリダーゼが存在する。リソソームで異化分解に関わるだけでなく、それぞれに特異的な標的分子からシアル酸を脱離することによって、細胞増殖・分化、アポトーシス等の重要な細胞機能に、シグナル伝達の制御等を通じて大きな影響を与えていることがわかってきた。一方、シアリダーゼの異常発現は、遺伝子欠損症であるシアリドーシスのみではなく、がんや糖尿病などの病態に深く関わっている証拠も挙げてきた。シアリダーゼによる細胞機能の制御およびその破綻機構の解明は、生体内シアル酸の機能とその変化の実体を明らかにし、がんや糖尿病等の病態解明、さらにはその新しい診断・治療法の開発にも繋がることが期待される。

はじめに

酸性糖であるシアル酸は、生体内ではそれ自身が遊離の形で存在することはほとんどなく、糖タンパク質や糖脂質、オリゴ糖などの糖鎖の非還元末端に局在し、血液や外分泌液中に、また細胞表層に多く見いだされる。シアル酸は炭素原子9個を含むアミノ糖であるノイラミン酸のアシル誘導体の総称であり、生物界に広く分布する。*N*-アセチル、*N*-グリコリル、*N*-アシル-*O*-アセチル（または*O*-メチル）体など50種以上の誘導体が存在するが、*N*-アセチルノイラミン酸が自然界で最も代表的で、ヒトではふつうこの形で検出される。細胞表層にあるシアル酸は、形質膜から外に突き出す糖鎖の末端に位置するので、外界からのシグナルに最初に接する場であり、環境の変化に鋭敏に対応する場と考えられる。一般に、糖鎖の分解はシアリダーゼによるシアル酸の除去によって開始し、糖鎖の合成はシアリルトランスフェラーゼによるシアル酸の付加によって終了する。

シアル酸には従来から種々の生理機能が託されてきた^{1,2)}。その機能はこれまで多くの場合、外来性の微生物シアリダーゼを用いた解析によって推察されてきた。シアル酸がシアリダーゼによって脱離されると、糖鎖分子の異化分解が促進されるだけでなく、糖鎖分子のコンホメーションやレセプターによる認識機構、細胞接着や免疫機構などが大きく影響を受けることが知られている。しかし最近まで、生体内でシアル酸がどのように脱離され、その結果どのような細胞変化をもたらされるのかについてはほとんどわかっていなかった。近年の動物シアリダーゼ研究の進展によって、細胞内シアリダーゼがリソソームでの糖鎖の異化分解を担っているのみではなく、糖鎖分子の機能を変化させ、細胞増殖・分化、シグナル伝達等の細胞現象に大きな影響を与えていることがわかってきた³⁻⁵⁾。一方、シアリダーゼ欠損症であるシアリドーシスの原因遺伝子はリソソームに存在するシアリダーゼであり、がんや糖尿病などでも形質膜に局在するシアリダーゼの異常発現が認められ、この異常が細胞機能を破綻させている可能性も示唆されている。本稿では、近年大きな進展を見せているシアリダーゼの細胞機能解析、およびその発現異常による機能破綻について紹介したい。

1. シアリダーゼの種類

動物シアリダーゼは、1960年 Warren と Spearing⁶⁾ によって、ヒトおよびウシの血漿糖タンパク質画分にその存在が

宮城県立がんセンター研究所生化学部 (〒981-1293 名取市愛島塩手字野田山 47-1)

Physiological and pathological roles of mammalian sialidases

Taeko Miyagi (Division of Biochemistry, Miyagi Cancer Center Research Institute, 47-1 Nodayama, Medeshima-shiode, Natori, Miyagi, 981-1293, Japan)

証明されて以来、種々の哺乳類組織において見いだされてきた。細胞の可溶性画分およびリソソーム画分に、あるいはゴルジ、形質膜画分等にシアリダーゼ活性が検出された。しかしながら、分離・精製が困難であったことから、それらの活性が同じシアリダーゼに由来するのか、異なったシアリダーゼに由来するのか、異同については不明であった。その役割についても、シアリドーシスの原因遺伝子としてのシアリダーゼ研究が中心に進行したこともあって、長い間シアリダーゼは異化分解に関わる単なるリソソーム酵素のひとつと考えられがちであった。このような状況にあって、筆者らはラット組織を主な酵素源として、生化学的な分離・精製や性状解析を進め、細胞内局在や基質特異性等の酵素学的性状を異にする少なくとも4種のシアリダーゼが存在することを提唱した。それらは、細胞内ではそれぞれ細胞質⁷⁾、リソソーム内腔⁸⁾、リソソーム膜⁸⁾、形質膜⁹⁾に主に局在し、肝や脳を含む複数のラット組織は実際にこれらの4種を含んでいた。リソソーム内酵素は、狭い基質特異性を有し、オリゴ糖や糖ペプチドを良く水解した。これとは対照的に、細胞質酵素は中性pHで、オリゴ糖やペプチドの他に糖タンパク質や糖脂質をも水解したが、表面活性剤存在下にガングリオシドを良い基質とする二つの膜酵素とは大きく異なっていた。形質膜酵素は、ガングリオシド以外のオリゴ糖や糖タンパク質には働かないが、リソソーム膜酵素はこれらの基質のみではなく、内部シアル酸を持つGM2をも水解した。以上のようなシアリダーゼ分子の多様性は、局在や基質特異性の違いに応じて、それぞれのシアリダーゼに特異な役割があることを推察させたが、その後のシアリダーゼ遺伝子クローニングの結果は、当時の生化学的な解析結果とこの仮説を検証することとなった。

1993年に最初の動物シアリダーゼとして、細胞質に局在するシアリダーゼ遺伝子 (*Neu2*) の構造が筆者らによって明らかにされた¹⁰⁾。このラット酵素の一次構造をこれまで知られていた微生物酵素と比較すると、有意の相同性は無いが、それらのシアリダーゼ間に見いだされていたいくつかの共通配列がこの動物由来酵素にも存在することがわかった。Roggentinら¹¹⁾によって微生物シアリダーゼ間に同定されていた Asp-box (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Try) 配列やN末端に近い部位の (Phe)-Arg-Ile-Pro 配列と二つの Asp-box 間に位置する (Val)-Gly-X-Gly が *Neu2* にも見いだされた。同じ頃、Taylorのグループ¹²⁾によって *Salmonella typhimurium* LT2 シアリダーゼが結晶化され、三次構造が明らかになった。折りたたみ構造や活性部位アミノ酸残基の立体配置がインフルエンザウイルス酵素と似ており、13個の活性部位アミノ酸残基のうち、10個が保存されていた。このような微生物シアリダーゼ間でみられた高次構造上の共通性は、*Neu2* にも該当し、その後、動物起源を含めたすべてのシアリダーゼに保存されている特徴であることが知られてきた。ついで、リソソーム (*Neu1*)、および形質膜に主局在を持つシアリダーゼ (*Neu3*) 遺伝子がクローン化され、さらに、これらの共通配列を利用して、ゲノム解析データから、第4番目のシアリダーゼ (*Neu4*) 遺伝子が同定された。表1にこれまで同定された動物シアリダーゼ、とくにヒト由来の4種のシアリダーゼの性状についてまとめた。相当するマウスやラット酵素の酵素学的性状もこれらと類似している。図1にはヒト由来シアリダーゼ (NEU1, NEU2, NEU3, NEU4) の構造的な特徴を模式的に示した。NEU3 と他の3種のシアリダーゼの推定されるアミノ酸の相同性を比較すると、NEU1, NEU2, NEU4 に対してそれぞれ19%, 38%, 40% であっ

表1 4種のヒトシアリダーゼの特徴

略称	NEU1	NEU2	NEU3	NEU4
主な局在	リソソーム	細胞質	形質膜 (ラフト, カベオラ)	リソソーム* ミトコンドリア** 細胞内膜**
良い基質	オリゴ糖 糖ペプチド 4MU-NeuAc	オリゴ糖 糖タンパク質 ガングリオシド 4MU-NeuAc	ガングリオシド	オリゴ糖 糖タンパク質 ガングリオシド 4MU-NeuAc
至適 pH	4.6	6.0	4.6 及び 6.0	4.6
アミノ酸数	415	380	428	496, 484
染色体部位	6p21.3	2q37	11q13.5	2q37.3
機能	リソソーム異化分解 免疫機能 エラスチン繊維集合	(マウス酵素で 筋細胞の分化 神経細胞の分化)	神経細胞の分化 アポトーシス	アポトーシス 細胞接着
文献 (遺伝子クローニング)	(13-18)	(10, 33-37)	(47-50)	(72-75)

*文献 74, **文献 75

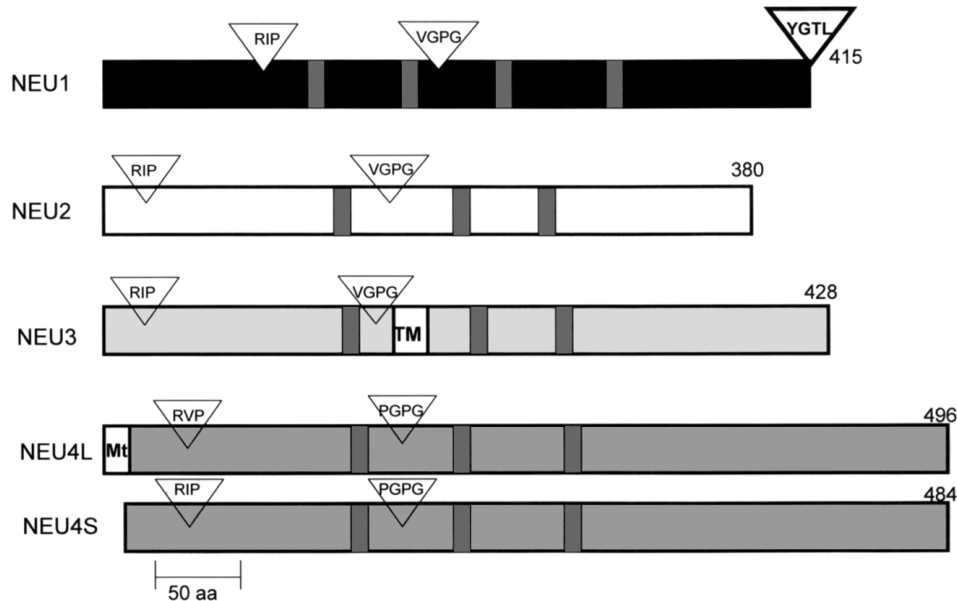


図1 ヒトシアリダーゼのアミノ酸配列の特徴

共通配列-R(I)P-, -(V)GPG-, Asp-box (■)が4種すべてに保存されている。推定される局在配列として、NEU1にはリソソーム移行シグナル (YGTL)、NEU3には膜貫通様ドメイン (TM)、NEU4Lにはミトコンドリア移行シグナル (Mt) が認められる。

て、NEU1のそれは、他3種に対して19-24%と相同性が低い。ヒトとマウス酵素間では67-82%の相同性を持つ。これら4種の酵素は、活性阻害剤2-デオキシ-2,3-デヒドロ-N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc2en) や Cu^{2+} などの重金属イオンによって、それぞれ異なった影響を受ける。シアリダーゼの細胞内局在については、これまでも生理的条件下で変化する可能性について考えられていたが、最近、NEU1やNEU3においてその証拠が示されてきており、これらの局在は必ずしも固定されたものではなく、生理的にダイナミックに移動するようである。

2. シアリダーゼ Neu1

細胞内の主要なシアリダーゼで、リソソームで他のグリコシダーゼとの協調下に糖鎖の異化分解に与っている。シアリダーゼ欠損マウス (SM/J) の遺伝学的解析によって、MHC 遺伝子座の17番染色体におけるH-2のNeu部位に局在することが旧くから推定されており、この略称もそれに由来して名付けられた。筆者らは、ラット肝のリソソームシアリダーゼの精製過程を通じて、その主要活性が内腔に存在し、オリゴ糖や糖ペプチド、合成基質である4-メチルウンベリフェリル-シアル酸 (4MU-NeuAc) などの低分子基質には働くが、糖タンパク質やガングリオシドには働きにくいことを見いだした⁸⁾。1996-1997年にヒト¹³⁻¹⁵⁾およびマウス¹⁶⁻¹⁸⁾の遺伝子が3グループによって、主要組織適合複合体 (MHC) に関連したシアリダーゼとして同定された。ヒト酵素にはC末端にリソソーム移行シグナル

があり、リソソームへの移行が保護タンパク質によって促進されると言われている¹⁹⁾。この酵素はβ-ガラクトシダーゼおよび保護タンパク質であるカルボキシペプチダーゼA/(カテプシンA)と複合体を形成し、シアリダーゼの活性発現や安定化に複合体形成が必要であること²⁰⁾が明らかになっていたが、N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfataseもその複合体に含まれるという。ヒト組織では、膵臓、腎臓、胎盤等に発現が高いようである。

NEU1発現異常が主な原因とされるヒトの遺伝性疾患にはシアリドーシスとガラクトシアリドーシスが挙げられる。前者はNEU1欠損症で、後者は保護タンパク質の欠損症である。これらの疾患においては、シアリル化されたオリゴ糖や糖脂質の組織への蓄積や尿への多量排泄が認められ、その蓄積量はある程度臨床的軽重と相関するとされている。シアリドーシス患者繊維芽細胞にNEU1遺伝子を導入すると4MU-NeuAcに対する活性が回復し、NEU1がシアリドーシスの原因遺伝子であることが証明された。NEU1遺伝子の解析によって、塩基置換や数塩基の挿入が起こっている例が見いだされた。NEU1分子の表層にみられるF260Y, L270F, A298Vの変異は酵素活性の喪失と酵素分子の異化分解の促進を招くことが実証され、この結果、β-ガラクトシダーゼや保護タンパク質との複合体形成に障害をもたらすと考えられている²¹⁾。P80L, W240R, P316S等の変異が日本人患者に見られているが、これらの変異は酵素の活性部位のコンホメーションを変化させているといわれている²²⁾。エクソン5の欠失があったり、CTL

遺伝子 (new gene 22) と融合していたりするなど、多様な変異例についても報告されている。SM/Jマウスのシアリダーゼ遺伝子解析では点変異により Leu209 の Ile への置換があり、これがシアリダーゼ活性低下を引き起こしていることが明らかとなった¹⁶⁻¹⁸⁾。これらの病態解析を通じて、NEU1 が糖鎖の異化分解の鍵酵素であることが一層明確となった。

この遺伝子が MHC 遺伝子座に局在するという発見が契機となって、免疫機能との関連性を解析した報告が多い。Landoli らは ConA などのマイトジェンによって T 細胞の活性化を誘導すると、Neu1 活性が上昇することを報告しており、Chen らは活性化された T 細胞の酸性シアリダーゼ活性が IL-4 産生の調節を担っている可能性を示した。また、ビタミン D₃ 結合タンパク質がマクロファージ活性化因子に変換される過程に、T 細胞の膜結合性シアリダーゼが B 細胞の β-ガラクトシダーゼと協調して働くという Yamamoto らの報告等がある。最近では、T 細胞の活性化によって酵素の細胞内局在がリソソームから細胞表層へと移動することが見いだされ²³⁾、また、ヒト単球がマクロファージに分化する過程においても NEU1 の発現が著明に上昇し、MHC クラス II コンパートメントから形質膜に移行するという報告²⁴⁾がなされた。NEU1 と MHC との機能的関連性が初めて検証された意義は大きい。一方、β-ガラクトシダーゼのスプライトバリエーションとして以前に同定されていた 67kDa のエラスチン結合タンパク質 (EBP) が保護タンパク質や NEU1 と複合体を形成し、繊維芽細胞や大動脈平滑筋細胞、耳軟骨由来の軟骨細胞の弾性繊維の集合を促進していることが明らかになった²⁵⁾。エラスチンペプチドが EBP、保護タンパク質および NEU1 からなるエラスチン受容体複合体と結合することによって、ERK1/2 の活性化とそれに引き続く pro-MMP (matrix metalloproteinase)-1 の産生が起こるが、このシグナリングに NEU1 による触媒作用が必要であることも示された²⁶⁾。先述の単球

細胞の分化に関わる NEU1 と同様に、この現象においても NEU1 がどの分子のシアル酸を脱離するのかはまだ定かではないが、リソソーム/エンドソームのコンパートメントを經由して形質膜に移動し、細胞表層からのシグナルを調節している興味深い証拠が得られた。

シアリダーゼががんの転移や浸潤とも関わっているらしいことが 1960 年代から推察されていた。それは細菌由来のシアリダーゼでがん細胞を処理すると、浸潤能等を含む悪性度が変化する現象がみられていたからである。その後、Warren ら²⁷⁾はがん細胞を緩やかなトリプシン処理して遊離した糖ペプチドを調べたところ、対照細胞に比べて分子量のより大きいところに溶出され、これがシアリダーゼ処理により消失する現象を見いだした。引き続いて、Kobata のグループ²⁸⁾やカナダの Dennis ら²⁹⁾の精力的な研究の結果、がん細胞のタンパク質には N-結合型糖鎖の側鎖分岐が増加すること、これはしばしば、ポリラクタミン糖鎖の増加によること、そして、その糖鎖非還元末端にはシアル酸が付加していることがこの背景となっていることが明らかとなった。がん細胞のいずれのシアリダーゼがこの現象に関わるかは長い間不明であったが、筆者らは浸潤や転移能が Neu1 シアリダーゼ発現に大きく依存することを見いだした。数種の細胞で Neu1 活性が転移能と逆相関することがわかった。例えば、転移能の異なる 3 種の細胞系、即ち、悪性転換ラット 3Y1 繊維芽細胞系、マウス B16 メラノーマ細胞系およびマウス結腸がん colon26 細胞を用いて各種シアリダーゼ活性レベルを比較したところ、3 者に共通に認められた変化は、高転移性細胞株が低転移細胞に比べ Neu1 活性が低いという結果であった。この実験において、各種シアリルトランスフェラーゼについても活性レベルを比較したが、細胞株に共通な変化は見られず、シアリダーゼ活性変化が自然転移能や浸潤能に密接に関わっている可能性が推察された。図 2 に示すように、マウス colon26 細胞系においては NL17 が最も転移能が高いが、

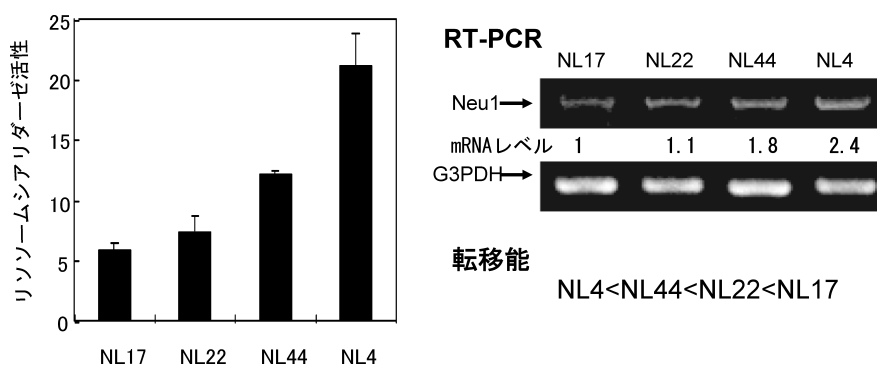


図 2 Colon26 細胞の転移能とリソソームシアリダーゼ発現の逆相関性 (参考文献 30 から改変)

Colon26 細胞の高転移細胞 (N17, N22) ではシアリダーゼ活性および mRNA レベルが低下している。

転移能が低いNL4と比べて、Neu1のmRNAおよび活性レベルが約1/4と著しく低下していた³⁰⁾。また、ラット3Y1繊維芽細胞にラウス肉腫ウイルスを感染させ、造腫瘍性を獲得させたSR-3Y1を受容細胞として、*v-fos*がん遺伝子を導入すると、このfos-SR-3Y1細胞では肺への自然転移能が上昇し、浸潤能も増強する。総シアル酸量や表層シアル酸量共に、転移能に依存した相違は見られなかったため、この現象はNeu1活性に主に依存しているものと考えられた³¹⁾。他のリソソーム酵素活性にはこのような変化は認められず、シアリダーゼにはほぼ特異的であるようであった。そこで、高転移細胞において低発現を示すNeu1遺伝子をB16メラノーマBL6細胞に導入してその影響を調べたところ、予想通り肺転移抑制が認められた³²⁾。細胞の増殖速度や腫瘍の増大速度が低下し、とくに悪性度の指標のひとつである足場非依存性増殖(anchorage independent growth)が低下した。さらに、ヒトNEU1遺伝子を保護タンパク質とともに高転移性大腸がん細胞に導入したところ、NEU1過剰発現によって運動・浸潤能および転移能が低下した。主な分子変化として、接着分子であるインテグリン $\beta 4$ の糖鎖シアル酸減少が運動・浸潤能を変化させていること(Uemura T.ら投稿中)が推察された。

3. シアリダーゼ Neu2

Neu2は、ラット肝や骨格筋から均一精製品が得られ⁷⁾、そのペプチド情報を手掛かりとしてcDNAがクローン化された¹⁰⁾。動物シアリダーゼでは初めての例である。クローン化されたcDNAは1679bpからなり、379個のアミノ酸をコードする。Asp-boxが2箇所に見いだされた。その後、CHO細胞³³⁾、マウス脳^{34,35)}、マウス胸腺³⁶⁾からも相同性の高いcDNAが単離された。中性pH付近で働き、Neu4とともに広い基質特異性を持つシアリダーゼである。ヒト酵素においては、ラット同様、骨格筋に最も高く検出されると報告されたが、そこではcDNAは単離されておらず、ヒト組織におけるNEU2発現の有無が不明であった。実際にはヒト骨格筋ゲノムライブラリーから単離されたDNAを大腸菌に発現することによって、シアリダーゼとしての同定が行われた³⁷⁾。最近、筆者らによって、その発現レベルが極端に低いものの、検出されることが明らかになり、脳組織からcDNAが単離された(Kosekiら、投稿中)。2005年Chavasらによって動物シアリダーゼでは初めて、X線解析によってヒトNEU2の三次構造が明らかになった³⁸⁾。典型的な6個の β -プロペラ構造のほかに、活性阻害剤として知られているNeuAc2enのN-アセチルおよびグリセロール部分を認識するアミノ酸残基が存在することがわかった。微生物酵素にはないこの特徴は、インフルエンザウイルス等のシアリダーゼ阻害剤の開発に利用できる。

膜貫通配列や膜へのターゲティング配列は認められず、組織から精製した酵素も細胞質に見いだされたように、COS細胞に導入した酵素は主に細胞質に検出された。中性pH付近で糖タンパク質やガングリオシドにも働くことから、糖鎖分子の可逆的な脱シアリル化を通してなんらかの機能調節に関わっているのではないかと考えられていた。ラット遺伝子のゲノム構造解析の結果、転写開始点の5'上流域にはMyoDやミオゲニンなどの筋特異的転写因子が結合する2対のE-box配列があること、この領域の転写活性は筋芽細胞で高いこと等がわかった³⁹⁾。ラットL6筋芽細胞⁴⁰⁾やマウスC2C12筋芽細胞⁴¹⁾ではこの領域が転写活性を示し、筋管形成に伴って活性とmRNAレベルが上昇することから、Neu2が筋分化において重要な役割を担っていることが明らかになった。PC12細胞ではNGF刺激で転写活性化され、Neu2が神経分化にも関与していることが推察された⁴²⁾。一方、この酵素は細胞質内だけでなく、核質にも局在することが骨格筋細胞の免疫電子顕微鏡で示された⁴³⁾。N末端に近い部位に核移行シグナル様配列が存在するが、核内での機能についてはまだわかっていない。

Neu2はがん化で発現低下傾向を示すようである。筆者らはシアリダーゼが転移に如何に影響を与えるかについて調べるため、糖タンパク質と糖脂質の両方に働く広い基質特異性を持つNeu2遺伝子を高浸潤・転移能のマウスメラノーマB16-BL6細胞に導入した⁴⁴⁾。この安定発現株を同種マウスの尾静脈から注入すると、著しく肺転移が抑制された。浸潤能や運動能は低下したが、細胞の増殖速度やフィブロネクチンやコラーゲンIVあるいはラミニンへの接着に変化はみられなかった。しかし、細胞表層や細胞内の糖タンパク質糖鎖には影響を与えず、ガングリオシドGM3の減少やラクトシルセラミドの上昇をもたらしているという結果が得られた。同じシアリダーゼ遺伝子をマウス結腸がんcolon26細胞の高転移細胞NL17細胞に導入した場合には、同様なガングリオシド変化と転移抑制が認められ、さらに、シアリルLe^xレベルが変化していた³⁰⁾。低転移性のNL4およびNL44細胞に比較し、高転移性のNL17およびNL22細胞では、低いNeu1シアリダーゼ発現を示し、シアリルLe^xおよびGM3の増加が認められた。Neu2遺伝子導入後のNL17細胞では、肺転移能、浸潤・細胞運動能の著しい低下とシアリルLe^xおよびGM3レベルの上昇が見られ、低転移能を示す細胞の形質と同じ方向へ変化していた。細胞をシアリルLe^xやGM3に対する抗体で処理すると、細胞接着や細胞の運動性が影響を受けたので、これらの分子の脱シアリル化が転移抑制に関わっていることが検証された。一方、総シアル酸量や細胞表層シアル酸量については、これらの高転移細胞では低転移細胞に比べて低く、しかもそれはシアリダーゼ活性レベルとは一致しない。以上の結果は、少なくともマウス由来の細胞では、シ

アル酸量ではなく、シアリダーゼレベルが転移能を決定している因子のひとつであると考えられた。さらに、最近の報告では、ヒト *NEU2* 遺伝子を K562 白血病細胞に導入したところ、Bcr-Abl/Src キナーゼの mRNA レベルや活性が低下し、アポトーシスが誘導されたという⁴⁵⁾。細胞質内の 44-65kDa の糖タンパクの脱シアリル化が関わっている可能性が示唆されている。

4. シアリダーゼ Neu3

最初の Neu3 は、ウシ脳シナプトソーム膜画分から高度精製され⁴⁶⁾、そのペプチドアミノ酸情報に基づいて、cDNA がウシ脳ライブラリーから単離された⁴⁷⁾。428 個のアミノ酸から構成され、膜貫通部位と推定される疎水性配列と 1 個の糖付加部位を含んでいた。3 個の Asp-box が認められた。ガングリオシドをほぼ特異的に水解し、糖タンパク質やオリゴ糖にはほとんど作用しない。形質膜に主に局在することが Percoll 密度勾配遠心や蛍光免疫染色によって確認された。プロテアーゼプロテクション法によって、膜におけるトポロジーについては、N 末端が細胞外へ向いているタイプ I 膜タンパク質であることが示された。相当するヒト^{48, 49)}、マウス³⁵⁾、ラット⁵⁰⁾ 遺伝子について全翻訳領域の一次構造を比較すると、それぞれ、83%、79%、78% であった。ウシ酵素を COS-7 細胞に導入すると、免疫電子顕微鏡においても上述のように、殆ど 100% の分子が細胞表層に認められたが、ヒト酵素は構造上高い同性を有するにも関わらず、高々 30% しか表層に存在しない。その後、ヒト酵素は血清や EGF 等の増殖因子の添加によって leading edge に移動し、Rac-1 と局在を共にし、細胞の運動能を上昇することが A431 細胞で見いだされた⁵¹⁾。生理的条件下で、機能的に細胞内局在を変化させているものと考えられる。ヒト組織では骨格筋、精巣において発現が高く、大腸や小腸では低い。ヒト酵素活性の pH 曲線は酸性と中性の 2 相性を示す。

ガングリオシドに優先的に働くこのシアリダーゼは、ガングリオシドが主要構成成分となっている脳神経組織において大切な役割を果たしていることが推定されていた。実際、ヒト神経芽細胞では、ガングリオシドを基質とするシアリダーゼ活性が細胞増殖と共に上昇するが、活性阻害剤 NeuAc2en の培地への添加によって増殖が抑制され、分化マーカーであるアセチルコリンエステラーゼの活性化も抑制される⁵²⁾。同じ細胞において、シアリダーゼの最終産物である GM1 がガレクチン-1 のためのリガンドとして働いていることが示唆されていた^{53, 54)}。しかし、活性レベルで検討されているので、これらのシアリダーゼが Neu3 であるという証拠はない。遺伝子がクローニングされた後、マウス Neuro2a 細胞³⁵⁾、やヒト NB-1 神経芽細胞⁵⁵⁾ について解析した結果によると、神経突起の形成に伴い Neu3 発現

が上昇し、遺伝子導入によって神経突起、とくに軸索様突起の伸展が亢進する。但し、Neuro2a 細胞でマウス Neu3 を siRNA でノックダウンした場合でも神経突起の伸長が起こるという報告⁵⁶⁾もある。この矛盾がなぜ生じるのか不明である。また、ラット海馬ニューロンにおいては、Neu3 が神経突起の伸展を制御し⁵⁷⁾、突起の再生を促進する⁵⁸⁾ことがわかった。

ヒト NEU3 がシグナル伝達分子のひとつとして働いている種々の証拠が挙げてきている。ヒト神経芽細胞においてはガングリオシドを水解するシアリダーゼがシグナル分子の集合するラフトに局在すること⁵⁹⁾、また、HeLa 細胞では NEU3 分子がカベオラに局在し、その主要タンパク質であるカベオリンと会合していること⁶⁰⁾が示された。さらに、この遺伝子導入によってガングリオシド分解を亢進したケラチノサイト様細胞では、インテグリン $\beta 1$ のリン酸化が促進する結果、プロテインキナーゼ B/Akt のリン酸化の増強、カスパーゼ-9 の活性化抑制が起こり、アポトーシスに導かれることが報告された⁶¹⁾。最近の結果ではカベオリンや Rac-1 のほかにも EGF レセプターや Grb-2 と会合する証拠が得られている。ガングリオシドはシグナルモジュレーターとして多様な役割を果たしていることが明らかになっているので、その発現調節に関わっている NEU3 には今後もシグナル分子としての多くの重要な役割が見いだされよう。

シアリダーゼ Neu3 はがんの悪性度に深く関わっている。先述のように、細胞のがん化に際して、糖タンパク質糖鎖のシアリル化異常が起こるが、糖脂質においてもこの糖鎖異常が Hakomori ら^{62, 63)}によって広範に調べられた。より短い糖鎖を持つガングリオシドが増加し、比較的長い糖鎖のガングリオシドが減少するという糖鎖不全現象と、それに伴う前駆体糖脂質の蓄積があり、それに加えて、正常対照細胞にはみられない新しい糖脂質の出現がある。これらの糖脂質はインテグリンや増殖因子レセプター等の機能を変化させることによって、がん細胞の増殖、接着、浸潤・転移等に必要とされるトランスメンブレンシグナリングを修飾している。Neu3 とがん化の関連については、ガングリオシドを水解するシアリダーゼ活性を指標として、この活性が BHK 細胞の悪性転換によって上昇すること⁶⁴⁾、マウス上皮由来 JB-6 細胞のホルボールエステル TPA による悪性転換時にもこの活性が 3-4 倍に上昇すること⁶⁵⁾等が観察されていた。遺伝子クローニングの後、筆者らは、ヒト大腸がん組織や複数の大腸がん細胞で NEU3 発現の異常亢進とその意義を解析した (図 3)。大腸がん患者の手術摘出標本において、がん部と非がん粘膜部の NEU3 mRNA レベルを RT-PCR で比較すると、がん部においては殆ど例外なく、3-100 倍に上昇していた⁶⁶⁾。in situ ハイブリッド形成によってこの発現上昇はがん細胞に起こって

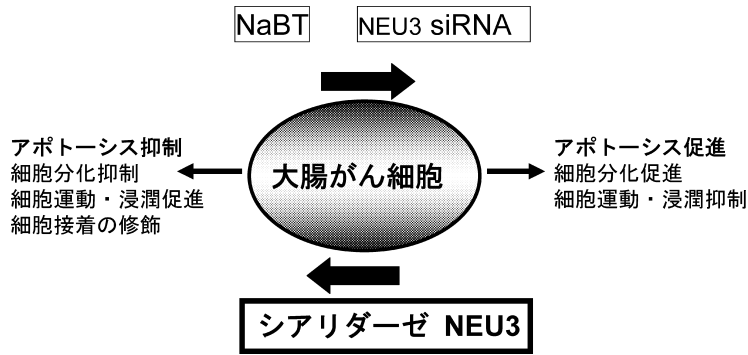


図3 がんにおける NEU3 発現上昇の意義
 大腸がん細胞では、高発現した NEU3 ががん細胞のアポトーシスや分化等を抑制し、浸潤や運動を促進する方向に働いているが、ブチル酸や NEU3siRNA によって NEU3 発現が低下すると、分化やアポトーシスが誘導される。

いることが確認された。NEU3 異常発現の意義の解析を目的として、エクダイソン-誘導系を用いて大腸がん細胞で NEU3 活性を高発現させると、対照細胞に比べて、ブチル酸で誘導されるアポトーシスが著明に抑制されることがわかった。この細胞では Bcl-2 などのタンパク質発現上昇があり、カスパーゼ-3 活性は低下していた。この機構には反応産物ラクトシルセラミド (Lac-cer) の蓄積が関わっているようであった。NEU3 の異常高発現は大腸がんだけでなく、腎細胞がん⁶⁷⁾、卵巣がん⁶⁸⁾、前立腺がん等にも認められている。この異常亢進ががん細胞の運動性や浸潤性を亢進させていることがわかってきた。大腸がん細胞では、アポトーシスの抑制のほかに、細胞外マトリックスとの接着についてもがん細胞に都合良い環境に導く。即ち、ラミニンへの接着時にはインテグリン β4 のリン酸化を亢進させ、FAK や ERK などを活性化するが、フィブロネクチンへの接着時には、逆にこのシグナル経路を低下させた⁶⁹⁾。また、腎がん細胞 ACHN では、NEU3 が STAT3 の活性化よりは主に PI3K/Akt 経路を活性化し、転移能などの悪性度を促す IL-6 シグナリングを活性化させていること、PI3K/Rho 活性化を介して運動・浸潤能の亢進をもたらすこともわかった⁶⁷⁾。ここでもラクトシルセラミドの蓄積があり、これが一因となっていることが推察された。一方、NEU3 を siRNA でノックダウンすると、運動・浸潤能の低下が起こるだけでなく、増殖因子レセプター等のチロシンリン酸化が低下し、がん細胞のアポトーシスが誘導された⁷⁰⁾。興味深いことに、正常細胞ではノックダウンによってアポトーシスは誘導されなかった。また、これらの現象の標的分子を検索すると、図4に示すように、NEU3 ががん細胞の Ras 活性を上昇させ、ERK1/2 等の活性化を介してがん細胞をアポトーシス抑制に導き、siRNA を導入すると Ras の活性化を阻害し、がん細胞が特別の刺激もなく自ら細胞死に陥ることを見いだした。これらの結果は

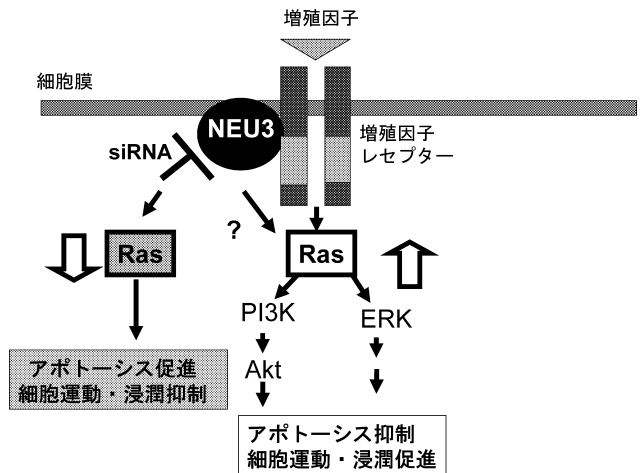


図4 シアリダーゼ NEU3 によるがん細胞のアポトーシス制御機構

NEU3 ががん細胞の生死を制御する重要な分子であることを示している。

NEU3 がインスリンシグナリングに関わり、その制御異常が糖尿病を発症する可能性が示唆された。糖尿病ラットの腎臓や網膜において、リソソーム様シアリダーゼ活性が対照と比べて上昇しており、また、糖尿病患者の赤血球ゴーストでは、ガングリオシドシアリダーゼ活性が上昇しているという報告がある。これらのシアリダーゼ分子の由来ははっきりしないが、後者は NEU3 である可能性が高い。筆者らは先述の大腸がんにおける NEU3 の異常亢進をマウスモデルで検証する目的で、NEU3 のトランスジェニックマウス (TG) を作成した。この TG マウスでは 18 週頃まで対照マウスに比べて、とくに際立った異常が認められなかったが、作成した 6 系統のうち、20-25 週後に 4 系統の雄マウスにおいて、耐糖能およびインスリン産生異常が観察された (図5)⁷¹⁾。糖負荷試験の血糖値は TG マウ

スにおいて対照群に比べて高値を示し、糖負荷試験時の血中インスリン値は著しく高かった。また、インスリン負荷試験における血糖値は血糖の低下を認めず、120分後には再上昇を認めた。膵ラ氏島は著明な肥大を示し、面積の増加が認められ、インスリン産生が活発に行われていることがわかった。インスリンレセプター (IR) およびインスリンレセプター基質 (IRS)-1 のリン酸化の程度を調べると、TG マウス筋において両者のリン酸化の減少が認められた。また、PI3-キナーゼやグリコーゲン合成酵素の活性を調べると、TG マウスの筋肉においては対照に比較し、活性低下を示した。各種組織のガングリオシドパターンには、GM1 あるいは GM2 の蓄積がみられ、これらの蓄積が IR のリン酸化の低下をもたらしているようであった。また、インスリン刺激により、NEU3 発現酵素がチロシンリン酸化を受けて活性化されており、その SH-2 ドメインを介して、シグナル分子 Grb-2 と会合している可能性が示唆された。チロシンリン酸化部位に変異を施した NEU3 では、IRS-1 のリン酸化やその下流のシグナリングの障害が正常化する傾向を示した。NEU3 高発現系では、NEU3 の反応産物である糖脂質を介した経路と NEU3 タンパク質の Grb2 との相互作用を介した二つの経路がインスリンシグナリングを低下させ、耐糖能およびインスリン産生異常を起している可能性がある。

5. シアリダーゼ Neu4

最近、遺伝子データベースの cDNA 配列に基づいて Neu4 cDNA が、マウス⁷²⁾ およびヒト⁷³⁻⁷⁵⁾ で同定された。マ

ウスの遺伝子は、4 個のエクソンから構成され、501 個のアミノ酸から成る翻訳領域を有していた。これまで知られたマウスシアリダーゼのうちでは、Neu3 (42%) に最も類似していた。NEU4 は他のヒトシアリダーゼとは異なり、ムチンにも働くなど、広い基質特異性を持っている。ヒト NEU4 は、遺伝子導入細胞の解析により、マンノース 6-リン酸レセプターによってリソソーム内腔に運ばれることが示唆された⁷⁴⁾。一方、筆者らは、NEU4 遺伝子導入細胞で、極度に高発現された場合のみ NEU4 分子がリソソームにも認められたが、中等度では以下のようにミトコンドリアや細胞内膜系に検出されることを明らかにした⁷⁵⁾。即ち、図 1 に示したように、ヒト NEU4 には二つのアイソフォームが存在すること、両者はミトコンドリア移行シグナル配列と考えられる N 末端の 12 アミノ酸残基の有無で区別され、ひとつ (NEU4L) がミトコンドリアに局在し、この配列を持たない他方 (NEU4S) は細胞内膜系に局在することを見いだした。NEU4L は殆ど脳に特異的に発現しているが、最近、このアイソフォームが神経細胞のアポトーシスに関わっているという現象が報告された⁷⁶⁾。SH-SY5Y 神経芽細胞においてカテコール代謝物によってアポトーシスを誘導すると、シトクロム c の細胞質への遊離とともに GD3 の形質膜からミトコンドリアへの移動が起こるが、それに先立って NEU4L の mRNA レベルの低下が観察されたという。GD3 を良い基質とする NEU4L がミトコンドリア GD3 の発現を調節することによって、神経芽細胞のアポトーシスを惹起している可能性を示す興味深い一例である。

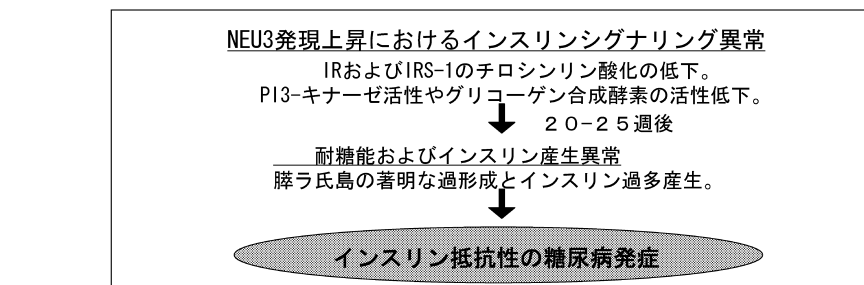
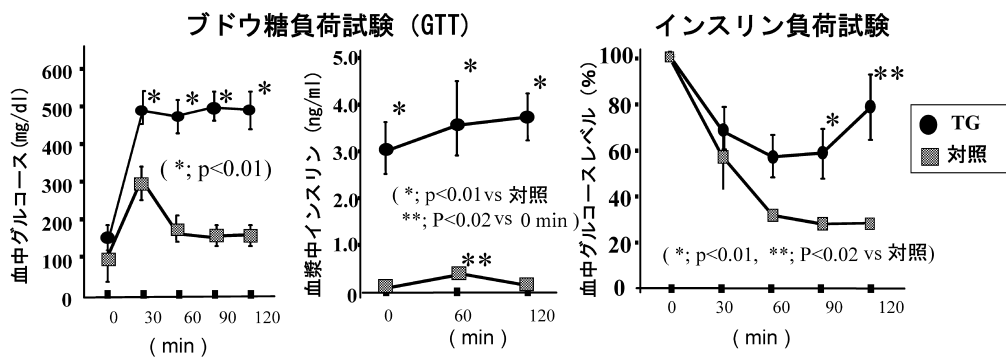


図5 NEU3 遺伝子導入トランスジェニックマウスにみられる異常 (参考文献71)

NEU4は、がんにおいては浸潤・転移性に関与するようである。大腸がん組織でmRNAレベルを調べると、NEU3の場合とは逆に、非がん粘膜部と比べて有意に低下していた。NEU1レベルも有意差は得られなかったが、予想通り低下傾向を示した(図6)⁷⁷⁾。大腸がん細胞でNEU4を高発現すると、浸潤・転移能は抑制され、ノックダウンすると逆に促進がみられた。大腸粘膜は、高発現が認められる脳、肝についてNeu4に富み、ほぼNEU4Sのみが検出される。NEU4がシアリル-Le^xやシアリル-Le^a等の糖鎖抗原の加水分解によってムチン機能を制御し、消化管や肺の粘膜細胞の維持に重要な役割を果たしているとするれば、これら分子が多く検出される大腸がん組織では、NEU4低下による粘膜機能の破綻ががん細胞の悪性形質発現に密接に関連しているのかもしれない。

おわりに

従来から、動物シアリダーゼについては、シアリドーシスの病態解析を通じて、リソソームで糖鎖の異化分解を制御するという役割を担っていることが知られてきた。しかし、リソソーム以外に主局在を持つシアリダーゼの役割が明らかになってくると、細胞分化や増殖、細胞死など、シアリダーゼが予想を超えて多くの重要な細胞機能を制御していることがわかってきた。しかし、いまだその分子機構については多くが推察の域を出ていない。たとえば、Neu2以外は酵素反応の至適pHが酸性であるが、どのように、Neu1は表層糖タンパク質に、Neu3は表層ガングリオシドに働くのであろうか。Neu3は隣接細胞のガングリオシドを修飾できるのであろうか。解決すべき課題は多い。また、最近、インフルエンザ治療薬として臨床使用されているタミフルやレンザはインフルエンザウイルスのシアリダーゼ阻害剤であるが、宿主のヒト各種シアリダーゼへの

影響はどうであろうか。病原微生物由来のシアリダーゼが宿主への感染経路に関わっていることを考えれば、それらの問題についての科学的検証も不可欠である。さらに、多くのがんで発現異常が認められるNEU3を標的としたがん診断・治療法の開発が期待されるなど、シアリダーゼ研究の基礎と応用両面の進展が急務である。

文 献

- 1) Schauer, R. (2000) *Glycoconj. J.*, **17**, 485-499.
- 2) Miyagi, T. & Yamaguchi, K. (2007) *Biochemistry of Glycans: Sialic Acids*, Elsevier BV., Amsterdam.
- 3) Saito, M. & Yu, R.K. (1995) *Biochemistry and Function of Sialidases*. in *Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg, A. ed.), Plenum Press, New York.
- 4) Monti, E., Preti, A., Venerando, B., & Borsani, G. (2002) *Neurochem. Res.*, **27**, 649-663.
- 5) Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., & Hata, K. (2004) *Glycoconj. J.*, **20**, 189-198.
- 6) Warren, L. & Spearing, C.W. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 489-492.
- 7) Miyagi, T. & Tsuiki, S. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 6710-6716.
- 8) Miyagi, T. & Tsuiki, S. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **141**, 75-81.
- 9) Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K., Handa, S., & Tsuiki, S. (1990) *J. Biochem.*, **107**, 787-793.
- 10) Miyagi, T., Konno, K., Emori, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yasui, A., & Tsuiki, S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 26435-26440.
- 11) Roggentin, P., Rothe, B., Kaper, J.B., Galen, J., Lawrisuk, L., Vimr, E.R., & Schauer, R. (1989) *Glycoconj. J.*, **6**, 349-353.
- 12) Crennell, S.J., Garman, E.F., Laver, W.G., Vimr, E.R., & Taylor, G.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9852-9856.
- 13) Bonten, E., van der Spoel, A., Fornerod, M., Grosveld, G., & d'Azzo, A. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 3156-3169.
- 14) Milner, C.M., Smith, S.V., Carrillo, M.B., Taylor, G.L., Hollinshead, M., & Campbell, R.D. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4549-4558.

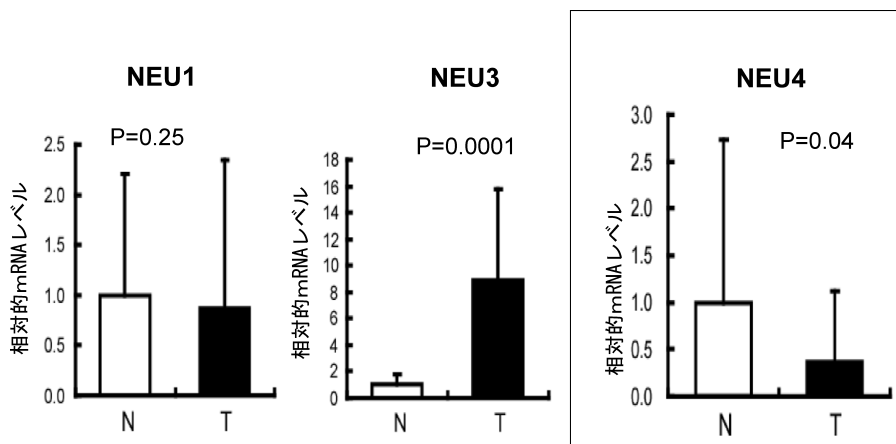


図6 大腸がんにおけるシアリダーゼ発現の変化(参考文献77から改変)

大腸がん手術摘出標本における各種シアリダーゼの発現について、がん部(T)と非がん粘膜部(N)組織において、RT-PCRによってmRNAレベルを比較した。NEU4はNEU3とは逆に有意にレベルが低下していた。

- 15) Pshezhetsky, A.V., Richard, C., Michaud, L., Igdoura, S., Wang, S., Elsliger, M.A., Qu, J., Leclerc, D., Gravel, R., Dal-laire, L., & Potier, M. (1997) *Nat. Genet.*, **15**, 316-320.
- 16) Carrillo, M.B., Milner, C.M., Ball, S.T., Snoek, M., & Camp-bell, R.D. (1997) *Glycobiology*, **7**, 975-986.
- 17) Igdoura, S.A., Gafuik, C., Mertineit, C., Saberi, F., Pshezh-et-sky, A.V., Potier, M., Trasler, J.M., & Gravel, R.A. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 115-121.
- 18) Rottier, R.J., Bonten, E., & d'Azzo, A. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 313-321.
- 19) van der Spoel, A., Bonten, E., & d'Azzo, A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 1588-1597.
- 20) d'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A.J., Robinson, D., & Gal-jaard, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4535-4539.
- 21) Lukong, K.E., Landry, K., Elsliger, M.A., Chang, Y., Lefran-cois, S., Morales, C.R., & Pshezhetsky, A.V. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 17286-17290.
- 22) Itoh, K., Naganawa, Y., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Sasagasako, N., Yamada, T., Kira, J., Kobayashi, T., Pshezh-et-sky, A.V., & Sakuraba, H. (2002) *J. Hum. Genet.*, **47**, 29-37.
- 23) Lukong, K.E., Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Ahmad, A., Gahl, W.A., Lefrancois, S., Morales, C.R., & Pshezhetsky, A.V. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 46172-46181.
- 24) Liang, F., Seyrantepe, V., Landry, K., Ahmad, R., Ahmad, A., Stamos, N.M., & Pshezhetsky, A.V. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 27526-27538.
- 25) Hinek, A., Pshezhetsky, A.V., von Itzstein, M., & Starcher, B. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 3698-3710.
- 26) Duca, L., Blanchevoye, C., Cantarelli, B., Ghoneim, C., Dedieu, S., Delacoux, F., Hornebeck, W., Hinek, A., Martiny, L., & Debelle, L. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12484-12491.
- 27) Warren, L., Buck, C.A., & Tuszyński, G.P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **516**, 97-127.
- 28) Kobata, A. (1989) *Pigment Cell Res.*, **2**, 304-308.
- 29) Dennis, J.W. & Laferte, S. (1987) *Cancer Metastasis Rev.*, **5**, 185-204.
- 30) Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., & Miyagi, T. (2002) *Int. J. Cancer*, **97**, 180-185.
- 31) Miyagi, T., Sato, K., Hata, K., & Taniguchi, S. (1994) *FEBS Lett.*, **349**, 255-259.
- 32) Kato, T., Wang, Y., Yamaguchi, K., Milner, C.M., Shineha, R., Satomi, S., & Miyagi, T. (2001) *Int. J. Cancer*, **92**, 797-804.
- 33) Ferrari, J., Harris, R., & Warner, T.G. (1994) *Glycobiology*, **4**, 367-373.
- 34) Fronda, C.L., Zeng, G., Gao, L., & Yu, R.K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 727-731.
- 35) Hasegawa, T., Yamaguchi, K., Wada, T., Takeda, A., Itoyama, Y., & Miyagi, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8007-8015.
- 36) Kotani, K., Kuroiwa, A., Saito, T., Matsuda, Y., Koda, T., & Kijimoto-Ochiai, S. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 250-258.
- 37) Monti, E., Preti, A., Rossi, E., Ballabio, A., & Borsani, G. (1999) *Genomics*, **57**, 137-143.
- 38) Chavas, L.M., Tringali, C., Fusi, P., Venerando, B., Tettamanti, G., Kato, R., Monti, E., & Wakatsuki, S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 469-475.
- 39) Sato, K. & Miyagi, T. (1995) *Glycobiology*, **5**, 511-516.
- 40) Sato, K. & Miyagi, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Com-mun.*, **221**, 826-830.
- 41) Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Zizioli, D., Presta, M., Preti, A., & Marchesini, S. (2003) *FEBS Lett.*, **547**, 183-188.
- 42) Fanzani, A., Colombo, F., Giuliani, R., Preti, A., & Marchesini, S. (2004) *FEBS Lett.*, **566**, 178-182.
- 43) Akita, H., Miyagi, T., Hata, K., & Kagayama, M. (1997) *Histo-chem. Cell Biol.*, **107**, 495-503.
- 44) Tokuyama, S., Moriya, S., Taniguchi, S., Yasui, A., Miyazaki, J., Orikasa, S., & Miyagi, T. (1997) *Int. J. Cancer*, **73**, 410-415.
- 45) Tringali, C., Lupo, B., Anastasia, L., Papini, N., Monti, E., Bresciani, R., Tettamanti, G., & Venerando, B. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 14364-14372.
- 46) Hata, K., Wada, T., Hasegawa, A., Kiso, M., & Miyagi, T. (1998) *J. Biochem.*, **123**, 899-905.
- 47) Miyagi, T., Wada, T., Iwamatsu, A., Hata, K., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S., & Sawada, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 5004-5011.
- 48) Wada, T., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S., Kuwabara, M., Akita, H., & Miyagi, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 21-27.
- 49) Monti, E., Bassi, M.T., Papini, N., Riboni, M., Manzoni, M., Venerando, B., Croci, G., Preti, A., Ballabio, A., Tettamanti, G., & Borsani, G. (2000) *Biochem. J.*, **349**, 343-351.
- 50) Hasegawa, T., Feijoo Carnero, C., Wada, T., Itoyama, Y., & Miyagi, T. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 726-732.
- 51) Yamaguchi, K., Hata, K., Wada, T., Moriya, S., & Miyagi, T. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 484-490.
- 52) Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Muhl, C., & Cantz, M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1188-1193.
- 53) Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., & Gabius, H.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11205-11211.
- 54) Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Andre, S., Kaltner, H., Uhl, J., Ehemann, V., Cantz, M., & Gabius, H.J. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35917-35923.
- 55) Proshin, S., Yamaguchi, K., Wada, T., & Miyagi, T. (2002) *Neurochem. Res.*, **27**, 841-846.
- 56) Valaperta, R., Valsecchi, M., Rocchetta, F., Aureli, M., Prioni, S., Prinetti, A., Chigorno, V., & Sonnino, S. (2007) *J. Neuro-chem.*, **100**, 708-719.
- 57) Rodriguez, J.A., Piddini, E., Hasegawa, T., Miyagi, T., & Dotti, C.G. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 8387-8395.
- 58) Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.G., & Abad-Rodriguez, J. (2005) *Nat. Neurosci.*, **8**, 606-615.
- 59) Kalka, D., von Reitzenstein, C., Kopitz, J., & Cantz, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 989-993.
- 60) Wang, Y., Yamaguchi, K., Wada, T., Hata, K., Zhao, X., Fujimoto, T., & Miyagi, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 26252-26259.
- 61) Sun, P., Wang, X.Q., Lopatka, K., Bangash, S., & Paller, A.S. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 107-117.
- 62) Hakomori, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10231-10233.
- 63) Hakomori, S. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 5309-5318.
- 64) Schengrund, C.L., Lausch, R.N., & Rosenberg, A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4424-4428.
- 65) Miyagi, T., Sagawa, J., Kuroki, T., Matsuya, Y., & Tsuiki, S. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1286-1292.
- 66) Kakugawa, Y., Wada, T., Yamaguchi, K., Yamanami, H., Ouchi, K., Sato, I., & Miyagi, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10718-10723.
- 67) Ueno, S., Saito, S., Wada, T., Yamaguchi, K., Satoh, M., Arai, Y., & Miyagi, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 7756-7764.
- 68) Nomura, H., Tamada, Y., Miyagi, T., Suzuki, A., Taira, M.,

- Suzuki, N., Susumu, N., Irimura, T., & Aoki, D. (2006) *Oncol. Res.*, **16**, 289–297.
- 69) Kato, K., Shiga, K., Yamaguchi, K., Hata, K., Kobayashi, T., Miyazaki, K., Saijo, S., & Miyagi, T. (2006) *Biochem. J.*, **394**, 647–656.
- 70) Wada, T., Hata, K., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Koseki, K., Moriya, S., & Miyagi, T. (2007) *Oncogene*, **26**, 2483–2490.
- 71) Sasaki, A., Hata, K., Suzuki, S., Sawada, M., Wada, T., Yamaguchi, K., Obinata, M., Tateno, H., Suzuki, H., & Miyagi, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27896–27902.
- 72) Comelli, E.M., Amado, M., Lustig, S.R., & Paulson, J.C. (2003) *Gene*, **321**, 155–161.
- 73) Monti, E., Bassi, M.T., Bresciani, R., Civini, S., Croci, G.L., Papini, N., Riboni, M., Zanchetti, G., Ballabio, A., Preti, A., Tettamanti, G., Venerando, B., & Borsani, G. (2004) *Genomics*, **83**, 445–453.
- 74) Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Hassan, J.A., Morales, C.R., & Pshezhetsky, A.V. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 37021–37029.
- 75) Yamaguchi, K., Hata, K., Koseki, K., Shiozaki, K., Akita, H., Wada, T., Moriya, S., & Miyagi, T. (2005) *Biochem. J.*, **390**, 85–93.
- 76) Hasegawa, T., Sugeno, N., Takeda, A., Matsuzaki-Kobayashi, M., Kikuchi, A., Furukawa, K., Miyagi, T., & Itoyama, Y. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 406–412.
- 77) Yamanami, H., Shiozaki, K., Wada, T., Yamaguchi, K., Uemura, T., Kakugawa, Y., Hujjiya, T., & Miyagi, T. (2007) *Cancer Sci.*, **98**, 299–307.
-