

## Geranylinalool에 의한 LLC-PK1세포내 스핑고지질 생합성 억제

조양혁 · 이용문\*

충북대학교 약학대학

(Received December 2, 1998)

### Inhibition of *de Novo* Sphingolipid Biosynthesis by Geranylinalool in LLC-PK<sub>1</sub> Cells

Yang-Hyeok Cho and Yong-Moon Lee\*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763 Korea

**Abstract**—Geranylinalool, a polyisoprenoid compound, was found to block the early biosynthetic pathway of sphingolipids in LLC-PK<sub>1</sub> cells. Sphinganine, an intermediate in sphingolipid biosynthetic pathway, was abruptly accumulated in LLC-PK<sub>1</sub> cells at 2  $\mu$ M of fumonisin B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>), a specific inhibitor of sphinganine N-acyltransferase, for 24 hr. Geranylinalool lowered the FB<sub>1</sub>-induced elevation of intracellular sphinganine by 3.2% at the concentration of 2  $\mu$ M FB<sub>1</sub> and 50  $\mu$ M geranylinalool. *l*-Cycloserine, an inhibitor of serine-palmitoyl transferase, was used as a positive control to evaluate the inhibitory effect of geranylinalool. These results suggest that geranylinalool may inhibit the serine-palmitoyl transferase, the first enzyme in *de novo* sphingolipid biosynthesis, resulting in the altered regulation of sphingolipid metabolism.

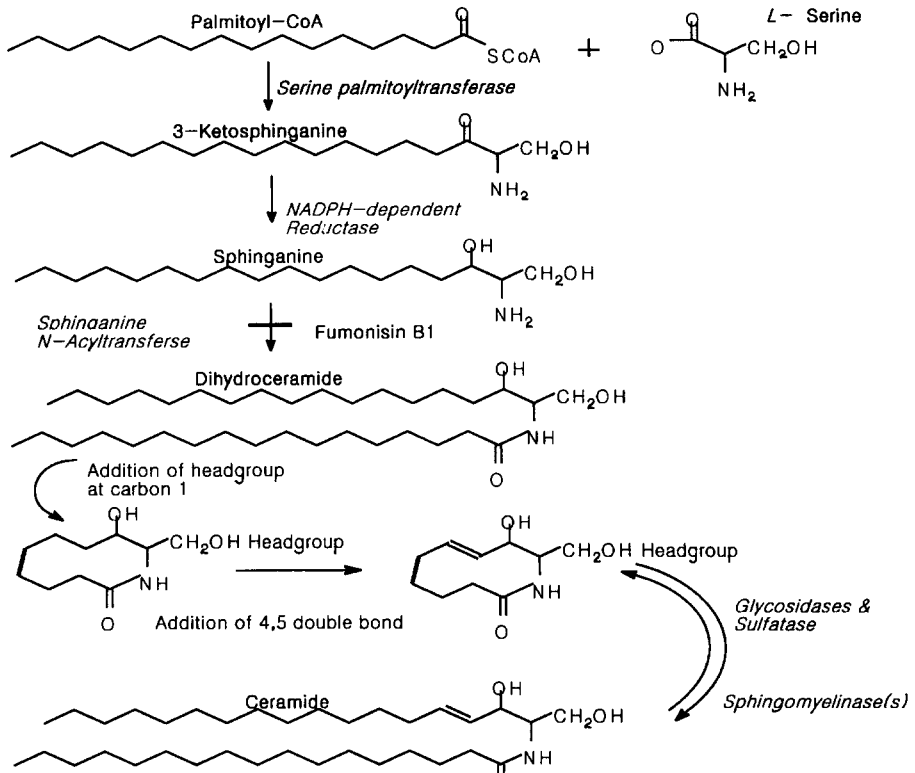
**Keywords** □ Geranylinalool, sphinganine, fumonisin B<sub>1</sub>, LLC-PK<sub>1</sub> cells.

스핑고지질은 인지질과 마찬가지로 세포막 구성에 없어서는 안될 중요한 인자이며, 세포내에서 인지질보다 낮은 함량을 나타내고 있으나, 혈소판 등에서도 상대적으로 높은 함량을 나타낸다.<sup>1)</sup> 최근 TNF- $\alpha$ , Fas ligand, IL-1등의 외부자극에 의하여 sphingomyelinase의 활성화로 유리되는 ceramides가 apoptosis의 정보전달을 매개하는 second messenger로서 알려져왔다.<sup>2,3)</sup> 그러나 외부자극이 없을 경우, ceramides를 비롯한 스핑고지질의 생성은 *l*-serine과 palmitoyl CoA로부터 시작되는 일련의 스핑고지질의 합성경로를 거치게 된다.<sup>4)</sup> 이중 일부는 단당류와 결합한 cerebrosides, 단당류가 결합한 gangliosides를 구성하게되며 phosphocholine과 재결합하면 세포막중의 sphingomy-

elin으로 되돌아간다. 한편, ceramides의 대사과정은 sphingosine을 거쳐 sphingosine-1-phosphate를 거치는 경로를 택하게 된다.<sup>5)</sup> 이와같이 각각의 대사경로에서 나온 다양한 스핑고지질류는 서로 다른 생리활성을 나타낸다.

따라서 세포내의 스핑고지질 함량의 조절은 세포의 증식, 분화 뿐만 아니라 세포사에 깊이 관련되어 있으며, 스핑고지질의 대사를 조절함으로써 새로운 활성물질, 또는 의약활성 후보물질을 찾아낼 수 있을 것이다. 이와같은 예로 Fugita 등은 동충하초(*Isaria sinclairii*)로부터 정제한 ISP-1(Myriocin)이<sup>6)</sup> 스핑고지질합성의 첫단계인 serine palmitoyltransferase를 억제하여 세포내의 스핑고지질의 함량을 고갈시키며, 이 효과는 T-cells의 proliferation을 억제하여 궁극적으로는 T-cells의 분화, 증식을 억제하여 면역억제 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup>

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0431-261-2825 (팩스) 0431-268-2732



**Fig. 1** — Fumonisin B<sub>1</sub> accumulates sphinganine by inhibiting sphinganine N-acyltransferase in *de novo* sphingolipid biosynthetic pathway.

Fumonisin B<sub>1</sub>은 식물질병에 관련한 진균류(*Fusarium moniliforme*)로부터 정제되어 얻어진 sphingoid골격을 갖는 진균독소의 일종으로, 배양세포내에 첨가하면 스핑고지질 생합성 단계중 sphinganine N-acyltransferase를 선택적으로 억제하여 세포내에서 sphinganine을 축적한다(Fig. 1).<sup>8)</sup> 이와같은 Fumonisin B<sub>1</sub>의 효과는 결과적으로 sphingosine과 sphinganine의 세포내의 balance를 파괴하여 장기간의 투여에 의한 세포독성을 나타내게된다.<sup>9)</sup>

*l*-Cycloserine은 스핑고지질 생합성의 첫단계 효소인 serine palmitoyltransferase의 기질중의 하나인 *l*-serine의 이성체이므로 이 효소에 대하여 경쟁적으로 작용하여, 스핑고지질의 생합성을 선택적으로 억제한다.<sup>10)</sup>

세포내의 sphingosine 및 sphinganine의 함량 측정은 1급아민기에만 선택적으로 반응하는 orthophthalaldehyde(OPA)와 2-mercaptoethanol를 이용한 형광유도체화 방법을 이용하여 HPLC 및 형광검출기를 사용하여 세포내 변화를 측정할 수 있다.<sup>11)</sup>

본 실험에 사용한 geranylgeranylol은 isoprenoid화합물로 그 화학적 구조가 geranylgeraniol과 유사하다. geranylgeraniol은 Ras의 post-translational farnesylation을 억제하게 되고 이는 oncogenic Ras의 세포막으로의 이동 및 transforming potential을 억제하게 된다. 따라서 geranylgeraniol은 Ras를 개재하여 세포 증식을 조절하는 중요한 인자임이 알려져 있다.<sup>12)</sup>

본 연구는 이와같은 배경에서, geranylgeranylol이 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 스핑고지질의 생합성을 차단하여 세포내의 스핑고지질의 고갈효과가 있음을 발견하였다. 스핑고지질의 고갈은 배양세포를 장시간에 걸쳐 배양할 경우, 세포의 정상적인 증식을 강하게 저해할 것으로 예상할 수 있다. 따라서, 본 연구결과는 isoprenoid화합물의 새로운 작용기구를 발견한 점에 그 의의가 있다.

## 실험방법

**실험재료 및 기기** - DMEM/F12와 heat-inac-

tivated FBS는 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였고, LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 ATCC (No. CL-101)(Rockville, MD, U.S.A.)에서 구입하였다.

실험에 사용한 geranyllinalool은 Fluka사(Buchs, Switzerland)에서 구입하였고, sphingosine, sphinganine, *l*-cycloserine 및 2-mercaptoethanol은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, OPA시약은 Nakalai Tesque(Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

기타 실험에 사용한 유기용매들은 모두 analytical grade이상의 특급을 사용하였다.

**HPLC 장치 및 분리조작** - 측정에서 사용한 HPLC system은 low pressure pump(L-6200 Series, Hitachi), Rheodyne 7125 injector 및 형광검출기(FP-920, Jasco)로 구성하였다. 분리에 사용한 역상컬럼은 Cosmosil ODS C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm L; Nakalai Tesque)를 사용하였다. 유속은 항상 1.0 ml/min으로 고정하였으며, 역상컬럼의 온도는 40°C를 유지하였다. OPA유도체화된 스펅고지질은 용리액 87% acetonitrile을 사용하여 isocratic용리조건에서 용출하였으며, 분리된 sphinganine의 OPA유도체를 여기과장 340 nm, 형광과장 455 nm에서 검출하였다.

**LLC-PK1 세포의 배양 및 geranyllinalool처리** - LLC-PK1세포는 DMEM/F12배지에 sodium bicarbonate를 가하여 pH를 7.4로 조절한 후, 10% heat-inactivated FBS의 농도가 되도록 하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 조건에서 배양하였다. 스펅고지질의 생합성 억제활성의 관찰은 Nunc 6 well-plate에 LLC-PK1 세포를 5 × 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 세포의 suspension을 가하였다. 12시간의 pre-incubation 후, 2 μM Fumonisin B<sub>1</sub>을 가하고 24시간 배양하여 충분히 세포내 sphinganine농도의 상승을 유발한 것을 negative control로 하였다. 측정하고자 하는 geranyllinalool 등과 2 μM Fumonisin B<sub>1</sub>을 배양액에 소량씩 점적한 후, 계속하여 24시간동안 더 배양하였다. 이때, Fumonisin B<sub>1</sub>과 *l*-cycloserine을 함께 가한 것을 positive control로 하여 geranyllinalool의 효과와 비교하였다.

**Sphinganine의 측정** - 세포내의 sphinganine의 변화는 다음과 같이 측정하였다. Geranyllinalool 등을 처리하고 일정 시간 경과 후, 2% trypsin-EDTA로 처리

하여 모든 세포를 2.0 ml Eppendorf tube에 옮겼다. 모든 세포는 1 ml의 PBS 완충액으로 2회 연속하여 세척한 후, 여기에 chloroform-methanol혼액(1:2, v/v) 1.5 ml와 내부표준물질인 C<sub>20</sub>-sphinganine(40 pmol/40 ml) 에탄올용액 40 μl를 넣어 충분히 혼합한 후 세포내의 총 지질을 추출하였다. 지질이 이행된 유기층을 따로 모아 1 ml의 알칼리 용액(증류수 250 ml에 1.0N-KOH 500 μl를 가하여 용시 조제하였다, pH 9.5)으로 2회 세척한 후, 무수Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 통과시켜 수분을 완전히 제거하였다. 상기의 추출조작을 다시 1회 반복하여 얻은 유기용매층을 speed vacuum concentrator에서 완전히 건조하였다.

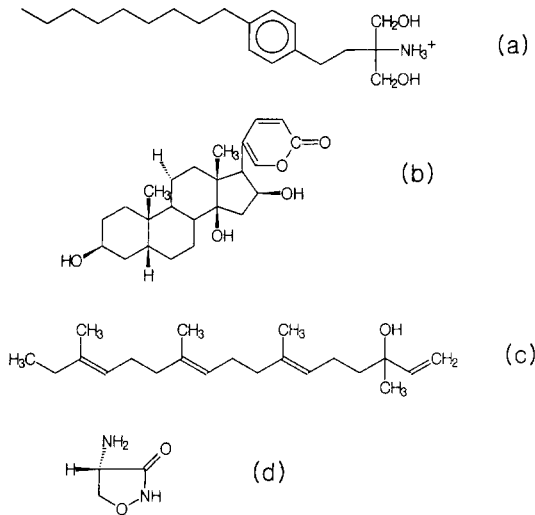
Sphinganine을 측정하기 위하여 사용한 OPA에 의한 형광표식은 Merrill등에 의하여 보고된 방법을 사용하였다.<sup>11)</sup> 즉, 3% boric acid buffer(KOH를 사용하여 pH 11.0으로 조정함) 99 ml에 0.4M OPA의 에탄올용액 1.0 ml를 가하여 잘 섞은 용액을 OPA시액으로 하였다. 유도체화는 배양세포로부터 추출, 건조된 pellets을 에탄올 40 μl에 다시 녹인후, OPA시액 100 μl와 2-mercaptoethanol 20 μl를 순차적으로 가하고 상온에서 20분간 방치하여 유도체화 반응을 시켰다. 반응액중 10 μl를 HPLC 장치에 주입하여 용출되는 형광피크의 면적을 측정하여 내부표준물질로 사용한 C<sub>20</sub>-sphinganine과의 형광 세기비로 작성한 calibration 직선식으로부터 sphingosine량을 산출하였다.

**단백질 함량 측정 및 통계처리** - 단백질함량의 측정은 Bradford법을 이용하여 bovine serum albumin 표준액으로부터 계산된 표준경량곡선( $y = 0.078x + 0.038$ ; cell number =  $x \times 10^3$ )에서 그 함량을 산출하였다.<sup>13)</sup> 결과에 대한 통계학적 계산은 Student's *t*-test를 통하여 그 유의성을 판정하였다.

## 결과 및 고찰

스펅고지질의 생합성과정은 palmitoyl CoA와 *l*-serine과의 축합에 의하여만 세포내에 필요한 스펅고지질이 공급되는 유일한 경로로서, 근래에 들어 활발히 연구되고 있는 ceramides, gangliosides 및 sphingosine-1-phosphate등의 활성발현과 직접 관계가 있다.

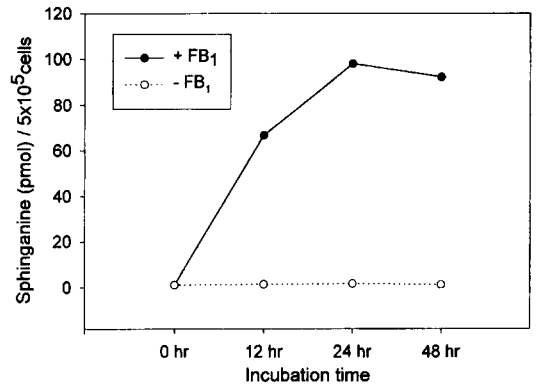
Fumonisin B<sub>1</sub>의 장기간에 걸친 노출에서 오는 독성 발현, ISP-1(Myriocin)에 의한 스펅고지질의 고갈 및 이에 동반한 CTLL-2 cells에서의 면억억제활성 저하효



**Fig. 2**—Chemical structures for the comparison of sphingolipid biosynthesis inhibition. (a) FTY720, (b) bufalin, (c) geranylinalool, (d) *l*-cycloserine.

과등은 최근에 발표된 대표적인 예이다.<sup>14)</sup> 따라서 스펅고지질의 총합량을 조절할 수 있는 조절제를 개발하고자 세포사 또는 분화를 유도하는 것으로 알려진 FTY720, bufalin 및 geranylinalool에 대하여 스펅고지질의 조절활성을 측정하고자 하였다(Fig. 2). 세포내의 sphinganine의 함량은 세포의 종류에 따라 약간씩 차이가 있으나 약 1.0~10 pmol/10<sup>6</sup> cells의 농도범위에 있다. 따라서 스펅고지질 생합성 경로를 억제함으로써 감소하는 세포내 sphinganine을 직접 측정하기에 난점이 있다. 따라서 본 실험방법은 Fumonisin B<sub>1</sub>이 sphinganine *N*-acyltransferase를 선택적으로 차단하여 결과적으로 스펅고지질이 생합성경로중 sphinganine으로 축적되는 점에 착안하였다(Fig. 1). 지금까지 스펅고지질의 생합성차단제로서 알려진 *l*-cycloserine은 serine palmitoyl-transferase의 기질인 *l*-cycloserine에 대하여 경쟁적으로 작용하여 스펅고지질의 생합성을 강하게 억제하는 물질로 알려져 왔다. 따라서 본 실험에서는 *l*-cycloserine의 스펅고지질 생합성 억제효과를 positive control로 하였다.

Geranylinalool의 스펅고지질 생합성억제효과를 측정하기 위하여 먼저 LLC-PK<sub>1</sub> cells에서 2 μM의 Fumonisin B<sub>1</sub>투여로 sphinganine *N*-acyltransferase효소의 활성을 차단함으로써 상승되는 sphinganine농도를 시간별로 측정하였다. 그 결과 (Fig. 3에서 보는 바와 같이) 상승하는 sphinganine농도는 24시간에서 최대



**Fig. 3**—Fumonisin B<sub>1</sub> inhibits sphinganine *N*-acyltransferase activity and accumulates sphinganine in a time-dependent manner. LLC-PK<sub>1</sub> cells treated with (●) or without (○) 2 μM Fumonisin B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>) were harvested and sphinganine was measured after OPA fluorogenic derivatization in HPLC system. Inhibitory effects were estimated by increased levels of sphinganine. Sphinganine content was normalized in pmols/5×10<sup>5</sup> cells (61.7 μg protein) by Bradford protein assay. The results were expressed as the mean value of duplicated experimental.

고 그 이후에는 포화됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 이때 Fumonisin B<sub>1</sub>을 투여하지 않은 control군에서는 sphinganine함량의 변화가 없었다. 이 조건에서 Fumonisin B<sub>1</sub>에 의한 독성은 관찰되지 않았으며, Bradford법에 의하여 배양세포의 단백질량을 측정하여 상승한 sphinganine의 양을 보정하였다.

이와같은 sphinganine을 marker로한 측정방법의 신뢰성을 검토하고자 이미 serine palmitoyl-transferase의 활성억제제로 알려져 있는 *l*-cycloserine을 2 μM Fumonisin B<sub>1</sub>과 함께 24시간 배양하여 *l*-cycloserine의 고농도 투여에 의하여 예상되는 sphinganine의 감소가 나타나고 있는지를 확인하였다. 그 결과 Fumonisin B<sub>1</sub>에 의하여 상승되었던 sphinganine은 함께 투여한 *l*-cycloserine에 의하여 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 1.0 mM을 투여하였을 경우, Fumonisin B<sub>1</sub>의 단독투여에 의한 상승농도의 약 8% 이하로 sphinganine농도를 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 4). 한편 Fig. 1에서 보는 바와같이 스펅고지질의 생합성 경로는 한쪽방향으로만 진행되기 때문에 Fumonisin B<sub>1</sub>에 의하여 상승된 sphinganine은 그대로 세포내에 머무르게 된다. 따라서 serine palmitoyl-

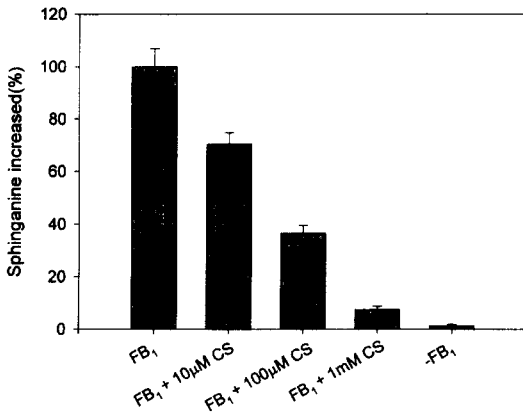


Fig. 4—*I*-Cycloserine (CS) inhibits the sphinganine level elevated by 2 µM Fumonisin B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>) for 24 hr co-incubation in a dose-dependent manner. The results are expressed sphinganine content on 24hr as percent of positive control (+FB<sub>1</sub>) and the bar is depicted as the mean±S.E. of three independent experimentals.

transferase의 억제활성을 갖는 화합물의 스크리닝에 상승된 sphinganine을 monitoring함으로써 판정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

Geranyllinalool은 그 화학구조가 geranylgeraniol과 유사하여, geranylgeraniol이 갖는 Ras의 farnesylation의 억제, Ras의 세포막이동의 억제 활성 및 apoptosis유도 활성이 있을 것으로 예상할 수 있다.<sup>14)</sup> Bufalin은 두꺼비비의 독으로 알려진 bufadienolides중의 한 성분으로 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase의 강한 억제제로 알려져 있다.<sup>15,16)</sup> FTY720은 동충하초(*Isaria sinclairii*)로부터 분리한 myriocin을 기본골격으로하여 합성한 화합물로, CTLL-2 cells에 면역억제활성을 갖으며, 또 10 µM 정도에서 apoptosis를 유발하는 것으로 보고되어 있다.<sup>7)</sup> 따라서 이와같이 apoptosis의 다양한 신호전달 과정에 관여하는 물질에 대하여 일차적 스크리닝을 목적으로, sphinganine의 변화량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 5에서 보는 바와같이), 50 µM의 geranyllinalool에서 positive control로 사용한 100 µM *I*-cycloserine보다 sphinganine의 억제효과가 강하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 5). 이와같은 결과는 geranyllinalool이 스펡고지질의 생합성 초기단계를 측정한 다른 화합물들보다 강하게 억제함을 의미한다. 최근, Merrill 등에 의하여 Myriocin을 사용하여 본 활성측정법과 유사한 방법을 사용하여 측정된 결과, 상당히 sphinganine상승을 억제하는 결과를 보고하였다.<sup>17)</sup> 반면, 본 실험에 사용한

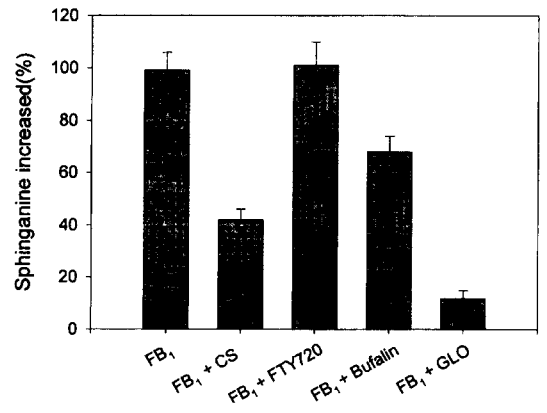


Fig. 5—Geranyllinalool (GLO) strongly inhibits the sphinganine level elevated by 2 µM Fumonisin B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>) for 24 hr co-incubation among tested compounds (*I*-cycloserine, 100 µM; FTY720, 20 µM; bufalin, 20 nM; geranyllinalool, 50 µM). The results are expressed sphinganine content at 24 hr as percent of positive control (+FB<sub>1</sub>) and the bar is depicted as the mean±S.E. of three independent experimentals.

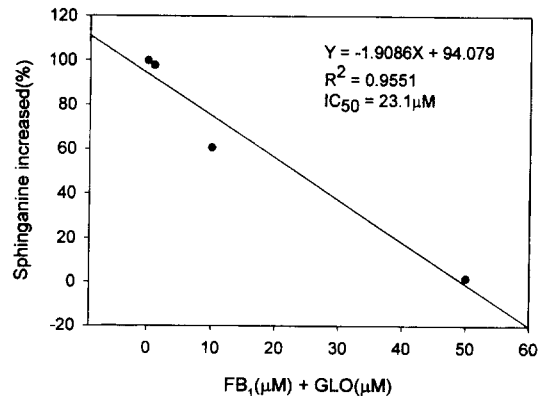


Fig. 6—Geranyllinalool (GLO) inhibits the sphinganine level elevated by 2 µM Fumonisin B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>) for 24 hr co-incubation in a dose-dependent manner. The results are expressed as sphinganine content at 24 hr as percent of positive control (+FB<sub>1</sub>). The results were expressed as the mean value of duplicated experimental.

Myriocin의 유사체인 FTY720은 전혀 sphinganine상승에 대한 억제효과가 나타나지 않았다. 이와같은 현상은 화학구조와 활성의 상관성이 좀더 검토되어야 하나, 미세한 화학구조의 차이가 스펡고지질 생합성과정의 조절에 영향을 미칠수 있음을 의미한다. 스펡고지질의 생합성 억제활성을 나타내는 geranyllinalool에 의한 sphinganine생성 억제활성의 IC<sub>50</sub>은 23.1 µM이었다

(Fig. 6).

스핑고지질의 대사경로중 생합성 경로는 이 경로에 관여하고 있는 효소들이 아직 cloning되어 있지 않아 주로 cell-free system을 사용한 효소활성 측정이나, 지질대사물의 변동으로 그 효과를 알 수 있다. Geranyllinalool에 의한 �핑고지질 생합성경로의 조절에 대하여 본 논문에서 처음 시도하였다. 이와같은 geranyllinalool에 의한 �핑고지질 생합성 저해활성은 세포의 증식 억제 또는 세포사멸과 깊이 관련이 있을 것으로 추정되며, 앞으로  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation에 미치는 영향이나, apoptosis marker등을 사용한 검토를 추가로 수행할 예정이다.

## 결 론

LLC-PK<sub>1</sub> cells에 Fumonisin B<sub>1</sub> 2  $\mu\text{M}$ 을 투여하면 약 24시간에서 sphinganine의 축적이 최대임을 관찰할 수 있었다. 또한, �핑고지질의 생합성 첫단계에 필요한 l-serine과 경쟁적으로 serine palmitoyl-transferase에 결합하여, �핑고지질의 생합성을 억제하는 l-cycloserine은 Fumonisin B<sub>1</sub>에 의하여 상승한 세포내 sphinganine을 용량의존적으로 감소시켰다. 따라서 l-cycloserine을 positive control로 하여 apoptosis inducer로 보고된 FTY-720, bufalin 및 geranyllinalool에 대하여 �핑고지질 생합성 억제활성을 측정 한 결과, geranyllinalool에서 강한 억제활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub>은 약 23  $\mu\text{M}$ 이었다. 이와같은 결과는 geranyllinalool이 세포내 �핑고지질의 고갈을 유발하여, 세포의 정상적인 성장의 억제 또는 apoptosis를 유발할 수 있는 agent로서 개발할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 96년도 교육부 학술조성연구비(GE96-101)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Spiegel, S. and Merrill, A. H., Jr. : Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*, **10**, 1388 (1996).
- 2) Hannun, Y. A. : The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3125 (1994).
- 3) Ballou, L. R., Lautederkind, S. J. F., Rosloniec, E. F. and Raghov, R. : Ceramide signaling and the immune response. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1301**, 273 (1996).
- 4) Hanada, K., Nishijima, M. and Akamatsu, Y. : A temperature-sensitive mammalian cell mutant with thermolabile serine palmitoyltransferase for the sphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22137 (1990).
- 5) Merrill, A. H., Jr., Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayman, J. A., Schroeder, J. J., Riley, R. T., Voss, K. A. and Wang, E. : Sphingolipids-The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 208 (1997).
- 6) Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., Chiba, K., Hoshino, Y. and Okumoto, T. : Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J. Antibiotics*, **47**(2), 208 (1994).
- 7) Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T. and Kawasaki, T. : Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **211**, 396 (1995).
- 8) Wang, E., Riley, R. T. and Merrill, A. H., Jr. : Analysis of urinary long chain sphingoid bases as biomarkers for consumption of fumonisins. *FASEB J.*, **9**, A456 (1995).
- 9) Wang, E., Nerred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T. and Merrill, A. H., Jr. : Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 14486 (1991).
- 10) Shimabukuro, M., Higa, M., Zhou, Y. T., Wang, M. Y., Newgard, C. B., Unger, R. H. : Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32487, (1998).
- 11) Merrill, A. H., Jr., Wang, E., Mullins, R. E., Jamison, W. C. L., Nimkar, S. and Liotta, D. C.

- : Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **171**, 373 (1988).
- 12) Kitten, G. T. and Nigg, E. A. : The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxy methylation, and nuclear membrane association of laminin B2. *J. Cell Biol.*, **113**, 13 (1991).
- 13) Weiner, G. J. and Kaminski, M. S. : Anti-idiotypic antibodies recognizing stable epitopes limit the emergence of idiootype variants in a murine B cell lymphoma. *J. Immunol.*, **144**, 2436 (1990).
- 14) Ohizumi, H., Masuda, Y., Nakajo, S., Sakai, I., Ohsawa, S. and Nakaya, K. : Geranylgeraniol is a potent inducer of apoptosis in tumor cells. *J. Biochem.*, **117**, 11 (1995).
- 15) Watabe, M., Kawazoe, N., Masuda, Y., Nakajo, S. and Nakaya, K. : Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells. *Cancer Res.*, **57**, 3097 (1997).
- 16) Watabe, M., Nakajo, S., Yoshida, T., Kuroiwa Y. and Nakaya, K. : Treatment of U937 cells with bufalin induces the translocation of casein kinase 2 and modulates the activity of topoisomerase II prior to the induction of apoptosis. *Cell Growth & Differentiation*, **8**, 871 (1997).
- 17) Schmelz, E. M., Dombrink-Kurtzman, M. A., Roberts, P. C., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Merrill, A. H. Jr. : Induction of apoptosis by Fumonisin B<sub>1</sub> in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **148**, 252 (1998).