

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

長崎大学大学院生産科学研究科
山西 智大

海洋性棘皮動物グミ (*Cucumaria echinata*) より新規に精製された CEL-I は、*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) に強い結合性を示す、16kDa のサブユニットが 1 本のジスルフィド結合によりホモダイマーを形成する C 型レクチンである。生物活性に関しては、ウサギ、ヒト (A-,B-,O-型) の赤血球を凝集する他、細胞種に特異的な細胞毒性を示す事が見出されている。一方、ある種のレクチンは、マクロファージ刺激作用を有し、サイトカインや一酸化窒素 (NO) の産生を誘導する事が知られている。また、マウスやヒトのリンパ球に対してマイトジェン作用を示すレクチンも知られている。本研究では、CEL-I の生物活性の解明を目的とし、マウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 に対する CEL-I の腫瘍壊死因子- α (TNF- α) や顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) などのサイトカイン誘導作用及び NO 産生誘導活性について調べた。さらに、CEL-I のマウス脾臓リンパ球に対するマイトジェン作用について検討した。

TNF- α 及び G-CSF は、サンドウィッチ ELISA 法により検出した。CEL-I で RAW264.7 細胞を刺激することにより、TNF- α 並びに G-CSF が、その濃度依存的に放出された。また TNF- α については CEL-I 刺激より 2 時間後、G-CSF は 6 時間後より検出された。LPS 阻害剤の polymyxin B を同時に添加したところ、サイトカイン検出量に影響は無く、その活性が CEL-I 独自のものであり、エンドトキシンの関与は無いことが確認された。CEL-I を FITC 蛍光標識し、細胞への結合を調べたところ、CEL-I の細胞結合量は活性発現と良い相関が認められた。さらに、CEL-I 刺激から各因子放出に至るまでのプロセスについて調べた。CEL-I の特異的糖である GalNAc を添加すると、活性が部分的ではあるが阻害された。よって、細胞表層の特異的糖鎖への CEL-I 結合が活性発現に重要である事が分かった。ゴルジ体特異的に作用し、細胞内蛋白質輸送を阻害する brefeldin A 存在下では、CEL-I が誘導するサイトカイン放出量は低下したが、各因子の転写レベルでの活性化については影響が認められなかった。細胞内伝達シグナルである MAP キナーゼ系 (ERK, p38, JNK) の関与について調べたが、それぞれのシグナル系は CEL-I 刺激後 90 分をピークに活性化した。またそれぞれに特異的な阻害剤を添加したところ、サイトカイン放出は阻害され、本シグナル系の関与が示唆された。近年、抗酸化活性を有し、サイトカイン、NO 産生系免疫をはじめとする免疫系への影響が報告されている赤色色素リコペンの効果について検討した。まずは TNF- α 誘導に対してリコペンの影響を検討したが、TNF- α 放出レベルが阻害される結果となった。

NO 産生はグリース法（亜硝酸法）により検出した。結果、CEL-I は RAW264.7 細胞を刺激することで NO 産生を誘導することが判明した。NO は CEL-I 刺激後より 6 時間で検出され、NO の合成酵素である iNOS またその転写レベルの活性化も検出された。本 NO 誘導活性における LPS の関与については、polymyxin B の影響が認められず、CEL-I 単独の活性である事を確認した。続いて NO 産生に至るまでの CEL-I 刺激作用のプロセスを調べた。GalNAc を用い CEL-I のレクチン機能の関与について検討したが、活性は阻害されず、むしろ促進される結果となった。その他の単糖（グルコース等）についても調べたが、GalNAc よりさらに促進効果を示すものが認められた。また PHA-L、LPS を用い同様の実験を行うと、同じく糖類添加により NO 産生が促進された。CEL-I のレクチン機能以外に、蛋白質間の接触を妨害するため牛血清アルブミン (BSA) の影響を調べた。結果として CEL-I の NO 誘導作用は阻害された。細胞内伝達シグナルの挙動に関して、MAP キナーゼ系の阻害剤により活性は阻害された。またリコペン添加により CEL-I の NO 産生誘導が濃度依存的に阻害されたが、TNF- α 活性に対する効果と比較し低濃度から比較的高い阻害効果が認められた。このリコペンの作用については MAP キナーゼ系をはじめとする細胞内伝達シグナル系への作用が影響するものと考えられるが、抗酸化活性との関係性も含め検討中である。

マイトジェン活性はマウス脾臓細胞 (ddY系, ♂, 6週齢) を用い検討したところ、CEL-I の濃度に依存的な活性を示した。またその活性は GalNAc により阻害され、CEL-I の糖鎖認識を介した活性であることが示唆された。マイトジェンは T 細胞、B 細胞に特異性があるか、若しくは両者に活性を示すものが知られており、CEL-I について調べた。B 細胞についてはヌードマウスより採取し、T 細胞については脾臓細胞をナイロンウールカラムに供することで T 細胞画分を得た。結果、CEL-I は T 細胞、及び B 細胞の両者に対しマイトジェン活性を示すことが判明した。

以上、CEL-I は、マクロファージ株細胞に対してサイトカイン、NO の産生を誘導する、多彩な刺激反応を誘発し、マウス脾臓細胞に対しても T、B 細胞両者にマイトジェン活性を示す非常に興味深いレクチンである事が明らかになった。また、サイトカイン誘導及びマイトジェン活性は CEL-I のレクチン機能による糖鎖認識を介した活性であったが、NO 産生誘導はそれとは別の刺激方法により誘発されるものであると考えられ、CEL-I は多様に生物活性を発現する事が示唆された。