

天然植物抽出に含まれる抗アレルギー物質の探索

—RBL-2H3 細胞のシグナル伝達に及ぼすリョウブ抽出液とイヌツゲ抽出液の効果—

中田美世子, 荒舘 忠, 片桐達雄

1. 概要

アレルギー発症に至るシグナル伝達に影響を及ぼす天然物を探索することを目的として、マスト細胞のFcεレセプター刺激で誘導される顆粒放出に影響を与える植物抽出液の探索と解析を行った。

マスト細胞の顆粒放出に及ぼす効果を検討するため、第一スクリーニングにはマスト細胞様細胞株 RBL-2H3 を用いたβ-hexosaminidase 放出測定系を用いた。この第一スクリーニングの結果は、各サンプルの RBL-2H3 に対する細胞毒性効果を内包する可能性が高い。したがって、第二スクリーニングでは、各抽出液の細胞毒性を細胞生存率、細胞周期の観点より解析を行った。用いた方法は、Propidium Iodide による DNA 染色であり、生存率の確認と細胞周期への影響を同時に解析することで、各抽出液が RBL-2H3 細胞に及ぼす効果を確認した。

両スクリーニングの結果より、イヌツゲ (*Ilex crenata*) 樹皮抽出液は顆粒放出を増加させること、一方、リョウブ (*Clethra barbinervis*) 葉抽出液は顆粒放出を抑制することを見出した。IgE 感作 RBL-2H3 の抗原刺激時におけるβ-hexosaminidase の放出量を基準として、イヌツゲ抽出液前処理により放出量は、対照群と比べて約 1.6 倍増加した。一方、リョウブ抽出液前処理では、対照群と比べて、およそ半量に抑えられた。リョウブ抽出液は、顕著な顆粒放出抑制効果を示したので、このメカニズムを解明するため、細胞内シグナルへの影響を調べた。この結果、リョウブ抽出液は細胞内チロシンリン酸化シグナルを抑制することが明らかとなった。すなわち、この抑制は、細胞内シグナルカスケードの上流に位置する src-family kinase である Lyn のキナーゼ活性を抑制する可能性が示唆された。Lyn は、Fcε 受容体からのシグナルにより活性化されて自己分子中の酵素活性ドメイン内にあるチロシン残基の自己リン酸化が増強するが、リョウブ抽出液で前処理を行った RBL-2H3 では対照群と比べて、有意にチロシンリン酸化の誘導が抑えられていることが示された。

今回の結果を元に将来的な臨床応用を考察すると、イヌツゲ抽出液では、マスト細胞に由来するアレルギー反応を増悪する可能性を示したことから、免疫機能の増強に応用できるかもしれない。イヌツゲ抽出液の作用機構は現在のところ全く不明である。一方、リョウブ抽出液処理では、マスト細胞に由来するアレルギー反応を抑制する可能性が考えら

れる。リョウブ抽出液の作用点は、Lyn または Lyn の上流のシグナルと考えられる。

以上の結果は、アレルギー発症機構に作用を持つ天然物質の標的分子が細胞内チロシン酸化シグナルを特異的に抑制する可能性を示唆しており、今後、抗アレルギー薬の作用機序を理解する上で重要な意味を持つと思われる。また、今回の結果が示すように、300 種類の天然物由来抽出液の中には、少なくとも数種の細胞毒性を示すことなく、マスト細胞活性化機構に何らかの薬理作用を及ぼす天然物が含まれる事が示された。この結果は、今後多くの天然物を広く探索することにより、これら物質中に未知の免疫活性制御物質が含まれている可能性を示すものである。

2. 背景

IgE 関与のアレルギーは、今日広く用いられている Coombs と Gel のアレルギーの4分類において、第I型に分類されるものであり、IgE とマスト細胞の関与する即時型過敏症として他のアレルギーと区別されている¹⁾。

I 型アレルギー発症の概要は、三段階よりなる。まずアレルギーの原因となる抗原（アレルゲン）の感作により、抗原特異的な IgE の産生が B 細胞に誘導される。この過程は T 細胞依存性で、Th2 型 T 細胞の活性化とそのサイトカイン産生 (IL-4、IL-13) が必須である。IL-4、IL-13 および T 細胞表面共刺激分子 (CD40 など) の刺激により、B 細胞は IgE 産生細胞へと分化成熟する^{1),2)}。次いで、第二段階では、産生された IgE が引き金になってマスト細胞が活性化される。その機構は、IgE のマスト細胞や好塩基球細胞表面の高親和性 IgE レセプターである FcεRI への結合、すなわち IgE 感作が必要条件となる。次いで、第二段階では、アレルゲンに再び暴露することにより、この細胞上の IgE に多価アレルゲンが結合して IgE/FcεRI 複合体が架橋されると細胞は活性化され、細胞内シグナル伝達が起こり、マスト細胞から炎症性の生理活性物質が放出される^{3,4)}。第三段階は、マスト細胞から放出された生理活性物質の作用段階である。マスト細胞質内好塩基性顆粒に貯蔵されたヒスタミンなどが放出されるとともに、アラキドン酸代謝物であるロイコトリエン (leukotrien:LT) やトロンボキサンなどの化学伝達物質が平滑筋の収縮、血管の拡張、腺分泌の亢進が生じ、即時型アレルギー反応の病状が惹起されるのである。

上記の I 型アレルギー発症機構より、免疫学的に抗アレルギー薬をデザインするとすれば標的反応もまた三段階あることになる。現在アレルギー治療薬はステロイド剤や抗ヒスタミン薬の使用が一般的であり、標的段階としては第一段階、もしくは第三段階に作用するものが主である。例えば、ステロイド剤は上述の第一段階をブロックするが、免疫系の生体防御反応全般をブロックしてしまう。また、抗ヒスタミン薬は上述の第三段階をブロックするが、生理的に必要なヒスタミン反応をもブロックしてしまうため副作用が現れる。このように現在の抗アレルギー薬は副作用が強い。新たな副作用の少ない抗アレルギー剤の開発研究の主流は、第二段階、すなわちマスト細胞活性化の制御に向けられはじめている。この研究の時流の中で、近年特に注目されているのが、天然物由来成分である。46 億年かけて生命が現在まで進化する過程で、免疫系は自己と非自己を認識する必然をもって発達したものと考えられ、わずかに数百年の歴史を持つ人工化学物質よりも、天然物の中には未知の免疫制御物質が存在していると考えられる。マスト細胞活性化制御物質を天然物由来成分より探索する試みの歴史は浅いが、それでも抗アレルギー作用のある天然物として、マスト細胞内の NF-κB 活性化の特異的な阻害効果のある aucubin を含有するアオキ (*Aucuba japonica*)⁵⁾ やマスト細胞の脱顆粒の阻害効果のある Myricetin を含有するヤマモモ (*Myrica rubra*)⁶⁾、同じく脱顆粒の阻害効果が認められるヨモギ⁷⁾ が報告され始めており、これらがアレルギー発症の第二段階にいかんにか作用するか研究の進展が期待されている。

本研究ではラットのマスト細胞様細胞株 RBL-2H3 を用いて、抗原刺激時のマスト細胞の顆粒放出に影響を与えるような全く新しい天然物由来成分を探索したものであり、探索の結果、数種の天然物より興味深い効果を確認することができた。顆粒放出を増大させる物質と減少させる物質の両者を確認したが、中でもリョウブ抽出液は、マスト細胞の顆粒放出を大きく抑制したことから、将来的な抗アレルギー薬として臨床応用にもつながるものと期待される。

3. 材料と方法

試薬および抗体：

DNP-albumin (albumin, human-dinitro phenyl) (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)を用いた。β-hexosaminidaseの基質として、p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-glucopyranosideを(Wako Purechemical Industrial, Ltd. OSAKA, JAPAN)より購入した。Siraganian bufferの調製に用いたPIPESその他の試薬はすべて特級試薬をWako Purechemical Industrial, Ltd. OSAKA, JAPAN)より購入した。細胞周期測定時に用いた、リボヌクレアーゼA、ウシ肝臓由来、およびpropidium iodide Lot 39H3721はそれぞれWako Purechemical Industrial, Ltd. OSAKA, JAPANとSigma chemical Co., St. Louis, MO, USAより購入した。IgE抗体はanti-dinitro phenyl (DNP) mouse monoclonal (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)を用いた。免疫沈降時には、Protein G Sepharose™ (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., Buckinghamshire UK)を用いた。

Western blot および免疫沈降には以下の抗体を用いた。Lyn(44): rabbit polyclonal IgG cat#sc-15, Lot#B170 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、Phospho-Lyn: (Tyr507) Antibody Lot: 1#2731S (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA)、Anti-Phosphotyrosine Monoclonal Antibody: Lot: 1#9411 (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA)、Anti-Phosphotyrosine, biotin conj. (mouse monoclonal IgG_{2b}, clone 4G10), Cat#16-103 (Upstate Biotechnology USA, Inc. IL, USA)、p44/42 MAP Kinase Antibody Lot: 11 (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA)、phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody Lot: 16 (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA)、Avidin/HRP: Lot/Chr-B, 068(201) (DAKO. A/S, Denmark)、Goat Anti-Rabbit-Ig-HRP: (Part:AL10404) (Biosource International, CA, USA)、Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005, Lot#J251 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、Goat Anti-Rabbit-AP (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA)

植物抽出液：

スクリーニングに用いた植物抽出液は、100%エタノールと植物体を3:1 (v/v)の割合で抽出した。(本研究でスクリーニングに用いた植物サンプルは富山大学・医学部・生物学教室の荒舘忠先生より恵与されたものである。)

リョウブ *Clethra barbinervis* (grown in Toyama, Japan)葉抽出液 (CBLE) は、新鮮な150gの葉を450 mlのエタノール(Wako Purechemical Industrial, Ltd. OSAKA, JAPAN)で、室温で4日間抽出し、吸引濾過したものである。

CBLEの分画

条件検討実験として、3本の1.5 mlチューブにそれぞれCBLE 300 μlを加えて、CBLEを減圧下で乾固させた。そして3本それぞれに、ミリQ水 300 μlを加えて溶解させた。この時点で弱酸性であった水溶液を、1N HClと1N NaOHを用いて酸性(約pH 4)、中性(pH 7)、アルカリ性(pH 10)に調整した。次に、それぞれのチューブにクロロホルム 300 μlを加え、よく混ぜ、遠心して二層に分離させた。下層のクロロホルム層を別のチューブに回収した。この操作を4回繰り返し、各pHにつき1200 μlのクロロホルム抽出液を得た。クロロホルム層の回収後、酢酸エチル 300 μlを加え、よく混ぜ、遠心して二層に分離させた。そして上層の酢酸エチル層を別のチューブに回収した。この操作を4回繰り返し、各pHにつき1200 μlの酢酸エチル抽出液を得た。酢酸エチル層の回収後、残った水層を、1N HClと1N NaOHを用いてそれぞれ中性(pH 6-7)にあわせた。次に、得られた抽出液サンプルを、細胞を用いた脱顆粒の系にもちこむために有機溶媒を除いた。抽出液を乾固させ、それぞれのチューブに75 μlの100%エタノールを加えて再溶解させた。さらに75 μlのD.W.を加えて溶かした。実験には、この抽出液30 μlと、50%エタノール30 μlを混ぜて用いた¹³⁾。

CBLE 10 mlを減圧下で乾固後(抽出物: 0.2 g)、D.W. 10 mlに溶解し、1N HClを用いて酸性(約pH 4)、に調整した後、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を回収し、減圧下濃縮を行い、さらに乾燥させて33 mgのクロロホルム抽出

物を得た。クロロホルム抽出後の水層を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を回収し、減圧下濃縮を行い、さらに乾燥させて 54 mg の酢酸エチル抽出物を得た。最終的に残った水層を、1N NaOH を用いて中性 (pH 6-7) に調整した。この水層サンプルを乾燥させ、残渣 108 mg を得た。次に、クロロホルム・酢酸エチル両抽出物に 40 mg/ml となるように 100 % エタノールを加え、再溶させた。水層を乾燥させたものは 40 mg/ml となるように 50 % エタノールを加え、再溶解した。

さらに顆粒放出抑制成分の性質を検討するため、顆粒放出抑制効果が認められたクロロホルム層 100 μ l (40 mg/ml) と酢酸エチル層 100 μ l (40 mg/ml) を逆相 HPLC (system: 島津 LC10A, column: Mightysil RP-18, GP 250-4.6 (5 μ m)) を用い、それぞれ、30 分かけて 100% まで、あるいは 60% までメタノール濃度を上昇させて分画した。30 分以後は 100% メタノールで 10 分間カラムを洗浄した。溶出速度は 1 ml/min で行った。クロロホルム層と酢酸エチル層はそれぞれ 40 のフラクションに分画し、その溶出分画をそれぞれ減圧下で乾固させ、それぞれのフラクションを 25 μ l の 100% エタノールで再溶解したものをサンプルとして用い、これらの各フラクションの脱顆粒 assay 系に与える影響を検討した。HPLC には、Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μ m) Lot: 01M1016 (KANTO CHEMICAL CO., INC.) を用いた。

細胞と培地:

RBL-2H3 (東京都神経科学総合研究所 矢倉英隆 参事研究員より恵与) の培養培地として、RPMI 1640 に 10% ウシ胎児血清 (JRH Biosciences)、 10^{-6} M 2- β メルカプトエタノール (Wako Purechemical Industrial, Ltd. OSAKA, JAPAN) と 2 μ g/ml Gentamicin solution (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA) を加えたものを用いた。(継代 3-20 数代までの細胞を使用した。)

培養 RBL-2H3 のシングルセルサスペンションには、0.05% Trypsin-EDTA (GIBCO, invitrogen Corporation, NY, USA) を用いた。

β -hexosaminidase release assay 脱顆粒の計測:

24-well flat-bottom microtiter plate (Becton Dickinson and Company, NJ, USA) に、 2.0×10^6 cells/well に対し約 0.45 μ g/ml の IgE (α -DNP) を加え、37 $^{\circ}$ C、24 時間インキュベートして感作した。上清を捨て、500 μ l の siraganian buffer I (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, NaOH, pH 7.2) で細胞を 2 回洗浄後、siraganian buffer II (5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA 添加) 200 μ l にて 37 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした。そして植物抽出液サンプル 2 μ l を加え、10 分間インキュベートした。その後、500 μ l の siraganian buffer I で細胞を 1 回洗浄後、siraganian buffer II 180 μ l (DNP-BSA を加えないコントロールの well には 200 μ l) を加え、DNP-BSA (最終濃度は 1 μ g/ml) 20 μ l で 37 $^{\circ}$ C、60 分間刺激した。刺激後、上清 50 μ l を 96 穴マイクロプレート (Becton Dickinson) にトリプレットで移し、substrate solution (1 mM p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -glucopyranoside/ 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5)) 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C、60 分間インキュベート後、Stop solution (0.1 M Na₂CO₃/NaOH), pH 10.0) 200 μ l で反応を停止し、405 nm で吸光度を測定した¹⁰⁾。分光光度計は、Nippon InterMed K.K. の ImmunoReader を用いた。

Western blot 解析:

Cell lysate の調製

24-well flat-bottom microtiter plate に、 2.0×10^6 cells/well を蒔き、(α -DNP IgE/0.45 μ g) を加えて 37 $^{\circ}$ C、24 時間感作した。上清を捨て、1000 μ l の siraganian buffer を加えた。10 μ l の植物抽出液を加えて経時的に 0、3、30 分間インキュベートした後、DNP-BSA (最終濃度は 10 ng/ml) 100 μ l で刺激した。上清を除き、TNE 200 μ l で 30 分氷上で反応させることで細胞を可溶化した。可溶化サンプルを集めて 10,000 rpm、30 秒間遠心し、上清を cell lysate とした。Cell lysate 50

リョウブ抽出液とイヌツゲ抽出液の抗アレルギー効果

μ lにSDS-PAGE sample buffer(蒸留水 4.0ml, 0.5M Tris-HCl pH6.8 1.0ml, グリセリン 0.8ml, 10%SDS 1.6ml, 2- β メルカプトエタノール 0.4ml, 0.05%(w/v)ブロモフェノールブルー 0.2ml) 50 μ lを加えて90-98°Cで5分間加熱し、タンパク質を変性させた後、SDS-PAGEで展開した。

SDS-PAGE と Western blot

ミニプロテイン III (Bio-Rad) システムを用いた。10%アクリルアミドのミニゲルで、ゲル二枚に対して60mA, 15分電気泳動した後80mAで50-60分電気泳動した。泳動後、アクリルアミドゲルをblotting buffer (25mM Tris, 192mM グリシン、20%v/v メタノール、pH8.3)で20分平衡化した。90Vで180分間 pure nitrocellulose membrane (Bio-Rad) に transfer した。装置はミニプロテイン III ウェスタンブロットモジュールを用いた。5% BSA-TBS で6-12時間 Blocking をした後、メンブレンをTTBSで2回、TBSで2回洗浄した。洗浄後、一次抗体に6-12時間反応させた。この後、メンブレンをTTBSで2回、TBSで2回洗浄した。洗浄後、二次抗体と1時間反応させた。反応後、メンブレンをTTBSで2回、TBSで2回洗浄した。洗浄後、AP 発色キット (Bio-Rad) で直接メンブレン上に発色、あるいは ECL 発色キット (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., Buckinghamshire UK) にて Film (Kodak BioMax MR1) 上に造映した。

二次元電気泳動法による発現タンパクの解析:

Cell lysate の調製: 1.0×10^6 cells/ml の RBL-2H3 細胞を α -DNP IgE (0.45 μ g/ml) を添加あるいは無添加で、6cm シャーレにて37°Cで24hr インキュベートした。次に培地を除去後、1000 μ l の siraganian buffer を加え、さらに10 μ l のリョウブ抽出液を添加もしくは無添加条件で、37°C、10分間インキュベートした。この後DNP-BSAを10 μ g/ml (最終濃度) 加えて37°C、10分間刺激もしくは無刺激した。そして上清を除いて二次元電気泳動用 Lysis buffer (Urea 9.5M, 2% Triton X-100, 2% Ampholyte (pH3~10), 5% 2-Mercaptoethanol) 100 μ l を加えて室温10分間静置して、細胞を可溶化した。細胞溶解液は10,000rpm, 0.5分で遠心して上清を二次元電気泳動用 Sample とした。

二次元電気泳動: 二次元電気泳動はBio-Radの泳動装置 PROTEAN IEF Cell を用いた。上記により調製した各 Sample 13 μ l と Rehydration Buffer 117 μ l を IPG ストリップ (pI3-10 Bio-Rad) にアプライして、ミネラルオイルを適量 (700 μ l) 重層した。20°C・Passive で12hr、さらにプログラミングに従って約30hr 放置した。二次元電気泳動の1次元目終了後、平衡化 buffer 1 をストリップ1本あたり約3ml 滴下して10 min 平衡化し、平衡化 buffer 2 約3ml に移し、10 min 平衡化した後2次元目のレディゲルをSDS-PAGE装置にセットした。そして平衡化が完了したストリップ及びバンドマーカをレディゲルにセットして電気泳動を始め、バンドマーカの位置を確認して約60分で電気泳動を終えた。

タンパク染色: 二次元電気泳動で展開したゲルは銀染色またはクマジーブリアントブルー (CBB) で染色した。銀染色には第一化学薬品のキット (電気泳動用 2D-銀染色試薬・II「第一」) を用いた。固定液 I (メタノール50%、酢酸10%、D.W) 20ml でゲルを固定・振とう後、10分間固定液 II (メタノール30%、酢酸10%、固定化剤0.5%、D.W) 20ml にて、15分間振とうしてタンパク質の固定を行った。前処理液 (メタノール50%、前処理剤0.5%、D.W) 20ml 中で、タンパク固定したゲルを10分間振とうし、タンパク固定したゲルを処理し、D.W 20ml で5分間水洗した。前処理の完了したゲルは、1ゲルにつき銀染色液20ml 中で、15分間振とうして染色した。D.W 20ml で、2分間ずつ3回水洗後、現像液20ml で現像した。5-10分の振とう中、スポットの出現確認した時点で停止液1mlを注いで現像を停止し、10分間よく振とうし、水洗後、ゲルドライヤーで乾燥して標本とした。スポットの解析は乾燥したゲル標本をイメージアナライザーでスキャンした後、画像解析した。

CBB 染色は2次元展開したアクリルアミドゲルをD.Wで洗浄後、クマジー染色液 (Bio-Rad) 10ml に浸し、振とう後、染色液を十分ゲル中に浸透させた後、D.W でよく洗浄した。スポットの染色と、背景の脱色を確認後、ゲルをゲルドライヤーで乾燥して銀染色と同様に画像解析を行った。

4. 結果

天然物抽出サンプルの顆粒放出に及ぼす効果 (一次スクリーニング β -Hexosaminidase の測定) :

IgE 感作 RBL-2H3 の抗原刺激時に誘起される Fc ϵ RI dependent の顆粒放出に対する植物抽出液の影響を調べた。本研究に用いた植物抽出液は 49 科 123 種の 300 種類の植物より得たエタノール抽出液ライブラリー (医薬大・生物学教室 荒館 忠先生より恵与) をスターティングマテリアルとした。このライブラリー中の抽出液処理による RBL-2H3 の顆粒放出量に及ぼす直接効果を検討した。実験は、各抽出液サンプルのみを加えた対照実験群と、各抽出液サンプルでの前処理の後に α -DNP IgE + DNP-BSA での Fc ϵ RI 刺激を行った実験群の顆粒放出量を測定して、それぞれの顆粒放出量を比較検討した。この結果、各抽出液サンプルは三つのカテゴリーに分類することができた。すなわち、各サンプル単独処理時 (対照実験) よりも IgE + 抗原刺激前にサンプルで処理した際の顆粒放出量が増大したもの (Group A)、有意な変化が認められなかったもの (Group B)、同様の系で顆粒放出量が減少したもの (Group C) である。実験に用いた 300 サンプルは実験条件により、種々の値を示したが、前述の 3 グループ中で再現よく典型的なパターンを示したサンプルを選出した。Group A より 6 種類、Group B より 6 種類、Group C より 8 種類、計 20 種類を以後の実験に用いた。

Fig. 1 に、各グループの典型的な顆粒放出への影響パターンを示した。図に示したとおり、RBL-2H3 を IgE + DNP で刺激した場合の顆粒放出を 100 とする相対値で Group A のイヌツグ抽出液での前処理で顆粒放出は約 65% 増大した。一方、Group B のアオツツラフジでは顆粒放出は約 9% 増加したが、コントロールの顆粒放出量と有意な差は認められなかった。そして、Group C の代表であるリョウブ抽出液前処理では、約 43% の顆粒放出の抑制が認められた。

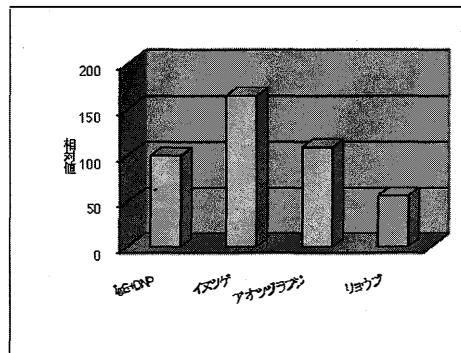


Fig. 1. 天然物抽出液サンプル前処理による β -Hexosaminidase の放出量の比較 : RBL-2H3 (2.0×10^6 cells/well) を α -DNP IgE (0.45 μ g/ml) 添加後、37°C で 24h インキュベートして感作した。次に細胞を siraganian buffer で洗浄後、180 μ l の siraganian buffer を加えて、37°C で 10 分間プレインキュベートした。次いで、2 μ l の植物抽出液を加えてさらに、37°C で 10 分間インキュベートした。この後、抗原 DNP-BSA (10 μ g/ml) を加えて 37°C で 10 分間刺激した。刺激後、上清 50 μ l を 96 穴マイクロプレートに移し、 β -Hexosaminidase 用の呈色反応基質を含む substrate solution 50 μ l を加え、37°C で 60 分間反応後に停止液 200 μ l を加えて反応を止め、405nm で吸光度を測定した。

顆粒放出に影響を及ぼすことが確認された植物抽出液の細胞周期に及ぼす効果 (二次スクリーニング 細胞毒性の評価) :

一次スクリーニングで選出したサンプルは、 β -Hexosaminidase を用いた顆粒放出測定系で有意な変化が認められたが、

この結果は必ずしも、これらサンプルが顆粒放出に特異的に作用したとは限らない。植物抽出液が RBL-2H3 の細胞周期もしくは、細胞破壊に直接的な効果を示したものであるか否かを確認するため、Propidium Iodide (PI) で二重鎖 DNA を染色し、フローサイトメトリーを用いて染色された DNA の蛍光が示すパターンより、RBL-2H3 の細胞周期を調べた。

Fig. 2A に通常細胞継代培地で維持した状態における細胞周期パターンを示す。一般に細胞株を用いた実験では G₀/G₁ 期にある細胞数が多く、DNA 量が倍化した G₂ 期細胞数が少ないという細胞周期のパターンが典型的であるが、我々の RBL-2H3 の系では Fig. 2A に示すような独特のパターンが得られた。この結果をコントロールとして、各種サンプルを RBL-2H3 で刺激した状態を比較した。この実験系でサンプルが細胞毒性を示したパターンを Fig. 2B に例を示した。Extract A, B は共に第 1 スクリーニングにおいて Group A に分類された抽出液であるが、Extract A, B 共に Fig. 2A に示した DNA の二相性のピークは観察されず、DNA の断片化が起こっているものと思われる。このように DNA フラグメンテーションを誘起させるような細胞毒性の強い抽出液を候補から除くことで、顆粒放出の機構そのものに影響を及ぼすサンプルを絞り込んだ。この結果、一次スクリーニングをクリアした 20 種類の抽出液から、さらにこの二次スクリーニングにより 4 種類のサンプルを選出した。また、この中から顆粒放出の抑制効果を示したリョウブの葉の抽出液についてさらに解析を進めた。

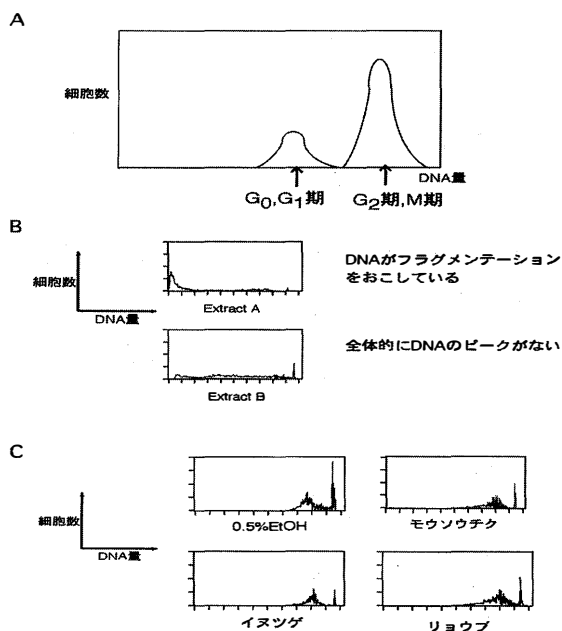


Fig. 2 RBL-2H3 の細胞周期に及ぼす植物抽出液の効果

A: RBL-2H3 の典型的な細胞周期

B: 細胞毒性の強い抽出液を加えたときの例:

C: RBL-2H3 を 24 穴プレート (5.0×10⁵cells/well) に蒔き、10μl のサンプル抽出液を 1000μl の培地中に添加して、37°C、24hr インキュベートした。この後、細胞をトリプシン EDTA でシングルセルサスペンションとし、ポリスチレンチューブに移した。1,000rpm で 5 分間遠心して細胞を回収し、200μl の PBS 中に再懸濁した。これに、リボヌクレアーゼ A を 10μl 加え、37°C で 20 分間インキュベートした。次いで、細胞を 70% EtOH 4ml に一時間、氷冷で固定し、3,000rpm で 5 分間遠心し細胞を回収した。再び 200μl の PBS で再懸濁させた後、Propidium iodide (25μg/ml) を 500μl 加え、5 分間室温で細胞中の DNA をラベルした。処理後の細胞は Flow cytometer で解析した。

顆粒放出抑制効果を示したリョウブ抽出液の作用メカニズムの解析：

リョウブ抽出液で前処理することによって、IgE + 抗原刺激によるマスト細胞の顆粒放出が抑制されることが明らかとなったので、そのメカニズムについて解析を試みた。実験は脱顆粒誘引シグナルの作用機序において重要な位置を占める細胞内シグナル伝達タンパクのチロシンリン酸化に及ぼす影響について検討した。

RBL-2H3 を DNP-BSA で刺激すると、3分をピークとして、主に 75-50kDa のタンパク質のチロシンリン酸化が認められた。このチロシンリン酸化タンパクの出現パターンは、以前より広く報告されているタイムコースと同様である^{14),15)} (Fig.3 レーン 1, 4, 7)。一方、リョウブ抽出液で RBL-2H3 を前処理後に刺激した場合のタンパク質の泳動パターンでは有意なチロシンリン酸化の抑制が認められた。特に DNP 刺激 30 分のデータにおいてレーン 8・9 では対照であるレーン 7 と比べて著明な抑制効果が認められ、バンドはほとんど消失した。

各レーンにおける α Lyn blot ではどのバンドもほぼ同程度のタンパク量を示した。この結果、各レーンにおけるタンパクの量に差がないこと、そして各反応系にはほぼ同量の Lyn タンパクが含まれていたことが確認された。

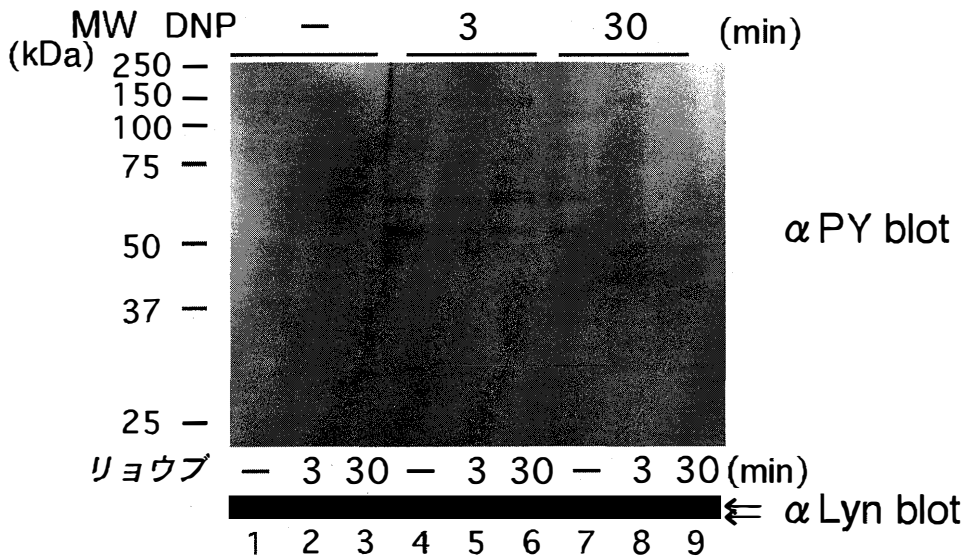


Fig. 3: リョウブ抽出液による細胞内チロシンリン酸化シグナルの抑制：

RBL-2H3 を 1.0×10^6 cells/ml になるように 6cm シャーレに蒔き、 α -DNP IgE ($0.45 \mu\text{g/ml}$) を加えて 37°C で 24hr インキュベートした。この後、培地を除き、 $1000 \mu\text{l}$ の siraganian buffer を加え、次に $10 \mu\text{l}$ のリョウブ抽出液を添加、0 (抽出液なし)、3、30 分間 37°C でインキュベートした。この後 DNP-BSA を最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ になるように加えて 37°C で 0、3、30 分間刺激した。刺激後上清を除いて TNE $200 \mu\text{l}$ で細胞を溶解した上清を各レーンにアプライして SDS-PAGE と Western blot で解析を行った。

Lyn のリン酸化に及ぼすリョウブ抽出液の効果

RBL-2H3 の total cell lysate を用いた実験では、リョウブ抽出液添加により、FcεRI 刺激で誘導される細胞内タンパクチロシンリン酸化の抑制がみられた。このメカニズムを解明するため、細胞内チロシンリン酸化シグナルシステムにおいて最も上流に位置するとされている酵素である src-family protein tyrosine kinase の Lyn に注目し、Lyn のリン酸化に及ぼすリョウブ抽出液の効果を検討した。

RBL-2H3 の total cell lysate を αLyn-protein G-Sepharose を用いて免疫沈降¹⁶⁾後、SDS-PAGE とウェスタンブロットリングで解析し、densitometry でバンドの濃度を計測した。この結果、リョウブ抽出液が total Lyn のチロシンリン酸化を抑制することが明らかとなった。抑制は、抗原刺激 30 分の実験条件において特に顕著であり、リョウブエキス前処理 3min 及び 30min でほぼコントロールレベルまでリン酸化は低下した。また、抗 phospho(PY)-Lyn 抗体を用いたプロットの結果では、Lyn の C 末端に位置するネガティブ制御チロシン残基のチロシンリン酸化は、抗原刺激時にリン酸化レベルがあがっており、リョウブ抽出液添加時には上昇したリン酸化レベルが抑制されているのが認められた。αLyn blot は各レーンにおける Lyn タンパクの量に差がないことを示している。

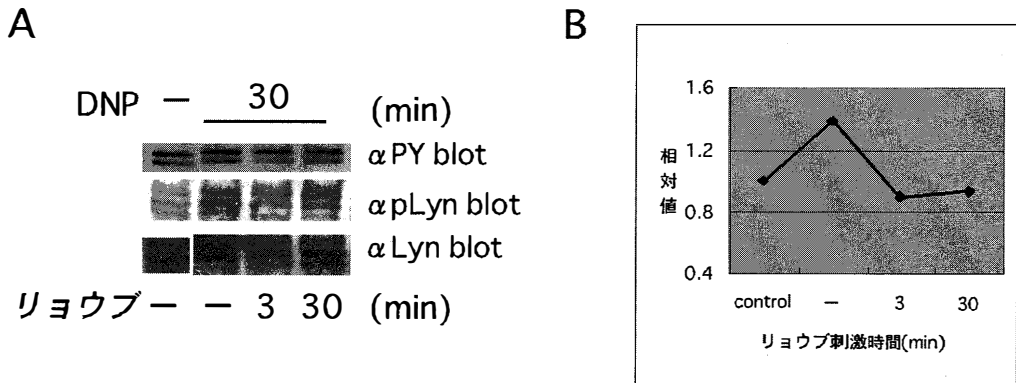


Fig. 4: リョウブ抽出液による Lyn タンパクチロシンリン酸化の抑制 :

A :RBL-2H3 を 1.0×10^6 cells/ml に α-DNP IgE (0.45 μg/ml) を加え、6cm シャーレに蒔いて 37°C で 24hr インキュベートした後、培地を除き、1000 μl の siraganian buffer を加え、次に 10 μl のリョウブ抽出液を添加、0 (抽出液なし)、3、30 分間 37°C でプレインキュベートした。続いて 0、3、30 分間抗原刺激した。刺激細胞を可溶化し、total cell lysate とした。Total cell lysate より、抗 Lyn 抗体で免疫沈降した Lyn を SDS-PAGE で展開し、αPY blot、αpLyn (C 末端 phospho tyrosine specific) blot、αLyn blot を行った。B:A で得られたチロシンリン酸化バンドの濃度を densitometry を用いて測定し、グラフに表した。

リョウブ抽出液前処理による抗原刺激時のプロテオームパターン比較解析

これまでの実験より RBL-2H3 のリョウブ抽出液がもたらす顆粒放出抑制効果のメカニズムに関して、チロシンリン酸化シグナル伝達上流の Lyn が標的分子である可能性を示唆する結果が得られたが、さらに、リョウ

ブ抽出液が細胞内シグナルにもたらす別の効果を検討する目的でプロテオーム解析の手法を適用し、総タンパク質の網羅的解析を試みた。

リョウブ抽出液処理-、抗原刺激-、IgE 感作/未感作の2つのパターンとリョウブ抽出液処理+、抗原刺激+の総タンパクの二次元電気泳動パターンにはほとんど変化が認められなかったが、リョウブ抽出液処理-、抗原刺激+のごく限られた一部のタンパクスポットに違いが認められた。特に、pI 10、MW 約 25kDa タンパクのスポット変化が顕著であった。

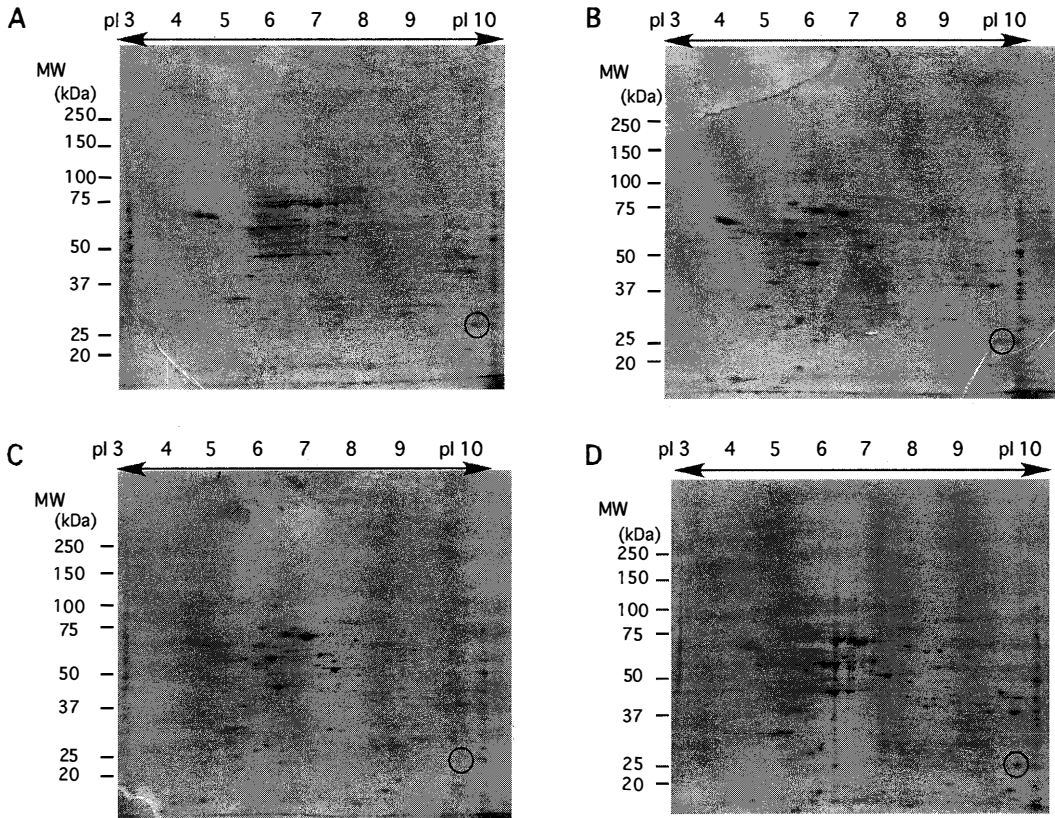


Fig. 5: リョウブ抽出液処理による総タンパク発現パターン :

A から D の各パネルは、実験条件における刺激条件の違いを示す。A: リョウブ抽出液処理なし・IgE および抗原刺激なし B: リョウブ抽出液処理なし・IgE 感作のみ C: リョウブ抽出液処理なし・IgE 感作および抗原刺激有り D: リョウブ抽出液処理有り・IgE 感作・抗原刺激共に有り。実験条件は次の通りである。1.0×10⁶cells/ml の RBL-2H3 細胞を 6cm シャーレに蒔き、α-DNP IgE(0.45 μg/ml) を添加あるいは無添加で、24hr インキュベートした。培地を除去後、1000 μl の siraganian buffer を加え、次に 10 μl のリョウブ抽出液を添加もしくは無添加条件で、37℃、10 分間インキュベートした。この後 DNP-BSA を 10 μg/ml (最終濃度) 加えて 10 分間刺激もしくは無刺激した。次いで上清を除き二次元電気泳動用 Lysis buffer 100 μl を加えて細胞を可溶化した。細胞溶解液は遠心して上清を二次元電気泳動用 Sample とし、二次元電気泳動で展開した。ゲルは CBB で染色し、ゲルをゲルドライヤーで乾燥した後、画像解析を行った。

5. 考察

天然物は、未知なる薬理作用を持つ物質の宝庫である。人類が今日に至る進化の過程における、様々な生物との膨大な相互作用の繰り返しを想起するならば、天然物中に免疫制御物質が数多く含まれるであろうと想定されるのは当然の帰結である。我々は、これら新規成分の可能性を検証すべく 300 種類に及ぶ植物抽出液を材料として、*in vitro* のマスト細胞活性化に及ぼす天然物抽出液の効果を検討した。

実験に用いた RBL-2H3 細胞の由来は、ラットの好塩基性白血球由来細胞であるが、マスト細胞様の性質を有し、IgE を介した抗原刺激で誘導される Fc ϵ RI dependent の顆粒放出の実験に広く用いられている。本研究では、第 1 にこの RBL-2H3 細胞の顆粒放出を抑制または増強する物質の検索を行った。天然物エキスの抽出はエタノール抽出法で行ったものを用いた。

最終的な臨床応用を想定すれば、経口投与の場合は水抽出による水溶性成分を探索する戦略も考えられる。しかし、マスト細胞の顆粒放出は組織の局所で進行する。したがって、アトピー性皮膚炎等に対する抗アレルギー薬のデザインを想定するならば、局所塗布で浸透性の高い脂溶性分を探索する戦略が有利であるかもしれない。

天然植物エタノール抽出サンプル・ライブラリーとして、49 科 123 種を原材料とする 300 種類の植物抽出液について調べた。300 種類のサンプルの前処理により、RBL-2H3 細胞刺激後で放出される β -Hexosaminidase の測定値に及ぼす影響を調べた。この結果、各サンプルは、様々なマグニチュードをもって RBL-2H3 細胞の顆粒放出に影響したが、測定データ解析より、各サンプルを三つのカテゴリーに分類した。すなわち、顆粒放出量を増大させたもの (Group A)、有意な変化を確認できないもの (Group B)、減少させたもの (Group C) である。

Group A に分類されたサンプル群は、単純に考えれば顆粒放出を増悪させたと考えられる。しかし、抽出液成分が顆粒放出を誘導するシグナル伝達を増幅した可能性とは別に、単にマスト細胞中に貯蔵された顆粒 (β -Hexosaminidase) を細胞膜破壊により、直接放出させた可能性がある。また、 β -Hexosaminidase の測定系で直接的に呈色反応に影響を与えることで見かけの吸光度をあげた可能性も考えられる。実際、用いたサンプルの中にはサンプルの単独添加により、測定バッファーの透明度に強く影響するものもあった。このような様々な実験系への本質的でない効果を廃除することが、今回のような研究では非常に重要である。

Group B に分類されたサンプル群は、顆粒放出にあまり影響していないと考えられる。

Group C に分類されたサンプル群は、抗アレルギー薬としての可能性を持つサンプル群である。顆粒放出量が無刺激状態の RBL-2H3 細胞の測定系上清よりも、むしろ減少させる測定結果を示した。このサンプル群には、顆粒放出誘導シグナルを抑制する物質が含まれる可能性もある。しかし、見かけ上、顆粒放出を抑制する要因として、非生理的に細胞膜を固定することにより物理的に顆粒放出が抑制された可能性もある。また、サンプルはこの実験系では、RBL-2H3 細胞刺激の前処理の段階から顆粒放出測定対象である β -Hexosaminidase の活性抑制または抗原 DNP-BSA 自体に影響している可能性も考えられる。

以上のような様々な可能性に鑑み、一次スクリーニングのデータ解析より、Group A、Group B より各 6 種類、Group C より 8 種類、計 20 種類の抽出液を選出し、二次スクリーニングを行った。

二次スクリーニングでは、先に述べた一次スクリーニングにおけるサイドエフェクトを検証した。実験は、

単に細胞毒性のみでなく、同時に細胞周期に与える影響を調べるため、PI で二重鎖 DNA を染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を調べた (Fig. 2)。Fig. 2 パネル B に示したサンプルでは PI 染色プロファイルのピークが左にシフト・もしくは明確なピークが認められない。このパターンは、これらの細胞で、もはや通常の長さの DNA 二重鎖が認められないことを示すものであり、DNA の断片化が生じたと考えられる。そのような細胞毒性の強い抽出液をリストから除外することにより、20 種類の抽出液から 4 種類選んだ。これらのサンプルでは、Fig. 2 パネル C に示したように通常の培養で RBL-2H3 に認められる典型的な細胞周期の PI 染色パターンが確認された。

このように、細胞毒性を示すことなく顆粒放出に影響を与えたサンプルの内、特に抑制効果が顕著であったリョウブの抽出液について、その作用メカニズムについて解析を進めた。

現在までに、リョウブに関して免疫制御作用に関する薬効の報告は全く見あたらない。わずかに、情報として、リョウブはわが国の山地に広く分布する落葉樹で若芽は救荒植物として食用に供せられ、また腹中の虫を除去するという記載があるのみである¹⁷⁾。また、現在、リョウブに含まれる成分はいくつか同定されており、リョウブの葉に含まれる成分として、barbinervic acid と rotundic acid と clethric acid という triterpene acid が同定されている^{18), 19)}が、これらもまた、各々の成分が、人体に対する影響についてのほとんど知られていない状態である

リョウブ抽出液の作用機構の解析ターゲットとして、脱顆粒の作用機序で重要な位置を占める細胞内チロシンリン酸化シグナルへの影響を調べた。RBL-2H3 を抗原 DNP-BSA で刺激すると、3分をピークに 75-50kDa のところにチロシンリン酸化タンパクが出現することが確認された^{14), 15)}。この系にリョウブ抽出液を加えたところ、チロシンリン酸化が抑えられているのが認められた (Fig. 3)。特に抗原刺激 30 分の時点では、誘導されるタンパク質チロシンリン酸化の差が顕著に現れた (Fig. 3 レーン 7-9)。この結果は、この実験に用いた条件では、リョウブ抽出液は強い抗原刺激もしくは刺激直後のリン酸化シグナルについては十分な抑制効果を発現することができなかったことを示している。しかし、チロシンリン酸化シグナルのピーク以降では顕著にシグナル抑制効果を示したことから、今後、実験に用いるリョウブ抽出液の量と前処理時間を検討することにより、さらに有効なチロシンリン酸化シグナル抑制条件が導き出せるものと考えられる。

さらに詳細に、チロシンリン酸化シグナル伝達システムにおけるリョウブ抽出液の作用点を調べるため、src-family protein tyrosine kinase の Lyn への影響を調べた。今回用いた RBL 2H3 の顆粒放出の機構は、高親和性 IgE レセプターである Fc ϵ RI より発することが報告されている^{1), 2), 3), 20), 21)}。Fc ϵ RI は細胞外ドメイン内に免疫グロブリン相同ドメインを 2 個もち、IgE の Fc ϵ 鎖を特異的に結合する α 鎖、情報伝達に関わる β 鎖、S-S 結合によって 2 量体を形成している γ 鎖の 3 種類、4 個のサブユニットで構成されている。この Fc ϵ RI 自体は酵素活性を持たないが架橋刺激後速やかに β 鎖と γ 鎖を含む細胞内の一連のタンパク質がチロシンリン酸化される。これは、Fc ϵ RI と細胞内の src-family protein tyrosine kinase (SFK) によって誘導されるものである。このように SFK は Fc ϵ RI シグナルのほぼ最上流に位置しているため、リョウブ抽出液の標的としての第一候補と考えられた。ヒトおよびマウス由来の骨髓由来培養マスト細胞では、SFK として少なくとも Lyn, Fyn, c-Src, Hck なども発現している。しかし、一般にマスト細胞では Lyn の発現レベルが最も高い。今回用いた RBL-2H3 細胞においても高レベルの Lyn が発現しており、かつ、Fc ϵ RI β 鎖と会合し

て存在すると報告されている³⁾。また、IgE受容体架橋刺激によってFcεRIに会合するLynは増加し、酵素活性も上昇することが広く認められている。そこで、Fig. 4に示すように、Lynを免疫沈降してそのリン酸化程度をリョウブ抽出液による前処理有り無しで比較を行うと、リョウブ抽出液処理で明らかなリン酸化の抑制が認められた。

Lynを含むSFKは、共通構造として、SH3(Src homology 3)、SH2、キナーゼドメインが直列に配列しており、C末端には負の制御に関わるチロシン残基が、キナーゼドメイン内には正に活性を制御する存在するチロシン残基が存在することが明らかになっており、活性化に伴い、トータルのチロシンリン酸化が亢進することが知られている。Fig. 4で得られた結果は、リョウブ抽出液が直接Lynの酵素活性を抑制したか、Lynの制御システムに作用して、Lyn活性の正の制御部位であるキナーゼドメイン中のチロシン残基のリン酸化が抑制されたこと、もしくはこの部位の脱リン酸化が亢進したことを示すと考えられる。この仮説は、Fig. 4に示したLynのC末チロシンのリン酸化時に特異的にこれと結合する抗体を用いたプロット結果が、リョウブ抽出液処理による影響をほとんど受けていないことから支持される。

今後、リョウブ抽出液とLynを*in vitro*で反応させてLynの*in vitro*キナーゼアッセイを行って、リョウブ抽出液のLynに対する直接効果を確認する必要がある。しかし、リョウブ抽出液がSFKの活性制御に影響しているとすれば大変興味深い。例えば、Lynは、刺激以前の状態ではCskに負の制御チロシンはリン酸化されて不活性状態にあることから、リョウブ抽出液がCskに作用する可能性もある。また、SFKはチロシン脱リン酸化酵素(PTP)であるCD45によって脱リン酸化されて活性化、あるいは不活性化されることも報告されている^{22), 23)}。また、マスト細胞系の細胞に局限して発現しているとされるPTPεも脱顆粒反応のシグナルに関与していることが近年明らかとされており²⁴⁾、リョウブ抽出液がこれらPTPの活性制御を介して作用している可能性もあり、興味深いところである。さらに、マスト細胞のIgE受容体シグナルは細胞膜上のラフトと呼ばれる有機的な構造体を起点として発する証拠も集積しており、リョウブ抽出液の作用点はラフト会合にあるかもしれない。

以上のシグナル伝達機構の観点からとは別の観点からの解析として、リョウブ抽出液が網羅的なタンパク発現にどのように影響するかを解析した。今回の結果は、まだ十分とは言えないが、この解析手法は、先のシグナル制御の結果と複合的に解析することで脱顆粒誘導機構の詳細な解明に有効であると考えられる。今回の結果では、主なタンパクの発現にリョウブ抽出液前処理による変化は認められなかった。しかし、いくつかのスポットについては変化があり、例えば、抗原刺激(+)、リョウブ添加(-)のsampleではpI 10、MWが約25kDaのタンパクに違いがみられた。このスポットに変化が認められた刺激条件は抗原による顆粒放出を誘導している条件である。したがって、顆粒放出誘導時にこのタンパクが発現しないことが何らかの意味を持つという可能性がある。

リョウブ抽出液処理で、ほとんどのスポットに変化がないという結果は、この処理がRBL2H3の細胞周期にほとんど影響を与えなかったことから予想される結果であり、一方、変化が少数のスポットに局限されたことは、これらスポットのタンパク質がより深く顆粒放出に関与することを示唆している。今後、これらスポットの解析により新たなアレルギー発症機構の解析に役立つ可能性は高いと考えられる。

これまでに天然物の抗アレルギー作用に関する報告は数多くされたが、本研究のように細胞内チロシンリン酸化に着目したものはほとんどない。抗アレルギー作用をもつ物質の細胞内チロシンリン酸化に与える影響を解明していくことは、現在既に使用されている薬物の作用機構を考える上で非常に重要な意味を持つと思われる。

謝 辞

本研究に用いた研究試薬の一部を分与していただいた富山大学大学院医学薬学研究部免疫学教室の村口篤教授ならびに FACS 解析技術を指導いただいた同教室員の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

1. Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv Immunol.* 2000. 76:325-55.
2. Galli SJ, Grimaldeston M and Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Reviews* 2008. 8:478-48
3. Wilson BS, Pfeiffer JR, Oliver JM. FcepsilonRI signaling observed from the inside of the mast cell membrane. *Mol Immunol.* 2002 38(16-18):1259-68.
4. Lusková P, Dráber P. Modulation of the Fcepsilon receptor I signaling by tyrosine kinase inhibitors: search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases. *Curr PharmDes.* 2004. 10(15):1727-37.
5. Jeong HJ, Koo HN, Na HJ, Kim MS, Hong SH, Eom JW, Kim KS, Shin TY, and Kim HM. Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by Aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells. *Cytokine.* 2002. 18(5): 252-9.
6. Matsuda H, Morikawa T, Tao J, Ueda K, and Yoshikawa M. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. VII. Inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells and absolute stereostructures of three new diarylheptanoid glycosides from the bark of *Myrica rubra*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2002. 50(2): 208-15.
7. Ryu SY, Oak MH, and Kim KM. Yomogin inhibits the degranulation of mast cells and the production of the nitric oxide in activated RAW 264.7 cells. *Planta Med.* 2000. 66(2): 171-3.
8. Saeko Aketani, Reiko Teshima, Yoshio Umezawa and Jun-ichi Sawada. Correlation between cytosolic calcium concentration and degranulation in RBL-2H3 cells in the presence of various concentrations of antigen-specific IgEs. *Immunology Letters.* 2001. 15; 75(3): 185-9.
9. Akasaka R, Teshima R, Kitajima S, Momma J, Inoue T, Kurokawa Y, Ikebuchi H, and Sawada J. Effects of hydroquinone-type and phenolic antioxidants on calcium signals and degranulation of RBL-2H3 cells. *Biochem Pharmacol.* 1996. 14; 51(11): 1513-9.
10. Takagi K, Nakamura R, Teshima R and Sawada J. Application of human Fc epsilon RI alpha-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol Pharm Bull.* 2003. 26(2): 252-5.
11. Kitani S, Teshima R, Morita Y, Ito K, Matsuda Y, and Nonomura Y. Inhibition of IgE-mediated histamine release by myosin light

- chain kinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992. 183(1): 48-54.
12. Abramson J, and Pecht I. Clustering the mast cell function-associated antigen (MAFA) leads to tyrosine phosphorylation of p62 Dok and SHIP and affects RBL-2H3 cell cycle. *Immunol Lett*. 2002. 82(1-2): 23-8.
13. Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*. 2008 Mar;44(3):235-40.
14. Eiseman E, and Bolen JB. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature*. 1992. 355(6355): 78-80.
15. Paolini R, Jouvin MH, and Kinet JP. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature*. 1991. 353(6347): 855-8.
16. Kawakami Y, Kitaura J, Kawakami T. Techniques to study Fc epsilonRI signaling. *Methods Mol Biol*. 2006;315:175-89.
17. Yoshihisa Tanabe, Tatsuo Oda, and Kotaro Takahashi. Studies on Constituents of Medical Plants. VII. The Constituents of the Bark and Fruit of *Clethra barbinervis* Sieb. *Et Zucc. Yakugaku zasshi*. 1966. 86(5) 441~443
18. Takahashi K and Takani M. Studies on constituents of medicinal plants. XXI. Constituents of the leaves of *Clethra barbinervis* Sieb. et Zucc. (2) and the ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 19 α -Hydroxyurs-12-en-28-oic Acid Type of Triterpenoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1978. 26(9): 2689-93.
19. Takani M, Kubota K, Nozawa M, Ushiki T and Takahashi K. Studies on constituents of medicinal plants. XVIII. Constituents of the leaves of *Clethra barbinervis* Sieb. et Zucc. (1). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1977. 25(5): 981-5.
20. Paolini R, Molfetta R, Beitz LO, Zhang J, Scharenberg AM, Piccoli M, Frati L, Siraganian R, and Santoni A. Activation of Syk tyrosine kinase is required for c-Cbl-mediated ubiquitination of Fcepsilon RI and Syk in RBL cells. *J Biol Chem*. 2002. 277(40): 36940-7.
21. Michael G Tomlinson, Joseph Lin and Artur Weiss. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. *Immunology today*. 2000. 21:584-591.
22. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Arimura Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K & Yakura H. CD45 negatively regulates Lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol*. 1999. 163: 1321-1326
23. Shrivastava P, Katagiri T, Ogimoto M, Mizuno K & Yakura H. Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells. *Blood*. 2004. 03(4):1425-32.
24. Akimoto M, Mishra K, Lim KT, Tani N, Hisanaga SI, Katagiri T, Elson A, Mizuno K, Yakura H. Protein tyrosine phosphatase epsilon is a negative regulator of FcepsilonRI-mediated mast cell responses. *Scand J Immunol*. 2009. 69(5):401-11