

海洋性棘皮動物グミ由来
N-Acetylgalactosamine 特異的 C 型レクチン CEL-I の
in vitro での生物活性に関する研究

2013 年 12 月

長崎大学大学院生産科学研究科

山西 智大

目次

I . 緒言	5～9
II . 試薬と方法	10～19
(1) サンプル調製 (CEL-I)	10
(2) 細胞培養・採取	10～12
(3) 細胞毒性評価 - MTTアッセイ、WST-8アッセイ	12
(4) サイトカイン定量	
- サンドウィッチEnzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法	13～14
(5) Mitogen-activated protein (MAP) kinase系 の解析	
- ビーズアッセイ (Bio-Plex™)	14
(6) レクチンのFITCラベル体作成	15
(7) レクチンの細胞に体する結合量測定	15
(8) RAW264.7細胞からのRNA 抽出 - AGPC 変法	16
(9) TNF- α 、G-CSF及びiNOS の転写レベル (mRNA) 応答の解析 - RT-PCR法	16～17
(10) NO 産生量測定 - Griess 法 (亜硝酸法)	18
(11) iNOS 発現の解析 - ウェスタンブロット法	18～19

第1部

CEL-IのRAW264.7細胞に対する細胞毒性

- (1) CEL-IのRAW264.7細胞に対する細胞毒性 20～21

第2部

CEL-IのRAW264.7細胞に対するサイトカイン放出誘導活性

- (1) 各種レクチンのRAW264.7細胞に対するTNF- α , G-CSF 放出活性の検討
22～23
- (2) CEL-IのRAW264.7細胞へのTNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する
polymyxin B の影響 24～26
- (3) CEL-IのRAW264.7細胞へのTNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する
特異的糖 GalNAc の影響 24～26
- (4) CEL-IのRAW264.7細胞に対するサイトカイン放出誘導活性(経時変化)
27～28
- (5) FITC 標識レクチンのRAW264.7細胞に対する結合量の測定 29～30
- (6) CEL-IのRAW264.7細胞へのTNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する
brefeldin A (BFA) の影響 31～32
- (7) CEL-I刺激に伴うTNF- α 並びにG-CSF mRNAの解析、
及びmRNA発現に対するBFAの影響 33～34
- (8) CEL-I刺激によって誘導されるRAW264.7細胞内のMAP kinase系解析 35～36
- (9) CEL-IのRAW264.7細胞へのTNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する
MAPキナーゼ阻害剤の影響 37～38
- (10) CEL-IのRAW264.7細胞へのTNF- α 放出誘導活性に対する
リコペンの影響 39～40

- (11) モデシンの RAW264.7細胞に対する サイトカイン誘導活性 41～43
- (12) モデシンの RAW264.7細胞へのサイトカイン誘導作用に対する
特異的糖 GalNAc の影響 44～45
- (13) モデシンの RAW264.7細胞へのサイトカイン誘導作用に対する
MAP キナーゼ阻害剤の影響 46～47

第 3 部

CEL-I の RAW264.7 細胞に対するの NO 産生誘導活性

- (1) 各種レクチンのRAW264.7細胞に対するNO 産生誘導活性の検討 48～49
- (2) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対するpolymyxin Bの影響
50～51
- (3) CEL-IのRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する抗TNF- α 抗体の影響
52～53
- (4) CEL-I のRAW264.7細胞に対する NO 産生誘導及びそれに伴う iNOS の発現
とその転写レベル(iNOS mRNA) の応答の解析 (経時変化) 54～55
- (5) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する
NG-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の影響 56～57
- (6) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する単糖の影響 58～59
- (7) PHA-L , LPS のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する単糖類の影響
60～61
- (8) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する bovine serum albumin
(BSA) の影響 62～63
- (9) CEL-I のRAW264.7 細胞への結合量に対するBSA の影響 64～65
- (10) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO 産生誘導に対するMAP kinase 阻害剤の影響
66～67
- (11) 熱処理CEL-I が誘導する NO 産生レベル 68～69

- (12) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO産生誘導作用に対するリコペンの影響 70～71
- (13) CEL-I のRAW264.7細胞に対するROS産生誘導活性とリコペンの作用 70～76
- (14) モデッシンのRAW264.7細胞に対するNO産生誘導作用の検討 77～79

第4部

CEL-Iのミトジェン活性に関する検討

- (1) CEL-I のミトジェン活性に関する検討 80～81
- (2) CEL-I のミトジェン活性に対する特異的糖GalNAcの影響 82～83
- (3) マウス脾臓 T細胞、B細胞に対する CEL-I のミトジェン活性の検討
84～86

IV. 考察 87～94

V. 総括 94

VI. 謝辞 95

VII. 参考文献 96～101

I. 緒言

レクチンとは、糖質に結合性を示すタンパク質並びに糖タンパク質の総称で、動物、植物、細菌中の生体成分として自然界に広く存在している [1-4]。海洋生物由来のレクチンも多く発見されており、ウニ及びフジツボ、ナマコ、ホヤ、エビ等からの新規精製例がある [5-8]。レクチンは、一般的にその糖質認識機能を介し、ある種の細胞に対して凝集作用及び毒性、増殖促進、幼若化、免疫賦活等の種々の作用を引き起こす [1-4]。近年、レクチンの持つ糖質種に特異的な結合性が着目され、糖鎖研究のツール、癌細胞判別の試薬として実用化されている他、さらにはドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発等、創薬への応用も期待されている [9]。しかしながらレクチンは構造的に多様で、その応用には更なる基礎的知見の蓄積が必須である。

福岡市沖の玄界灘に 1989 年以降、ナマコ的一种で海洋性棘皮動物のグミ (*Cucumaria echinata*) (Fig. 1) の大量発生が認められており、それらの影響から底引き網漁等への漁業被害が報告されている。また、グミは毒性を示す事から食用には適さず、乾燥して肥料にする程度の利用価値しか見出されていない。生理生態に関しては体長約 4 cm で、水深 5~50 m の海底に生息すること以外の詳細は不明であり、また最近では、その大量発生はあまり確認されておらず、環境変化の影響を受け易いことも窺える。



Fig. 1. A picture of *Cucumaria echinata*

1994年、畠山智充教授（長崎大学工学部応用化学科 御所属）らにより、グミからガラクトース及び *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) に親和性を示す、分子量の異なる4つのレクチンCEL-I ~ IV の新規精製が報告された [10]。CEL-I については 16kDa のサブユニットがホモダイマーを形成する C 型レクチンである。C 型レクチンとは糖結合時に Ca^{2+} を要求する動物レクチンであり、その他に Ca^{2+} 非要求型の S 型レクチン及びガレクチンに分類される。またこれら CEL-I ~ IV を赤血球凝集試験に供すると、CEL-I と CEL-IV がウサギ及びヒトの血球に対して強力な凝集活性を示したのに対し、CEL-II については、血球凝集反応を見出すことが出来なかった。一方で、CEL-III に関しては、ウサギ及びヒト血球に対して溶血活性を示し、トリ及びウマ赤血球に対して CEL-III の高濃度条件下にて凝集作用を示したという、各々に特徴的な活性を示した。これまで CEL シリーズに関する研究において、アミノ酸配列の決定や結晶構造解析が行われている他 [11,12]、またリコンビナント及び変異体の作成が行われ [13]、構造活性相関の解明にも取り組まれている。その他、CEL-I 並びに CEL-III に関して、生物活性に関する研究が進んでおり多くの報告がある。CEL-III は溶血活性を示すことを前述したが、その発現機構は、細胞膜上の糖鎖を介して細胞に結合することに始まり、膜内でそれらが会合することで、細胞膜中でポア形成し、結果的に溶血を引き起こすことが解明されている [14,15]。加えて、細胞毒性に関しては、pH 及び温度依存性を示す事が報告されている [16]。一方で、CEL-I は CEL-III にみられる溶血活性を示さない事から、グミがそれぞれのレクチンを有する意義として、生理的機能の分担も考えられる。

本研究対象である CEL-I は、同構造のサブユニットが一ヶ所のジスルフィド結合によりダイマー構造を形成している。また、GalNAc に対して非常に強い結合性を示し、その強度はガラクトース結合時の約 1,000 倍に相当する。GalNAc 結合には、そのアセトアミド基と CEL-I 中の糖認識ドメイン (carbohydrate recognition domain, CRD) とのファンデルワールス接触並びに水素結合が関与する。

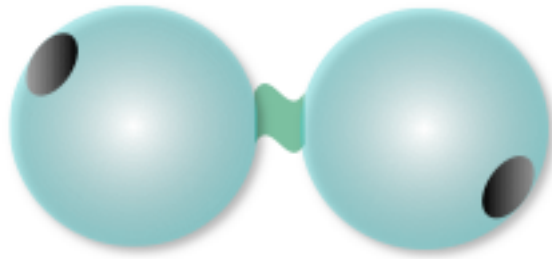


Fig. 2. A simplified diagram of CEL- I

CEL-I は種々の細胞に対して生物活性を示す。過去に報告されたものには、前述した血球凝集活性があり、CEL-I はウサギ、ヒト (A-,B-,O-型)の赤血球には強い凝集作用を示すが、ニワトリ、ウマに対しては活性が無い。また血球凝集は GalNAcの添加により阻害される [10]。細胞毒性に関する報告もあり、その毒性の強度は細胞種によって異なるネクロシス様の毒性であった。細胞種特異性として、イヌ腎臓由来 MDCK 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ラット肉腫由来 XC 細胞、アフリカミドリザル腎臓上皮由来 Vero 細胞には強力な毒性を示すが、チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞、マウス繊維芽細胞由来 L929 細胞には毒性が無い。また、毒性の強度は細胞への結合量に起因する事が、蛍光標識した CEL-I (FITCラベル体) を用いた実験により示唆されており、この毒性は GalNAcの添加により阻害される [17]。リコンビナント CEL-I (rCEL-I) を用いた実験も行われているが、rCEL-I の示す細胞毒性が、本研究で用いる native 型と比較して弱い事が報告されている。rCEL-I の特徴として native 型よりも Ca^{2+} との結合能が低く、細胞に対する結合能に影響し、それが細胞毒性強度の相違に繋がっていると考えられている [13]。これまでの研究結果を挙げたが、CEL-I が示す生物活性の発現機構にはいずれも糖鎖認識を介することが示唆されており、本研究においても、その関与については必須の検討事項であるといえる。

一方、ある種のレクチンはマクロファージを刺激し、サイトカイン及び一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の産生・放出を誘導する事が知られている他、リンパ球に対してマイトジェン活性を示すことが知られている。本研究では、CEL-I の生物活性の更なる

探究を目的とし、マクロファージ株細胞を用い、 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、 granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) のサイトカイン、及び NO 産生誘導活性について、また、マウス脾臓細胞を用いてマイトジェン活性について検討した。

サイトカインとは、蛋白質性の細胞間情報伝達物質であり、免疫系ネットワークにおいて重要な役割を担っている。本研究では、炎症性サイトカイン TNF- α と造血因子 G-CSF を検出対象としているが、種々の物質におけるサイトカイン放出誘導活性を検討する際、TNF- α が検出対象として多く取り上げられており、レクチンにおいても TNF- α 放出を誘導するものが報告されている。例えば、CEL-I と同様に、GalNAc に結合性を示すインゲン豆由来レクチン PHA-L は、RAW264.7 細胞をはじめとする免疫系の株細胞、並びに初代培養マウス腹腔内マクロファージに作用し、TNF- α 放出を誘導する [18]。他にも、A-B toxin に分類されるヒマ種子由来レクチンのリシン [19]、朝鮮ヤドリギ由来レクチン KML (Korean mistletoe lectin) 等も同様の活性を有する [20]。それに対して G-CSF の場合、当研究室において研究が進んでいる免疫賦作用有するアルギン酸オリゴマーの一連の実験の中で、ビーズアッセイ法 (Bio-PlexTM) を用いアルギン酸オリゴマー刺激により RAW264.7 細胞より誘導されるサイトカインのスクリーニングを行なった結果、放出誘導される主要なサイトカインとして TNF- α と共に G-CSF が検出された [21]。G-CSF は臨床学的な研究実績、またそれ自身が示す生理活性に関する知見は多いが、特定の物質が示す生物活性の誘導産物としての報告はほぼ無い。2 つは、CEL-I によりそれらサイトカインが誘導された場合、両者の細胞内における産生・放出機構が異なることより、CEL-I のそれらの誘導機構の解明に有効になると期待される。TNF- α は、その前駆体が細胞膜上の膜蛋白質として発現し、ある種の刺激により誘導されるメタロプロテアーゼにより、細胞外ドメインにおける切断 (ectodomain shedding) を受け、それらが放出される。その後形成される 3 量体を TNF- α と呼ぶ [22]。また、その前駆体を membrane TNF とし、細菌に対する防御因子としての報告例もある [23]。しかし、TNF- α の放出系は不明な点が多く残されている。一方、G-CSF は特定の刺激に応答して細胞内で生

合成され、エキソサイトーシスによって細胞外に放出される一般的な蛋白質放出系を経路とする。

NO は、マクロファージ及び神経膠細胞、血管内皮細胞等より放出されるフリーラジカルであり、生体内で生体防御や血流量調整、神経情報の伝達などに関与するメディエーターである。細胞内において NO synthase (NOS) とその基質である L-アルギニンとの酵素基質反応の産物として細胞外に放出される。NOS は、cNOS (constitutive NOS) と iNOS (inducible NOS) に、大きく分類される。cNOS は常に生体中で発現し、恒常性の維持に働く NO 産生に関与する。それに対し、iNOS は細胞外部の刺激によりその発現が誘導される。また産生源の細胞によって、neuronal NOS (nNOS)、endothelial NOS (eNOS)、macrophage NOS (mNOS) と別称される場合がある [24-27]。レクチンの有する生物活性として、NO産生誘導活性の報告数は、細胞毒性やサイトカイン誘導活性と比較して少ないが、その中で、NO産生誘導レクチンには、サイトカイン誘導レクチンでもある PHA-L [28] や KML [29]が知られ、他にはタチナタ豆由来レクチン Concanavalin A (Con A) [28]、や帝王バナナ由来レクチンの Emperor banana lectin が報告されている [30]。

マイトジェン活性は、リンパ球の幼若化及び増殖の促進を及ぼす活性を指し、種々のレクチンについてもこのような生体反応を引き起こすことが知られている。また、その作用についてはT細胞及びB細胞に対してどちらか、若しくは両者に特異性を示すことが知られており、PHA [31]、Con A [32]に関してはT細胞特異的であるが、アメリカヤマゴボウ由来レクチンpokeweed mitogen(PWM) [33]は両細胞種に活性を示す。マイトジェン活性は、どのような細胞内プロセスで誘発されるかは現在も不明であるが、免疫系の賦活作用に関する考査に利用されるなどの応用されている。よって作用メカニズムの解明は有意義であり、本活性を示す因子の探索はこの分野の発展に寄与出来るものと考えられる。

II. 試薬と方法

(1) サンプル 調製 (CEL- I)

CEL-I は、長崎大学工学部応用化学科 畠山 智充 教授より寄与されたものを用いた。調製方法としては、海洋性棘皮動物グミ(*C. echinata*)から得た水溶性画分をカラムクロマトグラフィー (Lactosyl-Cellulofine, GalNAc-Cellulofine, Sephadex G-75)に供し分離。赤血球凝集活性等のレクチン活性を指標としてCEL-Iを精製し、SDS電気泳動により純度を確認している [10]。

精製した CEL-I は 100 μ L /tube に分注した後、試験に用いるまで -80°C で保存した。 -80°C から解凍した際は、活性に影響がないことを確認してから実験に用いた。

(2) 細胞培養・採取

i、マウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 細胞の培養

マクロファージ株細胞にはマウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 細胞を用いた。RAW264.7 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。RAW264.7 細胞の培地は、Dulbecco modified eagles medium (D-MEM) (GIBCO) に抗生物質 (Benzyl Penicillin Potassium, Streptomycin Sulfate) (Nakarai tesque) を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、 56°C 、30 分間熱処理にて非動化した牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Biosource) を 10% (v/v) 添加したものを用いた。

細胞の培養は、セラムチューブ中の細胞懸濁液 (10% DMSO を含む培地中で、 -80°C に保存されている細胞)を融解し、15 mL チューブに移し、これに培地を加え、 4°C で

2,000 rpm、10 分間遠心を行った。その上清を捨て、細胞を再び培地約 5 mL に懸濁させ、培養フラスコ (Falcon) に移し、37°C、5% CO₂ インキュベーター (MCO-20AIC、SANYO) で培養した。一晩放置し、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 溶液 (トリプシン溶液) を添加し、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 (約 30 分)、フラスコ内の溶液を取り除き、再び CO₂ インキュベーターで 30 分ほど静置した。フラスコ底面からの細胞の剥離を確認した後、培地を加えて細胞を分散させ、再び CO₂ インキュベーターで培養を行った。

細胞の保存は、凍結保存法を用いた。培養フラスコから細胞を剥がし、15 mL チューブ (Falcon) に移した後、4°C で 2,000 rpm、10 分間遠心を行った。上清を除去し、細胞を 10% DMSO (infinity pure grade, Wako) を含む培地で懸濁した後、セラムチューブ (Falcon) に移し、-80°C で凍結保存を行った。

ii、マウス脾臓細胞の単離

ddY系マウス (6週齢、25~30g) より脾臓組織を摘出し、組織を破壊した後、SS製フィルター (100M) を用いて細胞浮遊液とし、RPMI1640培地 (3% fetal bovine serum (FBS), penicillin G (100 IU/mL), and streptomycin (100 µg/mL)を含む) 中に 5×10^6 cells/mLとなるよう調製した。脾臓由来B細胞についてはヌードマウスより採取した。ヌードマウスの脾臓中にはB細胞と、未成熟T細胞が存在することが知られている。B細胞の採取方法に関しては、前述した組織摘出から細胞浮遊液への調製と同様の方法で実施した。T細胞については、ddY系マウスより摘出した脾臓細胞から同様の方法で得た細胞浮遊液を用い、ナイロンウールカラムを使用してT細胞を得た。

ナイロンウールカラムは、シリンジ中にナイロンウールを充填し、滅菌PBSによりナイロンウールを3回洗浄、最後にRPMI培地で満たし作成した。完成したカラム中

に細胞調製液を4mL 注入し、37°C で45 分間インキュベートした後回収し、T細胞浮遊液を得た。この方法は *Trizio D* らの実験にて採用されているが、カラムを通過して得た細胞浮遊液中のT細胞は 90~95% を占める [34]。

(3) 細胞生存率測定 - MTT アッセイ、WST-8アッセイ

MTTアッセイについてはRAW264.7細胞（接着細胞）の生存率測定に用いた。96-well plate (Falcon) に RAW264.7 細胞を所定細胞数播種し、所定時間培養の後、所定濃度のサンプルで所定時間刺激した。培養上清除去後、PBS で 2 回洗浄後した。

続いて。希釈した 5 mg/mL MTT (Sigma Chemical) を 100 μ L/well 添加した。20 分放置した後、MTT の入った培地を除去し、150 μ L/well の DMSO を添加することで難溶性ホルマザン残基を溶解した。攪拌し、溶解液に澱みがない事を確認した後、吸光度計 (Multiskan spectrumn, Thermo electron) で吸光度 (Abs= 535 nm) を測定し、コントロールより細胞生存率を算出した。ちなみに 3- (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) は、ミトコンドリア酸化還元酵素の基質であり、生細胞内で酵素触媒を受けることで紫色を呈する。

マイトジェン活性測定については、浮遊細胞の生存率について測定するため、WST-8 アッセイを採用し、Dojindo社製キットCell Counting Kit-8を使用した。脾臓細胞を所定時間培養の後、所定濃度のサンプルで所定時間刺激した。続いてテトラゾリウム塩WST-8を添加後 2 時間インキュベートし、450 (-650)nmにて吸光度を測定した後、コントロールの生存率よりサンプル添加した細胞の生存率を算出した。WST-8は細胞内脱水素酵素により水溶性のホルマザンを生成するため、この吸光度(450nm)の測定値は細胞数と相関する。

(4) サイトカイン TNF- α 及び G-CSF の定量

- サンドウィッチ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法

サンドイッチ ELISA は、2 種の抗体を用いて抗原（サイトカイン）中の異なるエピトープを認識する、抗原抗体反応を基本とした蛋白質検出法である。実験手順は以下の通りである。

イムノプレート (NUNC-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface plate) に一次抗体希釈溶液¹⁾ を 1 ウェルあたり 100 μ L 添加した。室温で 24 時間静置後、洗浄液²⁾ で 5 回洗浄し、ブロッキングバッファー³⁾ を 1 ウェルあたり 200 μ L 添加した。室温で 24 時間静置後、洗浄液で 5 回洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈した培養上清を 1 ウェルあたり 100 μ L 添加し、室温で 2 時間静置した。洗浄液で 5 回洗浄し、二次抗体希釈液を添加し、室温で 2 時間静置した。洗浄液で 5 回洗浄し、コンジュゲート希釈液⁵⁾ を 1 ウェルあたり 100 μ L 添加した。室温で 30 分間静置し、洗浄液で 5 回洗浄後、基質溶液⁶⁾ を 1 ウェルあたり 100 μ L 添加し室温で 30 分間静置した。反応停止剤⁷⁾ を 100 μ L ずつ添加し、攪拌後、吸光度計 (Multiskan spectrumn、Thermo electron) を用い、吸光度 (Abs= 450 nm) を測定した。なお、既知の濃度のリコンビナント TNF- α (rTNF- α) 及びリコンビナント G-CSF (rG-CSF) (R&D Systems) を用い、検量線を作成した。

1) 一次抗体：PBS で希釈

4 mg/mL Anti-Mouse TNF- α Monoclonal Antibody (MM350C, ENDGEN)

2 mg/mL Monoclonal Anti-Mouse G-CSF Antibody (MAB414, R&D Systems)

2) 洗浄液：0.025% Tween 20 in PBS

3) ブロッキングバッファー：BSA in PBS (TNF- α 用 4%、G-CSF 用 1%)

4) 二次抗体：ブロッキングバッファーで希釈

1 mg/mL Anti-Mouse TNF- α Polyclonal Antibody (R&D Systems)

50 ng/ml Biotinylated Anti-Mouse G-CSF Antibody (BAF414, R&D Systems)

5) コンジュゲート

TNF- α ELISA 用 : 1000 倍希釈 Anti-Rabbit Ig、HRP-Linked Whole Ab Donkey
(NA934, Amersham bioscience)

G-CSF ELISA 用 : 200倍希釈 Anti-mouse Ig、HRP-Linked Whole Ab Donkey
(R&D Systems)

6) 発色基質 : TMB Peroxidase Substrate (KPL) : Peroxidase Solution B (KPL) = 1: 1
で混合

7) 反応停止剤 : 1 Nリン酸溶液 (Wako)

(5) Mitogen-activated protein (MAP) kinase系の解析 - ビーズアッセイ (Bio-Plex™)

Bio-Plex™ は、サンドイッチ ELISA 法を基本とした蛋白質定量システムである。多項目の抗体を結合させたカラーコードビーズと、フローベースのデュアルレーザー検出器用い、1つのサンプルより多項目のターゲットを同時に検出定量できる。

96-well plate に RAW264.7 細胞を 3×10^4 cells/well になるように播種した。37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した後、無血清培地にて所定濃度のサンプルを添加し所定時間培養した。培養上清を除去し、冷却した cell wash buffer にて洗浄後、すぐに cell lysis buffer¹⁾を 75 μ L/well 添加した。プレートシェーカーで 300 rpm、4°C で20分間攪拌した。続いて 2000 rpm、4°C で20分間遠心し、回収した上清を試料とした。試料は Bio Rad 社に送付し、得られた結果を基にグラフを作成した。また解析対象とした 3 種のMAP kinase 系は、Extracellular regulated kinase (ERK)、p38、c-Jun N-terminal kinase (JNK) である [35]。

1) cell lysis buffer : lysis buffer 10 mL、factor 1 40 μ L、factor 2 20 μ L
(Cell lysis kit, Bio-Rad)

(6) レクチンのFITC ラベル体作成

Fluorescein isothiocyanate (FITC) はアミノ基に結合する蛍光色素であり、蛋白質の蛍光ラベル体作成に用いられる。塩基性領域で溶解性を示す他、490 nm の波長で励起し、525 nm の蛍光を示す。

0.5 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.3) に溶解したレクチンに対し、0.1 M となるよう特異的糖を添加し、一晩、4°Cで放置した。そこにレクチンの10倍 mol 量となるように FITC (Dojindo) を添加し、遮光しつつ、4°Cで4時間攪拌した。その後、滅菌 0.5 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.3) で透析を行なった後、さらに滅菌 PBS で透析を行なった。得た FITC ラベル化レクチン (F-レクチン) については UV 法で蛋白質定量を行なった。また、赤血球凝集活性、もしくはサイトカイン及び NO 産生誘導活性を有するものについては、FITC ラベル化前のサンプルと同レベルの活性を保持することを確認した。

(7) レクチンの細胞に対する結合量測定

2×10^5 cells /well in 48-well plate で播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養した細胞に対して所定濃度の F-レクチンを添加した。2時間放置した後、上清を除去し、細胞を PBS で2回洗浄した。続いて溶解バッファー¹⁾を 500 μL 添加し細胞を溶解した。細胞溶解液の蛍光強度を蛍光光度計 (F-2500, Hitachi) で測定し、F-レクチン自身の蛍光強度より、F-レクチンの結合量を算出した。

1) 溶解バッファー : 20 mM Tris-HCl pH 8.3 + 0.1% SDS

(8) RAW264.7 細胞からのRNA 抽出 - AGPC 変法

RAW264.7 細胞からの全 RNA は、トリゾール試薬 (Invitrogen) を用いた AGPC 変法により抽出した。12-well plate (Falcon) に RAW264.7 細胞を 1×10^6 cells/well になるように播種し、24 時間培養の後、所定濃度の CEL-I で所定時間刺激した。培養上清を除去し、トリゾール試薬を 1mL 添加した後、強くピペッチングを繰り返し、1.5 mL チューブに移した。5 分間室温で静置した後、クロロホルムを 200 μ L 添加した。続いて強振し、2~3 分間静置後、13,500 rpm で 15 分間遠心した。水相を新しいチューブに移した後、500 μ L のイソプロパノールを添加し、ボルテックスした。10 分間静置した後、13,500 rpm で 15 分間遠心し、得たペレットを全 RNA とした。ペレットは 1 mL の 75% エタノールでリンスし、7,500 rpm で 15 分間遠心した後、エタノールを除去してからペレットを一晩乾燥させた。DEPC 処理水で溶解した全 RNA は、吸光度 (Abs= 260 nm) より濃度を求めた後、液体窒素で瞬間凍結し、使用するまで -80°C で保存した。

(9) TNF- α 、G-CSF 及び iNOS の転写レベル (mRNA) における応答の測定 - RT-PCR 法

AGPC 変法により抽出した全 RNA (1 mg) は、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) の oligo dT プライマーを用いて逆転写反応に供し、1st strand cDNA を得た。i) を調整し、PCR に供した。PCR は、サーマルサイクラー (Eppendorf) を用い、ii) の通り行なった。プライマーは iii) に記したものをを用いた。PCR で得られた産物は 0.1 mg/mL ethidium bromide を含む 2% アガロースゲルを用い、電気泳動に供した。泳動後は、ライトキャプチャー (ATTO) を用いバンドを確認した。

- i) 1st strand cDNA 0.5 μ L、GoTaq Green Master Mix (Promega) 12.5 μ L、
1 mM フォワードプライマーとリバースプライマー それぞれ0.5 μ L、
RNase フリー水11 μ L
- ii) 1 cycle of 70 sec at 95°C, [30 cycles (TNF- α) or 25 cycles (G-CSF and β -actin),
20 cycles (iNOS)] of 55 sec at 93°C, 45 sec at 61°C, 40 sec at 72°C, and 1 cycle of
100 sec at 72°C

iii) プライマー配列

- mouse-TNF- α (286 bp)

forward: 5'-GCA GGT CTA CTT TGG AGT CAT TGC-3'

reverse: 5'-CAT TCG AGG CTC CAG TGA ATT CCA G-3'

Chanらの報告 [18] で用いられた配列を採用した。

- mouse-G-CSF (337 bp)

forward: 5'-CTC AAC TTT CTG CCC AGA GG-3'

reverse: 5'-AGC TGG CTT AGG CAC TGT GT-3'

nucleotide sequence (accession number, NM_009971)を元に作成した。

- mouse-iNOS (231 bp)

forward: 5'-CAA CCA GTA TTA TGG CTC CT-3'

reverse: 5'-GTG ACA GCC CGG TCT TTC CA-3'

Imanishi らの報告 [36] で用いられた配列を採用した。

- mouse- β -actin (840 bp)

forward: 5'-GGA GAA GAT CTG GCA CCA CAC C-3'

reverse: 5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG-3'

Chanらの報告 [18] で用いられた配列を採用した。

(10) NO 産生量測定 - Griess 法 (亜硝酸法)

培養上清中の NO_2^- を、細胞より産生された NO として、Griess 法を用いて検出定量した。NO はフリーラジカルであるため、液層中では酸素分子と結合して NO_2^- と NO_3^- として蓄積される。また蓄積された両分子の内、 NO_2^- が大部分を占めて平衡を保つことから、NO 産生は NO_2^- の蓄積として測定できる。

培養上清と Griess 試薬¹⁾ を 1 : 2 (培養上清 : Griess 試薬) で混合し、20 分後、吸光度計 (Multiskan spectrumn、Thermo electron) により吸光度 (Abs = 550 nm) を測定した。なお既知の濃度の NaNO_2 (Dojindo) を用い、検量線を作成した

- 1) Griess 試薬 : 3 mM sulfanilic acid (Wako), 30 μ M N-1-naphtyl-ethlenediamine dihydrochloride (Wako), 25% glacial acetic acid)

(11) iNOS 発現の解析 - ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は、電気泳動で分離した蛋白質をメンブレンに転写し、抗体を用いて標的蛋白質を特異的に検出する蛋白質検出法である。

CEL-I 刺激後の細胞を氷冷した PBS で 3 回洗浄し、抽出バッファー¹⁾ を 100 μ L を添加した。プレートシェーカーを用いて 4 $^{\circ}$ C で 30 分間シェイクした後、回収した細胞溶解液を 10,000 rpm で 10 分間遠心した。得られた上清を試料とし、QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma) 用いた BCA 法により蛋白質定量を行い 20 mg/mL に調製した。試料を SDS 化 (細胞溶解液と等量の EzApply (ATTO) を加え、60 $^{\circ}$ C で 30 分間熱処理) した後、10 % アクリルアミドゲルにて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。分子量マーカーには、SDS-PAGE 用 SeeBlue® Plus2 Pre-stained standard (Invitrogen) を用いた。SDS-PAGE後のゲルを PVDF 膜 (BIO-RAD、Immuno-Blot™ PVDF Membrane) に転写した。転写装置は、Mini Trans-Blot Cell システム (BIO-RAD) を使用し、転写用バッファー²⁾ 中で 1 時間泳動 (450 V) 後、TBST³⁾ で

2 分間洗浄した。続いてブロッキングバッファー⁴⁾で 1 時間室温でブロッキングした後、1,000 倍希釈した一次抗体 (anti-iNOS (Upstate Biotechnology)) を室温で1時間反応させ、TBST で5分間の洗浄を 3 回行った。2000 倍希釈した二次抗体 (Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate (Upstate Biotechnology)) を室温で 1 時間反応させた後、TBST で 5 分間の洗浄を 3 回行い、その後 TBST で 2 分間の洗浄を 2 回行った。ECL plus 検出キット (Amersham) の発光基質を 5 分間反応させ、ライトキャプチャー (ATTO) で検出した

1) 抽出バッファー： 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% CHAPS,
1% プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nakarai tesque)

2) 転写用バッファー： 25 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 0.02% SDS (pH 8.4)

3) TBST： 0.1% Tween 20 in TBS

4)ブロッキングバッファー： 1% スキムミルク (Upstate Biotechnology) in TBST

Ⅲ. 結果

第 1 部

CEL-I のマウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 に対する細胞毒性

CEL-I の RAW264.7 細胞に対する刺激作用に関して検討するため、無血清培地中における CEL-I の細胞毒性を検討した。

CEL-I の評価と同時に、細胞毒性を示すことで知られる PHA-L (Phytohaemagglutinin-L) (生化学工業)、及び GlcNAc 特異的小麦胚芽由来レクチン WGA (Wheat germn agglutinin) (Sigma) を用い、細胞毒性を評価した[17]。

上記レクチンについて、無血清培地 (D-MEMに抗生物質 (Benzyl Penicillin Potassium, Streptomycin Sulfate) を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加) にて、0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調製し、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 $\mu\text{L}/\text{well}$ に添加後、24時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 存在下にてインキュベートした後、MTT法を用い、細胞毒性を評価した。

結果を Fig.3 に示す。CEL-I は RAW264.7 細胞に対して強い毒性は示さなかった。また、PHA-L、WGAについては、これまでの報告通りRAW264.7細胞に対する細胞毒性が確認され、CEL-Iよりも比較的強い毒性を示した。

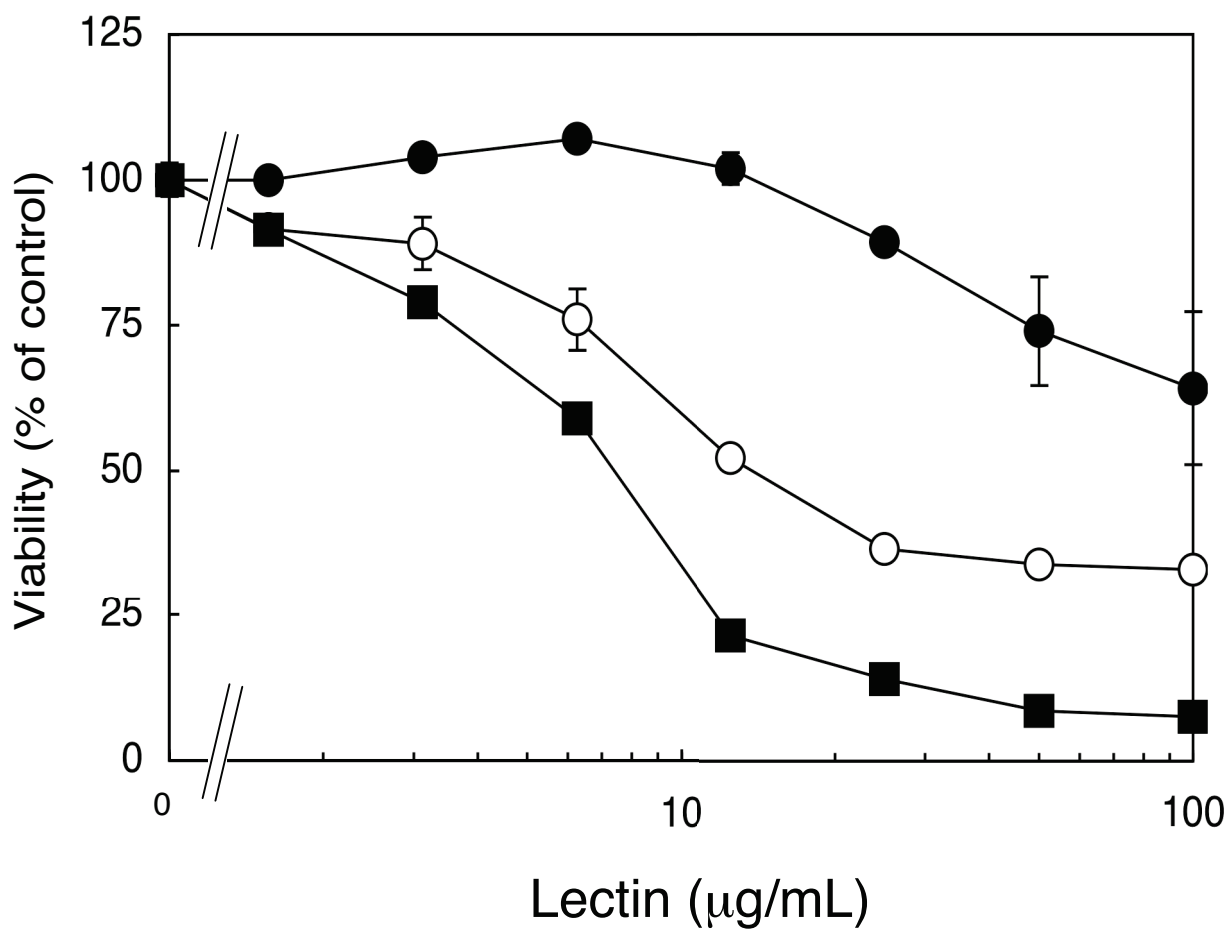


Fig. 3. Cytotoxicities of CEL-I (●), PHA-L (○), and WGA (■) on RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were treated with various concentrations of each lectin in serum-free DMEM at 37°C. After 24 h, the cell viabilities were measured by MTT assay as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

第 2 部

CEL-I のマウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 に対する TNF- α , G-CSF 放出誘導活性

(1) 各種レクチンのRAW264.7細胞に対するTNF- α , G-CSF 放出活性

CEL-I の RAW264.7 細胞に対するサイトカイン TNF- α 、G-CSF 放出誘導活性を検討した。ポジティブコントロールには PHA-L、またネガティブコントロールには WGA を用いた。

方法は、上記レクチンについて、無血清培地で、0-100 μ g/mLとなるよう調製し、RAW264.7 細胞 2×10^4 cells/100 μ L/well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下にてインキュベートした後、サンドイッチ ELISA 法により培地中よりサイトカインを検出し、CEL-I のサイトカインの産生誘導作用について検討した。

結果を Fig. 4 に示す。CEL-I は RAW264.7 細胞に作用し、その濃度依存的に TNF- α 、G-CSF の放出を誘導することが判明した。

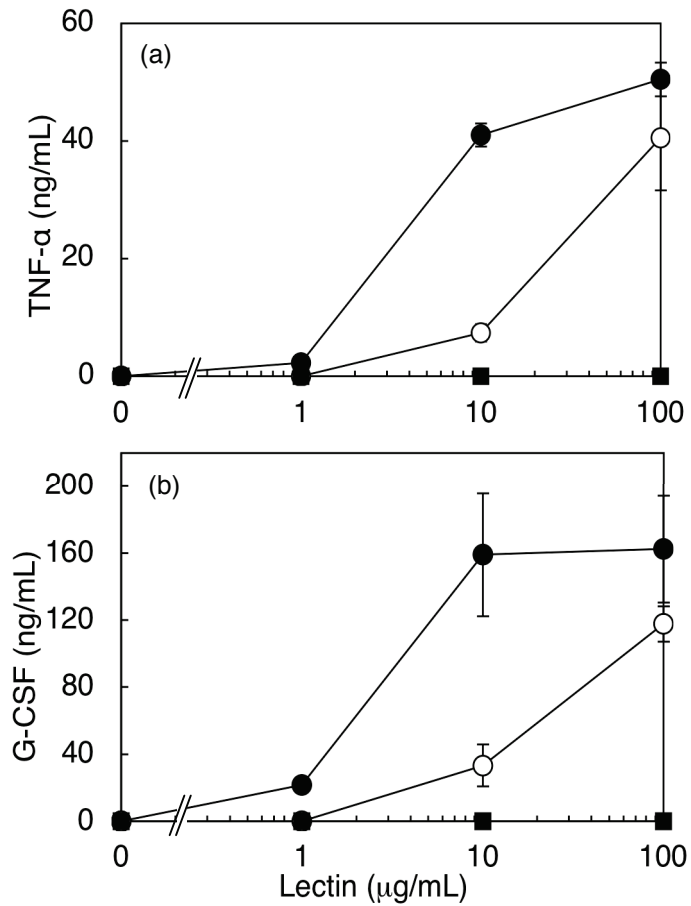


Fig. 4. Production of TNF- α (a) and G-CSF (b) from RAW264.7 cells incubated with various concentrations of CEL-I (●), PHA-L (○), and WGA (■). Adherent cells (2×10^4 cells/well in 96-well plates) were incubated with the indicated concentration of each lectin in serum-free DMEM at 37°C. After 24 h, each cytokine level in the supernatant was measured by sandwich ELISA method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(2) CEL-I の RAW264.7細胞への TNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する polymyxin B の影響

Polymyxin B は lipopolysaccharide (LPS) の活性を阻害する陽イオン性ペプチドである。LPS はグラム陰性菌細胞壁を構成するエンドトキシンであり、様々な細胞を刺激して炎症や細胞増殖などの多彩な反応引き起こす事で知られる。RAW264.7 細胞に対する NO やサイトカインの誘導活性も多数報告されている [37]。一方で過去に、見出された生理活性物質の活性の誘発源が、混入した LPS に原因していたとの報告がある [38]。ここでは polymyxin B を用いて、CEL-I の活性における LPS のコンタミネーションについて検討した。

方法は、無血清培地にて CEL-I を 10 μ g/mL、LPS を 50ng/mL となるよう調製したものを、またそこに PMB を終濃度 2 μ g/mL で添加したものを、RAW264.7 細胞 2 \times 10⁴ cells/100 μ L/well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、サンドイッチ ELISA 法を用い、サイトカインを定量した。

結果を Table. I に示す。Polymyxin B によって、LPS の活性は阻害されたが、CEL-I の活性に影響はなかった。よって、CEL-I のサイトカイン誘導作用について、LPS の関与は否定された。

(3) CEL-I の RAW264.7細胞への TNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する特異的糖 GalNAc の影響

これまで見出された CEL-I の赤血球凝集活性や MDCK 細胞に対する強力な細胞毒性は GalNAc 添加によって阻害される [11,18]。サイトカイン活性においても、CEL-I の特異的糖である GalNAc の影響を検討した。

方法は CEL-I を、無血清培地にて、CEL-I を 10 μ g/mL となるよう調製したものを、ま

たそこにGalNAcを終濃度 0.1Mになるよう添加したものを RAW264.7 細胞 2×10^4 cells/100 μ L/well に添加後、24時間、37°C、5% CO₂存在下にてインキュベートした後、サンドイッチ ELISA 法を用い、サイトカインを定量した。

結果を polymyxin B の影響と同様に Table. I に示す。特異的糖である GalNAc 添加により部分的ではあるが TNF- α 、G-CSF の両者に阻害効果が認められた。したがって CEL-I のサイトカイン活性は、そのレクチン機能（糖鎖認識）が関与していることが示唆された。

Table. I . Effects of and Polymyxin B and GalNAc on CEL-I-Induced Cytokine Secretion by RAW264.7 Cells.

Treatment	TNF- α (%) ^a	G-CSF (%) ^a
CEL- I	100	100
+ Polymyxin B (2 μ g/mL)	99	100
+ GalNAc (0.1 M)	75	51
LPS ^b	100	100
+ Polymyxin B (2 μ g/mL)	3	3

^a 100 % level of TNF- α and G-CSF detected in the culture supernatant of CEL-I-treated RAW264.7 cells were 18.7 and 29.1 ng/mL, respectively, or in those of LPS-treated cells were 59.5 and 86.4 ng/mL, respectively.

^b To confirm the inhibitory effect of polymyxin B, the effects of the inhibitor on LPS-included cytokine secretion were examined at the same plates.

(4) CEL-I のRAW264.7細胞に対するサイトカイン放出誘導活性 (経時変化)

CEL-I 刺激により誘導される TNF- α , G-CSF について、その放出が検出されるタイミングを調べるため、経時的にサイトカイン量を測定した。

方法は CEL-I を、無血清培地にて、10 μ g/mL となるよう調製し、RAW264.7 細胞 2×10^4 cells/100 μ L/well に添加後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートし、0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 24 時間の各時間に培養上清を回収し、サンドイッチ ELISA 法に供し、サイトカインを定量した。

結果を Fig.5 に示す。TNF- α 、G-CSF 放出が時間依存的に検出された。また、TNF- α と G-CSF が検出された時間に差がみられた。TNF- α は 2 時間付近からであるのに対し G-CSF は約 6 時間で放出が検出された。また、9 時間以降、TNF- α 放出の検出量は上昇しなかったが、G-CSF については継続して検出量の増加が認められた。

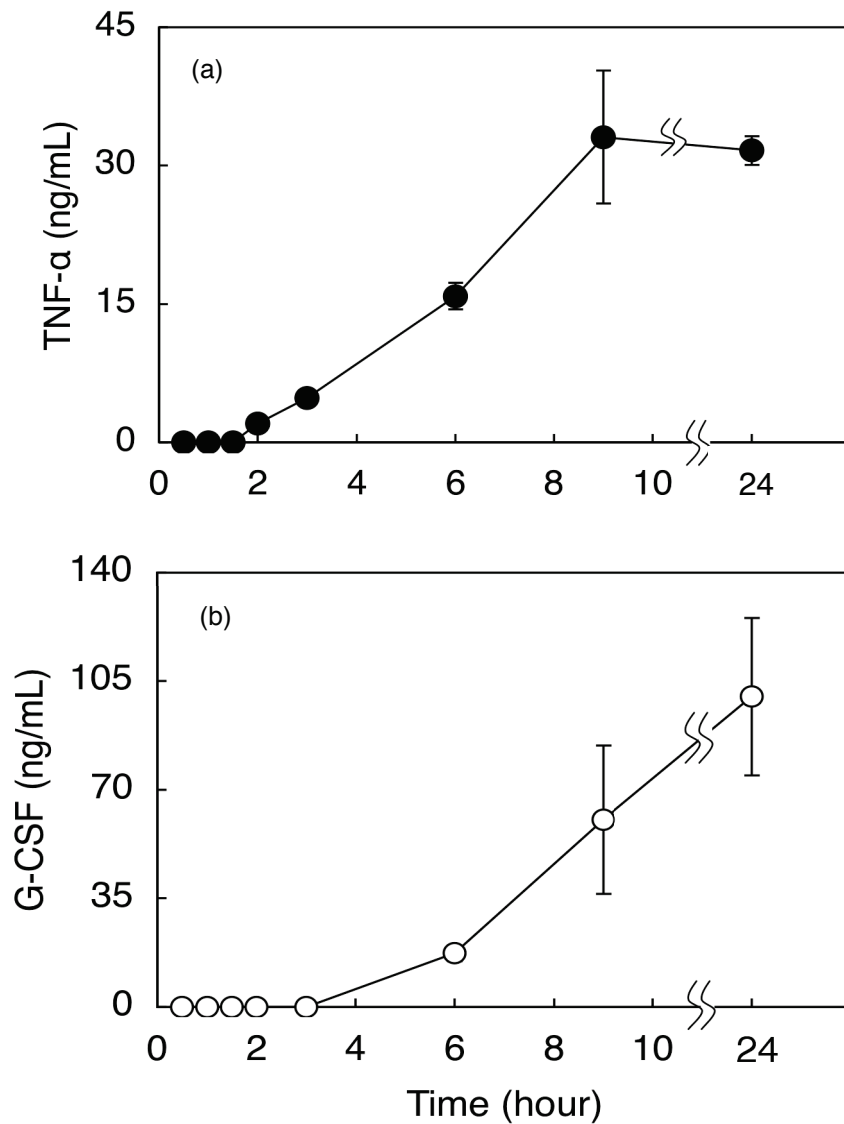


Fig. 5. Time courses of the production of TNF- α (a) and G-CSF (b) from CEL-I-treated RAW264.7 cells. Adherent cells (2×10^4 cells/well in 96-well plates) were incubated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of CEL-I for the indicated periods of time, and then the supernatant was withdrawn from each well and subjected to the measurement of cytokine levels by sandwich ELISA method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(5) FITC 標識レクチンのRAW264.7 細胞に対する結合量の測定

細胞への結合量と活性レベルの関係を調べるため、作成したCEL-I、PHA-L、WGA の FITC ラベル体 (F-CEL-I、F-PHA-L、F-WGA) を用い、それぞれの RAW264.7 細胞 に対する結合量を測定した。

方法は作成した レクチンのFITCラベル体 (F-CEL-I、F-WGA、F-PHA-L) を無血清 培地にて、それぞれ1nMとなるよう調製したもの、またそれぞれの特異的糖が0.1M となるよう添加したものについて、RAW264.7 細胞 2×10^5 cells/well (48-well plates) に添加後、2時間、37°C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、FITCの蛍光強 度を測定する事でFITCラベル体の結合量を調べた。

結果は Fig.6 に示す。結合量は、F-CEL-I >F-WGA >F-PHA-L の順に多く検出され た。また、それらの結合はそれぞれの特異的糖で阻害された。F-CEL-I においては、 GalNAc によって一部阻害されない現象が認められた。

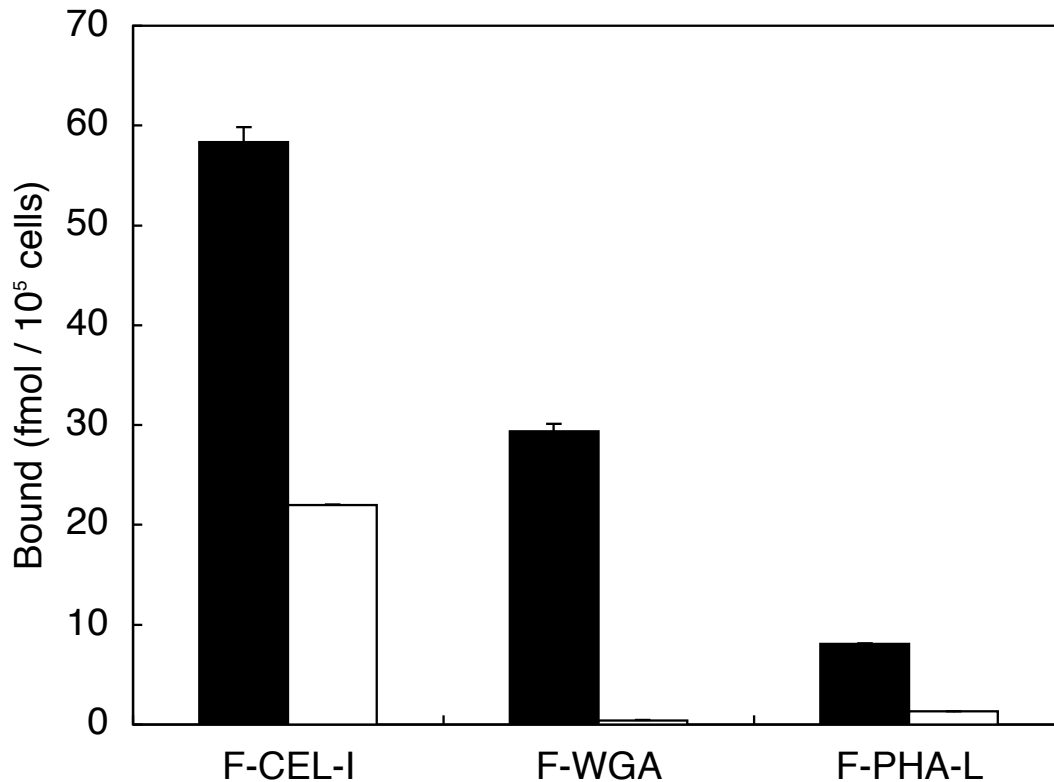


Fig. 6. Binding of F-CEL-I, F-PHA-L, and F-WGA to RAW264.7 cells in the presence (□) or absence (■) of the specific sugar for each lectin. Adherent cells (2×10^5 cells/well in 48-well plates) were incubated with 1 nM of each FITC-labeled lectin for 2 h at 37°C in serum-free DMEM. After incubation, the cells were washed three times with PBS and then the amount of cell-associated each F-lectin was measured as described under " MATERIALS AND METHODS ". As a specific sugar, 0.1 M GalNAc for CEL-I and PHA-L, and 0.1 M GlcNAc for WGA were used, respectively. Each column represents the average of triplicate measurements.

(6) CEL-I の RAW264.7 細胞への TNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する brefeldin A (BFA) の影響

レクチンは小胞体輸送及び retro grade transport (ゴルジ体から小胞体への方向への輸送 (逆行輸送)) により細胞内を運搬される。そこで CEL-I の活性に対する、BFA の影響を検討した。BFA は小胞体／ゴルジ体間における蛋白質輸送を阻害する他、細胞内の小胞体輸送を阻害する事で知られるインヒビターである [39-41]。

方法は、無血清培地にて CEL-I を 10 μ g/mL となるよう調製したもの、またそこに BFA を 0-0.5 μ g/mL となるよう添加したものを RAW264.7 細胞 2×10^4 cells/100 μ L /well に添加後、24時間 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下にてインキュベートした後、サンドイッチ ELISA 法を用い、サイトカインを定量した。

結果は Fig.7 に示す。BFA の濃度依存的に、CEL-I の活性が阻害された。0.5 μ g/mL においてそれぞれの誘導が完全に阻害された。

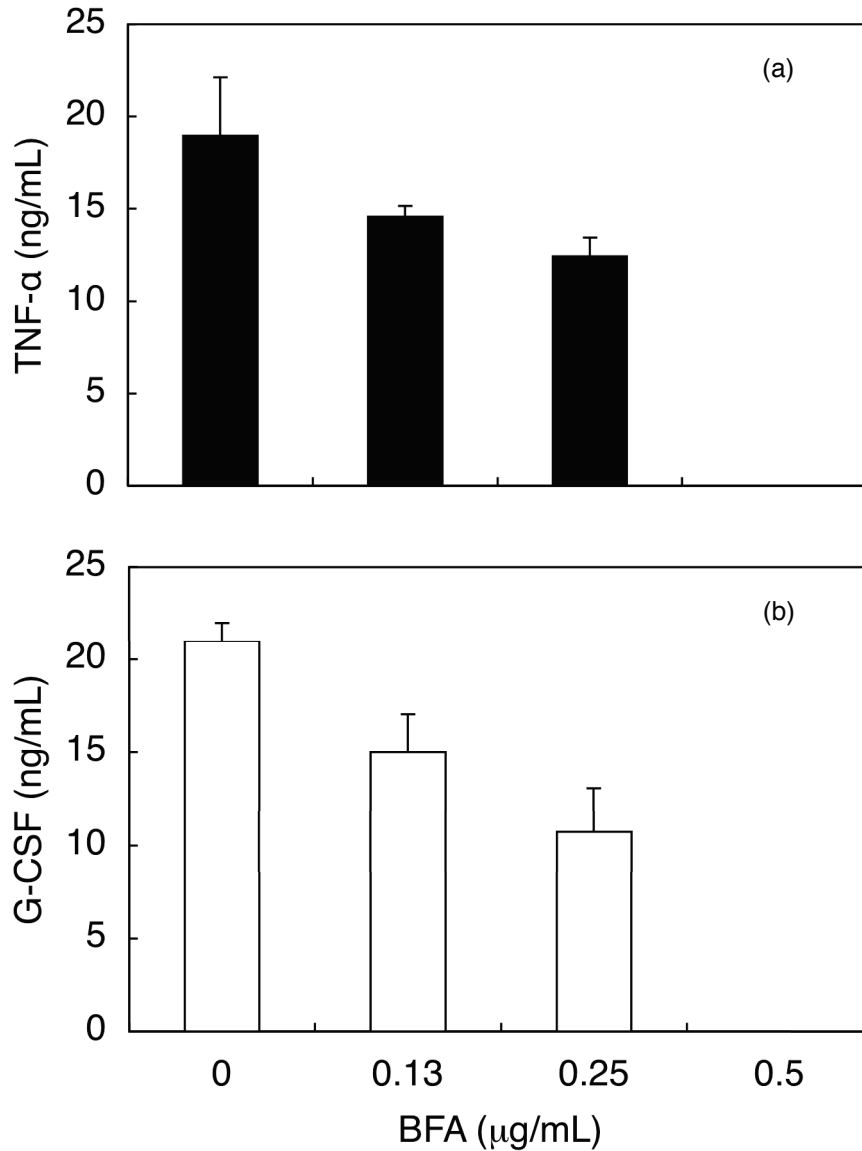


Fig. 7. Effects of BFA on the secretion of TNF- α (a) and G-CSF (b) by CEL-I-treated RAW264.7 cells. Adherent cells (2×10^4 cells/well in 96-well plates) were preincubated in the presence of indicated concentrations of BFA in serum-free DMEM at 37°C for 10 min, followed by the addition of CEL-I (final 10 μ g/mL). After 6 h incubation at 37°C, TNF- α and G-CSF in the culture supernatants were measured by sandwich ELISA method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements

(7) CEL-I 刺激に伴う TNF- α 並びに G-CSF mRNA の解析、及び mRNA 発現に対する BFA の影響

それぞれのサイトカインの転写レベルにおける活性化を確認するため本実験を行なった。さらに、細胞内への侵入が想定される CEL-I の、本活性への関与を検討するため、転写レベルの活性化に対する BFA の影響を検討した。

方法は、CEL-I を 0-10 μ g/mL になるよう 無血清培地で調製したもの、及び CEL-I 10 μ g/mL、BFA 0.5M をそれぞれの終濃度となるよう調製したものを RAW264.7 細胞 1×10^6 cells/well (12-well plates) に添加し、6時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした。その後、AGPC 変法により RNA を抽出し、RT-PCR 法により各々サイトカインの mRNA レベルにおける活性化を測定した。

結果は Fig.8 に示す。サイトカイン mRNA の活性化が CEL-I の濃度に応じて検出された。また、その活性化は、0.5 μ g/mL の BFA 添加により阻害されなかった。従って、細胞内の CEL-I ではなく、細胞膜上に結合した CEL-I の刺激が活性の誘発に重要であると示唆された。

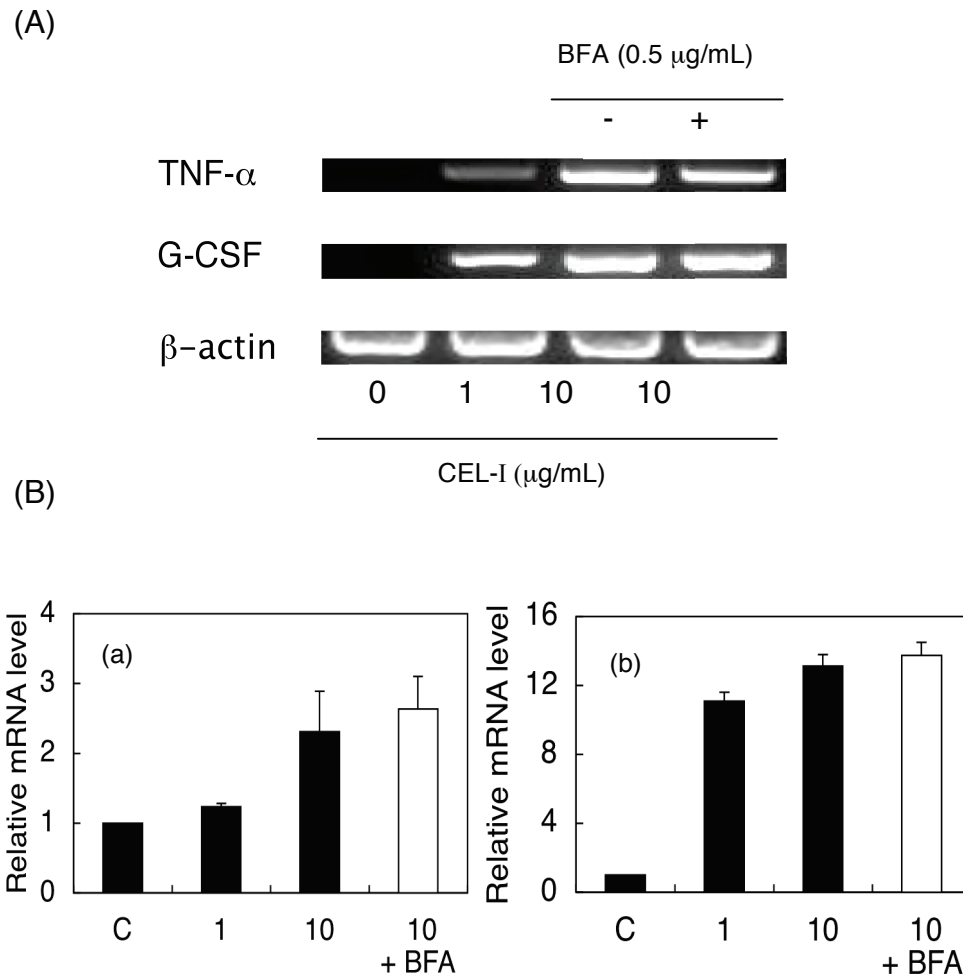


Fig. 8. Effects of BFA on mRNA expression levels of TNF- α (a) and G-CSF (b) in CEL-I-treated RAW264.7 cells. Adherent cells (1×10^6 cells/well in 12-well plates) were preincubated in the absence (■) or presence (□) of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BFA in serum-free DMEM at 37°C for 10 min, followed by the addition of CEL-I (final 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 6 h incubation at 37°C, TNF- α and G-CSF mRNA levels were examined by RT-PCR as described under "MATERIALS AND METHODS". (A) Representative results of agarose gel electrophoresis from several experiments are shown. (B) Intensity of each band for TNF- α (a) or for G-CSF (b) was determined with densitometry and mRNA levels normalized to β -actin mRNA were expressed as relative to the control.

(8) CEL-I 刺激によって誘導されるRAW264.7 細胞内の MAP キナーゼ系解析

MAP キナーゼ (mitogenic activated protein kinase) 系はサイトカイン誘導を媒介する細胞内伝達シグナル系の一つとして知られる [35]。CEL-I の活性における MAP キナーゼ系の関与を調べるため、ビーズアッセイ法によって 3 種の MAP キナーゼ系 (ERK、p38、JNK) の活性化を経時的に解析した。

方法は、CEL-Iが10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう 無血清培地 で調製したものを RAW264.7細胞 3×10^4 cells/wellに、37°C、5% CO_2 存在下にてインキュベート時間が 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 24 時間となるよう添加した後、細胞溶解液をビーズアッセイに供し、MAP キナーゼ系の活性化を測定した。

結果は Fig.9 に示す。CEL-I 添加後 90 分をピークとする MAP kinase (ERK, p38, JNK) 系の活性化が検出された。

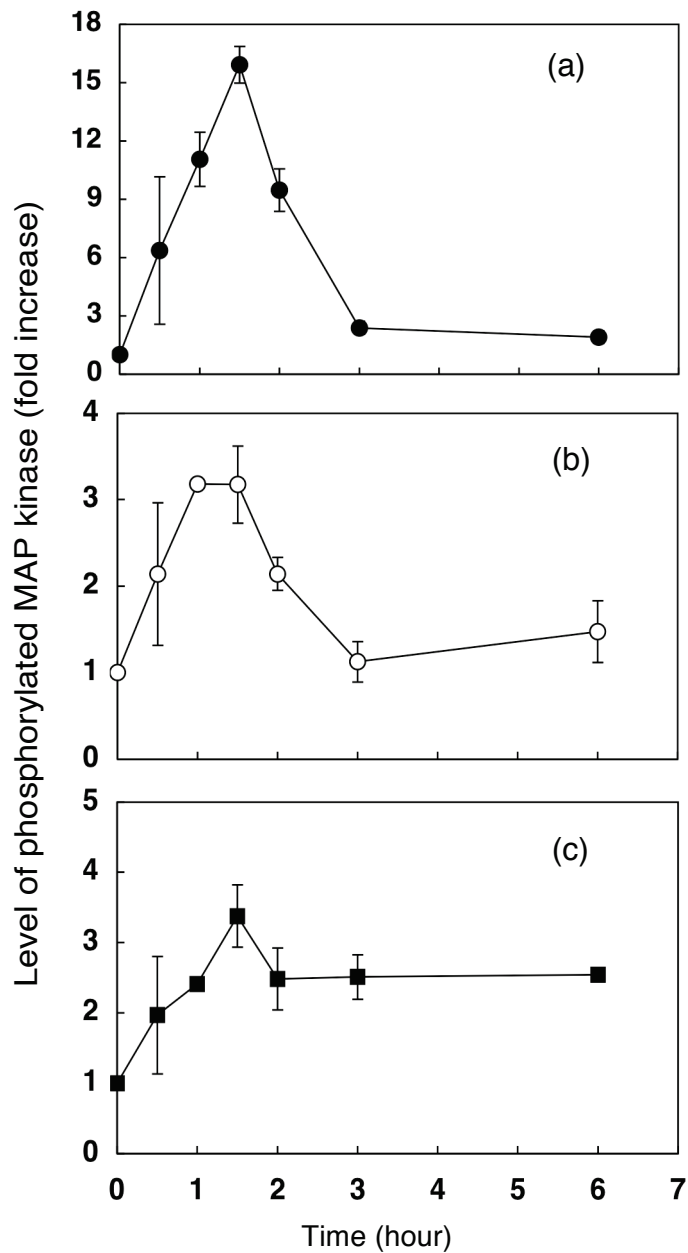


Fig. 9. Kinetics of phosphorylation of ERK (a), p38 (b), and JNK (c) MAP kinases in CEL-I-treated RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CEL-I in serum-free DMEM at 37°C. At the indicated periods of time, the cells were harvested and lysed. Each cell lysate was subjected to Bio-Plex beads assay for detection of phosphorylated MAP kinases as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(9) CEL-I の RAW264.7 細胞への TNF- α , G-CSF 放出誘導活性に対する

MAP キナーゼ阻害剤の影響

Fig. 9 で MAP キナーゼ系の活性化が検出されたので、それらの CEL-I の サイトカイン放出誘導活性への関与について、3 種の MAP キナーゼ系に特異的な阻害剤を用いて検討した。

方法は、CEL-I を 10 μ g/mL になるよう無血清培地で調製したもの、また CEL-I 10 μ g/mL に加え MAP キナーゼ ERK、p38、JNK のそれぞれに対する阻害剤 PD98059、SB202190、SP600125 をしたものを 30 mM を RAW264.7 細胞 2 \times 10⁴ cells/100 μ L /well に添加後、6時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした。その後、サンドイッチ ELISA 法を用い、サイトカインを定量した。

結果は Fig.10 に示す。それぞれの MAP kinase 阻害剤で、CEL-I のサイトカイン放出誘導は阻害された。

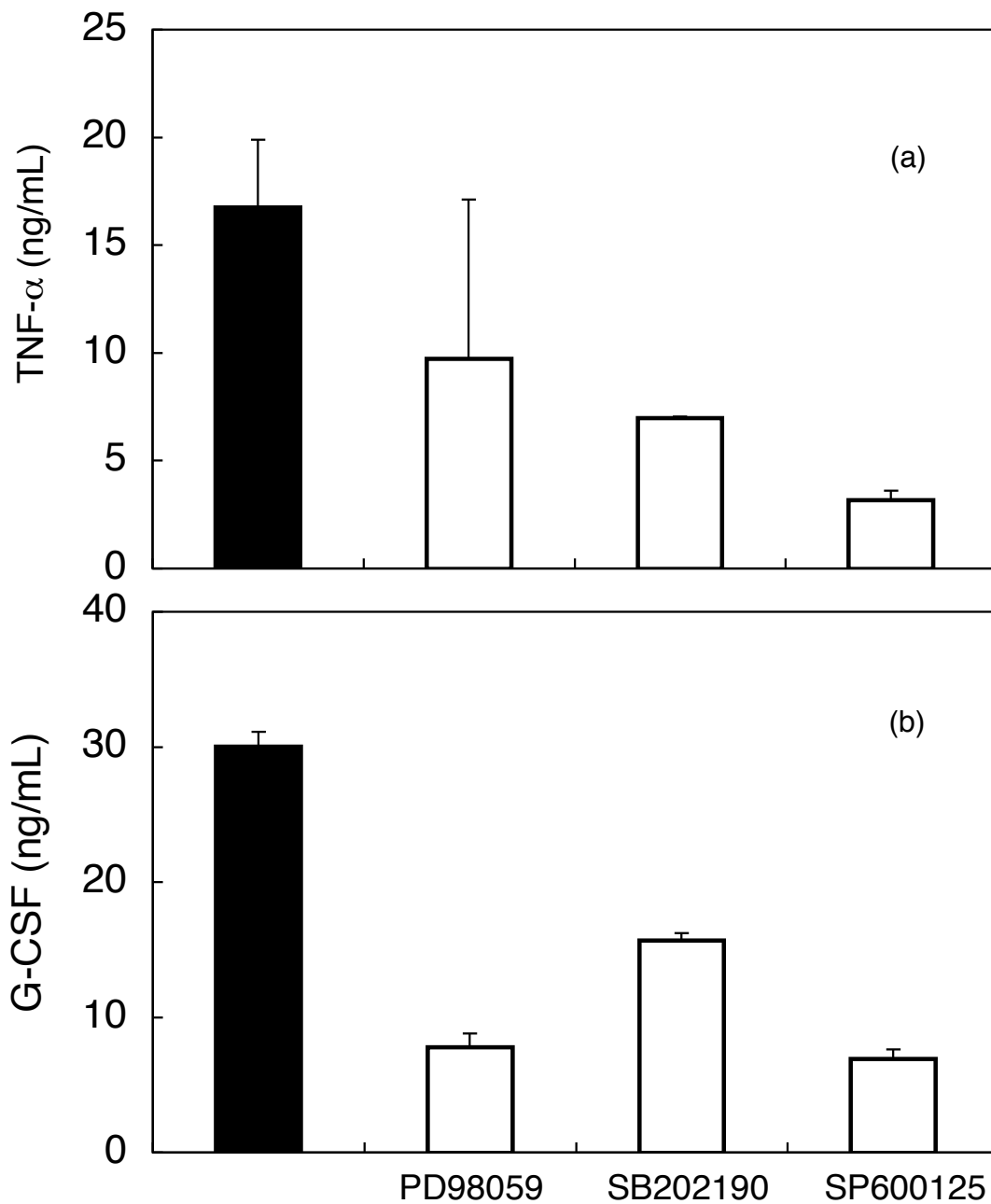


Fig. 10. Effects of MAP kinase inhibitors on the secretion of TNF- α (a) and G-CSF (b) by CEL-I-treated RAW264.7 cells. Adherent cells (2×10^4 cells/well in 96-well plates) were preincubated in the presence (\square) or absence (\blacksquare) of 30 μ M of ERK (PD98059), p38 (SB202190), or JNK (SP600125) MAP kinase inhibitor in serum-free DMEM at 37°C for 1 h, followed by the addition of CEL-I (final 10 μ g/mL). After 6 h incubation at 37°C, TNF- α and G-CSF in the culture supernatants were measured by sandwich ELISA method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(10) CEL-I の RAW264.7 細胞への TNF- α 放出誘導活性に対するリコペンの影響

リコペンは、疎水性が高い炭化水素化合物で、分子中に複数の二重結合をもつ直鎖状のビタミン様活性を持たないカロテノイドの一種であり、トマトを代表とする野菜及び果物に含まれる赤色色素である。近年、その抗酸化作用に関する研究結果が多数報告されており [42-44]、疫学調査では、リコペンを含む多様な野菜や果物を豊富に含む食事により、発ガンリスクの低下や慢性疾患の予防効果の可能性が確認され [45,46]、健康に有用な成分として注目されている。また、肥満、糖尿病、喫煙起因の疾病等に対するリコペンの効能についての研究も進んでいる [47-49]。また、リコペンは生体防御として主要な役割を果たしている免疫系に対しても何らかの作用を示す知見が得られつつある。細胞レベルでの解析から、細胞外からの刺激に応答してマクロファージが産生放出する NO や種々のサイトカインレベルがリコペン存在下で変化することが見出されている。例えば、RAW264.7 細胞を、グラム陰性菌細胞壁成分である LPS で刺激すると NO 及び炎症性サイトカインの一種である interleukin 6 (IL-6) が産生放出されるが、リコペンの添加によりこれらの因子の放出量が減少することが報告されている [50]。

本実験においては、CEL-I の TNF- α 及び NO の放出誘導作用に対するリコペンの作用について検討する。

方法は、CEL-I が 25 μ g/mL となるよう無血清培地で調製したもの、またリコペンがそこに 0-100 μ M となるよう添加したものについて、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 μ L/well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下にてインキュベートし、サンドイッチ ELISA 法を用い、TNF- α を定量した。

結果は Fig. 11 に示す。リコペンは CEL-I の誘導する TNF- α 放出量に、特に濃度 100 μ M にて阻害効果を示した。

なお NO 活性の検討に関する実験データについては、第 3 部 (12) に示す (Fig. 26)。

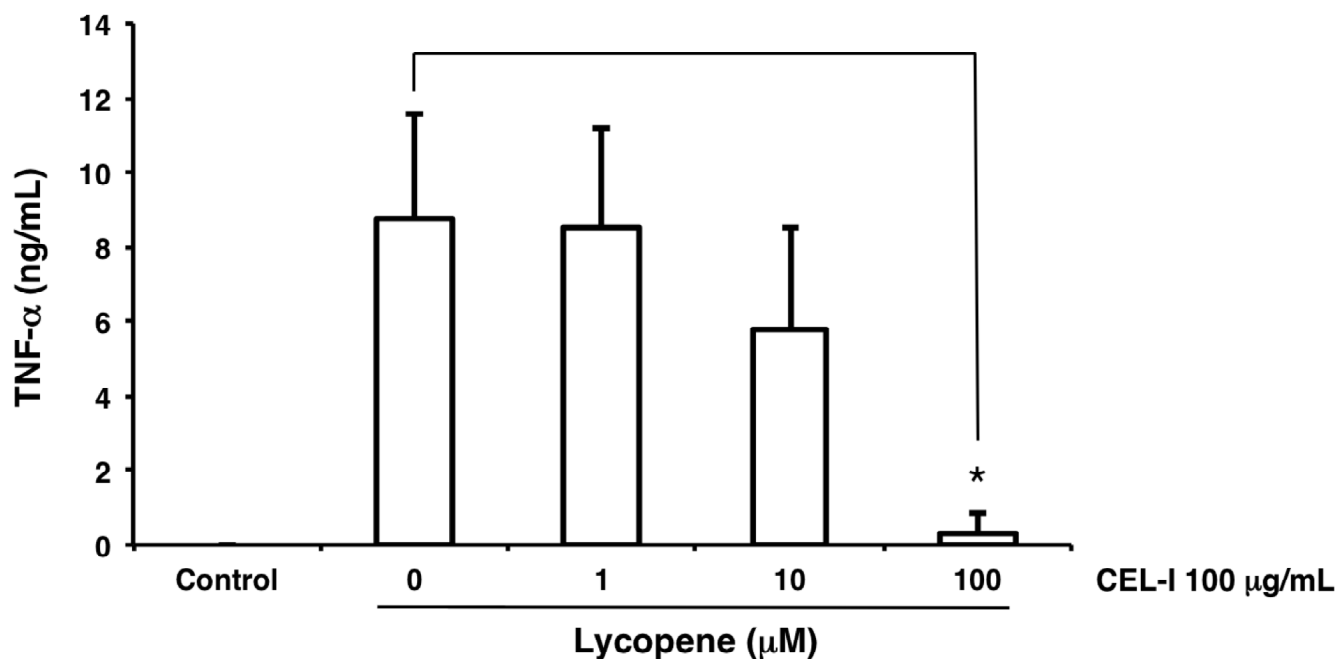


Fig. 11. Effect of lycopene on the secretion of TNF- α from RAW264.7 cells treated with CEL-I. Adherent RAW264.7 cells in 96-well plate (3×10^4 cells/well) were pre-incubated with 1-100 μ M of lycopene in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C for 1 h, followed by the addition of CEL-I (final 100 μ g/mL). After 24 h incubation, TNF- α levels in the supernatants of the treated cells were measured as described in the text. Columns represent the average of triplicate measurements and bars indicate the standard deviation. Asterisks indicate significant differences between absence and presence of lycopene with $p < 0.05$.

(11) モデッシンの RAW264.7細胞に対する サイトカイン誘導活性

モデッシンは南アフリカの植物である *Modecca digtiata* の根に存在するレクチンであり、GalNAc 及びガラクトースを含む糖質に結合性を示す。また、A鎖及びB鎖より構成され、2型リボソーム不活性化蛋白質 (RIPs)に分類される[75]。モデッシンは細胞毒性を示すが、その機構は、まず B 鎖の糖結合機能により細胞表面の糖鎖に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入する。以降、リボソームに達したモデッシンは A 鎖でリボソームを不活化させることにより、その毒性を発現させる。また、アポトーシスを誘導する事が報告されているが、同様の作用を示すものに、同じく RIPs に分類されるヒマ種子由来レクチンのリシン、トウアズキ種子由来レクチンのアブリンが知られている。一方、モデッシンはヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 及びマクロファージに作用し、サイトカインの TNF- α 、及び interleukin-8 (IL-8) を誘導する報告がある[19,64]。

本実験では、CEL-I のサイトカイン誘導作用との挙動の比較を行うため、モデッシンの RAW264.7細胞に対するサイトカイン活性、及び NO 誘導作用に関するデータを取り上げた。

方法は、モデッシンが 0-100ng/mL となるよう調製したものについて、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100mL /well に添加後、24時間、37°C、5% CO₂存在下にてインキュベートし、サンドイッチELISA 法を用い、培養上清より TNF- α 、G-CSF を定量した。

結果は Fig.12 に示す。モデッシンは RAW264.7 細胞に作用し、TNF- α の放出を誘導した。しかしながら、G-CSF に関しては培養上清より検出出来ず、その産生が誘導されないことが示唆された。また TNF- α 誘導活性は、モデッシンの濃度に依存性が見られるが、モデッシンが示す強い細胞毒性 (IC₅₀= 約2.0 - 4.0ng/mL) により高濃度域では減少し、放出量を表すグラフがベル型曲線となっている。従って、CEL-I のサイトカイン活性とは、誘導するサイトカイン種が異なること、また RAW264.7 細胞に対して示す毒性の違いより、その挙動に相違があることが確認された。ちなみにリ

シンもRAW264.7 細胞に作用し TNF- α の放出を誘導することで知られるが、アポトーシスを誘導する細胞内伝達シグナルと、 TNF- α 誘導の経路におけるクロストークが示唆されている[19]。CEL-I の細胞毒性は、モデシンの分類される RIPs と異なり、アポトーシスの誘導が認められない。詳細については不明であるが、サイトカイン誘導の機構が、細胞毒性の発現機構の相違に関連している可能性が考えられる。

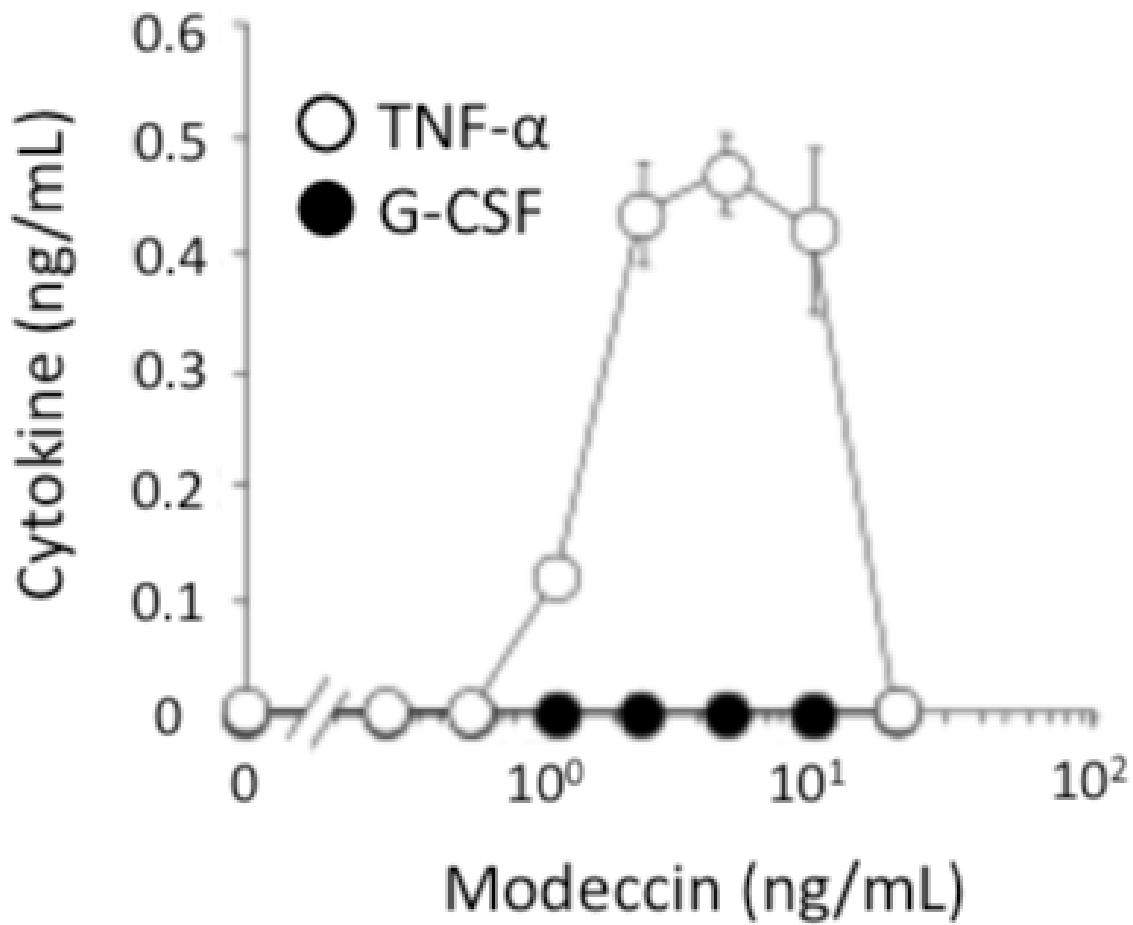


Fig. 12. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) levels in modeccin- treated RAW264.7 cells. Adherent RAW264.7 cells (3×10^4 cells per well in 96-well plates) were incubated with the indicated concentrations of modeccin in DMEM containing 10% of FBS at 37°C. After 24 h, the supernatant was withdrawn from each well, and subjected to the measurement of each cytokine level by sandwich ELISA method as described in the text. Data represents mean SD, $n = 3$.

(12) モデシンの RAW264.7細胞への TNF- α 誘導作用に対する特異的糖
N-acetylgalactosamine (GalNAc)の影響

CEL-I のサイトカイン活性は特異的糖 GalNAc の添加により阻害された。

よって、CEL- I のサイトカイン誘導はレクチン機能による細胞表層の糖鎖への結合が関与していることが考えられた。そこで、モデシンについても、特異的糖である GalNAcの存在下における、TNF- α 誘導活性への影響を検討した。

方法は、モデシンを 3ng/mL に調製したもの、もしくはモデシン 3ng/mL に GalNAc を終濃度 10 mM もしくは 100mM との混合溶液となるよう調製したものについて、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100mL /well に添加後、24時間、37°C、5% CO₂存在下にてインキュベートし、サンドイッチ ELISA 法を用い、培養上清より TNF- α を定量した。モデシンと GalNAc については、溶液中にて、細胞添加前に 1 時間プレインキュベートしている。

結果は Fig.13 に示す。モデシンの TNF- α 誘導作用は GalNAc の濃度に依存して阻害された。従ってモデシンの TNF- α 誘導作用についても、CEL-I と同様、レクチン機能による細胞表層の糖鎖への結合が関与していることが示唆された。

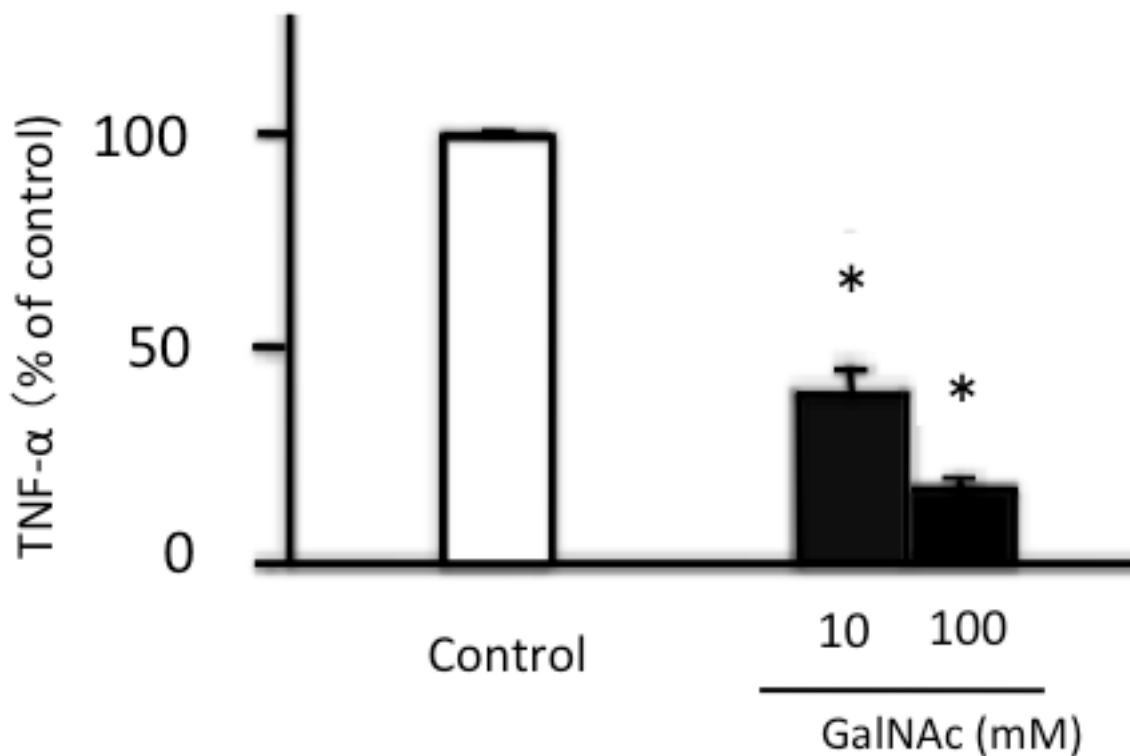


Fig. 13. Effects of N-acetylgalactosamine(GalNAc) on the modeccin- induced tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells per well in 96-well plates) were preincubated with N-acetylgalactosamine (GalNAc) (final 10 or 100 mM) for 1 h in DMEM containing 10% of FBS at 37°C, and then modeccin (final 3 ng/mL) was added. After 24 h, the supernatant was withdrawn from each well, and subjected to the measurement of TNF- α levels by sandwich ELISA method as described in the text. Data represents mean SD, $n = 3$. Asterisks indicate significant differences between with and without monosaccharide ($p < 0.05$).

(13) モデシンの RAW264.7 細胞への TNF- α 誘導作用に対する MAP キナーゼ
阻害剤の影響

RIPsであるヒマ種子由来レクチンのリシンは、前項でも触れた通り、RAW264.7 細胞に作用することでTNF- α の放出を誘導する。またその誘導機構として、MAP kinase 系の関与が報告されており、特に p38 MAP kinase の阻害剤によりその誘導が強く阻害された。よって、3種の MAP kinase 系においても特に p38 の関与が考えられ、またアポトーシスの誘導経路とのクロストークも示唆されている。本実験においても3種の MAP kinase 阻害剤を用いて、モデシンの TNF- α 誘導作用への影響を検討した。

方法は、モデシンを 3 ng/mL になるよう調製したもの、また モデシンを 3 ng/mL に加え MAPキナーゼ ERK、 p38、 JNK のそれぞれに対する阻害剤 PD98059、SB202190、SP600125 をしたものの15 mM を RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100mL /wellに添加後、24 時間、37°C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした。その後、サンドイッチ ELISA 法を用い、サイトカインを定量した。MAP キナーゼ阻害剤についてはモデシン添加前に、細胞に添加し1時間、37°C、5% CO₂存在下でプレインキュベートしている。

結果は Fig.14 に示す。p38 MAP キナーゼ阻害剤で、モデシンのサイトカイン放出誘導は顕著に阻害された。よって、リシンの場合と類似した阻害効果が認められ、CEL-1 の TNF- α 活性とは異なった誘導機構の存在が示唆された。

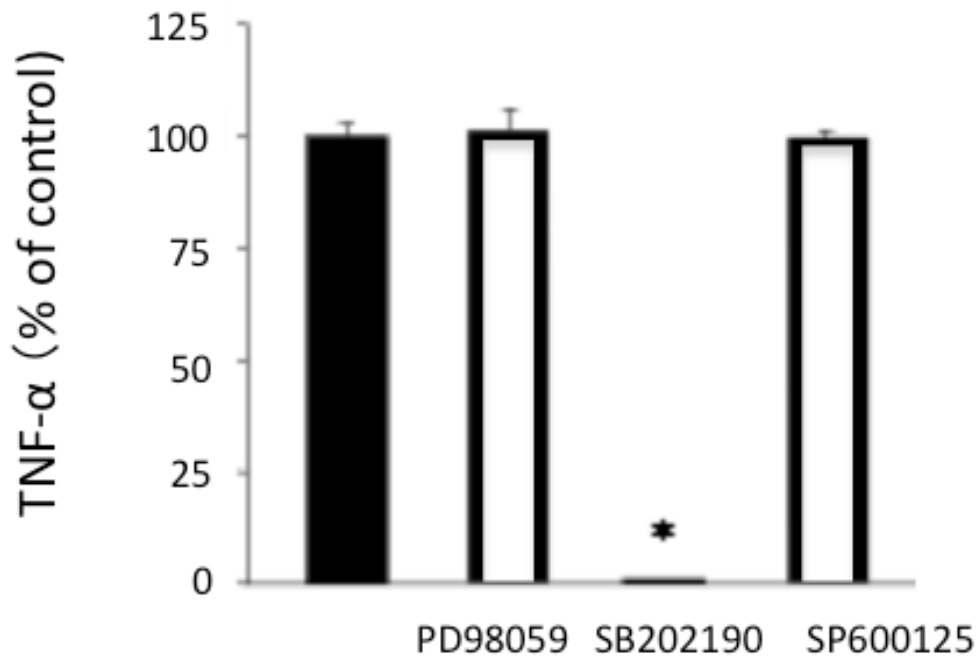


Fig. 14. Effects of MAP kinase inhibitors on the modeccin- tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells per well in 96-well plates) were preincubated in the absence (■) or presence (□) of ERK (PD98059), p38 (SB202190), JNK (SP600125) MAP kinase inhibitor (final 15 μ M) for 1 h in DMEM containing 10% of FBS at 37°C, and then modeccin (final 3 ng/ml) was added. After 24 h, the supernatant was withdrawn from each well, and subjected to the measurement of TNF- α levels by sandwich ELISA method as described in the text. Data represents mean SD, $n = 3$. Asterisks indicate significant differences between with and without inhibitors ($p < 0.05$).

第3部

CEL-I のマウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 に対する NO 産生誘導活性

CEL-I の RAW264.7 への刺激作用として、新規に見出された TNF- α 、G-CSF 放出誘導活性に続き、NO 産生誘導の可能性について検討した。

(1) 各種レクチンの RAW264.7 細胞に対する NO 産生誘導活性の検討

サイトカイン活性と同様、CEL-I の他に ポジティブコントロール PHA-L とネガティブコントロール WGA を用い、NO 産生誘導活性の比較を行った。

方法は、上記レクチンについて、無血清培地 (D-MEMに抗生物質 (Benzyl Penicillin Potassium, Streptomycin Sulfate) を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加) で、0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調製し、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 μL /well に添加後、24時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について検討した。

結果は Fig.15 に示す。CEL-I の濃度依存的に、RAW264.7 細胞より NO の産生が誘導された。また既知の NO 誘導レクチンである PHA-L よりも遥かに強い誘導作用を示すことが判明した。

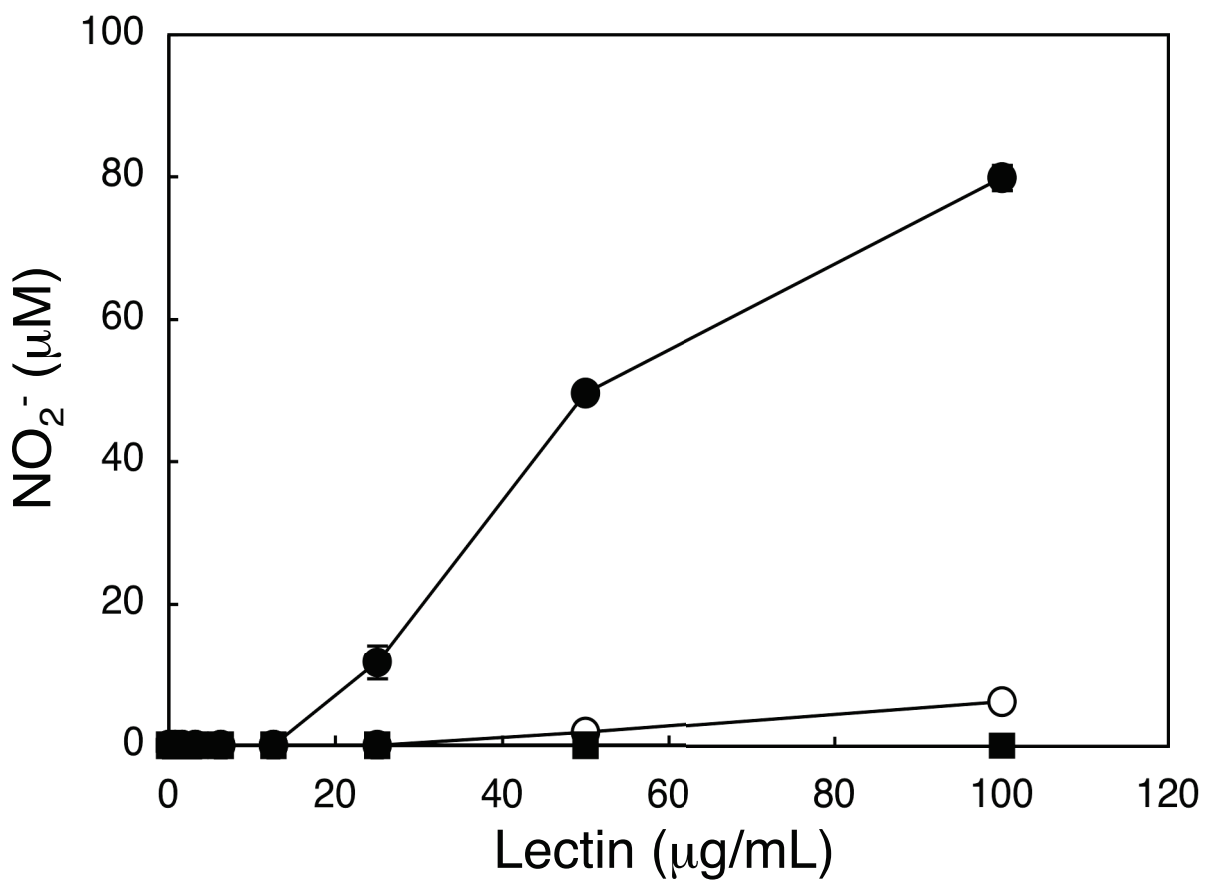


Fig. 15. NO production by RAW264.7 cells treated with various concentrations of CEL-I (●), PHA-L (○), and WGA (■). Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were treated with the indicated concentration of each lectin in serum-free DMEM at 37°C. After 24 h, the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(2) CEL-I の RAW264.7 細胞への NO 産生誘導活性に対する polymyxin B の影響

第 2 部 (2) で行なった実験と同様の目的で polymyxin B を用いた実験を行なった。

方法は、無血清培地にて CEL-I を 25 μ g/mL、LPS を 1ng/mL とするよう調製したもの、またそこに PMB を 0-1.0 μ g/mL で添加したものを、RAW264.7 細胞

3 \times 10⁴cells/100 μ L/well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について検討した。

結果は Fig.16 に示す。LPS の活性は polymyxin B の濃度依存的に阻害されたが、CEL-I は活性を保持した。従って、CEL-I の NO 活性において LPS が関与しないことが示唆された。

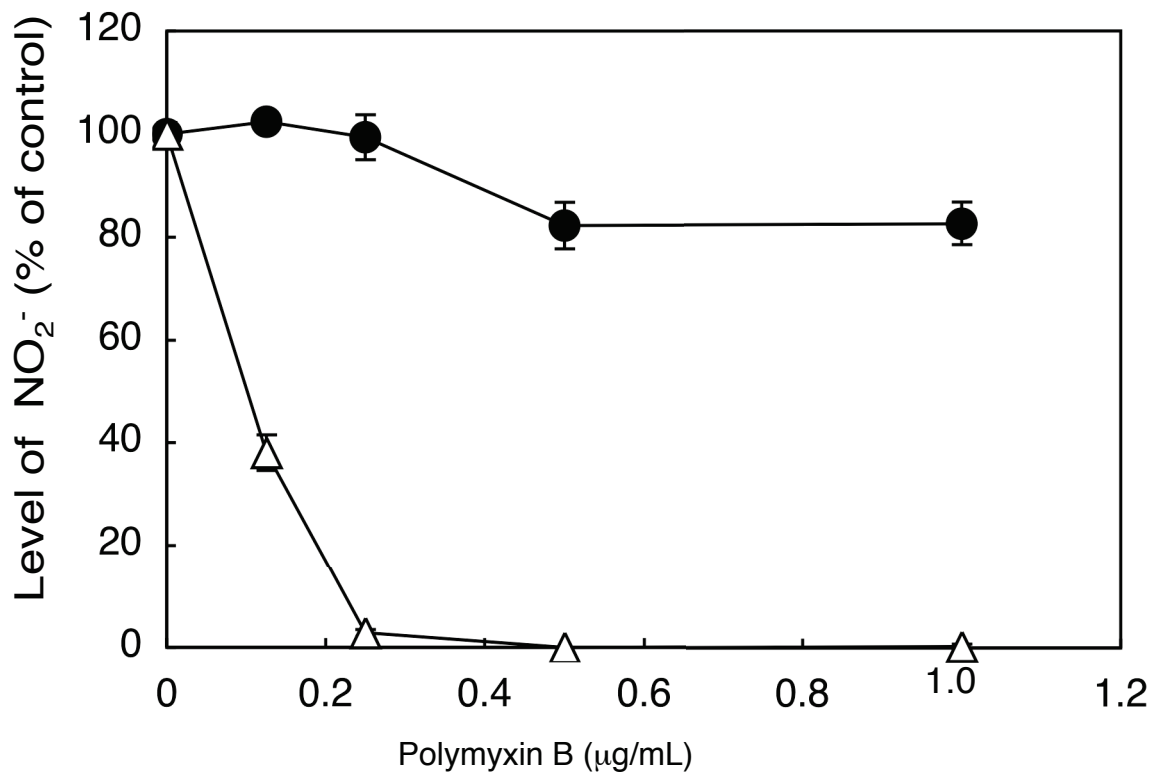


Fig. 16. Effects of polymyxin B on CEL-I- and LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were pre-incubated in the presence of indicated concentrations of polymyxin B in serum-free DMEM at 37°C for 10 min, followed by the addition of CEL-I (●) (final 25 µg/mL) or LPS (△) (final 1 ng/mL). After 24 h incubation at 37°C, the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(3) CEL-I の RAW264.7 細胞への NO 産生誘導活性に対する 抗 TNF- α 抗体 の影響

TNF- α は、NO 産生能を持つ細胞に作用し、NO 放出を誘導する事で知られる [51]。CEL-I は RAW264.7 細胞より TNF- α を誘導するが、CEL-I 添加によって上昇した NO 産生が、この TNF- α による 2 次的な作用によるものであるかを検討するため、本実験を行なった。ちなみに、rTNF- α 100 ng/mL (本研究で用いた条件で、CEL-I が誘導する TNF- α 量を上回る濃度) に対し、抗 TNF- α 抗体 10 μ g/mL を添加する事によって、サンドウィッチ ELISA 法による r TNF- α 検出が不可となる(データ未掲載)。方法は CEL-I を 25 μ g/mL となるように調製し、抗 TNF- α 抗体 0-10 μ g/mL となるよう添加したものについて RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 μ L /well に添加後、24 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について検討した。

結果は Fig.17 に示す。抗 TNF- α 抗体添加は、CEL-I の NO 産生誘導作用に影響しなかった。従って、CEL-I の誘導する TNF- α により、CEL-I 単独の作用により NO 産生が誘導されることが示唆された。

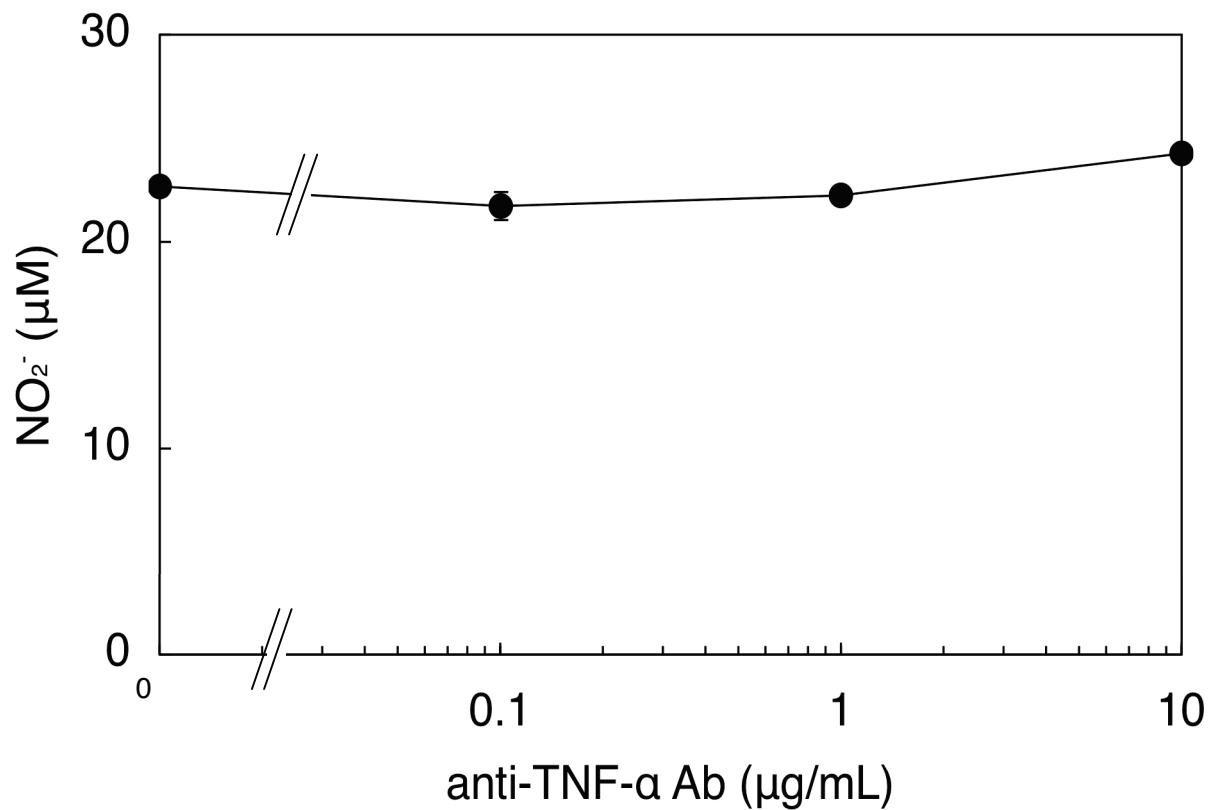


Fig. 17. Effects of anti-TNF- α antibody on CEL-I-induced NO production in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were pre-incubated in the presence of indicated concentrations of anti-TNF- α antibody in serum-free DMEM at 37°C for 10 μin , followed by the addition of CEL-I (●) (final 25 $\mu\text{g/mL}$). After 24 h incubation at 37°C, the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(4) CEL-I のRAW264.7細胞に対する NO 産生誘導及びそれに伴う iNOS の発現と
その転写レベル (iNOS mRNA) の応答の解析 (経時変化)

CEL-I の誘導する NO 産生を経時的に解析した。また iNOS の発現と iNOS mRNA の
応答を測定した。

方法は、CEL-I を 25 μ g/mL となるように調製し、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100mL/well
に添加後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24時間
の各時間で細胞を刺激した。

続いて、iNOS はウェスタンブロット法にて検出した。CEL-I 25 μ g/mL を RAW264.7
細胞 1×10^6 cells/100 μ L /well (12-well plates) に添加後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてイン
キュベートした後 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間の各時間で細胞を刺激した。また
iNOSmRNA については AGPC 変法にて RNA 抽出を行い、RT-PCR 法によって転写レ
ベルの活性化について検討した。

結果は Fig.18 に示す。CEL-I 刺激に伴い、NO 産生、iNOS の発現そして iNOS mRNA
の応答が、時間依存的に検出された。

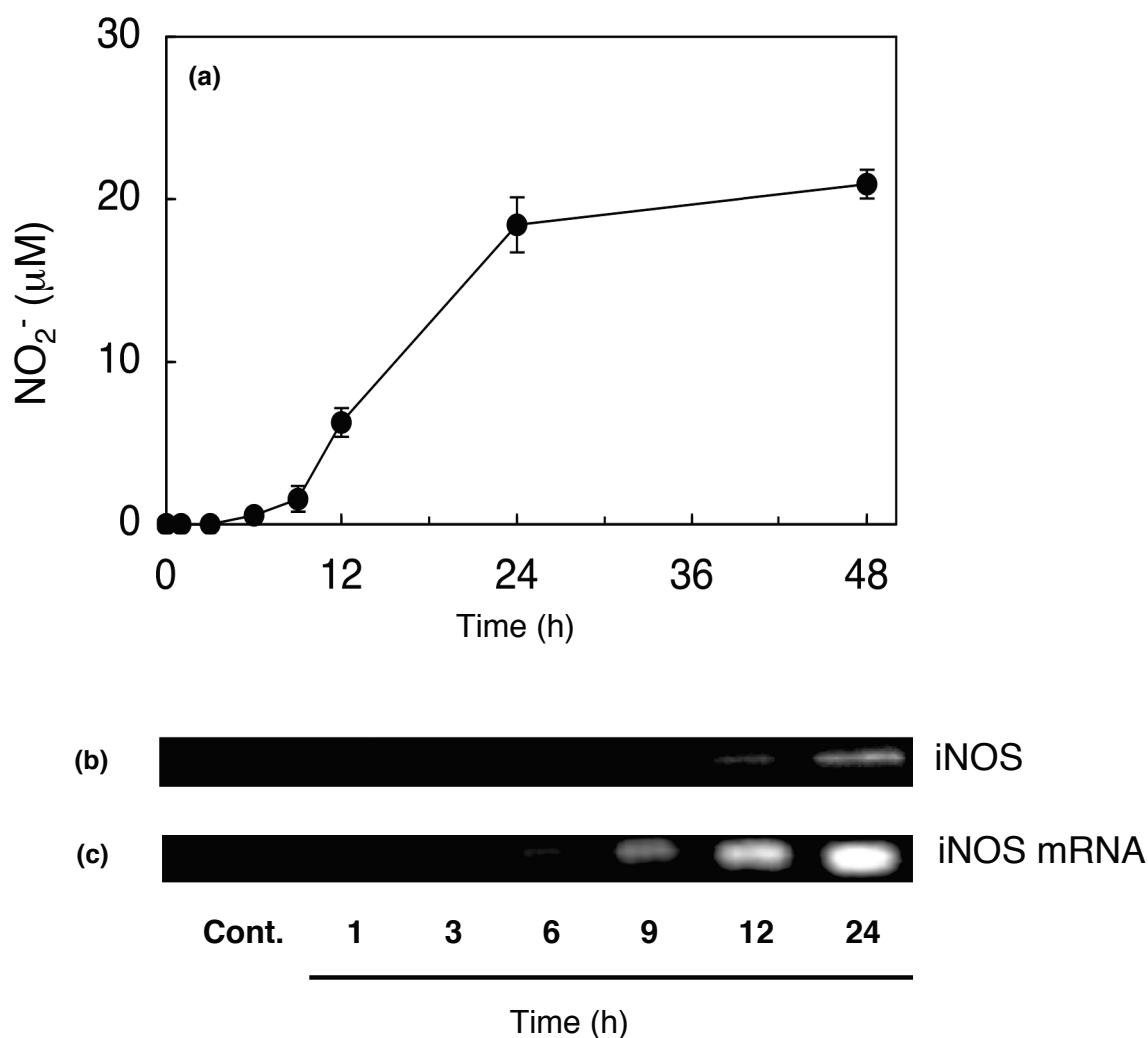


Fig. 18. Time course analysis of NO production (a), expression of iNOS protein (b), and expression of iNOS mRNA (c) in CEL-I-treated RAW264.7 cells. (a) Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were incubated with $25 \mu\text{g/mL}$ of CEL-I for the indicated periods of time, and then the supernatant was withdrawn from each well and subjected to the measurement of NO level, and the cells were subjected to the analysis of iNOS protein (b) as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements. Adherent cells (1×10^6 cells/ well in 12-well plates) were incubated with $25 \mu\text{g/mL}$ of CEL-I for the indicated periods of time, and then the cells were subjected to the analysis of iNOS mRNA levels (c) as described under "MATERIALS AND METHODS".

(5) CEL-I の RAW264.7 細胞への NO 産生誘導活性に対する NG-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の影響

マクロファージは、特定の刺激を受ける事で細胞内にて inducible NOS (iNOS) を生合成し、L-アルギニンとの酵素基質反応を経て、NO を産生する。L-NAME は L-アルギニンのアンタゴニストであり NOS の酵素活性を阻害する。L-NAME を用いて CEL-I の活性における iNOS の関与を検討した。

方法は、無血清培地にて CEL-I を 25 μ g/mL、LPS を 1ng/mL となるよう調製したもの、またそこに L-NAME を終濃度 0-5.0 μ M で添加したものを、RAW264.7 細胞 3 \times 10⁴cells/100mL/well に添加後、24 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について測定した。

結果は Fig.19 に示す。L-NAME の濃度依存的に CEL-I と LPS の活性が阻害された。

よって、CEL-I の誘導する NO は、その刺激により L-アルギニンと酵素基質反応を介して産生されることが示唆された。

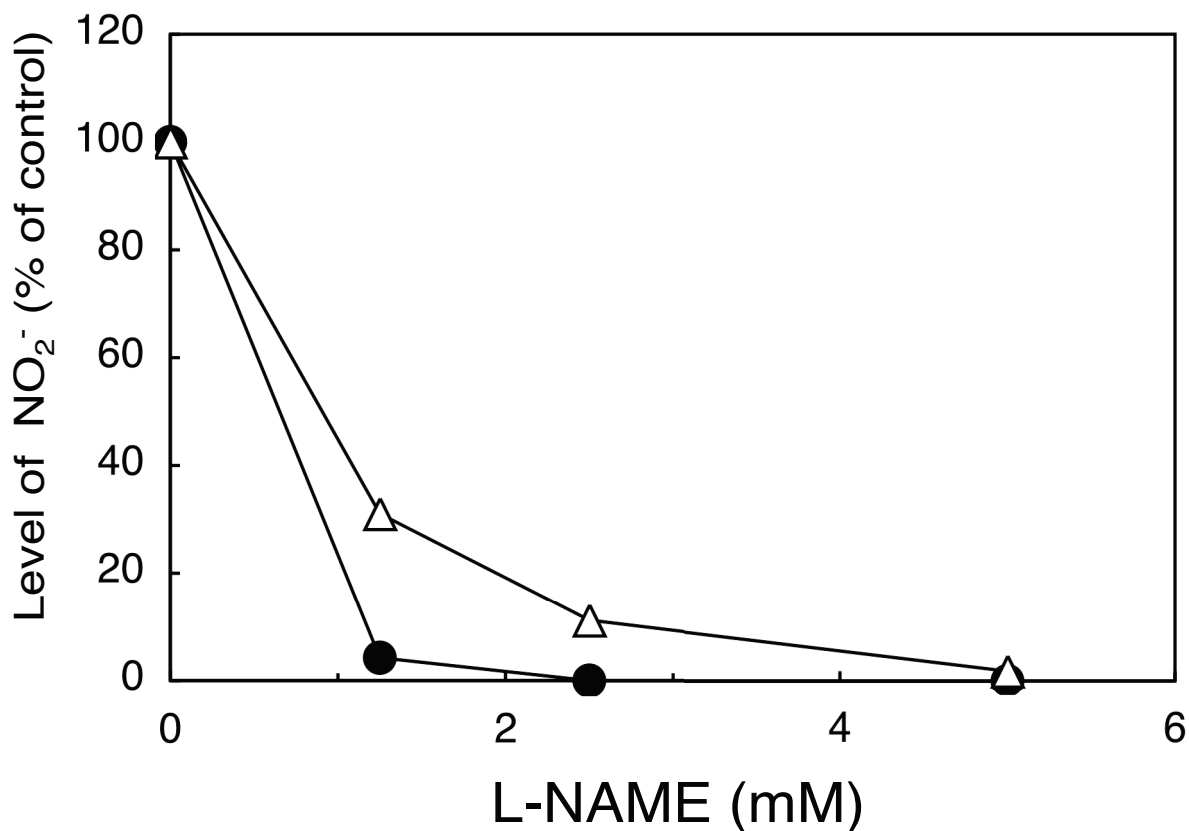


Fig. 19. Effects of L-NAME on CEL-I- and LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were pre-incubated in the presence of indicated concentrations of L-NAME (b) in serum-free DMEM at 37°C for 10 min, followed by the addition of CEL-I (●) (final 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or LPS (Δ) (final 1 ng/mL). After 24 h incubation at 37°C, the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(6) CEL-I の RAW264.7 細胞への NO 産生誘導活性に対する単糖の影響

サイトカイン活性と同様、NO 活性においても、CEL-I の特異的糖である GalNAc の影響を検討した。先に結果として、GalNAc によりNO産生は阻害されず、その産生が促進される結果となった。よって、合わせてGalNAc以外に様々な単糖類を用い、それらの影響も検討した。

方法は CEL-Iを、無血清培地にて、10 μ g/mLとなるよう調製したもの、またそこに単糖類（グルコース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、N-アセチル-D-ガラクトサミン、マンノース、ラムノース、フコース）を終濃度 0.1Mになるよう添加したのについて RAW264.7 細胞 3 \times 10⁴cells/100mL/well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、24 時間、37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について測定した。

結果は Fig.20 に示す。用いた単糖類の存在下で CEL-I の NO 活性は阻害されず、むしろその活性を上昇させるものが認められた。

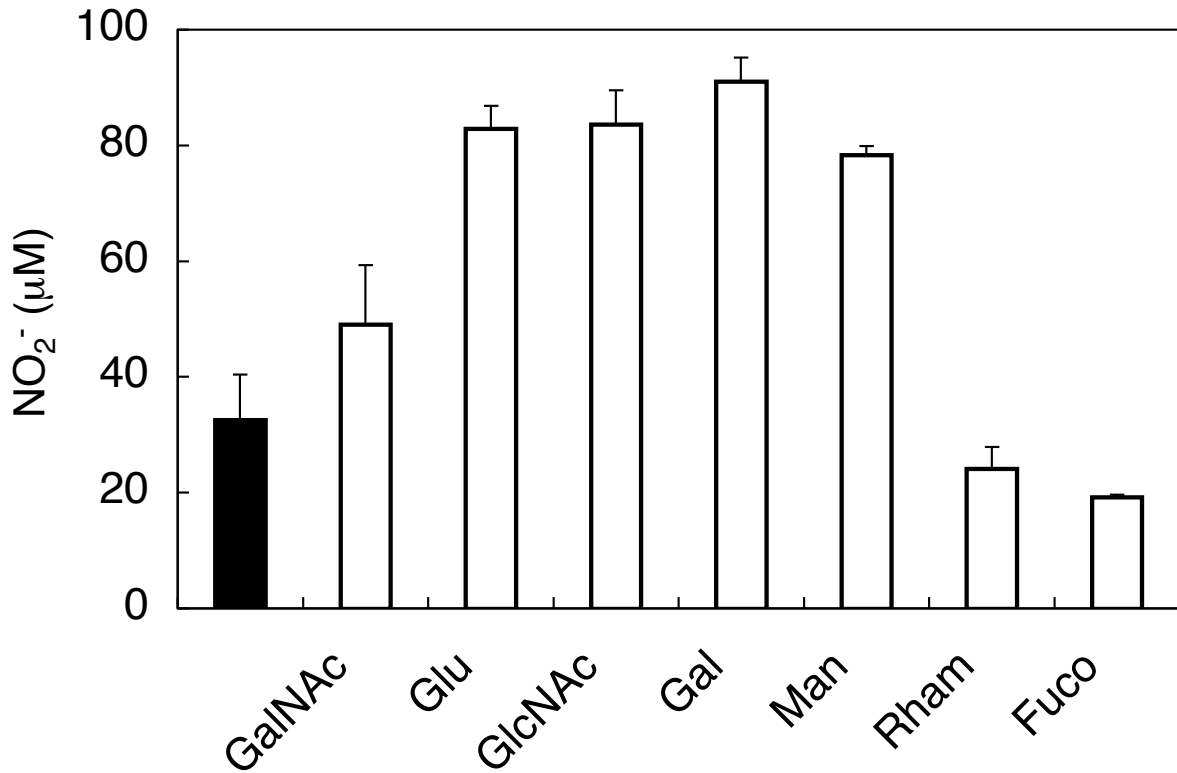


Fig. 20. Effects of GalNAc, glucose (Glu), N-acetylglucosamine (GlcNAc), galactose (Gal), mannose (Man), rhamnose (Rham) and fucose (Fuco) on CEL-I-induced NO production in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were treated with CEL-I (final $25 \mu\text{g/mL}$) in the presence (\square) or absence (\blacksquare) of each saccharide (final 0.1 M) in serum-free DMEM at 37°C for 24 h, and then the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements. In addition, each monosaccharide which was used in this experiment couldn't induce NO production in RAW264.7 cells.

(7) PHA-L, LPS のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する単糖類の影響

前項 (Fig. 20) で認められた、単糖類添加により NO 産生量が上昇した現象を受け、PHA-L 及び、蛋白質を含まない NO 産生誘導体である LPS について、同様の単糖類を用い、それぞれの活性に対する影響を検討した。

方法は PHA-L を 100 μ g/mL、LPS を 1ng/mL となるよう調製し、またそこに単糖類 (グルコース、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、N-アセチル-D-ガラクトサミン、マンノース、ラムノース、フコース) を終濃度 0.1M になるよう添加したものについて RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 μ L /well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について測定した。

結果は Fig.21 に示す。CEL-I の NO 産生誘導活性に対して単糖添加により NO 産生量が上昇した現象が、PHA-L と LPS の活性に対しても同様に認められた。

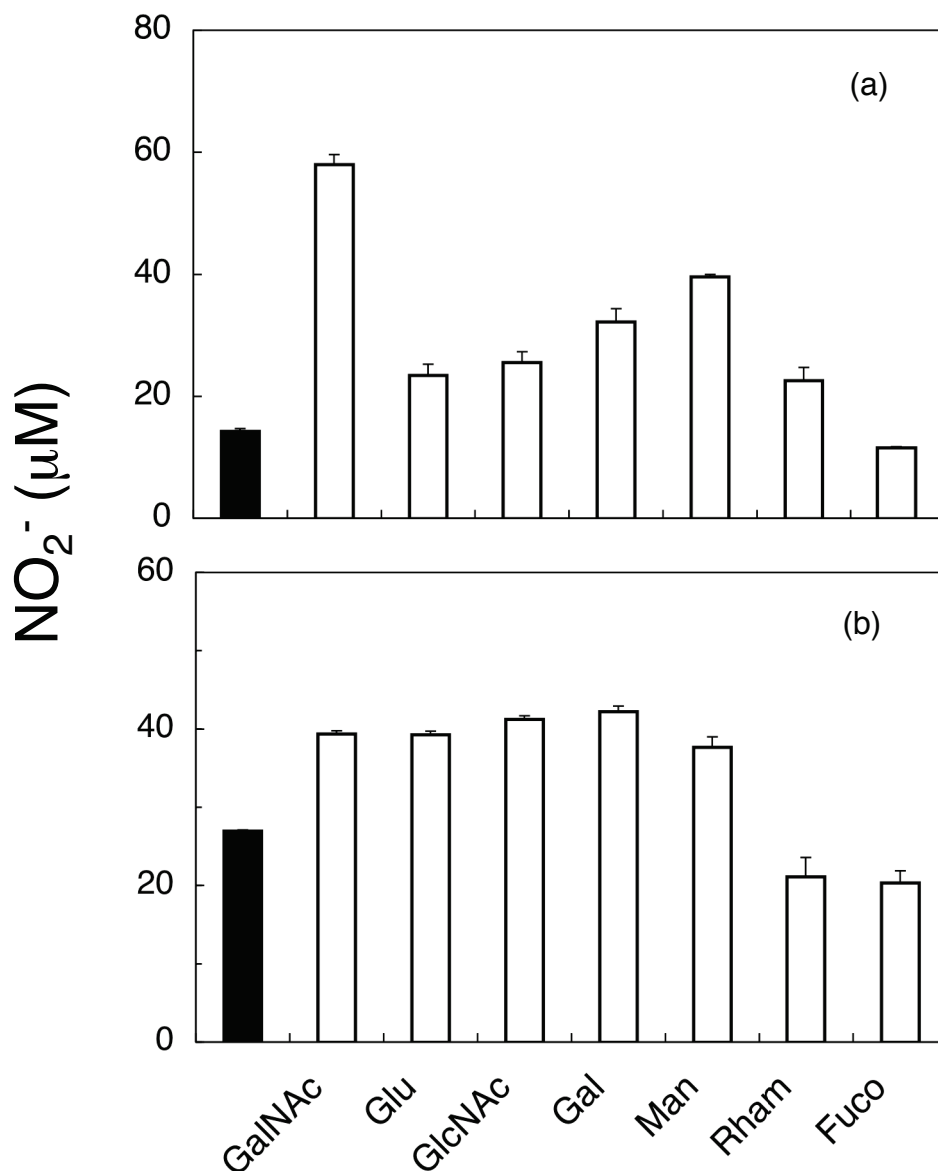


Fig. 21. Effects of GalNAC, glucose (Glu), N-acetylglucosamine (GlcNAC), galactose (Gal), mannose (Man), rhamnose (Rham) and fucose (Fuco) on PHA-L- (a) and LPS- (b) induced NO production in RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were treated with PHA-L (final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or LPS (final 1 ng/mL) in the presence (\square) or absence (\blacksquare) of each saccharide (final 0.1 M) in serum-free DMEM at 37°C for 24 h, and then the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements. In addition, each monosaccharide which was used in this experiment couldn't induce NO production in RAW264.7 cells.

(8) CEL-I のRAW264.7細胞へのNO産生誘導活性に対する bovine serum albumin (BSA) の影響

CEL-I のが細胞を刺激する際、糖鎖に対する作用以外のものとして、CEL-I と細胞における蛋白質間の相互作用を想定した。そこで、その相互作用を妨害するため BSA を用い、CEL-I 及び、糖脂質である LPS の活性に対する影響を検討した。

方法は、無血清培地にて CEL-I を 10 μ g/mL、LPS を 1ng/mL となるよう調製したものの、またそこに BSA を 0-5mg/mL となるよう添加したものについて RAW264.7 細胞 3 \times 10⁴cells/100mL/well に添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出について測定した。

結果は Fig.22 に示す。BSA 添加により、LPS の NO産生誘導活性には影響せず、CEL-I の活性はBSAの濃度に応じて阻害された。

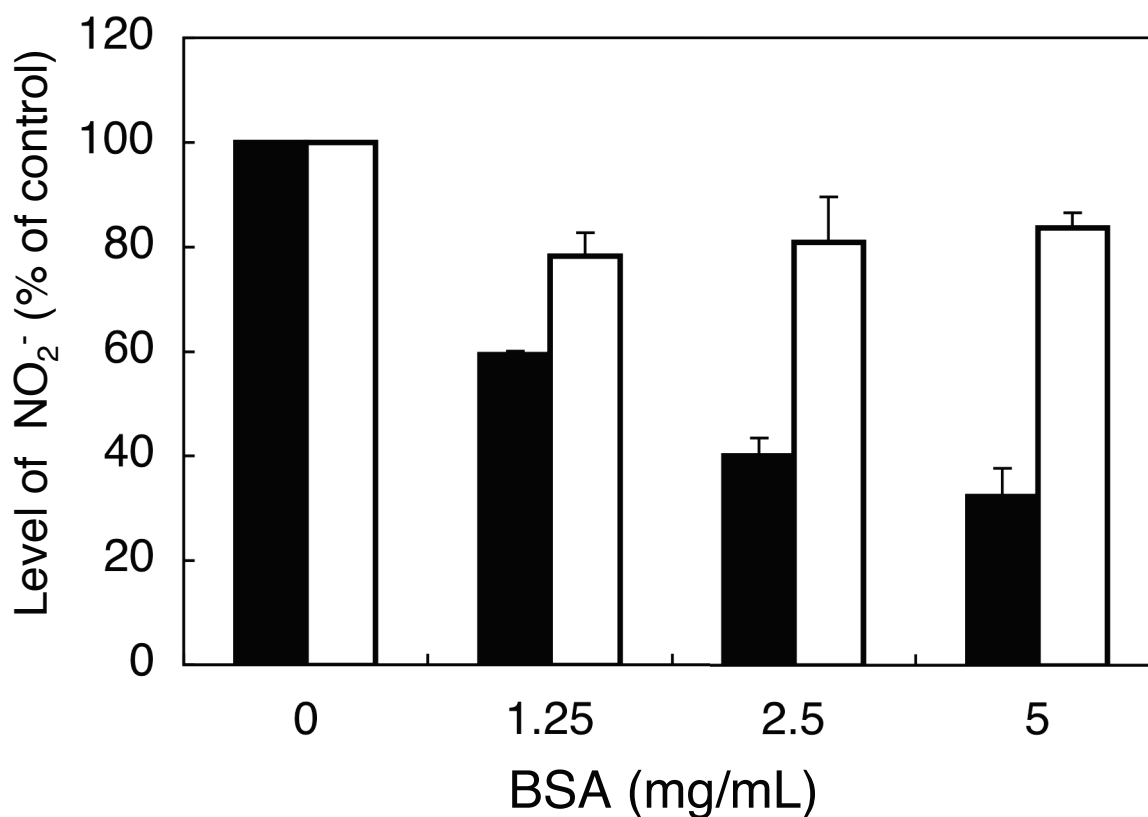


Fig. 22. Effects of BSA on the CEL-I- and LPS-induced NO production in RAW264.7 cells on RAW264.7 cells. (a) Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were treated with CEL-I (■) (final 25 $\mu\text{g/mL}$) or LPS (□) (final 1 ng/mL) in the presence of the indicated concentrations of BSA in serum-free DMEM at 37°C for 24 h, and then the NO level in the supernatant of each treated cells was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each point represents the average of triplicate measurements.

(9) CEL-I の RAW264.7 細胞への結合量に対する BSA の影響

BSA により CEL-I の NO 活性が阻害された結果を受け、CEL-I の RAW264.7 細胞への結合量に対する影響を検討した。

方法は、CEL-I の FITCラベル体 (F-CEL-I) を無血清培地にて 1nM となるよう調製したもの、またそこに BSA が 0-5.0 μ g/mL となるよう添加したものを RAW264.7 細胞 2×10^5 cells/well (48-well plates) に添加後、2時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、FITC の蛍光強度を測定する事で FITC ラベル体の結合量を調べた。結果は Fig.23 に示す。BSA 添加により、F-CEL-I の RAW264.7 細胞に対する結合量はその濃度依存的に減少した。

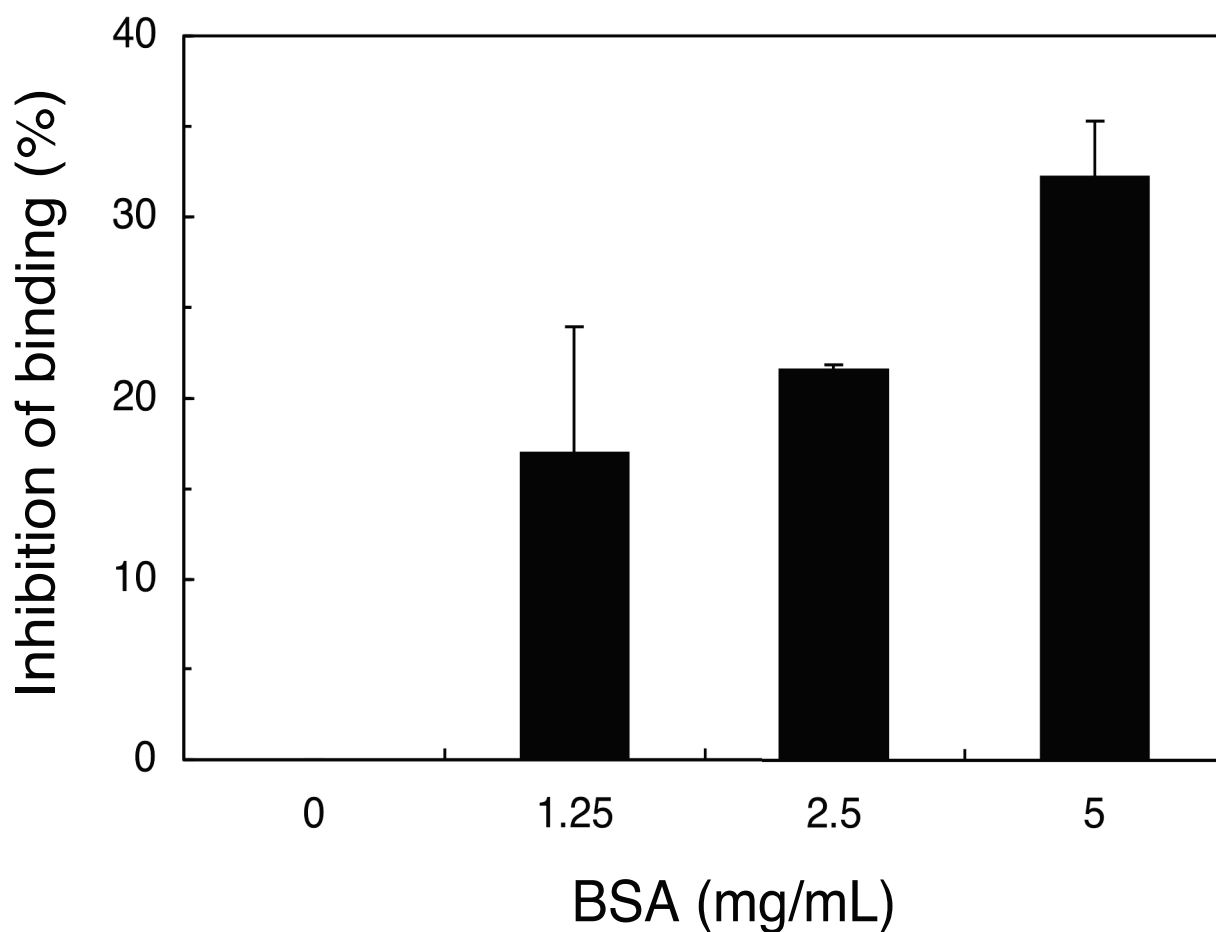


Fig. 23. Effects of BSA on the binding of FITC-labeled CEL-I on RAW264.7 cells. Adherent cells (2×10^5 cells/well in 48-well plates) were incubated with FITC-labeled CEL-I (final $25 \mu\text{g/mL}$) in the presence of the indicated concentrations of BSA for 2 h at 37°C in serum-free DMEM. After incubation, the cells were washed three times with PBS and then the amount of cell-associated FITC-labeled CEL-I was measured as described under " MATERIALS AND METHODS ". Each point represents the average of triplicate measurements

(10) CEL-I の RAW264.7 細胞への NO 産生誘導に対する MAP キナーゼ阻害剤の影響

サイトカイン活性と同様、それらの CEL-I の NO 産生誘導活性への関与を MAP キナーゼ阻害剤を用いて検討した。

方法はMAPキナーゼ ERK、p38、JNK のそれぞれに対する阻害剤 PD98059、SB202190、SP600125を 20 mM を添加したものを RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 μ L /well に添加後、1 時間、37°C、5% CO₂存在下にてプレインキュベートした。その後、CEL-I を終濃度 25 μ g/mL になるよう添加、同様の条件で 24 時間インキュベートし、Griess 法を用い、NO の産生放出について定量した。

結果は Fig.24に示す。それぞれの MAP kinase に特異的な阻害剤を用いた結果、CEL-I の NO 産生誘導は阻害された。

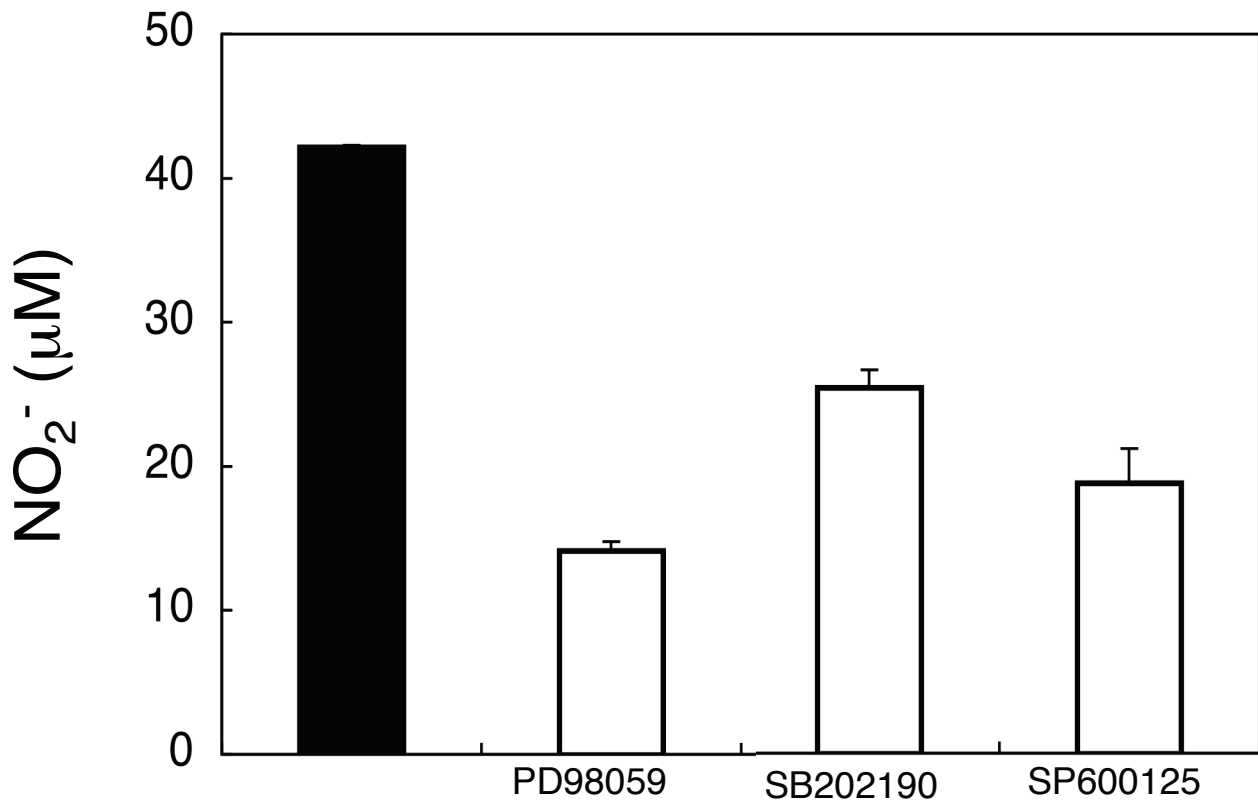


Fig. 24. Effects of MAP kinase inhibitors on the production of NO in CEL-I-treated RAW264.7 cells. Adherent cells (3×10^4 cells/well in 96-well plates) were pre-incubated in the presence (□) or absence (■) of 20 mM of ERK (PD98059), p38 (SB202190), or JNK (SP600125) MAP kinase inhibitor in serum-free DMEM at 37°C for 1 h, followed by the addition of CEL-I (final 25 µg/mL). After 24 h incubation at 37°C, NO level in the supernatant of each treated cell was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each value represents the average of triplicate measurements.

(11) 熱処理CEL-I が誘導する NO 産生レベル

熱処理による CEL- I の立体構造変化の影響を検討するため、下記条件にて加熱処理した CEL-I を用い、NO 産生量の変化について検討した。

方法は、70, 80, 90, 100°C にて各々 15 分間熱処理した CEL-I 25 µg/mL について、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100µL /well に添加後、24時間、37°C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、 Griess 法を用い、培養NO の産生放出量を定量した。

結果は Fig.25に示す。CEL-I の熱処理により、加熱温度依存的にその活性は低下した。

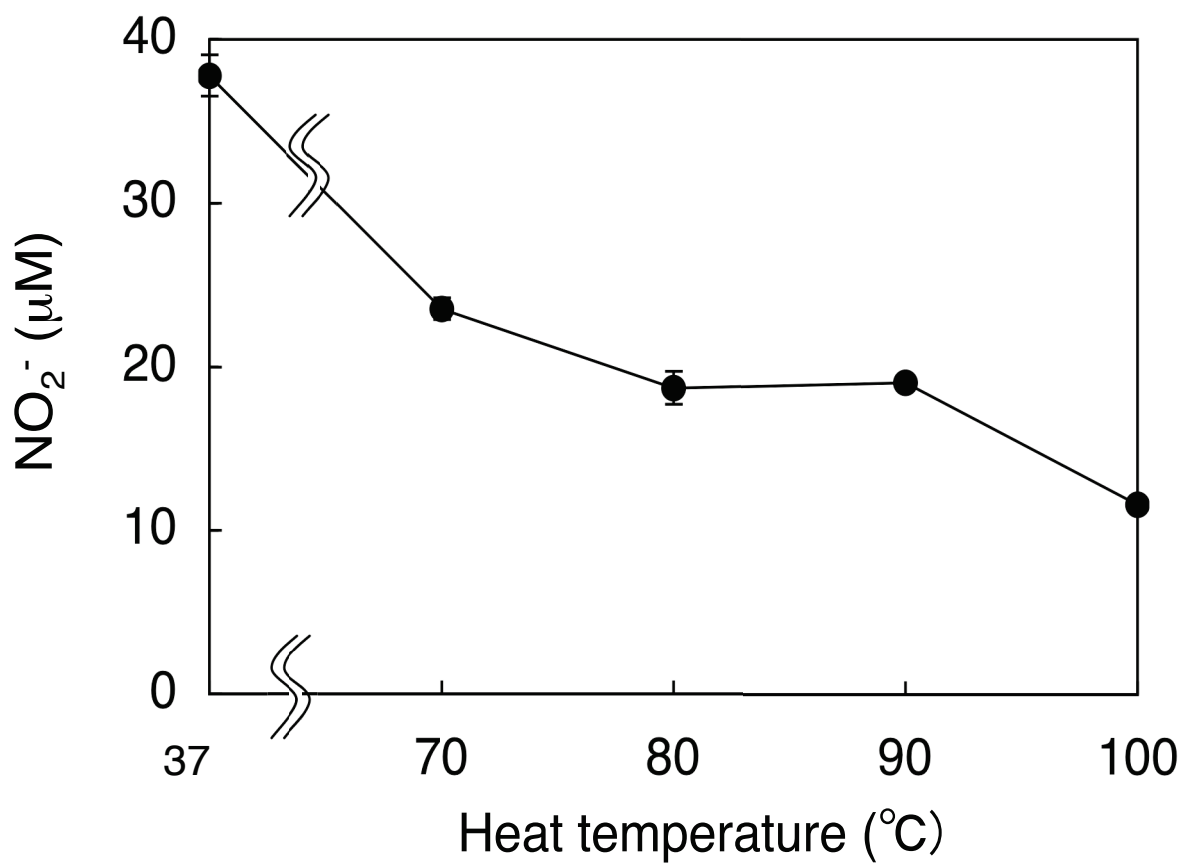


Fig. 25. Effects of heat-treatment on the NO-inducing activity of CEL-I in RAW264.7 cells. CEL-I in PBS (final 1mg/mL) was treated for 15 min at the indicated temperature, and then the NO-inducing activity of each treated CEL-I (final 25 µg/mL) was measured by Griess method as described under "MATERIALS AND METHODS". Each value represents the average of triplicate measurements.

(12) CEL-I の RAW264.7 細胞への NO 産生誘導作用に対するリコペンの影響

第 1 部 (9) において TNF- α 放出誘導活性に対するリコペンの影響を検討し、リコペンは CEL-I が誘導する TNF- α 量が、100 μ M にて減少することが判明した。この実験では同様の方法で NO 産生量への影響について検討した。

方法は CEL-I が 25 μ g/mL となるよう無血清培地で調製したもの、またリコペンがそこに 0-100 μ M となるよう添加したものを RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100 μ L /well に添加後、24 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出量を定量した。

結果は Fig. 26 に示す。リコペンの作用により CEL-I の NO 産生誘導を濃度依存的に阻害し、TNF- α の場合と比較すると、さらに低い濃度である 10 μ M から強い阻害作用を示すことが判明した。

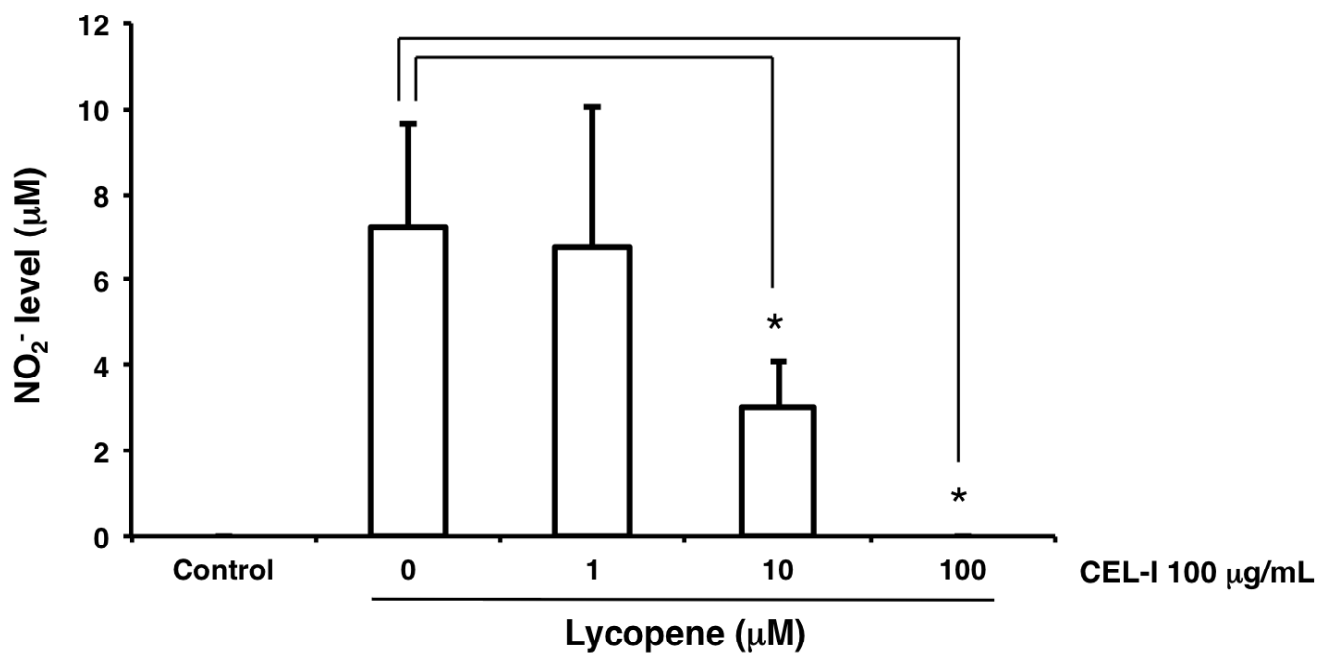


Fig. 26. Effect of lycopene on the secretion of NO and from RAW264.7 cells treated with CEL-I. Adherent RAW264.7 cells in 96-well plate (3×10^4 cells/well) were pre-incubated with 1-100 μM of lycopene in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C for 1 h, followed by the addition of CEL-I (final $100 \mu\text{g/mL}$). After 24 h incubation, NO levels in the supernatants of the treated cells were measured as described in the text. Columns represent the average of triplicate measurements and bars indicate the standard deviation. Asterisks indicate significant differences between absence and presence of lycopene with $p < 0.05$.

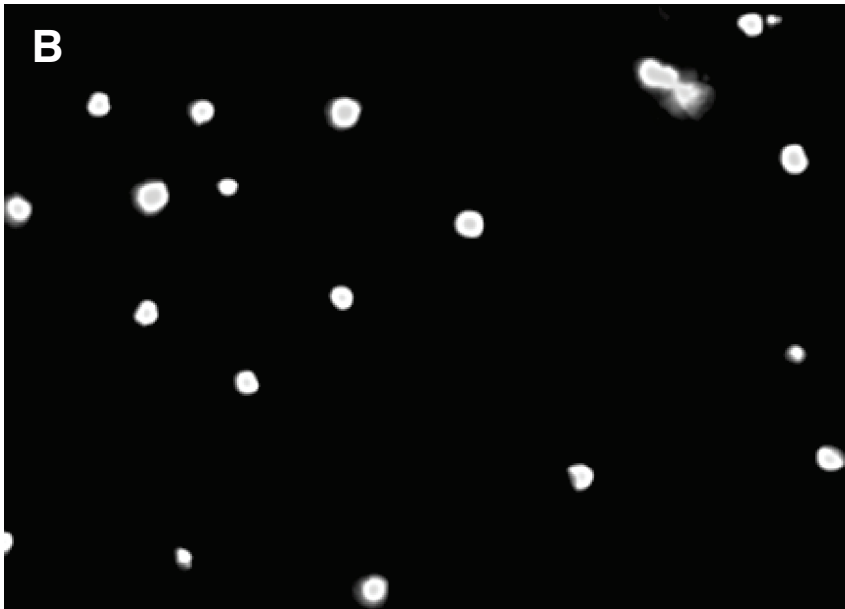
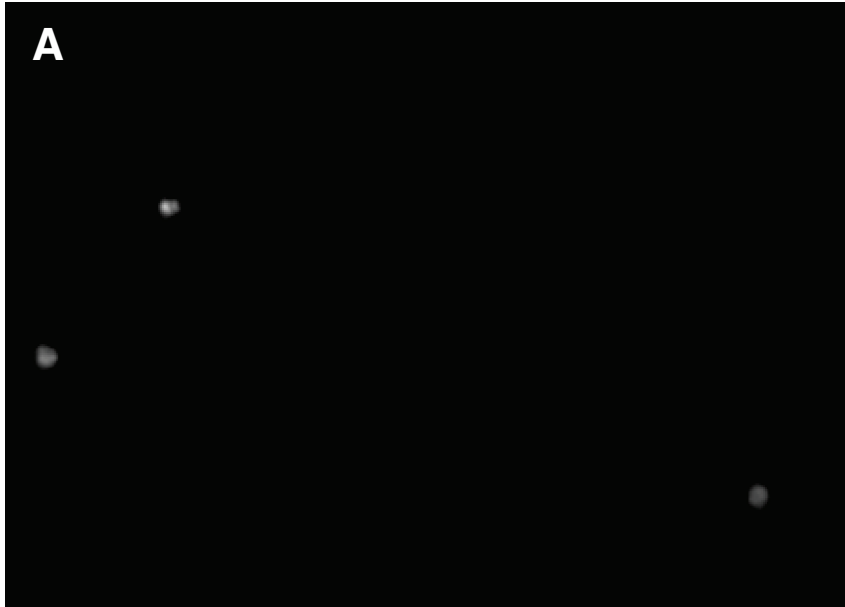
(13) CEL-IのRAW264.7細胞に対するROS産生誘導活性とリコペンの作用

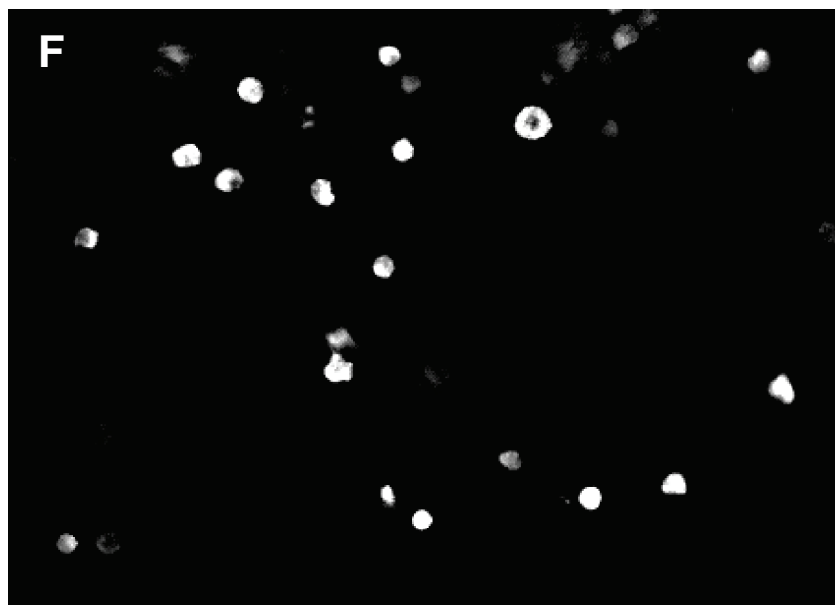
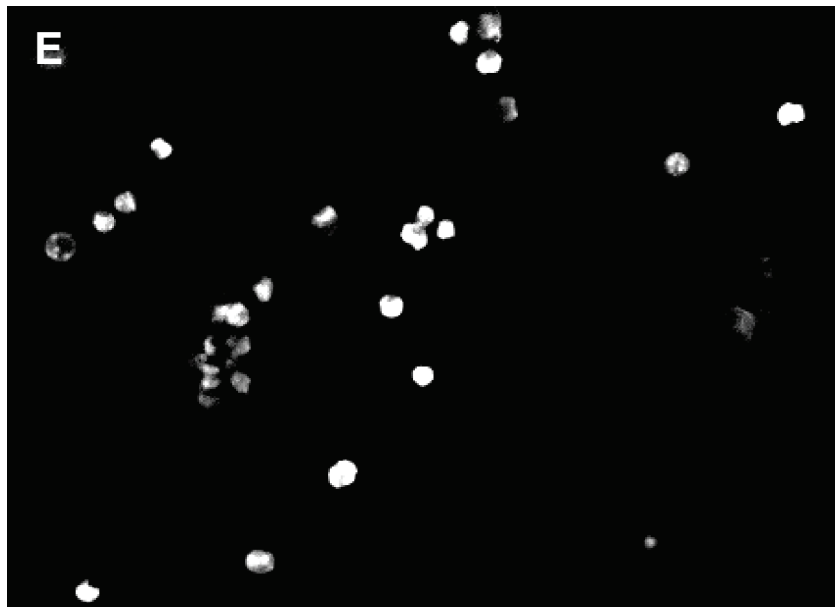
リコペン抗酸化物質として知られており、その作用は類似の他のカロテノイドに比べて強く、特に一重項酸素に対して特異的に消去活性を示すと報告されている。これは、リコペンがその分子内に多数の二重結合を有し、それにより高い一重項酸素消去活性を発揮すると考えられている[69-74]。予備実験において、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルに対するリコペンの直接的消去作用はあまり強くないことが観察されていることから、リコペンの一重項酸素に対する特異性が推察される。本項では、刺激に応答した RAW264.7 細胞からのサイトカイン並びに NO の放出と、細胞内の活性酸素レベルとの関連性を調べるため、CEL-I もしくは LPS で刺激した際の RAW264.7 細胞内の活性酸素レベルを、リコペン存在及び非存在下で活性酸素特異的蛍光試薬を用いて解析した。

方法は、DMEM 培地にて調製した 100 mL の RAW264.7 細胞浮遊液 (2×10^6 cells/mL) に 100 mL リコペンまたは THF (終濃度 10 mM 或いは 0.05% になるようにそれぞれ調製) を加え、37°C のウォーターバスで 1 時間インキュベートした。その後、25 mL の LPS (終濃度 1 μ g/mL) または CEL-I (終濃度 100 μ g/mL)、続いて蛍光試薬 H₂DCFDA (終濃度 10 mM) を加え、37°C のウォーターバスで 30 分間、遮光下でインキュベートした。その後、1,500 rpm、5 分遠心し、上清を捨て、PBS を加え懸濁後、ガラスベースディッシュに移し、それぞれの処理細胞を蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE 社製) により観察した。

結果を Fig.27 (A)~(G) に示す。(A)~(F) は蛍光顕微鏡により検鏡した際の写真を掲載した。(G) については、蛍光強度を通常の細胞より相対的に数値化し、グラフ化したものを示した。本研究でも、これまでの報告通り、LPS 刺激により RAW264.7 細胞内に活性酸素レベルの上昇を観察することができ、また、LPS による RAW264.7 細胞内活性酸素レベルの上昇は Feng らの報告と一致して、10 mM のリコペンで処理することにより抑制されることも確認できた [43]。これらの知見から LPS の刺激により、まず、細胞内活性酸素レベルの上昇が誘導され、次いで何らかの細胞内シグナル伝達

機構を介して NO 及びサイトカイン放出に繋がったと推定される。LPS 刺激による細胞内活性酸素産生機構の詳細についてはさらに検討が必要であるが、これらの知見及び本研究で得られた結果から、リコペンは RAW264.7 細胞内に侵入し、細胞内の活性酸素を消去しうると推定される。THF にも細胞内活性酸素消去作用が認められたが、リコペンに比べ弱い効果であった。一方、CEL-I 刺激においても RAW264.7 細胞内の活性酸素レベルの上昇が観察されたが、CEL-I 処理によって上昇した細胞内活性酸素レベルは 10 mM のリコペン添加によって減少しなかった。





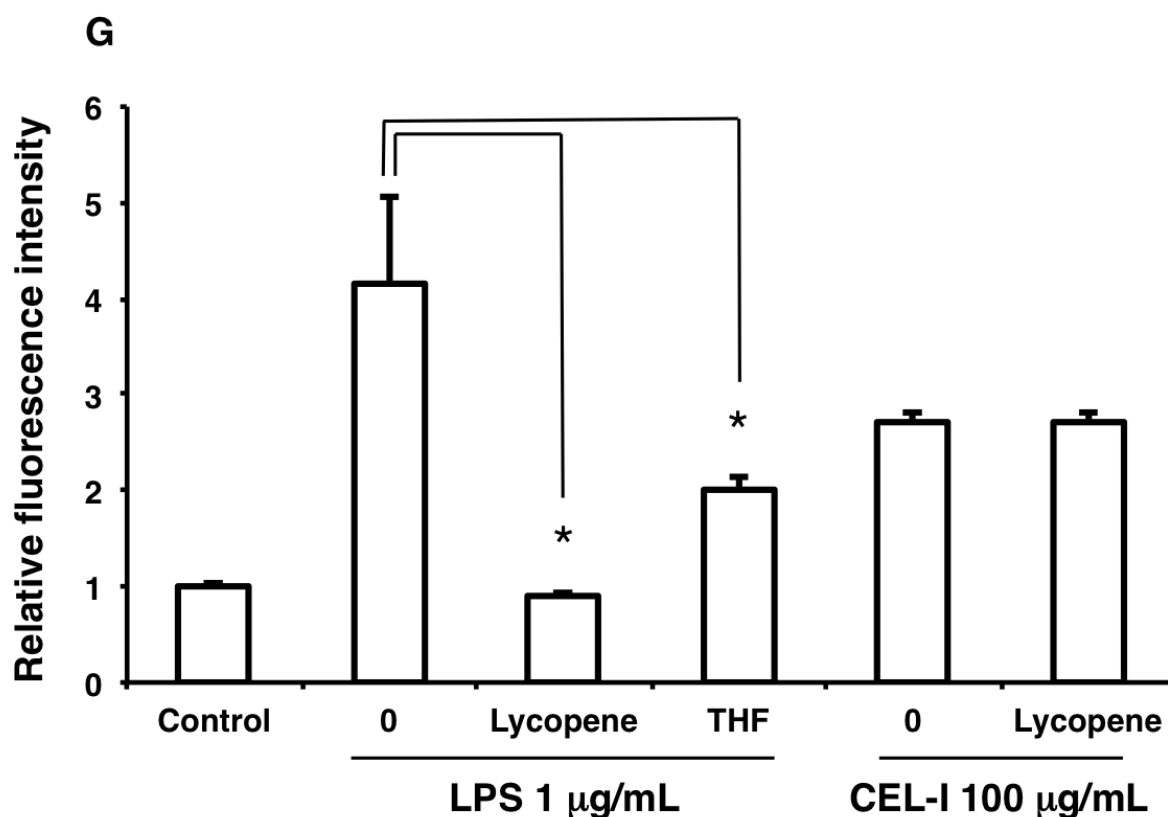


Fig. 27 Effects of lycopene on the intracellular ROS levels in RAW264.7 cells treated with LPS or CEL-I. Cell suspensions (2×10^6 cells/mL) in PBS were pre-incubated with lycopene or THF in at 37°C for 1 h, followed by the addition of LPS (final $1 \mu\text{g/mL}$) or CEL-I (final $100 \mu\text{g/mL}$) together with H_2DCFDA (final $10 \mu\text{M}$). After 30 min incubation, the cell suspensions were washed once with PBS by centrifugation (1,500 rpm for 5 min). Then, the cells were observed with the fluorescence microscope. A; control, B; + LPS, C; + LPS + lycopene, D; + LPS + THF, E; + CEL-I, F; + CEL-I + lycopene. Relative fluorescence intensities of treated cells were analyzed by ImageJ software (G). Columns represent the average of triplicate measurements and bars indicate the standard deviation. Asterisks indicate significant differences between absence and presence of lycopene with $p < 0.05$.

(14) モデシンの RAW264.7 細胞に対する NO 産生誘導作用の検討

前章にてモデシンのサイトカイン誘導活性について検討し、RAW264.7 細胞より TNF- α の放出を誘導することが分かった。しかし、CEL-I の場合と異なり、G-CSF の誘導は検出されず、両者間で異なる活性の挙動が認められた。本項では、再び RAW264.7 細胞を用い、モデシンの NO 産生誘導活性について検討した。また今回は比較対照として PHA を使用している。

方法はモデシンが 0 - 100ng/mL、PHA が 0 -100,000ng/mLとなるよう調製したもの、また PHA 10,000ng/mL と共に iNOS の阻害剤である L-NAME を終濃度 10mM となるようにした溶液を、RAW264.7 細胞 3×10^4 cells/100mL /well に添加後、24時間、37°C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、Griess 法を用い、NO の産生放出量を定量した。

また、iNOS の転写レベルにおける発現についても、RT-PCR 法にて検出した。モデシンが 3ng/mL、PHA が 0 -100,000ng/mL となるよう調製したものを RAW264.7 細胞 5×10^5 cells/100mL /well (24穴プレート) に添加後、12時間、37°C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした。その後、AGPC 変法にて RNA 抽出を行い、RT-PCR 法によって転写レベルの活性化について検討した。

結果は Fig. 28, 29 に示す。モデシンで刺激した RAW264.7 細胞の培養上清からは NO₂⁻ は検出されず、転写レベルの活性についても確認されなかった。一方で PHA 刺激の RAW264.7 細胞からはこれまで通り、その濃度依存的に NO 活性が認められ、その活性は L-NAME により阻害され、転写レベルの活性も確認された。従って、モデシンは、CEL-I、PHA とは異なり、NO 産生を誘導しない事が示唆された。

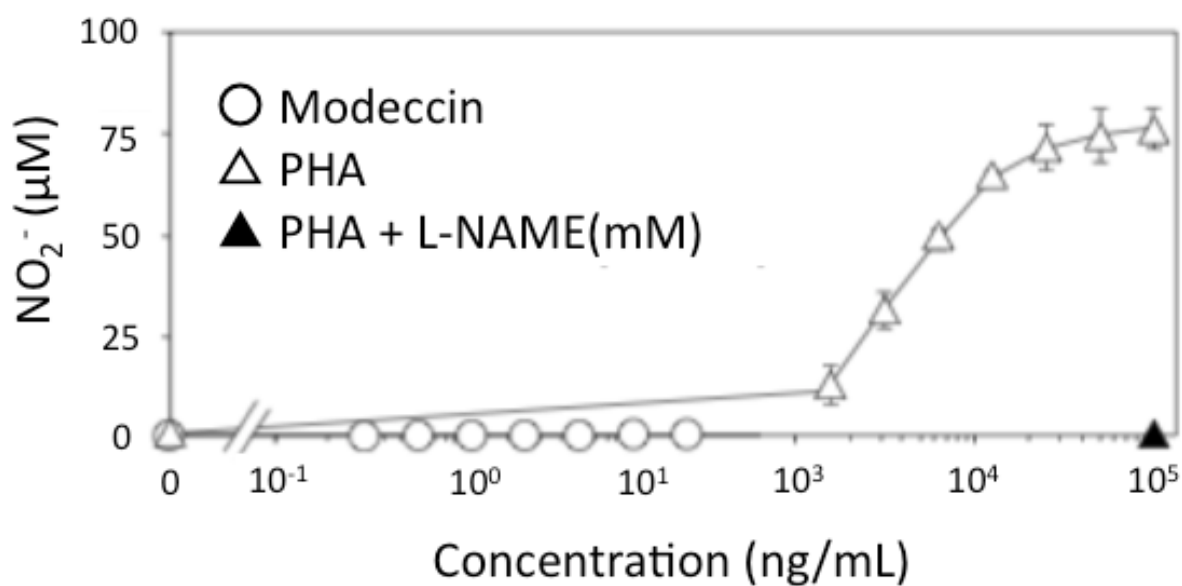


Fig. 28 Nitric oxide (NO) levels in modeccin- and PHA-treated RAW264.7 cells. Adherent RAW264.7 cells (3×10^4 cells per well in 96-well plates) were incubated with the indicated concentrations of modeccin or PHA in DMEM containing 10% of FBS at 37°C. After 24 h, the supernatant was withdrawn from each well, and subjected to the measurement of NO levels as described in the text. Closed triangle indicates the NO level induced by 100,000 ng/mL PHA in the presence of 10 mM L-NAME, an iNOS inhibitor. Data represents mean SD, $n = 3$.

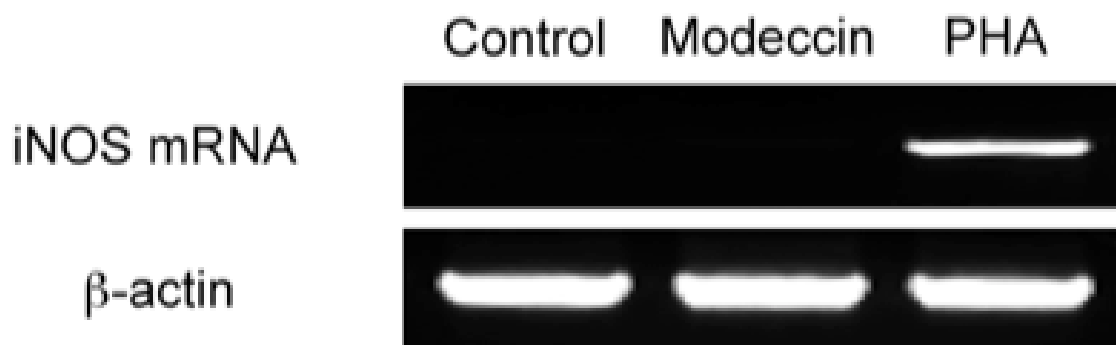


Fig. 29 iNOS mRNA levels in modeccin- and PHA-treated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (5×10^5 cells per well in 24-well plates) were treated with modeccin (final 3 ng/mL) or PHA (final 100,000 ng/mL) in DMEM containing 10% of FBS at 37°C. The untreated cells were used as a control. After 12 h, the iNOS mRNA trascription levels of each lectin-treated and untreated cells were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction method as described in the text.

第4部

CEL-I のマイトジェン活性に関する検討

マウス脾臓細胞を用いて、CEL-I のマイトジェン活性について検討した。

(1) CEL-I のマイトジェン活性に関する検討

マイトジェン誘導活性を示すレクチンとして知られるタチナタ豆由来レクチンの Con A をコントロールとして用い、CEL-I のマイトジェン活性について検討した。方法は、前述の通り ddY 系マウス (6 週齢、25~30g) よりマウス脾臓細胞を単離した後、 5×10^5 cells/50 μ L/well で播種した。各レクチンについて 0-100 μ g/mL となるよう調製したものを添加した後、48 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、WST-8 アッセイで細胞の生存率を測定した。

結果は Fig.30 に示す。CEL-I に濃度依存的な細胞増殖作用が認められた。ConA については、これまでの報告通りの作用を示した [32]。

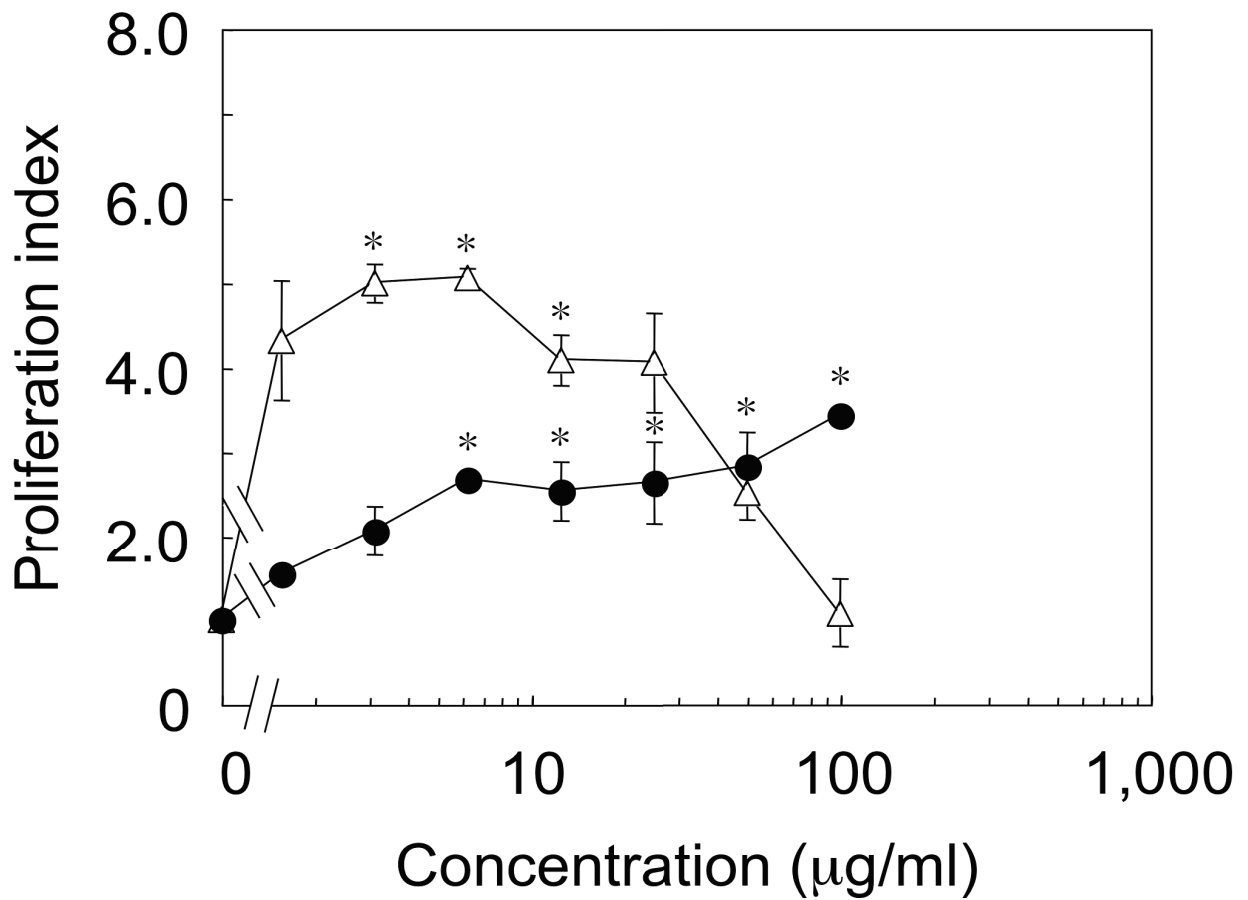


Fig. 30. Mitogenic Effects of CEL-I and Con A on Normal Mouse Splenocytes.

The cells were incubated with various concentrations of CEL-I (●) or Con A (△) in RPMI 1640 medium supplemented with 3% FBS for 48 hours, and then the proliferation activities of the cells were estimated as described in the text. Data represents mean S.D., $n = 3$. Asterisks indicate significant differences between with and without lectin ($p < 0.01$).

(2) CEL-I のマイトジェン活性に対する特異的糖 GalNAc の影響

CEL-I がマイトジェン活性を示すことが判明したため、そこでのレクチン機能の関与を検討するため、特異的糖である GalNAc の影響を検討した。

方法は CEL-I を、培地にて 100 μ g/mL となるよう調製したもの、またそこに GalNAc を終濃度 0.1M になるよう添加したものをマウス脾臓細胞 5 \times 10⁵ cells/50 μ L/well に添加後、48時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下にてインキュベートした後、WST-8 アッセイで細胞の生存率を測定した。脾臓細胞に関しては前述した同様の方法にて単離し実験に用いた。

結果を Fig.31 に示す。GalNAc 添加により CEL-I のマイトジェン活性は、その濃度依存的に阻害されることが判明した。よって、この細胞増殖は、CEL-I の細胞上の糖鎖認識を介した刺激より誘導されることが示唆された。

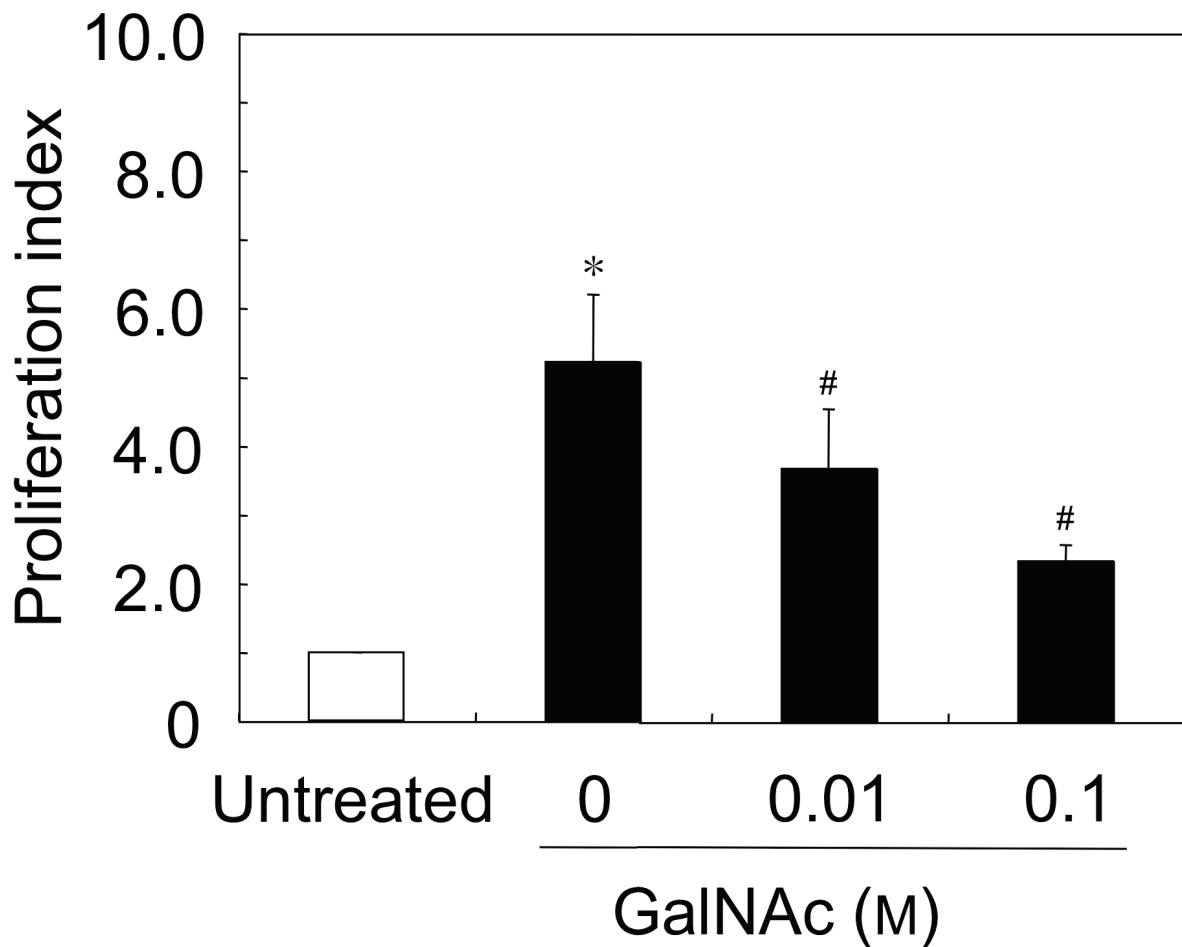


Fig. 31. Effect of GalNAc on the Proliferative Response of Normal Mouse Splenocytes Induced by CEL-I.

The cells were incubated with 100 mg/mL of CEL-I (■) in the presence of various concentrations of GalNAc (final 0, 0.01, and 0.1 M) in RPMI 1640 medium supplemented with 3% FBS for 48 h, and then the proliferation activities of the cells were estimated as described in the text. Untreated (□) represents control incubated without CEL-I. Data represents mean S.D., $n = 3$. Asterisk indicates significant difference between with and without lectin ($p < 0.01$). Sharps indicate significant differences between with and without GalNAc ($p < 0.01$).

(3) マウス脾臓 T 細胞、B 細胞に対する CEL-I のマイトジェン活性の検討

ConA は脾臓 T 細胞特異的にマイトジェン活性を示すが、B 細胞には示さない。

また PWM は T 細胞と B 細胞の両者に作用し、同活性を示すことが知られている。

本実験において、CEL-I の作用に関する特異性について検討した。

方法は T 細胞と B 細胞をそれぞれ前述した方法により採取し、それぞれ実験に用いた CEL-I とコントロールの ConA は 0-100 μ g/mL にて細胞に添加し、ナイロンウールカラム処理マウス脾臓細胞 (T細胞)、もしくはヌードマウス由来 脾臓細胞 (B 細胞) 5×10^5 cells/50 μ L/well に添加後、48時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下にてインキュベートした後、WST-8 アッセイで細胞の生存率を測定した。

結果は、T 細胞に対する作用については Fig.32、B細胞に対する影響については Fig.33 に示した。CEL-I は T細胞とB細胞の両者に対して、その濃度依存的にマイトジェン活性を示すことが判明した。

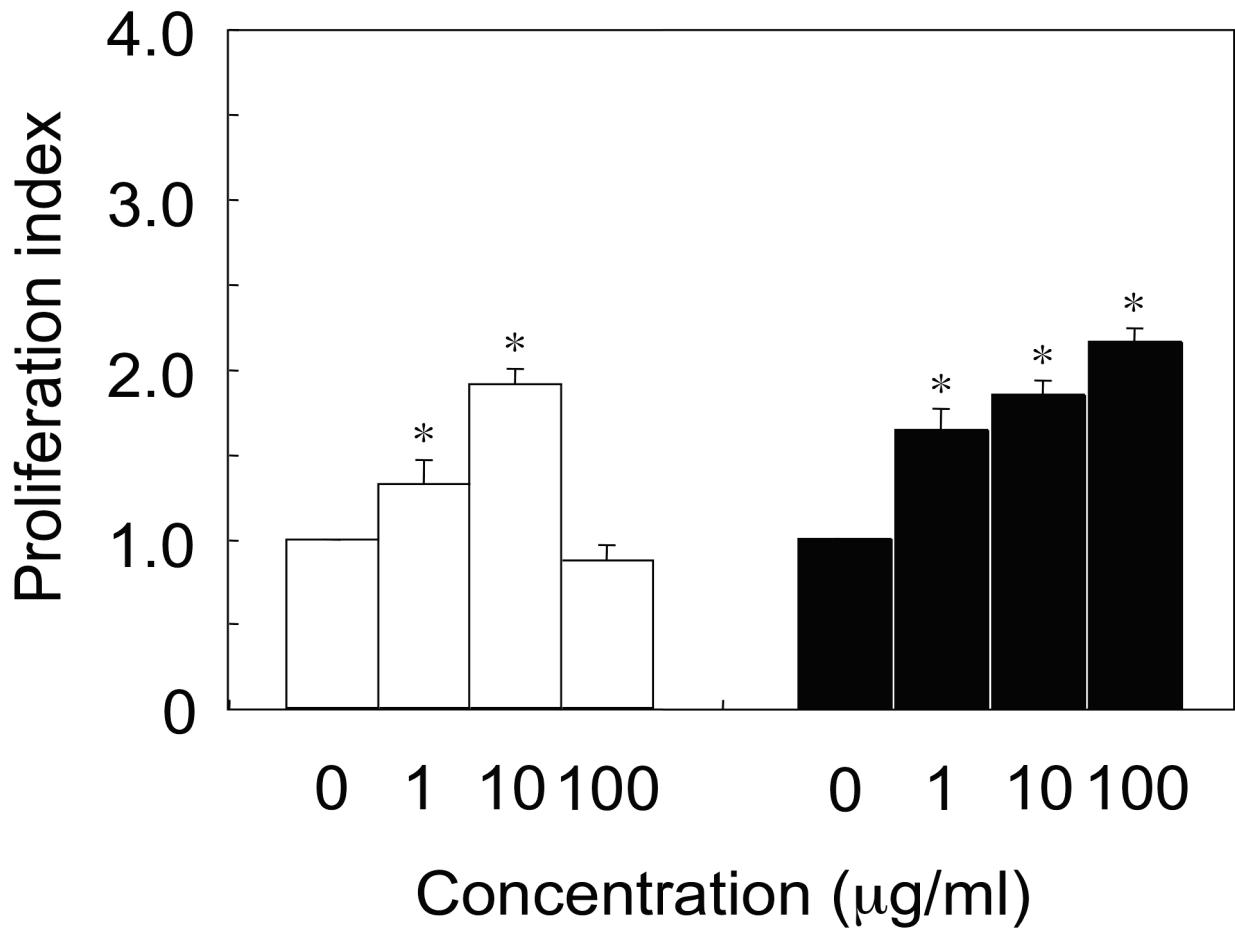


Fig. 32. Mitogenic Effects of CEL-I and Con A on T Cell-Enriched Normal Mouse Splenocytes.

T cell-enriched cells prepared as non-adherent cells to nylon wool column were incubated with indicated concentrations of Con A (□) or CEL-I (■) in RPMI 1640 medium supplemented with 3% FBS for 48 hours, and then the proliferation activities of the cells were estimated as described in the text. Data represents mean S.D., n = 3. Asterisks indicate significant differences between with and without lectin ($p < 0.01$).

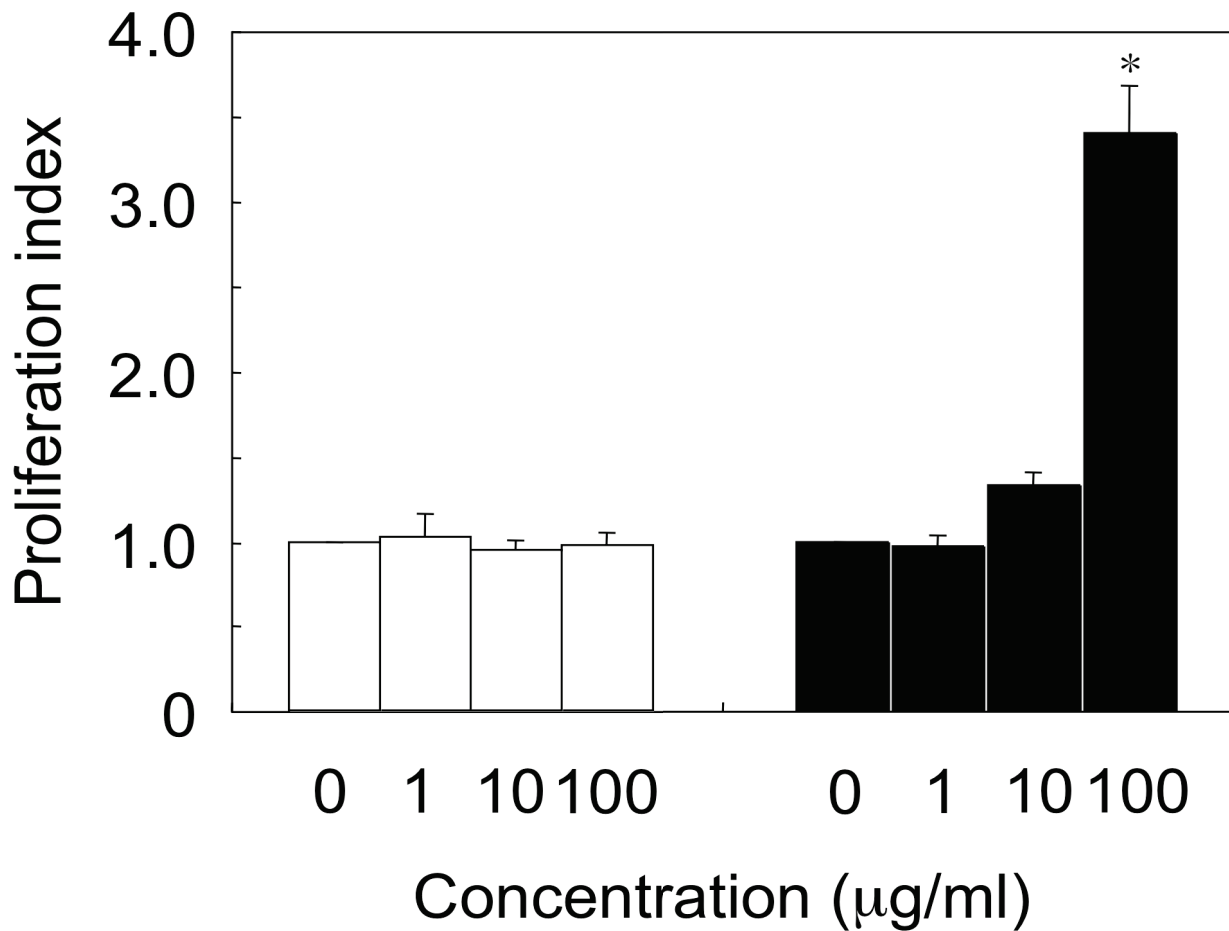


Fig. 33. Mitogenic Effects of CEL-I and Con A on Nude Mouse Splenocytes.

Nude mouse splenocytes were incubated with indicated concentrations of Con A (□) or CEL-I (■) in RPMI 1640 medium supplemented with 3% FBS for 48 hours, and then the proliferation activities of the cells were estimated as described in the text. Data represents mean S.D., n = 3. Asterisk indicates significant difference between with and without lectin ($p < 0.01$).

IV. 考察

(1) CEL-I が RAW264.7 細胞に対して誘発する刺激反応

CEL-I は RAW264.7 細胞を刺激し、TNF- α 、G-CSF 放出並びに NO 産生を濃度依存的 (0 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に誘導した (Fig. 4, 15)。また既知のサイトカイン及び NO 誘導レクチンとして知られる PHA-L よりも強い活性を有することが分かった。また、NO 産生については、iNOS 誘導を介した活性であり (Fig. 19)、CEL-I の誘導する TNF- α に起因しない事が示唆された (Fig. 17)。

CEL-I、PHA-L、WGAにおける活性レベルと結合量について、サイトカイン及びNOの産生レベル及び結合量が多い順にまとめると、

- ・ サイトカイン活性 CEL-I > PHA-L > WGA (Fig. 4)
- ・ NO 活性 CEL-I >> PHA-L > WGA (Fig. 15)
- ・ RAW264.7 細胞に対する毒性 WGA > PHA-L > CEL-I (Fig. 3)
- ・ RAW264.7 細胞 への結合量 F-CEL-I > F-WGA > F-PHA-L (Fig. 6)

であった。これを見ると、生物活性の強度及び細胞への結合量の間に関係が無いものが認められるが、レクチンが細胞上のどの部位に結合するか等、活性に繋がる要因として様々な可能性が考えられる。

レクチンの特異的糖は、一般的に PHA-L 及び CEL-I が GalNAc、WGA には GlcNAc であり、本研究においても種々の活性におけるレクチン機能の関与を検討するため、それぞれ特異的糖として用いた。

TNF- α 、G-CSF そして NO 産生に加えて、iNOS とその転写レベル (iNOS mRNA) における応答が、時間依存的に検出された (Fig. 5, 18)。またサイトカイン放出の経時変化について、TNF- α は約 2 時間後から検出されたのに対し、G-CSF は約 6 時間後から検出された。9 時間以降の両者の挙動も異なったが、この違いは、前述したそれぞ

れの放出系の相違、すなわち TNF- α の細胞外部に発現した前駆体がメタロプロテアーゼによって切断・放出される機構、また G-CSF の細胞内部からのエキソサイトーシスにより放出される機構が影響していると推察される。本研究においてはTNF- α 、及び NO 産生誘導作用に対するリコペンの影響について検討しているが、リコペンは TNF- α 及び NO の産生誘導を阻害した。また 10 μ M の添加では TNF- α と比較し、NO産生量の方が著しく阻害された (Fig. 11, 26)。これについてはの同じく放出系の相違、またさらに上流の細胞内伝達シグナル系が関係しているものと考えられるが、詳細は不明である。ちなみに、リコペンはキナーゼ系シグナル伝達カスケードを抑制することで転写因子の核への移行を阻害すると推定されているが、その詳細な作用機構の解明については今後の課題である [50]。

(2) サイトカイン、NO 産生誘導作用における、LPS コンタミネーションによる誘発の可能性

アメリカヤマゴボウ由来レクチン Pokeweed mitogen (市販標品) はサイトカイン放出誘導活性を持つとされていたが、その活性が LPS の混雑により誘発されたものであることが報告された [39]。

CEL-I のそれぞれの活性においては、LPS の阻害剤である polymyxin B による影響が無かった事に加え、Detoxi gel (エンドトキシン除去用ゲル) (Pierce) に供した CEL-I の活性は保持される (データ未掲載)。よって、LPS コンタミネーションによる誘発の可能性は否定され、CEL-I 独自の活性であると推定された (Table. 1, Fig.16)。

(3) サイトカイン、NO 産生誘導作用に関わる受容体について

一般にレクチンの誘導する生物活性は、細胞上の糖鎖、もしくは糖質を含むレセプターに結合することで発現するとされている。また、それらの活性は、レクチンの特異的糖の存在下で阻害される。CEL-I の活性において、これまでに報告されている血球凝集、細胞毒性については、GalNAc の添加によりその活性が完全に阻害された。TNF- α 、G-CSF 放出誘導活性についても、GalNAc 添加により TNF- α 、G-CSF 放出誘導が阻害されたが、その阻害効果は部分的であった (Table. 1)。この現象について、明確な原因は不明であるが、RAW264.7 細胞の表層は非常に複雑で、生物活性を媒介するレセプターが数多く存在しており [53]、また、複合糖鎖や糖蛋白質の存在も想定される。よって、サイトカイン誘導のトリガーとなるレセプターが、細胞表層においてレクチンがアプローチしにくい場所に存在する可能性がある。またそのレセプター自身が立体構造上複雑であり、単糖と比較して CEL-I が結合しにくい事も考えられる。CEL-I の糖結合性に関して、最近の研究により CEL-I は、ガングリオシド GM2 並びに血中の主要糖脂質であるグロボシド Gb4 にみられる、糖脂質の構成成分であるオリゴ糖鎖の GalNAc β 1-4Gal 及び GalNAc β 1-3 に結合性を示すことが明らかとなっており (Hatakeyama et al)、CEL-I の活性の発現に関係することも考えられる。一方で、細胞表面に発現する抗原に着目すると、RAW264.7 細胞のような株化した細胞に対し、初代培養系のマウスマクロファージを用いた検討の比較が有効であることも考えられる。他に、これまでサイトカイン誘導に関与するレセプターとして報告されたもので、本活性に関与する可能性のあるレセプターの一つに、糖蛋白質性の受容体であるインテグリンが挙げられる。インテグリンは α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマー構造を形成しており、15 種類の α 鎖と 8 種類の β 鎖の組み合わせで、約 20 種類が報告されている。これらは細胞接着に関与する他、様々な生物活性を媒介するレセプターとして知られている [54]。インテグリン結合レクチンとして蛇毒由来レクチンの Lebectin が報告され、細胞接着の阻害や細胞増殖を誘発する [55,56]。また、コラ

ーゲンによるサイトカイン誘導は、 $\alpha 1\beta 1$ インテグリンが関与する事が報告されている [57]。

NO 産生誘導作用について、GalNAc 添加により、NO 産生は阻害されず逆に促進された。また、他の単糖に GalNAc 以上の促進効果を示すものが存在した (Fig. 20)。単糖類のみで NO 産生誘導は見られなかったため、CEL-I の活性を助長するファクターとなっていると考えられる。また PHA-L 並びに LPS の活性も上昇させた (Fig. 21)。加えて、糖質を含まないレセプターとの相互作用を想定し、蛋白質間の相互作用を妨害するため BSA 添加の影響を検討した。結果、NO 誘導活性が阻害されたと同時に、F-CEL-I の RAW264.7 細胞に対する結合量も阻害された (Fig. 22, 23)。また、CEL-I の熱処理によって、活性が低下した (Fig. 25)。従って、NO 産生誘導活性は、糖質認識機能は関与せず、CEL-I 分子中にある特定の立体構造に対する RAW264.7 細胞の特異的な認識が起因となり、誘導されるものと推測された。BSA は、本実験で用いた CEL-I 濃度の約 500 倍である約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ にて、NO 産生を誘導することが報告されている [58]。よって、BSA と CEL-I において、類似する立体構造が活性に関与する事も考えられる。また、トウアズキ *Abrus precatorius* 由来レクチンは熱処理や酵素処理によって糖結合能を失活させても NO 産生誘導を含む様々な活性を保持することが報告されているが [59,60]、酵母 *paracoccidioides brasiliensis* 由来レクチン Paracoccin の場合は特異的糖の GlcNAc 添加で阻害された [49]。これらの報告例から、それぞれの活性物質が示す NO 産生誘導の多様性を窺う事が出来る。その他、NO 産生に関わるレセプターとして、海藻由来多糖のフコイダンや LPS は scavenger receptor を介して NO 産生を誘導しうる事が示唆されている [61,62]。またコラーゲンも NO 産生を誘導するが、そのインテグリンを介したサイトカイン誘導機構とは異なり、ジスコイジンドメインレセプター I に結合して誘導される事が示唆されている [57]。今後、それぞれの受容体に特異的な抗体を用いた阻害実験、また RNA interference (RNAi) 法等により、CEL-I の活性発現機構におけるこれらのレセプターの関与を検討したい。

単糖類添加に伴うNO 産生レベル上昇の明確な原因は不明であるが、GalNAc 及び BSA 添加により結合量が阻害される事 (Fig. 6, 23) から、CEL-I の細胞への結合する量と本現象とは直接関係しているとは考え難く、別の機構に着目する必要がある。現時点での推測では、糖質添加により活発化される細胞中の糖代謝に関わる酵素の誘導が iNOS 発現を促進し、その結果、NO 産生量が上昇すると考えている。高濃度 BSA の iNOS 発現誘導作用は、グルコース添加により上昇する事が報告されており [58]、またグリア細胞に対する LPS の iNOS mRNA 発現誘導は、高濃度 BSA と同じく細胞外部のグルコース濃度上昇に伴い活性化される。その原因として、iNOS と解糖系の脱水素酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) との関連性が報告されており、CEL-I の RAW264.7 細胞に対する活性についても、同様の現象により NO 産生を促進させた可能性が考えられる。

(4) NO 産生誘導作用 細胞内伝達シグナル系

サイトカイン放出誘導作用について、ヒマ種子由来レクチンのリシンはエンドサイトーシスにより細胞内に侵入し、リボトキシックストレスに伴う TNF- α 放出を誘導するが、その活性は BFA 添加により阻害される。さらに、その転写レベルにおける活性化も阻害される事が知られている [64]。また同様の実験を行なったところ、CEL-I のサイトカイン放出誘導作用は、BFA 添加により阻害された (Fig. 7)。しかし、サイトカイン mRNA 発現は阻害されなかった (Fig. 8)。従って、CEL-I の誘導する TNF- α 、G-CSF 放出には、細胞内に侵入していると想定される CEL-I が、関与しないと推測された。CEL-I の細胞への侵入は、F-CEL-I を用いて蛍光顕微鏡による観察を試みたが、残念ながら観察する事が出来なかった。また、細胞表面に結合している F-CEL-I も同様に観察できなかった。原因は、CEL-I が強力な毒性を及ぼす MDCK 細胞等の細胞種よりも、RAW264.7 細胞への結合量が比較的少ないためであると考えら

れた [17]。

細胞外刺激により活性化され、サイトカイン誘導を引き起こす細胞内シグナル伝達系として数多くの報告がある 3 種の MAP キナーゼ系 (ERK、p38、JNK) の関与を検討した。ビーズアッセイ法による解析 (Fig. 9)、そして MAP キナーゼ阻害剤による阻害効果が、サイトカインと NO 産生誘導の両者にみられた (Fig. 10, 24)。よって、両活性に共通して、それらの関与が示唆された。TNF- α 産生誘導に関して、ERK と JNK が TNF- α の遺伝子転写に関与し、p38 は mRNA の核外輸送を制御する事が示唆されている [65、66]。MAP キナーゼ以外に注目すべきシグナル系には、TNF- α 放出、NO 産生において NF κ -B の関与が報告されている他 [37]、protein kinase C 及び tyrosine kinase の活性化を介した活性も知られており [67]、それらが関与する可能性もある。

抗酸化物質で知られるリコペンを用い、CEL-I の活性酸素誘導に関連した実験を行ったが、NO 産生誘導の発現機構について、CEL-I は LPS とは異なった方法で細胞を刺激していると考えられた。LPS 刺激による RAW264.7 細胞への NO 放出誘導に対するリコペンの阻害効果には、リコペンの抗酸化作用が関与するとの研究報告があり、リコペンが細胞内活性酸素レベルを低下させた結果であると論じられている。すなわち、細胞内活性酸素を検出する蛍光試薬を用いた解析により、LPS 処理により RAW264.7 細胞内活性酸素レベルが上昇し、この上昇がリコペンで抑制されたことを報告している。さらに、別の抗酸化物質である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) 並びに NADPH oxidase の阻害剤でもリコペンと同様な阻害作用が観察され、上記の考えを支持している。CEL-I や LPS 刺激による細胞内活性酸素レベルの上昇のメカニズムの詳細が不明であり、リコペンの作用機構を含め、今後さらに検討する必要がある。

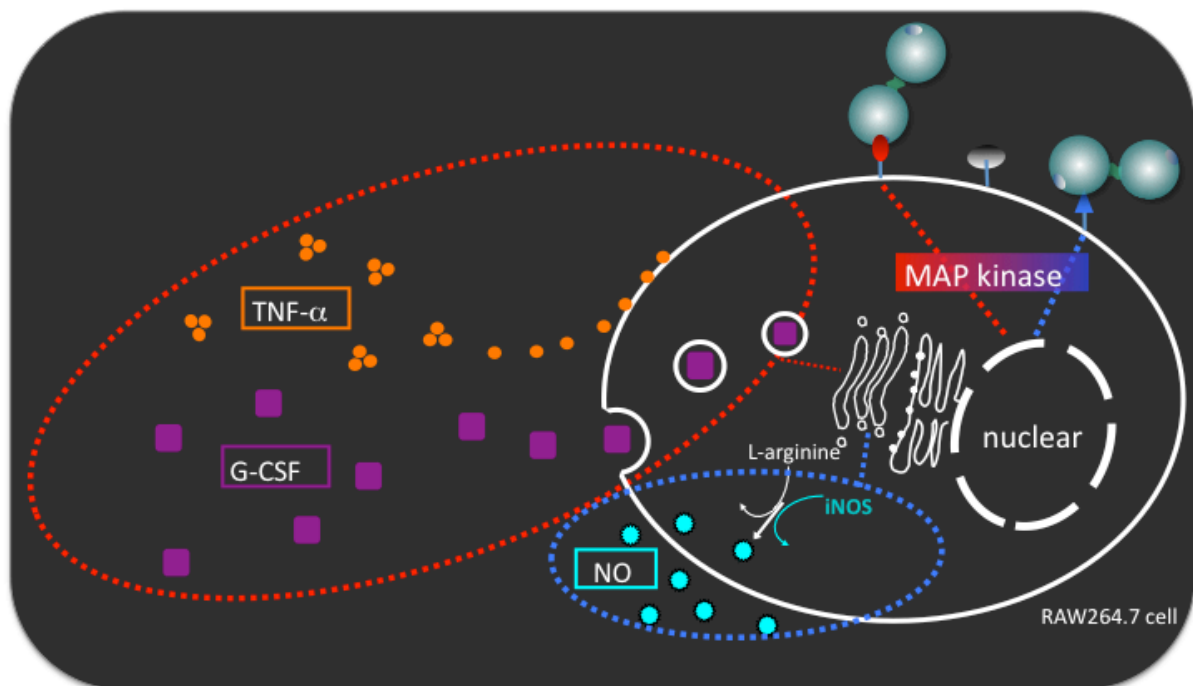


Fig. 34. A simplified diagram of CEL-I-inducing cytokines and NO from RAW264.7 cell.

(5) CEL-Iのマイトジェン活性

CEL-I はマウス脾臓細胞に作用し、マイトジェン活性を示した。また、その活性は CEL-Iの濃度に依存して上昇した (Fig. 30)。特異的糖のGalNAcの影響については、その活性が阻害されたことから、細胞上の糖鎖への結合を介した刺激作用であることが示唆された (Fig. 31)。T細胞・B細胞の特異性に関する所見は、ナイロンウールカラムを用いて分取したT細胞、ヌードマウスより採取したB細胞を用いた実験より、CEL-Iは両者の増殖を促進することがわかった (Fig. 32,33)。同様の作用を示すレクチンに PWM が挙げられるが、この PWM に関して5つのイソレクチン (Pa1~Pa5) が存

在することが報告されており、特に Pa1 が T 細胞・B 細胞の両者に活性を示す [68]。マイトジェン活性については、未だにその発現機構について不明な点が多く、マイトジェン活性と蛋白質構造との相関について、この Pa1 と CEL-I を比較することがその解明に繋がることも考えられる。

V. 総括

CEL-I の生物活性について、*in vitro* にて、ある種のレクチンが示す活性として知られる 3 つの生物活性、サイトカイン誘導活性、NO 産生誘導活性、マイトジェン活性を検討し、その発現機構について研究を行った。結果、CEL-I はこれらの生物活性を誘導し、特に NO 産生についてはレクチン機能以外の刺激により誘導することが示唆された。従って、CEL-I は多彩な生物活性を、多様な作用機構により誘導することが示唆された。

緒言でも触れた通り、レクチンは創薬等の応用も試みられている等、科学の発展への寄与が期待される物質である。CEL-I の活性については、未だ多くの不明な点が残されているが、この研究がレクチンの可能性を見出す一助になることを期待する。

VI. 謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、長崎大学水産学部教授 小田 達也 先生に心より御礼申し上げます。

日々の研究において貴重な御助言、数々の御支援を頂きました 長崎大学水産学部准教授 山口 健一 先生に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究サンプル CEL-I を寄与頂き、また本論文の作成においても御助言、御校閲頂きました長崎大学工学部教授 畠山 智充 先生に深く感謝申し上げます。並びに御所属研究室の皆様に御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、種々の御助言と御校閲を賜りました 長崎大学水産学部教授 橘 勝康 先生、長崎大学水産学部教授 原 研治 先生に深く御礼申し上げます。

本研究遂行のあたり、多大な御協力を頂きました、長崎大学水産学部海洋生物物理化学研究室御所属、長崎大学大学院水産・環境科学研究科日本学術振興会外国人特別研究員 姜 澤東 氏、並びに長崎大学大学院水産・環境科学研究科修士課程 上野 幹典 氏を始め、同研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

VII. 参考文献

1. Dodd, R.B. and Drickamer, K. (2001) Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiol.* **11**, 71R-79R
2. Kilpatrick, D.C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 187-197
3. Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560
4. Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N.W., Cummings, R.D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., Leffler, H., Liu, F. -T., Lotan, R., Mercurio, A.M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P.W. J., Rini, J.M., and Wang, J.L. (1994) Galectins: A family of animal b-galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597-598
5. Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560
6. Giga, Y., Ikai, A., and Takahashi, K. (1987) The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *J. Biol. Chem.* **262**, 6197-6203
7. Himeshima, T., Hatakeyama, T., and Yamasaki, N. (1994) Amino acid sequence of a lectin from the sea cucumber, *Stichopus japonicus*, and its structural relationship to the C-type animal lectin family. *J. Biochem.* **115**, 689-692
8. Muramoto, K. and Kamiya, H. (1990) The amino-acid sequences of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1039**, 42-51
9. Li J, Wu H, Hong J, Xu X, Yang H, Wu B, Wang Y, Zhu J, Lai R, Jiang X, Lin D, Prescott MC, Rees HH. Odorranalectin is a small peptide lectin with potential for drug delivery and targeting. PLoS ONE. 2008 Jun 11;3(6):e2381.
10. Hatakeyama, T., Kohzaki, H., Nagatomo, H., and Yamasaki, N. (1994) Purification and characterization of four Ca²⁺-dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. *J. Biochem.* **116**, 209-214
11. Hatakeyama, T., Matsuo, N., Shiba, K., Nishinohara, S., Yamasaki, N., Sugawara, H., and Aoyagi, H. (2002) Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the Holothuroidea, *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 157-163
12. Sugawara, H., Kusunoki, M., Kurisu, G., Fujimoto, T., Aoyagi, H. and Hatakeyama, T. (2004) Characteristic recognition of N-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type Lectin, CEL-I, revealed by X-ray crystallographic analysis. *J Biol Chem.* **279**, 45219-25.

13. Hatakeyama, T., Shiba, K., Matsuo, N., Fujimoto, T., Fujimoto, T., Oda, T., Sugawara, H., and Aoyagi, H. (2004) Characterization of recombinant CEL-I, a GalNAc-specific C-type lectin, expressed in *Escherichia coli* using an artificial synthetic gene. *J. Biochem.* **135**, 101-107
14. Hatakeyama, T., Nagatomo, H., and Yamasaki, N. (1995) Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **270**, 3560-3564
15. Hatakeyama, T., Furukawa, M., Nagatomo, H., Yamasaki, N., and Mori, T. (1996) Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands. *J. Biol. Chem.* **271**, 16915-16920
16. Oda, T., Tsuru, M., Hatakeyama, T., Nagatomo, H., Muramatsu, T., and Yamasaki, N. (1997) Temperature- and pH-dependent cytotoxic effect of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* on various cell lines. *J. Biochem.* **121**, 560-567
17. Kuramoto, T., Uzuyama, H., Hatakeyama, T., Tamura, T., Nakashima, T., Yamaguchi, K., and Oda, T. (2005) Cytotoxicity of a GalNAc-specific C-type lectin CEL-I toward various cell lines. *J. Biochem.* **137**, 41-50
18. Chang, S. H., Mun, S. H., Ko, N. Y., Lee, J. H., Jun, M. H., Seo, J. Y., Kim, Y. M., Choi, W. S., and Her, E. (2005) The synergistic effect of phytohemagglutinin and interferon-g on the expression of tumor necrosis factor- α from RAW264.7 cells. *Immunol. Letters* **98**, 137-143
19. Higuchi S, Tamura T, Oda T. Cross-talk between the pathways leading to the induction of apoptosis and the secretion of tumor necrosis factor- α in ricin-treated RAW 264.7 cells. *J Biochem.* 2003 Dec;134(6):927-33
20. Kang TB, Song SK, Yoon TJ, Yoo YC, Lee KH, Her E, Kim JB. Isolation and characterization of two Korean mistletoe lectins. *J Biochem Mol Biol.* 2007 Nov 30;40(6):959-65.
21. Yamamoto, Y., Kurachi, M., Yamaguchi, K., and Oda, T. (2007) Induction of multiple cytokine secretion from RAW264.7 cells by alginate oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 238-241
22. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, et al. Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF- α *J Leukoc Biol.* 1995 May;57(5):774-7
23. Dambuza I, Allie N, Fick L, Johnston N, Fremont C, Mitchell J, Quesniaux VF, Ryffel B, Jacobs M. Efficacy of membrane TNF mediated host resistance is dependent on mycobacterial virulence. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 May;88(3):221-34.
24. Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142

25. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064
26. Lowenstein, C. J. and Snyder, S. H. (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707
27. Xie, Q. and Nathan, C. (1994) The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 576-582
28. Keshewani, V. and Sodhi, A. (2007) Differential activation of macrophages *in vitro* by lectin concanavalin A, phytohemagglutinin and wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxide. *Nitric Oxide* **16**, 294-305
29. Kang, T. B., Yoo, Y. C., Lee, K. H., Yoon, H. S., Her, E., Kim, J. B., and Song, S. K. (2007) Korean mistletoe lectin (KML-IIU) and its subchains induce nitric oxide (NO) production in murine macrophage cells. *J. Biomed. Sci.* **15**, 197-204
30. Wong, J. H. and Ng, T. B. (2006) Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 234-243
31. Nowell PC : Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* (1960) May;20:462-6.
32. Harris H, Robson EB. Precipitin reactions between extracts of seeds of *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) and normal and pathological serum proteins. *Vox Sang.* 1963 May-Jun;8:348-55.
33. Brittinger G, König E. [Lymphocyte stimulation by pokeweed mitogen (PWM)]. *Klin Wochenschr.* 1969 Dec 15;47(24):1307-13.
34. Trizio D, Cudkowicz G. Separation of T and B lymphocytes by nylon wool columns: evaluation of efficacy by functional assays *in vivo.* *J Immunol.* 1974 Oct;113(4) :1093-7.
35. Melanie H.Cobb :MAP kinase pathways.*Progrss in Biophysics & Molecular Biology* 71 (1999) 479-500
36. Imanishi, N., Andoh, T., Sakai, S., Satoh, M., Katada, Y., Ueda, K., Terasawa, K. and Ochiai, H. (2005) Induction of inducible nitric oxide (NO) synthase mRNA and NO production in macrophages infected with influenza A/PR/8 virus and stimulated with its ether-split product. *Microbiol Immunol.* **49**, 41-48
37. Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappaB-dependent tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytother Res.* 2008 Dec;22(12):1605-9.
38. Yang JS, Kim HJ, Ryu YH, Yun CH, Chung DK, Han SH. Endotoxin contamination in commercially available pokeweed mitogen contributes to the activation of murine macrophages and human dendritic cell maturation. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Mar;13(3):309-13.

39. Sandvig, K. and Olsnes, S. (1982) Entry of the toxin protein abrin, modeccin, ricin and diphtheria toxin into cells. II. Effect of pH, metabolic inhibitors and ionophores and evidence for penetration from endocytic vesicles. *J. Biol. Chem.* **257**, 7504-7513
40. Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813
41. Yoshida, T., Chen, C., Zhang, M., and Wu, H.C. (1991) Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, and *Pseudomonas* toxin. *Exp. Cell Res.* **192**, 389-395
42. Hadad, N., Levy, R.,: The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein b-carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF- κ B signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 1381-1391 (2012).
43. Zou, J., Feng, D., Ling, W. H., Duan, R. D.,: Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophage by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains. *J. Nutr. Biochem.*, in press.
44. Catalano, A., Simone, R. E., Cittadini, A., Reynaud, E., Caris-Veyrat, C., Palozza, P.,: Comparative antioxidant effects of lycopene, apo-10'-lycopenoic acid and apo-14'-lycopenoic acid in human macrophages exposed to H₂O₂ and cigarette smoke extract. *Food chem. Toxicol.*, **51**, 71-79 (2013).
45. Washington DC, World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 1997,: Food, Nutrition and the prevention of Cancer: A global Perspective. *Nutrition*, **15**, 523-526 (1999).
46. Block, G., Patterson, B., Subar, A.,: Fruits vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, **18**, 1-29 (1992).
47. Simone, R. E., Russo, M., Catalano, A., Monego, G., Froehlich, K., Boehm, V., Palozza, P.,: Lycopene inhibits NF- κ B and PPAR γ signaling in cigarette smoke-stimulated macrophages. *PLoS ONE*, **6**, e19652 (2011).
48. Palozza, P., Simone, R. E., Catalano, A., Saraceni, F., Celleno, L., Mele, M. C., Monego, G., Cittadini, A.,: Modulation of MMP-9 pathway by lycopene in macrophage and fibroblasts exposed to cigarette smoke. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, **11**, 36-47 (2012).
49. Marcotorchino, J., Romier, B., Gouranton, E., Riollet, C., Gleize, B., Malezet-Desmoulins C., Landrier, J. F.,: Lycopene attenuates LPS-induced TNF- α secretion in macrophage and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**, 725-732 (2012).
50. Feng, D., Ling, W. L., Duan, R. D.,: Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF- κ B in macrophage. *Inflamm. Res.*, **59**, 115-121 (2010).
51. Silva, J. -S., Vespa, G. -N., Cardoso, M. - α ., Aliberti, J. -C., Cunha, F. -Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by

- inducing nitric oxide production in infected gamma interferon- α activated macrophages. *Infect Immun.* **63**, 4862-7.
52. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-44. Review.
 53. Hood, J. and Cheresch, D. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 91-100
 54. Sarry, S., Berther, V., Galvete, J.J., Secchi, J., Marvaldi, J., Ayeb, M.E. Marrakchi, N., and Luis, J. (2004) Lebectin, a novel C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits integrin-mediated adhesion, migration and invasion of human tumour cells. *Lab. Invest.* **84**, 573-581
 55. Pereira-Bittencout, M., Carvalho, D.D., Gagliardi, A.R., and Collins, D.C. (1999) The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res.* **19**, 4023-4025
 56. Kim SH, Lee S, Suk K, Bark H, Jun CD, Kim DK, Choi CH, Yoshimura T. Discoidin domain receptor 1 mediates collagen-induced nitric oxide production in J774A.1 murine macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2007 Feb 1;42(3):343-52.
 57. Poteser, M. and Wakabayashi, I. (2004) Serum albumin induces iNOS expression and NO production in RAW 267.4 macrophages. *Br J Pharmacol.* **143**, 143-51.
 58. Tripathi, T., and Maiti, T. K. (2003) Stimulation of murine macrophages by native and heat denatured lectin from *Abrus precatorius*. *Inter. Immunopharmacol.* **3**, 233-244
 59. Tripathi, T., and Maiti, T. K. (2005) Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius*. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 451-462
 60. Coltri KC, Casabona-Fortunato AS, Gennari-Cardoso ML, Pinzan CF, Ruas LP, Mariano VS, Martinez R, Rosa JC, Panunto-Castelo A, Roque-Barreira MC. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):704-13.
 61. Nakamura T, Suzuki H, Wada Y, Kodama T, Doi T. Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 28;343(1):286-94.
 62. Matsuno R, Aramaki Y, Arima H, Tsuchiya S. Scavenger receptors may regulate nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 28;237(3):601-5
 63. Won, J. -S., Im, Y. -B., Key, L., Singh, I. and Singh, A. (2003) The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-1-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein. *J. Neurosci.* **23**, 7470-7478
 64. Yamasaki, C., Nishikawa, K., Zeng, X. T., Katayama, Y., Natori, Y., Komatsu, N., Oda, T., and Natori, Y. (2004) Induction of cytokines by toxins that have an identical RNA

- N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin. *Biochim. Biophys. Acta* **1671**, 44-50
65. Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia*. 2002 Nov;40(2):175-83
 66. You M, Flick LM, Yu D, Feng GS. Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 2001 Jan 1;193(1):101-10.
 67. Paul, A., Pendereigh, R. H. and Plevin, R. (1995) Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 482-488
 68. Waxdal MJ, Basham TY. (1974) B and T-cell stimulatory activities of multiple mitogens from pokeweed. *Nature*. **251**(5471):163-4.
 69. DiMascio, P., Kaiser, S., Sites, H.,: Lycopene as the most effective carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 532-538 (1989).
 70. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. Rice-Evans, C. A.,: Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS lett.*, **384**, 240-242 (1996).
 71. Stahl, W., Sies, H.,: Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids in: Canfield L. M., Krinsky, N. I., Olson, J. A. eds. *Carotenoids in human health*. New York Academy of Science, **691**, 10-19 (1993).
 72. Ukai, N., Lu, Y., Etoh, H., Yagi, A., Ina, K., Oshima, S., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y.,: Photosensitized oxygenation of lycopene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1718-1719 (1994).
 73. Conn, P. F., Schalch, W., Truscott, T. G.,: The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol.*, **11**, 41-47 (1991).
 74. Krinsky, N., Russett, M. D., Handelman, G. J., Snodderly, D. M.,: Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J. Nutr.*, **120**, 1654-1662 (1990).
 75. Endo Y, Mitsui K, Motizuki K, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 1987, 262: 5908-5912.