

Aberrant Expression of Sialidase in Cancer

がんとシアリダーゼ異常

Miyagi, Taeko*; Kato, Kengo; Ueno, Seiji; and Wada, Tadashi

*To whom correspondence should be addressed.

Biochemistry Division, Miyagi Cancer Center Research Institute, Natori, Miyagi, 981-1293, Japan

FAX: 81-22-381-1195, E-mail: tmiyagi@mcc.pref.miyagi.jp

Key Words: sialidase, cancer, sialylation, gangliosides, metastasis, apoptosis

Abstracts

When cells undergo oncogenic transformation, the sialylation of cell surface glycoconjugates is altered, which is thought to be associated with malignant phenotype. To elucidate the significance and the molecular mechanism of the alteration, we have been focusing on sialidase that catalyzes the removal of sialic acid residues from glycoproteins and glycolipids. In mammalian cells, four types of sialidases have been identified to date and were found to behave in different manners during carcinogenesis. A sialidase found in lysosomes is decreased in the activity and mRNA level in cancer cells, while a sialidase in plasma membrane is increased as compared with those in the control cells. The former sialidase affects anchorage-independent growth and metastatic ability and introduction of the sialidase gene leads to reversion of these phenotypes. On the other hand, the latter brings about suppression of apoptosis in cancer cells and knocking down of this gene with short interfering RNA results in acceleration of apoptosis. In this review, we describe and summarize the alteration of sialidases and its possible significance in carcinogenesis.

A. Introduction

Sialic acids are generally found in the terminal position of the carbohydrate groups of glycolipids and glycoproteins. They have been proposed to play important roles in various biological processes by influencing conformation of glycoproteins, recognizing and masking biological sites of the molecules and cells. The removal of the sialic acids catalyzed by sialidase is an initial step in the degradation of glycoproteins and gangliosides. Sialidases of mammalian origin, therefore, have been implicated not only in lysosomal catabolism but also in regulation of functional molecules involved in many biological phenomena (1–3) through modulating sialoglycoconjugates. In fact, the lines of evidence for their involvement in cellular events including cell differentiation, cell growth, and apoptosis have been accumulated.

Alterations in sialylation during malignant transformation have been observed to be closely associated with malig-

要約

細胞ががん化すると、細胞表面シアル酸量が変化する。このシアル酸変化は、がん細胞の悪性形質と深く関わっていると考えられている。この変化の機構と意義を明らかにすることを目的として、糖タンパクや糖脂質の非還元末端からシアル酸を除去するシアリダーゼに着目して、研究を行ってきた。哺乳動物細胞には現在まで4種のシアリダーゼが同定されているが、それらはがん化でそれぞれ異なった挙動を取ることがわかってきた。主にリソソームに局在するシアリダーゼの活性と mRNA のレベルはがん化で減少し、細胞膜に局在するシアリダーゼの場合は逆に上昇している。前者は足場非依存性や転移能に影響し、この遺伝子の導入によって、これらの形質は対照細胞の方向へ戻っている。一方、後者のシアリダーゼについては発現亢進ががん細胞のアポトーシスを抑制し、siRNA の導入によってアポトーシスが促進される。本稿ではこれまで明らかになったがんにおけるシアリダーゼの変化と意義について紹介したい。

A. はじめに

シアル酸は一般に糖タンパクや糖脂質糖鎖の末端に見いだされる。糖タンパクのコンフォメーションに影響を与えたり、分子や細胞の機能部位を認識したり隠蔽することにより、多くの細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられている。シアリダーゼによるシアル酸の除去は、糖タンパクや糖脂質糖鎖分解の初期反応であるが、動物シアリダーゼは単にリソソームでの異化分解に関わるのみではなく、シアル口複合糖質を修飾することにより、多くの細胞現象を制御している可能性がある(1–3)。事実、シアリダーゼが細胞分化や細胞増殖、アポトーシス等の細胞現象に関わっている証拠が蓄積してきている。

がん化におけるシアリル化の異常には転移能や浸潤能が深く関わっていることがこれまで観察されてきたが、シアル酸量

nant phenotype in terms of metastatic potential and invasiveness, although no definite conclusions between sialic acid contents and malignant properties could be drawn because of some controversial experimental results. To understand the causes of such aberrant sialylation and the consequences of these changes, our studies have focused on mammalian sialidases, which control cellular sialic acid contents in collaboration with sialyltransferases. Sialidase expression level indeed changes in response to various cellular phenomena and especially in relation to cancer phenotype.

B. Multiple Forms of Mammalian Sialidase and Their Possible Functions

Sialidase activity in higher organisms was described for the first time in 1960 by Warren and Spearing(4). Since then numerous papers have demonstrated the presence of sialidase in various mammalian tissues. However, it remained uncertain whether the activities originated from the same or different type of sialidase. Our previous studies on biochemical isolation and characterization of sialidase from rat tissues presented evidence for the existence of four types of sialidases differing in their subcellular localization and enzymatic properties, including the substrate specificity. They were classified according to their major intracellular localization to be intralysosomal, cytosolic, and membrane-associated sialidases I and II (5). Several rat tissues, including the liver and brain were found to contain all four types of sialidases. Intralysosomal sialidase possessed a narrow substrate specificity, such that only oligosaccharides and glycopeptides served as its substrates (6). Sialidase found in the cytosol, in contrast, was able to hydrolyze glycoproteins and gangliosides at near neutral pH (7). Both the sialidases were, however, distinct from the membrane-associated sialidases which required detergents for solubilization and preferentially hydrolyzed gangliosides (8). Membrane sialidase I scarcely hydrolyzed other substrates including oligosaccharides and glycoproteins, while membrane sialidase II acted on oligosaccharides, glycoproteins and even on gangliosides GM2 having an internal sialic acid residue. Sialidase I was localized mainly in the plasma membranes and sialidase II was localized predominantly in the lysosomal membranes. The biochemical characterization of the multiple forms of sialidases suggested that each may play a unique role depending on its particular subcellular localization and catalytic properties. Recent progress in the molecular cloning of sialidases has confirmed this hypothesis and facilitated the elucidation of their functional roles and expression mechanisms. Three of them are found to be localized predominantly in the lysosomes (9-14), cytosol (15-20) and plasma membranes (19, 21-24) and the fourth sialidase quite recently identified (25-27) has been suggested to be in lysosomes by gene transfection, abbreviated as Neu1, Neu2, Neu3, and Neu4, respectively. The properties of the four forms are compared in Table I. Enzymatic

と悪性形質間にはっきりした関連性は得られていない。実験結果が必ずしも一定方向を示さないからである。われわれはこのシアル化異常の原因とその結果を明らかにすることを目的として、シアルトランスフェラーゼと協調してシアル酸量の調節に与っているシアリダーゼに着目して研究を行ってきた。シアリダーゼ発現レベルは実に、種々の細胞現象に対応して、特に、がん細胞形質に関連して変化している。

B. 哺乳動物シアリダーゼの分子多様性とその機能

高等動物のシアリダーゼ活性は 1960 年に初めて Warren と Spearing (4) によって報告された。それ以来、種々の哺乳動物組織において見いだされてきた。しかしながら、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、不明であった。先にわれわれは、ラット組織を酵素源として、生化学的な分離・精製や性状解析を行い、細胞内局在や基質特異性等の酵素学的性状を異にする 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、主な細胞内局在に応じて、リソソーム内酵素、細胞質酵素、膜結合酵素 I, II と分類された (5)。肝や脳を含む複数のラット組織は実際にこれらの 4 種を含んでいる。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 (6)。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、糖タンパクや糖脂質をも水解した (7) が、表面活性剤存在下に Ganglioside を良い基質とする膜酵素 I, II とは大きく異なっていた (8)。膜酵素 I は、Ganglioside 以外のオリゴ糖や糖タンパクには働かないが、膜酵素 II はこれらの基質のみではなく、内部シアル酸を持つ GM2 をも水解する。前者は主に、形質膜に局在し、後者はリソソーム膜に局在する。以上のようなシアリダーゼ多様性は、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。シアリダーゼ遺伝子クローニングの最近の進歩は、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。クローン化された 4 種のシアリダーゼのうち、3 種は上述のように、リソソーム (9-14)、細胞質 (15-20)、形質膜 (19, 21-24) に主に局在することが確認され、Neu1, Neu2, Neu3 と呼ばれているが、ごく最近同定された 4 番目のシアリダーゼ、Neu4 (25-26) の局在場所はリソソームであるという報告があるが、はっきりしない (26)。表 I に 4 種の性質を比較している。遺伝子導入によっ

Table I. Comparison of four types of mammalian sialidase so far cloned.

	Neu1	Neu2	Neu3	Neu4
Major location	Lysosomes	Cytosol	Plasma membranes	Lysosomes (?)
Substrate specificity	Oligosaccharides 4MU-NeuAc	Oligosaccharides 4MU-NeuAc Glycoproteins Gangliosides	Gangliosides	Oligosaccharides 4MU-NeuAc Glycoproteins Gangliosides
Optimal pH	4.4-4.6	6.0-6.5	4.6-4.8	4.4-4.5
Total amino acids (human)	415	380	428	496 (484)
Chromosome location (human)	6p 21.3	2q 37	11q13.5	2q37.3
References for gene cloning	(9-14)	(15-20)	(19,21-24)	(25-27)
Possible function	Degradation in lysosomes Immune function	Myoblast differentiation	Neural differentiation Apoptosis Cell signaling	?
Frequent change in cancer	↓ inverse relationship with metastatic potential	↓	↑ apoptosis suppression	?

properties including substrate specificity and optimal pH determined by gene transfection were revealed to be completely identical to those presented in our previous biochemical studies (5).

Neu2 was the first example of cDNA cloning for mammalian sialidase(15), and the primary structures of Neu1 and Neu3 were successively reported. Although their primary sequences are not particularly similar to those of bacterial and parasite sialidases, the sequence alignment revealed that they contain several Asp boxes (-Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp-), Arg-Ileu-Pro and (Val)-Gly-Pro-Gly, the conserved sequences being found in the sialidases from microorganisms. They seem to have a three-dimensional structure similar to those of bacterial and viral sialidases as suggested by the alignment with that of *S. typhimurium* sialidase, whose three-dimensional structure was determined by X-ray crystallography (28).

In the sequence of *Neu2* gene (15), there is no long stretch of hydrophobic amino acid residues representing the transmembrane domain or targeting signal to some membranes, which is compatible with recovery mainly from the tissue cytosol. When

て得られた諸性質は以前にわれわれが生化学的に解析した結果を確認することとなった。

哺乳動物シアリダーゼで最初にクローン化されたのは、*Neu2* (15) で、その後、*Neu1*、*Neu3* と続いてクローン化された。それらの一次構造は細菌や原虫のそれとは類似しないが、これらの微生物酵素に保存される Asp box と呼ばれる配列や、Arg-Ileu-Pro, (Val)-Gly-Pro-Gly 等の短いアミノ酸配列が含まれることがわかった。さらに、X線解析によってその三次構造が明らかになっている *S. typhimurium* の酵素 (27) と比較することによって、三次構造も微生物酵素と似ていることが予測された。

Neu2 遺伝子配列 (15) には、膜貫通配列や膜へのターゲティング配列は認められないが、組織から精製した酵素が細胞質に見いだされたように、COS 細胞に導入した酵素も主に細胞質に

the cDNA was transfected into COS cells, sialidase activity appeared mainly in the supernatant of the cell homogenates. In addition to location in cytosol, the sialidase was also found in nucleoplasm of muscle fibers by immuno-histochemical analysis on electron microscopy, probably due to the presence of nuclear localization signal near the N-terminus. The expressed sialidase showed an optimum pH of about 6.5 and could desialylate fetuin and gangliosides as well as 4-methylumbelliferyl-neuraminic acid (4MU-NeuAc), a synthetic substrate. The homologues were cloned from cDNA libraries of CHO (16), mouse brain (19) and rat thymus (20) and from a genomic library of human skeletal muscle (17), respectively, showing high amino acid identity (98-70%) to the rat gene. The rat cytosolic sialidase gene was found to be highly expressed in skeletal muscle in a tissue-specific manner and to contain two E-box pairs, known to be consensus binding sites for muscle-specific transcription factors, in the 5'-flanking enhancer/promotor region of the gene. This region exhibits transcriptional activity in rat L6 (29) and murine C2C12 (30) myogenic cells, and the activity as well as mRNA level is increased during myotube formation, indicating that the enzyme plays a critical role in muscle cell differentiation. In PC12 cells the sialidase has been suggested to participate in neuronal differentiation by nerve-growth factor-induced transcriptional activation of the gene (31).

Lysosomal sialidase, Neu1, was investigated extensively as a target gene for sialidosis, and was found to be associated with a protective protein (carboxypeptidase A) and β -galactosidase as a complex in lysosomes (32), and dissociation of the complex led to sialidase inactivation. In 1996-1998, the *Neu1* gene was identified by three groups in humans (9-11) and mice (12-14) as major histocompatibility complex (MHC)-related sialidase genes. The human sialidase was suggested to be located in lysosomes because of the presence of the lysosomal C-terminal targeting motif. Evidence of a protective protein transporting it to lysosomes has been provided (33). On the other hand, recent observations revealed that the intracellular distribution of sialidase encoded by the human homologue *NEU1* gene is regulated by the signal sequence at the cytoplasmic tail, and that the sialidase can be detected within the lysosomes as well as in plasma membrane under conditions of cell stimulation (34). Examination of sialidosis patients who have a sialidase deficiency revealed mutations in genomic DNA including frame-shift insertion and missense mutations. Transfection with the cDNA restored sialidase activity toward 4MU-NeuAc in human sialidosis fibroblasts to normal levels, indicating that it is a target gene for sialidosis. Besides the glycoconjugate catabolism as described above, Neu1 has been suggested to be involved in cellular signaling during immune responses, as described in the reports demonstrating the increased activity during mitogen-activation of T lymphocytes (35), and its participation in the

検出された。この酵素は、免疫電顕により、筋肉細胞で細胞質の他に核質にも検出されたが、N-末端付近に認められる核移行シグナルが機能しているためかもしれない。発現酵素は pH 6.5 付近に至適 pH を有し、合成基質である 4-メチルウンベリフェリルノイラミン酸 (4MU-シアル酸) やフェトイン、ガングリオシドを水解する。ホモログが CHO (16)、マウス脳 (19)、ラット胸腺 (20) の cDNA ライブラリーから、また、ヒト筋肉ゲノムライブラリーから (17) 単離されたが、それらは 70 ~ 98 % と高いアミノ酸配列の相同性を示した。ラット細胞質シアリダーゼは骨格筋に多く含まれ、遺伝子の 5' 上流エンハンサー/プロモーター領域には筋肉特異的転写因子が結合するふたつの E-box ペアを含んでいる。この領域はラット L6 筋芽細胞 (29) で、またマウス C2C12 筋芽細胞 (30) で転写活性を示し、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 が神経分化に関与していることが推察された (31)。

リソソームシアリダーゼ (Neu1) はシアリドーシスの標的遺伝子として研究されてきたが、保護タンパクや β -ガラクトシダーゼと複合体を形成しており (31)、その解離はシアリダーゼの失活をもたらすことがわかっている。1996 ~ 1998 年にヒト (9-11) およびマウスの遺伝子 (12-14) が 3 グループによって、主要組織適合複合体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によって促進されるようである (33)。一方、NEU1 の局在が C-末のシグナル配列によって制御されており、リソソーム内腔のみではなく、形質膜にも認められるという報告もある (34)。シアリドーシス患者の酵素を調べると、フレームシフトやミスセンス変異が見いだされた。患者繊維芽細胞に遺伝子を導入すると 4MU-NeuAc に対する活性が回復し、シアリドーシスの原因遺伝子であることが証明された。この酵素は、複合糖質の異化分解という役割の他に、免疫応答にも関与しており、T 細胞の活性化に際して上昇を示したり (35)、Ia 抗原の調節や活性化 T 細胞によるサイトカイン IL4 の産生にも関わっているようである (36, 37)。

つぎに、形質膜シアリダーゼ (Neu3) 遺伝子がウシ脳 cDNA ライブラリーから精製酵素のペプチド配列を基にクローン化された (21)。COS-7 細胞に一過性に過剰発現した酵素を用いて、

regulation of allogenic Ia and the production of cytokine IL4 by activated T cells (36,37).

A plasma membrane-associated sialidase, Neu3, was then cloned from a bovine brain library (21), based on the peptide sequence information from the purified enzyme protein. In COS-7 cells transiently expressing the sialidase, the hydrolysis was essentially specific to gangliosides other than GM1 and GM2, in the presence of Triton X-100, and the major subcellular localization was assessed to be plasma membrane by Percoll density gradient centrifugation of cell homogenates and by immunofluorescence staining of the cells. Analysis of the membrane topology by protease protection assay suggested that this sialidase has a type I membrane orientation with its amino-terminus facing the extracytoplasmic side and lacking a signal sequence. The primary sequences covering the entire coding region of the corresponding human (22, 23), mouse (19), and rat (24) genes displayed an 83%, 79%, and 78% overall identity with the bovine gene, respectively. For the possible function of plasma-membrane-associated sialidase, there were reports by Kopitz *et al.* that 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid, a sialidase inhibitor, abolishes increases in differentiation markers in human neuroblastoma cells and that a cell surface sialidase may take part in growth inhibition and neural differentiation of the cells by providing the reaction product GM1 as a ligand for galectin 1 without affecting cell apoptosis (38,39). After cloning, studies on the molecular basis with the cDNA have facilitated the elucidation of its physiological function. Neu3 was proved to indeed participate in neurite formation of mice (19) and human neuroblastoma cells (40), and in regulation and regeneration in rat hippocampal neurons (41). From another aspect, a possible involvement of human NEU3 in signal transduction was recently described. The sialidase was proved to be located in a raft of neuroblastoma cells (42) and in caveolae of HeLa cells, closely associated with caveolin-1 (43). Furthermore, ganglioside depletion via the introduction of NEU3 resulted in activation of integrin-linked kinase/Akt with inhibition of caspase-9 in a human keratinocyte-derived SCC12 cell line (44). These data suggest that Neu3 plays critical roles in signal transduction by modulating gangliosides.

Recently, based on the cDNA sequences in public databases, cDNAs predicted as *Neu4* genes for murine (25) and human (26, 27) have been identified to encode sialidase by measuring the enzyme activity with 4MU-NeuAc in the transfected cells. The murine gene has been reported to contain four exons and an open reading frame of 501 amino acids, and to be most similar to Neu3 (42%) among the other known murine sialidases. A sialidase encoded by human ortholog cDNA has been suggested to be targeted to lysosomal lumen by the mannose-6-phosphate receptor (27). Unlike other human sialidases, the enzyme possesses broad substrate specificity including sensitivity to mucin, similar to membrane II sialidase, as expected in our

TritonX-100 存在下で GM1 や GM2 以外のガングリオシドに特異的に働くことが証明された。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 膜タンパクであることが示された。相当するヒト (22, 23)、マウス (19)、ラット (24) 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。推定される機能として、Kopitzらは、シアリダーゼ阻害剤である 2,3-デヒドロ-2デオキシ-N-アセチルノイラミン酸をヒト神経芽腫細胞に投与すると、分化マーカーの増加を阻害すること、細胞表層シアリダーゼがガレクチン 1 のリガンドである反応産物 GM1 を供給することによって、アポトーシスに影響することなく、増殖阻害や神経細胞分化に関わっているらしいことを報告している (38, 39)。クローニングの後、cDNA を使った分子レベルの解析はその生理的機能の解明を促進させることになった。Neu3 は実際にマウス (19) やヒト (40) の神経芽腫細胞で、また、ラット視床下部ニューロン (41) で神経突起形成に関わっていることが検証された。他方、ヒト NEU3 は、シグナル伝達に関わっているらしいことも知られてきた。神経芽腫細胞でラフトに、HeLa 細胞ではカベオリン-1 と結合する形でカベオラに局在することが明らかになり、さらに、*NEU3* 導入によるガングリオシド低下によって、ヒトケラチノサイト由来 SCC12 細胞では ILk/Akt の活性化、caspase-9 の阻害がもたらされた (44)。これらの結果は Neu3 がガングリオシドを修飾することによって、シグナル伝達に重要な役割を果たしていることを推察させるものである。

最近、遺伝子データベースの cDNA 配列に基づいて *Neu4* 遺伝子として予想されていた cDNA が、マウス (25) およびヒト (26, 27) で、遺伝子導入細胞で 4MU-NeuAc を基質としてシアリダーゼ活性を測定することにより検証された。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。相当するヒトシアリダーゼはマンノース 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推察されている (26)。他のヒトシアリダーゼとは異なり、ムチンにも働くなど、広い基質特異性をもっている。これは先のわれわれの生化学的解析により示した膜型 II のシアリダーゼに相当する。現在のところ、その機能に

previous biochemical studies of the rat enzymes. The function of Neu4 is not known at present.

C. Alterations of Sialidases in Carcinogenesis

In the 1970–1980's, several observations on alteration of endogenous sialidase activity in cancer suggested that sialidase might be related to tumorigenic transformation and tumor invasiveness. On the basis of these pioneering studies, we attempted to clarify the direction of changes in sialidase in cancer and provided some evidence for the presence of multiple forms of mammalian sialidase by their biochemical isolation and characterization (5). Based on sialidase multiplicity, using a differential assay procedure for each form of sialidase, we observed that membrane-bound sialidase activities were elevated, but cytosolic sialidase activity was reduced in rat hepatomas as compared with normal liver. In mouse epidermal JB6 cells exposed to TPA and in the anchorage-independent transformants, we also found lysosomal sialidase activity to be decreased while plasma membrane-associated sialidase activity was increased as compared with that in untreated JB6 cells. The activity decrease in lysosomal sialidase also occurred in rat 3Y1 fibroblasts after *src*-transformation. When the levels of sialidase activity were assayed in transformed rat 3Y1 cells, a lysosomal-type sialidase was found to be inversely correlated with the metastatic potential of the cells (45). As compared with control 3Y1 cells, *src*-transformed cells exhibited decreased lysosomal-type sialidase activity, and *v-fos* transfer to these cells induced an even more severe decrease in the sialidase activity with acquisition of high lung metastatic ability. Various lysosomal enzymes other than sialidase were barely affected by the transformation, suggesting that the alterations occur specifically in sialidase. Since their metastatic potential was not parallel in the sialic acid levels nor the levels of various sialyltransferases responsible for glycoprotein and ganglioside formation, it is likely that altered sialidase expression is more important for metastasis in transformed cells.

After Neu1 gene was cloned, we measured sialidase activity and the mRNA level in mouse adenocarcinoma colon 26 cells of different metastatic potential (46) as well as in rat 3Y1 transformants (45) described above, to determine whether the levels are closely related with metastatic potential. There was good inverse relationship between Neu1 expression level and metastatic ability in the both cases. We then investigated how sialidase expression influences metastasis by introducing a cytosolic sialidase (Neu2) cDNA, which was found to have broad substrate specificity, acting on both glycoproteins and gangliosides, into a B16-BL6 mouse melanoma cell line known to be highly invasive and metastatic(47). Intravenous injection of these stable transfectants into syngeneic mice resulted in a marked decrease in experimental pulmonary metastasis, invasiveness and cell motility but no change in cell growth or cell attachment to fibronectin, collagen type VI or laminin. Analysis of the mo-

ついてはわかっていない。

C. がんにおけるシアリダーゼ変異

1970～1980年代にがんのシアリダーゼ活性についての研究結果が少なからず報告されたが、それらは、シアリダーゼのがん化や浸潤との関連性を示唆するものであった。これらの先駆的研究を背景に、われわれはがんのシアリダーゼ変異の方向性をはっきりさせることをめざして、酵素の生化学的な分離・精製、性状解析を行い、動物シアリダーゼの多様性の実験的検証を行ってきた(5)。この分子多様性を基に、各々の酵素の活性鑑別測定を行い、ラット肝がんでは正常肝に比較して、膜結合酵素Ⅰの活性が上昇し、細胞質シアリダーゼ活性が低下することを見いだした。マウス類上皮 JB6 細胞では、TPA 処理を施したり足場非依存性を獲得すると、未処理細胞に比べて、リソソームシアリダーゼ活性が低下し、形質膜シアリダーゼ活性が上昇することがわかってきた。このリソソームシアリダーゼ活性の減少は、ラット 3Y1 繊維芽細胞が *src*-悪性転換後にも認められた。3Y1 悪性転換細胞でリソソームタイプのシアリダーゼ活性を測定すると、細胞の転移能と逆相関関係にあることがわかった(45)。即ち、3Y1 細胞にラウス肉腫ウイルスを感染させると活性低下が起こるが、*v-fos* がん遺伝子を導入して造腫瘍性を獲得させると、さらにこの活性が低下した。この変化は他種のリソソーム酵素には見られず、シアリダーゼに特異的であるようであった。転移能はシアル酸量や糖脂質や糖タンパク合成に与る数種のシアリルトランスフェラーゼ活性レベルと平行していなかったため、シアリダーゼの変化が転移能に、より重要である可能性がある。

Neu1 遺伝子がクローン化された後、3Y1 悪性転換細胞(45)および転移能の異なるマウス結腸がん colon26 細胞系について(46)、このシアリダーゼ活性と mRNA レベルが転移能と密接に関連しているかどうかを調べた。両方の細胞系において、*Neu1* 発現レベルと転移能が良い逆相関関係を示すことがわかった。次に、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、糖タンパクと糖脂質の両方に働く広い基質特異性を持つ細胞質シアリダーゼ、*Neu2*、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(47)。*Neu2* 遺伝子を導入した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。分子機構を解析すると、シアリ

lecular mechanisms showed that sialidase overexpression did not lead to any significant changes in cell surface or intracellular glycoproteins, while there was a decrease in ganglioside GM3 and an increase in lactosylceramide based on thin layer chromatography results. When the sialidase gene was transfected into a highly metastatic cell line of mouse colon 26 adenocarcinoma cells, changes in the sialyl Le^x level were observed in addition to marked suppression of metastasis and ganglioside alterations similar to those in BL6 cells (46). Compared to low metastatic NL4 and NL44 cell lines, the highly metastatic NL17 and NL22 cells exhibit low expression of Neu1 sialidase, accompanied by higher levels of sialyl Le^x and GM3. After transfection, NL17 cells showed marked inhibition of lung metastasis, invasion and cell motility with a concomitant decrease in sialyl Le^x and GM3 levels, in line with the case of spontaneously low metastatic sublines having a relatively high level of endogenous sialidase. Treatment of the cells with antibodies against sialyl Le^x and GM3 affected cell adhesion and/or cell motility, providing evidence that desialylation of these molecules, as targets of sialidase, is involved in the suppression of metastasis. However, the highly metastatic cells exhibited rather lower sialic acid content, both total and cell surface, as compared to the low metastatic cells, which was not consistent with the sialidase activity. The results together indicate that the sialidase level is a determining factor affecting metastatic ability, at least of murine origin, irrespective of sialic acid contents.

To investigate whether overexpression of Neu1 sialidase can reverse metastatic ability, we next introduced a rat lysosomal sialidase gene into B16 melanoma cells (48). As expected, sialidase-overexpressing cells showed suppression of experimental pulmonary metastasis and tumor progression. In contrast to the case of Neu2 sialidase, the transfectants exhibited reduced cell growth and anchorage-independent growth and increased sensitivity to apoptosis, induced by suspension culture or serum depletion *in vitro*, but no significant alterations in invasiveness, cell motility, or cell attachment. Although the target molecule for the sialidase has not been specified, the results indicate that the sialidase affects malignant properties including the metastatic ability of cancer cells, in a manner different from that of Neu2.

Thirdly, we introduced a plasma membrane-associated sialidase, Neu3, into B16-B16 melanoma cells, and no significant changes in metastatic potential were observed before, versus after, transfection (Sawada, *et al.* Unpublished data). We then investigated the sialidase expression in human colon cancer (49), since it has been suggested that gangliosides and sphingolipids modulate transmembrane signaling essential for tumor cell growth, invasion, and metastasis. The NEU3 mRNA levels were found to be increased by 3- to 100-fold in colon cancer tissues compared to adjacent non-tumor mucosa, associated with significant sialidase activity elevation in the tumors.

ダーゼ過剰発現が細胞表面や細胞内の糖タンパク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ことが薄層クロマトグラフィによる分析によって明らかになった。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 (46)。低転移能の NL4 および NL44 細胞に比較し、高転移能の 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。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、比較的高いシアリダーゼ活性を持ち、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、シアリダーゼの標的としての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面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ひとつの因子であることを示している。

そこで、Neu1 シアリダーゼの過剰発現が実際に転移能を低下させるかどうかを調べるため、ラットリソソームシアリダーゼを B16 メラノーマ細胞に導入した (48)。予想通り、このシアリダーゼ導入細胞は実験的肺転移能と腫瘍の増大を抑制した。Neu2 シアリダーゼの場合とは違って、細胞増殖や足場非依存性を低下させ、細胞を浮遊状態にしたり血清除去によって誘導したアポトーシスへの感受性を増強した。しかし、浸潤、細胞運動、細胞接着に変化は見られなかった。このシアリダーゼの標的分子は特定できていないが、これらの結果は、このシアリダーゼが、Neu2 とは違った形で、がん細胞の転移能を含む悪性形質に影響を与えていることを示している。

三番目に、形質膜シアリダーゼ (Neu3) を B16-BL6 メラノーマに導入した。導入前後で、転移能に有為な変化は見られなかった。しかしながら、ガングリオシドやスフィンゴリピドが細胞増殖や浸潤、転移などに関するトランスメンブレンシグナルを修飾していることが推察されているので、ヒト大腸がんにおける発現を調べた (49)。がん組織の mRNA レベルは、対応する非腫瘍組織と比べて 3~100 倍に上昇し、シアリダーゼ活性も

In situ hybridization showed the high sialidase expression in epithelial elements of adenocarcinomas. To understand the significance of the increased expression, cultured human colon cancer cells were treated with sodium butyrate, and changes in expression during differentiation and apoptosis were observed. The NEU3 level was down-regulated by the treatment while NEU1 was up-regulated. Transfection of *NEU3* gene into cancer cells inhibited apoptosis accompanied by increased Bcl-2 and decreased caspase expression, while knocking down of this gene with short interfering RNA resulted in acceleration of apoptosis. Colon cancer tissues exhibited a marked accumulation of lactosylceramide, a possible NEU3 product, and addition of the glycolipid to the culture reduced apoptotic cells during sodium butyrate treatment. These results indicate that high expression of NEU3 in cancer cells leads to protection against programmed cell death. Through modulation of gangliosides NEU3 may give influence not only on mitochondrial apoptotic pathway but also on apoptosis-related molecules at death receptors' level, as described in the reports that NEU3 is within microdomain, rafts, at cell surface (42, 43). Taken together, the results indicate that increased NEU3 might cause disturbance of apoptosis signaling probably via modulation of gangliosides.

To know whether similar changes in NEU3 expression

有為な上昇を示した。*In situ* ハイブリダイゼーションによって、がん細胞自体に高いシアリダーゼ発現を認めた。この発現上昇の意義を明らかにするため、ヒト培養大腸がん細胞をブチル酸処理し、分化やアポトーシスにおける発現の変化を調べた。NEU3 レベルは低下し、NEU1 レベルは上昇した。*NEU3* の導入によって、アポトーシスが抑制され、Bcl-2 の上昇、caspase 発現の低下が起こった。さらに、siRNA によりこの遺伝子をノックダウンすると、アポトーシスの促進がみられた。大腸がん組織には、NEU3 の反応産物と考えられるラクトシルセラミドの著しい蓄積が認められたが、これを培養細胞へ添加すると、ブチル酸によって誘導されたアポトーシスの抑制が起こった。以上の結果は、NEU3 高発現ががん細胞を細胞死から回避させていることを示している。NEU3 は細胞表層でマイクロドメイン、ラフトに局在しているので(42,43)、ガングリオシドの修飾を介して、アポトーシスのミトコンドリア経路やデスレセプター経路に影響を与えている可能性がある。したがって、これらの結果は、高発現した NEU3 がガングリオシドの修飾を介して、アポトーシスシグナリングを攪乱していることを推察させる。

同様な変化が他のがん組織でも起こっているかどうかを調

Table II. Malignant phenotype altered by transfection of mammalian sialidase genes.

Sialidase gene	References
Neu1 <i>in vivo</i> suppression of metastasis in murine melanoma (murine B16-BL6 cells) Suppression of tumor growth in murine melanoma <i>in vitro</i> reduced anchorage-independent growth (murine B16-BL6 cells) increased sensitivity to apoptosis (murine B16-BL6 cells) reduced cell growth (murine B16-BL6 cells)	(48)
Neu2 <i>in vivo</i> marked suppression of metastasis in murine melanoma (B16-BL6 cells) marked suppression of metastasis in colon adenocarcinoma (colon 26 adenocarcinoma) <i>in vitro</i> reduced cell invasion and motility (murine B16-BL6 cells) possible target: GM3 reduced cell invasion and motility (murine colon 26 cells) possible target:GM3 and sialylLe ^x no change in cell growth	(46,47)
Neu3 <i>in vivo</i> No significant changes in metastasis in murine melanoma (murine B16-BL6 cells) <i>in vitro</i> inhibition of differentiation (human prostate cancer cells) decreased sensitivity to apoptosis (human colon cancer cells) no significant change in cell growth (human colon and prostate cancer cells)	(44,49)

occur in other cancerous tissues, we extended our studies on prostate cancer (submitted, Kawamura, S., Li, Y., Li, D., Wada, T., and Miyagi, T.). An increase in *NEU3* mRNA level was detected in the most cases for cancer as compared with non-cancerous tissue. Furthermore, the mRNA level was found to be inversely correlated to differentiation grade of the cancer. For further understanding of the biological significance of the increased expression seen in prostate cancer, we analyzed two human prostate cancer cell lines, PC-3 and LNCap cells. Androgen-insensitive and apoptosis-resistant PC-3 cells expressed higher level of *NEU3* than androgen-sensitive LNCap cells, in sialidase activity as well as in the mRNA levels. Following induction of differentiation and apoptosis with sodium butyrate treatment, the sialidase expression of LNCap cells was down-regulated while expression of PSA, a prostate cancer marker, was elevated. In PC-3 cells *NEU3* overexpression increased Bcl-2 and Bcl-XL protein levels compared to control cells. These results suggest that up-regulation of *NEU3* sialidase leads to suppression of cell differentiation and apoptosis, and thus may be related to malignant properties of prostate cancer cells, as observed in colon cancer. The results on gene transfection into cancer cells are summarized in Table II.

D. Conclusion

The use of sialidase genes as tools has made it possible to elucidate some of their functions and the biological significance of their altered expressions in cancer. Further investigation of mammalian sialidase would clarify the molecular basis of numbers of pathological phenomena as a result of aberrant sialylation. In the observations described herein it would be the most important phenomena for cancer that the expression level

べるため、前立腺がんについても研究を行った。対照組織と比べて、*NEU3* mRNA レベルの上昇がほとんどのがん部に検出された(川村ら、投稿中)。さらに、この mRNA レベルとがんの分化度との間には逆相関関係が認められた。がん組織に認められた mRNA の上昇の意義を調べるため、前立腺がん細胞 PC-3 および LNCap 細胞について解析した。アンドロジェン不応性でアポトーシス抵抗性の PC-3 細胞は、アンドロジェン感受性の LNCap 細胞よりも高い *NEU3* mRNA および活性レベルを有していた。ブチル酸処理により分化やアポトーシスを誘導すると、LNCap 細胞のシアリダーゼが低下し、前立腺がん腫瘍マーカーである PSA が上昇した。PC-3 細胞で *NEU3* を過剰発現させると、対照細胞と比べて、Bcl-2 や Bcl-xL タンパクレベルが上昇した。この結果は、大腸がんの場合のように、*NEU3* 発現上昇が細胞分化やアポトーシスを阻害する方向へ導いており、前立腺がんの悪性形質に関わっていることを示唆している。がん細胞へのシアリダーゼ遺伝子導入に関する結果を表 II に示す。

D. おわりに

シアリダーゼ遺伝子をツールとして用いることによって、シアリダーゼの機能やがんにおける変異の意義の解析が可能となった。動物シアリダーゼの研究の展開によって、シアリル化異常の結果としての多くの病的現象の分子基盤が明らかになるものと期待される。本稿で述べた結果のうちで、がんに関する最も重要な点は、*NEU1* が悪性度を規定する重要な因子である

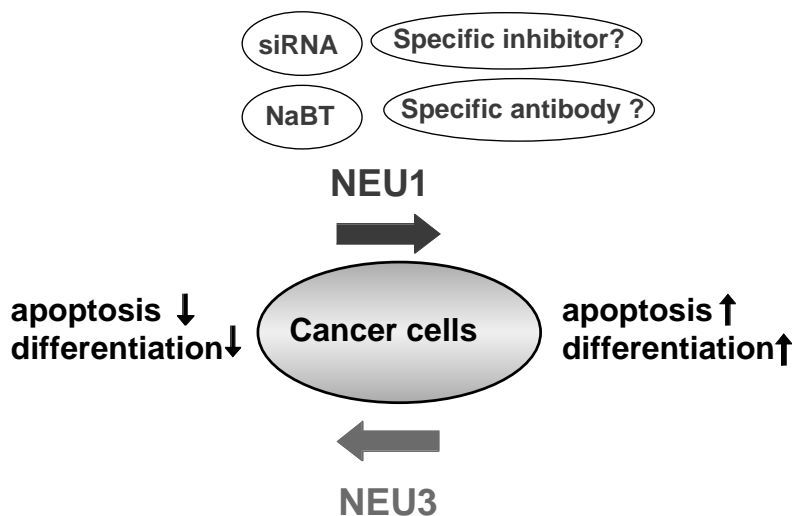


Fig. 1. Biological significance of altered sialidase expression in cancer and possible means for reversion of malignant phenotype

of Neu1 may be a critical and defining factor in malignancy, and that increased expression of Neu3 may be essential for the survival of various cancer cells. Investigation of the fourth sialidase (Neu4) gene in cancer is now required. If the alterations occur, what consequences do the alterations have? Whatever the mechanism and biological significance of altered expression are, sialidase could be a useful target for cancer diagnosis and therapy. As shown in Fig.1, discovery of specific inhibitor for NEU3, the use of small interfering RNA or specific antibody would open up the possibility of potential applications in a cure for cancer.

らしいこと、高発現 NEU3 が多くのがんの生存に重要であるかもしれないことである。4 番目のシアリダーゼ、Neu4 のがんにおける研究が待たれる。もし変化が起きているとすれば、それは何をもたらしているのであろうか。がん性変異の機構や意義がたとえ何であろうと、シアリダーゼはがんの診断や治療の有益な標的となる可能性がある。とくに、図 1 に示すように、NEU3 の特異的阻害剤の開発や siRNA、特異抗体の使用によってがん治療への応用に繋がるのが期待される。

References

1. Saito, M., and Yu, R.K. (1995) in *Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg A., ed.) pp.261–313, Plenum Press, New York
2. Monti, E., Preti, A., Venerando, B., and Borsani, G. (2002) *Neurochem. Res.* **27**, 649–63
3. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., and Hata, K. (2004) *Glycoconjugate J.* **20**, 189–198
4. Warren, L., and Spearing, C. W. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 489–492
5. Miyagi, T., Hata, K., Konno, K., and Tsuiki, S. (1992) *Tohoku J. Exp. Med.* **168**, 223–229
6. Miyagi, T., and Tsuiki, S. (1984) *Eur. J. Biochem.* **141**, 75–8132
7. Miyagi, T., and Tsuiki, S. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6710–6716
8. Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K., Handa, S., and Tsuiki, S. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **107**, 787–793
9. Bonten, E., van der Spoel, A., Fornerod, M., Grosveld, G., and d’Azzo, A. (1996) *Genes Dev.* **10**, 3156–3169
10. Milner, C.M., Smith, S.V., Carrillo, M.B., Taylor, G.L., Hollinshead, M., and Campbell, R.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4549–4558
11. Pshezhetsky, A.V., Richard, C., Michaud, L., Igdoura, S., Wang, S., Elsliger, M.A., Qu, J., Leclerc, D., Gravel, R., Dallaire, L., and Potier, M. (1997) *Nat. Genet.* **15**, 316–320
12. Carrillo, M.B., Milner, C.M., Ball, S.T., Snoek, M., and Campbell, R.D. (1997) *Glycobiology* **7**, 975–986
13. Igdoura, S.A., Gafuik, C., Mertineit, C., Saberi, F., Pshezhetsky, A.V., Potier, M., Trasler, J.M., and Gravel, R. A. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 115–121
14. Rottier R.J., Bonten, E., and d’Azzo, A. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 313–321
15. Miyagi, T., Konno, K., Emori, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yasui, A., and Tsuiki, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26435–26440
16. Ferrari, J., Harris, R., and Warner, T. G. (1993) *Glycobiology* **4**, 367–373
17. Monti E, P. A., Rossi E, Ballabio A., and Borsani G. (1999) *Genomics* **57**, 137–143
18. Fronza, C. L., Zeng, G., Gao, L., and Yu, R. K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 727–731
19. Hasegawa, T., Yamaguchi, K., Wada, T., Takeda, A., Itoyama, Y., and Miyagi, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8007–8015
20. Kotani, K., Kuroiwa, A., Saito, T., Matsuda, Y., Koda, T., and K.-Ochiai. S. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 250–258
21. Miyagi, T., Wada, T., Iwamatsu, A., Hata, K., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S., and Sawada, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5004–5011
22. Wada, T., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S., Kuwabara, M., Akita, H., and Miyagi, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 21–27
23. Monti, E. Bassi MT, Papini N, Riboni M, Manzoni M, Venerando B, Croci G, Preti A, Ballabio A, Tettamanti G, and Borsani G. (2000) *Biochem. J.* **349**, 343–351
24. Hasegawa, T., Feijoo Carnero, C., Wada, T., Itoyama, Y., and Miyagi, T. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 726–732
25. Comelli, E.M., Amado, M., Lustig, S.R., Paulson, J.C. (2003) *Gene* **321**, 155–161
26. 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., and Borsani, G. (2004) *Genomics* **83**, 445–453
27. Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Hassan, J.A., Morales, C.R., and Pshezhetsky, A.V. (2004) *J. Biol. Chem.*
28. Crennell, S. J., Garman, E., F., Laver, W.G., Vimir, E.R., and Taylor, G.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 9852–9856
29. Sato, K., and Miyagi, T. (1995) *Glycobiology* **5**, 511–516
30. Fanzani, A., Giuliani, R., Colombo, F., Zizioli, D., Presta, M., Preti, A., and Marchesini, S. (2003) *FEBS Lett.* **547**, 183–188
31. Fanzani, A., Colombo, F., Giuliani, R., Preti, A., and Marchesini, S. (2004) *FEBS Lett.* **566**, 178–182
32. d’Azzo A, Hoogveen, A., Reuser AJ, Robinson D, and Galjaard H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **79**, 4535–4539
33. van der Spoel, A., Bonten, E., and d’Azzo, A. (1998) *EMBO J.* **17**, 1588–1597
34. Lukong, K.E., Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Ahmad, A., Gahl, W.A., Lefrancois, S., Morales, C.R., and Pshezhetsky, A.V. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 46172–46181
35. Landolfi, N. F., Leone, J., and Womack, J. E. (1985) *Immunogenetics* **22**, 159–167
36. Chen, X. P., Enioutina, E. Y., and Daynes, R. A. (1997) *J. Immunol.* **158**, 3070–3080
37. Chen, X. P., Ding, X., and Daynes, R. A. (2000) *Cytokine* **12**, 972–985
38. Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., and Gabius, H. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11205–11211
39. Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Andre, S., Kaltner, H., Uhl, J., Ehemann, V., Cantz, M., and Gabius, H. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35917–35923
40. Proshin S., Yamaguchi, K., Wada T., and Miyagi T. (2002) *Neurochem. Res.* **27**, 841–846
41. Rodriguez, J. A., Piddini, E., Hasegawa, T., Miyagi, T., and Dotti, C. G. (2001) *P. J. Neurosci.* **21**, 8387–8395
42. Kalka, D., von Reitzenstein, C., Kopitz, J., and Cantz, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 989–993

43. Wang, Y., Yamaguchi, K., Wada, T., Hata, K., Zhao, X., Fujimoto, T., and Miyagi, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26252–26259
44. Sun, P., Wang, X. Q., Lopatka, K., Bangash, S., and Paller, A. S. (2002) *J. Invest. Dermatol.* **119**, 107–117
45. Miyagi, T., Sato, K., Hata, K., and Taniguchi, S. (1994) *FEBS Lett.* **349**, 255–259
46. Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., and Miyagi, T. (2002) *Int. J. Cancer* **97**, 180–185
47. Tokuyama, S., Moriya, S., Taniguchi, S., Yasui, A., Miyazaki, J., Orikasa, S., and Miyagi, T. (1997) *Int. J. Cancer* **73**, 410–415
48. Kato, T., Wang, Y., Yamaguchi, K., Milner, C. M., Shineha, R., Satomi, S., and Miyagi, T. (2001) *Int. J. Cancer* **92**, 797–804
49. Kakugawa, Y., Wada, T., Yamaguchi, K., Yamanami, H., Ouchi, K., Sato, I., and Miyagi, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 10718–10723

Received on July 22, 2004, accepted on September 10, 2004

Profile of the Author



Taeko Miyagi graduated from Tohoku University School of Medicine and received her PhD from Tohoku University, Graduate School of Medicine. She continued her research mainly on sialyltransferase and sialidase as a Research Associate and then as an Associate Professor with Prof. Shigeru Tsuiki in the Biochemistry Division of the Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University. In 1993 she moved to Miyagi Cancer Center Research Institute as Chief of the Biochemistry Division and in 2004 she became Director of the Research Institute. For the past decade, she has focused her research on structure and function of mammalian sialidases and their carcinogenic alterations. Her wish is to apply the sialidase work for cancer diagnosis and therapy.