

アルギン酸の構造と RAW264.7 細胞に対する TNF- α 放出誘導活性の構造活性相関に関する研究

倉智 麻木, 宮島 千尋^{*1}, 岩本 佳子^{*2}, 村松 毅^{*2}, 中島 琢自^{*3}
山口 健一, 小田 達也

Structure-activity relationship of alginates to induce TNF- α secretion from RAW264.7 cells

Maki KURACHI, Chihiro MIYAJIMA^{*1}, Yoshiko IWAMOTO^{*2}, Tsuyoshi MURAMATSU^{*2},
Takuji NAKASHIMA^{*3}, Kenichi YAMAGUCHI and Tatsuya ODA

Alginate is an acidic polysaccharide present in seaweed, and consists of mannuronate (M) and guluronate (G). This polysaccharide is widely used as food additive, cosmetic and pharmaceutical materials inducing thickener, humectant, and disintegrator of tablet because of its characteristic physicochemical feature and the biologically innocent property. Several bioactivities of alginates such as in vivo antitumor activity and activation of immune system have been reported. However, there is no detailed study regarding the structure-activity relationship of alginates. To clarify this point, we examined the effect of alginates with varying molecular weights and M/G ratio to induce tumor necrosis factor- α (TNF- α) release from a murine macrophage cell line, RAW264.7 cells. Range of molecular size and M/G ratio of highly purified alginate polymers used in this study were 9,000-38,000 and 1.50-3.17, respectively. Among the alginates tested, I-S, the highest molecular weight of alginate (MW 38,000, M/G 2.24), showed the most potent TNF- α -inducing activity. Alginates with molecular weight less than 20,000, and polyguluronate (MW 4,000) and polymannuronate (MW 4,600) had no or only a trace activity. Furthermore, among the alginates with similar molecular, alginates having higher M/G ratio tended to have higher activity. These results suggest that M/G ratio also influences the TNF- α inducing activity in addition to the molecular weight. By the analysis of the effects of three MAP kinase inhibitors on I-S and LPS-mediated induction of TNF- α , the inhibition profile of I-S by these inhibitors was different from that of LPS. Namely, I-S-mediated TNF- α induction was more significantly inhibited by JNK and p41 MAP kinase (ERK) inhibitors than that of lipopolysaccharide (LPS). These results suggest that the underlying mechanism of I-S-mediated TNF- α release may be different from that of LPS in terms of the major MAP kinases involved.

Key Words : alginate, RAW264.7 cells, macrophage, TNF- α , MAP kinase

褐藻類に含まれるアルギン酸はその乾燥重量の約30%を占めており、藻体細胞壁構成多糖あるいは細胞間充填物質として存在し、細胞形態の安定化に関与していると考えられている。アルギン酸は β -D-マンヌロン酸（以下Mと表記）と α -L-グルロン酸（以下Gと表記）の2種類のウロン酸から構成されており、これらの単糖がグリコシド結合により種々の割合で結合しており、藻体から得られるアルギン酸は直鎖状

のポリウロニド多糖体構造を形成している。その分子中には、Mが連なった Poly- β -D-mannuronate (PM) 部位、Gが連なった Poly- α -L-guluronate (PG) 部位、及び M と G が無作為に連なった MG ランダム部位が存在し、藻体中には、これら3つのドメインの存在比率が異なる多様な物性を有するアルギン酸が混在している¹⁾。従って、アルギン酸分子の構造を正確に把握することは大変難しいと言える。

*1 株式会社キミカ

*2 別府大学食物栄養学部

*3 (財)長崎県産業振興財団

アルギン酸は酸性領域では水に不溶であるが, 分子中のカルボキシル基が水酸化アルカリ金属や炭酸アルカリ金属などと塩を形成する条件下では高粘性の水溶液となる。同様に多価金属塩とPG部位のカルボン酸がキレート性の塩を形成することによりアルギン酸塩水溶液はゲル化する。従って, アルギン酸ナトリウムの水溶液にカルシウムイオンを含む水溶液を添加すると, 速やかにイオン交換が生じ, カルシウム-アルギン酸のゲルが形成される。PMは比較的平坦なシート構造を有しているが, PGは捻じれたポケット構造を有しており, このポケット構造にカルシウムイオンなどの多価イオンが侵入して, エッグボックスに例えられる架橋点を形成することによってゲル化すると考えられている^{2, 3)}。従って, G含量が高いアルギン酸ほどカルシウムイオン存在下で固いゲルを形成することになる。このカルシウムアルギン酸ゲルは, 種々の機能を有する細胞の固定剤として幅広く利用されている⁴⁾。例えば, カルシウムアルギン酸ゲルにホルモン生成細胞をカプセル化したものは, 糖尿病や副甲状腺病への治療に用いられている^{5, 6)}。アルギン酸は, 医療品以外にも食品の増粘剤や化粧品保湿成分, 繊維加工など幅広い用途に活用されている。このようにアルギン酸は多岐にわたり使用されているが, アルギン酸の分子量, MとGの混成比(M/G比)は, 褐藻類の生息場所, 季節, 藻体部位によって様々であり, その化学構造と物性あるいは生物活性との詳細な関連性についてはまだ解明されていない。

アルギン酸は他の多くの海藻多糖と同様に, 多くの哺乳動物の消化器官では分解されず, 腸内細菌によってわずかに分解される程度である。従ってアルギン酸は食物繊維として良質のものであり, 我々がコンブやワカメを摂取した場合, それらの成分であるアルギン酸は整腸作用を果たすと考えられている。さらに, 食物中のコレステロールをエッグボックスで構成された網目構造に包み込み, そのまま排泄する性質があるとの指摘がある。この働きが腸におけるコレステロールの吸収を妨げ, 血中のコレステロールを低下させる効果が期待できることから, アルギン酸を含む飲料食品がサプリメントとして市販されている。このようにアルギン酸は特異的な物理化学的性質を有することから幅広く利用されている⁷⁾。一方, 哺乳動物細胞に対する生理活性作用について, Otterleiら⁸⁾は*Pseudomonas aeruginosa* DE 127株より産生した分子量50,000以上のアルギン酸ポリマー, 及びコンブから得られた分子量200,000の高分子アルギン酸がマウス由来線維肉腫細胞株細胞より高い腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor- α ; TNF- α)の産生誘導活性を有し, コンブから得られた比較的低分子量でPGを多く含むアルギン酸には活性がないことを報告している。最近, Iwamotoら⁹⁾は, 褐藻類より得られたアルギン酸を*Pseudoalteromonas* sp.由来のアルギネートリアーゼ(アルギン酸分解酵素)で消化させた分解産物(分子量の異なるオリゴマーの集合体)にヒト単球細胞からのTNF- α 放出誘導を確認している。しかし, 褐藻類のアルギン酸の分子量およびMGランダム比率(M/G比)の違いによるTNF- α 産生・放出誘導は未だ不明である。

本研究では, 市販されているアルギン酸の平均分子量およびM/G比を特定し, アルギン酸のマウスマクロファージ系株細胞(RAW264.7細胞)に対する作用, 特にTNF- α 産生・放出の誘導について詳細に検討し, アルギン酸の構造と生物活性との相関に関する知見を得ることを目的とした。

実験方法

アルギン酸は各社から販売されているものを使用した。用いたアルギン酸は以下の通りである。I-S, I-5, I-3, IL-2, IL-2G, IL-2M, I-1, ULV-3は株式会社キミカより提供して頂いた。SIGMA 3500 cps, SIGMA 250cpsはSIGMA社製を, Nacalaiはナカライテスク社より購入した。PG, PMはナカライテスク社製のアルギン酸より酸処理により調整した^{1, 10)}。

RAW264.7細胞はAmerican Type Culture Collection(ATCC)から入手した。RAW264.7細胞の培地は, RPMI 1640培地に抗生物質(Benzyl Penicillin Potassium, Streptomycin Sulfate, Wako社製)を各々100 μ g/mlとなるように添加し, 56°C, 30分間熱処理をした牛胎児血清(FBS)を10%(v/v)添加したものを用いた。細胞の培養は, -80°Cに保存されている細胞を融解し, 約5 mlの培地を加え細胞を分散させた後, 遠心分離により細胞をペレットとし, 上清を捨て, 再び細胞を同培地約5 mlに懸濁させ, 培養フラスコ(ファルコン社製, 25 cm²プラスチックフラスコ)に移し, 37°C, 5% CO₂インキュベーターで培養した。一晚放置し, 細菌などの混入がないこと, また, 細胞が培養フラスコの底面に付着していることを確認して, 培地交換・継代培養を行った。RAW264.7細胞の継代培養は, フラスコ内の培地を除き0.2%trypsin/0.025%EDTA(トリプシン)溶液を添加し, 37°C, 5% CO₂インキュベーター内で細胞が個々に分かれるまで静置後, フラスコ内のトリプシン溶液を取り除き, 再びガス培養器内30分ほど静置した。フラスコ底面から細胞が剥がれてきたことを確認してから, 10%FBSを含むRPMI 1640培地を加え, 細胞を遠心により回収し, 新たな培養フラスコに適量の細胞数を分散させ, 再び5%CO₂インキュベーターで培養を行った。

アルギン酸の分子量の測定には3,5-dinitrosalicylic acid法を用いた^{11, 12)}。3,5-dinitrosalicylic acid 1gに20 mlの2 M NaOHと50 mlの水を加えて加温しながら溶解させた。さらに30 gの酒石酸ナトリウムカリウム四水和物を加えて溶解させ, 水を加えて100 mlとし, これを3,5-dinitrosalicylic acid 試薬とした。アルギン酸溶液を1.5 ml, 3,5-dinitrosalicylic acid 試薬を1 ml加えよく攪拌し5分間沸騰浴させた。その後流水中で室温まで冷却し, 5.0 mlの水を加えて攪拌し, 540 nmで吸光度を測定した。なお, 検量線作成の標準にはガラクトロン酸を用いた。

円偏光二色性(CDスペクトル)により, 各種アルギン酸のマンヌロン酸とグルロン酸の構成比(M/G比)を算出した¹³⁾。CDの測定には, 円偏光二色性分散計J500A(日本分光製)を用いた。測定中は, 装置内に窒素ガスを流入させ空

気中の酸素の影響をできるだけさけた。また測定条件は以下のように行った。溶媒：10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5), 波長：190~260 nm, セル：1 mm, 感度：1 m⁰/cm, 時定数：8 sec, 走査速度：20 nm/min, 実験室内温度：約20°C。CD表示には、下記の式に従って平均残基楕円率を用いて表した。なお平均残基量 (MRW) は176の値を用いた。

$[\theta]$ = mean residue ellipticity

θ_{obs} = actually observed ellipticity

MRW = mean residue weight

d = path length (cm)

C = concentration (g/ml)

P/T < 1,

M/G = 2.0 × P/T

P/T > 1,

M/G = (40 + 27 P/T) / (60 - 27 P/T)

アルギン酸の細胞毒性の測定には MTT 法を用いた。5 g の MTT を 1 L の PBS に溶かし MTT 溶液とした。96 well プレートに RAW264.7 細胞を 1 well 当たり 2×10^4 個になるように撒いた。細胞数は、血球計算盤にて測定した。37°C 5% CO₂ インキュベーター内で一晩放置後、培地にて種々の濃度に調整したサンプルを添加し、24時間培養した。培地 100 μl 当たり MTT 溶液を 10 μl 添加し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で約 20 分間放置後、上清を取り除き DMSO を 1 well 当たり 100 μl 添加し細胞を溶解した。よく攪拌し、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定した (Abs=570 nm)。

TNF-α の定量には ELISA 法を用いた。ELISA 用 96 well プレートに滅菌 PBS で 4 μg/ml に希釈した一次抗体 (Anti-Mouse Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) Monoclonal Antibody, Purified (ENDOGEN)) を 1 well 当たり 100 μl ずつ添加した。室温で 24 時間静置後、洗浄溶液 (0.025% tween 20 in PBS) で 2 回洗浄し、Blocking 溶液 (4% BSA in PBS) を 1 well 当たり 200 μl ずつ添加した。室温で 24 時間静置した後、洗浄溶液で 5 回洗浄し、Blocking 溶液で 10% に希釈したサンプル培養上清 (TNF-α 定量の対象となるサンプル) を 1 well 当たり 100 μl ずつ添加した。室温で 1 時間インキュベートし、洗浄溶液で 5 回洗浄し、Blocking 溶液で 1 μg/ml に希釈した二次抗体 (Anti-Mouse Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) Polyclonal Antibody, Purified (ENDOGEN)) を 1 well 当たり 100 μl ずつ添加した。室温で 1 時間インキュベートし、洗浄溶液で 5 回洗浄し、Blocking 溶液で 1000 倍に希釈した酵素-抗体コンジュゲート (Anti-Rabbit Ig, HRP-linked Whole Ab Donkey (アマシャム バイオサイエンス株式会社)) を 1 well 当たり 100 μl ずつ添加した。室温で 30 分インキュベートし、洗浄溶液で 5 回洗浄後、基質溶液 (TMB Peroxidase Substrate と Peroxidase Solution B (TMB Microwell Peroxidase Substrate System) を 1 : 1 で混合したもの) を 100 μl ずつ添加し室温で 30 分インキュベートした。反応停止剤として 1 N リン酸溶液を 50 μl ずつ添加し、よく攪拌した後マイクロプレートリーダーにより吸光度

(Abs=450 nm) を測定した。なお、既知の濃度の TNF-α を ELISA 用プレートに添加し、同様の操作を行って、TNF-α の検量線よりサンプルの TNF-α 量を求めた。

結果および考察

アルギン酸の平均分子量と M/G 比を Fig. 1 に示した。アルギン酸の平均分子量は 4,000~38,000 の範囲であった。また、PG および PM を除く全てのアルギン酸において M/G 比 1.50~3.17 であり、実験に用いたいずれのアルギン酸も M が G より多く含まれていることが判明した。アルギン酸は褐藻類の生息場所、季節、藻体部位によって異なることされている。しかし、この M が G よりも約 2 倍多いという結果は、褐藻類が生産するアルギン酸の基本的な組成比率に基づくものと考えられる。

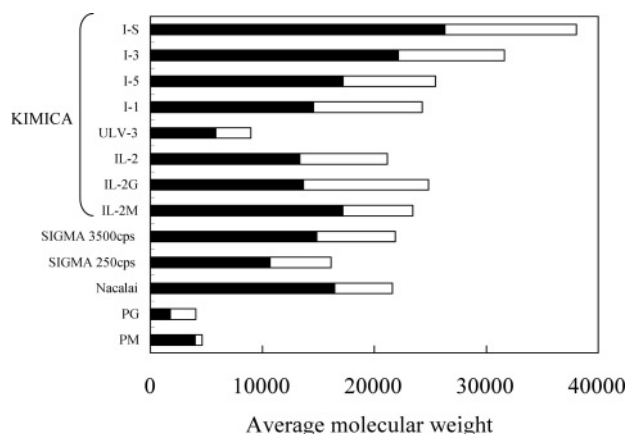


Fig. 1. Average molecular weight and M/G ratio of various alginates

M/G ratio of each alginate was estimated by circular dichroism analysis.¹⁴⁾ The molecular weight of each alginate was estimated by the combination of the measurement of total uronic acid content¹⁵⁾ and reducing endo-sugar content.¹⁶⁾

□, guluronic acid; ■, mannuronic acid.

アルギン酸を添加し培養した RAW264.7 細胞では、生存率が 100% を超えているものが多く (Fig. 2), M と G を含んだアルギン酸は RAW264.7 細胞に毒性を示さなかった。むしろ細胞の増殖を促進している可能性が示唆された。また、TNF-α 産生・放出を誘導することで最もよく知られている LPS (リポポリサッカライド) を細胞毒性試験の比較対照に用いた。その結果、低濃度の LPS (1 μg/ml) も RAW264.7 細胞の生育を促進する傾向にあった。一方、PM および PG は細胞に対する生育促進効果はみられなかった。アルギン酸オリゴマーの生育促進活性についていくつか報告されている。Kawada らはアルギン酸オリゴマーがヒト内皮細胞¹⁴⁾ やケラチン生成細胞¹⁵⁾ の増殖を促進することを確認している。また、酵素処理によるアルギン酸分解産物は、ピフィズ菌の生育促進、¹⁶⁾ コマツナ (*Brassica rapa* var. *pervidis*) 種子発芽後の幼芽、オオムギの根の伸張促進などが報告されてい

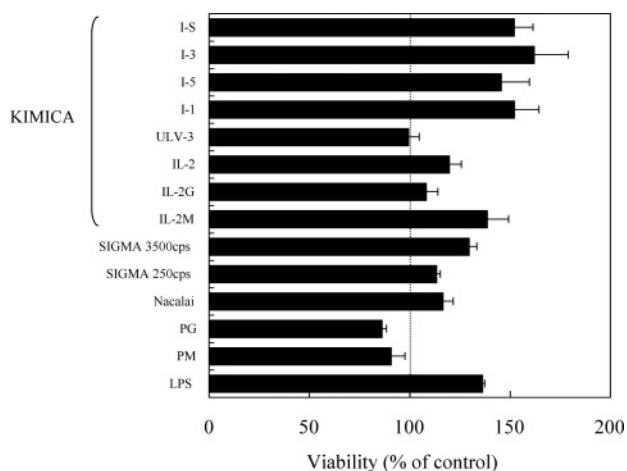


Fig. 2. The effect of various alginates or LPS on the viability of RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells in 96-well plates (2×10^4 cells/well) were incubated with $1,000 \mu\text{g/ml}$ of each alginate or $1 \mu\text{g/ml}$ LPS in RPMI 1640 medium containing 10% FBS at 37°C . After 24 h, the viability of each treated RAW264.7 cells was measured by MTT assay as described in the text.

る^{17, 18)}。最近の研究で、重合度 4 のアルギン酸オリゴマー (G4) はイネやニンジンなどの根の成長促進に関わっていることがわかった¹⁹⁾。このようにアルギン酸オリゴマーは細胞の生育促進作用を有していると考えられる。しかし、アルギン酸ポリマーの細胞生育促進効果はまだ不明な部分もあり、多くの課題が残されている。

TNF- α は、単球、マクロファージのみならず、血管内皮細胞、脂肪細胞、ミクログリア、アストロサイト、からも産生される多機能性サイトカインである²⁰⁻²²⁾。TNF- α の役割は

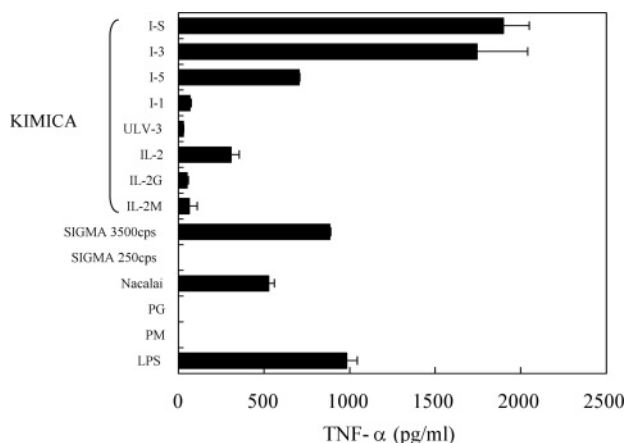


Fig. 3. TNF- α inducing activities of various alginates and LPS in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells in 96-well plates (2×10^4 cells/well) were incubated with $1,000 \mu\text{g/ml}$ of each alginate or $1 \mu\text{g/ml}$ LPS in RPMI 1640 medium containing 10% FBS at 37°C . After 24 h, the amount of TNF- α in the cell-free supernatant from each treated cells was measured by ELISA as described in the text.

強力な炎症性メディエーターとして全身に炎症反応を引き起こす一方、アポトーシス誘導、免疫制御、エンドトキシンショック、血管新生、細胞保護などの役割を果たしていることが知られている。そこで、分子量および M/G 比の異なるアルギン酸ポリマーの TNF- α 誘導を RAW264.7 細胞で調べた。その結果、分子量 20,000 以上のアルギン酸ポリマーに RAW264.7 細胞に対する TNF- α の誘導活性がみられた。平均分子量がほぼ等しい I-5, I-1, IL-2G では、M/G 比が 2 以上である I-5 に高い TNF- α の誘導活性が検出された (Fig. 3)。さらに、Sigma 社から販売されている 3500cps (MW 21,900, M/G 2.12) と 250cps (MW 16,000, M/G 1.96) を比較すると、3500cps に高い TNF- α 産生・放出 (885 pg/ml) が認められた。しかし、250cps は検出限界以下であった (Fig. 3)。一方、分子量 21,000 の IL-2 (M/G 1.71) および 24,000 の I-1 (M/G 1.50) は低い TNF- α 誘導活性しか認められなかった。TNF- α 産生・放出の誘導活性が最も強かった I-S (MW 38,000, M/G 2.24) を用いて、濃度依存性を検討した。その結果、I-S は $100 \mu\text{g/ml}$ においても TNF- α の産生・放出を誘導しており、それは濃度依存性であった (Fig. 4)。これら結果より、RAW264.7 細胞に対する TNF- α 誘導活性はアルギン酸ポリマーの平均分子量として 20,000 以上が必須であり、M/G 比が 2 以上のアルギン酸が高い TNF- α 誘導活性を示すことが示唆された。

TNF- α の産生誘導には、mitogen-activated protein (MAP) kinase が関与していることが知られている²³⁾。MAP kinase の代表的なものとして c-jun amino-terminal kinase (JNK), p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK) があり、JNK と p38 は熱ショック、タンパク合成阻害剤 (アニソマイシン)、紫外線、浸透圧変化などの物理化学的ストレス、炎症性サイトカイン、虚血などの生理的ス

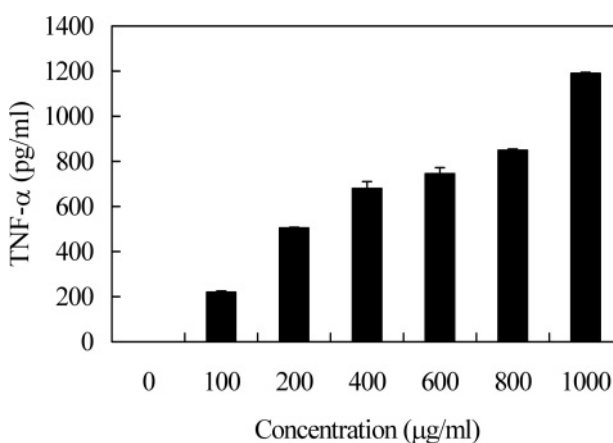


Fig. 4. Concentration-dependent activity of alginate (I-S) to induce TNF- α secretion from RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells in 96-well plates (2×10^4 cells/well) were incubated with varying concentrations (0-1,000 $\mu\text{g/ml}$) of I-S in RPMI 1640 medium containing 10% FBS at 37°C . After 24 h, the amount of TNF- α in the cell-free supernatant from each treated cells was measured by ELISA as described in the text.

トレスによって活性化される。一方、ERK はインスリン、アンジオテンシンII, エンドセリン, 細胞増殖因子などの増殖刺激により最も典型的に活性化される。TNF- α 産生誘導には、ERK と JNK が TNF- α の遺伝子転写を、p38 が mRNA の核外輸送を制御しているとされている^{20, 21)}。そこで、アルギン酸ポリマーによる TNF- α の放出誘導作用に対する MAP kinase の関わりを調べるため、コントロールに LPS を用い、I-S の TNF- α 誘導に対する JNK, p38 及び ERK MAP kinase の特異的阻害剤の影響について調べた。I-S の TNF- α 産生誘導は JNK 及び p41 MAP kinase (ERK) 阻害剤により強く阻害された。その阻害効果は LPS に対する場合に比べ、明らかに強かった。一方、p38 MAP kinase 阻害剤は I-S 及び LPS に対して同程度の阻害効果を示した (Fig. 5)。これらの結果より、アルギン酸の TNF- α 産生誘導活性は JNK 及び ERK MAP kinase が強く関与しており、LPS の MAP kinase カスケードとは異なることが推定された。

以上の結果から、分子量20,000以上、M/G 比 2 以上のアルギン酸ポリマーが、マクロファージ系細胞からの高い TNF- α の放出・産生を誘導することがわかった。しかし、緑膿菌由来のアルギン酸は、分子量50,000以上に高い TNF- α の産生誘導活性を有していると報告されている⁹⁾。緑膿菌のアルギン酸は、マンヌロン酸の O-2 もしくは稀ではあるが O-3 または両方の位置で O-アセチル基によって修飾されている点で、褐藻類のアルギン酸とは構造上異なっている²⁰⁾。

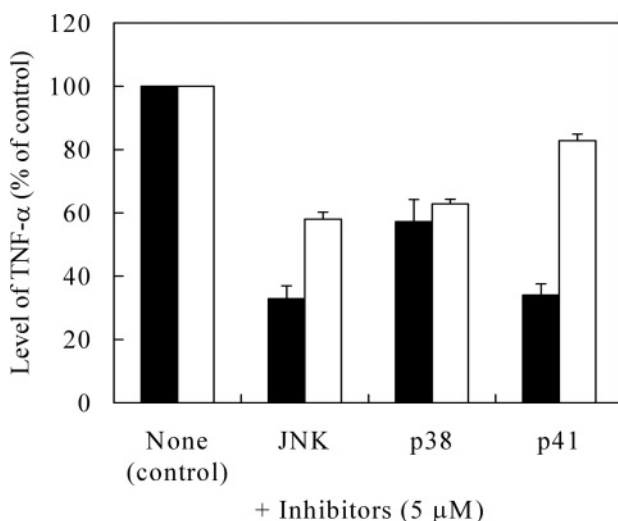


Fig. 5. Effect of MAP kinase inhibitors on the induction of TNF- α release from RAW264.7 cells by alginate (I-S) or LPS.

RAW264.7 cells in 96-well plates (2×10^4 cells/well) were incubated with 5 μ M of each inhibitor in RPMI 1640 medium containing 10% FBS at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. And then, 1,000 μ g/ml of I-S or 1 μ g/ml of LPS was added to the cells. After 23 h, the amount of TNF- α in the cell-free supernatant from each treated cells was measured by ELISA as described in the text.

■, alginate (I-S), □, LPS

この緑膿菌と褐藻類のアルギン酸の構造上の違いが、TNF- α の産生誘導に大きく関わっているものと考ええる。また、今回の結果および緑膿菌の高分子アルギン酸が高い TNF- α 誘導活性を示すことを考えると、I-S より高分子で M/G 比が 2 以上のアルギン酸ポリマーはより高い TNF- α の誘導活性を有することが推察できる。

褐藻由来アルギン酸による TNF- α 産生誘導には JNK および ERK MAP kinase が関与していた。ERK MAP kinase は細胞増殖因子などの増殖刺激により活性化されるため、アルギン酸ポリマーが細胞増殖を活性化した結果、はじめに ERK MAP kinase が活性化され、さらに、サイトカインなど複数のシグナルのクロストークにより多彩に調節され、TNF- α の産生・放出を誘導していると考えられる。今後、MAP kinase 受容体の阻害剤などを用いて、アルギン酸の TNF- α 誘導活性のメカニズム解明が必要である。

褐藻由来のアルギン酸の安全性は F A O / W H O で評価され、最も安全な物質のひとつであるとされている。そのアルギン酸のポリマーに TNF- α の産生誘導活性が確認できた。これらアルギン酸ポリマーは免疫賦活化剤としての利用が期待される。

参考文献

- 1) Haug, A.: *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 69-73 (1965).
- 2) Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., and Thom, D.: *FEBS Lett.*, **32**, 195-198 (1973).
- 3) Simpson, N.E., Stabler, C.L., Simpson, C.P., and Sambanis, A.: *Biomaterials*, **25**, 2603-2610 (2004).
- 4) Scott, C. D.: *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 66-73 (1987).
- 5) Darquy, S., and Sun, A.M.: *ASAIO J.*, **33**, 356-358 (1987).
- 6) Fan, M.Y., Lum, Z.P., Fu, X.W., Levesque, L., Tai, I.T., and Sun, A.M.: *Diabetes*, **39**, 519-522 (1990).
- 7) 西澤一俊, 杉村幸子. 海藻の本. 東京: 研成社, 28-30 (1993).
- 8) Otterlei, M., Sundan, A., Skjak-Braek, G., Ryan, L., Smidsrod, O., and Espevik, T.: *Infect Immun.*, **61**, 1917-1925 (1993).
- 9) Iwamoto, Y., Xu, X., Tamura, T., Oda, T., and Muramatsu, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 258-263 (2003).
- 10) Iwamoto, Y., Araki, R., Iriyama, K., Oda, T., Fukuda, H., Hayashida, S., and Muramatsu, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 133-142 (2001).
- 11) Morris, E., Rees, D.A., and Thom, D.: *Carbohydr. Res.*, **81**, 305-314 (1980).
- 12) Hodge, J.E., and Hofreiter, B.T.: *Academic Press, New York*, 388- 389 (1962).
- 13) Otterlei, M., Ostgaard, K., Skjak-Brak, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., and Espevik, T.: *J. Immunother.*, **10**, 286-291 (1991).

- 14) Kawada, A., Hiura, N., Tajima, S., and Takahara, H.: *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, 542-547 (1999).
- 15) Kawada, A., Hiura, N., Shiraiwa, M., Tajima, S., Hiruma, M., Hara, K., Ishibashi, A., and Takahara, H.: *FEBS Lett.*, **408**, 43-46 (1997).
- 16) Akiyama, H., Endo, T., Nakakita, R., Murata, K., Yonemoto, Y., and Okayama, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 355-356 (1992).
- 17) Yonemoto, Y., Tanaka, H., Yamashita, T., Kitabatake, N., Ishida, Y., Kimura, A., and Murata, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 68-70 (1993).
- 18) Tomoda, Y., Umemura, K., and Adachi, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 202-203 (1994).
- 19) Xu, X., Iwamoto, Y., Kitamura, Y., Oda, T., and Muramatsu, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2022-2025 (2003).
- 20) Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y.: *J. Neurochem.*, **75**, 965-972 (2000).
- 21) You, M., Flick, L.M., Yu, D., and Feng, G.S.: *J. Exp. Med.*, **193**, 101-110 (2001).
- 22) Hsu, H.Y., Chiu, S.L., Wen, M.H., Chen, K.Y., and Hua, K.F.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 28719-28730 (2001).
- 23) Hide I.: *Folia. Pharmacol. Jap.*, **121**, 163-173 (2003).
- 24) Skjak-Braek, G., Grasdalen, H., and Larsen, B.: *Carbohydr. Res.*, **154**, 239-250 (1986).