

## 魚類に見いだされるレクチンの構造・機能と糖鎖認識

### — バーキットリンパ腫治療への応用の可能性 —

細野 雅祐, 菅原 栄紀, 立田 岳生, 仁田 一雄

## Structure, Function and Carbohydrate Recognition of Fish Lectins: A Possible Application for Burkitt's Lymphoma

Masahiro HOSONO, Shigeki SUGAWARA, Takeo TATSUTA, and Kazuo NITTA

(Received November 20, 2013)

### はじめに

レクチンは、その存在の普遍性や多様性、さらには糖鎖を認識するという性質から、自然免疫における主要なプレイヤーであろうことは、古くから議論されてきた。同じ“糖鎖認識”でも、抗糖鎖抗体によるものとレクチンによるそれはかなり異なり、前者は特異的であるのに対し、後者は半特異的あるいは非特異的な認識にとどまる。しかし、これは言い換えると、半（非）特異的であるが故に、広範囲かつフレキシブルな対応がとれるということにもつながり、レクチンは first defense の担い手として非常に好都合であるといえる。すなわち、レクチンは、潜在的に外来異物（分子）に対するパターン認識受容体（pattern recognition receptor, PRR）<sup>12)</sup> としての資質をもっている。「パターン認識」は、昨今、自然免疫（innate immunity）の分野で盛んに使われるようになった術語で、獲得免疫（adaptive immunity）における抗原と抗体との関係を「ゆるく」したようなものである。現在、PRR は、(1) 分泌タイプ、(2) エンドサイトーシスタイプ、(3) シグナル伝達タイプ、の3種類に分類されているが、実はこのいずれにもレクチンが関与している。<sup>3)</sup> (1) にはマンノース結合性レクチン mannose binding lectin (MBL)、<sup>4,5)</sup> フィコリン<sup>6,7)</sup> などが、また、(2) にはマクロファージマンノース受容体<sup>8,9)</sup> などがあてはまる。そして (3) には、Toll 様受容体 (TLR) <sup>10,11)</sup> の発見により近年急速に知見が増えている分野で、異物（病原体）がもつ構造である pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) <sup>10,12)</sup> あるいは damage-associated molecular pattaerns (DAMPs) <sup>12,13)</sup> に対する PRR として、認識するだけではなく、結合してシグナルを下流に伝達し、サイトカインやケモカインの

遺伝子発現誘導を促して積極的に異物排除に関与するものが含まれる。具体的には、これまで知られている TLRs, <sup>10,11)</sup> RIG-1-like receptors (RLRs), <sup>10,14,15)</sup> NOD-like receptors (NLRs) <sup>10,16,17)</sup> に加え、C 型レクチン受容体 (CLRs) <sup>18)</sup> が、近年第4の PRR として注目されている。CLR の例としては、Syk を介して NF- $\kappa$ B の発現を誘導する dectin-1 <sup>19)</sup> や TLR と協調して NF- $\kappa$ B を活性化する dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN) <sup>20)</sup> などが挙げられる。

以上のように、自然免疫における PRR としての役割を担う動物レクチンには、その機能の多様性に注目が集まっているが、言うまでもなく自然免疫は、下等動物になるほど防御機構に占めるウェイトが高い。獲得免疫システム、すなわちリンパ球系の細胞を有する最も下等な生物は軟骨魚類（サメやエイなど）とされており、<sup>21)</sup> したがって、いわゆる“さかな”は基本的に哺乳類と類似の防御機構をもっている。しかし、水中で暮らす“さかな”たちは、総じて常時微生物と接触しながら生きねばならず、必然的に水と接する表皮を粘液（この体表粘液中にはレクチンや抗体などのタンパク質が豊富に存在している）で覆うことによって、外敵への最前線としている。

一方、魚卵中には L-ラムノースに結合するユニークなレクチンが存在することが知られている。<sup>22-24)</sup> “魚卵”といえば、イクラやタラコなど、ごく一般的な食材として食卓にのることも多いが、その成分としては、稚魚の孵化、成長に必要な栄養素がほとんどを占め、薬学的見地から有用となる生物活性をもつ物質はあまり見つかっていない。反対に、コレステロールやプリン体が多く含まれることで、過剰摂取により高脂血症や通風の原因とな

り, また, アレルゲンによる即時型アレルギーの害も知られている。L-ラムノースは, 細菌の細胞壁多糖や植物配糖体中に多く存在するが, 動物体内にはほとんど見られない。このような糖に対して高い親和性を有するレクチンがなぜ魚卵中に偏在するのか? その理由については, いくつかの可能性が提唱されているものの, 今のところ明らかにはなっていない。当研究室では, このラムノース結合性レクチン (rhamnose-binding lectin, RBL) に着目し, 検討を重ねてきた。本稿では, RBL に関する最近の知見を中心に, 魚類に存在するレクチンの構造と機能および応用について概説する。

## I. 魚類に存在するレクチン

魚類に存在するレクチンについては, 上述のごとく主に“自然免疫の担い手”として, この10年間でいくつかの総説が発表されている。<sup>25-30)</sup> Cタイプレクチンは, 17のサブグループを擁する動物レクチンのなかでも最大派閥であり, このファミリーに特徴的な糖結合ドメイン, carbohydrate recognition domain (CRD), いわゆる C-type lectin-like domain (CTLCD)<sup>31)</sup> を有する。このカテゴリーには, 動物レクチンとして初めて免疫機構への関与が証明された MBL<sup>32)</sup>をはじめ, 機能が明らかになっているレクチンが多数含まれる。<sup>33)</sup> MBLは Type IIIのコレクチンサブファミリー<sup>6)</sup> に属する可溶性タンパク質であるが, 同様のものが魚類でも見つかった。<sup>34,35)</sup> CLRは, Type IIサブファミリーに属する膜結合型レクチンで, ゼブラフィッシュから DC-SIGN の完全長 cDNA がクローニングされている。<sup>36)</sup> 現在のところ, dectin に相当する分子は魚類では見つかっていない。<sup>37)</sup> 一方, ニジマスなどで, 細胞内にシグナル伝達の抑制に関与する immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) を含む CLR 遺伝子の存在が確認されている。<sup>38)</sup> また, 魚類に特徴的なタンパク質に抗凍結タンパク質 antifreezing protein (AFP) があり, 興味深いことに, そのうちのタイプ II (Cタイプレクチンのサブファミリーと紛らわしいため, カタカナ表記とした) に属するタンパク質の構造中に CTLCD が含まれており, Type VII グループの範疇に加えられている。<sup>39)</sup> 極海に棲む魚の血清中に AFP が存在する意義は説明するべくもないが, 氷の結晶形成抑制に CTLCD の構造が何らかの形で関わっているとすれば, レクチンの

機能としては異色であるといえる。同様に, このグループに属するものとして, 当研究室で単離したシシャモ卵レクチン (OLABL)<sup>40)</sup> 他, 数種の C タイプレクチンの報告がある。<sup>41-43)</sup>

C タイプレクチンと並んで動物レクチンファミリーの双璧を成すガレクチンファミリーは, 魚類においては Teichberg らによって電気ウナギ (electric eel, *Electrophorus electricus*) のエラから精製されたエレクトロレクチンが嚆矢となっている。<sup>44)</sup> 構造的にはプロト型, キメラ型およびタンデムリピート型に分類され,<sup>45)</sup> やはりガレクチン特有の CRD が存在する。魚類のガレクチンとしては Muramoto らによりマアナゴ (conger eel, *Conger myriaster*) の体表粘液から単離されたコンジェリンが詳細に研究されている。<sup>46-48)</sup> また, 同様にウナギ (Japanese eel, *Anguilla japonica*) からガレクチン AJL-1 が見つかった。<sup>49)</sup>

その他の魚類レクチンとしては, L-フコースに親和性をもつ F-type レクチン<sup>50)</sup> に属するものや, もともと哺乳類の腸管上皮に存在するラクトフェリン受容体として知られるようになったインテレクチン (intelectin)<sup>51,52)</sup> のグループに属するレクチンが数種報告されており,<sup>29,53)</sup> いずれも自然免疫に関与していると考えられている。また, 近年, トラフグ (pufferfish, *Fugu rubripes*) の粘液から, ユリ目 (タマネギ, ニンニクなど) の植物に存在するレクチンと相同性をもつレクチンが単離された。<sup>54)</sup> 動物レクチンと植物レクチンは, 分子進化の上でも隔たりがあるため, 両者の関係が注目されている。

## II. ラムノース結合性レクチンの構造

### 一次構造

魚類は, 動物レクチンの研究史において最も早くから実験材料として利用され, 1960 年代の終わり頃から Prokop や Uhlenbruck などの先駆者たちにより, 主に血清学的実験に用いられた。<sup>55)</sup> 次いで, Kocoureck や Krajhanzl<sup>22)</sup> をはじめとする多くの研究者により, 主に卵を材料として次々に発見されたのが RBL である。アフィニティークロマトグラフィーの導入によってレクチン精製が容易になり, さらに多くの知見が蓄積されてきた。<sup>56)</sup> RBL は, L-ラムノースと合わせて, ガラクトシル  $\alpha$  結合に親和性を持ち, 糖結合にカルシウムイオンあるいは遊離のチオール (SH 基) を必要とせず, ウサギ赤血球及びヒト B 型赤血球を凝集する, などの性質を

共有する。<sup>23)</sup>しかし、その一次構造が明らかになったのは Prokop らの研究から 30 年を経た 1998 年、Tateno らによってアミノ酸配列分析されたニジマス (steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss*) 卵レクチン (STL),<sup>57,58)</sup> 次いで我々のグループによる cDNA クローニングからのナマズ (catfish, *Silurus asotus*) 卵レクチン (SAL)<sup>59)</sup> が端緒である。相次いで構造が明らかにされた 2 種の RBL は、いずれも 100 残基程度のアミノ酸から成るポリペプチドドメインが 3 回繰り返す (以下、3D と表記)、いわゆるタンデムリピート構造をもつことが分かった。この領域のアラインメントにより、個々のドメインは、N 末端側に ANYGR, C 末端側に DPC-KYL をコアとするコンセンサス配列 (RBL motif) を有し、ドメインあたり 8 個存在するシステインの位置が保存されていた。以後 RBL は、主にこれら 2 カ所のペプチドモチーフおよびシステインの位置情報を基に帰属が行われ、さらに数種の魚卵から同様の構造をもつレクチンが見つかったことから、一時は魚卵に特異的なレクチンファミリーであるとの考えもなされた。しかし、タンパク質データベースの利用が隆盛となり、この構造はもっと以前に、しかも以外なことに魚卵ではなく、ムラサキウニ (sea urchin, *Anthocidaris crassispina*) 卵から単離されたレクチン (SUEL) に存在することが報告されていたのである。<sup>60)</sup> SUEL は当初、“ガラクトース結合性レクチン”として紹介されていたが、構造的には 2 個の RBL ドメインがジスルフィド結合したホモダイマーであ

り、さらにラムノースにも親和性を有することが我々の研究により明らかになった。<sup>59)</sup> このことから、現在、RBL は SUEL-related lectin とも呼ばれている。<sup>6)</sup> また、構造の基本となるドメインは RBL-CRD あるいは C タイプレクチンの CTLD に因んで RBL CRD-like domain (RCLD) とも呼ばれている。<sup>61)</sup> Table 1 に、これまでに精製レクチンとして活性および一次構造が明らかにされた RBL を列挙した。<sup>62-71)</sup>

また、Fig. 1 には各々の RCLD のアラインメントを示す。前述のように、この図では、まず赤で示したシステインの位置が、ほぼすべての RCLD で保存されているのが分かる。同様に、緑で示した 2 カ所の RBL motif もよく保存されている。また、灰色で囲んだ部分がかかなり目立つが、これはすべての RCLD に共通するものではなく、同属の RBL をドメイン配置 [N 端側, 中間 (M) および C 端側] で分けて並べたとき、それぞれのグループで配列が驚くほどよく似ていることを示している (例えば STL1-C, CSL1-C および WCL1-C)。最下段に加えたのは、魚類ではなく、哺乳類の神経細胞に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 G タンパク共役型受容体 (GPCR)、ラトロフィリン (latrophilin; LPH) である。クロゴケグモ (black widow spider) の毒素ラトロトキシン (latrotoxin) をリガンドとするこの 7 回膜貫通型受容体の細胞外ドメインに、どういう訳か RCLD と相同の配列が組み込まれていることは比較的早くから知られていた。<sup>72,73)</sup> ラトロトキシンの結合に RCLD は関与していないと

Table 1. Lectins from Aquatic Animals

Japanese name	Latin name	Lectin abbreviation	Source	Molecular mass monomer (kDa)	Ref.
マベガイ	<i>Pteria penguin</i>	PPL	mantle	21	63
ムラサキウニ	<i>Anthocidaris crassispina</i>	SUEL	egg	11.5	60
ウスイタボヤ	<i>Botryllus schlosseri</i>	BsRBL	whole body	11	64
シシャモ	<i>Osmerus lanceolatus</i>	OLL		21	65
ナマズ	<i>Silurus asotus</i>	SAL		31	59
ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	STL1~3		31.4, 21.3, 21.5	57, 58
サケ	<i>Oncorhynchus keta</i>	CSL1~3		29, 21.5, 22	66
イワナ	<i>Salvelinus leucomaenis</i>	WCL1,2	egg	35, 26	67
サワラ	<i>Scomberomorus niphonius</i>	SML		24	62
アユ	<i>Plecoglossus altivelis</i>	SFL		30	68
マルタウグイ	<i>Tribolodon brandti</i>	TBL1~3		29, 22, 34	69
マスノスケ	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	SEL24K		24	70
ヒイラギ	<i>Leiognathus nuchalis</i>	PFL1,2	skin mucus	24, 30	71

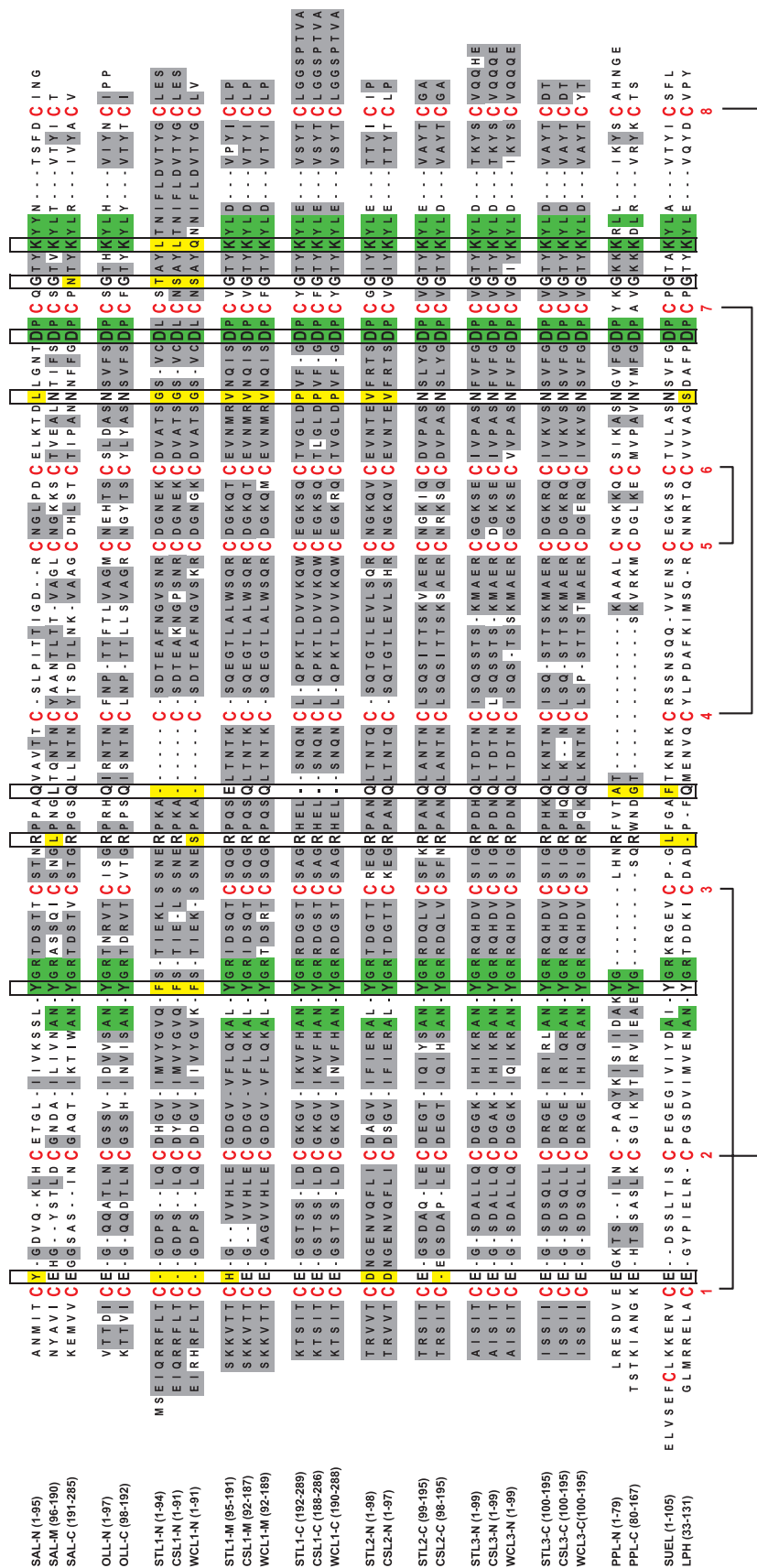


Fig. 1. Alignment of RCLD amino acid sequences among RBLs

Identical amino acid residues among the domains of related RBLs were shaded, and cysteine were denoted with large red letters. Two RBL motifs, "ANYGR" and "DPC-KYL", were in green boxes. The carbohydrate-interacting residues were emphasized by large bold letters in the boxes. Disulfide bridges were depicted by four lines.



考えられているが、少なくともこの受容体の一部として、糖結合性を保持した配列が存在することは確かである。<sup>74)</sup> 魚類から一足飛びに哺乳類のタンパク質にまで保存配列が見つかったことから、RCLDは、少なくとも進化の過程で淘汰されてしまうことなく、すなわち、何らかの必要性をもって保存されてきた可能性が示唆される。しかも、神経系の細胞表面上に、である。

2007年、Teradaらは、サワラ卵レクチン (SML) のペプチドマッピングを行い、RCLD中に8個存在するシステインがすべてドメイン内で共有結合 (S-S結合) していることを明らかにし、<sup>62)</sup> また、この結合様式は、Zhaoらによってマスノスケ卵レクチン (SEL24K) においても同様 (Mass解析による) であることが示された。<sup>75)</sup> すなわち、システイン残基にN末端から1~8まで番号を付けた場合、C1-C3, C2-C8 (large loop), C4-C7 および C5-C6 (small loop) の4つのループが出来上がることになる (Fig. 1)。また、Vakonakisらは、2008年、LPHの部分構造としてのRBLドメインの立体構造をX結晶構造解析によって明らかにし、<sup>74)</sup> 次いで2009年にはShiraiらによってCSL3の高次構造が同様の方法で解明された。<sup>75)</sup> 2つのドメインから成るCSL3は、ねじれたダンベル型 (kinked dumbbell shape) 構造をとり、N端ドメイン (N-lobe) とC

端ドメイン (C-lobe) が短いリンカーペプチド (QQQET) によって連結されている。X線結晶構造解析は、同時に糖を結合した形でも行われ、L-ラムノースとの結合に関わる8個のアミノ酸が同定された (N末端から順にE, Y, R, Q, N, D, G, K) (Fig. 1)。これらのうち、LPHのRCLDに関する実験では、L-ラムノースあるいはD-ガラクトースに対してE, Y, GおよびKが配位しているモデルが示されたが、CSL3では、L-ラムノースに対してはE, N, D, GおよびKが配位し、RとQは、グロボトリアオシルセラミドGb3の三糖構造 (Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc) の2番目と3番目の糖、すなわちD-ガラクトースとD-グルコースへの結合に使われ、また、残りのYは、Nと相互作用して糖結合を安定化させていると結論づけられた。これら8個のアミノ酸がすべてRBLモチーフに含まれているわけではないが、システインとモチーフの保存性の高さを考慮すると、糖結合アミノ酸、S-S loopおよびRBLモチーフが協調してリガンドとの結合にあたっているものと考えられる。

### ゲノム構造

2010年にJiaらは、ライギョ (snakehead, *Channa argus*) のcDNAライブラリーから、2DタイプのRBLの全長配列を単離し、さらにゲノム解析を行った。<sup>77)</sup> その結果、ライギョRBL (SHL) は、9

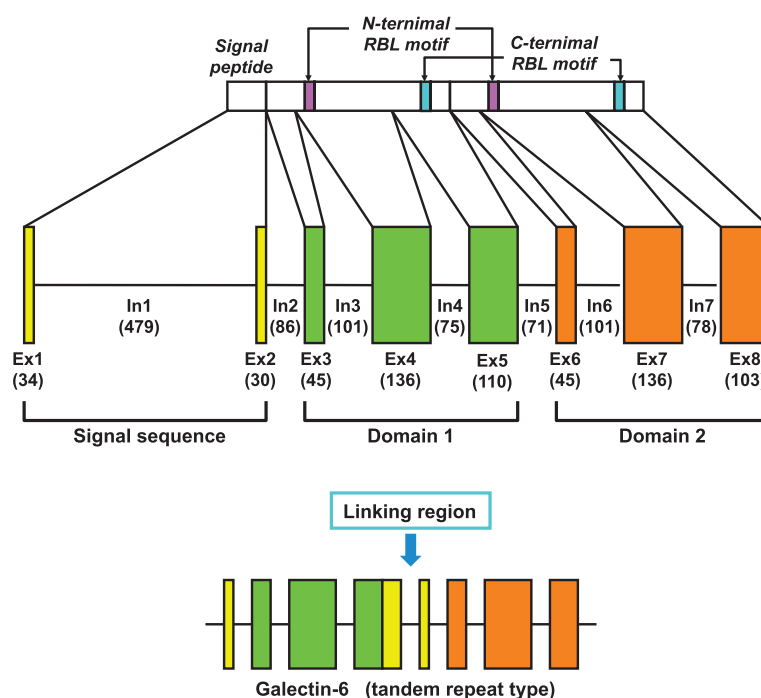


Fig. 2. Schematic Depiction of Genomic Organization of OLL and galectin-6

OLL polypeptide body was depicted by open boxes with small-colored motifs in upper panel. Genomic composition of OLL and galectin-6 was in middle and lower panel, respectively. Nucleotide numbers of exon (Ex, colored boxes) and intron (In, lines) were noted in parentheses.

個のエキソンに分かれてコードされており, 最初の2エキソンでシグナル配列, その後3個および4個のエキソンでそれぞれSHL-Nおよび-Cがコードされていた. 我々は最近, SHLと同様2Dタイプのシシヤモ (*shishamo smelt*, *Osmerus lanceolatus*) 卵レクチン, OLLに関してゲノム解析を行い, これと若干異なる結果を得た (Fig. 2).<sup>65)</sup> OLLゲノムは, 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. オープンリーディングフレーム (ORF) は, シグナル配列が2個のエキソンに分断されており, その間に最長 (479 bp) のイントロンが挿入され, さらに2個のRBLドメインはそれぞれ互いに相同な3個ずつのエキソン (Ex3とEx6間で82%, Ex4とEx7間で83%, Ex5とEx8間で91%) でコードされていた. CRDをコードする3個のエキソンを隔てているイントロンもまた, ドメイン間で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とっていることが明らかとなった. このようなゲノム構造は, タンデムリピート型のガレクチン-6のゲノム構造 (CRD間に挿入配列がある点は異なる)<sup>78)</sup> でも見られる. 以上の結果からも, RBLは進化の過程において, CRDをコードするエキシ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強く示唆される.

### III. RBLの構造とレクチン活性

#### RCLDのタンデムリピート構造と赤血球凝集活性

特徴的なタンデムリピート構造および赤血球凝集活性を基に, 我々はRBLを5つのグループに分類した.<sup>79)</sup> このとき, ニジマス STL1, イワナ

(white-spotted charr, *Salvelinus leucomaenis*) WCL1 およびサケ (chum salmon, *Oncorhynchus keta*) CSL1 は, いずれも SAL と同様に 3D であるが, それらの N 末端ドメインは, システインの数と位置は保存されているものの RBL モチーフをもたないこと, また, ヒト赤血球を凝集しない<sup>65,66)</sup> ことから SAL とは別のグループに分類した. 同様に, STL3, WCL3 および CSL3 は, OLL と同様に 2D であり, ヒト赤血球を凝集するが, その活性がラクトースによって阻害されないことから, OLL とは別グループとした. このようにドメイン構造およびアミノ酸配列を子細に検討すると, 構造と活性に興味深い関係が見えてくるが, このことについては後述する. 最近, Ogawa らは, タンパク質配列データベースから包括的な系統樹解析を行い, ドメインのアミノ酸配列の進化的相同性から RBL を 5 つのグループおよび 13 のサブグループに分類した.<sup>29)</sup> その結果, 広義の “RBL ファミリー” と呼べるタンパク質は, 軟体動物 (貝類) から哺乳類にいたる幅広い生物種におよそ 20 種類 (ドメイン数としては 70 以上, 一部はデータベース上) 見つかっていることから, 前述した LPH (ラトロフィリン) と合わせて, RBL 遺伝子の進化と機能発現に関して興味をもたれる.

Table 2 に, 我々の分類と Ogawa らの分類を併せて表示した. Fig. 1 のアラインメントと合わせて考えると以下のような推論が導きだせる.

- 1) STL1/CSL1/WCL1 と SAL は, RCLD 遺伝子 3, 5 および 6 のシャッフリングの結果生みだされた 3D レクチンだが, RCLD6 には糖結合活性はなく, 逆に存在することにより, 少なくとも赤血球凝集反応において RCLD3 や 5 の活

Table 2. Schematic Representation and Grouping of RBLs

Type <sup>a)</sup>	Type (Ogawa et al.) <sup>a)</sup>	RCLD composition <sup>a)</sup>	RBL	Classification (order)	Hemagglutination <sup>b)</sup>	Ref.			
I	I a	<table><tr><td>5</td><td>3</td><td>3</td></tr></table>	5	3	3	SAL	Siluriformes	B	59
5	3	3							
II	II	<table><tr><td>6</td><td>5</td><td>3</td></tr></table>	6	5	3	STL1/CSL1/WCL1		N.A	57, 58, 66, 67
6	5	3							
III	III a	<table><tr><td>4</td><td>4</td></tr></table>	4	4	STL3/CSL3/WCL3	Salmoniformes	B > A, O	57, 58, 66, 67	
	4	4							
	III b	<table><tr><td>5</td><td>4</td></tr></table>	5	4	STL2/CSL2		B	57, 58, 66	
5	4								
III c	<table><tr><td>5</td><td>5</td></tr></table>	5	5	OLL	Osmeriformes	B > A, O	65		
5	5								
IV	IV a	<table><tr><td>2</td><td>2</td></tr></table>	2	2	PPL	Pterioda	A, B, O	63	
2	2								
V	V	<table><tr><td>S</td><td>1</td></tr></table>	S	1	SUEL	Echinoida	N.D		
		S	1						
<table><tr><td>S</td><td>1</td></tr></table>	S	1							
S	1								

a) RBL grouping were followed in the data reported by Nitta et al. (ref. 79) (left column) and Ogawa et al. (ref. 29) (right column), respectively. Phylogenetically classified CRD numbers from ref. 29 were denoted in the boxes.

b) Hemagglutinating activity for human erythrocytes. N.A and N.D indicate “none of the activity” and “not determined”, respectively.

性を阻害しているように見える。

- 2) 前述の糖結合アミノ酸と赤血球凝集活性の間に興味深い一致が見られる。すなわち、CSL3において解析された8個の糖結合アミノ酸がすべて保存されているのはSTL3/CSL3/WCL3とOLLのみで、これらはいずれもヒトB型赤血球をよく凝集し、AおよびO型に対して、弱い凝集活性がある。言い換えると、このRCLDの糖結合アミノ酸組成と2D構造が、B>A、Oという赤血球凝集活性（さらにはガラクトースとN-アセチルガラクトサミンあるいはフコースに対する親和性の違い）を生みだしているのではないか？

これらの推論を確かめるべく、現在当研究室において、組換えレクチンの作製を進めており、さらなる構造活性相関の解明が期待される。

繰り返しになるが、RBLは、総じて非常に高いラムノース親和性と、ウサギ赤血球凝集活性をもっており、この2点においてはほとんどのRBL間で特に差異は認められない。一方、マベ貝 (penguin wing oyster, *Pteria penguin*) 由来のPPLは、2Dレクチンで、SUELと40%程度の相同性をもつことから、RBLファミリーに属するものとして報告されているが、他のRBLとの間には以下のような相違点がある。<sup>62)</sup>

- 1) どちらのドメインにおいてもRBLモチーフが不完全。
- 2) システイン配置を他のRBLと整列させて考えた場合、前述した4つのS-Sループのうち、C1-C3とC4-C7が欠損しており、さらにC2-C8は20残基ほど短い (C5-C6は変わらない)。
- 3) N-アセチルガラクトサミンに親和性をもつ一方、L-ラムノースに対する親和性が非常に低い。
- 4) ヒト赤血球を非特異的に凝集する。このレクチンはもともと、ウシ顎下腺ムチン (BSM) をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーにより精製された。

RBLの精製方法としての4)も異例であるが、最もインパクトが大きいのは、RBLの生命線ともいべき、“L-ラムノースに対する親和性”が著しく低いことであり、さらに興味深いのは、PPLは、単糖レベルというよりはむしろ、N-結合型糖鎖によく見られるオリゴ糖鎖 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-) に対して高い親和性をもつことである。Naganumaらが結論づけているように、自然免疫が生体防御の要となっ

ている無脊椎動物では、パターン認識が非常に重要であり、しかも、なるべく多種類の病原性物質に対応するために多種類の、あるいは幅広い守備範囲をもったディフェンスプレイヤーが必須であることから、このようなレクチン活性はまことに都合が良い。<sup>62)</sup> さらにPPLは、海水とほぼ同じNaCl濃度 (約500 mM) では非共有結合的に2量体を形成しているという。実はこの傾向は、他のRBLでも報告されており、CSL1、2および3は溶液中でそれぞれ4、18および2量体として、<sup>29)</sup> またSALは最大3量体として存在することが報告されている。<sup>80)</sup> SALを例にとると、1分子あたり3個のRCLDがあって、それぞれ独立して糖鎖と結合すると仮定すれば、3量体として計9個の結合部位が生まれる。異物認識の際に、これらの結合部位が必ずしもすべて同等に機能する必要はなく、むしろ捕捉すべき相手 (PAMPs?) の糖鎖構造の数および空間的配置によってフレキシブルに対応できる機能が備わっていると考えると、極めて合目的的である。また、PPLのlarge loopが短いことが、STLと比較して熱安定性に寄与しているらしい。<sup>62)</sup> Loopが2個しかなくても、両ドメインで8個のうち7個の結合アミノ酸が保存されており、しかも凝集活性はあるのだから、もしかするとC1-C3およびC4-C7 loopは活性に直接必要がないのかもしれないが、これについてはさらに検討が必要であろう。

一方、Ozekiらは、SUEL (RCLDのホモ2量体) の性質を検討し、還元条件下 (すなわち、1D構造になる) では、チオジガラクトシドに対する結合性は保持するものの、赤血球凝集活性が消失すると報告している。<sup>59)</sup> このことを検証するため、我々は、大腸菌発現系を用いて組換えSAL (3D) を封入体タンパク質として獲得し、リフォールディングにより赤血球凝集活性をもつ組換えレクチンの作製に成功した。同時にSAL-C (Fig. 1) に相当する1D組換え体、ANYGRモチーフを含むN末端部分あるいはDPC-KYLモチーフを含むC末端部分を欠損させた短縮型1D組換え体を発現させ、赤血球凝集反応を行ったところ、1Dそのものでは還元剤の有無にかかわらず凝集活性が認められたのに対し、短縮型1Dでは、凝集活性およびガラクトース-Sepharoseに対する親和性も失われていることが分かった (Hosonoら、未発表データ)。以上の結果から、2つのRBLモチーフは、レクチン活性に必須であり、またSAL-C (1D) は、溶液



中で非共有結合的に2量体を形成し、赤血球凝集活性を発揮する可能性が示唆された。

#### 糖結合特異性

当研究室で単離した2種のRBL, SAL (3D) および OLL (2D) を比較すると、前述したように糖結合特異性にも違いがあると考えられる。そこで、表面プラズモン共鳴スペクトル解析法 (SPR) を用い、固相化した糖タンパク質あるいは糖脂質に対するレクチン結合能の速度論解析を行った。<sup>65)</sup> その結果、SAL のガラクトシル  $\alpha$  結合に対する親和性 ( $K_d$ ) は  $5.9 \times 10^{-7}$  M で、 $\beta$  結合に対するそれ ( $4.3 \times 10^{-5}$  M) よりかなり高かったのに対し、OLL の場合はそれぞれ  $5.3 \times 10^{-6}$  M および  $3.3 \times 10^{-6}$  M と、大きな差は見られなかった。ガラクトシル  $\alpha$  結合を非還元末端にもつスフィンゴ糖脂質である Gb3 に対しても、SAL は OLL に比べて高い親和性を示した (Table 3)。SPR によるこの結果は、赤血球凝集活性の結果と矛盾しない。すなわち、ガラクトシル  $\alpha$  結合 (B 型物質) に対する親和性が SAL > OLL という序列である。一方、SPR とは別のモードの解析法であるフロンタルアフィニティークロマトグラフィー (FAC) により解析された Gb3 に対する親和性のデータを比較すると、困ったことにこの序列が逆転していた。Table 3 で既報の CSL1~3 の  $K_d$  値と比較した。<sup>81)</sup> 3 種の CSL と OLL は、ほぼ同等の親和性を示したのに対し、SAL は明らかに低い親和性を示したのである。この理由はよくわからないが、SPR と FAC では、固相化する分子が異なる (前者では糖鎖を、後者ではレクチンを固相化) することから、いわゆるレクチンに対する糖鎖のクラスター効果が逆に作用したのかもしれない。いずれにしても、SAL と OLL の間には少なくとも糖鎖認識において違いが認められた。

#### Ⅳ. RBL とがん細胞の相互作用

SAL が Gb3 にも親和性を示したことから、Sugawara および Kawano らは、細胞表面に Gb3 を多く発現しているヒトバーキットリンパ腫 (Burkitt's lymphoma, BL) 細胞に着目し、SAL の結合性を調べた。<sup>82-84)</sup> すると、SAL は BL 株である Raji や Daudi 細胞に結合し、Gb3 発現がほとんどないヒト慢性骨髄性白血病細胞 (human erythromyeloblastoid leukemia) K562 には結合しなかった (Fig. 3a)。このとき、彼らは同時に SAL 処理により細胞が縮小することを見だし (Fig. 3b)、後にそのメカニズムは、細胞膜に存在する Gb3 が  $K^+$  チャネル ( $Kv1.3$ ) と一部共局在しており、Gb3 に SAL が結合することによってチャネルが活性化され、 $K^+$  が放出されると同時に水分子が排出されることとした (Fig. 3c)。さらに、SAL 処理により Raji 細胞の増殖が抑制されるが、アネキシン V (ANV) の結合増加およびヨウ化プロピジウム (PI) の取り込み促進にもかかわらず (通常、この変化は後期アポトーシスまたはネクローシス状態を示すといわれている)、アポトーシスを起こさない (実行カスパーゼの活性化も起きない) ことも見いだした。<sup>84)</sup> これに対し、Shirai らは、結腸がん細胞株 (Caco-2) を用いて CSL3 の影響を検討している。SAL と対照的に、CSL3 は、Caco-2 に対して生存率の低下をもたらしたが、<sup>76)</sup> この作用は L-ラムノースによって阻害された。Fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析や DNA ラダーパターンから、CSL 処理によって Caco-2 にアポトーシスが誘導されることは明らかである。加えて、Gb3 の糖鎖生合成阻害薬 (PPMP) を用いた実験から、この作用がレセプターとしての Gb3 を介していることも示された。それでは、先に CSL3 と赤血球凝集活性が同じと判じた OLL ではどうか？ そこで、

Table 3. Affinity Constants ( $K_d$ ) of RBLs Analyzed by SPR and FAC Analyses <sup>a)</sup>

Lectins <sup>b)</sup>	SAL	OLL	CSL1	CSL2	CSL3
SPR analysis (M)					
Gala-HSA <sup>c)</sup>	$5.9 \times 10^{-7}$	$5.3 \times 10^{-6}$			
Gal $\beta$ -BSA <sup>c)</sup>	$4.3 \times 10^{-5}$	$3.3 \times 10^{-6}$			
Gb3	$2.8 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$			
FAC analysis (M)					
Gb3	$3.2 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^{-5}$	$3.1 \times 10^{-5}$	$7.1 \times 10^{-5}$	$2.6 \times 10^{-5}$

a) SPR and FAC means surface plasmon resonance and frontal affinity chromatography, respectively.

b) Data were referred from ref. 65 for SAL and OLL, and ref. 81 for CSL1~3.

c) HSA, human serum albumin; BSA, bovine serum albumin.



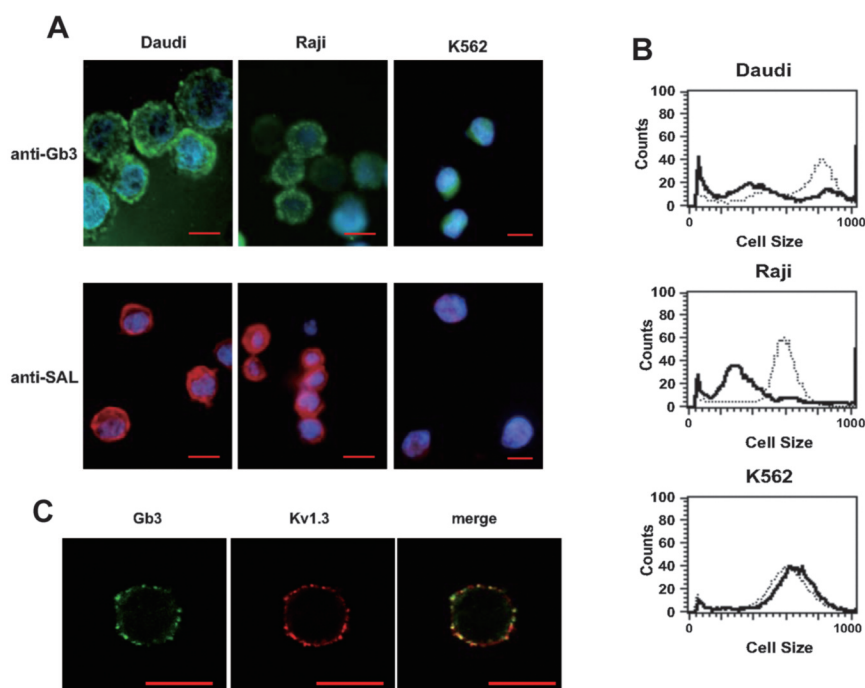


Fig. 3. Interection between SAL and Burkitt's Lymphoma and Erythroleukemia Cells

(A) Gb3 expression on Daudi, Raji and K562 cells (upper panel, green) and binding properties of SAL (lower panel, red). (B) SAL-induced cell shrinkage of each cells was analyzed by flow cytometry. Cell size was denoted by forward scatter histograms. (C) Co-localization of Kv1.3 and Gb3 on Raji cells. Green: anti-Gb3 (left), Red: anti-Kv1.3 (middle), Merged image (right).

OLL でも Raji に対して同様の作用が起きるか否か比較したところ, SAL の場合と同様に細胞サイズが縮小し, また, FACS 解析において, ANV の結合増加および PI の取り込み増加が認められた. しかし, SAL (0.32 mM) と同等の変化を起こすのに OLL では 4.8 mM を要した. すなわち, OLL の活性は SAL の約 1/10 ということになる. また, SAL 処理 (3.2 mM, 24 h) で, Raji の生存率は 90% 近くを維持していたのに対し, OLL 処理では濃度依存的に生存率の低下が認められ, 9.6 mM, 24 時間処理で生存率は約 50% まで低下した (Hosono ら, 未発表データ). 以上の結果から, OLL は, Raji に対して一部は SAL とレセプター (Gb3) を共有するものの, その他の部分で SAL とは別の (おそらくはガラクトース  $\alpha$  結合糖鎖以外の) レセプターに結合するために, Gb3 を介して起こる一連の細胞変化が鈍化するものと考えられる. また, phycoerythrin (PE) で蛍光ラベルした OLL および SAL と Raji を反応させると, いずれの場合でも細胞表面が蛍光染色されるが, このとき, 細胞を抗 Gb3 抗体で前処理しておくと, PE-SAL の結合はほぼ完全にブロックされるが, PE-OLL の場合は抗体未処理とほぼ同様の染色像を示した (Hosono ら, 未発表データ). このことも, OLL が SAL とは異なる糖鎖認識を

行っていることの証左であると考えられる. 以上の知見は, 前項で述べた構造活性相関の考え方と合わせて議論することは可能であると思われ, 現在の検討課題となっている.

## V. RBL の生物活性および機能

冒頭から述べているように, 最も重要と思われる RBL の機能は, 生体防御であろう. 膜タンパク質ではないが, 体表粘液中や免疫関連組織 (エラ, 消化器官, 脾臓など) に発現し, TLRs のように LPS に結合するとともに細菌を凝集する.<sup>85,86)</sup> 魚のマクロファージに働きかけて, TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの産生およびファゴサイトーシスを促す.<sup>81,87)</sup> これらはすべて, RBL が PRR として働いているとする考えの源となっている. 一方, RBL が病原菌の結合 (感染) に一役かっているという見方もある. Beck らは, アメリカナマズ (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) のエラにおける RBL 遺伝子の発現が, 固有の病原菌である *Flavobacterium columnare* に対して易感染性の個体では高く, 耐性の個体では低いことを見いだした.<sup>87)</sup> これだけなら, 感染刺激に対して RBL が防御要員として動員されたとも考えられるが, 彼らはさらに, ハプテン糖である L-ラムノースや D-ガ

ラクトースによって菌の感染が抑制されることも示した。魚の免疫機構に RBL がどのように関わっているのか、まだ整理しなければならない課題が多く残っている。

これとは別の視点から、すなわち主にがん細胞上に発現している Gb3 の糖鎖をレセプターとして、RBL が active component として作用することも重要である。SAL や CSL の他にもがん細胞に対して細胞増殖抑制作用を示すものもあるが、RBL が Gb3 を介して細胞周期に抑制的に関わるシグナルを何らかの形で調節している可能性があると考えられている。そのひとつが、SAL の結合により Raji 細胞内で遺伝子発現が有意に低下する mitochondria-associated GM-CSF signaling molecule (MAGMAS, ヒトでは TIMM16) である。<sup>88)</sup> TIMM16 は、主にミトコンドリア内膜に存在する、ある種のトランスロケータの一部を成しているが、この分子の動きにも興味をもたれる。

## VI. RBL のバーキットリンパ腫への応用

先に述べたように、Gb3 は、消化器がんや腎臓がんにも発現が認められ、特にがん細胞の転移能、すなわち悪性化に関与していることが知られている。<sup>89,90)</sup> 同じく Gb3 の発現量が高いバーキットリンパ腫は、悪性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫のひとつで、最も急速に増殖するヒト腫瘍といわれており、<sup>91)</sup> 三種の病型（散発型、風土病型、HIV 陽性型）が存在する。<sup>92)</sup> 散発型は世界中で広く発症しているものであるが、風土病型はアフリカ大陸に多く、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) 感染が関与している。いずれの病型でも、第 8 染色体上の *c-myc* 遺伝子あるいは第 14 染色体上の免疫グロブリン H 鎖の転座が高率で認められ、診断基準のひとつに加えられている。<sup>93)</sup> IV で述べたように、Sugawara らは、SAL はバーキットリンパ腫 Raji 細胞に対し、アポトーシスを誘導しないが細胞増殖を停止させること、<sup>84)</sup> さらに、その培地中から SAL を除去すると、ふたたび増殖しはじめること (Sugawara ら、未発表データ) を見いだした。また同時に、抗腫瘍薬アドリアマイシン (adriamycin, 別名ドキソルビシン doxorubicin) の Raji 細胞への取り込みが、SAL 処理により増加し、アドリアマイシンの細胞死誘導効果を増強することを示した。<sup>83)</sup> SAL と抗腫瘍薬との併用効果に関しては、この他にビンブラスチ

ン (vinblastine) およびイリノテカン (irinotecan) でも同様の結果が得られており、加えてこの効果は Gb3 をもたない K562 細胞では認められないことから、SAL と Gb3 との相互作用に起因している可能性が示唆されている。<sup>94)</sup> 一方、特に細胞増殖率の著しく高い白血病/リンパ腫では、抗腫瘍薬に対する感受性 (有効性) が高い反面、腫瘍細胞の急速な破壊に起因する腫瘍崩壊症候群 (tumor lysis syndrome, TLS) の危険性が指摘されている。<sup>95)</sup> この点において、細胞に対して細胞死を誘導せずに増殖を抑制する SAL の特性が、バーキットリンパ腫への臨床応用を目指す上でのアドバンテージとなる可能性を秘めている。また、Schmitz らは最近、バーキットリンパ腫が他の非ホジキンリンパ腫 (びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫など) と悪性化のメカニズムが分子的に異なることを報告している。<sup>96)</sup> 彼らは、バーキットリンパ腫において、B 細胞の生存を調節する転写因子である transcription factor 3 (TF3) を阻害する inhibitor of DNA binding 3 (ID3) が高度に変化していること (すなわち、TF3 を阻害できなくなり、その結果として細胞が生存する方向に向かう)、また、サイクリン D3 (cyclin D3) をコードする遺伝子 *CCND3* が高頻度で変異しており、その結果産生される安定な変異サイクリン D3 によって CDK6 が活性化し、細胞の増殖が促進されることを示した。以上の結果は、CDK6 を含むいくつかの細胞周期関連分子がバーキットリンパ腫治療の重要なターゲットとなり得ることを示唆するものである。当研究室においても現在、SAL 処理による Raji 細胞の増殖抑制が、細胞周期を停止させることによることを確認しており (Sugawara ら、未発表データ)、今後このラインの研究を推し進めていくことにより、バーキットリンパ腫治療への応用が期待できるものと考えている。

## おわりに

動物レクチンの分類としては現在、新旧合わせて 15 のファミリーが紹介されている。<sup>28)</sup> RBL ファミリーは、一定の員数を有し、他のレクチンファミリーとは明確に区別でき、糖結合特異性が明確で CRD も同定され、3 次元構造も解明されたにもかかわらず、そこには数えられていない。これまで蓄積された知見を披歴すれば、RBL は堂々と動物レクチンの一ファミリーとして総説などの

表中に加えられてもおかしくないと思われるが、いまだ確たる市民権を得ていないのが実情である。唯一考えられる理由は、“ファンクション”が明確にされていないことであろう。本稿で取り上げたように、傍証的なものはいくつも発表されており、上述のごとく、(繰り返しになるが)自然免疫に対して何らかの寄与をしている蓋然性は高いものと思われる。しかし、なぜ卵に多いのか?もしも生体防御に重要なものであれば、すべての魚卵に見つからないのはなぜか?など、決定的な疑問が解決されていないのも確かである。著者は、もとよりRBLを“陽のあたる表舞台”に押し上げることをことさら望んでいるものではない。しかし、このレクチンは、他の動物レクチンとは異なる構造と性質をもっていることは明らかで、生物がそのようなタンパク質を進化の過程でわざわざ残すには、何らかの必然性がそこに存在するはずであるという思いは常にもっている。まったくエビデンスのない想像の話ではあるが、実はそれほど小難しい理由ではなく、L-ラムノースをもつ細菌に対する武器のひとつとして、ある種の魚には備わっている(消極的に考えると残った)ということだけかもしれないし、もしくは餌として摂取する植物性プランクトンや海藻類から、栄養源としての糖質を選別するために使われているものなのかもしれない。解決されない問題が多いほど、そしてまた新しい抗腫瘍作用のメカニズムがひとつずつ明らかになるごとに、RBLに対する興味は日に日に募ってくる。

**謝辞** 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。

## REFERENCES

- 1) Takeuchi O., Akira S., *Immunol. Rev.*, **220**, 214–224 (2007).
- 2) Takeuchi O., Akira S., *Cell*, **140**, 805–820 (2010).
- 3) Hayashi T., Nakamura T., Takaoka A., *Jpn. J. Clin. Immunol.*, **34**, 329–345 (2011).
- 4) Kilpatrick D.C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 401–413 (2002).
- 5) Eddie IP W. K., Takahashi K., Ezekowits R. A., Stuart L. M., *Immunol. Rev.*, **230**, 9–21 (2009).
- 6) Lu J., Teh C., Kishore U., Reid K. B. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 387–400 (2002).
- 7) Matsushita M., Fujita T., *Immunol. Rev.*, **180**, 78–85 (2001).
- 8) East L., Isacke C. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 364–386 (2002).
- 9) Martinez-Pomares L., *J. Leukocyte Biol.*, **92**, 1177–1186 (2012).
- 10) Kumar H., Kawai T., Akira S., *Int. Rev. Immunol.*, **30**, 16–34 (2011).
- 11) Kawai T., Akira S., *Immunity*, **34**, 637–650 (2011).
- 12) Tang D., Kang R., Coyne C. B., Zeh H. J., Lotze M. T., *Immunol. Rev.*, **249**, 158–175 (2012).
- 13) Kono H., Rock K. L., *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 279–289 (2008).
- 14) Yoneyama M., Mikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T., *Nat. Immunol.*, **5**, 730–737 (2004).
- 15) Loo Y.-M., Gale M., *Immunity*, **34**, 680–692 (2011).
- 16) Geddes K., Magalhaes J. G., Girardin S. E., *Nat. Rev.*, **8**, 465–479 (2009).
- 17) Franchi L., Eigenbrod T., Munoz-Planillo R., Nunez G., *Nat. Immunol.*, **10**, 241–247 (2009).
- 18) Osorio F., Reis e Sousa C., *Immunity*, **34**, 651–664 (2011).
- 19) Reid D. M., Gow N. A. R., Brown D., *Curr. Opin. Immunol.*, **21**, 30–37 (2009).
- 20) Gringhuis S. I., den Dunnen J., Litjens M., van Het Hof B., van Kooyk Y., Geijtenbeek T. B., *Immunity*, **26**, 605–616 (2007).
- 21) Kasahara M., *Immunol. Rev.*, **166**, 159–175 (1998).
- 22) Krajhanzl A., *Adv. Lectin Res.*, **3**, 83–131 (1989).
- 23) Hosono M., Nitta K., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **40**, 21–43 (1993).
- 24) 村本光二, 小川智久, 神谷久男, “海洋生物成分の利用”, 伏谷伸宏監修, シーエムシー出版, 東京, 2005, pp.276–289.
- 25) Ellis A. E., *Dev. Comp. Immunol.*, **25**, 827–839 (2001).
- 26) Ewart K. V., Johnson S. C., Ross N. W., *ICES J. Mar. Sci.*, **58**, 380–385 (2001).
- 27) Russell S., Lumsden J. S., *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **108**, 111–120 (2005).
- 28) Vasta G. R., Nita-Lazar M., Giomarelli B., Ahmed H., Du S., Cammarata M., Parrinello N., Bianchet M. A., *Dev. Comp. Immunol.*, **35**, 1388–1399 (2011).
- 29) Ogawa T., Watanabe M., Naganuma T., Muramoto

- K., J. Amino acids, doi:10.4061/2011/838914 (2011).
- 30) Zhu L. Y., Nie L., Zhu G., Xiang L. X., Shao J. Z., *Dev. Comp. Immunol.*, **39**, 39–62 (2013).
  - 31) Day A. J., *Biochem Soc Trans.*, **22**, 83–87 (1994).
  - 32) Wallis R., Mitchell D. A., Schmid R., Schwaebler W. J., Keeble A. H., *Immunobiol.*, **215**, 1–11 (2010).
  - 33) Zalensky A. N., Gready J. E., *FEBS J.*, **272**, 6179–6217 (2005).
  - 34) Vitved L., Holmskov U., Koch C., Teisner B., Hansen S., Skjødtt K., *Immunogenet.*, **51**, 955–964 (2000).
  - 35) Zhang H., Robinson B., Thorgaard G. H., Ristow S. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1494**, 14–22 (2000).
  - 36) Lin A. F., Xiang L. X., Wang Q. L., Dong W. R., Gong Y. F., Shao J. Z., *J. Immunol.*, **183**, 7398–7410 (2009).
  - 37) Lauridsen J. H., Buchmann K., *Acta Ichthyol. Piscat.*, **40**, 61–66 (2010).
  - 38) Yoder J. A., Mueller M. G., Nichols K. M., Ristow S. S., *Immunogenet.*, **54**, 662–670 (2002).
  - 39) Ewart K. V., Fletcher G. L., *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **2**, 20–27 (1993).
  - 40) Hosono M., Sugawara S., Ogawa Y., Kohno T., Takayanagi M., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1725**, 160–173 (2005).
  - 41) Richards R. C., Hudson D. M., Thibault P., Ewart K. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **1621**, 110–115 (2003).
  - 42) Tasumi S., Ohira T., Kawazoe I., Suetake H., Suzuki Y., Aida K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 27305–27311 (2002).
  - 43) Mistry A. C., Honda S., Hirose S., *Biochem. J.*, **360**, 107–115 (2001).
  - 44) Teichberg V. I., Silman I., Beitsch D. D., Resheff G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 1383–1387 (1975).
  - 45) Hirabayashi J., Satoh M., Kasai K., *J. Biol. Chem.*, **267**, 15485–15490 (1992).
  - 46) Muramoto K., Kamiya H., *Biochim. Biochem. Acta*, **1116**, 129–136 (1992).
  - 47) Ogawa T., Ishii C., Kagawa D., Muramoto K., Kamiya H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1203–1208 (1999).
  - 48) Muramoto K., Kagawa D., Sato T., Ogawa T., Nishida Y., Kamiya H., *Comp. Biochem. Physiol.*, **123**, 33–45 (1999).
  - 49) Tasumi S., Yang W. J., Usami T., Tsutsui S., Ohira T., Kawazoe I., Wiider M. N., Aida K., Suzuki Y., *Dev. Comp. Immunol.*, **28**, 325–335 (2004).
  - 50) Bianchet M. A., Odom E. W., Vasta G. R., Amzel L. M., *Nature Struct. Biol.*, **9**, 628–634 (2002).
  - 51) Tsuji S., Uehori J., Matsumoto M., Suzuki Y., Matsuhisa A., Toyoshima K., Seya T., *J. Biol. Chem.*, **276**, 23456–23463 (2001).
  - 52) Suzuki Y. A., Shin K., Lönnerdal B., *Biochemistry*, **40**, 15771–15779 (2001).
  - 53) Tsutsui S., *Nippon Suisan Gakkaishi*, **78**, 677–680 (2012).
  - 54) Tsutsui S., Tasumi S., Suetake H., Suzuki Y., *J. Biol. Chem.*, **278**, 20882–20889 (2003).
  - 55) Uhlenbruck G., Prokop O., *Vox Sang.*, **12**, 465–466 (1967).
  - 56) Yano T., *Fish Physiol.*, **15**, 105–157 (1997).
  - 57) Tateno H., Saneyoshi A., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 19190–19197 (1998).
  - 58) Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Hirai T., Saneyoshi M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1328–1338 (2001).
  - 59) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 668–675 (1999).
  - 60) Ozeki Y., Matsui T., Suzuki M., Titani K., *Biochemistry*, **30**, 2391–2394 (1991).
  - 61) Tateno H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1141–1144 (2011).
  - 62) Terada T., Watanabe Y., Tateno H., Naganuma T., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 617–629 (2007).
  - 63) Naganuma T., Ogawa T., Hirabayashi J., Kasai K., Kamiya H., Muramoto K., *Mol. Div.*, **10**, 607–618 (2006).
  - 64) Gasparini F., Franchi N., Spolaore B., Ballarin L., *Dev. Comp. Immunol.*, **32**, 1177–1191 (2008).
  - 65) Hosono M., Sugawara S., Tatsuta T., Hikita T., Kominami J., Nakamura-Tsuruta S., Hirabayashi J., Kawsar S.M.A., Ozeki Y., Hakomori S., Nitta K., *Fish Physiol. Biochem.*, **36**, 1619–1630 (2013).
  - 66) Shiina N., Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Saneyoshi M., Kamiya H., *Fisheries Sci.*, **68**, 1352–1366 (2002).
  - 67) Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1356–1365 (2002).
  - 68) Watanabe Y., Shiina N., Shiozaki F., Yokoyama H., Kominami J., Nakamura-T S., Hirabayashi J., Sugahara



- K., Kamiya H., Matsubara H., Ogawa T., Muramoto K., *Dev. Comp Immunol.*, **32**, 487–499 (2008).
- 69) Jimbo M., Usui R., Sakai R., Muramoto K., Kamiya H., *Comp. Biochem. Physiol.*, **B147**, 164–171 (2007).
- 70) Yu H., Murata K., Hedrick J. L., Almaraz R. T., Xiang F., Franz A. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **463**, 1–11 (2007).
- 71) Okamoto M., Tsutsui S., Tasumi S., Suetake H., Kikuchi K., Suzuki Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 463–469 (2005).
- 72) Lelianova V. G., Davletov B. A., Sterling A., Rahman M. A., Grishin E. V., Totty N. F., Ushkaryov Y., *J. Biol. Chem.*, **272**, 21504–21508 (1997).
- 73) Krasnoperov V., Bittner M. A., Holz R. W., Chepurny O., Petrenko A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 3590–3596 (1999).
- 74) Vakonakis I., Langenhan T., Prömel S., Russ A., Campbell I. D., *Structure*, **16**, 944–953 (2008).
- 75) Zhao L., Almaraz R. T., Xiang F., Hedrick J. L., Frans A. H., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**, 1603–1616 (2009).
- 76) Shirai T., Watanabe Y., Lee M., Ogawa T., Muramoto K., *J. Mol. Biol.*, **391**, 390–403 (2009).
- 77) Jia W. Z., Shang N., Guo Q. L., *Fish Physiol. Biochem.*, **36**, 451–459 (2010).
- 78) Gitt M. A., Xia Y. R., Atchison R. E., Lusi A. J., Barondes S. H., Leffler H., *J. Biol. Chem.*, **273**, 2961–2970 (1998).
- 79) Nitta K., Kawano T., Sugawara S., Hosono M., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 553–561 (2007).
- 80) Murayama K., Taka H., Kaga N., Fujimura T., Mineki R., Shindo N., Morita M., Hosono M., Nitta K., *Anal. Biochem.*, **247**, 319–326 (1997).
- 81) Watanabe Y., Tateno H., Nakamura-Tsuruta S., Kominami J., Hirabayashi J., Nakamura O., Watanabe T., Kamiya H., Naganuma T., Ogawa T., Naude R. J., Muramoto K., *Dev. Comp. Immunol.*, **33**, 187–197 (2009).
- 82) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Sasaki S., Nitta K., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **51**, 125–132 (2004).
- 83) Sugawara S., Sasaki S., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 327–334 (2005).
- 84) 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).
- 85) Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 604–612 (2002).
- 86) Tateno H., Shibata Y., Nagahama Y., Hirai T., Saneyoshi M., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1427–1430 (2002).
- 87) Franchi N., Schiavon F., Carletto M., Gasparini F., Bertoloni G., Tosatto S. C. E., Ballarin L., *Immunobiol.*, **216**, 725–736 (2011).
- 88) Kawano T., Sugawara S., Hosono M., Tatsuta T., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 998–1002 (2008).
- 89) Kovbasnjuk O., Mourtazina R., Balbakov B., Wang T., Elowsky C., Choti M. A., Kane A., Donowitz M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 19087–19092 (2005).
- 90) Falguières T., Maak M., von Weyhern C., Saa M., Sastre X., Poupon M-F., Robine S., Johannes L., Janssen K-P., *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 2498–2508 (2008).
- 91) Armitage J. O., *CA-Cancer J. Clin.*, **55**, 368–376 (2005).
- 92) Brady G., MacArthur G. J., Farrell P. J., *J. Clin. Pathol.*, **60**, 1397–1402 (2007).
- 93) Zeidler R., Lipp M., Joos S., Delecluse H-J., Bornkamm G. W., Klobeck G., Vuillaume M., Lenoir G. M., *Genes Chrom. Cancer*, **9**, 282–287 (1994).
- 94) Sugawara S., Araya K., Hosono M., Tatsuta T., Nitta K., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **58**, 41–46 (2011).
- 95) 城下 智, 上條 敦, 北野喜良, 信州医誌, **56**, 73–78 (2008).
- 96) Schmitz R., Young R. M., Ceribelli M., Jhavar S., Xiao W., Zhang M., Wright G., Schaffer A. L., Hodson D. J., Buras E., Liu X., Powell J., Yang Y., Xu W., Zhao H., Kohlhammer H., Rosenwald A., Kluin P., Müller-Hermelink H. K., Ott G., Gascoyne R. D., Connors J. M., Rimsza L. M., Campo E., Jaffe E. S., Delabie J., Smeland E. B., Ogburn M. D., Reynolds S. J., Fisher R. I., Braziel R. M., Tubbs R. R., Cook J. R., Weisenburger D. D., Chan W. C., Pittaluga S., Wilson W., Waldmann T. A., Rowe M., Mbulaitye S. M., Rickinson A. B., Staudt L. M., *Nature*, **490**, 116–120 (2012).