

平成 26 年度 博士学位論文

タラの芽由来 aralin の癌細胞選択的細胞毒性の発現機構の解析

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻
大塚 寛子
指導教員 薬学博士 田代文夫

目次

本論文で使用する略語	2
I 序論	4
II 実験材料および実験方法	7
III 結果	15
1. Aralin の細胞侵入メカニズム	
2. プロセシングされた 110kDa HDLBP は aralin 受容体として作用する	
3. HeLa 細胞における HDLBP の機能獲得および機能損失解析	
4. Huh7 細胞における HDLBP 機能獲得解析	
5. Aralin 経口投与された aralin は HDLBP を介して腫瘍形成を抑制する	
IV 考察	21
V 引用文献	25
VI 謝辞	31
VII 図	32

本論文で使用する略語

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
BSA	bovine serum albumin
CHAPS	3-(3-cholamidepropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate
CLA-1	Human CD36 and LIMP II analogous-1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	dithiothreitol
EtOH	ethanol
ER	endoplasmic reticulum
ERGIC	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment
FBS	fetal bovine serum
GPI-PLC	glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C
HCC	human hepatocellular carcinomas
HDL	high density lipoprotein
HDLBP	high density lipoprotein binding protein
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IgG	immunoglobulin G
M β CD	methyl- β -cyclodextrin
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PKC	protein kinase c
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RIP	ribosome-inactivating protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SV40	simian virus
TAMRA	tetramethylrodamine
Tween20	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
LDLR	low density lipoprotein receptor

LRP1	low-density lipoprotein receptor-related protein-1
TCS	trichosanthin
rViscumin	recombinant mistletoe lectin-I

I 序論

現在、日本の死因の第一位は悪性新生物いわゆる癌で、心疾患、脳血管疾患を大きく引き離し全体の3割を占めており、年間30万人以上の方が癌で亡くなっている[1]。癌の治療法には、外科的療法、放射線療法、化学療法、免疫細胞療法がある。化学療法(抗癌剤)には、DNA合成を阻害する作用を持つ代謝拮抗剤、アルキル化剤、植物アロカロイドなどがあり、癌に特異的な性質や発現を示す分子に作用する分子標的薬(例:チロシンキナーゼ阻害剤のイマチニブ)[2,3]などがある。しかしながら、低分子の抗癌剤に対して癌細胞は耐性を獲得することから細胞膜受容体を介して癌細胞選択的に作用し副作用の少ない抗がん剤の開発が期待されている。

リボソーム不活性化タンパク質 RIP (Ribosome inactivating proteins)は様々な植物に広く存在し、RNA *N*-glycosidase として真核生物のリボソーム RNA のアデノシンを除去、切断してタンパク質合成を阻害して細胞死を誘導する。RIP は主に type I と type II RIP のタイプに分類される。Type I RIP は約 30 kDa の分子量を有する単鎖タンパク質であり、一方 type II RIP は、細胞侵入時に必要な B 鎖とジスルフィド結合を介して結合した type I RIP と機能的に同等な A 鎖から構成される約 56-65 kDa のヘテロダイマーの糖タンパク質である。Type I RIP は、ricin や abrin などの type II RIP と比べて弱い細胞毒性を示す[4,5]。Type I RIP が type II と比べて毒性が弱いのは、特異的な受容体が存在しないことに起因しているためではないかと考えられている。

Type II RIP は始めに B 鎖を介した細胞表面受容体への結合により細胞へ侵入することがよく知られており、エンドサイトーシスを介して細胞膜を通過し最終的にゴルジ体や小胞体(ER)を介した逆行輸送によって細胞質ゾルに到達する。ER では、A 鎖はサイトゾルターゲットを攻撃するため ER 関連分解経路を利用する[4,5,6,7]。Ricin の場合では、一つの分子は一分間に 2000 リボソームを不活性化することができ、細胞質において一つまたは数個の分子で細胞を殺すのには十分である(Fig. 1, 2 ; [7],[8])。

Ricin は細胞内に侵入する時、細胞表面上の糖脂質と末端にガラクトースを付加した糖タンパク質を利用する。それ故 ricin は非特異的な細胞毒性を示す。RIP の同定された表面受容体タンパク質は今まで非常に少なく[7,9]、多くの研究室はイムノトキシンや他のリガンドと結合させた融合毒素として、固形腫瘍や血液系腫瘍の治療に応用されて良好な臨床結果が報告されている[10]。興味深いことに、type II RIP に属する

rViscumin(recombinant mistletoe lectin-I)の場合では、rViscumin 受容体として機能する CD75 と iso-CD75 ガングリオシドが膵臓腺がんサンプルにおいて特異的に発現されている。新規抗癌剤としての rViscumin は、Phase I 治験を完了し Phase II 治験が開始されている[11,12,13]

このような状況下において、タラの芽由来 type II RIP の aralin は、正常細胞と比較して、ヒト子宮頸癌 HeLa、膀胱癌 T24、膵臓癌 MIA PaCa-2、急性前骨髄性白血病 HL-60、卵巣癌 OVK18 細胞などの様々なタイプのヒト腫瘍細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導することが当研究室の戸松らによって報告されている[14,15,16]。Aralin は 29kDa の A 鎖と 32kDa の B 鎖から構成され、それぞれの N 末端アミノ酸配列はニワトコ由来の毒性タンパク質 nigrin の A 鎖とヒマ種子由来の毒性タンパク質 ricin の B 鎖と相同性があることが示された(Fig. 3)。Aralin の細胞毒性はガラクトースおよびその誘導体の添加によって効果的に抑制された。さらに、TAMRA 標識 aralin を用いた aralin 受容体の解析により、受容体は SV40 で形質転換した細胞株(VA-13)の細胞表面周辺で高く発現され、一方正常細胞では低い発現が観察された。

TAMRA-aralin の結合はガラクトースによって抑制されるが ricin では抑制されなかったことから、aralin 特異的受容体はガラクトースを含むタンパク質であることが強く示唆された。しかしながら、今まで細胞膜の真の aralin 特異的受容体については不明であった。

High density lipoprotein-binding protein (HDLBP)は 150-kDa の糖タンパク質であり、より低分子(105-110 kDa)にプロセッシングされ、HDL 受容体として機能するために細胞膜へと移動する[17,18,19,20,21]。HDLBP mRNA とタンパク質の発現レベルはコレステロール過剰な細胞において亢進されることより[17,18]、HDLBP は HDL を介して細胞からコレステロールを除去する役割を果たす可能性が示唆されており、HDL の抗動脈硬化作用の根底にあるプロセスかもしれない[17]。ゼブラフィッシュにおいては、HDLBP が受精後 36 時間の発生過程において高発現されている[22]。成熟ゼブラフィッシュでは肝臓や卵巣やひれなどにおいて特異的に発現されており、インスリンや成長ホルモンの影響は受けない[22]。HDLBP は多くのリン酸化部位を持ち[23]、K568N と D939V 変異は乳癌サンプルにおいて報告されている[24]。今までに報告されたデータは非常に少ないが、HDLBP の機能とプロセッシング経路は生理学的条件によって制御されている[17,18,21]。1268 アミノ酸からなる HDLBP は vigilin

とも呼ばれ、細胞質や核に存在し RNA 結合領域を介して転写、mRNA の安定性、翻訳を制御している[25,26]。ニワトリ HDLBP のアミノ酸配列はヒト HDLBP と 90% の相同性があり、構造上高い保存性を示す[27]。また、HDLBP は多種多様な細胞や組織において発現されている[28]。

本研究では、細胞表面 aralin 受容体タンパク質の同定に焦点をあて、細胞への侵入と aralin の選択的細胞毒性との関係を解析した。脂質ラフトにおいてプロセシングされた 110kDa HDLBP が aralin 受容体として同定され機能することが明らかとなった。HeLa 細胞で強制発現された 110-kDa HDLBP は *in vivo* で aralin に対する高い感受性を賦与し、一方 shRNA HDLBP の抑制発現は *in vitro* および *in vivo* での aralin 感受性を低下させた。これらの結果は、aralin が HDLBP を過剰発現した腫瘍への抗癌剤として有望な候補であることを提示している。同時に、HDLBP の発現量の増加は腫瘍マーカーに成り得ることを示している。

II 実験材料および実験方法

1. 細胞培養

1-1. 細胞培養と継代

ヒト正常二倍体線維芽細胞 Hs68 は、10% FCS-DMEM(high glucose) (Wako/Japan) 培地中で、37°C、5% CO₂の条件下で培養を行った。細胞を継代する際は、PBS で洗浄後、トリプシン溶液(0.05%トリプシン(GIBCO BRL/USA)、2 mM EDTA (Sigma)、pH8.0)を加えて 37°C で 5 分間保温することで細胞をはがし、10-cm dish に 1×10⁶ cells で継代した。また、同様にして、ヒト扁平上皮がん SCC-25 は 10% FCS-DMEM F12 (Wako)で、ヒト子宮頸癌 HeLa は 10% FCS-Minimum Essential Medium Eagle (以後 MEM と略記)で、ヒト肝癌 HepG2、Huh7 細胞、サル腎臓癌 COS-7 細胞は 10% FCS-DMEM (Nissui/Japan)中で培養した。

2. Arlin の精製[8]

以下の工程はすべて、4°C で行った。タラノキの新芽 140 g に対し、5 倍量 (v/w) のバッファーA(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA)を加え、ポリトロンホモジナイザーにてホモジナイズ後、17,000 g で 30 分間遠心した上清を 4 重にしたガーゼで濾過することで、粗抽出液を得た。これに、硫酸アンモニウムを 80% 飽和になるようにゆっくり加えてから、さらに 30 分間攪拌した後、17,000 g で 30 分間遠心分離して得た沈殿を少量のバッファーA に融解して、同バッファーに対して透析した。この溶液を 17,000 g で 30 分間遠心して沈殿を除いた後、あらかじめバッファーA で平衡化した TOYOPEARL QAE-550C (東ソー株式会社) カラム (4×33-cm)に供した。バッファーA で洗浄後、0 mM から 250 mM NaCl の直線濃度勾配をつけた 700 ml のバッファーA で溶出した。流速は 1 ml/min で行い、10 ml ずつ分取した各フラクションを適宜希釈して選択的細胞障害活性を測定した。活性のあるフラクションを集め、Amicon YM10 膜をセットした限外濾過装置 (Stirred Cell, Millipore Corp.)により濃縮およびバッファーA へのバッファー交換を行った。この溶液を 17,000 g で 30 分間遠心分離して沈殿を除いた後、NaCl を 0.1 M となるように加え、あらかじめバッファーB (25 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.1 M NaCl) で平衡化した Con A-Agarose (生化学工業株式会社) カラム (1.4×19-cm)に供した。バッファーB および 0.05 M α -メチル

グルコシドを含むバッファーBで洗浄後、0.1 M α -メチルマンノシドを含むバッファーBで溶出した。流速は0.14 ml/minで行い、2 ml ずつ分取した各フラクションを適宜希釈して選択的障害活性を測定した。活性のあるフラクションを集め、Centriplus-30 (Millipore Corp.) により濃縮とPBSへのバッファー交換を行った。本研究では、秋田総合食品研究所の戸松誠博士によって精製された aralin および anti-aralin 抗体を使用した。

3.細胞表面認識実験

TAMRA 結合 aralin (TAMRA-aralin)の精製と TAMRA-aralin による細胞表面の標識

Aralin をアミン反応プローブである Tetramethylrhodamine(以後 TAMRA と略記)(Molecular Probes, Eugene, OR)を用いて以下のように蛍光標識した。TAMRA (10 mg/ml) 1 μ l に対して 5 μ g 分の aralin を混合し、遮光下で室温、1 時間反応させた。その後、未反応の TAMRA を除去するために、G50 TE カラムに通した。得られた TAMRA-aralin 溶液を 12% ポリアクリルアミドゲルで泳動し、FLA-3000 (フルオロ・イメージアナライザー)で蛍光強度を確認し、TAMRA-aralin の存在を確認した。その後ゲルを銀染色し、Scion Image でバンドの濃さを測定し TAMRA-aralin の濃度とした。なお、BSA も同様に反応させ、TAMRA 結合 BSA (TAMRA-BSA)を精製した。

8 穴 Lab-Tek II Chamber Slide (Nalge Nunc International, Naperville, IL)に SCC-25 細胞を 5×10^3 cells/well でまきこみ、48 時間培養し Hoechst33342 (Sigma, St. Louis, MO)で核を染色した。そして、TAMRA-aralin (8×10^{-10} M)で氷上、15 分処理した。そして、すぐに蛍光顕微鏡にて観察した。また、コントロールとして BSA を TAMRA で蛍光標識した TAMRA-BSA (8×10^{-10} M)を用いた。さらに、aralin の経時の変化を見るために、TAMRA-aralin を各時間処理し、蛍光顕微鏡にて観察した。

Cy3 および Cy5-aralin の標識と細胞表面の標識

Aralin を Cy3 または Cy5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)のプロトコルに従い作製した。コントロールとして BSA を標識した Cy3-BSA を精製した。8 穴 Lab-Tek II Chamber Slide (Nalge Nunc International)に HeLa 細胞を播きこみ

培養し Hoechst33342 (Sigma)で核を染色した。実験に応じて 3.2 nM Cy3-aralin、Cy3-BSA (3.2 nM)また同時に未標識 32 nM aralin、5 mM の各糖(ラクトース、ガラクトース、フコース、マンノース)を加え、15 分間氷上で反応させた後、洗浄後共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。また、SCC-25 細胞を培養後 Hoechst33342(Sigma)で核を染色し、Cy5-aralin を 45 分間反応させ局在を観察した。なお局在の比較のため、ゴルジ体は BODIPY TR ceramide (Molecular Probes)、小胞体-ゴルジ体中間コンパートメント(ERGIC)-53 (Sigma-Aldrich)を用いて染色した。さらに、ER の局在を pEF/myc/ER/GFP (Initrogen, Carlsbad, CA)をトランスフェクションすることにより解析した。

4. 癌細胞選択的細胞毒性の測定法

24 well プレートに 1×10^4 cells/well、HeLa, HepG2, Huh7 細胞を播種し、37°C、24 時間培養した。Hs68 細胞は 37°C、48 時間培養した。その後、PBS(-)で希釈された aralin 溶液(秋田県総合食品研究所の戸松博士により精製された)を各濃度になるように培地を準備し、培地交換の要領で aralin を加えた。コントロールには PBS(-)を培地に対して 1/1000 量加えた。Aralin 処理を行い、36 時間培養後、各 well の培地を 1.5 ml エッペンに回収し、各 well を PBS(-)で 2 回洗浄し、その溶液をエッペンに加えた。トリプシン溶液を加えて 37°Cで保温することで細胞をはがし、その液をさらに加えた。そして、5000 rpm、4°C、5 分間遠心し、100 μ l になるように上清を除去し細胞カウント用サンプルを得た。各サンプルに等量の 0.03% トリパンプルー溶液を加え、光学顕微鏡下において血球計算板を用い、トリパンプルーで染まらなかった細胞を生細胞、染まった細胞を死細胞としてカウントした。

5. 発現ベクターの構築と樹立

150-kDa HDLBP 過剰発現ベクターは、150-kDa human *HDLBP* cDNA (Open Biosystems, Huntsville, AL)を pcDNA3 ベクター (Invitrogen)に挿入して構築した。また、これを pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA)と pEGFP-C1 (Clontech)の N 末端および C 末端に融合させて構築した。110-kDa HDLBP cDNA は 150-kDa HDLBP cDNA をテンプレートとして使い PCR によって増幅させた。110-kDa HDLBP (5'-primer; 5'-gcc aag ctt gcc acc atg agt gag aag agc aat ttg atc cgc atc g-3',

3'-primer, 5'-cgt acc aag ctt ggg tct ccc tat ag-3')。増幅させた cDNA は pcDNA3 に挿入にして構築した。Lipofectamine PLUS (Invitrogen) を使い HeLa/Huh7 細胞に 150-kDa HDLBP 発現ベクターと空ベクターをトランスフェクション後、G418 により選択し HeLa/Huh7 細胞それぞれから VC と HBP1/2 細胞株を樹立した。Huh7 細胞は 110-kDa HDLBP ベクターを用いて 110-kDa HBP2 を樹立した。

6. 遺伝子発現抑制細胞株の樹立

6-1. マイクロ RNA 配列の設計

HDLBP の発現を抑制する相補的 2 本鎖配列を発現するベクターを BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression vector kits (Invitrogen) を用いて構築した。HDLBP の発現を抑制する相補的な 2 本鎖配列の作成は Web 上に公開されているマイクロ RNA 配列設計ソフトウェアを用いて設計した。なお設計に利用したヒト HDLBP 遺伝子の配列情報は Accession Number: NM_005336 である。

shHDLBP1(相補的な配列は HDLBP 遺伝子の ORF の 1417 番目から 21 塩基である); (top) 5'-tgc tga gtc aac gcc tga cct aac ttg ttt tgg cca tga ctg aca agt tag gag gcg ttg act-3' / (bottom) 5'-cct gag tca acg cct cct aac ttg tca gtc agt ggc caa aac aag tta ggt cag gcg ttg act c-3',

shHDLBP2(相補的な配列は HDLBP 遺伝子の ORF の 3011 番目から 21 塩基である); (top) 5'-tgc tgt cac gaa ttt cac gga tcc gtg ttt tgg cca ctg act gac acg gat ccg aaa ttc gtg a-3' / (bottom) 5'-cct gtc acg aat ttc gga tcc gtg tca gtc agt ggc caa aac acg gat ccg tga aat tcg tga c-3' の配列を設計した。

6-2. マイクロ RNA 発現ベクター(pcDNA™6.2GW/EmGFP-HDLBP miR vector)の作成

設計した配列の oligonucleotides は 200 μM になるように TE で希釈し、top strand と bottom strand を 1:1、さらに 10×Oligo Annealing Buffer、DNase/RNase-Free Water をそれぞれ 2 μl、5 μl 加え、よく混合した後に 95°C で 5 分間加熱し、top strand と bottom strand のアニーリングを行った。その後アニーリングした dsDNA (50 μM) 4 μl に DNase/RNase-Free Water を加えて 10 nM に希釈した。このようにして作成

した 10 nM 二本鎖オリゴ 4 μ l に pcDNATM6.2GW/EmGFP-miR ベクター(5 ng/ μ l) 4 μ l、10 \times Ligation 緩衝液 4 μ l、DNase/RNase-Free Water 9 μ l、T4DNA Ligase 1 μ l を加え混合し、室温で 30 分間静置し、インサート DNA とベクターDNA を連結させた。

6-3. マイクロ RNA 発現ベクター大腸菌へのトランスフォーメーション

上記で作成したライゲーション反応液を One shot TOP10 Chemically Competent Ecoli のバイアル中に 2 μ l 加え、よく混合し 20 分間氷上で静置させた。その後、42°C 30 秒間大腸菌をヒートショックし、大腸菌を直ちに氷上に移した。そして、室温の S.O.C 培地を 250 μ l 加え、37°C で 1 時間インキュベートし、50 μ g/ml の spectinomycin (nacalai tesque)を含む LB 寒天プレートに適量滴下して、コンラージ棒で広げ、37°C で 12 時間以上培養した。

6-4. HDLBP 発現抑制細胞株の樹立

マイクロ RNA 発現ベクターDNA を用いて遺伝子導入を行った。5 \times 10⁵ cells HeLa 細胞の培地を無血清培地と交換した。マイクロ RNA 発現ベクター10 μ g は予めエタノール沈殿を行い滅菌し、70%メタノールで洗浄後真空乾燥を行った。そこに 50 μ l の HBS 緩衝液()を加え攪拌し、DNA を溶かした。また、30 μ l の DOTAP に 70 μ l の HBS 緩衝液を加え混合したものを先ほどの DNA と混合した。HeLa 細胞に混合液を加え 3 時間後に通常培養で用いる培地と交換し、24 時間培養した。

7. 膜タンパク質の抽出

細胞を 10-cm dish を 8 枚用意し、2 ml の PBS(-)で 3 回洗浄した後、1 ml の TBS を加えスクレイパーで細胞を剥離し、200 g、10 分間、4°C で遠心し上清を除去し細胞を回収した。回収した細胞の体積の 9 倍量の TBS-EDTA (20 mM Tris-HCl、pH7.4、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA、1 mM PMSF、protease inhibitor cocktail)を加えて懸濁し、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザー(YAZAWA)で 20 ストローク以上ホモジナイズを行った後、800 g、10 分間、4°C で遠心した。沈殿物に 1 \times Sample buffer を適量加え核分画とした。この上清を 100,000 g、60 分間、4°C で遠心して上清を細胞質

分画として除き、保存した。沈殿物に対して 15 mM CHAPS-TBS-EDTA で再懸濁し、4°C で 20 分間インキュベートした後、100,000 g、60 分間、4°C で遠心して上清を可溶性膜分画、沈殿物を不溶性膜分画とした。

8. ウェスタンブロット解析 (WB)

細胞を SDS sample buffer (10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 5% DTT)によりタンパク質を調製した。タンパク質を 95°C で 5 分間加熱し 10% SDS-PAGE により分離した。その後分離ゲルを Clear Blot Membrane-P (Atto, Tokyo, Japan)にトランスファーした。トランスファー後、メンブレンをブロッキング液に室温で一時間振盪させた。次に一次抗体を遮光し 4°C で一晩振盪させた。その後、PBS-T で 10 分間振盪させる洗浄を 3 回繰り返した。次に、二次抗体を室温で一時間振盪させた。一次抗体の洗浄と同様に 3 回洗浄した後、PBS に浸して 5 分間浸透させる洗浄を二回行った。発色には Immobilon Western (Millipore, Billerica, MA)を使用した。なお、本研究で用いた抗体は以下のとおりである。一次抗体：anti-HDLBP(center) (Abgent, San Diego, CA), anti-flotillin-1 (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA), anti-Na⁺/K⁺-ATPase (Santa Cruz), anti-β-actin (Santa Cruz), anti-Histone H1 (Santa Cruz), anti-GFP antibodies (Nacalai).二次抗体：anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Cell signaling, Danvers, MA), anti-goat IgG conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotech.) antibody.

9. ファーウェスタンブロット解析 (FWB)

細胞から各々調製した分画または全抽出液中のタンパク質を SDS-PAGE で分離後、メンブレンに転写した。転写後、メンブレンをブロッキング溶液 (0.5% BSA を含む PBS-T (0.1% Tween 20 を含む PBS))中に浸して室温で 1 時間振盪した。AW で 2 回洗浄した後、aralin 溶液(2.0 μg/ml)を室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 10 分間の振盪洗浄を 3 回行った後、一次抗体として抗 aralin IgG 抗体(PBS-T で 100,000 倍希釈)と 4°C で一晩反応させた。PBS-T で 10 分間の振盪洗浄を 3 回行った後、二次抗体としてペルオキシターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (PBS-T で 2,000 倍希釈)を室温で一時間反応させた。PBS-T で 10 分間の振盪洗浄を 3 回行った後、PBS で 10 分間の振盪洗

浄を行い、Immobilon Western (Millipore)を用いた化学発光検出を行った。

また、検出された 110-kDa バンドを同定するため、LC/MS 解析を北里大学 薬学部 生化学教室 飯田直幸博士、柴垣芳夫博士、服部成介博士のご協力のもと行った。

10. Filipin 染色

8 穴 Lab-Tek II Chamber Slide (Nalge Nunc International)で培養した細胞を各濃度の MβCD 処理後 PBS で洗浄した。4°C で 15 分 1% (w/v) グルタルアルデヒドで固定した。PBS で洗浄後 50 μg/ml filipin III (Sigma)を室温で 30 分反応させ、再度 PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

11. Aralin の抗腫瘍性の解析

11-1. 皮下移植用の細胞懸濁液の調製

HeLa 細胞懸濁液を細胞カウント後、4°C 1200 rpm 3 分間遠心した。上清を除去し再び PBS(-)で再懸濁し 4°C 1200 rpm 3 分間遠心した。そして上清を除去後、PBS とマトリゲル(3 : 1)で再懸濁した。23G の注射針で細胞懸濁液を注意深く吸い上げた。なお、この際の細胞懸濁液の量はヌードマウス一匹あたりに、 1×10^6 cells/0.2 ml になるように調製し皮下移植した。

11-2. タラの芽粗抽出液の精製と投与方法

植物体のタラの芽 1 g に対して 1 ml の PBS(-)を加え乳鉢によりすりつぶした。4°C 100,00 rpm で 5 分間遠心後、その上清を回収した。また、その上清中の aralin 濃度を調べるために、aralin 抗体を用いた WB により、aralin 濃度を決定した。ヌードマウス 20 g に対して(aralin 2 μg 含有)のタラの芽粗抽出液をゾンデにより経口投与した。また、投与期間としては 5 日間経口投与後、2 日間は投与しないという周期で 3 週間行った。また、VC、HBP1、shC および sh2 を皮下移植したマウスでは、腫瘍が約 100-150 mm³になってからタラの芽粗抽出液 (aralin 1 μg 含有)を 19 日間、その後、タラの芽粗抽出液 (aralin 2 μg 含有)を 7 日間、さらにタラの芽粗抽出液(aralin 3 μg 含有)を 7 日間経口投与した。また、すべての投与方法においてコントロールとして PBS(-)を用いた。腫瘍体積は $0.52 \times (\text{短軸}^2 \times \text{長軸})$ として算出した。これらのデータは

動物数の平均値±標準偏差で示し、有意差検定は student's *t*-test を用いて行った。

ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu)は Clea Japan (Tokyo, Japan)から購入した。マウスの取り扱いは National Institutes of Health のガイドラインに従った。実験計画は、Institutional Animal Care and Use Committee と東京理科大学動物実験委員会の承認を得た。

III 結果

1 Aralin の細胞侵入メカニズム

以前の研究で、aralin 低感受性のヒト胎児肺由来二倍体繊維芽細胞 WI-38 および aralin 高感受性の WI-38 を形質転換した VA-13 細胞およびヒト扁平上皮細胞癌 SCC25 を用いた細胞表面との結合解析において、WI-38 細胞と比較して VA-13 細胞および SCC25 細胞により強く結合することが明らかとなった[8, 16]。本研究では、Cy3-aralin を使い HeLa 細胞における aralin の細胞表面受容体を解析した (Fig.5A)。HeLa 細胞に 3.2 nM Cy3-aralin を 4°C、15 分処理したところ、Cy3-aralin は細胞表面で結合を示したが Cy3-BSA では結合は見られなかった。この結合は 10 倍の aralin の添加によって阻害された。また Type II RIP の ricin は細胞毒性を発揮する際、レクチンである B 鎖が標的細胞表面にあるガラクトース含有糖鎖に結合することやマンノースレセプターに結合することが報告されている[29]。これにより、aralin も標的細胞表面の糖鎖と結合することが予測される。そこで、各糖を添加し解析を行った結果、5 mM マンノースを除く 5 mM ガラクトース、ラクトースとフコースで aralin の結合が阻害された (Fig. 5A)。これは、糖の添加によって aralin の細胞障害活性が阻害されるという以前の研究と一致している[16]。また、その結合はガラクトース濃度依存的に結合が抑制されることが示唆されている[8, 16]。以上より、aralin は細胞膜に存在するガラクトースを含む糖鎖を持つ受容体を認識して結合する可能性が示された。

Ricin は細胞膜上の糖鎖に結合後ゴルジ体や小胞体を介してエンドサイトーシスへ輸送されることが知られている[4,5]。Aralin もまた ricin と同様の機構が考えられるのでこれに基づき解析を行った。次に、aralin の細胞侵入が受容体によって媒介されるか明らかにするために、SCC-25 細胞に 4°C 120 分 TAMRA-aralin を処理した。15 分後の TAMRA-aralin は細胞表面上で観察され、120 分後では細胞表面の aralin は細胞質内への拡散に伴って減少した (Fig. 5B)。Aralin の細胞内局在を解析するために、ゴルジ体と小胞体-ゴルジ体中間コンパートメント(ERGIC)-53 と小胞体を BODIPY TR ceramide (Molecular Probes, Eugene, OR) と anti-ERGIC-53-Cy3TM (Sigma-Aldrich) と pEF/myc/ER/GFP 発現ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) をそれぞれ用いて Cy5-aralin と共に可視化した (Fig. 5C)。これらの結果は、aralin がゴルジ体、ERGIC-53、小胞体に局在することを示した。Cy5-aralin の量はゴルジ体

>ERGIC-53>ER であり、aralin が他の type II RIP のように細胞膜受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞へ取り込まれ細胞基質へ拡散する可能性が示唆された。

2 プロセッシングされた 110kDa HDLBP は aralin 受容体として作用する

Aralin の癌細胞選択性は、aralin の細胞膜への結合能の違いによることから、細胞膜に存在する aralin 受容体の同定を試みた。まず、HeLa 細胞の細胞質および膜分画を Aralin、anti-aralin 抗体を用いた Far Western blot (FWB) 解析により aralin 受容体の検出を行った。その結果、膜分画において 110-kDa のタンパク質に強く結合し、その結合は 5 mM のラクトース存在下で減少することが明らかとなった (Fig. 6-1A)。この 110-kDa のタンパク質を同定するために LC/ESI/MS 解析を行った。得られたペプチド配列 (SNLIRIEGDPQVQAK および EALIQLDNDNVVEDSMLVDPK) から 110-kDa のタンパク質は、High density lipoprotein binding protein (HDLBP) であることが推定された。なお、これらのペプチド配列 (SNLIRIEGDPQVQAK および EALIQLDNDNVVEDSMLVDPK) は、それぞれ HDLBP の 478-488、791-810 アミノ酸配列と一致していた。

次に、細胞内の HDLBP の発現を調べるため、HeLa 細胞の核、細胞質、CHAPS 可溶性、CHAPS 不溶性膜分画を調製し anti-HDLBP 抗体を用いた WB により解析した。150-kDa HDLBP の発現レベルは細胞質分画中において高く、110-kDa の HDLBP は、細胞質と CHAPS 不溶性膜分画(脂質ラフト)で検出された (Fig. 6-1B)。さらに、anti-aralin 抗体を用いた FWB 解析により、脂質ラフトに存在する 110-kDa HDLBP と結合することが明らかとなった。脂質ラフトはコレステロールやスフィンゴリン脂質、ganglioside などに富むマイクロドメインである [30,31]。界面活性剤不溶性の分画にコレステロールやスフィンゴ脂質、GPI アンカータンパク質が検出されたことから、本研究でも CHAPS 不溶性の分画を脂質ラフトと定義している。

脂質ラフト内の 110-kDa の HDLBP の存在を確認するため、HeLa 細胞を M β CD で処理した。Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) はコレステロールに特異的に結合することで脂質ラフトを破壊するので脂質ラフトを解析する上で有用な手段である [32,33]。

細胞膜からのコレステロールの除去度合を filipin 染色によって検討した。蛍光ポリエン抗生物質「filipin」はコレステロールと特異的に結合して蛍光を発することからコレステロールのプロープとして使用されている [32,34]。Fig. 6-2A で示すように、

filipin で検出された膜コレステロールは、未処理と比較すると 2.5 mM および 5 mM の M β CD の存在下でそれぞれ 10%、5%まで減少した。次に HeLa 細胞を M β CD (2.5, 5 mM)で処理した後、脂質ラフトにおける 110-kDa HDLBP の発現レベルが低下するかどうかを WB で解析した。M β CD 処理後、CHAPS 可溶性分画で検出された 110-kDa HDLBP はごくわずかであり未処理と変化がないのに対し、脂質ラフトにおいては未処理と比較して M β CD 濃度依存的にそれぞれ 40,60%まで減少した (Fig. 6-2B)。さらに、M β CD 処理により aralin の細胞毒性に影響を与えるかどうか調べたところ、aralin が M β CD の濃度依存的に阻害されることが明らかとなった (Fig. 6-2C)。以上のことより、aralin と結合する 110-kDa HDLBP は脂質ラフトに存在することが明らかとなった。

110-kDa HDLBP の発現レベルが aralin 感受性を決定するかどうかを調べるために、Cy3-aralin を使いヒト正常細胞 Hs68、および HeLa ,HepG2, Huh7 における 110kDa HDLBP の発現レベルを解析した。HeLa 細胞の細胞表面に Cy3-aralin が強く結合し、Huh7 細胞や Hs68 細胞では結合はほとんど検出されなかった。HepG2 ではこれらの中間くらいの Cy3 を観察した (Fig. 6-3A)。これらの細胞の脂質ラフトにおける 110-kDa HDLBP の発現レベルを FWB によって解析した。Cy3-aralin 実験と一致し、これらの細胞で aralin と結合する 110-kDa HDLBP の発現レベルは HeLa>HepG2>Huh7 = Hs68 であった (Fig. 6-3B)。

これらの細胞への aralin の細胞毒性効果を調べた。HeLa, HepG2, Huh7, Hs68 細胞の IC₅₀ 値はそれぞれ 19.3, 36.4, > 1,000 および 902.5 ng/ml であった (Fig. 6-3C, D)。これらのことより、aralin 受容体は 110-kDa HDLBP であり、その発現レベルが aralin 感受性を決定することが示唆された。

3 HeLa 細胞における HDLBP の機能獲得および機能損失解析

Aralin の選択的細胞毒性における 110-kDa HDLBP の機能を解析するために、HeLa 細胞から 150-kDa HDLBP を過剰発現する細胞株 HBP1,HBP2 を樹立した。コントロール細胞として空ベクターを導入した VC 細胞株も同時に樹立した。それぞれの 150-kDa HDLBP の発現量を解析したところ、HBP1/2 細胞で VC 細胞の 1.4 倍増加しているにも関わらず Cy3-aralin の細胞表面への結合レベルは同程度であった (Fig. 7-1A)。予想通り、FWB によって検出した HBP1/2 細胞の脂質ラフトでの 110-kDa

HDLBP の発現レベルは変化しなかった (Fig. 7-1B)。これらの細胞(HBP1/2, VC)に対する aralin の細胞毒性効果を解析したところ、それぞれ 12.5、12.9、19.2 ng/ml と同様の IC₅₀ 値が得られた (Fig. 7-1C)。これらより、150-kDa HDLBP の強制発現は 110-kDaHDLBP の直接的な増加を誘導しないことを示す。次に、HDLBP 発現抑制細胞株 sh1,sh2 を樹立し、コントロール細胞として shC も同時に樹立した。HDLBP 発現抑制細胞株 sh1 および sh2 細胞では細胞表面への aralin の結合レベルが shC 細胞と比較して有意に減少した。WB および FWB によって検出された sh1 および sh2 細胞の脂質ラフトにおける 110-kDa HDLBP の発現レベルは、それぞれ shC 細胞の 40%と 20%に減少した (Fig. 7-2A, B)。110-kDa HDLBP の減少の結果として、sh1 と sh2 細胞の感受性は shC と比較すると 3/8 倍と 1/6 倍に低下した (Fig. 7-2C)。

4 Huh7 細胞における HDLBP 機能獲得解析

110-kDa HDLBP の発現レベルが低く aralin への高い抵抗性を持つ Huh7 細胞を使って、150-kDa および 110-kDa HDLBP の異所性発現による aralin 感受性に対する作用を解析した。まず、最初に Huh7 細胞から 150-kDa HDLBP を過剰発現する細胞株 HBP1、HBP2 を樹立した。150-kDa HDLBP HBP1/2 細胞の発現レベルは VC 細胞よりも 1.6 倍高かったにもかかわらず、これらの細胞の Cy3-aralin 結合レベルは VC 細胞と同程度であった (Fig. 8-1A, B)。HBP1/2 の IC₅₀ 値は HeLa 細胞 (Fig. 7-1C) で行ったように VC 細胞と同じであった (Fig. 8-1C)。

150-kDa HDLBP から 110-kDa 形成へのプロセッシングメカニズムは未だ知られていない。初めに、プロセッシング中に除去される部分を明確にするために、N 末端 (EGFP-HDLBP) および C 末端 (HDLBP-EGFP) の発現ベクターでの EGFP タグをつけた 150-kDa HDLBP を構築した。これらのベクターを COS7 細胞に導入し 48 時間後細胞ライセートを anti-GFP 抗体と anti-HDLBP 抗体を用いた WB により解析した。その結果、両方の融合タンパク質は 176-kDa タンパク質として発現していた。110-kDa HDLBP は 136-kDa EGFP タグ付きのプロセッシングフォームとして観察され、HDLBP-EGFP で発現し EGFP-HDLBP ではあまり発現していなかった (Fig. 8-2)。これらのデータから、N 末端領域は 150-kDa HDLBP のプロセッシング段階で除去されることを示している。そこで 110-kDa HDLBP (Met475-Arg1268) 発現ベクターを構築し aralin 抵抗性の Huh7 細胞へ導入した。次に aralin の細胞表面への結合を調べ

た結果、Huh7由来 110-kDa HBP2細胞はVC細胞より強く結合することから機能的 aralin 受容体を保有していた (Fig. 8-3A)。WB および FWB によって解析したこのトランスフェクタント細胞における 110-kDa HDLBP の発現レベルは VC 細胞と比較して高かった (Fig. 8-3B)。予想されたとおり、110-kDa HBP2 トランスフェクト細胞は aralin 感受性を獲得しその IC₅₀ は 166 ng/ml であり 6 倍以上の高感受性を示した (Fig. 8-3C)。従って、機能獲得および機能損失解析もまた 110-kDa HDLBP が aralin 受容体であり、この発現レベルが aralin 感受性を決定するということが明らかに示した。

5 Aralin 経口投与された aralin は HDLBP を介して腫瘍形成を抑制する

In vivo での aralin の抗癌活性を評価するため、ヌードマウスの側腹部中に HeLa 細胞を皮下移植した。タラの芽は早春に好んで食べられ、その根皮は抗関節炎や抗糖尿病作用などの治療や強精を目的とした民間薬として広く使用されている。また、タンパク質毒素 ricin、Shiga toxin は経口投与によって強く毒性を発揮することが知られている [50]。Aralin もまた経口投与によって作用を与えることが考えられるため、本研究では経口投与による抗癌活性を検討した。皮下移植 24 時間後、aralin 2 µg (100 µg/kg 相当)/ 150 µl PBS/animal を含むタラの芽粗抽出物を週 5 日 3 週間経口投与した。三週間後、腫瘍体積を測定した。PBS を投与したコントロール群と比較して Aralin の経口投与群は、HeLa 細胞の腫瘍形成を有意に抑制し、これは *in vitro* と同様であった (Fig. 9-1A, B)。

このシステムを使って、HeLa トランスフェクタントの腫瘍形成への aralin の抑制効果を解析した。播種した細胞が明白な腫瘍(100-150 mm³)に発達してから、aralin 1 µg を 19 日間、2 µg を 7 日間、3 µg を 7 日間経口投与した。約 70 日後、aralin 処理した VC 由来の腫瘍体積は PBS 投与したコントロールと比較すると 60%減少が認められた。一方で aralin 処理した HBP1 由来の腫瘍体積はコントロールの 43%減少していた (Fig. 9-2Aa/b, Ba/b, Ca)。VC と HBP1 細胞より発生した腫瘍の 110-kDa HDLBP の発現レベルを anti-HDLBP 抗体を用いた WB により解析した。その結果、VC 由来の腫瘍と比較して HBP 由来の腫瘍では 110-kDa HDLBP が外来性の 150-kDa HDLBP からより積極的にプロセッシングされており (Fig. 9-3A)、150-kDa HDLBP から 110-kDa HDLBP へのプロセッシングは様々な生理的条件により制御されていることを示した。しかしながら、これらの傾向は統計的に有意ではなかった。また、sh2 由

来の腫瘍は aralin に対する高い抵抗性を示し、*in vitro*と同様の結果であった。一方で shC 細胞の抑制の割合は、PBS 投与群の 65%であった (Fig. 9-2Ac/d, Bc/d)。さらに、sh2 細胞の腫瘍形成は他のトランスフェクタントの腫瘍よりも著しく小さく (Fig. 9-2Ad, Cb)、*in vivo*において HDLBP が腫瘍の成長に必要であることを意味する強く示唆している。また、aralin の経口投与によって体重減少や腸の炎症などが観察されなかったことから、aralin は体重減少による腫瘍抑制ではないことや経口投与による副作用が少ないことが示された。次に、経口投与された aralin が腫瘍に実際に到達したかどうか調べるために、VC と HBP1 由来腫瘍を 3 μ g aralin を処理した後 anti-aralin 抗体を用いた WB によって解析した。その結果、aralin の A 鎖と B 鎖が検出され (Fig. 9-3B)、経口投与された aralin は消化管で吸収されたのち血管系を介して腫瘍に到達することが明らかとなった。

IV 考察

本研究では、gain-of-function と loss-of function 解析に基づいて、プロセッシングされた 110-kDa HDLBP が脂質ラフトにおいて aralin 受容体として機能し、*in vivo* での HeLa 細胞の腫瘍形成を抑制することを明らかにした。まず始めに、Cy5-aralin が 110-kDa HDLBP に結合し、SCC25 細胞に取り込まれゴルジ体、小胞体-ゴルジ体中間コンパートメント、小胞体へと移行することから、110-kDa HDLBP のエンドサイトーシスを介した RIP の細胞内へ侵入することが明らかになった。エンドサイトーシスはクラスリン依存性経路とクラスリン非依存性経路によって生じる[35]。クラスリン非依存性経路には、macropinocytosis、caveolae、lipid raft/membrane microdomain などがあり[36]、ricin はクラスリン依存性および非依存性エンドサイトーシスによって取り込まれる。Aralin は受容体である 110-kDa HDLBP が脂質ラフトに存在することや MβCD 処理によりコレステロールを枯渇させ脂質ラフトを破壊した時に aralin の細胞毒性が低下することからもクラスリン非依存性エンドサイトーシスによって取り込まれていると考えられる。コレステロールプローブとして知られる filipin は、caveolae/lipid raft を介したエンドサイトーシスの阻害剤としても知られているので[37,38]、filipin や RNA 干渉法を用いて aralin のエンドサイトーシスによる細胞内への取り込み機能の理解を深めることが出来ると考えられる。

次に、HeLa 細胞での HDLBP の発現レベルを解析したところ、110-kDa HDLBP が細胞質と脂質ラフトで発現していることが明らかとなった。しかし、FWB 解析により aralin と結合する 110-kDa HDLBP は脂質ラフトでのみ結合することが示された (Fig. 6-1B)。これは、150-kDa HDLBP のプロセッシングの過程で N 末端領域が切断され出現するものと思われる。本研究で用いた HDLBP 抗体の認識部位は 770-800 アミノ酸領域であり、C 末端側を認識する抗体を用いた場合、110-kDa HDLBP は脂質ラフトにのみ強い発現が検出された。これらのことより、細胞質で見られた 110-kDa HDLBP は C 末端側にプロセッシングを受けた 110-kDa HDLBP であり、脂質ラフトでは N 末端側にプロセッシングを受け 110-kDa HDLBP になったことが推察される。Aralin の受容体として機能する 110-kDa HDLBP は N 末端側がプロセッシングにより除去された 110-kDa HDLBP であり、aralin の結合には C 末端側領域が必要であることを示している。さらに、HDLBP が膜に配位するために GPI アンカーと結合してい

る可能性が考えられる。GPI アンカータンパク質は、タンパク質の C 末端領域と結合するため C 末端領域が必要である[49]。今後、N-グリコシド結合分解酵素処理によって HDLBP の分子量が減少するか、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (GPI-PLC)により減弱するかなどを解析することにより HDLBP が GPI アンカー型タンパク質であるかを明らかにすることが出来るものと思われる。

HDLBP は 150-kDa 糖タンパク質でプロセッシングにより(105-110-kDa)を生じ、HDL 受容体として機能するために細胞膜へと移動することが知られているが、詳細なプロセッシングメカニズムは未だ明らかとなっていない[17,18,19]。HDLBP mRNA とタンパク質の発現レベルはコレステロール過剰な細胞において亢進し[17,18,21]、HDLBP は ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)と共同して細胞から HDL を介しコレステロールを除去する役割を果たすことが示されている。急速に分裂する癌細胞におけるコレステロールは癌細胞の増殖と悪性化において不可欠であり[21]、乳癌や結腸直腸癌において K568N および D939V などの HDLBP 遺伝子の高い変異頻度が報告されている[24]。さらに Human CD36 and LIMP II analogous-1 (CLA-1)、B タイプクラスのスカベンジャー受容体は AP-1 転写因子の活性を介して増殖と HDL の抗アポトーシス機能を誘導することから癌細胞の増殖や悪性に強く関与していると考えられている[39,40]。

Ricin は経口投与により小腸などにおいて重篤な症状が見られることから、経口投与によって強い毒性を発揮することが知られている。Ricin のレクチン活性が小腸への吸収に重要な役割を果たすと考えられている[50]。Ricin は経口投与により強い細胞毒性を発揮し死に至らしめるが、本研究により aralin の経口投与はマウスの体重減少を伴わず腫瘍形成を抑制し小腸への炎症も見られなかった。これは aralin の B 鎖のレクチン活性が ricin とは異なり、aralin が高い癌細胞選択性を有することによるものと考えられる。今後、aralin の経口投与後に肝臓や小腸に aralin がどの程度蓄積しているか、また aralin の全アミノ酸配列を明らかにすることで経口投与によるレクチン活性が与える詳細な作用を明らかにすることができると考えられる。

本研究で、HeLa 細胞での 150-kDa HDLBP mRNA の強制発現(HBP1 と HBP2)は、*in vitro* で脂質ラフトにおける 110-kDa HDLBP の発現レベルと aralin 感受性に影響を与えなかったが、ヌードマウスにおける HBP1 細胞の腫瘍形成は、空ベクター(VC)と比較して aralin 粗抽出物を経口投与することによってより効果的に抑制されること

が明らかとなった。一方では、HDLBP 抑制発現 HeLa 細胞(sh1 と sh2)では、*in vitro* において脂質ラフトにおける 110-kDa HDLBP の発現が減少し aralin に高い抵抗性を示し、さらに *in vivo* においても sh2 細胞の腫瘍形成もまた aralin に対して高い抵抗性を示した。加えて、sh2 細胞による腫瘍形成は aralin の経口投与なしでも空ベクター-shC 細胞よりも顕著に小さかったことから 110-kDa HDLBP が腫瘍形成に必須であることを明示している。また、肝細胞癌(HCC)において vigilin が過剰に発現していることや本研究と同様に肝細胞癌の vigilin (150-kDa HDLBP)をノックダウンした場合、細胞増殖や腫瘍形成能が低下したという報告[41]からも HDLBP/vigilin が腫瘍形成に関与していることが考えられる。興味深いことに乳癌細胞で vigilin によって癌原遺伝子 *c-fms* 発現の抑制に関係するという報告もあり[42]、癌の種類やタイプによって機能が異なることが考えられる。

機能的 HDLBP への HDLBP のプロセッシング経路は、*in vivo* で生理学的条件によって制御されているのかもしれない[17,18,21,32,40]。それ故、HBP1 細胞の *in vitro* と *in vivo* における aralin 感受性の差は、おそらくプロセッシングの違いに起因すると考えられる。さらに、HDLBP の過剰発現による細胞質コレステロールの減少は、腫瘍細胞中の CLA-1 スカベンジャー受容体を介したコレステロールの過剰な取り込みを引き起こすことが可能である。あるいは、PKC が ApoA-I、HDL/HDLBP シグナル伝達経路の下流で活性化され、急速な細胞分裂を引き起こすことも可能であると考えられる[20]。一方、HDLBP の抑制発現では、PKC が ApoA-I、HDL/HDLBP シグナル伝達の下流で活性化されなかった可能性が考えられる。また、PKC は LDLR(low density lipoprotein receptor)の遺伝子発現を制御することから[51]、LDL を介したコレステロールの取り込みを抑制し腫瘍形成に影響を与えた可能性が考えられる。今後 *in vitro* での HDLBP ノックダウン細胞において HDL や apoA-I を介したシグナル伝達経路が抑制されているかどうか解析する必要がある。

脂質ラフトは細胞膜マイクロドメインであり、コレステロールとスフィンゴリン脂質、糖脂質であるガングリオシド(GM1)に富み、膜タンパク質や膜へと移行するタンパク質を集積することが知られている。脂質ラフトは、エンドサイトーシスやシグナル伝達、コレステロール輸送など多様なプロセスにおいて関与している[32,43,44]。これらの事実に基づいて、多発性骨髄腫における脂質ラフト標的療法が報告されている[45,46]。さらに、Jiao と Liu はカーゴ輸送エンドサイトーシス受容体または細胞シグ

ナル受容体として機能する低密度リポタンパク質受容体タンパク質-1(LRP1)は、絨毛癌細胞において type I RIP であるトリコサンチン(TCS)の受容体であると報告している[9]。この様に、コレステロール輸送システムは様々な RIP の受容体として機能しているものと思われる。

HeLa 細胞の場合では、110-kDa HDLBP の発現レベルが肝細胞癌 HepG2 および Huh7 細胞より高く aralin 高感受性であったが、逆に Huh7 細胞における発現レベルは低く、1000 ng/ml の aralin 存在下においても細胞死は観察されなかった。

以上の結果より、aralin の真の受容体がプロシングされた 110-kDa HDLBP であり、脂質ラフトにおいて発現する 110-kDa HDLBP が aralin 感受性を決定することが実証された。さらに、タラの芽は、我国において早春に好んで食べられている。またその根皮は、抗関節炎や抗糖尿病作用などの治療や強精を目的とした民間薬として広く使用されている[47]。これらのことより、aralin は副作用なしに 110-kDa HDLBP を過剰発現する腫瘍に対して経口投与が可能な抗癌剤と成り得る可能性が非常に高い。さらに、110-kDa HDLBP の発現レベルは腫瘍マーカーとして応用できるものと思われる。今後、生理的条件下での HDLBP の糖鎖修飾やプロセッシングメカニズムを明らかにすることで、癌細胞の浸潤・転移や再発などの悪性形質獲得過程における HDLBP の役割が解明で出来るものと思われる。

V 引用文献

- [1] 厚生労働省人口動態統計年報 主要統計表(平成 25 年)
- [2] N Iqbal, N Iqbal, Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract.* 2014 (2014) 9pages
- [3] F Ciardiello, G Tortora. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res.* 10(2001) 2958-2970.
- [4] M. Puri, I. Kaur, M.A. Perugini, R.C. Gupta, Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications, *Drug. Discov. Today* 17 (2012) 774-783.
- [5] K. Sandvig, B. van Deurs, Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives, *EMBO J.* 19 (2000) 5943-5950.
- [6] L.-N. Li, H.-D. Zhang, R. Zhi, S.-J. Yuan, Down-regulation of some miRNAs by degrading their precursors contributes to anti-cancer effect of mistletoe lectin-I, *Br. J. Pharmacol.* 162 (2011) 349-364.
- [7] B. Stechmann, S.-K. Bai, E. Gobbo, R. Lopez, G. Merer, S. Pinchard, L. Panigai, D. Tenza, G. Raposo, B. Beaumelle, D. Sauvaire, D. Gillet, L. Johannes, J. Barbier, Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge, *Cell* 141 (2010) 231-242.
- [8] 戸松誠 (2006) タラノキ由来新規 type2 RIP ファミリータンパク質 aralin に関する研究、平成 17 年度 博士学位論文 (東京理科大学大学院 基礎工学研究科)
- [9] Y. Jiao, W. Liu, Low density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for trichosanthin in 2 choriocarcinoma cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1597-1585.
- [10] R.J. Kreitman, Immunotoxins in cancer therapy, *Curr. Opin. Immunol.* 11 (1999) 570-578.
- [11] P. Schöffski, S. Riggert, P. Fumoleau, M. Campone, O. Bolte, S. Marreaud, D. Lacombe, B. Baron, M. Herold, H. Zwiierziana, K. Wilhelm-Oggunbiyi, H. Lentzen, C. Twelves, Phase I trial of intravenous aviscumin (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research

- and Treatment of Cancer New drug Development Group, *Annl. Oncol.* 15 (2004) 1816-1824.
- [12] J. Müthing, I. Meisen, B. Kniep, J. Haier, N. Senninger, U. Neuman, M. Langer, K. Witthohn, J. Milosević, J. Peter-Katalinić, Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc residues are receptors for the anticancer drug rViscumin, *FASEB J.* 19 (2005) 103-105.
- [13] U. Dister, J. Souady, M. Hülsewig, I. Drmić-Hofman, J. Haier, A. Denz, R. Grützmann, C. Pilarsky, N. Senninger, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, M.A. Schmidt, J. Peter-Katalinic, J. Müthing, Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2464-2475.
- [14] M. Tomatsu, M. Ohnishi-Kameyama, N. Shibamoto, Aralin, anew cytotoxic protein from *Aralia elata*, inducing apoptosis in human cancer cells, *Cancer Lett.* 199 (2003) 19-25.
- [15] M. Tomatsu, T. Mujin, N. Shibamoto, F. Tashiro, A. Ikuta, Production of aralin, a selective cyotoxic lectin against against human transformed cells, in callus culture of *Aralia elata*, *Planta med.* 70 (2004) 469-471.
- [16] M. Tomatsu, T. Kondo, T. Yoshikawa, T. Komeno, N. Adachi, Y. Kawasaki, A. Ikuta, F. Tashiro, An apoptotic inducer, aralin, is a novel type II ribosome-inactivating protein from *Aralia elata*, *Biol. Chem.* 385 (2004) 819-827.
- [17] D.L. Graham, J.F. Oram, Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membrances by ligand boltting, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 7439-7442.
- [18] G.L. Mcknight, J. Reasoner, T. Gilbert, K.O. Sundquist, B. Hokland, P.A. McKernan, J. Champagne, C.J. Johson, M.C. Bailey, R. Holly, P.J. O'Hara, J.F. Oram, Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding prorein that is up-regulated by cholesterol loading of cells, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12131-12141.

- [19] R.C. LeBoeuf, Y.-R. Xia, J.F. Oram, A.J. Lusis, Mapping of the gene for high density lipoprotein-binding protein (Hdlbp) to proximal mouse chromosome 1, *Genetics* 23 (1994) 296-298.
- [20] N.H. Fide, High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands, *J. Lipid Res.* 40 (1990) 187-201.
- [21] J.F. Oram, A.J. Mendez, J.P. Slotte, T.F. Johnson, High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts, *Arterioscler. Thromb.* 11 (1991) 403-414.
- [22] Y.J. Chen, J.C. Chen, J.L. Wu, Molecular cloning and functional analysis of zebrafish high-density lipoprotein-binding protein, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136 (2003) 117-130.
- [23] S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villén, J. Li, M.A. Cotn, L.C. Cantley, S.P. Gygi, Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 12130-12135.
- [24] T. Sjöblom, S. Jones, L.D. Wood, D.W. Parsons, J. Lin, T.D. Barber, D. Mandelker, R.J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S.D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J.K.V. Willson, A.F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B.H. Park, K.E. Bachman, The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers, *Science* 314 (2006) 268-274.
- [25] G Neu-Yilik, H Zorbas, TR Gloe, HM Raabe, TA Hopp-Christensen, PK Müller, Vigilin is a cytoplasmic protein. A study on its expression in primary cells and in established cell lines of different species. *Eur J Biochem.* 213(1993) 727-736
- [26] J Zhou, Q Wang, LL Chen, GG Carmichael, On the mechanism of induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin. *RNA.* 14(2008) 1773-1781.
- [27] C. Schmidt, B. Henkel, E. Poschl, H. Zorbas, W.G. Purschke, T.R. Gloe, P.K. Müller, Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domain, *Eur. J. Biochem.* 206 (1992)

625-634.

- [28] B. Henkel, C. Schmidt, E. Poschl, T.R. Gloe, W.G. Purschke, P.K. Muller, Chicken vigilin gene organization and expression pattern. The Domain structure of the protein is reflected by the exon structure, *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 321-328.
- [29] DL Newton, R Wales, PT Richardson, S Walbridge, SK Saxena, EJ Ackerman, LM Roberts, JM Lord, RJ Youle, Cell surface and intracellular functions for ricin galactose binding. *J Biol Chem.* 267(1992) 11917-11922.
- [30] DA Brown, JK Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell.*, 68 (1992) 533-544.
- [31] RG Anderson, K Jacobson, A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 296 (2002)1821-1285
- [32] T. Murai, Y. Maruyama, K. Mio, H. Nishiyama, M. Suga, C. Sato, Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppressed tumor cell migration, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 1999-2007.
- [33] S Ilangumaran, DC Hoessli, Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J.* 335 (1998) 433-440.
- [34] V. Matthews, B. Schuster, S. Schütze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, KJ. Kallen, S. Rose-John, Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem.* 278 (2003) 38829-38839
- [35] L. Johannes and C. Lamaze, Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic.* 3 (2002) 443-451.
- [36] SK. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B van Deurs, K. Sandvig, Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10(1999) 961-974.
- [37] PA Orlandi, PH Fishman, Filipin-dependent inhibition of cholera toxin:

- evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* vol. 141 (1998) 905-915
- [38] JE Schnitzer, P Oh, E Pinney, J Allard, Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol.* 127 (1994)1217-1232
- [39] D. Gospodarowicz, G.-M. Lui, R. Gonzalez, High-density lipoproteins and the proliferation of human tumor cells maintained on extracellular matrix-coated dishes and exposed to defined medium, *Cancer Res.* 42 (1982) 3704-3713.
- [40] W.M. Cao, K. Murano, H. Imachi, X. Yu, H. Abe, A. Yamauchi, M. Niimi, A. Miyauchi, N.C.W. Wong, T. Ishida, A mutant high-density lipoprotein receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 1515-1521.
- [41] WL Yang, L Wei, WQ Huang, R Li, WY Shen, JY Liu, JM Xu, B Li, Y Qin, Vigilin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and is required for HCC cell proliferation and tumor growth. *Oncol Rep.* 31 (2014) 2328-2334
- [42] HH Woo, X Yi, T Lamb, I Menzl, T Baker, DJ Shapiro, SK Chambers, Posttranscriptional suppression of proto-oncogene c-fms expression by vigilin in breast cancer, *Mol Cell Biol.* 31(2011):215-25
- [43] L.J. Pike, Lipid rafts: heterogeneity on the high seas, *Biochem. J.* 278 (2004) 281-292.
- [44] E Kiyokawa, T Baba, N Otsuka, A Makino, S Ohno, T Kobayashi, Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J Biol Chem.* 280(2005) 24072-24084
- [45] M.R. Freeman, D. Di Vizio, K.R. Solomon, The raft of the medusa: cholesterol targeting in cancer therapy, *Oncogene.* 29 (2010) 3745-3747.
- [46] F Mollinedo, J de la Iglesia-Vicente, C Gajate, A Estella-Hermoso de Mendoza, JA Villa-Pulgarin, MA Campanero, MJ Blanco-Prieto, Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma, *Oncogene.* 29(2010) 3748-3757
- [47] L.M. Perry, J. Metzger, Medical plants of East and Southeast Asia: Attributed

properties and uses, Massachusetts, MIT Press (1980), P4

- [48] 上代淑人監訳、ハーパー・生化学 原書 25 版 丸善株式会社、p315
- [49] C Galian, P Björkholm, N Bulleid, G von Heijne, Efficient glycosylphosphatidylinositol (GPI) modification of membrane proteins requires a C-terminal anchoring signal of marginal hydrophobicity. *J Biol Chem.* 287(2012) 16399-16409
- [50] M Ishiguro, Y Matori, S Tanabe, Y Kawase, I Sekine, R Sakakibara, Biochemical studies on oral toxicity of ricin. V. The role of lectin activity in the intestinal absorption of ricin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 40(1992) 1216-1220
- [51] JH Auwerx, A Chait, SS Deeb, Regulation of the low density lipoprotein receptor and hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase genes by protein kinase C and a putative negative regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(1989) 1133-1137.

VI 謝辞

本研究は、東京理科大学基礎工学生物工学科 田代文夫教授の懇切なご指導、ご鞭撻を承り遂行されたもので謹んで感謝申し上げます。また、本論文を執筆にするあたり貴重なご教示を賜りました村上康文教授、三浦成敏教授、十島二郎准教授、深井文雄教授に深く感謝申し上げます。

本研究に用いた aralin、抗 aralin 抗体およびタラの芽のご提供、ご指導いただきました秋田県総合食品研究所 戸松誠博士に深く感謝致します。また、LC/MS 解析にご協力いただいた北里大学薬学部生化学教室 飯田直幸博士、柴垣芳夫博士、服部成介博士に深くお礼申し上げます。さらに、本研究を行うにあたり、ご指導を賜りました秋山弘匡博士、川崎靖博士、ならびに多大なるご協力を頂きました米納孝氏、後藤良隆氏、小野孝英氏に心より感謝致します。

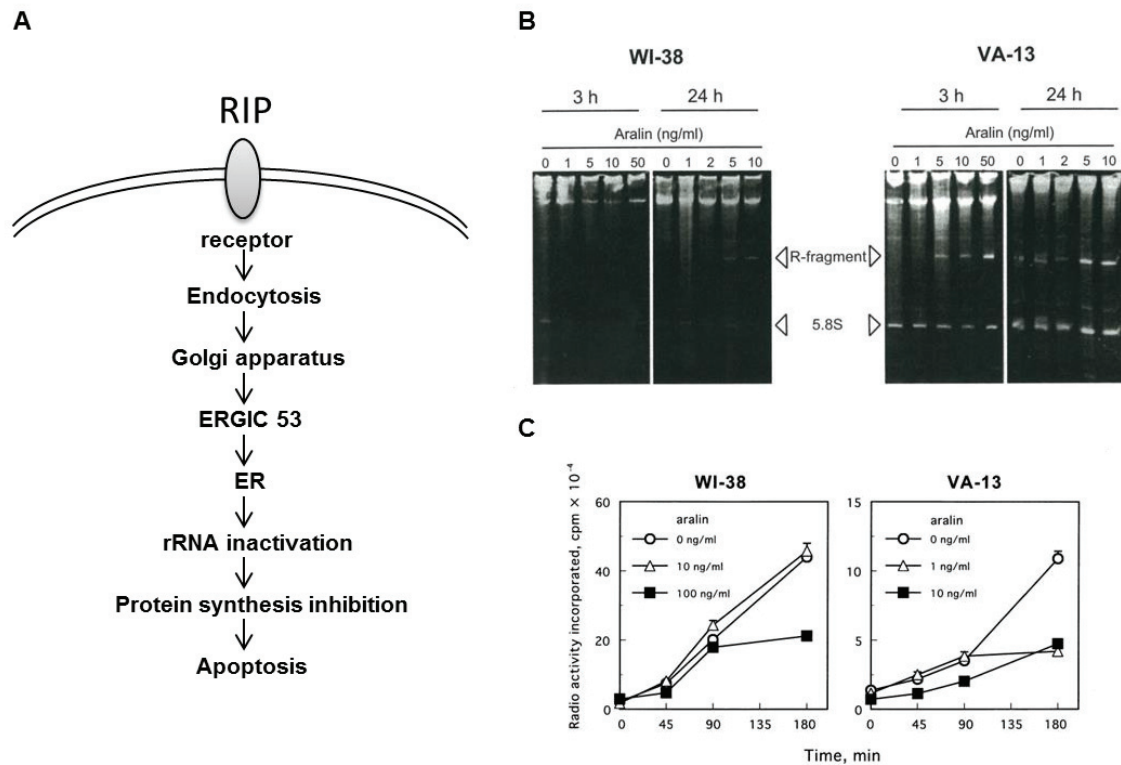


Fig. 1. RIP の毒性発現機構

(A) RIP の作用機構。(B) Aralin の RNA *N*-Glycosidase 活性(Whole cell 系)。WI-38 または VA-13 細胞と種々の濃度の aralin とを、3 または 24 時間反応させた後、各々の細胞から RNA を抽出した。RNA をアニリン処理し、生じた R-fragment を 7 M urea/5% PAGE にて分離検出した。(C) Aralin によるタンパク質合成阻害。WI-38、または VA-13 細胞を 24 時間培養後、培地を表記の aralin を含む Met および Cys-free の培地に交換した。表記の時間反応後、細胞を集め、タンパク質に取り込まれた放射能を測定した[8]。

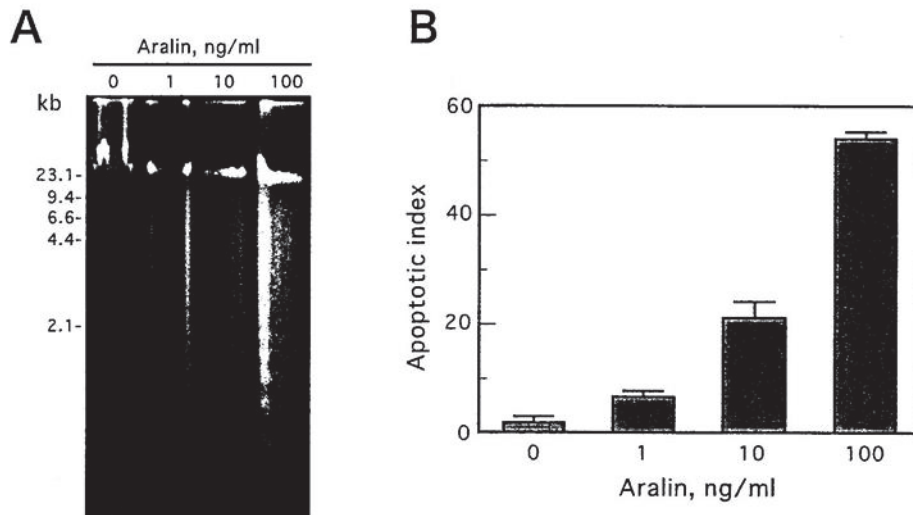


Fig. 2. Aralin によるアポトーシスの誘導

(A) HL-60 細胞での DNA ラダーの検出。培養系に種々濃度の aralin を添加し、24 時間後に細胞を回収した。各々から DNA を抽出して、1.5%アガロースゲル電気泳動で分析した。(B) VA-13 細胞での TUNEL 反応陽性率の測定。培養系に種々濃度の aralin を添加し、24 時間後に細胞を回収し、各々を固定、洗浄した。アポトーシスによって生じた DNA の 3'-OH 末端を TdT で FITC 標識し、抗 FITC-POD を結合させた後、DAB により発色させ、検出した。全細胞数に対する TUNEL 陽性細胞の割合を apoptotic index とし、平均値±標準偏差($n = 3$)であらわした[8]。



Fig. 3. Aralin と type II RIP (nigrin, ricin)の N 末端アミノ酸配列の比較

Aralin と一致したアミノ酸を*で示した。ホモロジーサーチでは、aralin A 鎖と Nigrin A 鎖 (25 残基中 7 残基 : 28%)、および aralin B 鎖と ricin B 鎖(25 残基中 13 残基 : 52%)が相同性を示した[8]。

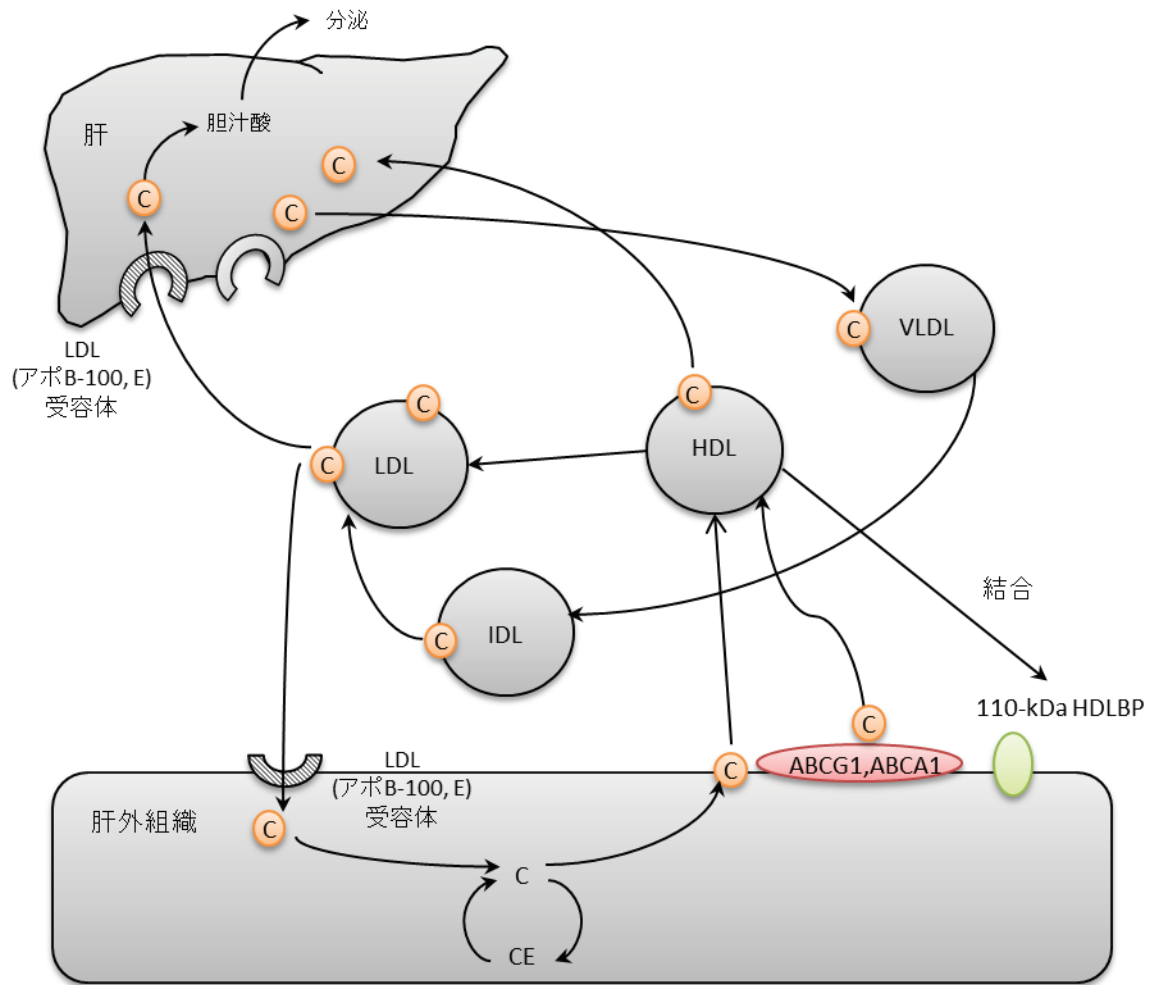


Fig. 4. ヒトにおける組織間のコレステロール輸送 [48]

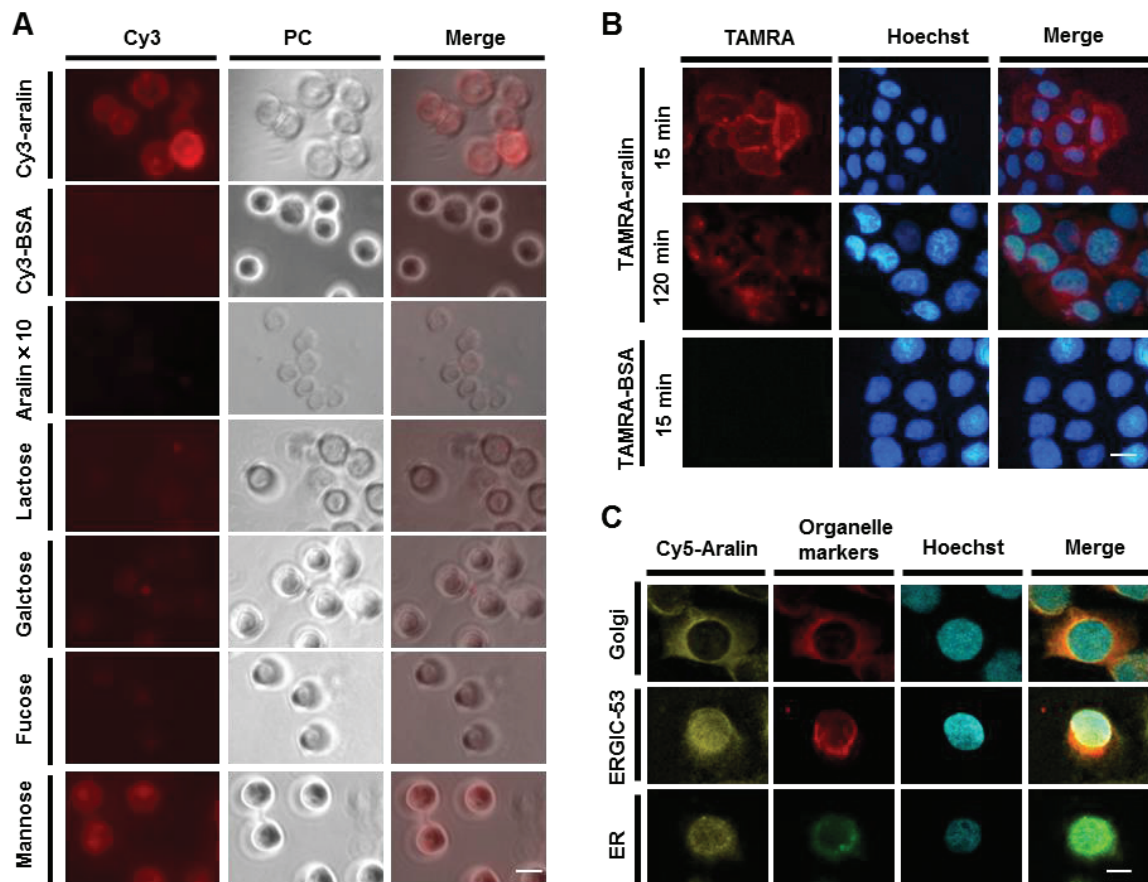


Fig. 5. Aralin の細胞侵入における細胞表面受容体

(A) HeLa 細胞に 3.2 nM Cy3-aralin と同時に 10 倍量の未標識 aralin、5 mM ラクトース、ガラクトース、フコース、マンノースを加え氷上で 15 分反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。Cy3 と明視野 (PC) を merge した。Cy3-BSA (3.2 nM) はネガティブコントロールとして使用した。(B) SCC-25 細胞に 3.2 nM TAMRA-aralin を氷上で 120 分間反応させ、核を Hoechst 33258 で染色した。(C) SCC-25 細胞におけるゴルジ体および小胞体-ゴルジ体中間コンパートメント-53、小胞体は Cy5-aralin と氷上で 45 分反応させ、それぞれ BODIPY TR ceramide、anti-ERGIC-53/p58-Cy3TM、pEF/myc/ER/GFP によって可視化した。Scale bar = 10 μ m.

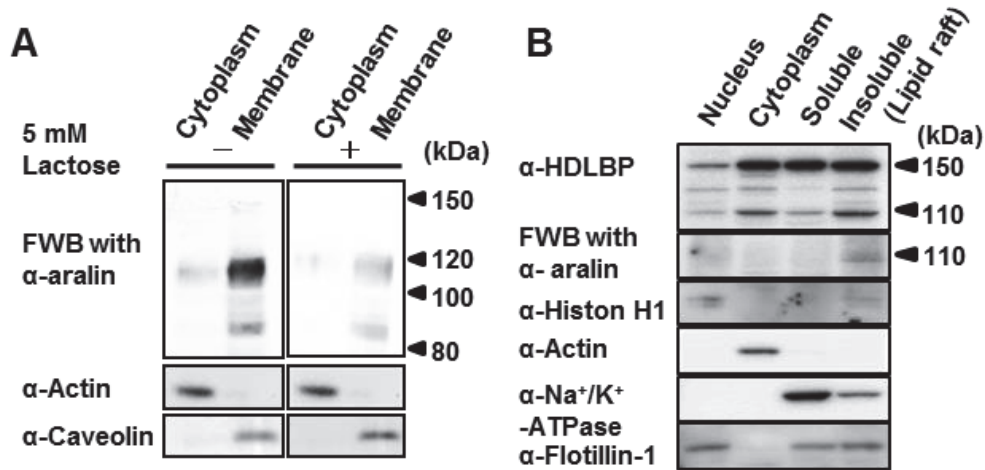


Fig. 6-1. 受容体の同定および HDLBP の局在

(A) HeLa 細胞から細胞質分画と膜分画を調製し、5 mM ラクトース存在下および非存在下で anti-aralin 抗体を用いた FWH により解析を行った。110-kDa バンドの氨基酸配列は LC/ESI/MS 解析によって決定した。(B) 110-kDa HDLBP の細胞内局在。核、細胞質、CHAPS-可溶性/不溶性(脂質ラフト)膜分画を WB および FWH により解析した。Actin、Histone H1、Na⁺/K⁺-ATPase と flotillin-1 の発現レベルを細胞分画マーカーとして対応する抗体を用いて WB によって解析した。

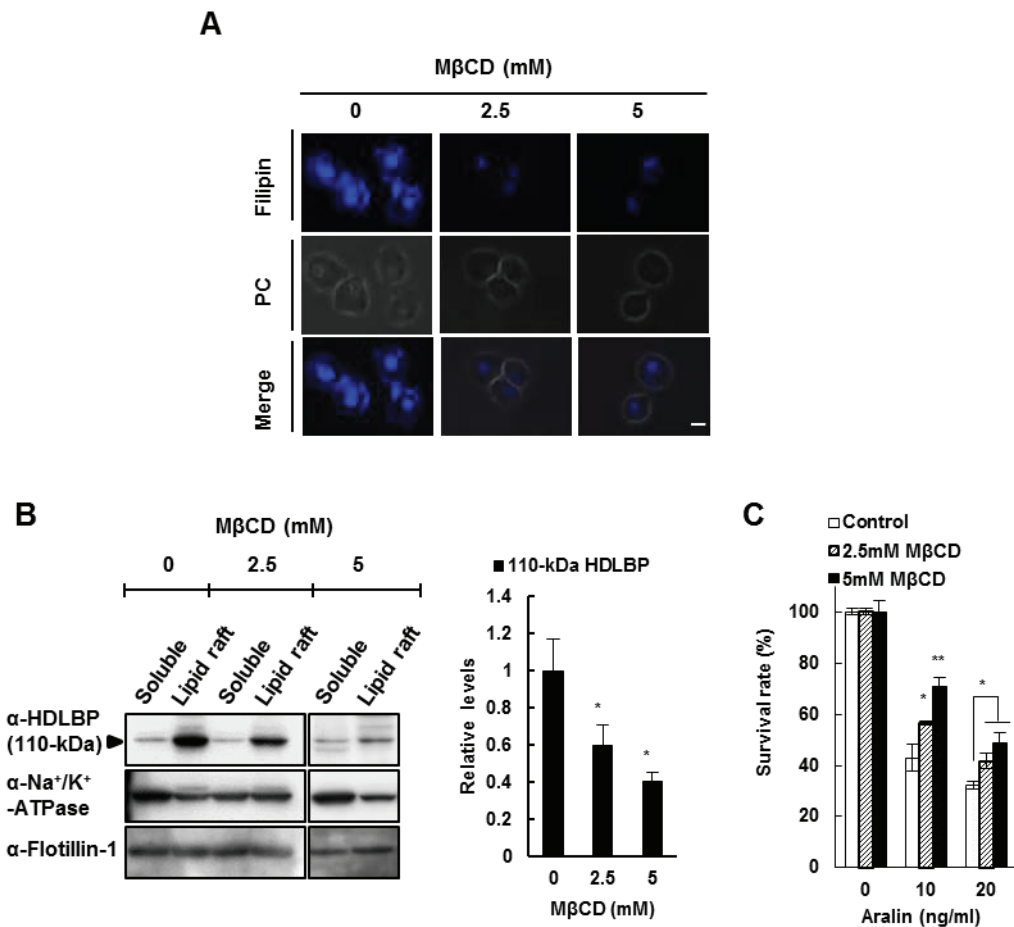


Fig. 6-2. 脂質ラフトにおける HDLBP の機能

(A, B) 脂質ラフトにおける 110-kDa HDLBP の発現を示す。HeLa 細胞に 2.5、5 mM M β CD を 37°C で 1 時間処理し脂質ラフトを破壊した。(A) その時の細胞の膜コレステロールを可視化するために、1%グルタルアルデヒドで固定し、50 μ g/ml の filipin で処理した。Scale bar = 10 μ m. (B) M β CD 処理した HeLa 細胞から CHAPS-可溶性膜/脂質ラフトを anti-HDLBP 抗体を用いて WB により解析した。(P < 0.02) コントロールと比較した(n = 3)。(C) 脂質ラフトの 110-kDa HDLBP の発現レベルは aralin に対する感受性を決定する>(*P < 0.03, **P < 0.005) コントロールと比較した (n = 3)。

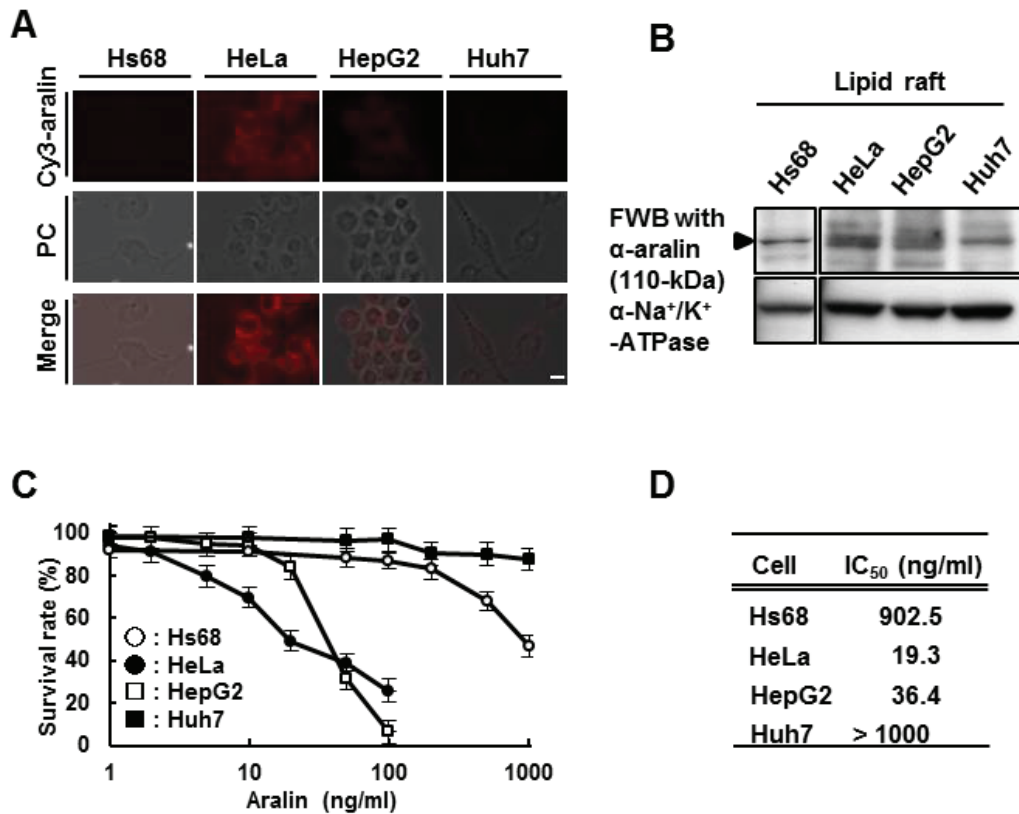


Fig. 6-3 諸種癌細胞の aralin 感受性

(A, B) 脂質ラフトの 110-kDa HDLBP の発現レベルは aralin に対する感受性を決定する。(A) Cy3-aralin による Hs68, HeLa, HepG2, Huh7 細胞における aralin 細胞表面受容体の検出。(B) これらの細胞の脂質ラフトにおける aralin 受容体の発現レベルを FWB によって解析した。(C, D) 癌細胞に対する aralin の細胞毒性効果。細胞を各濃度の aralin で 36 時間処理した。生存率は、トリパンプルー排除法 (C) および IC₅₀ 値 (D) を決定した。Scale bar = 10 μm.

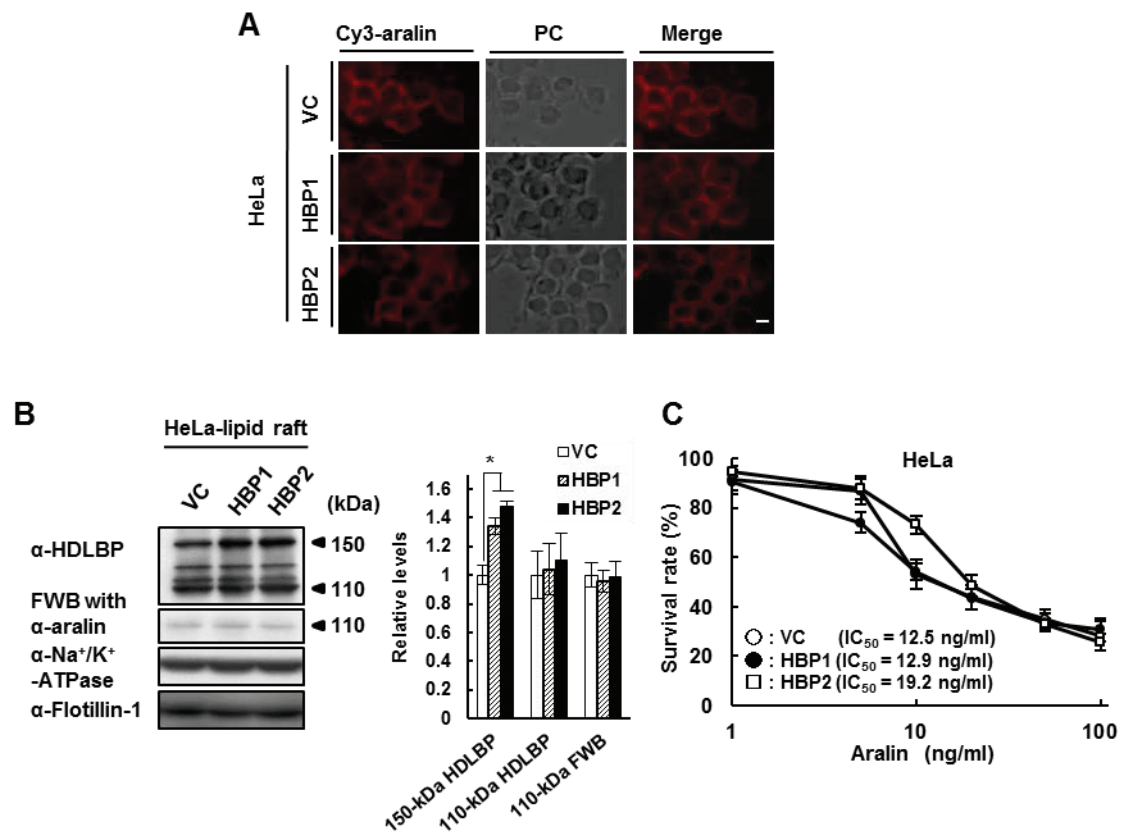


Fig. 7-1. *In vitro*でのHeLa細胞におけるHDLBP機能獲得解析

(A) aralin細胞膜受容体の解析。HeLa細胞に150-kDa HDLBPを過剰発現させたHBP1/2とVCにおけるaralin細胞膜受容体をCy3-aralinを氷上で15分反応させ可視化した。Scale bar = 10 μ m. (B) HBP1/2細胞におけるHDLBPの発現量。VCとHBP1/2細胞からの脂質ラフトをWBおよびFWB、定量化によって解析した。(P < 0.02) VC細胞と比較した(n = 3)。 (C) *In vitro*における150-kDa HDLBP過剰発現細胞株はaralin感受性に影響しない。VCおよびHBP1/2細胞をaralinで36時間処理した。AralinのIC₅₀値を算出し括弧内にて示した。

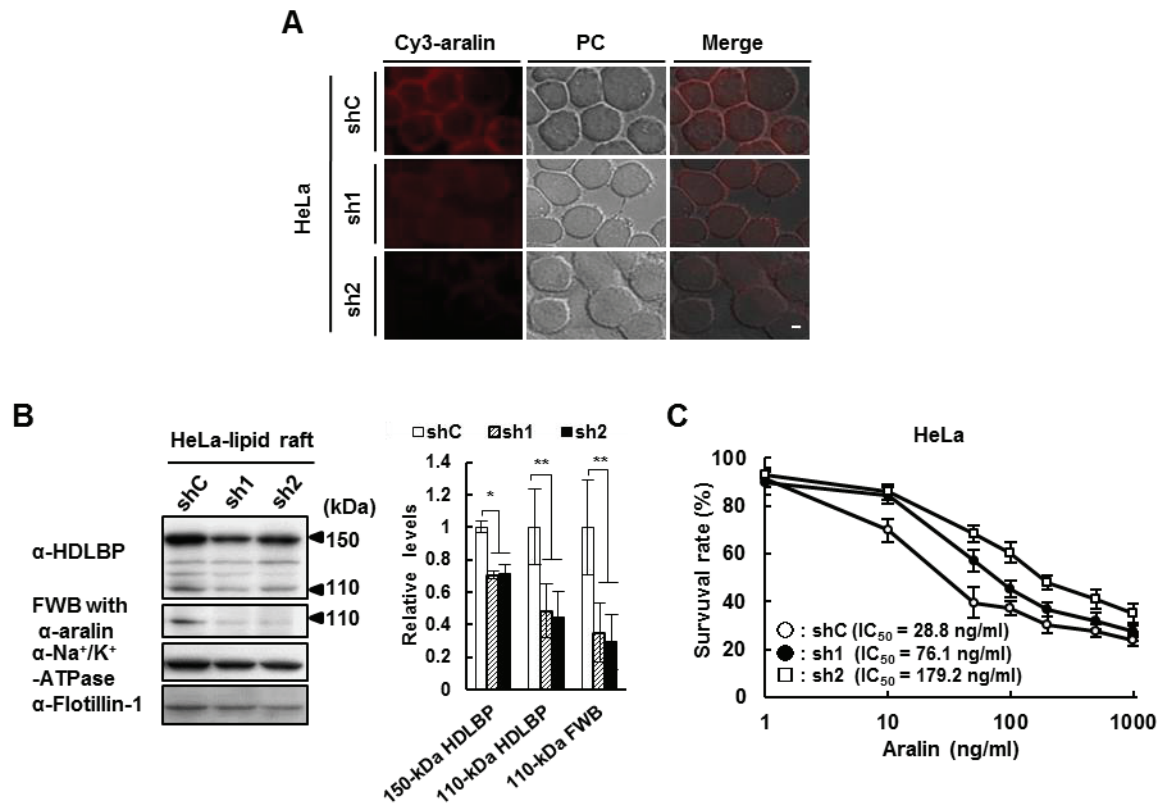


Fig. 7-2. *In vitro*での HeLa 細胞における HDLBP 機能損失解析

(A) HeLa 細胞に HDLBP ノックダウンさせた sh1/2 細胞と shC における aralin 細胞膜受容体を Cy3-aralin を氷上で 15 分反応させ可視化した。(B) sh1/2 における HDLBP の発現量。脂質ラフトを WB および FWB、定量化によって解析した。(* $P < 0.001$, ** $P < 0.05$) shC と比較した($n = 3$)。(C) shC と sh1/2 細胞を aralin で処理し、 IC_{50} 値を括弧内に示した。

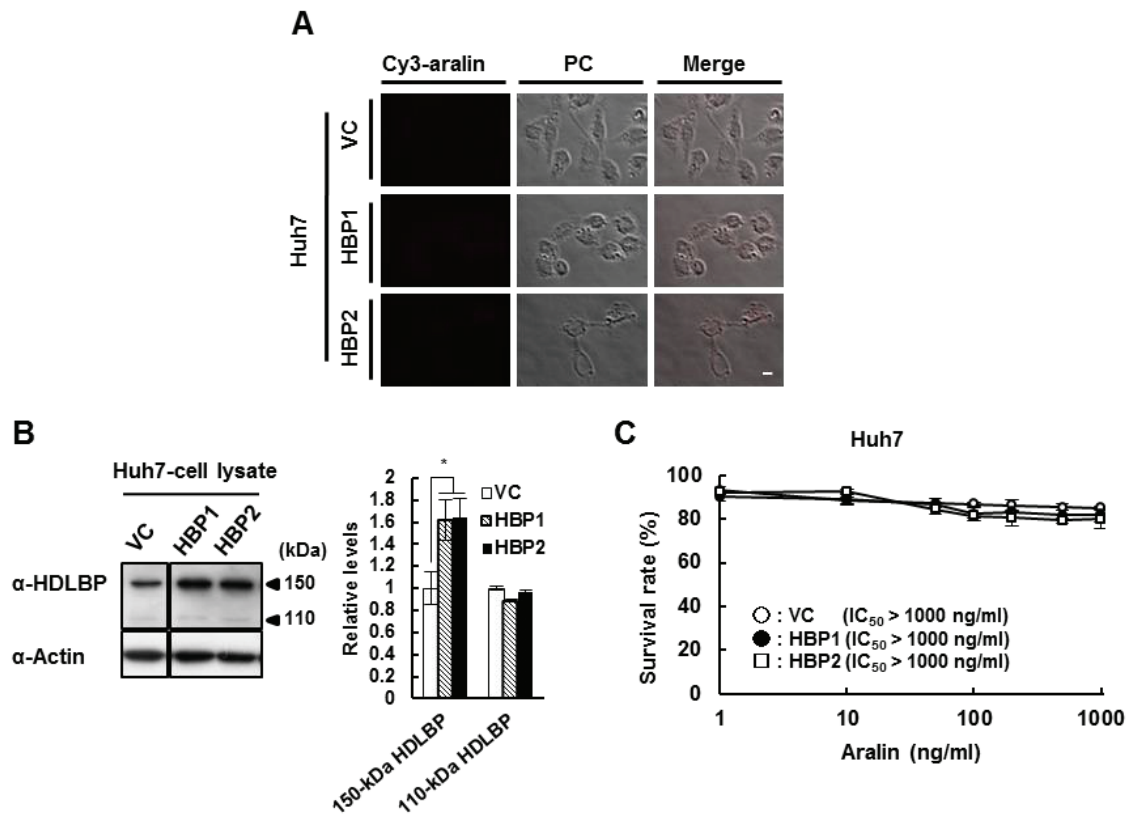
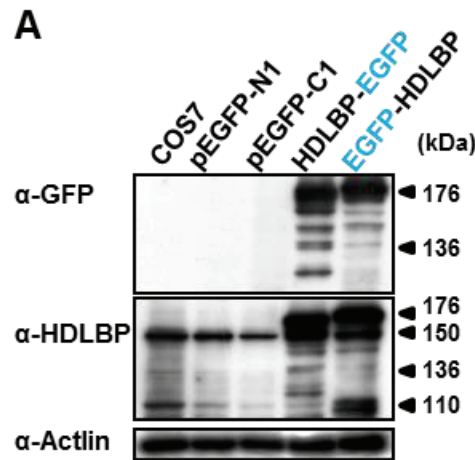


Fig. 8-1. Huh7 細胞の aralin 感受性に対する 150-kDa HDLBP の異所性発現の影響

(A) 150-kDa HDLBP を過剰発現する Huh7 HBP1/2 細胞の細胞膜上の aralin 受容体の分析は上記のように Cy3-aralin で行った。(B) Huh7 細胞における 150-kDa HDLBP の発現量は WB と定量化により解析した。(P < 0.05) VC 細胞と比較した (n = 3)。(C) Huh7 細胞における 150-kDa HDLBP の過剰発現は aralin 感受性に影響を及ぼさなかった。Aralin の IC₅₀ 値を算出し括弧内に示した。



B

This sequence may not contain a signal peptide

```

MSSVAVLTQESFAEHRSGLVPPQQIKVATLNSEESDPPTYKDAFPPLPEKAACLESAPAGAWGNKIRPIKASVITQVF 80
HVPLEERKYKDMNQFGEQEAKICLEIMQRTGAHLELSLAKDQGLSIMVSGKLDVAVMKARKDIVARLQTQASATVAIPKE 160
HHRFVIGKNGEKLQDLELKTATKIQIPRPDDPSNQIKITGTKEGIEKARHEVLLISAEQDKRAVERLEVEKAFHPFIAGP 240
YNRLVGEIMQETGTRINIPPPSVNRTEIVFTGEKEQLAQAVARIKKIYEKKKTTTIAVEVKKSQHKYVIGPKGNSLQE 320
ILERTGVSVEIPPSDSISETVILRGEPEKLGQALTEVYAKANSFTVSSVAAPSWLHRFIIIGKKGQNLAKITQQMPKVHIE 400
FTEGEDKITLEGPTEDVNVAQEIEGMVKDLINRMDYVEINIDHKFHRHLIGKSGANINRIKDQYKVSVRIPPD(*)SEKSNL 480
IRIEGDPQGVQQAKRELLEASRMENERTKDLIEQRFHRTIIGQKGERIREIRDKFPEVIINFDPDAQKSDIVQLRGPK 560
NEVEKCTKYMQKMVADLVENSYSISVPIFKQFHKNIIIGKGANIKKIREESNTKIDLPAENSNSETIIITGKRANCEAAR 640
SRILSIQKDLANIAEVEVSIPAKLHNSLIGTKGRLIRSIMEECGGVHIFPVEGSGSDTVVIRGPPSSDVEKAKKQLLHLA 720
EEKQTKSFTVDIRAKPEYHKFLIGKGGGKIRKVRDSTGARVIFPAAEDKDQDLITIIIGKEDAVREAQKELEALIQLNDNV 800
VEDSMLVDPKHRRHFVIRRGQVLREIAEEYGGVMVVSFPRSGTQSDKVTLLKGAKDCVEAAKKRIQEIIEDLEAQVTLECAI 880
PQKFHRSVMGPKGSRIQQITRDFSVQIKFPDREENAVHSTEPVVQENGDEAGEGREAKDCDPSRRCDIISGRKEKC 960
EAAKEALEALVPVTIEVEVPFDLHRYVIGQKGSIRKMMDEFEVNIHVPAPELQSDIIAITGLAANLDRAGLLERVKE 1040
LQAEQEDRALRSFKLSVTVDPKYHPKIIIGRKGAVITQIRLEHDVNIQFPDKDDGNQPQDQITITGYEKNTAARDAILRI 1120
VGELEQMVSEDEVPLDHRVHARIIGARGKAIRKIMDEFKVDIRFPQSGAPDPNCVTVTGLPENVEEAIDHILNLEEEYLAD 1200
VVDSEALQVYMKPPAHEEAKAPSRGFVVRDAPWTASSSEKAPDMSSEEFPSFGAQVAPKTLPWGPKR

```

Fig. 8-2. HDLBP 切断領域の推定

(A) 150-kDa HDLBP の N 末端領域はプロセッシングステップ中に除去された。150-kDa HDLBP タグ付き EGFP での N 末端 (EGFP-HDLBP) と C 末端 (HDLBP-EGFP) を COS7 細胞で発現させ、48 時間後 anti-GFP 抗体と anti-HDLBP 抗体を用いた WB により解析した。EGFP 融合 150-kDa および 110-kDa HDLBP はそれぞれ 176 と 136-kDa タンパク質として発現していた。pEGFP-N1/C1 はベクターコントロールとして使用した。(B) ヒト HDLBP の全アミノ酸配列。*部分をメチオニンに置換して 110-kDa HDLBP の発現ベクターを作製した。

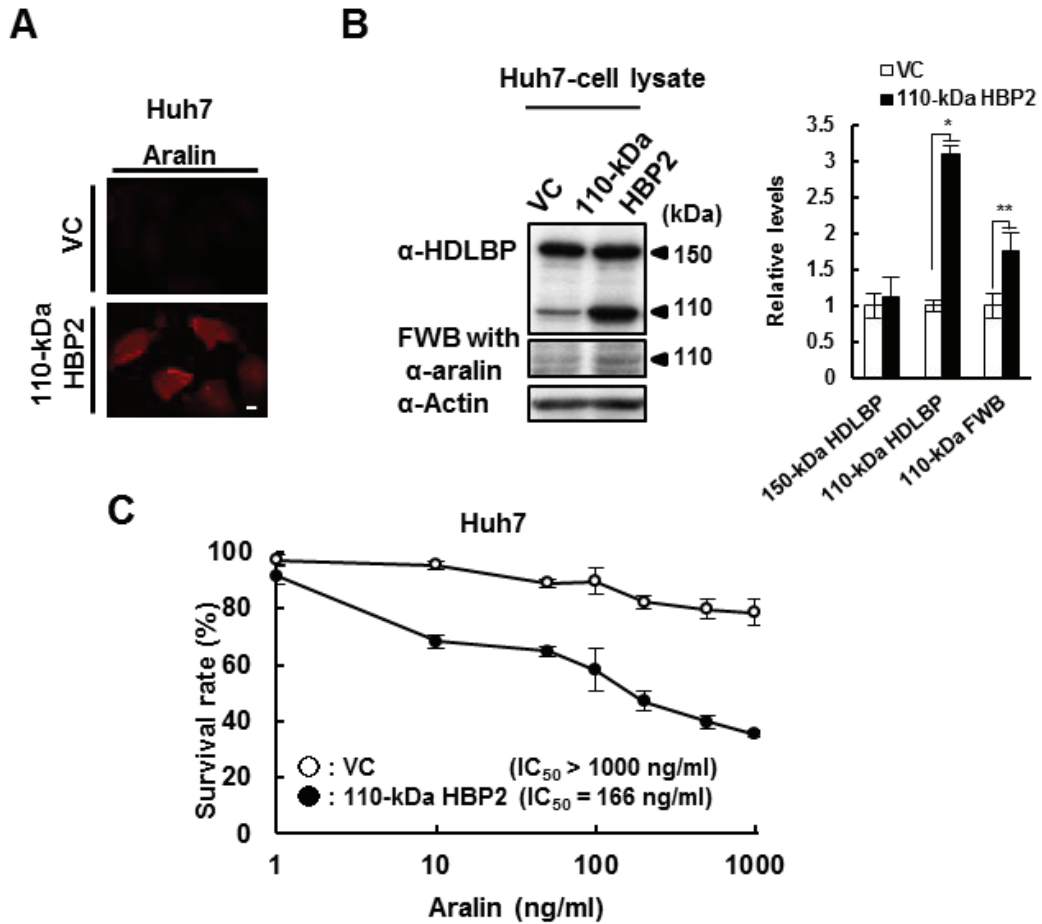


Fig. 8-3. Huh7 細胞での 110-kDa HDLBP は aralin 感受性に影響を与える

(A) Huh7 細胞における 110-kDa HDLBP 一過性発現 110-kDa HBP2 と VC 細胞を Cy3-aralin を用いて解析した。Cy3 と PC を merge させた。(B) VC と 110-kDa HBP2 細胞における 110-kDa HDLBP の発現量の解析。細胞ライセートを WB および定量化によって解析した。(* $P < 0.0001$, ** $P < 0.02$) VC と比較した($n = 3$)。 (C) aralin 感受性を 110-kDa HDLBP の異所性発現によって獲得した。細胞を aralin で処理し、 IC_{50} 値を算出し括弧内に示した。Scale bar = 10 μ m.

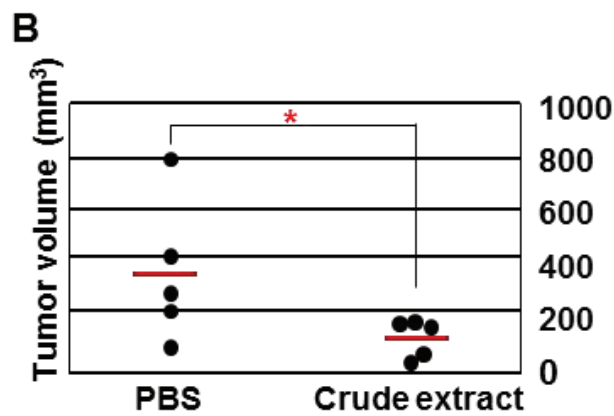
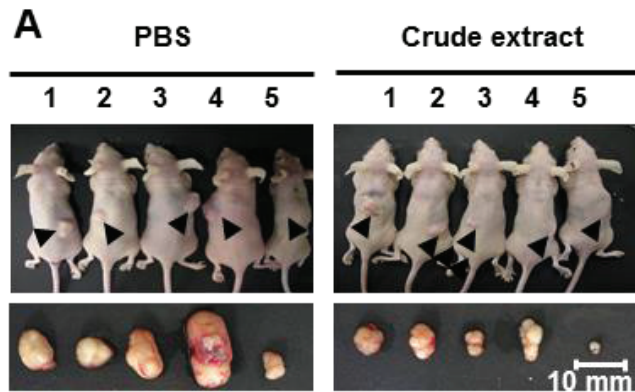


Fig. 9-1. *In vivo*において aralin を経口投与したマウスで腫瘍形成を抑制する

(A) HeLa 細胞(1×10^6 cells)を 6 週齢のヌードマウスの側腹部に皮下移植した。24 時間後、aralin $2\mu\text{g}$ を含むタラの芽粗抽出物を週 5 日経口投与した。3 週間後、腫瘍を撮影した。(B) aralin とコントロール群(PBS 投与)のマウスの腫瘍体積を定量した。($P < 0.05$) PBS 処理群と比較した ($n = 5$)。

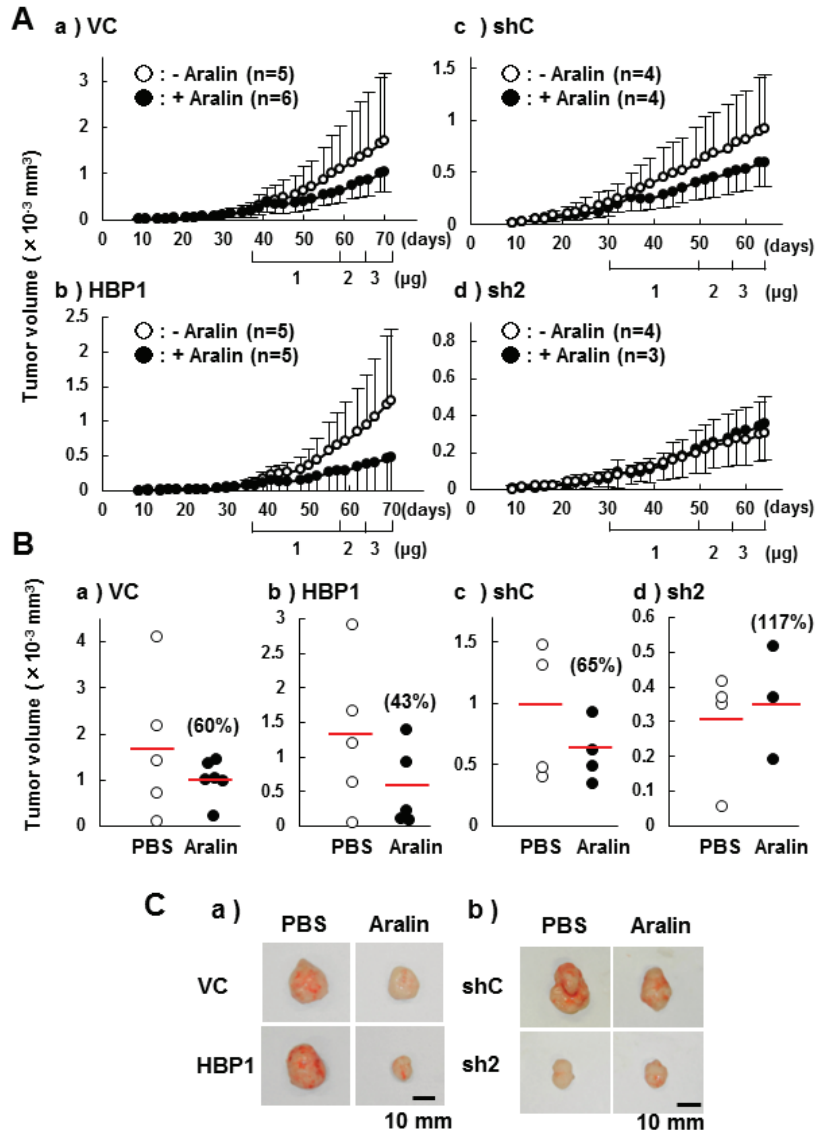


Fig. 9-2. *In vivo*での HDLBP 発現量は aralin 感受性に影響する。

(A, B) HeLa トランスフェクタントの腫瘍が約 $150\text{-}200 \text{ mm}^3$ に発達してから aralin 1, 2, 3 μg 含有のタラの芽粗抽出物をそれぞれ 19 日間、7 日間、7 日間経口投与した。(a) VC, (b) HBP1, (c) shC, (d) sh2 由来腫瘍体積を定量した。(C) HeLa トランスフェクタントの典型的な腫瘍の写真。VC-および HBP1 由来腫瘍 (a) と shC-と sh2 由来腫瘍 (b)を撮影した。

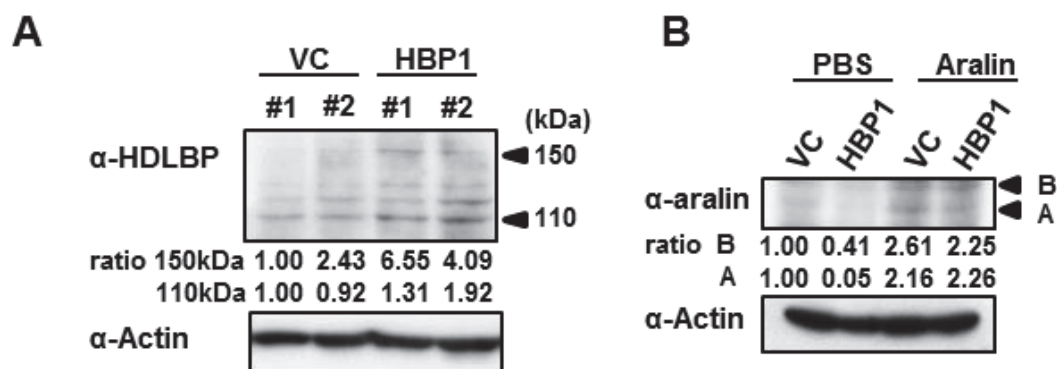


Fig. 9-3. *In vivo* で 150-kDa HDLBP の過剰発現は aralin 感受性を高める

(A) VC と HBP1 細胞由来のそれぞれ 2 つの腫瘍からタンパク質を調製し WB によって解析した。(B) aralin 経口投与された aralin は腫瘍に到達する。PBS または 3 μ g の aralin の経口投与から 24 時間後、VC と HBP1 由来の腫瘍は anti-aralin 抗体を用いた WB により検出した。A および B は aralin の A 鎖と B 鎖を示す。

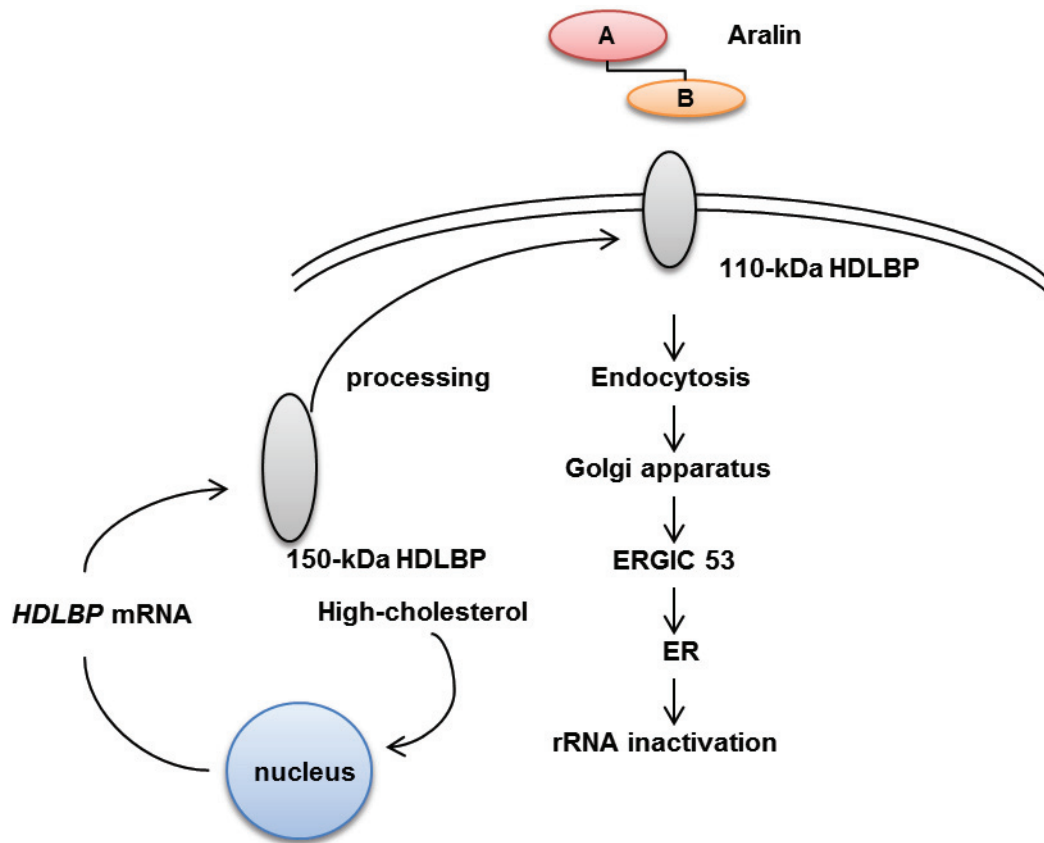


Fig.10. Aralin の HDLBP を介した細胞内への取り込み機構