HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海綿由来タンパク質ThCから視る糖鎖を介したトロンボポエチン受容体活性化機構
Author(s)	辺, 浩美
Citation	北海道大学. 博士(水産科学) 甲第14761号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k14761
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/88268
Type	theses (doctoral)
File Information	Hiromi_Watari.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

海綿由来タンパク質 ThC から視る糖鎖を介した トロンボポエチン受容体活性化機構

（Structural and physiological insights of sugar mediated activation of thrombopoietin receptor by marine sponge-derived lectin ThC）

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences
Division of Marine Life Science

辺　浩美
Hiromi Watari

2022 年

目次

謝辞.....1

序論.....3

ヒト血球の分化.....5

血球増多剤の開発と現状.....8

海洋天然物からの造血サイトカイン様物質の探索.....17

海洋生物抽出物からの血球増多剤の探索.....19

結果・考察.....23

1 章　ThC の性質と構造.....23

1 節　ThC の性質と分離精製.....23

2 節　ThC の一次構造.....28

3 節　X 線結晶構造解析.....32

2 章　ThC の MPL アゴニストとしての活性化メカニズム.....44

1 節　MPL の特異的アゴニスト.....44

2 節　単糖による ThC の活性への影響.....47

3 節　各種レクチンによる活性.....49

4 節　阻害剤を用いた ThC の活性評価.....52

5 節　MPL 糖鎖欠損変異体を用いた ThC の活性評価.....55

6 節　シグナルの持続時間と細胞表面受容体の発現量 58

7 節　PA-IIL による MPL 活性化.....61

8 節 MPL アゴニストの相乗効果 67

総合考察 75

骨髄増殖性腫瘍 CALR mutant との比較 75

各種 MPL アゴニストによる下流シグナル、細胞分化の違い 78

なぜ海綿に MPL アゴニストが含まれているのか.....83

材料と方法.....88

参考文献 95

謝辞

はじめに、これまで私の自由な選択を尊重し、応援してくれた両親に深く感謝します。本当にありがとうございました。

本論文の作成にあたり、X 線結晶構造解析を行っていただきましたは東北大学大学院生命科学研究科 田中良和教授、影山大夢さん、小野寺かこさん、Northwestern 大学 Douglas M. Freymann 教授深謝いたします。また、各種レクチンの発現実験は田中良和教授のグループに実施していただきました。順天堂大学大学院医学研究科 荒木真理人教授、増渕菜弥助教、小松則夫教授には CALR に関する指導をいただき、多くの知見とご意見をいただきました。イムノブロット・細胞表面 MPL 量の変化の実験は増渕助教に実施していただきました。また、UT-7/TPO、EPO 細胞を供与いただきました。北里大学理学部 松井崇講師には天然 ThC の 25 番目のアミノ酸残基の決定を LC-MS/MS を用いて行っていただきました。広島大学大学院統合生命科学研究科 平山真講師、堀貫治教授に hypnin を供与いただきました。岐阜大学糖鎖生命コア研究所 木塚康彦准教授に 6-alkynyl-fucose を供与いただきました。琉球大学熱帯生物圏研究センター 伊勢優史博士に *Corticium* sp.海綿の同定を行っていただきました。日産化学株式会社 中村隆典博士には Ba/F3、Ba/F3-HuMpl、Ba/F3-HuEPOR、Ba/F3-HuGCSFR 細胞を供与いただきました。

また、研究を遂行するにあたり、日本学術振興会に特別研究員-DC 2 として研究費を、株式会社池田理化による第 44 回リバネス研究費 池田理化再生医療研究奨励賞をいただきました。

日本学術振興会に特別研究員-DC２として研究奨励金を、公益財団法人帝人奨学会による帝人久村奨学金を、公益財団法人 サントリー生命科学財団 SUNBOR SCHOLARSHIPをいただき、金銭的な心配をせずに博士課程を過ごすことができました。

本論文は北海道大学大学院水産科学研究院　細川雅史教授、澤辺智雄教授、藤田雅紀准教授に査読していただき、貴重なご意見をいただきました。

皆様のご協力無くしては、本研究は成し遂げることができませんでした。深く感謝いたします。ありがとうございました。

最後に、北海道大学大学院水産科学研究院 酒井隆一教授は、私の指導教員としてこれまで６年間にわたり、たくさんのご指導をいただきました。非常に有意義で楽しい学生生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

2022 年 1 月 11 日　辺浩美

序論

海洋生物に含まれる生理活性物質というと、まず初めにフグ毒として知られる“テトロドトキシン”を思い浮かべる人が多いだろう。他にも食中毒の原因として知られる、サキシトキシン、シガトキシン、パリトキシンなどが挙げられる。これらを生産する有毒渦鞭毛藻などを摂取した魚類や貝類が毒素を体内に蓄積し有毒化することにより、私たちが食べた際に間接的に毒性が発揮される。一方で、毒を持つ海洋生物はクラゲやイソギンチャク、ウミヘビ、オコゼなども有名で海水浴場では、よくこれらの生物に対する注意の看板を目にする。食中毒とは異なり、これらは刺胞や毒棘などを通して直接相手に毒素を送る刺毒・咬毒と呼ばれている。食中毒原因毒素と刺毒・咬毒は毒性の発揮法以外にも大きな相違点がある。前者は主に低分子毒素であり、食物からの摂取で代謝されずに体内に蓄積される。興味深いことに、後者の刺毒・咬毒は多くの場合、ペプチドもしくはタンパク質毒である。代表的なものとしてイモガイのコノトキシンはシステインノットという特有の構造を持つ強力なペプチド神経毒として知られるが、2004 年には ω-conotoxin が非オピオイド系重度慢性疼痛治療薬「Prialt®」として FDA に承認されている(*1*)。

海洋に住む生物がどのように低分子毒とタンパク質毒を使い分けているかは不明だが、これまでの傾向として刺毒・咬毒に多いタンパク質毒は敵から身を守る、もしくは餌を取るという目に見えて分かりやすい結果が出ているのに対し、低分子毒は“毒”として生産されているのか、もしくは海洋生物の中で何か他の生理活性を担っているのか、その目的が不明である場合が多い。現に、トラフグではテトロドトキシンを体表ではなく、主に肝臓や生殖器に蓄積しており、捕食者がテトロドトキシンの作用を受けるころにはフグはすでに死んでいるだろうと言われている。

このように強い毒性を発揮する海洋天然物は古くから盛んに研究され、その成果として医薬品へと変貌を遂げたものもある。一方で、毒性以外の生理活性を示す化合物は探索が難

しく、発見されにくいため報告例も比較的少ない。その中で特にペプチド・タンパク質に焦点を当てた例を挙げる。ハタゴイソギンチャクから得られたサワガニに対して強い麻痺性を示すペプチド gigantoxin 類のアミノ酸配列を解析したところ、gigantoxin I にヒト Epidermal Growth Factor （EGF）と 30%程度の高い配列相同性が見られた。EGF とは上皮成長因子とも呼ばれる、分子内に 3 組のジスルフィド結合を持つアミノ酸 53 残基のペプチドである。EGF 受容体は一回膜貫通型で受容体 1 分子に対し EGF1 分子が結合し、EGF-受容体複合体が 2 量体化することで、受容体が相互にリン酸化され下流へのシグナルが入り、細胞の増殖が起こる。Gigantoxin I でも同様に、 EGF 受容体を高発現している細胞に添加すると、EGF 受容体のリン酸化が確認され、その活性は生理的アゴニストに比べると弱いながらも EGF 受容体のアゴニストとして働くことが報告されている(*2*)。

また、marine ball sponge とも称される *Cinachyrella* 属由来のガレクチン CchGs は哺乳動物のイオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA、カイニン酸型受容体に結合することが 2013 年に報告されている(*3*)。ガレクチンとはレクチンのファミリーの 1 種で 「β ガラクトシドに対する特異性を持つ動物レクチンで、進化的に保存されたアミノ酸配列を持つもの」と定義されており、CchGs はラクトースと強い結合性を示す。CchGs がポジティブアロステリックモジュレーター（PAM）として AMPA（2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid)、カイニン酸型受容体と相互作用することが示された(*4*)。また、マメ科由来のレクチン、コンカナバリン A (ConA)は以前からカイニン酸受容体の活性化状態を持続(脱感作抑制)させることが知られており、このような機能を持つ内因性の調節因子の存在が推察されていたが、CchGs の発見により初めて動物性ガレクチンがこのような活性を持つことが示された(*4*)。

このように海洋生物に含まれる生理活性タンパク質の中には毒性を持つもの以外にも、ヒト受容体にアゴニストとして作用するものや、その作用を調節するものなどユニークな

活性を持つものが見出されている。しかし、イソギンチャクに EGF 受容体、海綿にカイニン酸受容体が存在するといった報告は無く、これらの由来生物の中でその特異的リガンドがどのような生理機能を持つのかは不明である。しかし、テトロドトキシンの例のように強い生理作用を持つ天然のリガンドが未知の生理機能の発見や機構解明に寄与した例は枚挙にいとまがない。

本研究では“海洋生物に含まれる新しいヒト血球増多剤の探索”を目的にスクリーニングを行い、その結果としてユニークな活性を示す新規タンパク質 ThC を見出した。ThC はこれまでとは全く異なる機構でサイトカイン受容体を活性化することが明らかとなった。さらに、ThC という分子を用いることで、未だ明らかとなっていない受容体の細胞表面における挙動の一端をつかむことができたのでここに報告する。

ヒト血球の分化

ヒトの血液は血漿と血球に大別される。血漿成分は水が 90%、その他 10%はアルブミン、グロブリン、血液凝固因子などのタンパク質成分と無機塩、糖質などを含む。血球は主に赤血球、白血球、血小板などの細胞から成る。すべての血球は造血幹細胞（Hematopoietic Stem Cell: HSC）に由来し、HSC に各種のサイトカインが作用することによって血球の分化・増殖が起こる（Figure 1）。HSC は主に骨髄に存在し、分化していく一方で自らを複製する自己増殖も行う。HSC は主に赤血球や血小板へと分化していく骨髄前駆細胞と白血球へと分化していくリンパ系前駆細胞に分かれ、次第に細胞の分化の方向が運命付けられてゆく。1 種類の血球に分化するために必要なサイトカインは 1 種ではなく、細胞の分化段階に応じて何種類ものサイトカインが複雑に関与しており、その詳細な機構はいまだ不明な点が多く、血球減少症や増多症などの疾患を理解するためにも研究が求められている分野である。ここでは造血因子として代表的なサイトカインに絞り述べる。

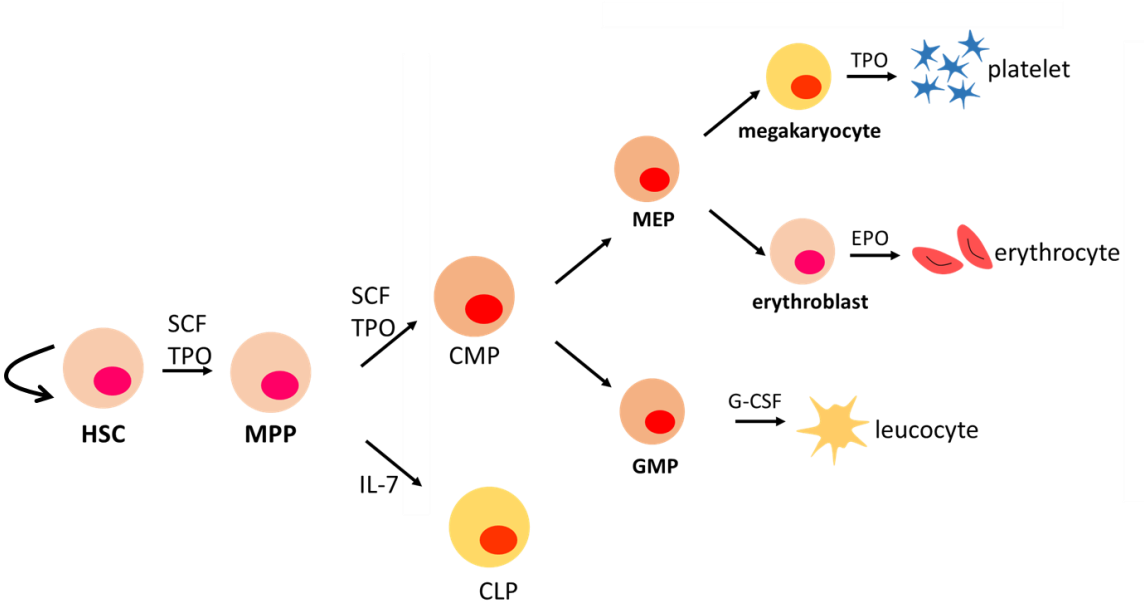


Figure 1. Blood cell differentiation and cytokines

All blood cells are derived from Hematopoietic Stem Cells (HSCs) and differentiate into various types of blood cells. During this process, different cytokines are involved in directing the differentiation. MPP: multipotent progenitor, CMP: common myeloid progenitor, CLP: common lymphoid progenitor, MEP: megakaryocyte-erythrocyte progenitor, GMP: granulocyte-macrophage progenitor, SCF: stem cell factor, TPO: thrombopoietin, IL-7: interloikin-7, EPO: erythropoietin, G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor.

1）エリスロポエチン（Erythropoietin: EPO）

EPO は主に赤血球へと分化誘導するサイトカインである。成人では主に腎臓もしくは肝臓で産生され、1 日に 2000 億個の赤血球を生産していると言われている。アミノ酸 165 残基から成り、分子量は糖鎖も含めると約 30,000 程度だが、糖鎖の構造が一定ではないため分子量も一定ではない。分子中の 24、38、83 番目のアスパラギン残基に N-グリカンが付加しており、126 番目のセリンには O 型糖鎖が付加している。これら糖鎖の役割について多くの研究がなされており、N-グリカンを欠損させると活性が損なわれる一方で、O 型糖鎖の存在は EPO の活性に影響を及ぼさないことが報告されている(*5, 6*)。また最近、83 位の糖鎖を 2 分岐型から 3 分岐型へ替えることで活性が大幅に上昇することが報告されてい

る(*7*)。1 分子の EPO が 2 分子の EPO 受容体に結合すると受容体の構造変化が起こり、受容体細胞内ドメインに結合した Janus kinases2 (JAK2)を介した signal transducer and activator of transcription proteins (STAT5)のリン酸化に加え、Ras/ mitogen-activated protein kinase (MAPK)、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ Protein kinase B (Akt)経路の活性化が起こることで、赤血球の生産が促進される(*8*) 。

2）トロンボポエチン（Thrombopoietin: TPO）

TPO は主に肝臓で生産され、血小板へと分化誘導するサイトカインである。長年、その存在が予想されていたが、なかなか発見に至らなかった。TPO 受容体（MPL）はマウス骨髄増殖性白血病ウイルス(murine myeloproliferative leukaemia virus: MPLV）からがん遺伝子として *v-mpl* がクローニングされ、ヒトにも非常に類似した *c-mpl* が存在することが明らかとなった。当時は *c-mpl* の機能は不明であり、オーファン受容体とされたが、システイン残基の保存や WSXWS などの特有のアミノ酸配列から IL-3 受容体や G-CSF 受容体と高い類似性を示すことが明らかとなり、サイトカイン受容体の 1 種であることが推察された(*9*)。そして 1994 年にキリンビール株式会社のグループによって、その存在が発見され(*10*)、これとほぼ同時期に 3 つのグループが独立して TPO の存在を明らかにしている。TPO はアミノ酸 353 残基から成り、N 末端側 154 残基は EPO に類似した配列であり、受容体に結合するため、この配列だけでも TPO の活性は発揮される。一方で C 末端側は類似するタンパク質がなく、高度に糖鎖修飾されている。これは血中での半減期を遅らせるためだと考えられている(*11*)。また、分子内シャペロンとして正しい立体構造をとるためにも重要だという報告もある(*12*)。

3）顆粒球コロニー形成刺激因子（Granulocyte Colony Stimulating Factor: G-CSF）

最も早く発見されたサイトカインの一つであり、主に好中球に分化を誘導する。通常、血漿中で G-CSF は検出できないほど低いレベルで存在するが、感染症などに応じて急速にそのレベルが上昇する(*13*)。また、興味深いことに、通常主に骨髄に存在する HSC が末梢血へ動員されることが明らかとなり、HSC の移植の際にこの作用を用いて、ドナーに G-CSF 製剤を投与、末梢血から HSC を採取する方法が確立されている。

このように様々なサイトカインが造血に関わっており、これらサイトカインやその受容体の恒常性が崩れると、血球の異常減少や増殖が起こる。本研究では特に TPO と TPO 受容体（MPL）に焦点を当てて研究を進めている。以下に、これまでに研究されてきた血球産生に関わる化合物・医薬を紹介する。

血球増多剤の開発と現状

造血サイトカイン様の化合物は、造血系の疾患だけでなく幅広い分野でのニーズがあり、長い間、製薬会社により医薬シーズとなる化合物が探索されてきた。例えば、抗ガン剤を使用すると、ガン細胞だけでなく、正常な細胞も影響を受ける。特に分裂速度の速い血球細胞や、口腔粘膜、胃腸粘膜、毛根細胞などは影響を受けやすい。したがって、抗がん剤投与後の血球細胞の増減は重要な課題である。このような背景でいち早く臨床応用されたのは、遺伝子組み換え技術により製造された EPO および G-CSF であった(*14, 15*)。一方、遺伝子組み換えヒト TPO（rhTPO）やポリエチレングリコール化された TPO 製剤も *in vitro* では血小板を有意に増加させることが確認され、EPO、G-CSF に続き製剤化が試みられた(*14*)。しかし、海外での臨床試験で投与された遺伝子組み換えヒト TPO が抗原となり、その抗体が内因性の TPO まで攻撃することで深刻な血小板減少を引き起こすという事例が報告され、国内でも医薬品としての利用は断念された(*16*) 。一方、中国では rhTPO が化学療法による血小板

減少症の治療薬として 2005 年に、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）に対する医薬品として 2007 年に使用が認可されている。Shenyang Sansheng Pharmaceutical Co., Ltd.が販売を行っている。2020 年での売り上げは 13 億元（約 230 億円）であり、中国国内ではがん患者が過去 10 年で毎年 3.9%ずつ増加しており、rhTPO の需要は今後も伸び続けると見込まれている。

興味深いことに 1996 年、erythropoietin mimetic peptide (EMP)という、EPO との相同性が無いアミノ酸 14 残基のペプチドに EPO 様活性があることが発見された （Figure 2）。(*17, 18*) これに続くように、1997 年、同じくアミノ酸 14 残基の thrombopoietin mimetic peptide が見出された。これも TPO とは相同性が無いため、内因性の TPO に対する抗体が生成する懸念はない。更にこのペプチドを二量体化すると活性が 4,000 倍 になることも示された（Figure 2）(*19*) 。これらのことから、これらペプチドの臨床での応用が期待されたが、体内での半減期が短く、直接医薬として利用されることは叶わなかった。しかし、この thrombopoietin mimetic peptide を利用し、ヒト免疫グロブリンの Fc 領域を結合させたペプチド鎖を 2 つの S-S 結合で二量体化させた遺伝子組み換えタンパク質ロミプロスチムが開発された (Figure 3)。これは peptide と antibody を組み合わせた”peptibody”と呼ばれている。Fc 領域には CH2、CH3 ドメインがあり、生体内 IgG の分解抑制に関わる neonatal Fc receptor（FcRn）受容体(*20*)に結合し細胞内に取り込まれた後、再び血液循環に放出されるため、血中半減期が大幅に伸びる(*21*)。この製剤は主に難治性慢性特発性血小板減少性紫斑症 （ITP）に対する治療薬として 2009 年にアメリカで、2011 年には日本で使用が承認されており、現在では世界 90 の国で利用されている(*22*)。

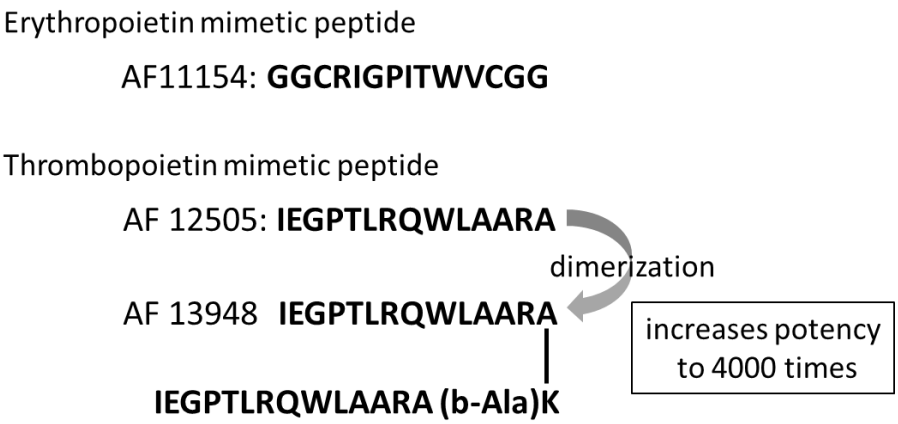


Figure 2. Amino acid sequences of EPO and TPO-mimetic peptides

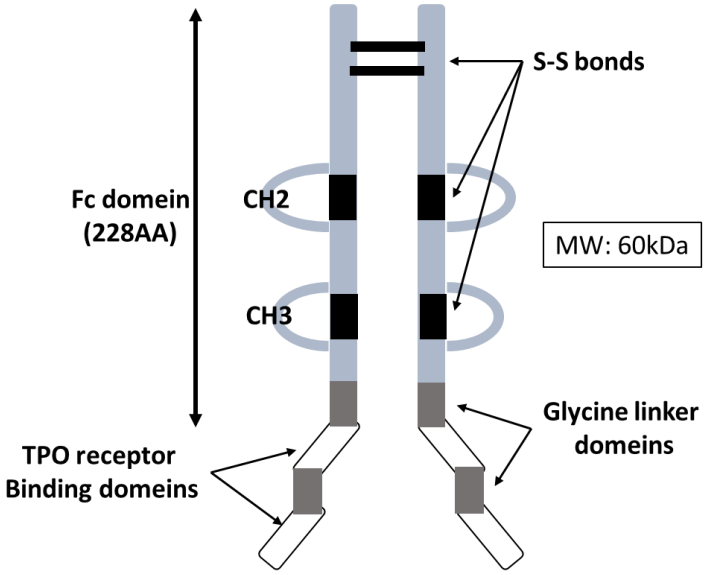


Figure 3. A schematic structure of romiplostim

しかし、これらは全てタンパク質製剤であるため、静脈注射による投与が必要であり、患者への負担が大きい。そこで経口投与が可能な非ペプチド化合物の探索が米国や日本の製薬会社で盛んに行われてきた。しかし、スクリーニングでヒットする化合物はきわめて少な

く、”difficult target”と称され、創薬上挑戦性の高い分野とされてきた。

EPO 様活性を持つ化合物の探索では、EMP と EPO 受容体の複合体 X 線結晶構造解析結果を元に、受容体の活性化に必要なアミノ酸残基に結合するようデザインされた非ペプチド化合物の合成が試みられているが、最大活性が EPO の 15-20%程度に留まるなど、医薬として有望な非ペプチド化合物は未だ見つかっていない (Figure 4) (*23, 24*)。G-CSF 様活性を持つ化合物に関しても、現在までにいくつか見出されているが、マウスに特異的に作用するものや最大活性が G-CSF の 30%に留まること、再現性に乏しいことや細胞毒性を示すことなどから臨床への応用は叶っていない (Figure 5）(*25, 26*)。

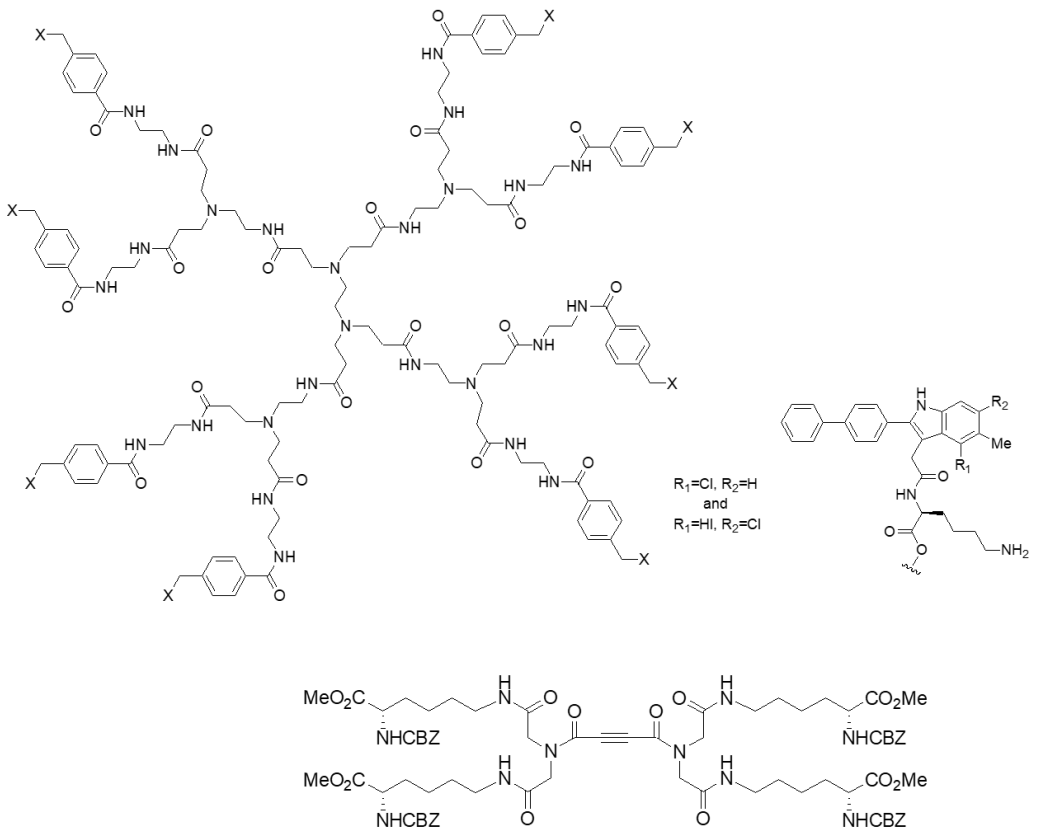


Figure 4. Nonpeptide EPO receptor agonists

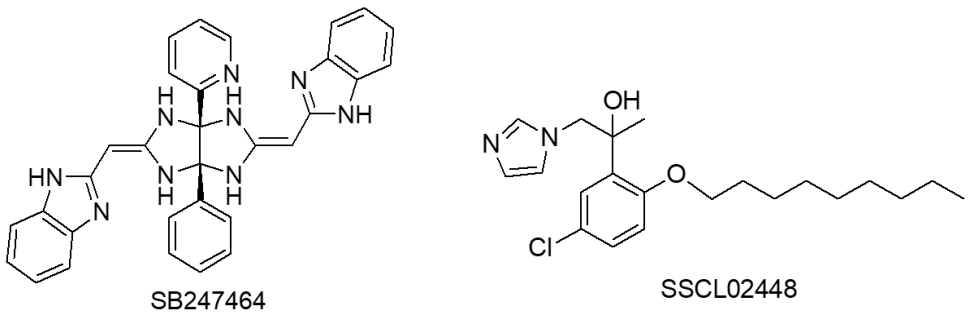


Figure 5. Nonpeptide G-CSF receptor agonists

一方で、TPO 様活性を持つ低分子化合物は現在までに多数見つかっている。1998 年に初めて、TPO 様活性を示す非ペプチド化合物 TM41 が報告された (Figure 6) (*27*)。これは TPO 受容体の TPO 結合部位である細胞外ドメインに結合する。一方で 2001 年、全く新しい作用メカニズムを持つ SB394725 という化合物が報告された (Figure 6) (*28*)。この化合物は受容体細胞外ドメインの TPO 結合部位ではなく、受容体膜貫通ドメインに結合することで活性を発揮する (Figure 7)。TPO 受容体の一次配列は動物種によって少しずつ異なっている。SB394725 は受容体膜貫通ドメインの 499 番目のヒスチジン残基 (H499)にと相互作用することで、受容体を活性化させている。したがって、この H499 を持つ動物種だけに効果があり、ヒトやチンパンジーに活性を示す一方、マウスやウサギには効果が無い (Figure 8)。

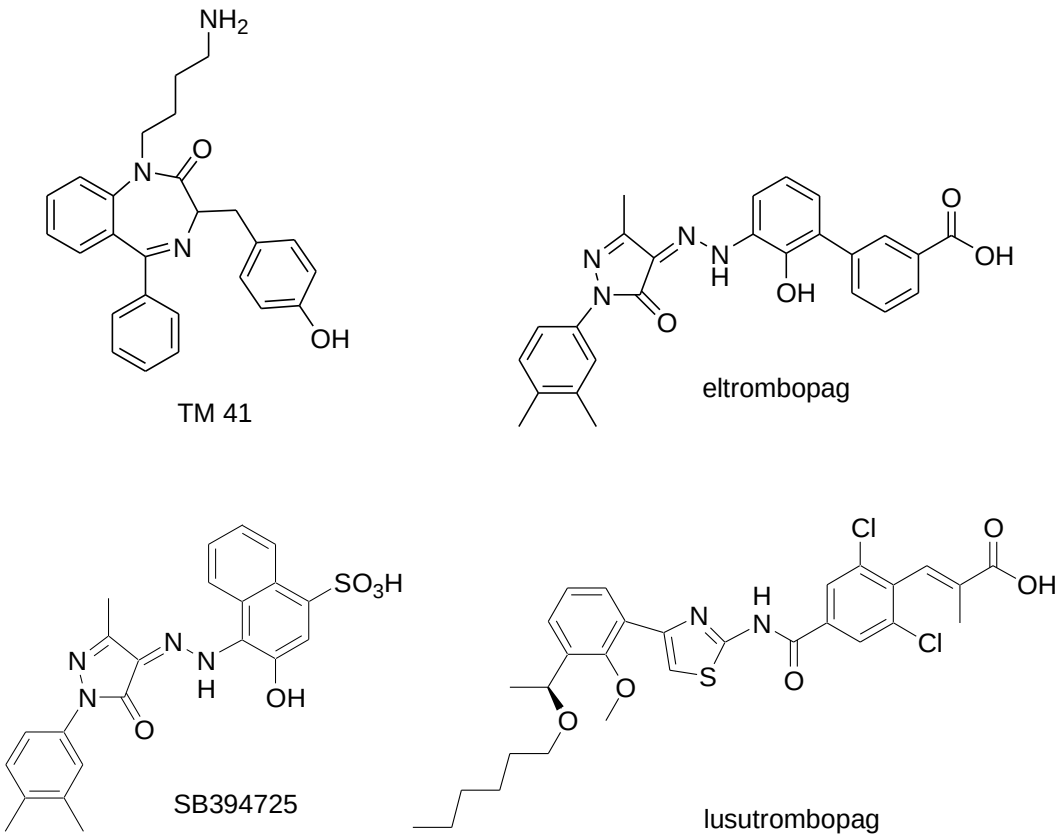


Figure 6. Nonpeptide TPO receptor agonists

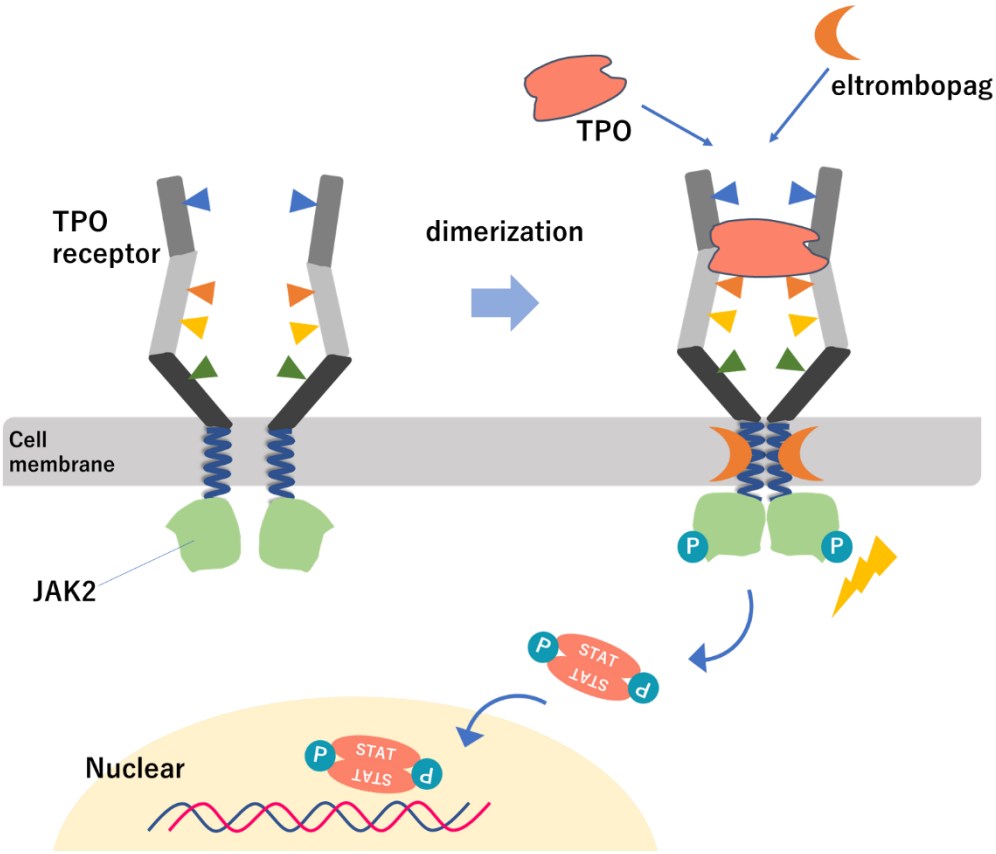


Figure 7. TPO receptor agonists binding domain

There are two types of activation mechanisms known for the TPO receptor (MPL) on the cell surface. The first is the binding of TPO to the ligand binding domain. TPO has a high affinity site and a low affinity site, which are located just behind each other. One molecule of MPL binds to each of these two sites, and the two molecules of MPL are cross-linked, activating the receptor. Eltrombopag binds to the transmembrane of MPL, causing the receptor to change its active conformation, and when the receptor dimerizes, it becomes active and transduces signals into the cell.

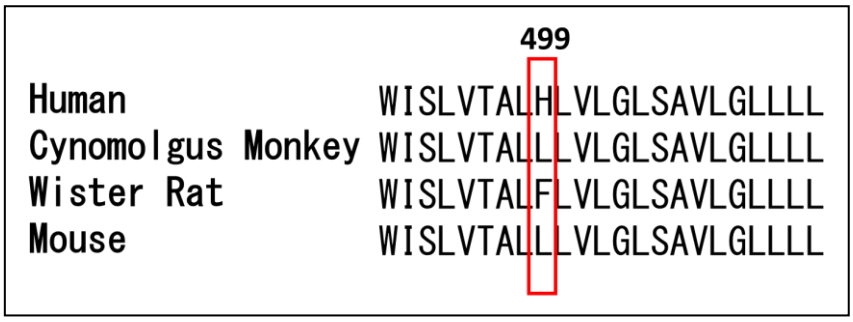


Figure 8. Comparison of amino acid residues in 499 TPO receptors from various animals

The 499th amino acid residue is unique to each animal species.

現在臨床応用されているエルトロンボパグ (Figure 6) は SB394725 をリード化合物として開発された(*29*)。これは現在、特発性血小板減少性紫斑症 (ITP)や再生不良性疾患（AA）などに対する治療薬としてレボレード (日)、PROMACTA (米)の商品名でノバルティスファーマから市販されており、市場規模は 1000 億円を超えるとされている。この化合物は経口投与が可能であり、患者に対する負担が小さいだけでなく、受容体への作用点が TPO と異なることで、内在性の TPO と競合しないことも大きなメリットの一つである。エルトロンボパグと同様な活性化メカニズムで作用する lusutrombopag (Figure 6)も 2015 年にから慢性肝疾患罹患者における血小板減少症の改善という効能で塩野義製薬から販売されており、TPO 受容体の H499 を標的とする非ペプチド TPO 受容体アゴニストがいくつかの後続薬として臨床研究されている(*30*)。

近年、ニュースや新聞で iPS 細胞由来の血小板の臨床研究が認可されたという報道が世間をにぎわせた。京都大学 江藤浩二教授らの研究チームが再生不良性貧血患者に 1 名に対し iPS 細胞由来の血小板を体内に戻す臨床研究を行った。現在、ケガや病気により輸血が必要な場合、その供給源は全て献血に頼っている状況である。しかし今後、高齢化や人口減少が進む国内では献血が減ることは確実である。さらには、輸血されても他人の血液であるため、拒絶反応が起こることもある。そこで自身の体細胞由来の iPS 細胞を作成し、それを分化させ血小板を作ることで、拒絶反応のない血小板を安定供給できるというデザインである (Figure 9) (*31*) 。

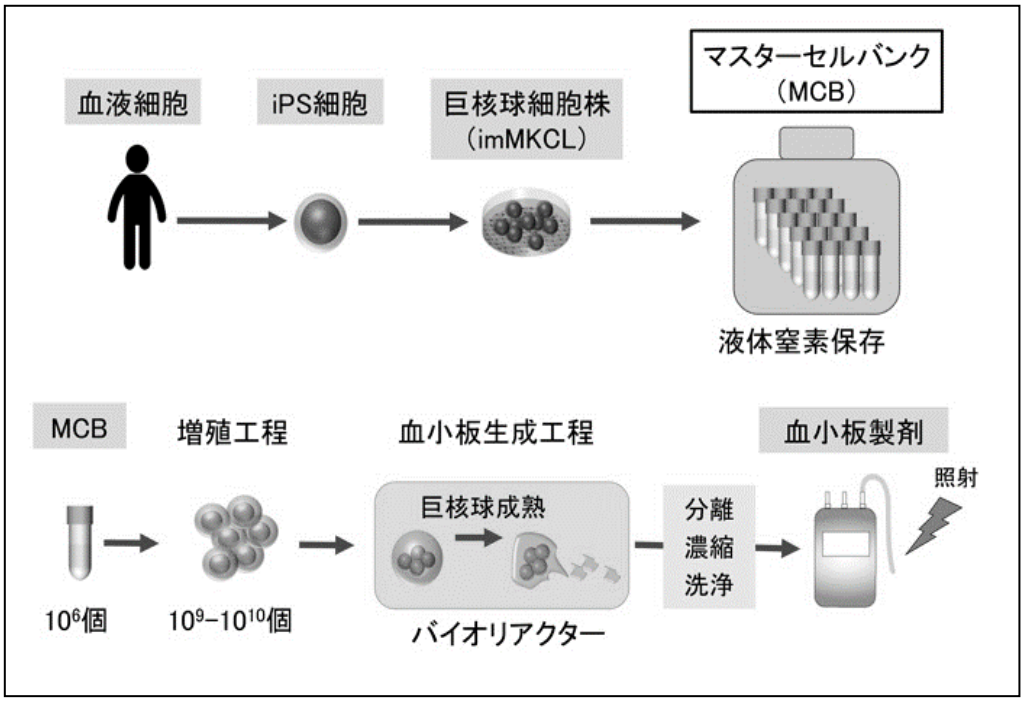
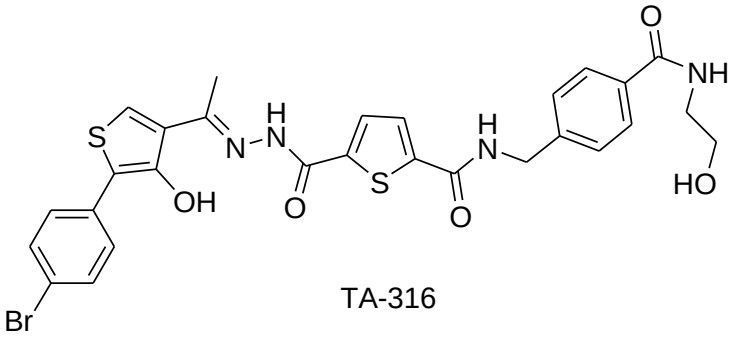


Figure 9. Overview of iPS-derived platelet production

（京都大学医学部付属病院 HP https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/press/20200325.html より引用）

この iPS 細胞から血小板へと分化させる段階でも TPO 受容体アゴニストが使用されている。TA316 (Figure 10)という合成品は、TPO やエルトロンボパグよりも強い活性を示し、生産コストも安いため不死化巨核球細胞株（imMKCL 細胞）の分化に利用されている (Figure 9) (*32*)。このように新しい造血サイトカイン様化合物の発見は、患者への直接投与だけでなく、新しい造血メカニズムの発見や創薬ターゲット、再生医療などにも役立つ可能性があり、非常にメディカルニーズの高い分野である。



TA-316

Figure 10. Structure of TA-316

海洋天然物からの造血サイトカイン様物質の探索

造血サイトカイン様活性を示す非ペプチド化合物は合成品の化合物ライブラリから多く探索されてきたが、天然物からの探索例はほとんどない。天然物、特に海洋生物の二次代謝物には私たちの想像し得ない特異な構造を持つものが多く、それに伴いユニークな生理活性を示すことがあると言われている。その中で、2005 年に TPO 様活性を持つ天然物の存在が初めて報告された。すなわち、Sakai らは海洋底生生物や海洋微生物を対象にスクリーニングを行い、*Basipetospora* sp.という海洋真菌由来に含まれる xanthocillin 類が TPO 様活性を示すことを報告した (Figure 11) (*33*)。すなわち、xanthocillin (**1**)をヒト白血病由来の血液前駆細胞モデルである UT-7 細胞の TPO 感受性を持つ系譜細胞に作用させるとその増殖を促進し、EC_{50} 4.0 ng/mL においては TPO に匹敵する最大増殖率を示すことを明らかにした。xanthocillin (**1**) が TPO 受容体にどのように作用し、活性を発揮しているかは不明だが、オレフィン構造と適度な分子サイズが活性に重要であり、2 つのイソニトリル基は活性に必須ではないことなどがその後の合成・構造活性相関研究で明らかとなっている(*34*)。xanthocillin (**1-3**) は Hela 細胞に対し細胞毒性を示すことや、酵母の増殖抑制、抗ウイルス活性なども報告されている化合物である(*35*)。このように xanthocillin 類が何かの生物活性を阻害・抑制する作用は知られていたが、最近その作用機構として細胞内リン酸化経路の阻害

が提唱された(*36*)。しかし、xanthocillin (**1**)が非常に低濃度で効率的かつ選択的に TPO 受容体の活性化を促すという作用は初めての発見であり、天然物からの造血サイトカイン様活性を持つ化合物の報告も現在のところ、この 1 例だけである。

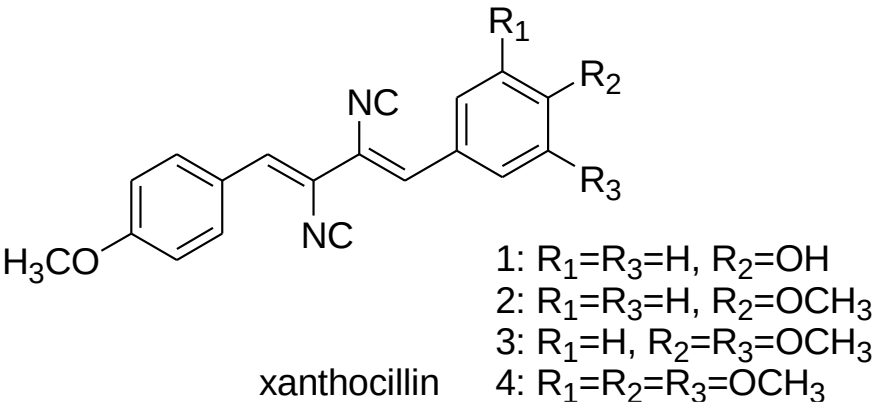


Figure 11. Structures of xanthocillin derivatives (1-4).

海洋生物抽出物からの血球増多剤の探索

先行研究では海洋生物の抽出物から造血サイトカイン様物質を見出すことを目的にスクリーニングを行った。スクリーニング方法には、マウス由来 ProB 細胞（Ba/F3 cell）に主要な造血サイトカイン受容体である、ヒト TPO、EPO、GCSF 受容体を発現させた Ba/F3-HuMpl、Ba/F3-HuEPOR、Ba/F3-HuGCSFR に加え、コントロールとして Ba/F3 細胞を用いた（Figure 12)。Ba/F3 細胞は murine interleukin-3（mIL-3）依存的に増殖し、サイトカインの非存在下では死滅する。ヒト TPO、EPO、GCSF 受容体を発現している細胞は mIL-3 もしくは、TPO、EPO、GCSF の存在下で増殖する（Figure 12)。したがって、各細胞にサンプルを添加し、増殖活性が観察されればサイトカイン様活性を示す物質が含まれている可能性がある。サンプルはパラオ共和国、ミクロネシア連邦（ヤップ島、チューク島)、日本（九州、四国、沖縄)で採取した海洋底生生物 868 種の水抽出物、メタノール抽出物を用いた。その結果、活性を示したサンプルを Table 1, 2、Figure13 に示す。

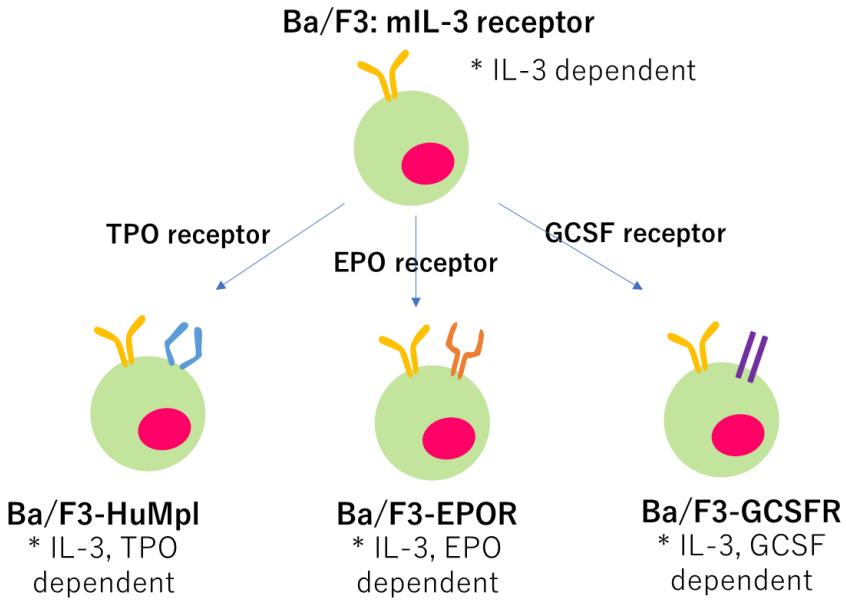


Figure 12. Various cell lines derived from Ba/F3 cells and their cytokine dependence

Ba/F proliferates in a mIL-3-dependent manner, and Ba/F-HuMpl, HuEPOR, and HuGCSFR also proliferate in the presence of human TPO, EPO, and G-CSF, respectively.

Table 1. Numbers of active samples

	A. EPO	B. TPO	C. G-CSF	Total
1. Palau	1	2	0	3
2. Yap	0	0	0	0
3. Chuuk	1*	2(1*)	1*	2
4. Japan	1**	3(1**)	1**	3
Total	1	7	2	

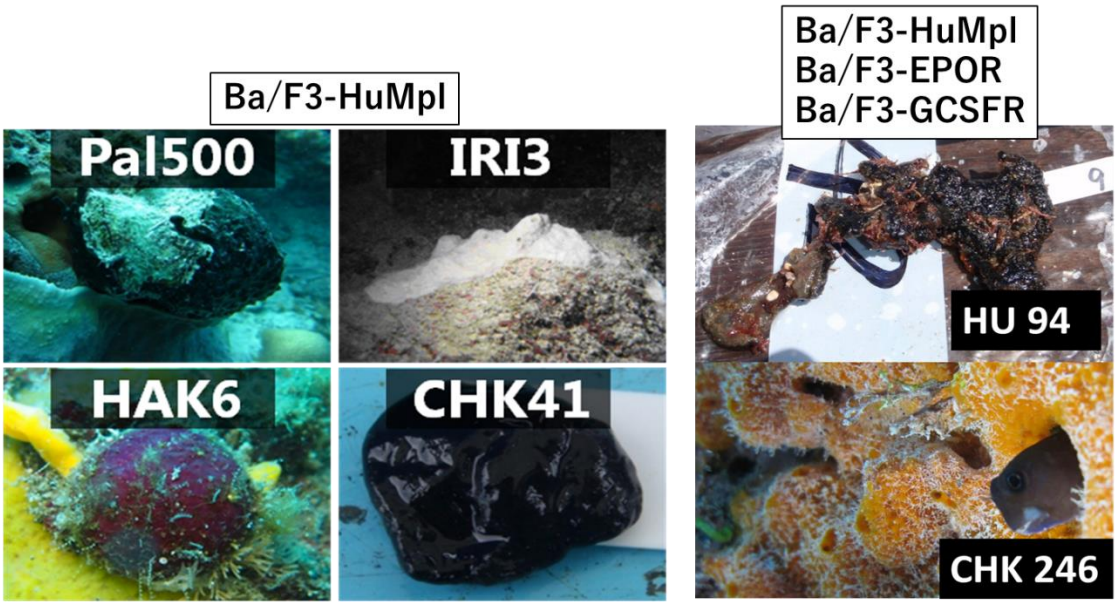


Figure 13. Marine organisms exhibiting cell proliferation

造血サイトカイン様活性を示したサンプルの概要を Table 1 に示す。ここで、パラオ産の EPO 様活性を示したものを A-1 とし、同様の方法で他のものも表記する。1*、1**はそれぞれ同一サンプルが EPO、TPO、G-CSF 全てに活性を示したことを意味し、1*を A-3、1**を

A-4 とし、Table 2 のサンプルナンバーに対応している。

これらの中にはサンプル量が少なく、失活などから再現性が得られていないものもあるが、スクリーニングサンプル 868 種中、8 サンプルがヒットしたことは、医薬品エルトロンボパグの素となった化合物 SB394725 の発見までに 50,000 を超える化合物のスクリーニングを要した事例と比較すると、本研究で用いた海洋天然物のライブラリは非常に有望な探索源であるといえる。そこで本研究では、最も再現性良く強い活性を示した *Corticium* sp.と同定された海綿 B-3-1（Table 2, CHK41）、から見出された TPO 様活性を示す新規タンパク質トロンボコルチシン(Thrombocorticin, ThC)を対象とし、その構造と作用機構の解明を目指すこととした。

Table 2. Samples that showed activity in the screening and their properties

		Sample number	Organism species	Extraction solvent	Feature or Activity
EPO	A-1	Pal292	Tunicate	Water	Activity increases after heat treatment. Then inactivated.
	A-3	CHK246	Sponge	Water	It is active in all three cell types. The active body is a protein.
	A-4	HU94	Tunicate	Water	Active in all three cell types, no IL-3-like activity.
TPO	B-1-1	Pal500	Sponge	Water/ methanol	Active in both water and methanol extraction. Contains alkylpyridine.
	B-1-2	Pal366	Sponge	Water	Maximum activity is about 90%. Toxic at high concentrations.
	B-3-1	CHK41	Sponge	Water	Contains ThC, a water-soluble protein from *Corticium* sp..

	B-4-1	**HAK6**	**Soft coral**	**Water**	**Active in internal solutions of dialysis.**
	B-4-2	**IRI3**	**Sponge**	**Water**	**Very potent, with maximum activity of about 110%.**

*(*37*)より引用

結果・考察

1 章　ThC の性質と構造

1 節　ThC の性質と分離精製

スクリーニングによって見出された Chuuk 島産海綿に含まれる活性物質を特定するため、活性本体の物性の確認と分離精製を行った(*38*)。まず、*Corticium* 海綿（Figure 14）の水抽出物を透析し、高分子画分と低分子画分に分けた。予備実験から ThC は酸性バッファーで処理してもほとんど活性を失わないことが明らかとなっていたため、透析高分子画分を 200 mM glycine buffer （pH 3.0）で処理し、目的以外のタンパク質を沈殿させた。その後上清を回収し、再度透析でバッファー交換をした後、SDS-PAGE と細胞アッセイを指標に、活性のあるフラクションを陰イオン交換クロマトグラフィー (DE52)、疎水性クロマトグラフィー（Butyl Toyopearl 650M)、サイズ排除クロマトグラフィー（TSK gel G2000SW）の順に供し、精製を進めた（Figure 15, Table 3)。その結果、分子量約 15 kDa に 2 本バンドが確認された（Figure 16A)。同一試料を非還元状態で処理すると、SDS-PAGE の下のバンドに相当する位置に 1 本のバンドのみ観察され、非還元-非加熱処理では下のバンドの位置はそのままに、上のバンドの位置が少し上昇した（Figure 16B)。このようにサンプル調整方法の違いにより見かけの分子量は変化し、2 本から 1 本のバンドへと変化することからも、この 2 本のバンドは状態に応じて ThC のコンフォメーションが変化し SDS との相互作用が変わるために生じたものであると考えた(*39*)。

また、ThC の熱処理により安定性を調べたところ、加熱時間に比例して徐々に活性は落ちるものの、98℃で 60 分処理した後でも活性は完全には失われておらず、非常に熱安定性が高いことが示された（Figure 16C)。

Figure 14. *Corticium* sp. in Chuuk Island Micronesia

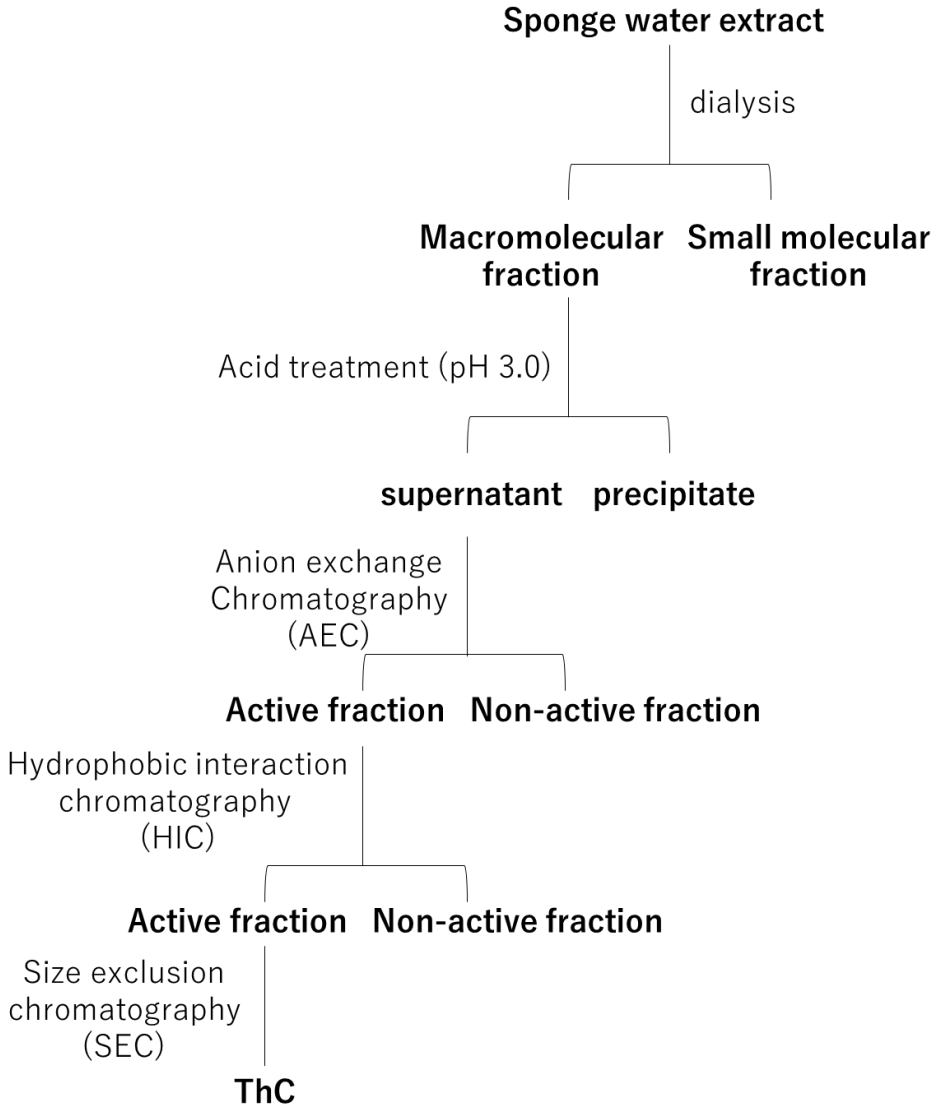


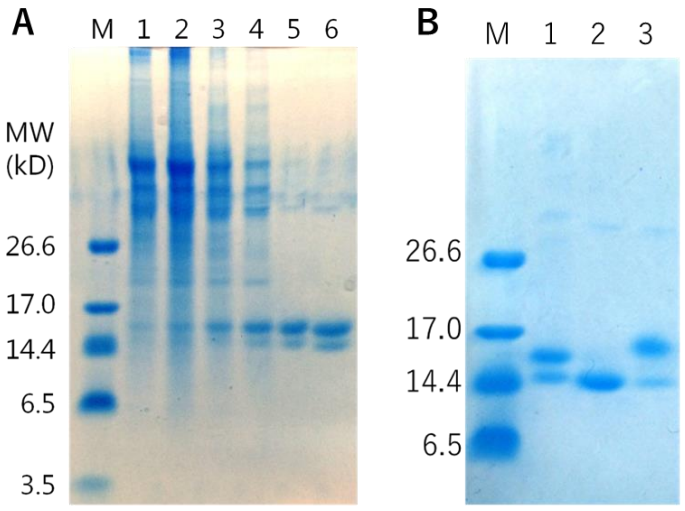
Figure 15. Purification scheme for ThC

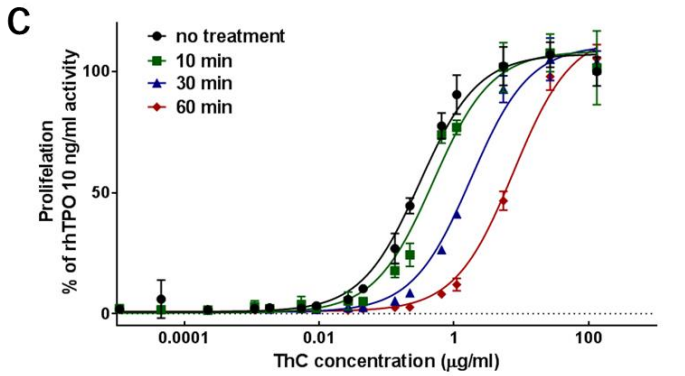
Purified ThC was obtained through five purification steps. Details of the purification are described in the supplemental data (Figure S1-S3).

Table 3. Sample weight at each purification stage of ThC

No.	purification	weight (mg)	Protein (mg)	A_{280} (-)	Volume (mL)
1	Sponge specimen	53 g	-	-	-
2	Dry sponge	11 g	-	-	-
3	Water extract	4,350	5,140	10.3	500
4	Dialysis	1,820	2,720	7.77	350
5	Acid treatment	-	1,280	12.8	100
6	Dialysis	-	700	5.11	140
7	AEC	-	98	0.62	160
8	HIC	-	7.5	2.36	3.2
9	SEC	6.1	3.1	2.54	1.2

*(*38*)より引用





	EC_{50} (μg/mL)	EC_{50} (nM)
Native ThC	0.31	22.8
Heating (10 min)	0.49	35.9
Heating (30 min)	1.78	130
Heating (60 min)	7.65	562

Figure 16. SDS-PAGE profiles and Ba/F3-HuMpl cell proliferation for ThC.

(**A**) M**:** Marker, polypeptide standard. 1: Water extract, 2: Dialysis inner solution, 3: pH 3.0 supernatant, 4: ThC fraction from AEC, 5: ThC fraction from HIC, 6: ThC fraction from SEC. Electrophoresis is run under reducing conditions. (**B**) SDS-PAGE for ThC under three different conditions: heat and mercaptoethanol (ME) (lane 1), heat treated without ME (lane 2), without both heat and ME treatment (lane 3). (**C**) Ba/F3-HuMpl cell proliferation activity and EC_{50} value of ThC after heat treatment.

*(*38, 40*)より引用

2 節　ThC の一次構造

1 節では *Corticium* 海綿由来の TPO 様活性を示すタンパク質として ThC を精製した。そこで次にアミノ酸配列の決定を試みた。ThC の一次構造は前任者によって推定配列が提出されていた(*38*)（Figure 17A)。当初は海綿の cDNA を作成し、そこから ThC のアミノ酸配列情報を得ることが試みられたが、実験は成功しなかった。*Corticium* sp.は黒色の海綿（Figure 14）であり、PCR 阻害活性のあるメラニンを多く含むため、非特異的な増幅を行ったことが考えられる。そこで前任者は精製した ThC をトリプシン、キモトリプシン、V8 プロテアーゼなどを用いて消化し、それらのペプチド断片を HPLC 分取した後、MALDI-TOF MS/MS でペプチドのアミノ酸配列情報を得た。これらの断片の配列情報をマッピングすることで ThC の全長 131 アミノ酸残基の配列を推定した。この結果は SDS-PAGE のバンドによる推定分子量、さらには高分解能質量分析の結果とも一致した。そこで推定アミノ酸配列につき Blast で相同性検索を行ったところ TPO との相同性は無く、*Serratia* sp. (ATCC 39006)由来の fucose binding lectin と 30%程度の相同性を持つことが明らかになった(*38*) （Figure 17B)。その他にもいくつかのシアノバクテリア、エンテロバクテリア、プロテオバクテリア由来の hypothetical protein が ThC と配列相同性を示したが、これらのタンパク質については遺伝子情報のみが登録されており、タンパク質の構造や機能についての報告はない(Table S1)。一方で、生理的アゴニストである TPO との配列相同性は持たないことが明らかとなった（Figure 17C)。

まず初めにこの推定配列を基に ThC を大腸菌で発現させ、活性の有無を調べた。Figure 17D に示す通り、ThC を発現させた大腸菌の破砕液をニッケルカラムに供し、イミダゾールバッファーで溶出すると分子量約 15kDa のほぼ単一のバンドが観察されたため、これを発現 ThC とし、Ba/F3-HuMpl に対し細胞増殖アッセイを行ったところ、活性を示さなかった。そこで、発現 ThC のアミノ酸配列を LC-MS/MS を用いて確認した（Figure 17E)。

その結果、ThC の全長配列は確認できなかったものの、おおよそ天然物と同じ配列であったため、発現物のアミノ酸配列に関する決定的な誤りを見つけることはできなかった。活性を示さない理由として、

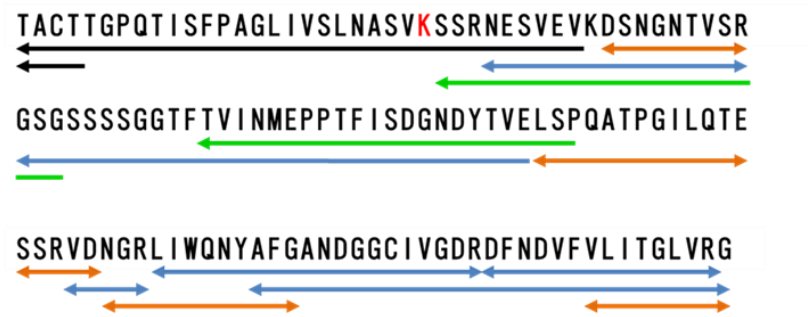
１）発現物の立体構造が天然物と異なる（2 次、3 次、4 次構造)、

２）天然 ThC に翻訳後修飾がある、

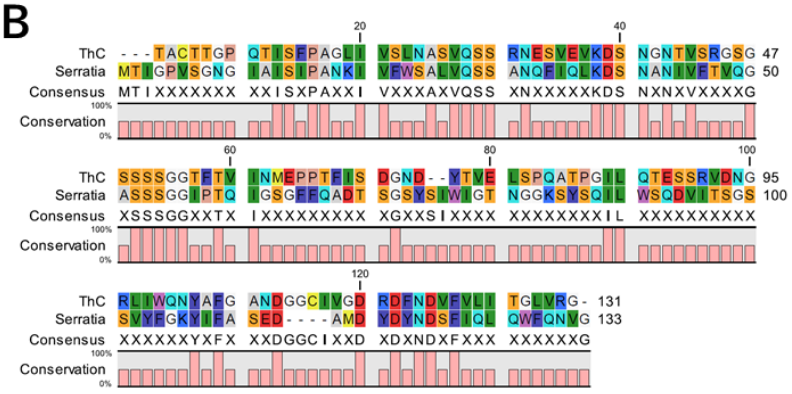
３）推定配列に誤りがある、

ことが考えられた。

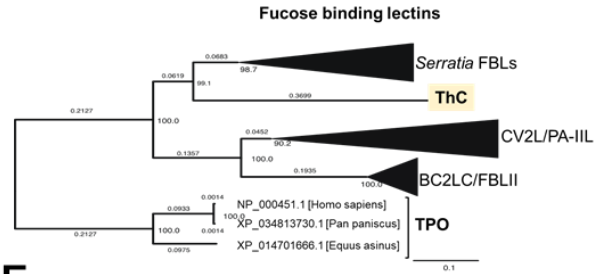
A



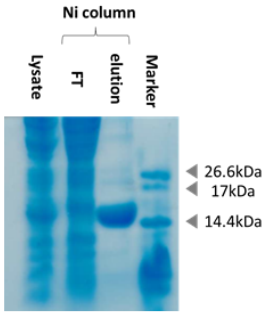
B



C



D



E

```
ThC4      ------------PAGLLVSLNASVK--QAESVEAR-SNGNTVSR----------------  29
ThC1      ------------PAGLLVSLNASVK----------SNGNTVSR----SSSGGTFTVLN-  32
ThC       TACTTGPQTISFPAGLIVSLNASVKSSRNESVEVKDSNGNTVSRGSGSSSSGGTFTVINM  60
ThC2      ---------LSFPAGLLVSLN-----EEVESVEVK-SNGNTVSR----ASSGGTFTVLN-  40
ThC3      --------TLSFPAGLLVSL------EEVESVEVK-SNGNTVSR----ASSGGTFTVLN-  40

ThC4      ------SDGNDYTVEL-PQATPGLLKTESSR------------FGANDGGCLVDEAD---  67
ThC1      ------SDGNDYTVEL-PQATPGLLQTE--------------FGANDGGCLVDEAD---  67
ThC       EPPTFISDGNDYTVELSPQATPGILQTESSRVDNGRLIWQNYAFGANDGGCIVGDRDFND  120
ThC2      ------SDGNDYTVEL-PQATPGLLQTE-FQNDGGCLLWK-----QNDGGCLVGD-----  82
ThC3      ------SDGNDYTVEL-PQATPGLLQTE-FQNDGGCLLWK---FGANDGGCLVDEAD---  86

                          ******:*:**                ******:*.:

ThC4      ---LLTGLVGR   75
ThC1      VFVLLTGLVR-   77
ThC       VFVLITGLVRG   131
ThC2      ---LLTGLVGR   90
ThC3      ---LLTGLVGR   94
```

Figure 17. Amino acid sequence of ThC

(**A**) Draft amino acid sequence of native ThC (nThC). Amino acid sequence of nThC was first determined based on Edman degradation (black line), and MALDI-TOF MS/MS *de novo* sequencing data of chymotrypsin (green), trypsin, (blue), and V8 protease (orange) digests. The 25th residue was assignes to by lysine (red letter). (**B**) Amino acid sequence comparison with the most homologous lectin from *Serratia* sp.. (**C**) Phylogenetic tree of ThC, related bacterial lectins and TPO with collapsed tree nodes (Figure S4). (**D**) SDS-PAGE for recombinant ThC. Recombinant ThC was expressed in *E.coli* based on the sequence of draft ThC, and purified by nickel column using His-tag at the N-terminus. ThC was not found in the flow-through fractions (FT) of the nickel column, and a band of ThC was identified in the elution fraction. (**E**) Amino acid sequences of a recombinant ThC. Recombinant ThC was digested with trypsin and the obtained peptides were sequenced by LC-MS/MS and fitted to the draft sequence. A total of four runs were conducted. ThC1-4 indicates each experiment.

3 節　X 線結晶構造解析

2 節では ThC の推定配列を基に発現実験を行ったが、天然物の持つ活性は示さなかった。原因はいくつかの可能性が考えられるが、X 線結晶構造解析で天然 ThC と発現 ThC を直接比較することができれば、原因が明らかとなる。以下、構造解析に関しては東北大学田中良和教授と Northwestern 大学 Freymann 教授との共同研究で行った。

Freymann 教授による天然物の結晶化および回折データの取得は成功したものの、データ解析は成功せず、立体構造を得ることはできなかった。そこで、回折データを田中教授のグループで再度解析したが、同じく構造情報を得ることができなった。

X 線結晶構造解析は重原子同型置換法、異常散乱法、分子置換法という 3 種の方法に大別される。重原子同型置換法は最も古い方法で、得られた結晶に 2 種類の水銀や鉛などの重原子を結合させ、それらに由来する位相をもとにタンパク質結晶由来の位相を決定する方法である。しかし、この方法では重原子をソーキングすると結晶の組み方に変化が生じるなどの問題点があり、近年ではあまり用いられなくなっている。異常散乱法は、重原子同型置換法とは異なり、タンパク質自体に含まれる原子の異常散乱効果を利用したものである。メチオニン残基の硫黄（S）をセレン（Se）に置換したセレノメチオニン（SeMet）をリコンビナントタンパク質中に組み込ませ、結晶化するのが一般的である。そこで、ThC についても今回 SeMet を用いたリコンビナント体を作成し、結晶構造解析に用いた。さらに今回は特定の 1 波長のみで取得したデータから位相を決定する短波長異常散乱法（SAD 法）を用いている。分子置換法では類似した構造を持つ既知のタンパク質をリファレンス（サーチモデル）とし位相を決定する方法である。この方法はアミノ酸配列情報のみで行うことができるため、最も簡便な方法であるが、サーチモデルがどれくらい目的タンパク質と類似しているかに大きく影響される。したがって、構造の解かれているタンパク質の複合体の構造を予測する際などには重宝されている。

今回は異常散乱法で SeMet を用いたリコンビナント ThC から得られた結晶構造をサーチモデルとして天然 ThC の構造を決定した（Figure 18A, B)。その結果、得られた回折データの分解能は 1.5 Å であった。しかし、ThC の推定配位列を得られた電子密度に当てていくと、25 番目のリジン（K）残基が合致しなかった。そのため、電子密度に最も合うアミノ酸を検討したところ、グルタミン（Q）もしくはグルタミン酸（E）の可能性が高いことが明らかとなった（Figure 18C)。しかし、電子密度の形だけでは E、Q の区別がつかなかったため、LC-MS/MS を用いて決定することとした。北里大学松井先生の協力の下、天然 ThC のペプチドマスマッピングを行った結果、25 番目の残基は Q であることが明らかとなった（Figure S5)。さらに、大腸菌を用いてリコンビナント ThC Q25、Q25E を調製し Ba/F3-HuMpl に対する活性を比較した（Figure 18D)。その結果、EC_{50} は Q25 では 0.26 μg/mL であり天然 ThC と同等であったのに対し、Q25E では 2.1 μg/mL だった。この結果も天然 ThC の 25 番目のアミノ酸残基が Q であることを支持するものである。この情報を基に、再度リコンビナント ThC Q25（rThC）と天然 ThC との構造を比較した。その結果、この二つのタンパク質は非常に類似していたため（root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 0.66 Å for 261 C α atoms)、同等の物であると判断した（Figure 18E)。したがって、以降の細胞実験では rThC を用いることとした。

得られた構造情報から ThC は 9 つの β 鎖から成る β サンドウィッチ構造を持ち、分子内に C3 と C111 による 1 組のジスルフィド結合を持つこと、さらに、2 分子が上下反転した状態でホモダイマーを組んでいることが明らかとなった。ThC はカルシウム要求性の C 型レクチンであるため Ca^{2+}、フコース/マンノースとの共結晶を行ったところ、ThC は 2 分子の Ca（Ca-1, Ca-2）を介してフコース/マンノース と結合しており、この糖結合サイトはホモダイマー1 つにつき 2 カ所あることが明らかとなった（Figure 18B, F, G)。ThC とフコース複合体及びマンノースとの複合体はそれぞれ分解能 1.3 Å, 1.4 Å で構造を決定した。

Ca-1 は片方のプロトマーの D117-N119-D120 ともう一方のプロトマーの G131 残基（G131*）によりキレートされている。Ca-2 は N107-D115-D117-D120 によりキレートされている。フコースでは 3 つのヒドロキシ基に Ca-1-Ca-2-D115-D120-D108-G131*がかご状の空間を作り、糖がそこにはまって極性相互作用することで結合している（Figure 18G）。次に等温滴定型カロリメトリー（Isothermal Titration Calorimetry: ITC）を用いて rThC と糖との乖離定数（K_D）を求めた。その結果、フコースとの KD は 4.7 μM であった一方、マンノースでは 66.3 μM であり、その差は約 14 倍であった（Figure 19A, Table S2 ）。さらに表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance：SPR）を用いて同様の実験を行ったところ、K_D はフコースにおいて 1.18 μM、マンノースにおいて 33 mM であり、約 10,000 倍もの差が見られた（Figure S6）。この結合力の差は何に由来するのかを考察するため、マンノースとフコースの結合様式を詳細に比較した。L-フコースは D-マンノースとピラン環および 3 つの水酸基のポジション、すなわち L-フコースの C2, 3 、4 と D-マンノースの C4, 3, 2 が重なる（Figure 20）。このため、レクチンの糖結合部位においてはこれらの糖は 3 つの水酸基と 2 つのカルシウムイオンの強い結合により配置される。その結果、ピラン環の酸素原子と C3 を結ぶ軸で 1 位と 5 位は逆に配置される（Figure 20）。ここで、ThC-フコース複合体においては、R28 の Nε とフコースの 1 位の水酸基間に水分子が入り水素結合を形成しているのに対し、マンノースでは 6 位の嵩高さゆえに同位置に水分子が入り込めず、R28 は結合に関与できない。一方、マンノースの 1 位の水酸基は結合部位の外に出ているため、ThC との相互作用はない。これらの違いにより ThC はフコースとの結合においてより安定化し、マンノースに比べ強い結合が観察されている可能性が示唆された。また、Asp108（D108）は糖と直接水素結合を形成しているが、糖の非存在下では R28 と静電相互作用（塩橋）しており、糖の添加によりこの相互作用が切断され糖と結合することが分かった（Figure 21）。

次に、なぜ Q25K ThC では活性を示さなかったのか、について検討した。rThC と Q25K ThC の立体構造を詳細に比較したところ、Q25K ThC では C 末端 G131*のカルボキシ基が天然物とは別の方向を向き、WT に比べて Ca-1 とフコースへの結合が欠損するため、糖への結合能が失われることが示唆された（Figure 22, 19B)。これを証明するため rThC の C 末端に G を 1 残基付け加えた G132 mutant を作成し、ITC による糖との結合定数、Ba/F3-HuMpl における TPO 様活性の有無を調べた（Figure 19B, C)。その結果、この変異体も Q25K ThC 同様に糖結合能、TPO 様活性を示さなかった。したがって、ThC のレクチン活性、TPO 様活性の発揮には C 末端の G 残基のカルボキシ基が必須であることが明らかとなった。前任者による推定配列が偶然一残基誤っていたことから、糖との結合が直接関係なさそうな 25 番目のアミノ酸が変異することで、C 末端グリシン残基のカルボキシ基の向きが大きく変わり、糖との結合能を失うという大変興味深い知見が得られた。

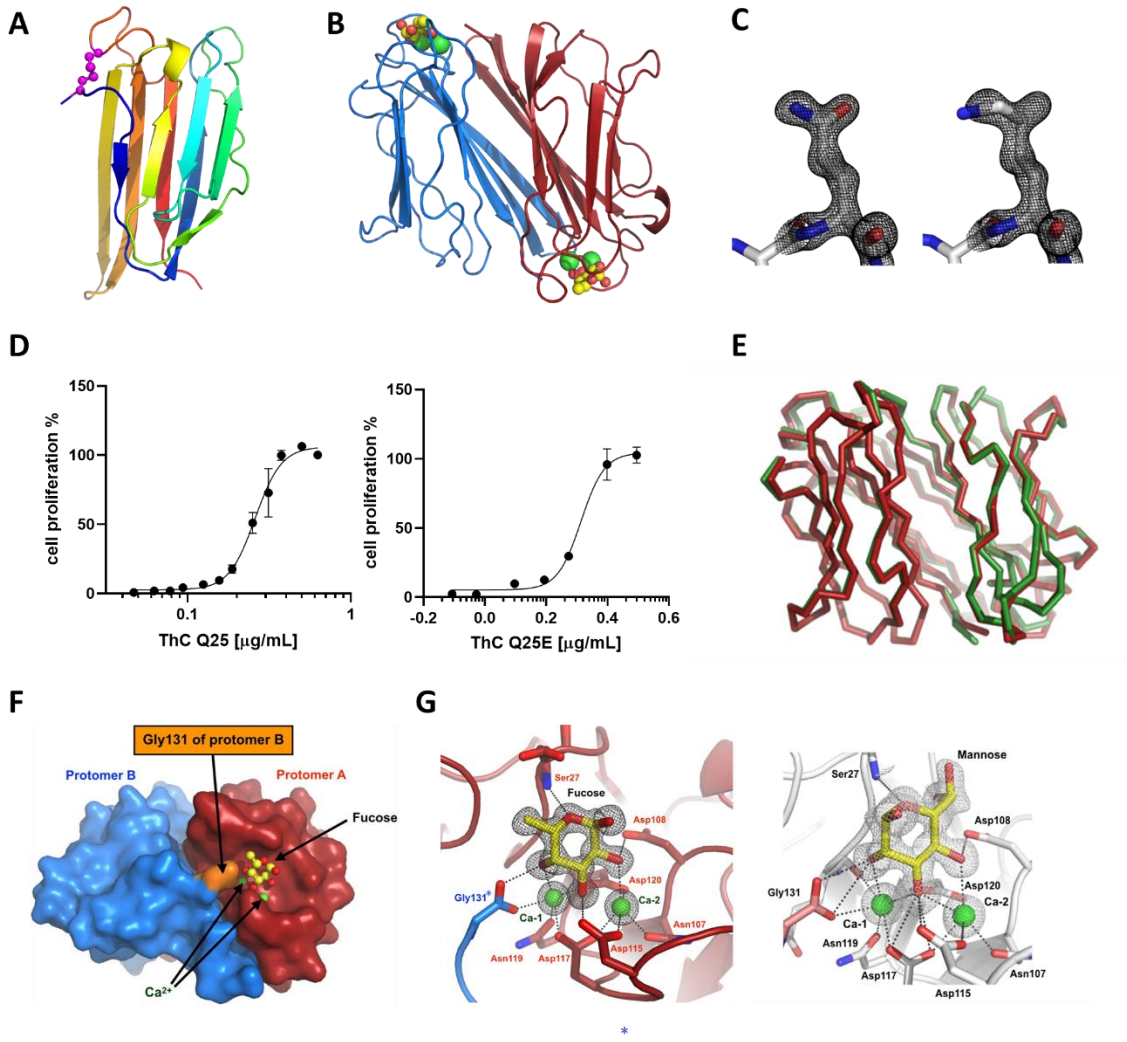


Figure 18. Crystal structure of ThC

(**A**) Ribbon diagram of the nThC monomer colored according to the sequence in blue at the N-terminus to red at the C-terminus. The disulfide bond between Cys3 and Cys111 is shown as a magenta ball. (**B**) Dimer structure of rThC in complex with Ca^{2+} (green ball) and fucose (ball-and-stick model, yellow: carbon, red: oxygen). (**C**) Electron density of the 25th residue. Atomic model of Lys (K) and Gln (Q) is located in the electron density of nThC. Q is fit well whereas K is not located in the electron density. (**D**) Concentration-response curve of proliferating Ba/F3-HuMpl cells by rThC Q25 (left) and Q25E (right). The half-maximal effective concentration EC_{50} was 0.26 μg/mL and 2.1 μg/mL, respectively. (**E**) Comparison nThC (green) and rThC (red). (**F**) Pseudodomain swapping structure in dimeric rThC. G 131*, shown in orange, of one protomer intervenes in the other. (**G**) A close-up view of the fucose and mannose binding site of rThC. The bound Ca^{2+} ions and fucose (mannose) are shown as green balls and stick models. Residues are

colored according to the chain as in (B).

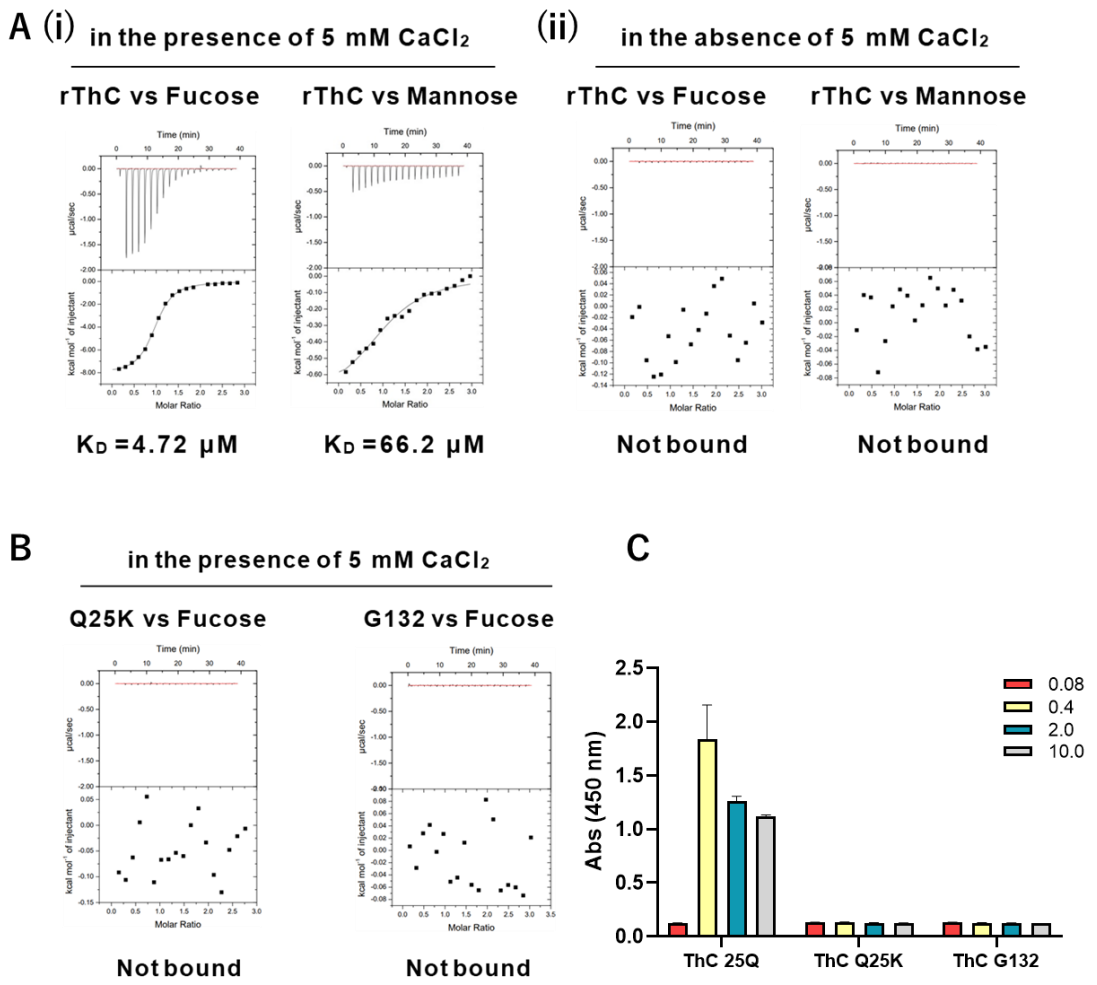


Figure 19. Comparison of sugar binding and TPO activity between ThC and mutants
(**A**) Thermodynamic analysis by ITC of the interaction with ThC and fucose or mannose in the presence (i) and absence (ii) of 5 mM $CaCl_2$. Thermogram (top) and titration curve (bottom) are shown. (**B**) ITC data on the interaction of ThC Q25K and G132 mutants with fucose. (**C**) Proliferation of Ba/F3-HuMpl cells by ThC 25Q (WT), Q25K and G132 (μg/mL).

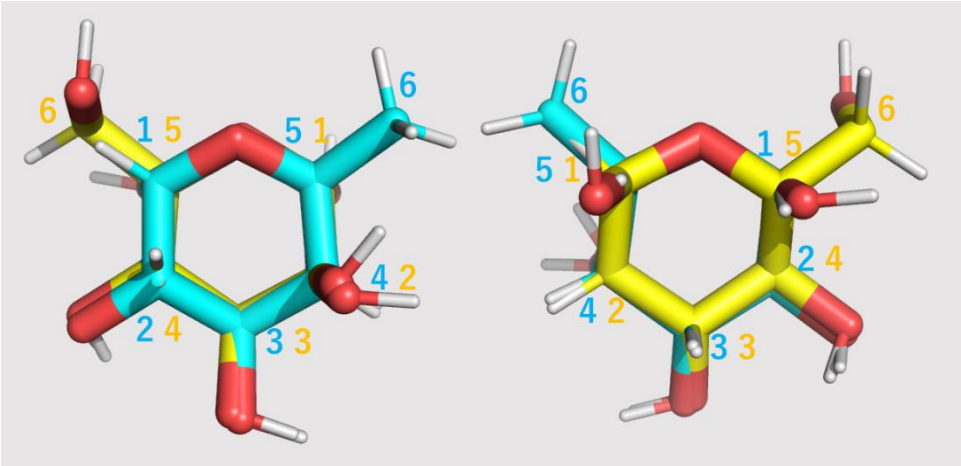


Figure 20. Three-dimensional structure model for L-fucose and D-mannose

Overlay for L-fucose (blue) and D-mannose (yellow). L-Fucose and D-mannose have the same orientation of the hydroxyl groups at the 2, 3, and 4 carbon.

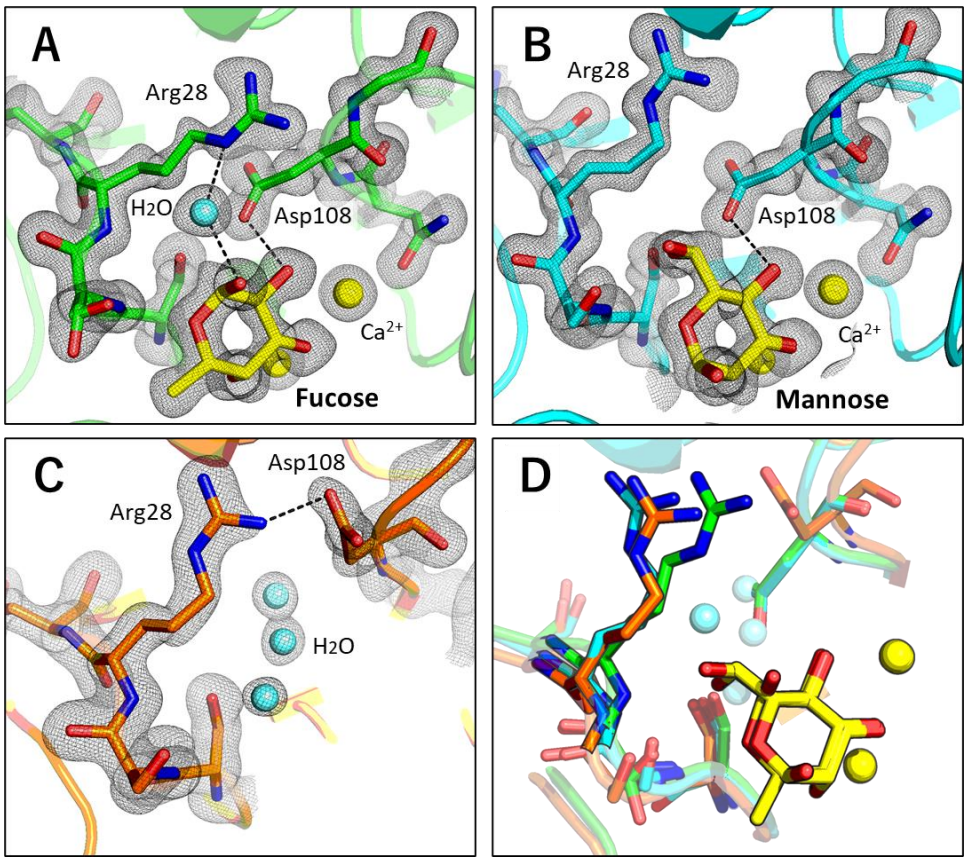


Figure 21. Difference in position of ThC Arg28

(**A**) A hydrogen bond between Nε of Arg28 and fucose via water molecule, bringing the Arg28 closer to sugar. (**B**) No interaction between Arg28 and mannose was observed. (**C**) A salt bridge between

Arg28 and Asp108 in ThC at apo state. (**D**) Superposition of A, B, and C. Only the fucose-bound form shows Arg28 close to the sugar.

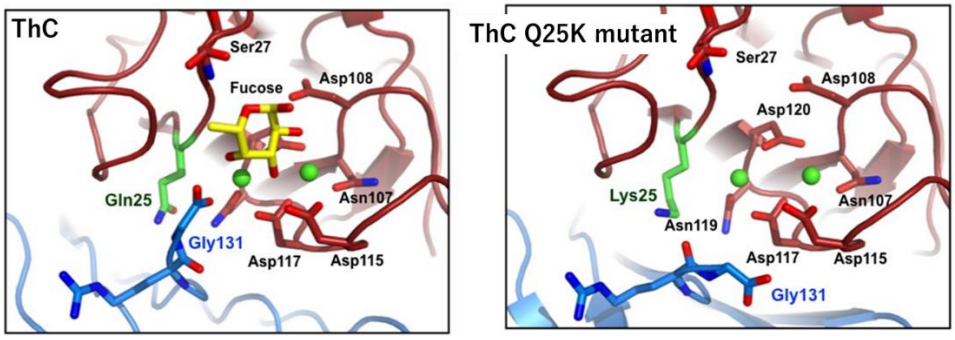


Figure 22. Structure comparison of the Ca^{2+} binding configuration between wild type and Q25K

Close-up view of the fucose binding site is shown. Individual protomers are shown in red and blue. The substituted residue (Q25 and K25) is shown in green. G131(blue) is facing a different direction.

一方で、今回得られた ThC の立体構造は既知のバクテリア由来レクチン PA-IIL と BC2LC-ct に非常に類似している事が明らかとなった。PA-IIL（LecB）は *Pseudomonas aeruginosa* 由来のレクチンであり、ThC と同様に 2 分子の Ca を介し主にフコースと結合する（Figure 23)。また、各種糖との結合の強さは L-fucose (Fuc) > L-galactose (Gal) > D-arabinose (Ara) > D-fructose (Fru) > D-mannose (Man)の順である(*41*) (*42*)。BC2LC は *Burkholderia cenocepacia* 由来のレクチンであり、N-terminal と C-terminal domain でそれぞれ別のレクチンを形成している。N-terminal domain はフコース結合性レクチンであり、特に Fucα(1,2)Galβ(1,3)GlcNAc/GalNAc (H type 1/3/4)に強く結合する。近年、このレクチンが特異的に認識する糖鎖が未分化 ES、 iPS 細胞に特異的に発現していることから、未分化細胞マーカーの標識としての利用が進んでいる(*43, 44*)。一方で、ThC と類似構造を持つ C-terminal domain (ct) はマンノース結合性のレクチンであり、フコースには結合しない（Figure S7, Table S2)。

PA-IIL においては糖結合特異性に関する研究が行われており、PA-IIL の 22 番目のセリンをアラニンに置換した変異体においてはマンノースとの結合性が、23 番目のセリンをアラニンに置換した変異体では、フコースとの結合特性が上昇することが報告されている(*45*)。このように 1 残基の変化で糖との結合特性が変化するという知見から、R28 を含むいくつかのアミノ酸残基が ThC におけるフコースへの結合性を高めていることが示唆される。今後、ThC や類似レクチンの糖結合特異性を比較していくことで、より糖とのアフィニティの高い・活性の強いレクチンの作出が可能になると考える。

本章では ThC を分離精製していく過程で、広範囲の pH に耐性を持つこと、熱耐性が高いなどの特徴を見出した。また、アミノ酸配列と X 線結晶構造解析から ThC が二量体を形成し、その二量体内に 2 カ所の糖結合部位を持つ C 型レクチンであること、C 末端ドメインが糖との結合に必須であることが明らかとなった。

また、調べてみると ThC に類似した構造を持つレクチンはバクテリア由来レクチンとして既にいくつか報告されており、PA-IIL、BC2LC-ct に加え、*Chromobacterium violaceum* 由来の CV-IIL(*46*)、*Ralstonia solanacearum* 由来の RS-IIL(*47*)などが類似した立体構造を持つレクチンとして知られており、これらはホモダイマーを最小単位とする Ca 依存性レクチンであること、アンチパラレル β-サンドイッチ構造を持ち、 C 末端のカルボキシ基が互いのプロトマーに入り込み糖と結合に関与していることが挙げられる(*48*)。このような構造的特徴を持つレクチンを PA-IIL 型レクチンと呼ぶこととする(Figure 23, Table 4)。

ThC 以外の PA-IIL 型レクチンは全てバクテリア由来であるが、*P. aeruginosa* が宿主へ感染し広汎性外耳炎を引き起こす際に、PA-IIL を接着の足場として利用していることが報告されている(*49*)。したがって、このレクチンが特異的に結合する糖液を塗布することで治療が可能である。また、嚢胞性繊維症では気道上皮細胞の糖タンパク質上糖鎖のフコシル化が増加することで PA-IIL による *P. aeruginosa* の感染を促進する(*42*)。さらに、これらのレ

クチンはバクテリアのクオラムセンシングに応答し、発現が調節されているとも報告されており、バクテリアの感染・増殖の過程で様々な役割を果たしていることが推察される。また、アミノ酸配列の相同性が ThC に類似したタンパク質の遺伝子がバクテリアゲノムに数多く存在することがわかっている(Figure S1, 8)。これらはタンパク質としての実態は報告されていないもの、PA-IIL、BC2LC-ct に比べ、ThC とのより高い配列相同性を示し、全長アミノ酸残基数もおよそ 130 残基と近い。さらに、すべての配列で C 末端アミノ酸グリシン残基が保存されており、共通して糖結合能に C 末端カルボキシ基が必要である事を示唆している。海綿由来タンパク質である ThC はその生産者が海綿自身なのか、もしくは海綿に共生する微生物なのか不明である。ここで、ThC と類似したタンパク質をコードする遺伝子を持つバクテリアはいずれも海洋由来である点は興味深い(*50-53*)。このことから、ThC も海綿に共生するバクテリアによる産物である可能性があると考える。

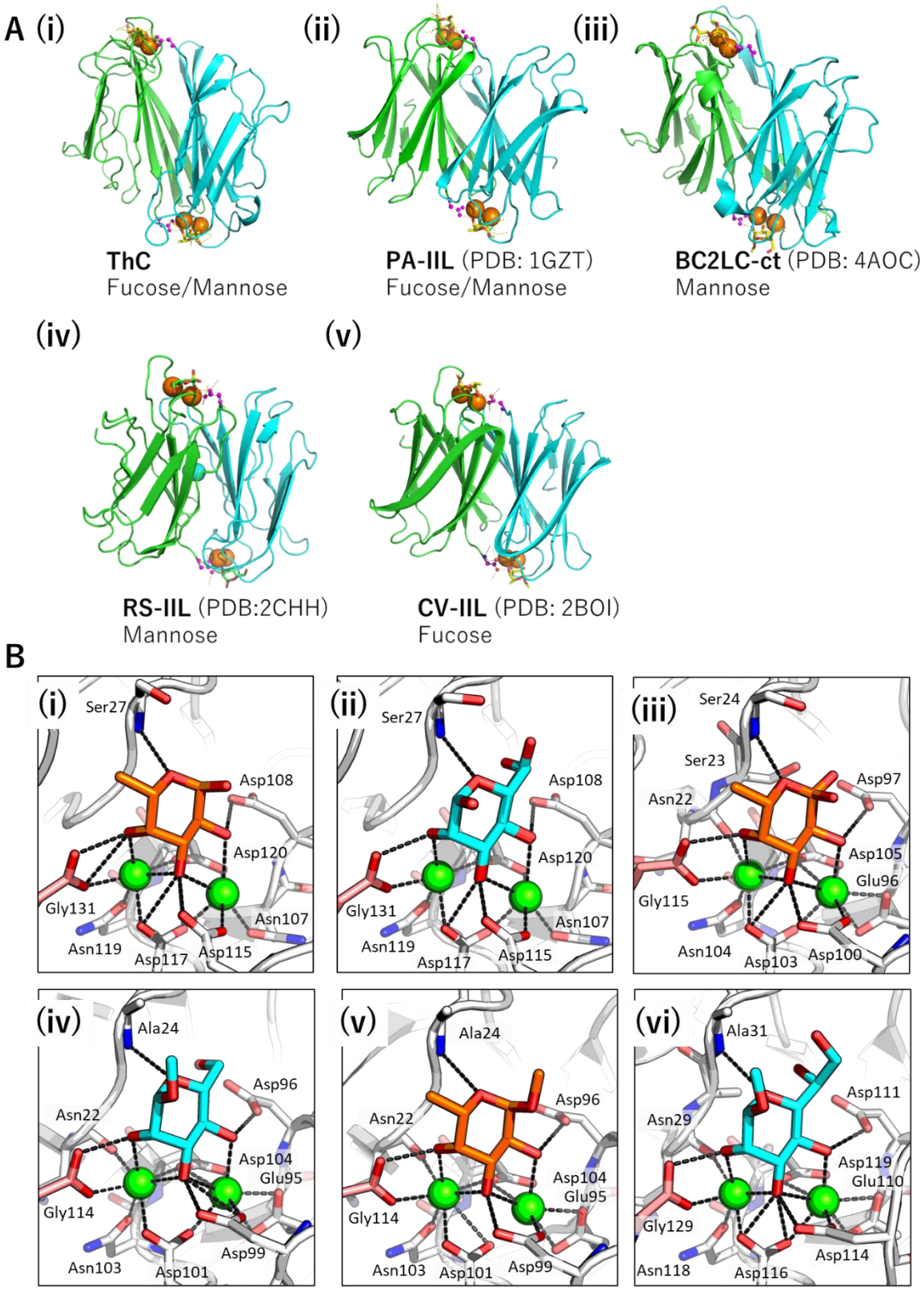


Figure 23. Three-dimensional structure of bacterial lectin and ThC

(**A**) Three dimensional structure of bacterial fucose/mannose binding lectins: PA-IIL, BC2LC-ct,

CV-IL, RS-IIL. These lectins have the following features in common: 1) β-sandwich structure; 2) homodimer; 3) Ca-mediated binding to sugars; 4) C-terminal carboxy group enters each other's protomer and binds to sugar. (**B**) Sugar binding sites of ThC and analog proteins. Fucose and its derivatives are shown as orange stick model, mannose and its derivatives as light blue stick model, Ca^{2+} as green ball. (i) ThC with fucose, (ii) ThC with mannose, (iii) PA-IIL with fucose (PDBID: 2jdp), (iv) RS-IIL with α-methyl-mannoside (PDBID: 1uqx), (v) CV-IIL with α-methyl-fucoside (PDBID: 2boi), (vi) BC2L-A + methyl L-glycero-α-D-manno-heptopyranoside (PDBID: 4aoc).

Table 4. Sugar binding properties and amino acid residues of Bacterial ThC-like lectins

	derived species	**sugar specificity**	**AA residues**
ThC	unknown	Fucose/Mannose	131
PA-IIL	*Pseudomonas aeruginosa*	Fucose/Mannose	115
BC2LC-ct	*Burkholderia cenocepacia*	Mannose	116
CV-IIL	*Chromobacterium violaceum*	Fucose	113
RS-IIL	*Ralstonia solanacearum*	Mannose	113

2 章　ThC の MPL アゴニストとしての活性化メカニズム

1 節　MPL の特異的アゴニスト

ThC は Ba/F3-HuMpl を増殖させる活性を指標に得られた新規タンパク質である。しかし ThC が MPL の特異的アゴニストであるかもしくは mIL-3 を含む他の受容体に作用するのかは不明である。そこで、これを調べるために以下の実験を行った。まず、Ba/F3 cell と Ba/F3-HuMpl に対し、ThC による細胞増殖活性を経時的に 5 日間まで測定した（Figure 24A)。ThC は Ba/F3 cell に対しては細胞増殖を起こさない一方で、Ba/F3-HuMpl cell に対しては mIL-3, TPO と同程度の細胞増殖が 4 日目に確認された。さらに確認のため、ThC を Ba/F3-HuEPOR、Ba/F3-HuGCSFR、UT- 7 /TPO、UT-7/EPO に添加した。その結果、TPO 受容体を発現している UT-7/TPO のみで増殖活性を示し、そのほかの細胞に対しては増殖活性を示さなかった（Figure 24B, C)。

次に、イムノブロットを用いて ThC・TPO の存在、もしくは非存在下で Ba/F3・Ba/F3-HuMpl の JAK2、STAT5 のリン酸化を調べた。その結果、細胞増殖の結果と一致して、Ba/F3-HuMpl のみで TPO・ThC による JAK2、STAT 5 のリン酸化が確認された（Figure 24D)。これらの結果は ThC は MPL を介し細胞増殖を引き起こしている、すなわち MPL のアゴニストであるという考えを支持した。しかし、ThC 添加時のバンドは TPO と比較して弱い一方で、細胞増殖の最大活性は TPO と同程度であり、TPO と ThC の作用機序が同一ではないことが示唆された。さらに、ThC の作用は濃度依存的であり、concentration-response curve から EC_{50} は 0.23 μg/mL と算出した。これはモル換算すると 10 nM であり、0.1 nM である TPO には及ばないが、医薬として利用されているエルトロンボパグの 270 nM と比べると強い活性である（Table 5)。

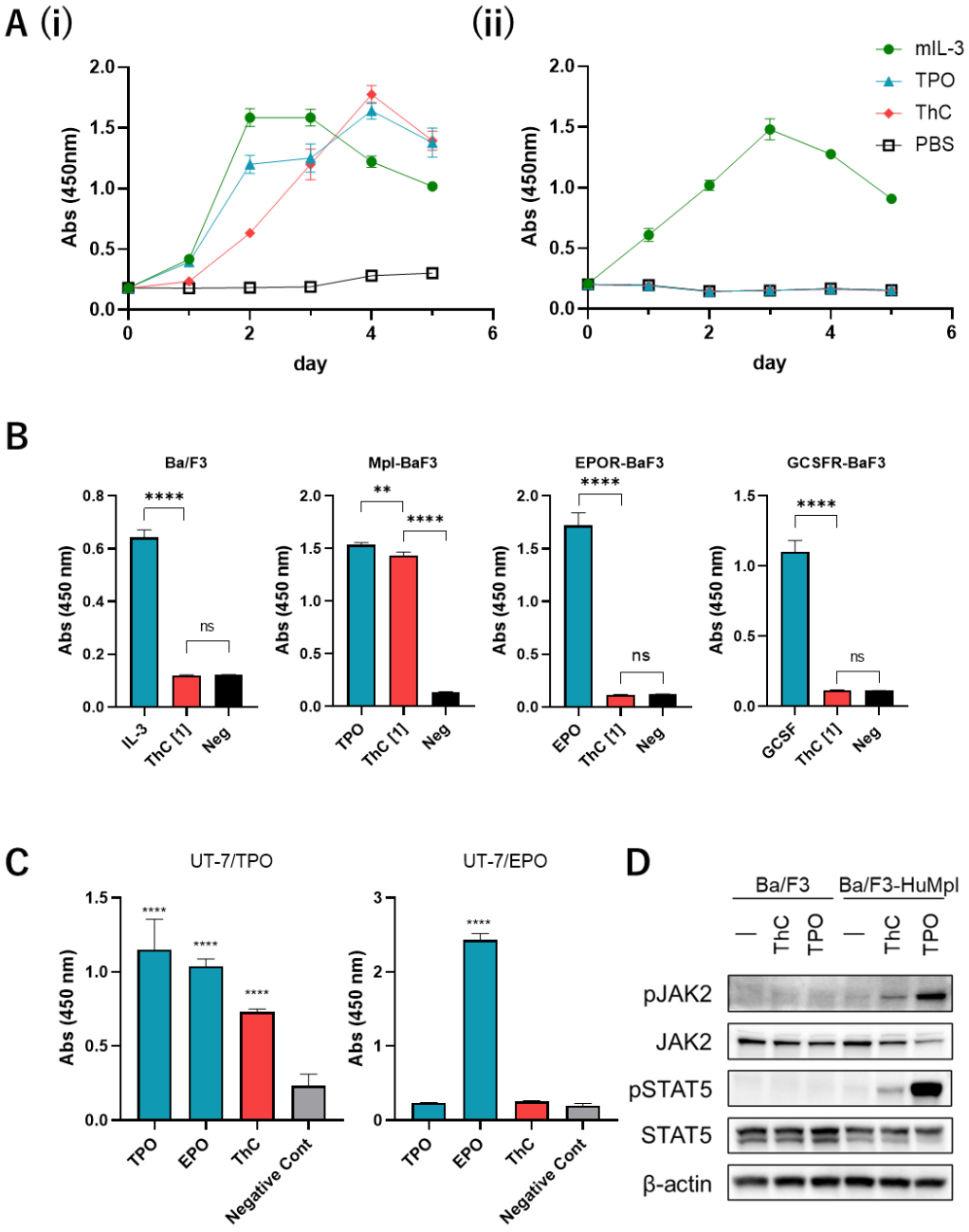


Figure 24. Effect of ThC on various cells and downstream signals

(**A**) Cell proliferation of (i) Ba/F3-HuMpl and (ii) Ba/F3 for 5 days after addition of ThC or cytokines. TPO: 10 ng/mL, MIL-3: 10 ng/mL, ThC: 0.5 μg/mL. (**B**) Proliferation of Ba/F3, Ba/F3-HuMpl, Ba/F3-HuEPOR, and Ba/F3-HuGCSFR cells by ThC and each cytokine. ThC: 1 μg/mL, TPO: 10ng/mL, EPO: 10 ng/mL, G-CSF: 10 ng/mL. (**C**) Proliferation of UT-7/TPO and UT-7/EPO by TPO (10 ng/mL), EPO (10 ng/mL) and ThC (1 μg/mL). (**D**) Immunoblot analysis of Ba/F3 and Ba/F3-HuMpl cells upon steady-state activation by TPO and ThC.

Table 5. A comparison of cell proliferation activity for TPO and TPO mimetic compounds

Compound	Type	MW (Da)	EC_{50} (nM)	Drug status
Romiplostim	Protein	50 k	0.2[a]	Approved
rhTPO	Protein	18.6 k	0.1[a]	–
ThC	Protein	14 k	10[a]	–
AF12505	Peptide	1754	400[a]	
Eltrombopag	Syn	442	270[a]	Approved
Xanothocillin	Nat	302	13[b]	–

[a]Tested on Ba/F3-HuMpl or [b]UT7/TPO, UT7/EPO-mpl cells. Syn: synthetic molecule, Nat: natural product.

2 節　単糖による ThC の活性への影響

第 1 章では X 線結晶構造解析により、ThC は 2 量体として存在し、それぞれの糖結合部位において 2 分子のカルシウムを介してフコースもしくはマンノースと結合していることを明らかにした。これを踏まえ、ThC による TPO 様活性もまた、糖が関与しているのではないかと考え、細胞の培地中に各種単糖を添加し、ThC による細胞増殖に影響を与えるか調べた（Figure 25A)。コントロールとして用いた TPO に糖を添加した際には、フコースを除き有意な影響は見られなかった（Figure 25A(ii)）。フコース添加時の増殖率は 70%程度であった。高濃度においてフコースは細胞の増殖に影響を及ぼすとの報告があることから、今回も同様の現象が起きたと考える(*54*)。一方、ThC ではフコースとマンノース添加時に顕著な増殖阻害が確認された（Figure 25A(i)）。ThC が培地中のフコース/マンノースに結合したことから、受容体糖鎖へ結合できなくなり、活性が阻害されたと考えた。そこでこれら 2 種の糖について、ThC の活性に対する IC_{50} 値を算出した。その結果、フコースは 22.8 μM、マンノースは 6.7 mM となり（Figure 25B)、ITC の結果（Figure 19）と同様 ThC はフコースとより高い親和性を示し、その性質が TPO 様活性の発揮にも関与していることが明らかとなった。さらにこの結果から、ThC は MPL の糖鎖中の糖に結合することで受容体を活性化していることが示唆された。

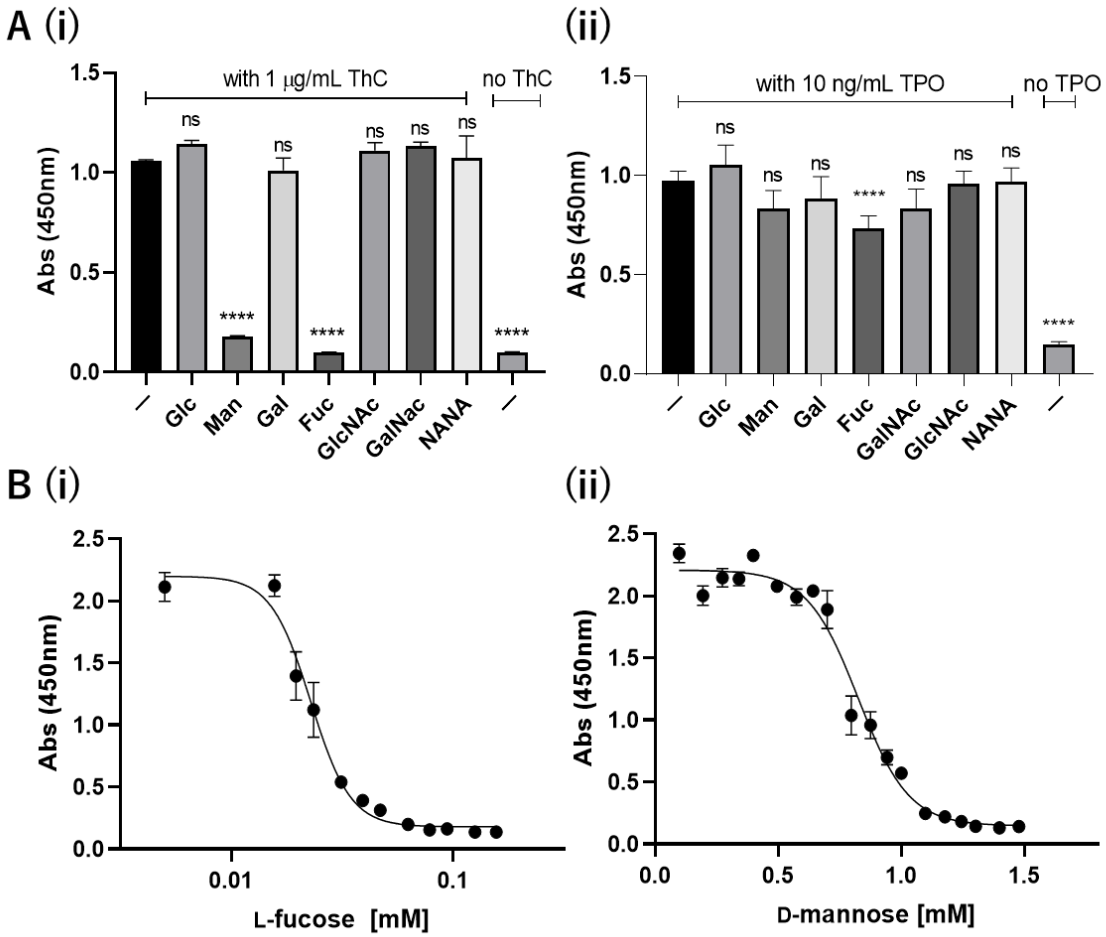


Figure 25. Effect of various sugars on the activity of ThC

(**A**) (i) ThC or (ii) TPO and 10 mM sugar were added to the medium of cells and incubated for 4 days, and the effects on cell proliferation was examined. (**B**) Concentration-dependent inhibition of (i) fucose or (ii) mannose upon cell proliferation by ThC treatment (1 μg/mL). EC_{50} values by fucose and mannose were 22.8 μM and 6.67 mM.

3 節　各種レクチンによる活性

前節の結果を受け、フコースもしくはマンノースに結合するレクチンであれば ThC 同様に TPO 様活性を示すのか？という問いに答えるため、Table 6 に示す各種レクチンを細胞に添加し、その増殖を調べた。その結果、PA-IIL を添加したときに細胞の増殖が確認された（Figure 26A)。PA-IIL は 1 章で述べたように ThC と類似した立体構造を示し、糖結合の特異性も同じである。したがって、PA-IIL が ThC と同様の活性を示したことは順当である。一方、PA-IIL に加え BC2LC-ct も ThC と類似した構造を持つにもかかわらず、活性を示さなかった。この二者の違いは何か?　ITC データに示すように、BC2LC-ct はフコースと結合しない点が唯一の相違点である。この結果から、類似した構造を持つレクチンの中で、ThC と PA-IIL のみが活性を示すのは、フコースへの結合能によるものである可能性が示唆された。さらに、紅藻由来レクチンである hypnin により ThC が阻害されたことから、その IC_{50} を調べてみると、5.9 μg/mL であった（Figure 26B(i)）。一方で、コントロールとして Ba/F3 細胞に対する mIL-3 の活性への hypnin による活性阻害を調べたところ、IC_{50} は ~47 μg/mL であった（Figure 26B(ii)）。両者の IC_{50} 値に 8 倍程度の差があることから、hypnin の ThC に対する活性阻害は単に細胞毒性ではなく、ThC の活性を特異的に阻害していると考えられる。これはレクチン同士が標的糖鎖を競合しているためであると考える。Hypnin は糖への結合選択性が非常に厳密であり、α(1,6) fucose にのみ結合することが知られている(*55*)。ThC は ITC、X 線結晶構造解析の結果から単糖のフコースにも結合することが分かっているが、これらの知見は MPL 活性化に必要な標的糖はα (1,6) fucose である可能性を示唆するものである。

Table 6. Properties of lectins used in the assay (Figure 26A)

	Derived species	**Sugar specificity**
ThC	Unknown	Fucose/Mannose
PA-IIL	*Pseudomonas aeruginosa*	Fucose/Mannose
BC2LC-ct	*Burkholderia cenocepacia*	Mannose
ConA	*Canavalia ensiformis*	Mannose
Hypnin	*Hypnea japonica*	α(1,6) fucose

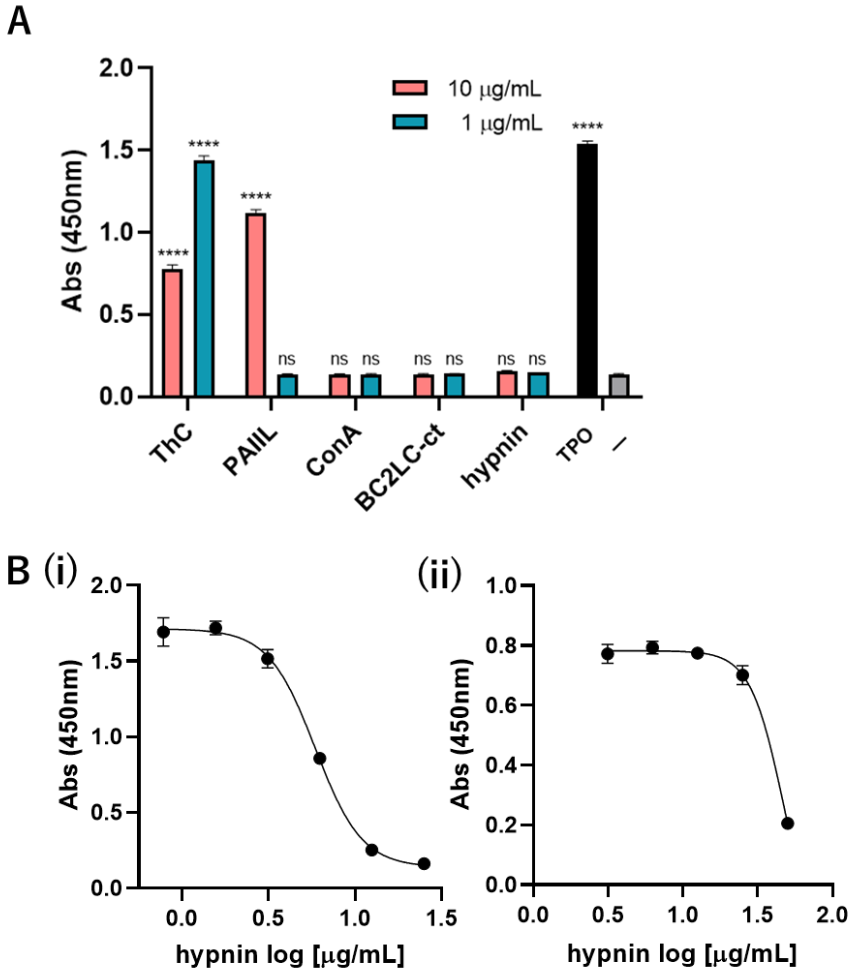


Figure 26. Growth of Ba/F3-HuMpl by various lectins

(**A**) Inhibition of ThC activity by various lectins. TPO (10 ng/mL) and PBS(-) were used as control. (**B**) Inhibition of ThC and TPO activity by hypnin. (i) Effect of hypnin on the proliferation of Ba/F3-HuMpl cells in the presence of ThC (1 μg/mL). IC_{50}: 5.9 μg/mL. (ii) Effect of hypnin on the

proliferation of Ba/F3 cells in the presence of TPO (10 ng/mL). IC_{50}: ~47 μg/mL.

4 節　阻害剤を用いた ThC の活性評価

これまでの結果から、ThC は受容体糖鎖中のフコースに結合し、MPL の活性化を引き起こしていることが示唆された。そこで、フコース糖鎖合成阻害剤である以下の 2 種のより詳細に検討することとした。用いた試薬は 6-alkynyl-fucose (6-Alk-Fuc)と 2-deoxy-galactose (2-D-Gal)である。通常、細胞内で使用されるフコース獲得方法には、直接細胞外からフコースを取り込む salvage 経路とマンノースを酵素的にフコースに変換する *de novo* 経路の 2 種類が存在する（Figure 27）(*56*)。6-Alk-Fuc は培地に添加することで細胞に取り込まれ、salvage 経路に乗り、フコースの代わりに 6-Alk-Fuc 含有糖鎖が合成される。または *de novo* 経路上の酵素（GDP-fucose synthase: FX）を阻害することで、GDP-fucose の合成が阻害されフコース欠損糖鎖となる。どちらにおいても、フコース結合レクチンに認識されなくなるため、フコース含有糖鎖合成阻害剤として有用通されている（Figure 28）(*57*)。2-D-Gal は 2 位の水酸基が外れているため、その水酸基を介してα(1,2)結合するはずのフコースが結合できなくなり、α(1,2) fucose 欠損糖鎖となることが知られている。これら化合物が ThC の活性にどのような影響をもたらすかを調べることで ThC の標的糖の詳細な情報を得ることとした。培地中に 6-Alk-Fuc を添加すると、TPO に比べ ThC で顕著に活性が阻害された（Figure 28B）ことから、ThC はマンノースではなくフコースに結合していることが示された。一方、2-D-Gal においては TPO と ThC の間に IC_{50} 値の大きな差が見られなかった（Figure 28C)。この結果と前節で得られた hypnin による ThC の活性阻害、2-D-Gal による活性阻害が見られない点を総合して考えると、ThC は MPL 糖鎖中のα(1,6) fucose に結合して受容体活性化を引き起こしてる可能性が示唆された。

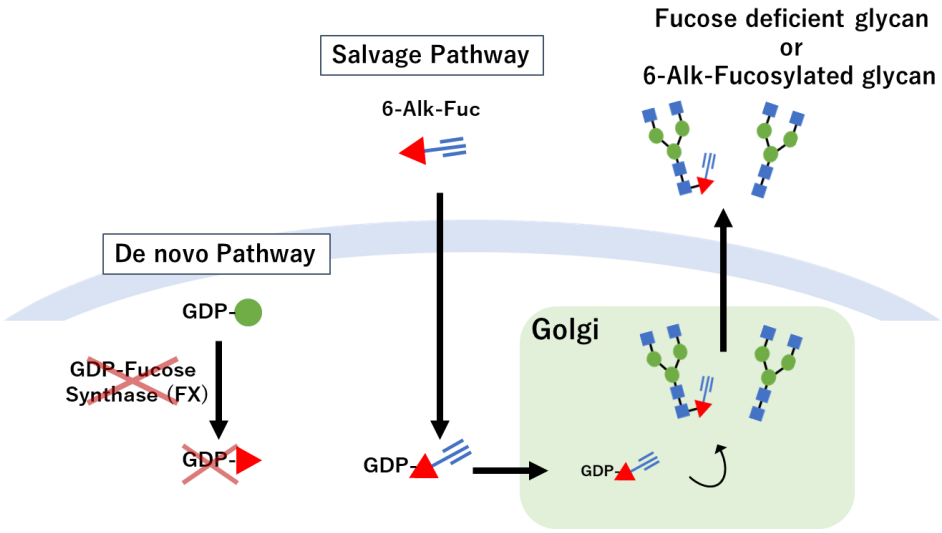


Figure 27. Effect of 6-alkynyl-fucose (6-Alk-Fuc) on the glycans of cells.

Two types of fucose usages in cells: the salvage pathway, where fucose from external sources is directly taken, and the *de novo* pathway, in which fucose was enzymatically converted from mannose. The added 6-Alk-Fuc is taken up by the cells and either 6-Alk-Fuc-containing glycans are synthesized instead of fucose in the salvage pathway, or, fucose-deficient glycans are synthesized due to inhibition of the key enzyme FX in the *de novo* pathway.

*Figure was taken from (*57*) with partial modification.

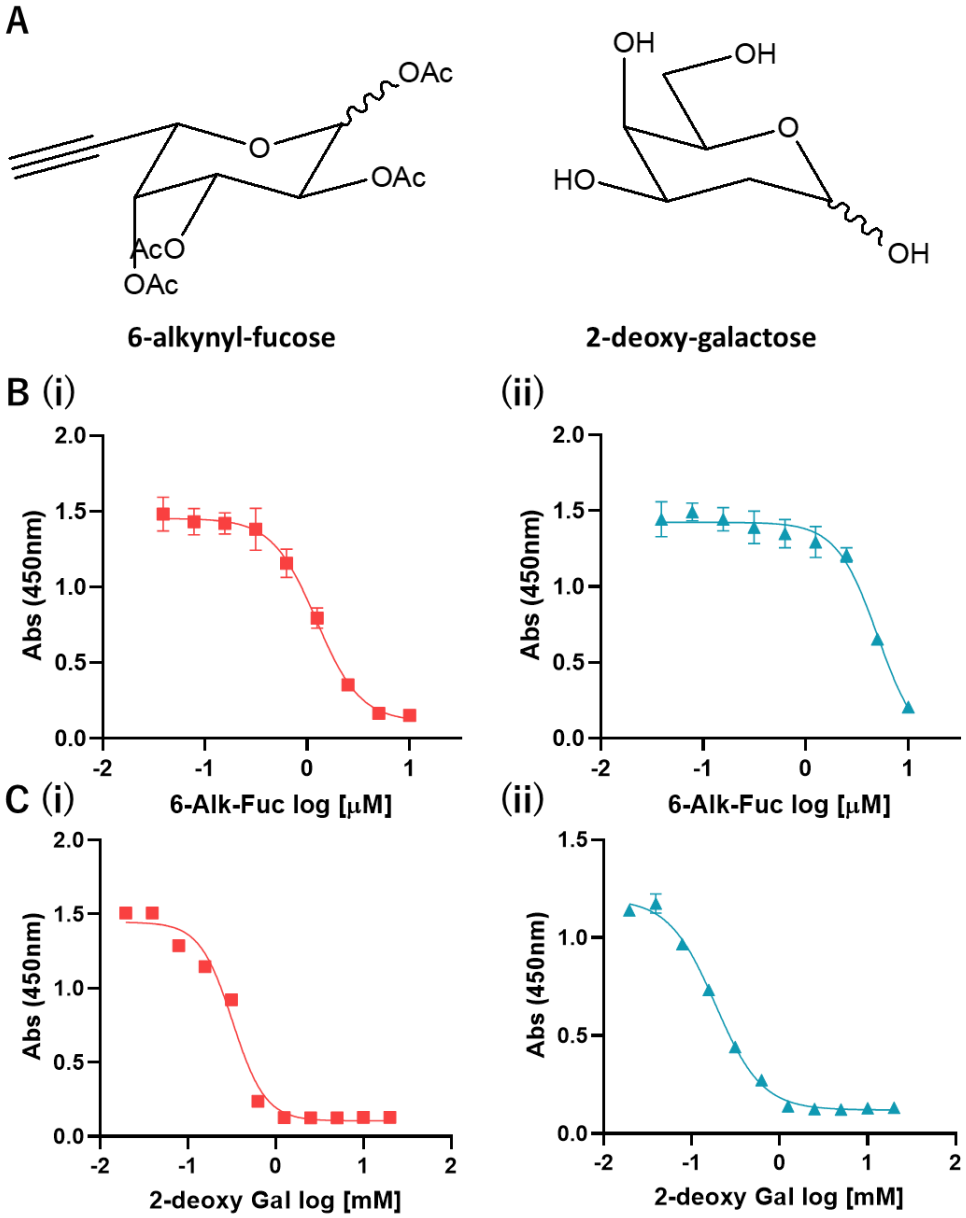


Figure 28. Effect of inhibitors on ThC and TPO

(**A**) Structure of 6-alkynyl-fucose (6-Alk-Fuc) and 2-deoxy-galactose (2-D-Gal). (**B**) 6-Alk-Fuc mediated inhibition of cell proliferation induced by (i) ThC (1 μg/mL) and (ii) TPO (10 ng/mL). The activity of ThC was inhibited in a concentration-dependent manner. IC_{50} values of ThC and TPO by 6-Alk-Fuc was 1.2 μM and 5.0 μM. (**C**) 2-D-Gal mediated inhibition of cell proliferation induced by (i) ThC (1 μg/mL) and (ii) TPO (10 ng/mL). The activity of ThC was inhibited in a concentration-dependent manner. IC_{50} values of ThC and TPO by 2-D-Gal was 0.32 mM and 0.19 mM.

5 節　MPL 糖鎖欠損変異体を用いた ThC の活性評価

MPL には 117、178、298、358 番の 4 ヶ所の N-グリカン結合部位が存在し、その 4 つともに糖鎖が付加していると考えられている（Figure 29A）（*58*）。これら糖鎖の構造は不明であるが、その機能については各種の実験が行われており、MPL のタンパク質としての安定性の保持や細胞表面への局在性に重要であるとの考察がされている(*58*)。

そこで、ThC がどの残基の糖鎖に結合しているのかを調べるため、MPL 変異体を作成し、ThC の活性への影響を調べた。作成した変異体は、4 ヶ所の N-グリカン結合部位のうち 1 カ所のみを Q へ置換した N178Q、N198Q、N298Q、N358Q の 4 種類と、1 カ所の N を残し 3 か所を Q に置換した、N178/298/358Q、N117/298/358Q、N117/178/358Q、N117/178/298Q の 4 種に加え、4 カ所すべてを置換した N117/178/298/358Q の全 9 種である。これらの変異体を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、レポーターアッセイを用いてリン酸化 STAT5 による転写量を調べた（Figure 29B)。コントロールとして用いた TPO 添加時では、MPL WT と変異体群で有意差は見られなかった。一方、ThC による活性化時には変異体群の中で N117 が欠損しているとき、すなわち、N117Q mutant と N117/298/358Q、N117/178/358Q、N117/178/298Q、N117/178/298/358Q mutant において活性が有意に減少した。これらのことから、ThC は N117 結合糖鎖に結合することで MPL の活性化を引き起こしていると推察される（Figure 29B(i)）。

興味深いことに、MPL の 4 ヶ所の糖鎖の中でも N117 のみが哺乳類から魚類に至るまでの多くの生物で保存されている(Figure 29C)。これまでの報告から MPL 上の各糖鎖は MPL の活性化に必須ではないが、特に N117 結合糖鎖は MPL の細胞表面への局在化に重要な役割を果たしていることが推察されてきた(*58*)。更に最近の報告では、骨髄増殖性腫瘍(MPN)という血液ガンの原因物質として変異した分子シャペロン（CALRmut）が小胞体で MPL の N117 糖鎖に結合しそのまま細胞表面に発現して、TPO 非存在下でも MPL の活性化を

引き起こしてるという報告がある(*59, 60*)。これは CALR のフレームシフトにより偶然生まれた現象であるが、N117 糖鎖が他の糖鎖に比べ、種間を超えて共通した役割を担っているのかもしれない。

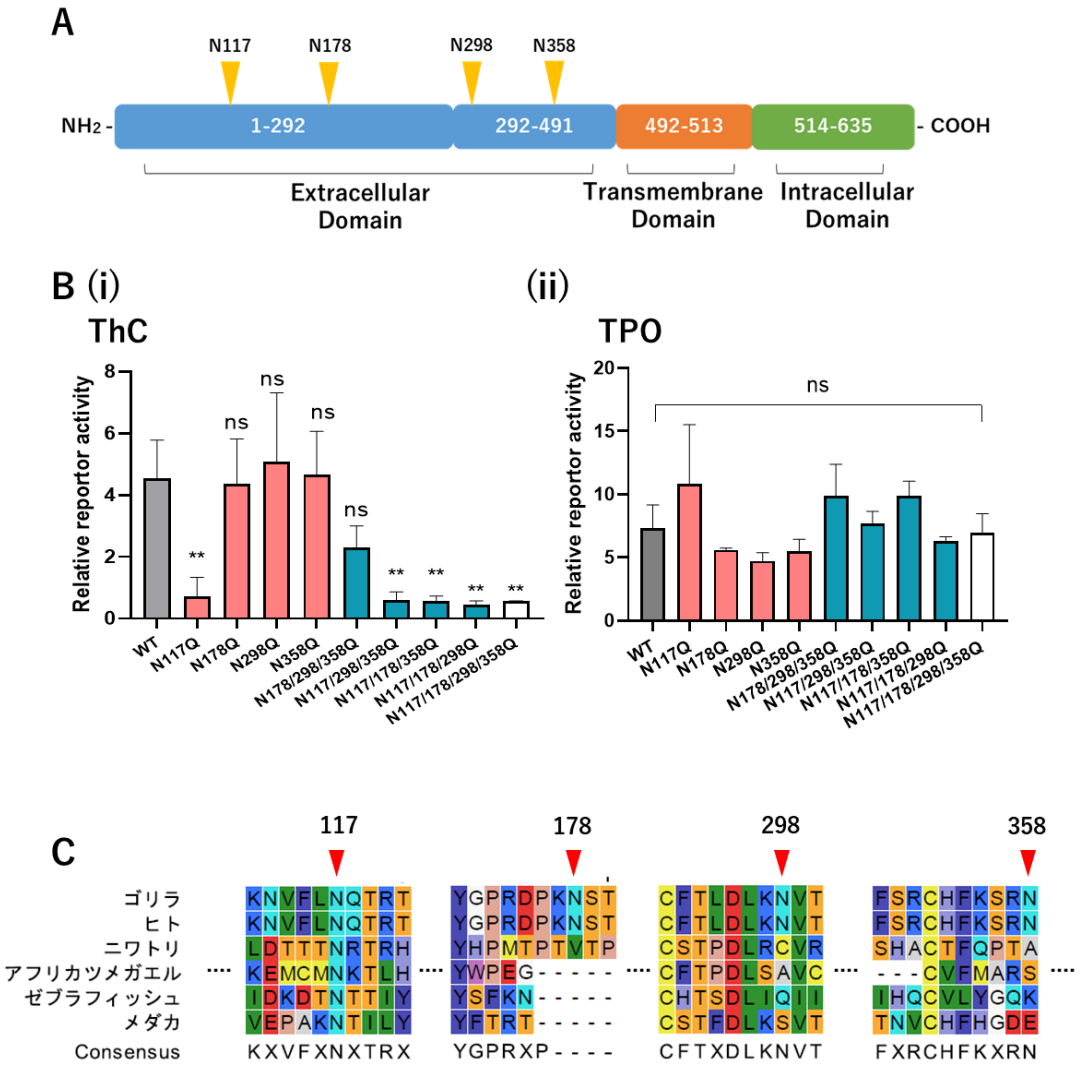


Figure 29. N-glycans of TPO receptors

(**A**) Domain and number of amino acid residues of human TPO receptor. Yellow arrows indicate the N-glycan consensus sequence. (**B**) Effect of mutations on potential N-glycosylation sites on MPL for activation by ThC (1 μg/mL). STAT5 reporter activity representing MPL activation status was measured and is depicted. Gray bar: wild-type (WT) MPL, red bars: single-site mutant MPL, green bars: triple-site mutant MPL, and white bar: quadruple-site mutant MPL. (**C**) A comparison

of N-glycan consensus sequences of MPLs in various animals. Only N117 is conserved in all animals surveyed.

6 節　シグナルの持続時間と細胞表面受容体の発現量

次に ThC による活性化についてより詳細に理解するために細胞内シグナルの持続時間と細胞表面受容体の発現量を調べる実験を行った。本来、MPL は TPO と結合し活性化すると速やかに細胞内に取り込まれ、分解、もしくはリサイクルされて細胞表面に戻ることが知られている。これは、適切なシグナルの持続時間や血中の TPO 濃度の調節にも関与しており、重要な役割を担っている(Figure 30A)(*61*)。一方で、CALRmut が結合した MPL では、CALRmut-MPL 複合体が長時間細胞内に取り込まれずに、細胞表面に残り続ける。さらに表面に残った複合体が細胞内にシグナルを送り続けるため、異常な細胞増殖や分化が起こってしまう事が明らかとなっている(Figure 30A)(*62*)。これらの知見を基に同じ N117 糖鎖に結合していると思われる ThC ではどうようになっているのか調べた。

初めに細胞の下流シグナルの継続時間を TPO と比較した(Figure 30B)。事前に培地からアゴニストを除去した状態で 24 時間スタベーションした後、TPO もしくは ThC を添加した時間を Time 0 とした。TPO では添加後 10 分でシグナルが入り、30 分で極大を迎えた後、120 分時点ではバンドが薄くなっている。一方 ThC では 30 分でシグナルが入った後、微弱ながらも 360 分まで持続していた(Figure 30B)。次にアゴニスト添加後の細胞表面の MPL 発現量の変化を調べたところ、下流シグナルに連動して細胞表面 MPL 量も ThC 存在下において内在化が抑制されていることが示された(Figure 30C)。したがって、ThC による MPL 活性化の挙動は CALRmut と非常によく類似していることが示された。一方で、CALRmut はタンパク質として発現する細胞と作用する細胞が同一であるため、スタベーション後、下流因子を活性化するまでの時間を計測する等の条件で実験を行うことができなかった。ThC が TPO と比較してシグナルを入れるまでに要する時間が長いという結果は、糖鎖を介した MPL 活性化における初めての知見であり、Figure 24D で得られた定常状態における p-STAT5 のバンドが TPO と比べて非常に薄いことと総合して考えると、ThC に

よる MPL 活性化は TPO よりも弱いが長時間持続するという特徴を持つ。すなわち、MPL の糖鎖を介した活性化では生理的アゴニストである TPO とは少し異なる細胞表面受容体の動きを導き、それに伴う細胞内シグナリングを引き起こすことが示された。

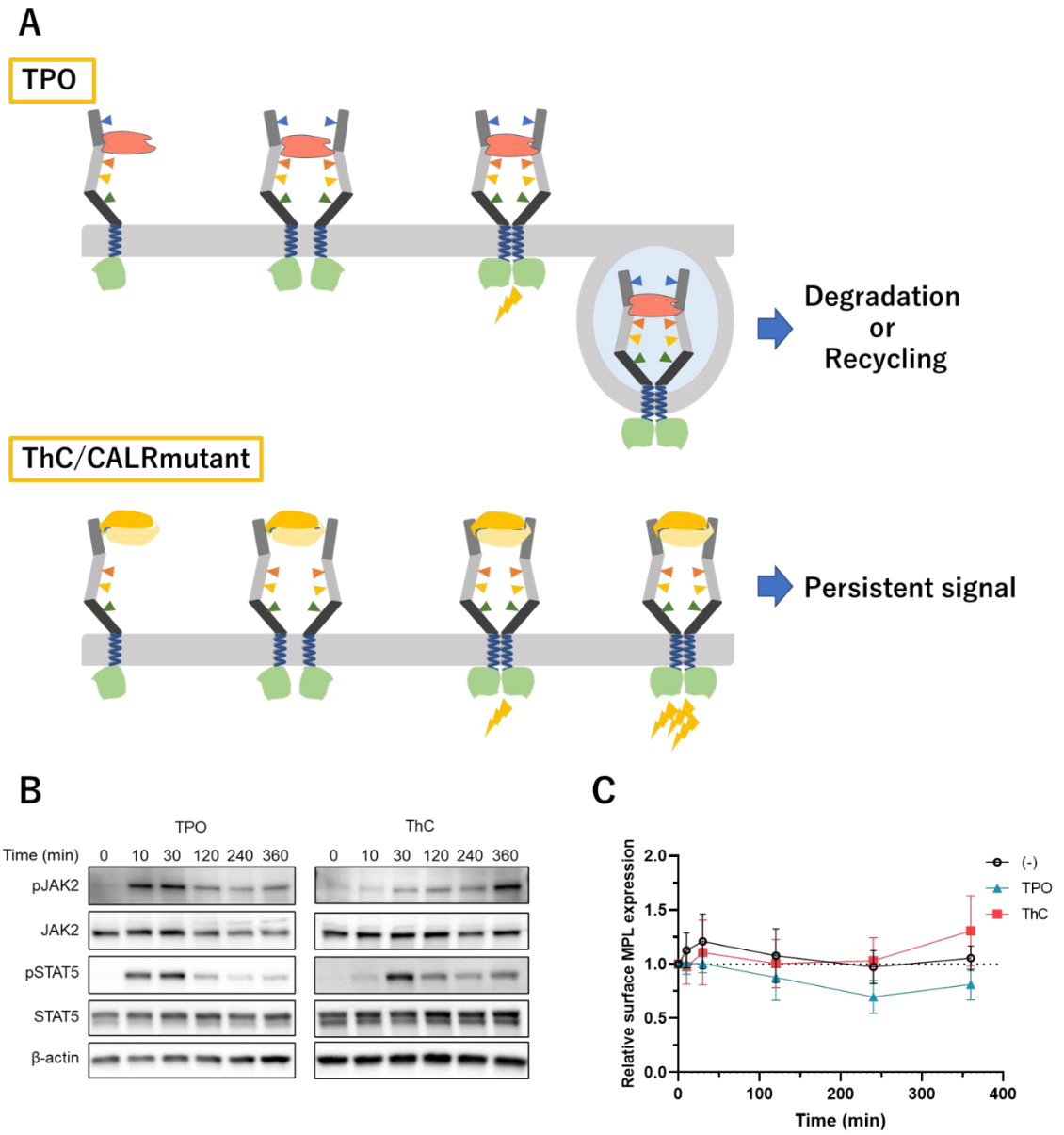


Figure 30. Motion of TPO receptors on the cell surface and associated signaling

(**A**) Proposed behaviors of cell surface MPL by TPO or ThC/CALRmut, (**B**)Time-dependent activation of MPL-downstream molecules in Ba/F3-HuMpl cells treated with ThC (1 μg/mL) and

TPO (2 ng/mL). Phosphorylation of STAT5 and JAK2 was monitored at the indicated times after the addition of an agonist. (**C**) Relative amount of MPL on the cell surface. 0, 10, 30, 120, 240, and 360 min after the addition of ThC (1 μg/mL) and TPO (2 ng/mL).

7 節　PA-IIL による MPL 活性化

これまでの結果からバクテリア由来 PA-IIL は ThC と非常に類似した構造を持ち、Ba/F3-HuMpl 細胞を増殖させることから TPO 様活性を持つことが明らかとなった。そこで PA-IIL の活性の詳細を調べ、ThC との類似点・相違点を比較することでレクチンによる MPL 活性化の更なる詳細に迫ることを目指した。まず初めに PA-IIL による Ba/F3-HuMpl 細胞増殖の EC_{50} を算出したところ、17.45 μg/mL であり、ThC と比較すると約 70 分の 1 の活性であった（Figure 31A)。上記でも述べているようにこれらのレクチンの立体構造は非常に類似しており(Figure 23A)、更に ITC のデータでは PA-IIL の方がフコースへの結合能が高かった（Figure 19A, S7)。それでは、活性にこのような差あるのはなぜであろうか？この活性の差が何によるものか検討するため、ThC と PA-IIL の 4 次構造を比較した。すなわち、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた分子量推定（Figure 31B）では、ThC はおもに 2 量体で存在するのに対し、PA-IIL では 4 量体を形成していた。そこで、結晶構造を比較したところ ThC は結晶格子内に 2 量体として存在していたのに対し、PA-IIL では 4 量体を形成していた（Figure 31C)。2 量体で存在する ThC が MPL の糖鎖に結合し MPL の 2 量体化を仲介しているのであれば、4 量体の PA-IIL では立体障害が生まれ、MPL の活性化が起こりにくくなっているのではないかと考えた。PA-IIL と ThC の結晶構造を詳細に比較してみると、Figure 31D に示すように PA-IIL では 81 番目が疎水性アミノ酸であるバリン（V81）により、ダイマー同士が疎水性相互作用によって 4 量体化していることが推察された。ThC では同位置にあるアミノ酸がセリンであったため、PA-IIL V81S と Q81E/V81S/I82S という 2 種類の変異体を作成し、PA-IIL が 2 量体として溶液中で存在すれば ThC と同等の活性を示すのかを検証することとした。まず各変異体をゲル濾過クロマトグラフィーに供し、推定分子量を測定したところ、Q81E/V81S/I82S 変異体ではおおよそ 2 量体の分子量であった一方、V81S 変異体では 4 量体のままであった（Figure 32A)。

このことを踏まえ細胞増殖実験を行ったところ、予想に反し、2 量体となった Q81E/V81S/I82S 変異体では WT に比べ、活性にほとんど変化が見られなかった（EC_{50}: 19.3 μg/mL）一方、V81S 変異体の活性は若干上昇していた（EC_{50}: 4.8 μg/mL）ものの、ThC には及ばない値であった（Figure 32B）。この結果の直接的な原因は不明であるが、ThC に比べ PA-IIL の活性が弱い理由として多量体形成能の違いのみではないことが窺われた。

次に X 線結晶構造解析のデータから ThC と PA-IIL の結合フコースについての詳細な比較を行うため、片方の結合フコースを重ね合わせ、もう片方のフコースが ThC と PA-IIL 間でどの程度ずれが生じるかを調べた。その結果、ThC のフコース間の距離は 39.6 Å で、PA-IIL のフコース間の距離は 36.4 Å であり、3.2 Å の差があった。また、両者のフコース間の距離は 6.7 Å で角度は 8.9° であった（Figure 32C）。

エルトロンボパグなど MPL の膜貫通ドメインに作用する低分子アゴニストの発見により、MPL が活性化する際に MPL が 2 量体化するだけでなく、膜貫通ドメインがねじれることも必要であることが明らかとなっている（*63*）。一見、非常に類似した構造を持つ ThC・PA-IIL の MPL アゴニスト活性が大きく異なるのは、フコース同士の距離やねじれの微妙な差が寄与している可能性が高い。また、PA-IIL よりもさらに ThC にアミノ酸配列相同性の高い *Serratia* sp.由来の fucose-binding lectin を大腸菌で発現し、その活性を Ba/F3-HuMpl3 細胞を用いて評価したが、細胞増殖は示さなかった（Figure S9）。このレクチンに関してはアミノ酸配列以上の情報が無いため、本当に fucose-binding lectin なのか、発現実験・リフォールディングがうまくいっていないのか、など不明な点が多いが、*Serratia* 以外にも類似した配列を持つバクテリアが数種類報告されていることから（Table S1, 8）、今後、これらのタンパク質を全て発現させ活性を調べることで PA-IIL を含む ThC 類似レクチンの TPO 様活性の全体像が見えてくると考える。

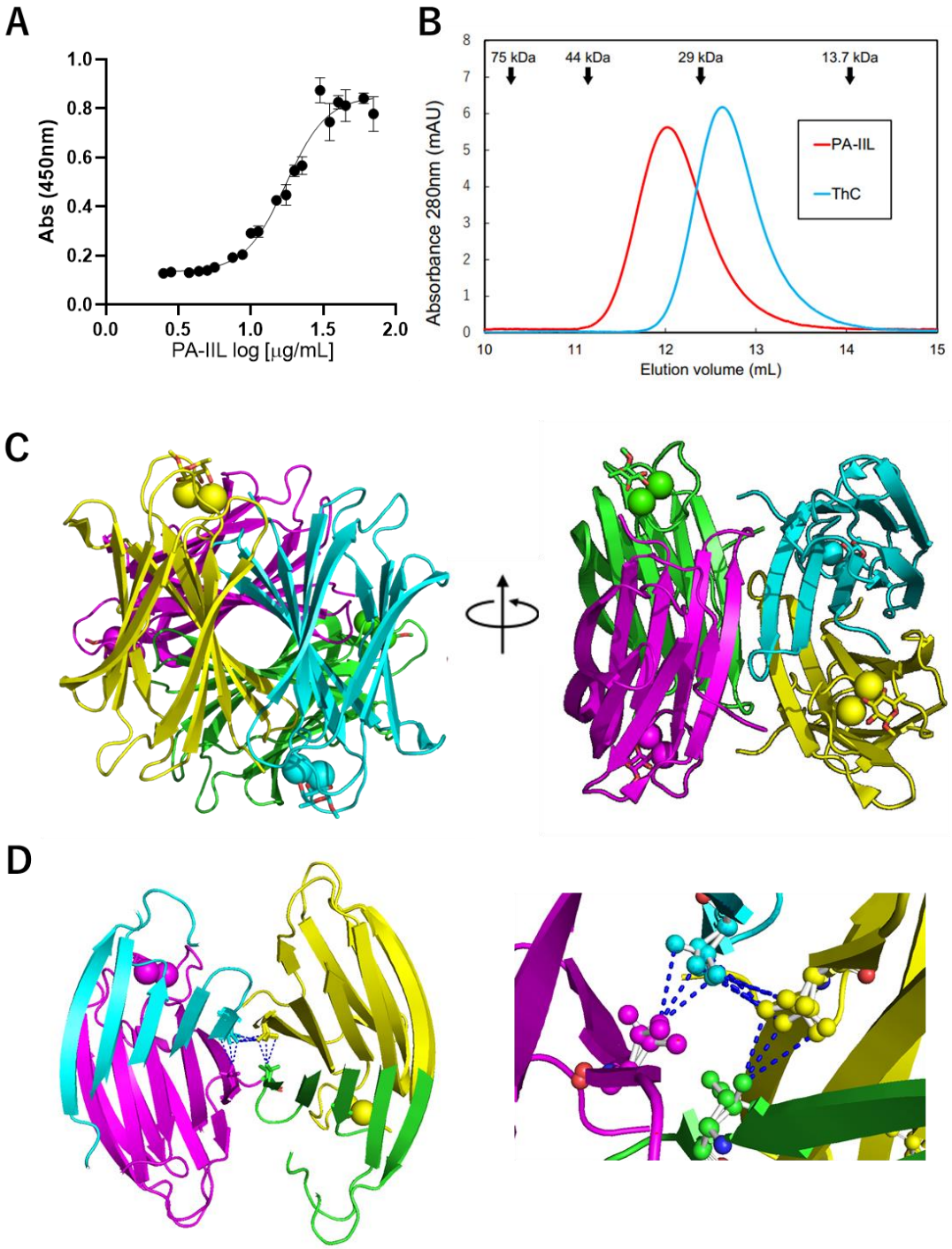


Figure 31. TPO-like activity and multimer formation of PA-IIL

(**A**) Concentration dependency of Ba/F3-HuMpl cell proliferation induced by PA-IIL (EC_{50}: 17.5 μg/mL). (**B**) A comparison of ThC and PA-IIL under non-denaturing conditions by Size Exclusion Chromatography. ThC forms a dimer, while PA-IIL is suggested to form a tetramer. (**C**) Tetrameric structure of PA-IIL. (**D**) Interaction of tetrameric PA-IIL in V81.

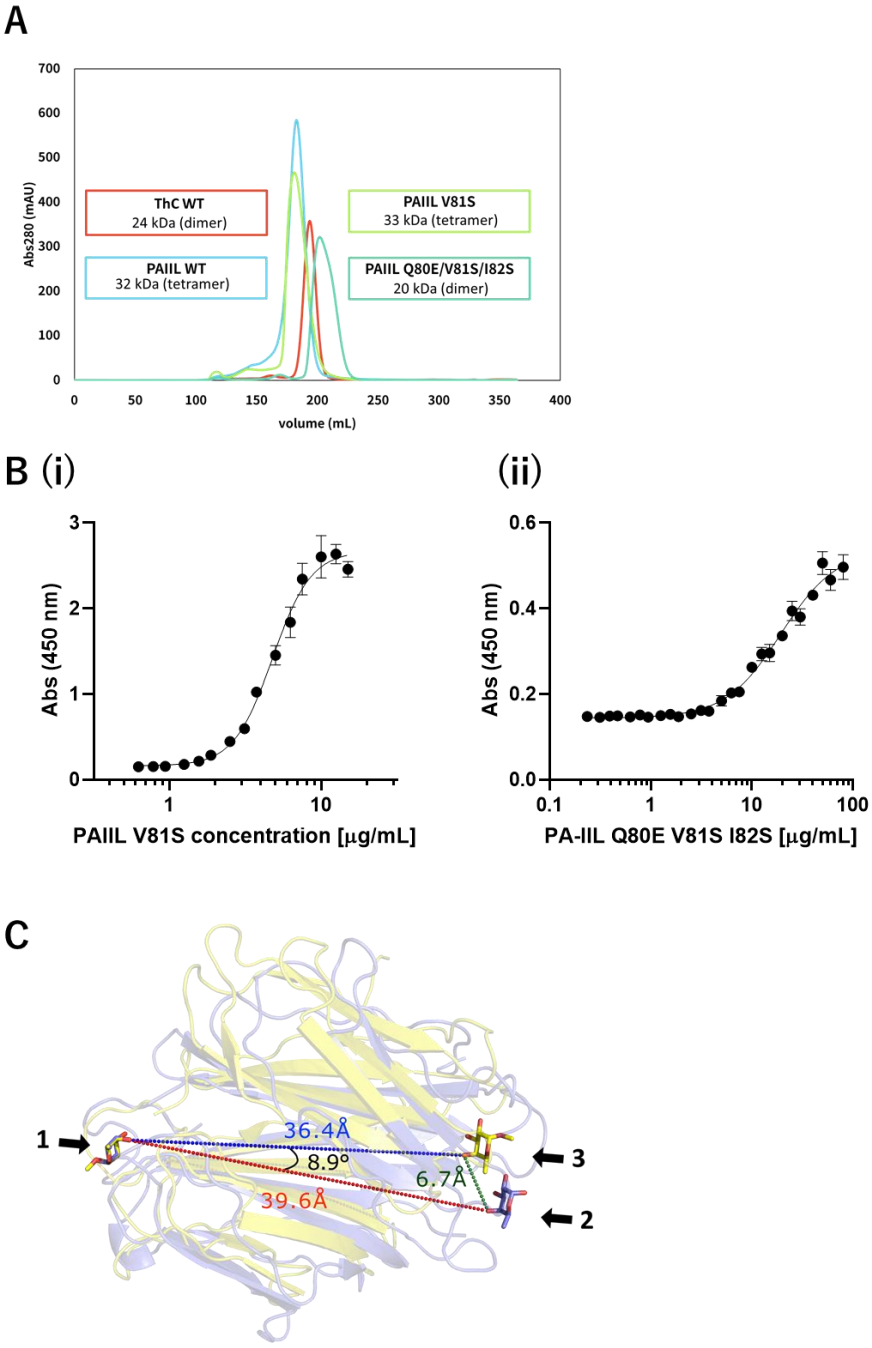


Figure 32. Multimer formation by PA-IIL mutants and their activities

(**A**) Size exclusion chromatography of PA-IIL WT, mutants and ThC. (**B**) Concentration dependency of Ba/F3-HuMpl cell proliferation induced by PA-IIL (i) V81S and (ii) Q80E/V81S/I82S mutants. (EC_{50}: 4.8 and 19.3 μg/mL). (**C**) Relative positions of two fucose molecules bound to the ThC dimer and PA-IIL dimer. One of the two fucose molecules bound to each is superimposed (fucose on the left). The other fucose molecule is shown as sticks. Purple represents the fucose

bound to ThC, and yellow represents the fucose bound to PA-IIL. The numbers represent the distance between O4 atoms (red: between two fucoses of ThC, blue: between two fucoses of PA-IIL, green: between fucoses of ThC and PA-IIL) and the angle between the three O4s of superimposed fucoses, that of PA-IIL bound fucose, and that of ThC bound fucose. Ribbon diagrams of the ThC dimer (purple) and PA-IIL dimer (yellow) are also shown in translucent form.

本章 1 節で ThC は Ba/F3-HuMpl3 細胞のみを増殖させるという結果を得ている（Figure 24)。一方、PA-IIL で同様の実験を行ったところ、Ba/F3-HuMpl3 に加え、Ba/F3、Ba/F3-HuEPOR、Ba/F3-HuGCSFR の 4 種の細胞全てにおいて増殖活性を示した（Figure 33A)。この現象の詳細はまだ不明であるが、以下の可能性が考えられる。

１）これら 4 種の細胞には共通して mIL-3 受容体が発現しており、mIL-3 受容体のアゴニストとして働いている可能性

２）mIL-3、TPO、EPO、GCSF 受容体にそれぞれ作用している可能性

３）受容体を介さない全く別の経路による細胞増殖活性

一方で、UT-7/TPO、UT-7/EPO に PA-IIL を添加しても細胞増殖は確認されなかった（Figure 33B)。このことから、PA-IIL が作用しているのは Ba/F3 細胞に特異的に発現している mIL-3 受容体、もしくは、Ba/F3 細胞上の TPO、EPO 受容体と UT-7 細胞上の TPO、EPO 受容体の糖鎖構造が異なっており、そのために同じアミノ酸配列を持つ受容体の存在下でも細胞種によって、反応が異なることが考えられる。

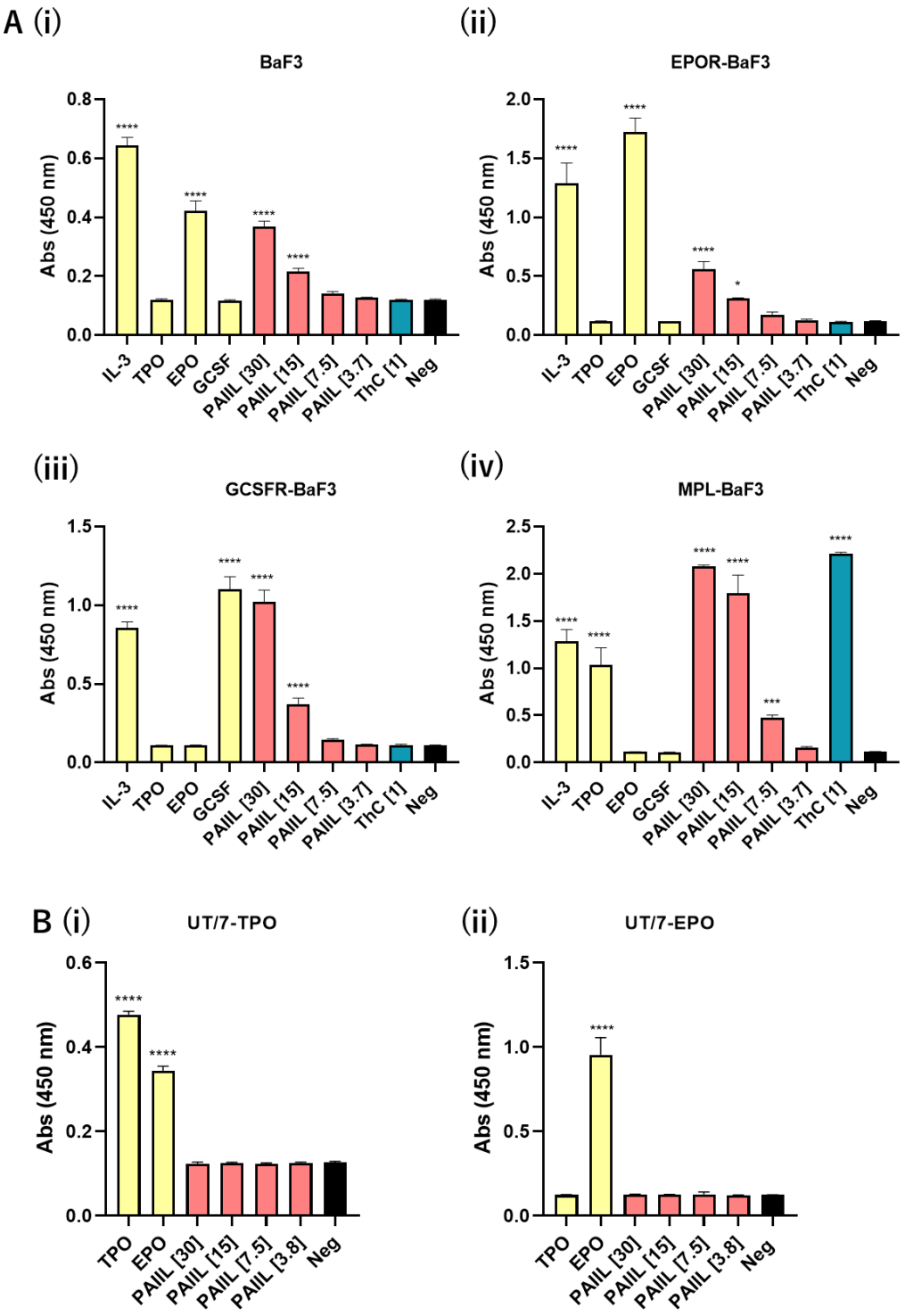


Figure 33. Activity of PA-IIL on various cells

(**A**) (**B**) Proliferation of various cells by cytokines, ThC, and PA-IIL. mIL-3/TPO/EPO/GCSF: 10 ng/mL, PA-IIL/ThC at the given concentration [μg/mL].

8 節 MPL アゴニストの相乗効果

これまでの結果から、TPO・ThC・エルトロンボパグはそれぞれ異なる作用機構で受容体を活性化していることが明らかとなった。これを踏まえて、これらのアゴニストは相乗効果を示すのか調べることとした。単独では細胞増殖活性を示さない低濃度（0.1 μg/mL）の ThC 存在下で、TPO・エルトロンボパグの concentration-response curve を描き、EC_{50} を比較した。その結果、ThC の存在下で TPO の EC_{50} は 2.64 ng/mL から 0.27 ng/mL へ約 1/10 にまで低下した（Figure 34A(i)）。一方で、エルトロンボパグに対する EC_{50} は 0.24 μM から 0.21 μM へと減少傾向を示したが、ほとんど変化が無かった（Figure 34A(ii)）。しかし、ThC の添加/非添加時を比較したところ、エルトロンボパグを 0.125 μM で添加した際に最も差が大きく、細胞増殖率が約 6%から約 35%にまで上昇していた。また、両者とも最大活性に変化はなかった。実験の過程で、偶然 hypnin も TPO との相乗効果を示すことが明らかとなったため、加えて実験を行った。Hypnin の TPO との相乗効果を調べたところ、EC_{50} は 1.8 ng/mL から 0.8 ng/mL と、活性は約 2 倍に増強された（Figure 34B）。なぜ、ThC と hypnin は TPO へ相乗効果をもたらすのか？Table 5-1 に記すように ThC と hypnin はどちらもフコース結合レクチンであるが、ThC は MPL アゴニストである一方、hypnin にその活性はない（Figure 26）。しかし、hypnin は ThC の活性を阻害することから、MPL 上の同じ糖鎖（フコース）に結合していることが推測される。これらの結果を総合し、レクチンによる相乗効果の機構を考察した（Figure 35）。すなわち TPO では、まず TPO の high affinity site と 1 分子の MPL が結合、さらにもう 1 分子の MPL と TPO の low affinity site と結合する必要があるが、MPL2 分子が関与するため、確率の障壁が存在する。この障壁を越えて受容体が二量化すると、MPL は速やかに活性化コンフォメーションに移行し、細胞内のドメインの活性化が始まる。一方、ThC も 2 カ所の糖結合サイトを介し MPL 糖鎖がそれぞれ結合することにより、2 分子の MPL を架橋するが、その際に、TPO とは異なり、

ThC の架橋角度や距離の問題から、すぐには活性化コンフォメーションになれずに、多くが(III)の non-active dimer の状態で存在すると仮定することができる。これは、ThC が TPO に比べて下流シグナルの活性化開始が遅れていることから支持されると考える（Figure 30B)。ThC は添加後 30 分程度経過してから、一部が activation dimer となり STAT5 のリン酸化が始まる。他方、hypnin は 2 分子の MPL を架橋するも、全てが State(III)までで止まってしまう。これは、hypnin が構造上 MPL2 分子を活性化複合体として安定化させることができないことに起因すると考えられる。ThC もしくは hypnin によりあらかじめ形成された State(III)複合体に TPO が結合すると、エントロピーの障壁をスキップし、直ちに活性化コンフォメーション State(IV)となることができるため、相乗効果が観察されたのだと考えた。さらに相乗効果に寄与するもう一つの要因として、6 節で述べた ThC が TPO と比べて受容体の内在化が遅く、活性化シグナルが長時間持続するという結果も関与していると考えている。上記の仮説は、1 つの MPL 複合体に TPO と ThC 両方が結合している（TPO/ThC/2MPL complex）というモデルに基づく。この複合体の細胞表面での挙動は、TPO のように、素早く内在化するのか、もしくは ThC の影響で内在化が遅くなるのか、という疑問が生じる（Figure 30)。そこで、TPO/ThC/2MPL complex の細胞表面受容体量の経時変化を調べたところ ThC 同様、TPO に比べて長時間細胞表面に滞在し続けていることが明らかとなった（Figure 34C)。この実験を行った際の条件として ThC：0.1 μg/mL、TPO：0.2 ng/mL の濃度で添加している。これは条件検討により相乗効果が一番観察しやすい濃度として設定したが、この条件では ThC と TPO のモル数が大きく異なっている。したがって、この実験結果は 1 つの TPO/ThC/2MPL complex の細胞表面での動きを直接反映したものとは言い難いが、相乗効果が大きく出る条件下での細胞表面 MPL 全体の動きとして、内在化が抑制されているということに間違いはないと考える。このことから、ThC と TPO による相乗効果のメカニズムをまとめると

1）ThC（Hypnin）による non-active dimer (State (III))の形成による活性化エントロピーの回避

2）TPO/ThC/2MPL complex の内在化抑制による活性化シグナルの長期化

が挙げられる。しかし、留意すべき点として、この仮説は MPL がアゴニスト非存在下では細胞表面でモノマーとして存在することを前提としている。

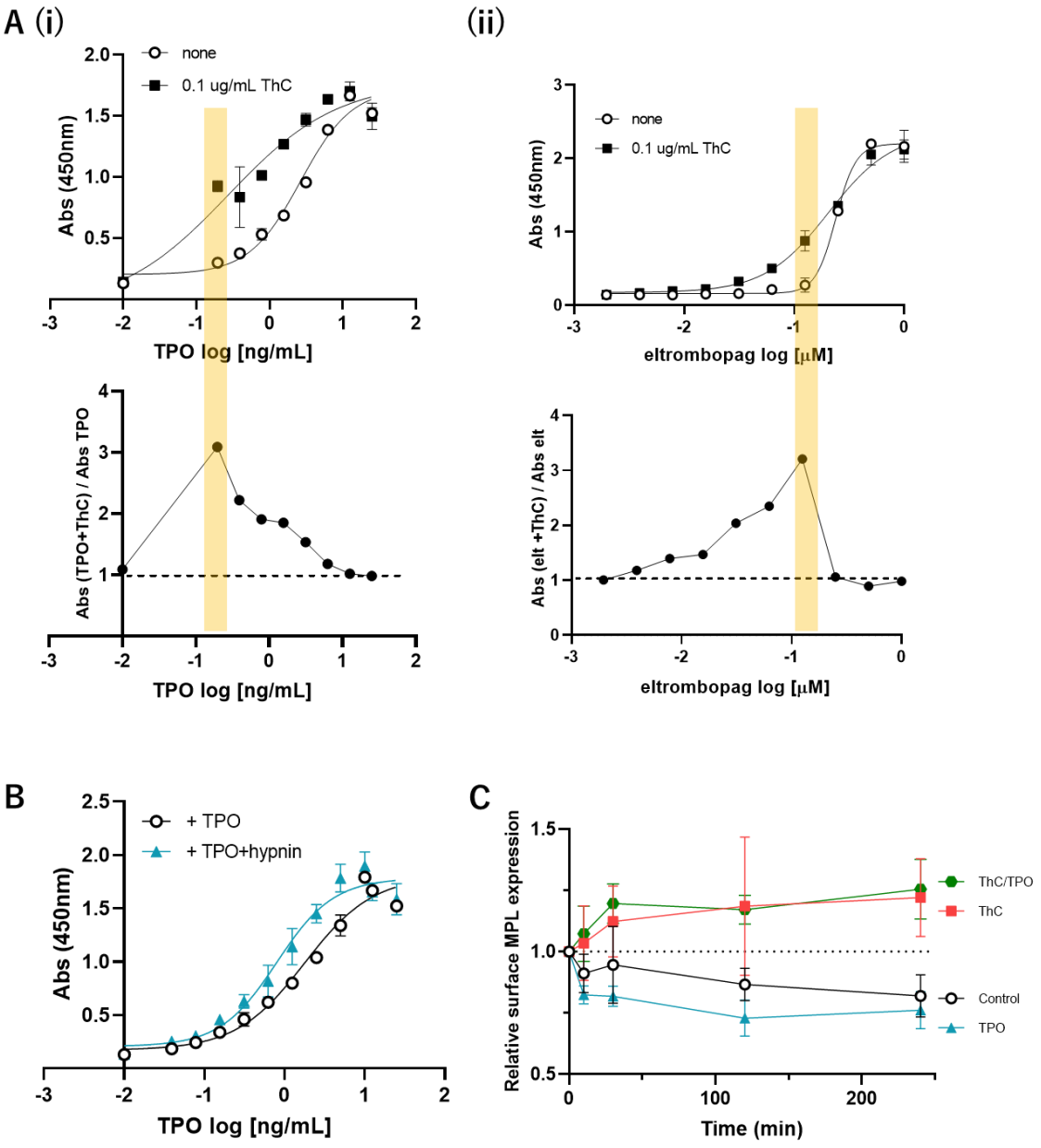


Figure 34. Synergistic effects of TPO receptor agonists and lectins

(**A**) Synergic effects observed in a given combination of agonists in the Ba/F3-HuMpl cell proliferation assay. Concentration-response curve for (i) TPO or (ii) eltrombopag in the absence or presence of fixed subactivation concentrations of ThC (0.1 μg/mL) (upper trace). The ratios of absorptions with and without ThC (0.1 μg/mL) are plotted (lower trace). (**B**) Concentration-dependent curves of TPO in the presence and absence of hypnin (5 μg/mL). (**C**) Relative amounts of cell surface receptors in the synergistic effect of A (i).

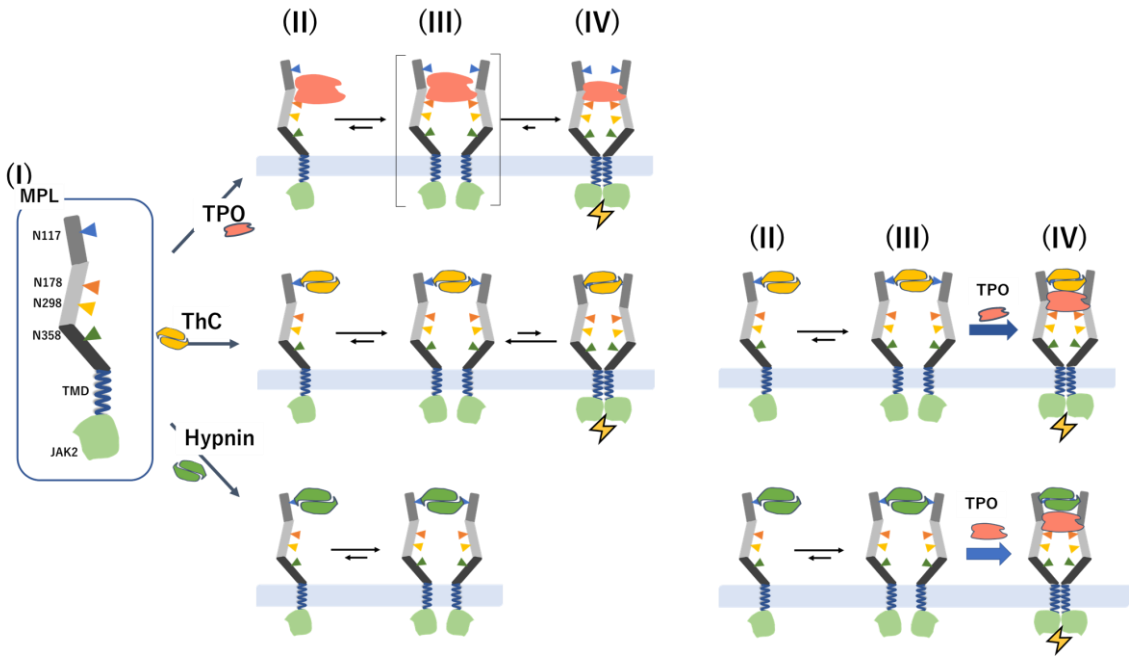


Figure 35. Proposed mechanisms for activation by two mechanistically discrete agonists, TPO, ThC and hypnin

(I) Schematic depiction of MPL. Monomeric MPL has four N-glycosylation sites at N117, 178, 298, and 358; (II) ligand-bound monomeric state with each TPO and ThC; (III) ligand-bound nonactivated state; (IV) dimeric signaling complexes.

これまで MPL を含む多くのサイトカイン受容体が、細胞表面における活性化前の状態として pre-formed dimer として細胞表面に存在し、アゴニストと結合することで active conformation になると考えられてきた(*64*)。一方で、monomer として存在するという説も

存在し、それを実験的に証明するのは困難であった。しかし最近、一分子イメージングを用い、MPL を 2 種類の蛍光で染め分けることで、MPL の単量体・二量体の動きを捉えた実験が報告され(*65*)、MPL はアゴニスト非存在下では細胞膜表面において単量体の状態で激しく動きまわっており、TPO を添加すると 2 種類の蛍光の共局在（多量体化）がアゴニスト非存在下に比べて長く観察されることが示された。この報告は、これまでの論争に終止符を打つものに思えるが、この際に使用しているのは HaLa 細胞に MPL を一過性に過剰発現させた状態での結果であり、ネイティブな血液細胞での受容体の発現量やその動きを再現したものではない。

この研究では、MPL がモノマーで存在する証拠として、TPO の添加量を過剰量まで増やすと、下流のシグナルがむしろ減衰しシグナル強度の曲線が Bell shape になると述べている(*65*)。これは、受容体の活性化に必要なアゴニスト・受容体複合体は TPO：MPL＝１：２であるが、TPO が過剰に存在することで、TPO：MPL＝１：１の複合体が多く形成されてしまい、Active complex を形成できなくなってしまうためだと考えられる（dimerize inhibition）(Figure 36)。これまでの ThC を用いた実験の結果は上述のようにモノマーで受容体が存在するモデルを支持する。もしモノマー説が正しいのであれば、下流シグナル同様細胞増殖においても Bell shape の反応曲線が得られるはずである。これを確認したところ、TPO における増殖曲線は Bell shape を示した（Figure 36)。この結果は、より簡便な細胞増殖を指標に受容体の挙動を調べることが可能であることが確認できたので、続いて、ThC、PA-IIL、エルトロンボパグに対して同様の実験を行った。その結果、予想通り、ThC、PA-IIL については TPO と同様にベル型の増殖曲線を示した（Figure 36）ことから、高濃度のアゴニスト存在下では dimerize inhibition が起こり、agonist：MPL＝１：２の状態を active complex としていることが示唆された。一方で、エルトロンボパグは一見 Bell shape のように見えるが、これは高濃度において細胞毒性を示したためであり、本実験での指標における

MPL の dimerize inhibition は観察されなかった。エルトロンボパグはその他アゴニストとは異なり、タンパク質ではなく低分子化合物であり、MPL の膜貫通ドメインのアミノ酸側鎖に結合することにより MPL を active conformation に導くと考えられている(*63, 66*)。この際、エルトロンボパグ：MPL の比が 1 ： 2 なのか、 2 ： 2 なのかについては未だ明らかになっていない。しかし本実験結果から、高濃度における増殖が毒性以外では阻害されていないため、エルトロンボパグによる active complex はエルトロンボパグの濃度が過剰量であっても dimerize inhibition が起こらない complex を形成していると考えられる。以上の結果は、ここまで私たちが描いてきた ThC と MPL との結合モデルとも良い一致を示すため、(*65*)で報告されている通り、細胞表面で MPL はモノマーで存在するという説を支持する結果となった。

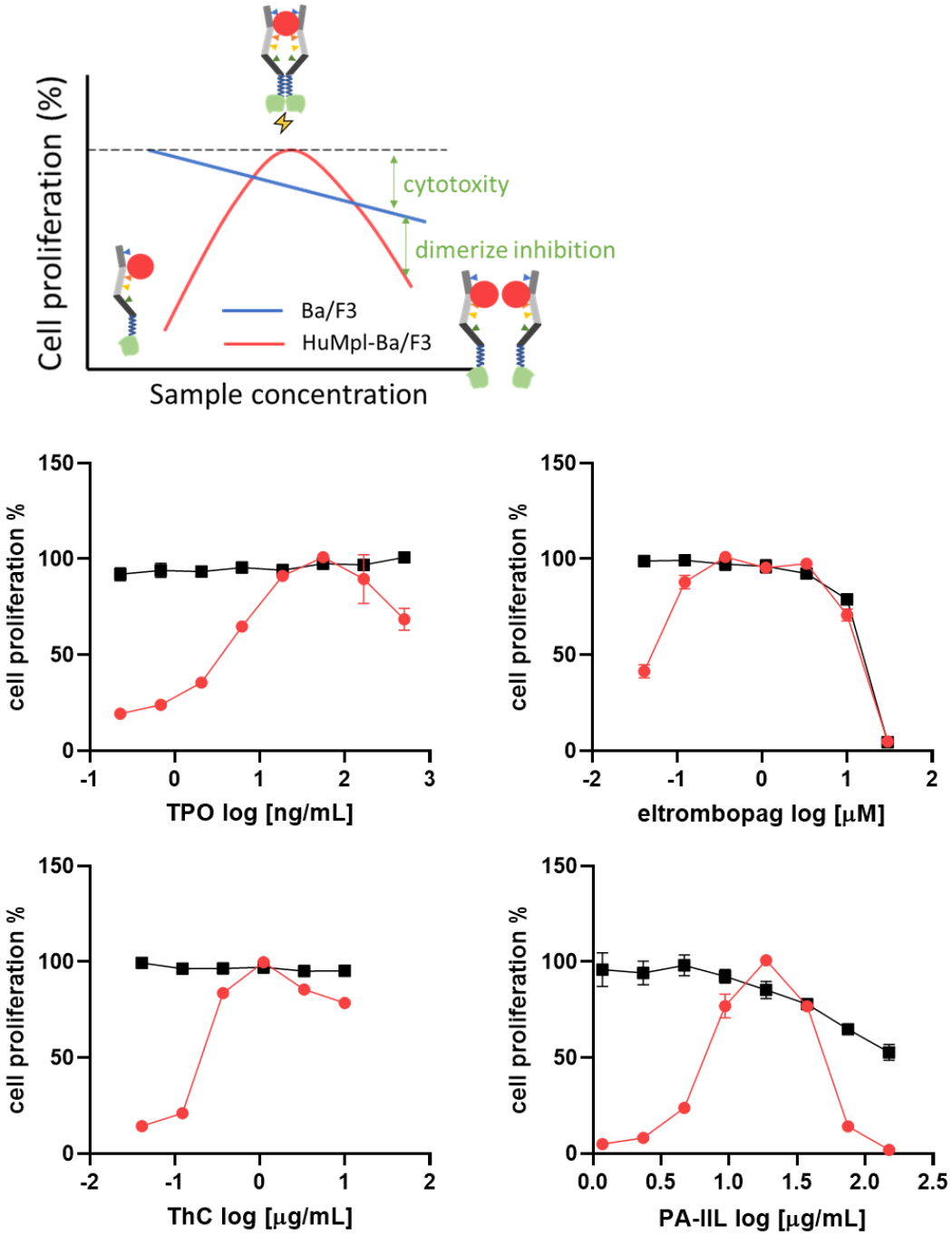


Figure 36. Effect of high concentrations of each MPL agonist on proliferation of Ba/F3-HuMpl

(**A**) Predicted inhibition of Ba/F3-HuMpl cell proliferation by agonists at high concentrations. Cytotoxicity was measured using Ba/F3 cells, and if the proliferation of Ba/F3-HuMpl cells was lower than the cytotoxicity, dimerize inhibition was considered to have been induced. (**B**) Proliferation rate of Ba/F3-HuMpl by high concentrations of agonists (black line) and of Ba/F3 by

agonists in the presence of mIL-3 (pink line).

総合考察

骨髄増殖性腫瘍 CALR mutant との比較

本研究は海洋生物抽出物から新しい血球増多物質の探索を目的とし、ミクロネシア産海綿 *Corticium* sp.から新規タンパク質 ThC を見出した。また、糖やレクチン、6-Alk-Fuc を用いた阻害実験から ThC は糖結合能により TPO 様活性を発揮していることを明らかにした（Figure 25, 26, 28）。さらに、N-グリカンを欠損させた変異 MPL を作成し ThC に対する反応を観察したところ、MPLN117 糖鎖のフコースに結合し、2 分子の受容体を架橋することで活性化を引き起こすことが示された（Figure 29B）。この結果は、ヒト MPL、ひいては一回膜貫通型受容体に糖鎖を介した活性化機構が存在することを初めて証明したものである。一方、骨髄増殖性腫瘍（Myeloproliferative neoplasms：MPN）という血液のガンでかねてから受容体の糖鎖を介したメカニズムで MPL が活性化しているという仮説が存在していた。MPN は血球の異常増殖やその機能に異常をきたす造血器腫瘍の総称である。その中で血小板が異常増殖してしまう要因の一つとして CALR 変異が発見された。CALR はカルネキシンと並んで分子シャペロンの一つで普段は小胞体に局在し、タンパク質のリフォールディングを担っており、MPL もその対象の一つである（Figure 37）。CALR は N 末端ドメイン、プロリンに富んだ P ドメイン、C 末端ドメインに分けられ、N 末端ドメインがカルシウムを介した糖との結合性を持ち、C 末端側ドメインは小胞体局在シグナルである KDEL 配列が存在する（Figure 38）（*67*）。この CALR がフレームシフトすることにより主に CALR Del52、Ins5 の 2 種類の変異体が発現する。これらはどちらも KDEL 配列を失っており、小胞体で MPL 上の N117 グリカンと結合するとそのまま細胞表面まで移動し、MPL の“偽のアゴニスト”として受容体を活性化させる（Figure 39）。ここで CALRmut が ThC と決定的に異なる点は発現タンパク質を細胞外から添加しても活性を示さないことである。通常、TPO を含む細胞表面受容体アゴニストは培地に添加することで、アゴニスト

としての活性を発揮する。ThC においても同じである。しかし、CALRmut はリコンビナント体を細胞外から添加しても MPL を活性化しない。通常 CALR は ER に滞在し、未成熟糖鎖の末端グルコース残基（9 mannoses and 1-glucose）に結合し、リフォールディングの品質管理を担う(*68*)。リフォールディングに成功したタンパク質はゴルジ体に移動し更にプロセッシングを受けることで成熟糖鎖となり細胞外へ出る(Figure 37, 39)。したがって、CALR と CALRmut の糖結合性が同じであると仮定すると、CALR/CALRmut が結合することのできる糖鎖は、基本的には細胞内（小胞体内）にしか存在しない。このため、CALRmut を細胞外から添加しても、細胞外に発現している MPL 上の成熟糖鎖には結合できず、受容体の活性化は起こらないと考えられている。2016 年に最初の報告がされてから現在まで CALRmut に関する様々な実験が行われ(*59, 60*)、現段階では CALRmut が小胞体内で MPL の N117 の未成熟糖鎖に結合し、そのまま細胞外へ移動し、細胞表面に到着してから受容体を活性化、細胞内へシグナルを入れると考えられている(*62, 69*)が、その直接的な証明は極めて困難である(Figure 39)。本研究により ThC は成熟糖鎖のフコース(恐らく α(1,6)fucose)に結合しているという結果が得られ、糖鎖により MPL が活性化されることをはじめて証明することができた。最近、培養細胞を用いて発現させたヒト MPL の N117 糖鎖を、マススペクトロメトリーを用いて分析したところ、フコースが含まれていたと報告されており(*69*)、これは本研究の結果を支持するものである。しかし、前述のとおり N117 を含む MPL 上の全ての糖鎖構造を精密に解析した実験はなく、N117 上の糖鎖に α(1,6)fucose を含むかなどの点は今後早急に取り掛かるべき課題である。今後、ThC と結合する糖鎖、CALRmut と結合する糖鎖の構造を解析し比較することで、CALRmut が細胞外から添加しても MPL を活性化できない理由や、PA-IIL が同じ受容体が発現しているにもかかわらず細胞種によって活性が異なる理由をより明確にできると考える。

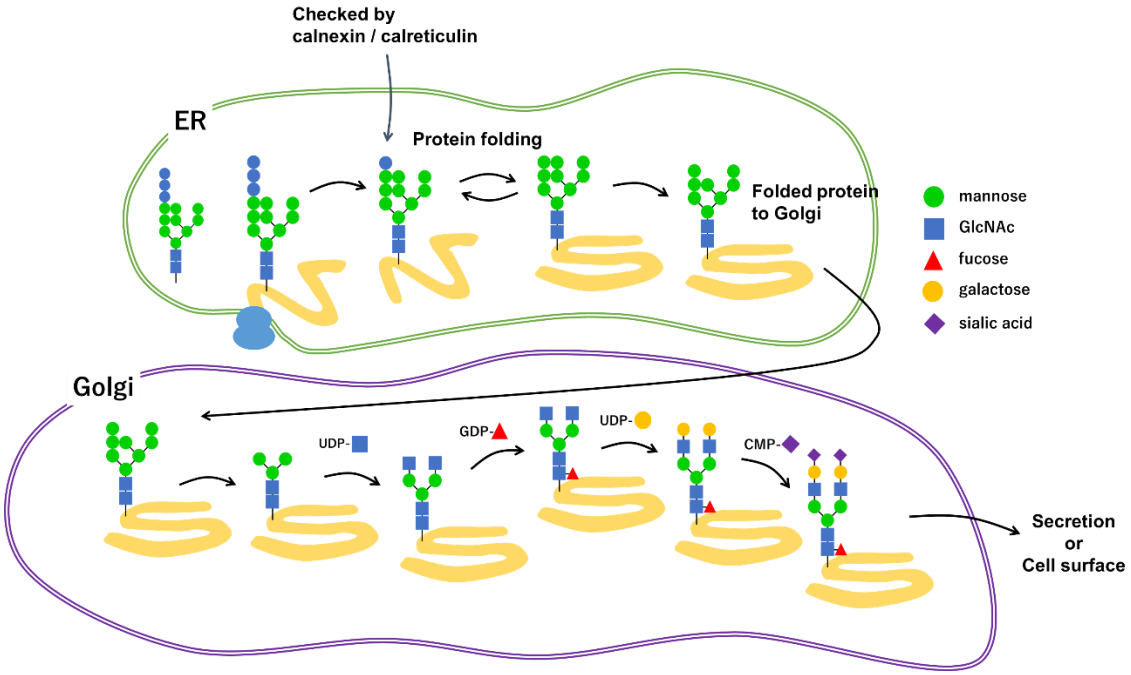


Figure 37. Biosynthesis of N-glycans

N-glycans in higher animals, such as mammals, undergo a process called processing, after which the terminal modification of galactose or sialic acid occurs and the N-glycan matures into a complex glycan structure. The biosynthesis of N-glycans shares the same precursors (Glc3Man9GlcNAc2-dolichol phosphate) with all eukaryotes, from yeast to humans.

(*70*)より一部改変して引用.

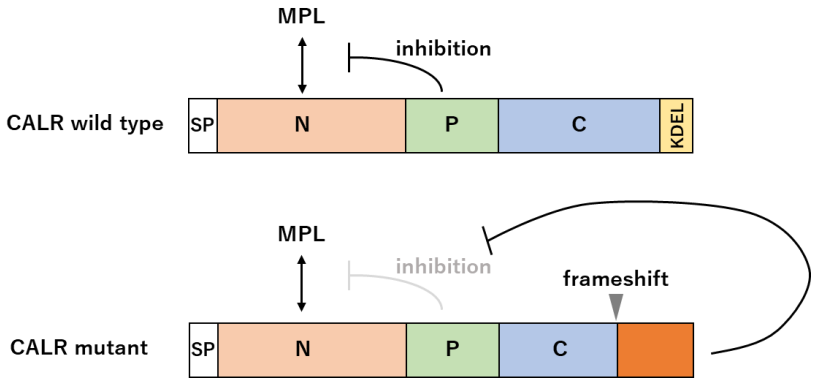


Figure 38. schematic structure of CALR/CALRmut

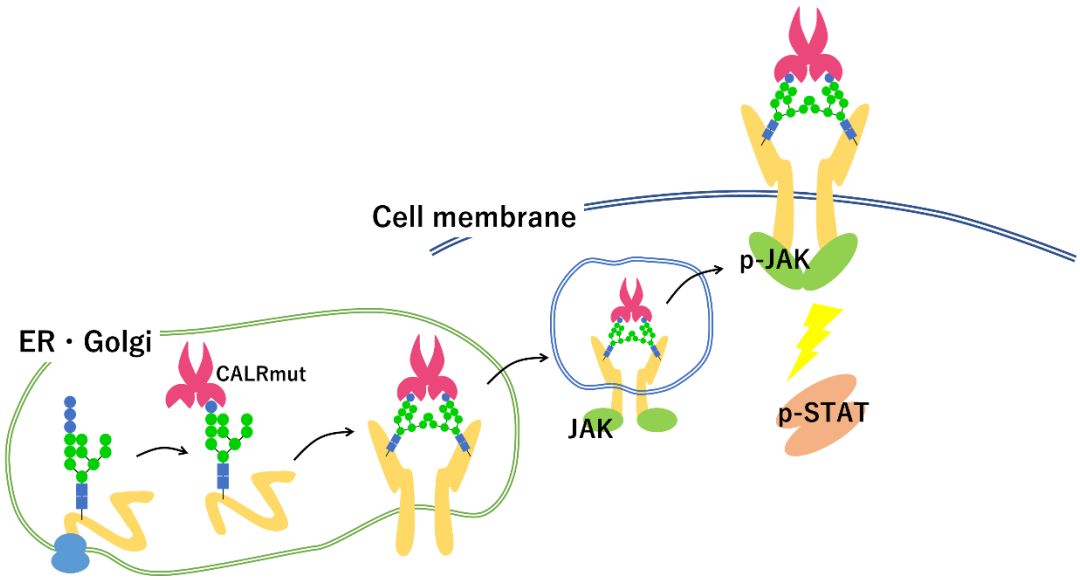


Figure 39.　A model for the trafficking of mutant CALR to the cell surface of MPL

The mutant CALR interacts with N-glycan-containing MPL in the ER by its carbohydrate-binding ability, is delivered to the Golgi, and then localizes to the cell surface. MPL-CALRmut complex localized at the cell surface constitutively activates downstream signaling molecules and induces cell oncogenesis.

(*59*)より一部改変して引用.

各種 MPL アゴニストによる下流シグナル、細胞分化の違い

これまで述べてきたように ThC と PA-IIL は非常に類似した構造・糖結合性を持ち、どちらも MPL の活性化を引き起こす（Figure 16, 31）。しかしその EC_{50} 値には約 70 倍もの差があり、ThC が PA-IIL に比べ非常に効率的に MPL を活性化していることがうかがえる。さらに興味深いことに、PA-IIL のみが Ba/F3、Ba/F3-HuEPOR、Ba/F3-HuGCSFR 細胞に対しても増殖活性を示した（Figure 33）。この結果は、MPL のみならず他の造血サイトカイン受容体にも糖鎖を介した活性化機構が存在することを示唆するもので、非常に興味深い。

この活性化を説明するものとして PA-IIL が Ba/F3 系のすべての細胞に共通して発現している mIL-3 受容体（Figure 12）の活性化が挙げられるが、TPO、EPO、G-CSF 受容体

それぞれを活性化している可能性も否定できず、今後の早急な検証が必要である。 MPL 同様ホモダイマーで活性化する EPO、G-CSF 受容体にも糖鎖を介した活性化機構が存在し得るのか？ G-CSF 受容体細胞外ドメインには 27、69、104、110、365、450、547、555、586 の 9 カ所の N-グリカンが存在している(*71*)。一方、EPO 受容体では細胞外ドメインに 1 カ所 N-グリカンコンセンサス配列があるものの、実際に糖鎖が付加しているかは不明である（Figure 40)。また、EPO 受容体は MPL、GCSF 受容体と比較して細胞外ドメインが短い。したがって、MPL と比較すると、EPO 受容体よりも G-CSF 受容体の方が糖鎖・細胞外アミノ酸残基数の点で類似しており、糖鎖による活性化がもし存在するのであれば、G-CSF 受容体でより起こりやすいのではないかと考えられる。

興味深いことに、EPO もしくは G-CSF 受容体の発現している細胞に CALRmut を発現させたところ、GCSF 受容体発現細胞で、STAT5 が活性化されたことが報告され、CALRmut は MPL のみならず、GCSF 受容体に対しても活性化を引き起こすことが示された(*60*)。しかし、MPL とは異なり、GCSF 受容体に対するシグナルは一過性であり、長期的な細胞増殖などは観察されず、その生理学的な詳細は不明のままである(*59, 60*)。この現象は今回 PA-IIL で観察されたものと類似している可能性が高いと考える。今後、PA-IIL による活性をより詳しく調べていくことで、“糖鎖を介した活性化機構”が MPL 以外のサイトカイン受容体にも存在する可能性を探ってゆきたい。

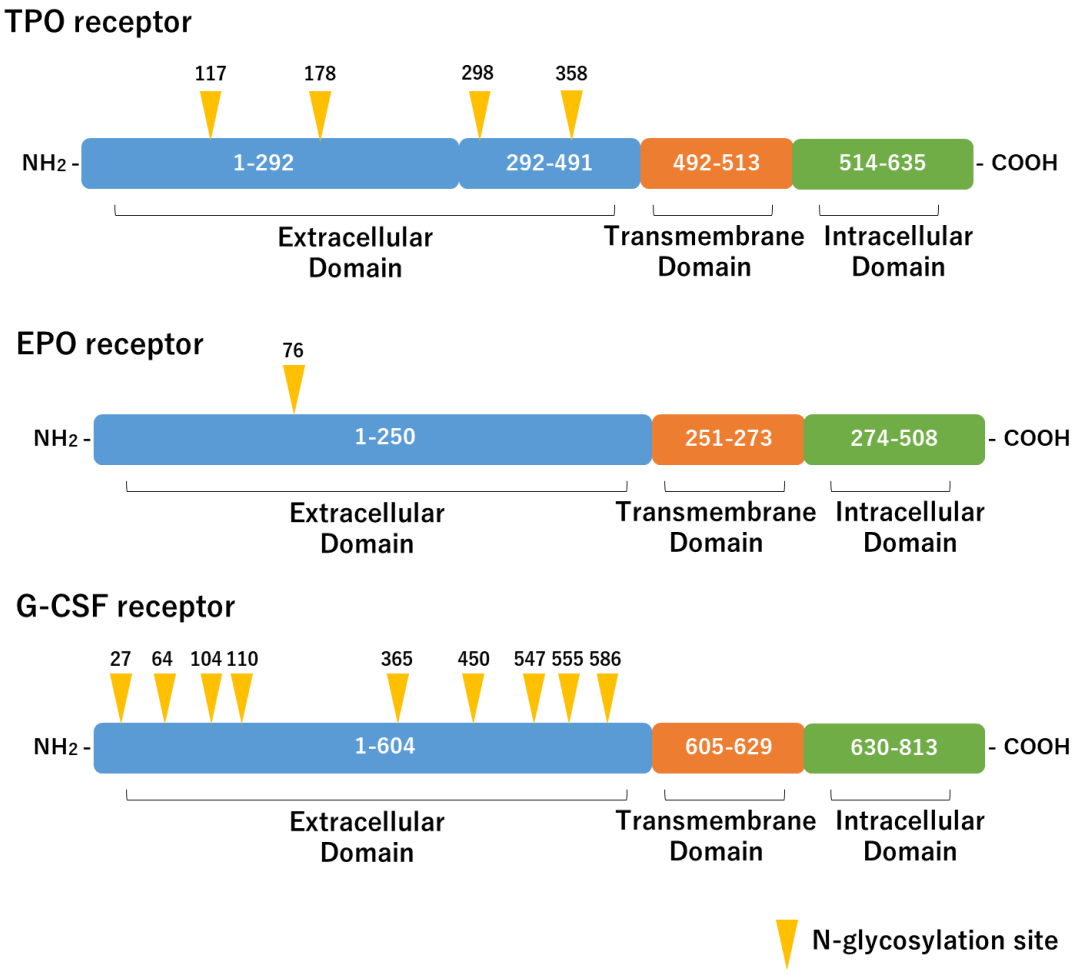


Figure 40. N-glycan binding sites of hematopoietic cytokine receptors

Schematic structures of MPL, EPOR and GCSFR. The number of carbohydrate chains differs greatly among receptors, and the binding sites also differ, but all are present in the extracellular domain.

TPO アゴニストの作用機序の比較

本研究とこれまでの研究の蓄積から MPL は TPO 以外にもいくつかの異なるアゴニストにより活性化されることが明らかとなり、その活性化モードは①TPO 結合部位を介す機構、②膜貫通ドメインを介す機構、そして③糖鎖を介する機構である。そこで既知の MPL アゴニストの活性化機構を比較した。まず、医薬品として主に使用されているロミプロスチムとエルトロンボパグであるが、ロミプロスチムは TPO と同様、リガンド結合ドメインに、また、エルトロンボパグは受容体膜貫通ドメインにある H499 残基に結合し互いに異なった

機構で受容体を活性化させる。これらのアゴニストによる下流のシグナルの惹起、巨核球形成、血小板形成は TPO と比べ、それぞれ異なっている（Figure 41）（*72*）。すなわち、エルトロンボパグは下流シグナル JAK/STAT、AKT、MAPK 経路の全てにおいて、TPO よりも強く活性化し、血小板産産生を促進する（*73*）。一方で、ロミプロスチムは AKT のリン酸化をより強く誘導するが、ERK のリン酸化が弱く、その結果、未熟な巨核球の増殖を著しく促進する一方、血小板を形成する能力が低いとされる（Figure 41）（*73, 74*）が、なぜこのような違いが生まれるのかは全く不明である。ロミプロスチムに至っては生理的アゴニストである TPO と同じ結合部位に結合するにもかかわらず、結果として起こる現象が異なるなど、既に医薬品として使用されているものでさえ、未だ説明のつかない現象が多く報告されている。MPL アゴニストが今後、血小板減少症から造血不全、将来的には造血器悪性腫瘍の治療へと適用を拡大させるためにも詳細なメカニズムを理解することが極めて重要である。また、改めて造血幹細胞（HSC）からの細胞分化を見てみると、TPO は HSC において分化から自己複製、増殖に加え、相反する静止期の維持にも作用する多面的な役割を持っている点は興味深い（Figure 1）（*75*）。HSC における MPL の役割について、最近興味深い結果が報告された。すなわち、MPL 上の様々な部位をエピトープとして設計した Diabody（DB）と呼ばれる single-chain variable fragment（scFv）を短いリンカーで 2 量化させた抗体を作成（*76*）、MPL に作用させたところ TPO の結合を 100%ブロックできる競合的アンタゴニスト（AK111）や、アゴニストとしての活性が TPO の 50%程度に留まるパーシャルアゴニスト（AK113）などが見いだされた。また、DB の受容体への結合サイトの違いで、活性化される細胞内の下流シグナルも異なることが明らかとなった。さらに、興味深いことに DB の種類によって HSC の自己増殖と分化の方向性が異なることも明らかとなるなど、MPL とアゴニストからなる活性複合体はアゴニストの結合部位により大きく異なった生理的シグナルを惹起することが示唆された（Figure 42）（*76*）。これらの報告は、本研究で見出

された ThC や PA-IIL が TPO と異なる挙動を示すことや、非常に類似した構造を持つ ThC と PA-IIL 間においても、アゴニストとしての活性の強さに大きな差があり、更には受容体選択性も異なるなどの観察と類似している。いずれにせよ、まだはっきりとしたメカニズムは明らかになってはいないものの、各種のアゴニストにより、多様な活性化機構、多様な下流シグナリング・細胞の形態変化が存在することが明らかになり始めている。これは MPL の活性化には、ON/OFF という単純なモード変化ではなく、より複雑な多段階のモードが存在することを示唆している。ThC や PA-IIL をはじめとしたフコース結合性レクチンはこの現象を研究するための有用なプローブである可能性が高いので、今後はこれらのレクチンと各種変異体が HSC にどのように作用するのか、検討する予定である。

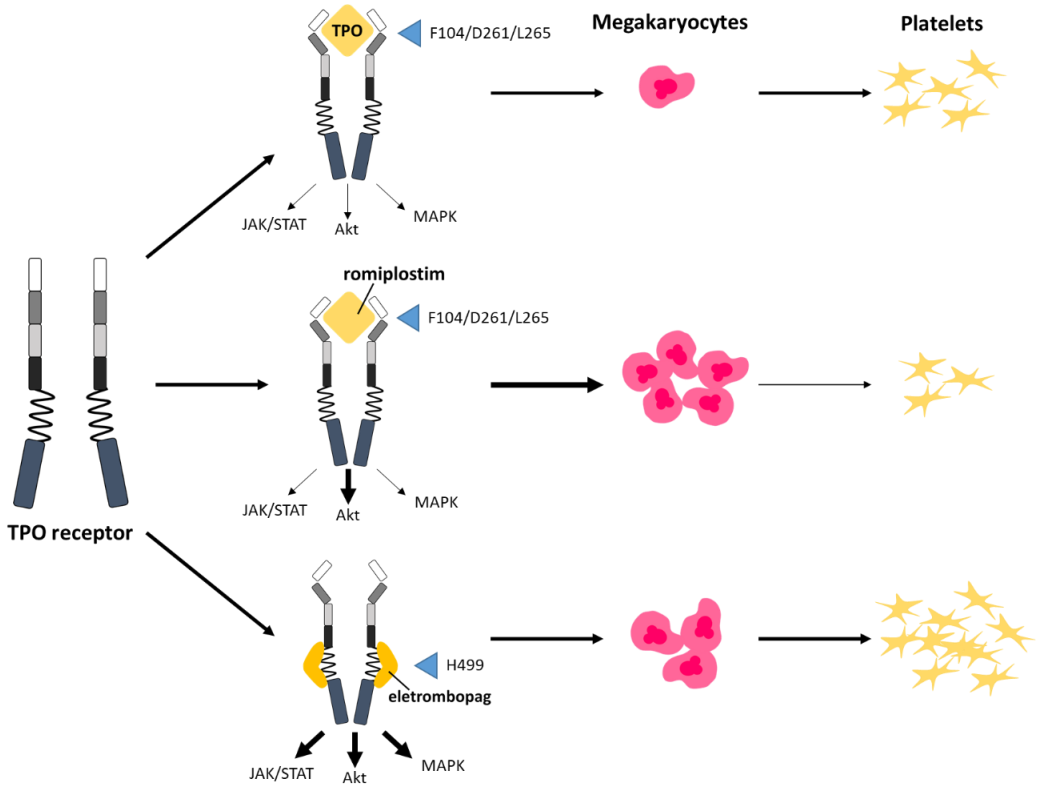


Figure 41. Different types of TPO receptor agonists produce different amounts of megakaryocytes and platelets

Different types of TPO receptor agonists cause different intracellular signaling and thus different

ratios of blood cells to be produced.
(*72*)より一部改変して引用.

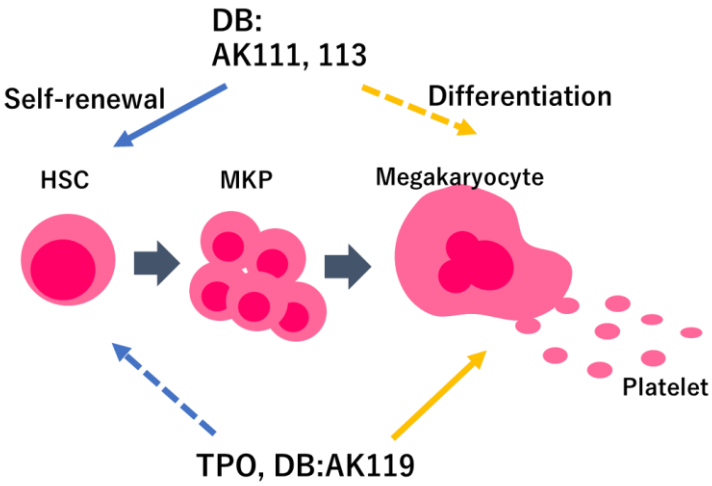


Figure 42. Differences in the direction of HSC proliferation and differentiation into megakaryocytes by TPO and the MPL agonist diabody (DB)
AK111,113: HSC expansion, AK119: platelet production.
(*76*)より一部改変して引用.

なぜ海綿に MPL アゴニストが含まれているのか

ThC は海綿に含まれる化合物であるが、

なぜ海綿にこのような化合物が含まれているのかは不明である。海綿動物は“最も原始的な多細胞動物”とも言われており、当然、脊椎動物の造血サイトカイン受容体である MPL は存在しないだろう。それどころか、海綿は非常に単純な体制を持ち、唯一の器官と言えば、体内に海水を取り込むための襟細胞（襟細胞室）くらいで、その他は多くの細胞が未分化（多能性を維持）の状態で存在し、必要に応じて生殖細胞などに分化するとされてきた(*77*)。しかし、情報のやり取りが無い細胞間でどのように連携して水流を起こしているのか、また、海綿は体の表面に泥などが蓄積すると、それを除去するために体表面の細胞が一気に剥がれ落ちるという現象も報告されており(*77*)、細胞間で何らかのコミュニケーションが存在す

ることを示唆している。最近、淡水海綿である *Spongilla lacustris* の細胞をシングルセルRNAシーケンシングで調べたところ、18 種のタイプに分類できることが明らかとなり、その中で消化に関わる役割を持つ細胞でシナプス伝達に重要な遺伝子が多く発現していることが明らかとなった(*78*)。また、すべての細胞と接している小さな多極細胞にはプレシナプスに特徴的な分泌装置が、また、水流を発生させたり微生物の食物を消化したりする襟細胞にはポストシナプスに特徴的な受容装置の遺伝子群が存在していた。これらの結果は、動物の最初の指向性コミュニケーションが摂食を制御するために進化した可能性を示唆しており、未だ明らかとなっていない神経系の進化に対する新たな知見が得られたとしている(*78*)。

今回私たちが発見した ThC はレクチンである。レクチンは異物に対する T-細胞の活性化にかかわるマイトジェン刺激を引き起こす、自然免疫と深くかかわる分子としてよく知られている。レクチンが細胞表面の受容体糖鎖へ結合し、細胞内へシグナルを伝達するという点で見てみると、これはマイトジェン活性によく似ていることがわかる。マイトジェン活性を持つレクチンとして ConA 等の植物レクチンが知られているが、これらのレクチンが T 細胞上の T-cell receptor に結合することで、T 細胞がこれを抗原として認識し、細胞が活性化、炎症性サイトカインなどを放出する(*79*)。マイトジェン活性においてレクチンが作用する T-cell receptor も MPL と同様に一回膜貫通型受容体である。さらに、分化の過程を遡っていくと、どちらも同じ造血幹細胞から分化した細胞である。しかし、この両者が決定的に異なる点は、レクチンを異物のシグナルと見なすか、厳密に制御された血球生産の制御因子として働くかである。

海綿の細胞は自己と非自己の細胞を見分けることができる。有名な実験として 2 種類の海綿の細胞を取り出し、海水中で混ぜ合わせると、次第に同じ由来の細胞同士が凝集し、2種類の海綿が出来上がるというものだ。さらに、日本の海岸でもよくみられるダイダイイソカイメンにおいては、同種異個体の認識も可能であることが明らかとなっている(*80*)。この

ような現象は、多細胞生物における自然免疫の起源であり、この際にもレクチンの関与が疑われている(*81*)。これまで様々な海綿からレクチンが分離された報告があり(*82*)、ThC を含むこれらのレクチンが自然免疫やサイトカインの反応に関わっている可能性もあり得ると考えている。

次に、海綿と共生しているバクテリアが ThC を生産している可能性について考えてみる。上記でも述べたように ThC に類似した構造を持つ PA-IIL や BA2LC-ct はバクテリア由来のレクチンであり、PA-IIL は ThC と同様の活性も示した。*Corticium* sp.を沖縄、西表、グアム、パラオ、ミクロネシア ヤップ島・チューク島で採取し、前任者によりそれぞれの採集地（Figure 43）ごとの ThC の有無が調べられたが、興味深いことに、チューク島で採集したサンプルにのみ ThC が含まれており、他の採集地の試料には含まれていなかった（Figure S10）(*83*)。海綿は非常に多くの微生物と共生していることが知られており、*Corticium* sp.においても多くのバクテリアが共生、垂直伝播によって次の代に受け継がれていることも明らかとなっている(*84*)。もし仮に、ThC が海綿自身の産物であり、海綿中で何かしらの機能を担っているのであれば、採集地にかかわらず ThC が含まれるはずである。最近、ThC に高い相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子が海洋バクテリアより次々と見出されている（Figure S1, 8)。これらのレクチンを発現した研究はないが、アミノ酸配列を比較してみると、ThC や PA-IIL や BC2LC-ct に保存されている糖やカルシウムイオン結合に必須なアミノ酸残基は非常に高い割合で保存されていることも明らかとなった（Figure S8)。これらの結果は ThC が海綿自身ではなく、共生バクテリアの産物である可能性を示唆するものである。

Figure 43. Collection sites of sponges and presence of ThC content
Not containing ThC (blue pin), Contains ThC (red pin).

本研究が明らかにした糖鎖を介した活性化を含め、MPL には 3 種の活性化機構が存在する。TPO による ligand binding domain への結合と、ThC による糖鎖への結合は 2 分子の MPL を架橋することになるので、受容体の活性化を引き起こすことは理解がしやすい。一方で、エルトロンボパグや序論で紹介した TM41 などは直接 2 分子の MPL を架橋するものではない。MPL の立体構造が未だ明らかとなっていない現段階では、これらのアゴニストがどのように作用し、2 量体化へ導いているのか不明である。しかし、これまでの多くの研究者により様々な種類の MPL アゴニストが発見され、各アゴニストが少しずつ異なった挙動を示すことが明らかとなってきた今、MPL の詳細なシグナル伝達機構やそれに伴う細

胞の分化増殖が解き明かされつつある。ThC もその中の一つのユニークな分子であり、今後も先行研究におけるスクリーニングで見つかった抽出物のプロファイリングを進めることで、MPL ひいてはサイトカイン受容体研究の歩みを進めるための助けになる研究を行ってゆきたい。

材料と方法

・天然試料（スクリーニング用）の調製

冷凍保存した各地の海で採取した海綿やホヤなどの生物試料を常温で解凍し、試料の湿重量と等量の蒸留水を加え、ミキサーで撹拌し抽出した。抽出液を遠心により上清を沈殿に分け、上清を水抽出物とした。沈殿には 2-プロパノールを加え、沈殿と撹拌し、一晩 4℃で静置した。同様に遠心により上清と沈殿に分け、上清を 2-プロパノール抽出物とした。水抽出物はフリーズドライ、2-プロパノール抽出物はエバポレーターを使用し濃縮し、それぞれの乾燥重量を測定した。乾燥後の試料を蒸留水、または DMSO を用いて適当な濃度に調製し、細胞アッセイの試料とした。

・天然試料（*Corticium* sp.）の採集

天然 ThC の供給源として用いた海綿サンプルはミクロネシア連邦チューク州において Department of Marine Resources の許可の下、2011 年 3 月 9 日に採集した CHK129、CHK151 を用いた。また、海綿の種同定は琉球大学熱帯生物圏研究センター 伊勢優史博士に行っていただいた。

・細胞増殖アッセイ

本研究ではマウスの ProB 細胞由来 mIL-3 依存性細胞株 Ba/F3 細胞と、そこにヒト TPO 受容体、EPO 受容体、G-CSF 受容体を安定発現させた Ba/F3-HuMpl、Ba/F3-HuEPOR、Ba/F3-HuGCSFR 細胞（日産化学株式会社より供与）を用いた(*85*)。この細胞は mIL-3 またはヒト TPO、EPO、G-CSF の存在下でのみ増殖することができる。したがって細胞の増殖が見られたサンプルには造血サイトカイン様活性があると仮定し、サンプルの活性を評価した。使用した培地は RPMI1640-10% FBS(以下、培地とする)で各サイトカインを 10

ng/mL となるように添加し培養を行った。継代後約 3 日間培養した細胞液を 15 mL 遠心チューブに分注し、1,000 rpm で 3 分間遠心して細胞を沈殿させ、上清を除いた。その後、PBS を 10 mL 加えて同条件で遠心し、得られたペレットに培地を加え、細胞数を血球計測板でカウントし、6.0×10^4 cells/mL に調製した。これを 96 穴プレートへ 90 μL 分注した。サンプルは 0.22 μm フィルタで滅菌した後に、PBS (-)で適当な濃度に希釈し、各 well に 10 μL ずつ加えた。ポジティブコントロールには終濃度 10 ng/mL となるように Recombinant Human TPO (Peprotech)、ネガティブコントロールには PBS (-)を 10 μL 添加した。これをインキュベータ（37℃、5% CO_2）で 4 日間培養した。4 日目に cell counting kit (Dojindo, Japan）を 10 μL 添加し、2 時間インキュベートした後、450 nm の吸光度を測定した。結果は、得られた吸光値をそのまま示すか、必要な際はポジティブコントロールを 100%、ネガティブコントロールを 0 %として増殖率を算出した。

UT-7/TPO(*86*)、UT-7/EPO(*87*)を用いた実験でも、同様の手法で細胞増殖を測定した。

・アミノ酸配列解析

ThC を含む海綿透析内液もしくは分離フラクションを SDS-PAGE を用いて各タンパク質を分離し、ゲルを PVDF 膜にエレクトロブロッティングし、ThC のバンドを切り出して自動シークエンサー（Procise 492HT）を用いて N 末端アミノ酸配列を決定した。内部アミノ酸配列情報を得るため、精製した ThC をトリプシン（Fujifilm-Wako)、キモトリプシン（Fujifilm-Wako)、V8 プロテアーゼ（Fujifilm-Wako）のいずれかで消化しペプチド断片化した。各消化物は、HPLC で逆相カラム（VYDAC protein&peptide C18）を用いて、0.1% TFA とアセトニトリルのグラジエント（0-50%）の条件下で分離した。各ペプチド断片は、MALDI-TOF MS/MS による *de novo* 配列解析と Edman 分解を行った。得られた配列情報をマッピングし、推定されたアミノ酸配列を ThC のドラフトアミノ酸配列とした。

・X 線結晶構造解析

結晶化には、約 6 mg/mL まで濃縮した精製タンパク質を使用した。0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.2 M $MgCl_2$、30%(w/v) PEG 4000 からなるバッファーを用いて nThC の結晶を成長させた。nThC の回折データセットは Advanced Photon Source (IL, USA)で収集し、プログラムは HKL2000 を用いて処理した。nThC の位相決定には、seleno- methionine（SeMet）置換した rThC（SeMet-rThC）の結晶構造を決定した。SeMet-rThC の結晶は、100 mM 酢酸ナトリウム(pH 3.3~5.5)、20% PEG3350~6000、20% PEG400 からなるバッファーから形成した。rThC が糖質結合活性に Ca^{2+}が必要であることが生化学的に明らかになったため、5 mM $CaCl_2$ 存在下で結晶化させた。100 mM 酢酸ナトリウム（pH 3.3~5.5)、20% PEG3350~6000、20% PEG400 からなるバッファーから 5 mM $CaCl_2$存在下での rThC の結晶を成長させた。精製した rThC 溶液に 5 mM のフコースまたはマンノースを加えて共結晶化することにより、フコースまたはマンノースと複合化した rThC の結晶を得た。X 線回折実験は Photon Factory（日本、つくば市）および SPring-8（日本、播磨）で実施された。SeMet-rThC、$CaCl_2$存在下での rThC、フコースとの複合体 rThC、マンノースとの複合体 rThC の回折データは、Photon Factory で収集した。Ca^{2+}イオンの異常異方性フーリエマップを計算するために、波長 2.9Å の X 線を用いて rThC の回折データを収集し、プログラム XDS で処理した。データ収集の統計は Table S3 を参照。

SeMet-rThC の結晶構造は Se-SAD 法によって決定された。Se のサイトはプログラム SHELX を使用して決定した。フェーシングとモデル構築は phenix.autosol を使用して実施した。nThC の結晶構造は、SeMet-rThC の構造を検索プローブとして、phenix.mr プログラムを用いて分子置換法により決定した。rThC とその Ca^{2+}イオン、マンノース、フコースとの複合体の結晶構造は、nThC の構造をサーチプローブとして、分子置換法により決定し

た。異常差分フーリエマップは phenix.maps を使用して計算した。構造精密化は phenix.refine を用いて行った。

・Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC 測定は、iTC200（GE ヘルスケア）を用いて行った。セルに約 100 μM rThC，100 μM BC2LC-CTD，35 μM PA-IIL を充填し，シリンジに 1.5 μM フコースまたはマンノースを充填した. 120 秒間に 2 μL ずつ 18 回注入した。データはプログラム ORIGIN で解析した。

・大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の発現（ThC、PA-IIL、BC2LC-ct）

質量分析により決定した ThC、PA-IIL、BC2LC-ct のアミノ酸配列を基に合成 DNA 断片を作成し（Table S4)、それぞれ改変 pET26 と pET28 ベクターの NdeI/XhoI サイトにクローニングして、ThC、PA-IIL、BC2LC-ct の発現ベクターを作成した。ThC の N-末端には 6×His tag を付けた。ThC 変異体の発現ベクターは、ThC 発現ベクターを鋳型として inverse PCR 法により構築した。目的のタンパク質の発現ベクターを保有する大腸菌 BL21(DE3) 株を LB 培地で 37℃、120 rpm で振盪培養した。OD600 が 0.6 になった時点で、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.2 mM になるように培地に添加しリコンビナントタンパク質を発現誘導し、さらに 25 ℃で一晩培養した。4,000 x g で 30min 遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞をバッファーA（ 20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、200 mM NaCl）に懸濁し、UD-211 超音波破砕機（TOMY SEIKO, Japan）を用いて破砕した。40,000 x g、30min の遠心分離後、上清を Ni Sepharose (GE Healthcare, Sweden)の 1 mL カラムにアプライした。バッファーA で洗浄後、カラムに結合したタンパク質をバッファーA 中のイミダゾール濃度を上昇させ溶出した。精製した ThC を含む画分を、バッファーA で予め平衡化した HiLoad 26/600 Superdex 75pg (GE Healthcare) を用いたサイズ排

除クロマトグラフィーによってさらに精製した。SeMet 置換 ThC は、LB 培地の代わりに SeMet 置換 M9 培地を用い、同様の方法で発現・精製した。

・イムノブロット

抽出物を調製するために、細胞を 2 mM オルトバナジン酸を含む PBS(-)で洗浄し、2 mM オルトバナジン酸とプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む RIPA バッファ（20 mM Tris-HCl（pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40, 1% deoxycholate sodium）中で超音波洗浄した。等量のタンパク質を変性させ、電気泳動し、PVDF 膜にブロットした。イムノブロット検出には、以下の一次抗体を使用した。Anti-c-MPL（IBL #18505)、anti-β-Actin (Cell Signaling #4967))、anti-STAT5 (Cell Signaling #9363), anti-phospho-STAT5 (Cell Signaling #9359), anti-JAK2 (Cell Signaling #3230), and anti-phospho-JAK2 (Cell Signaling #3771)。二次抗体には horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies (Santa Cruz) goat anti-mouse immunoglobulin G（#sc-2005）または anti-rabbit IgG（#sc-2004)。化学発光反応は ECL Western Blotting Femto (Thermo Fisher）を用いて行い、画像は LAS-3000 または LAS-4000 装置（Fuji）を用いて撮影した。データは ImageJ ソフトウェアで定量した。

・糖による Ba/F3-HuMpl の増殖への影響

グルコース（Glc)、マンノース（Man)、ガラクトース（Gal)、フコース（Fuc)、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc)、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc)、N-アセチルノイラミン酸（NANA）の 7 種の糖を用いた。これらを 100 mM となるように PBS(-)で調整した。NANA は酸性糖であり、直接細胞培地に添加すると培地の pH に影響を及ぼすため、事前に水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.0 に調整した後に用いた。

・阻害剤を用いた ThC の活性評価

試薬は 6-alkynyl-fucose（株式会社ペプチド研究所）と 2-deoxy-galactose（東京化成工業株式会社）を用いた。6-Alk-Fuc は DMSO、2-D-Gal は蒸留水に溶解し、細胞培養液に目的の濃度になるよう添加した。これらの試薬を添加後、6 時間インキュベートした後に TPO もしくは ThC を加え、4 日間培養後 WST-8 を用いて細胞の増殖を測定した。

・糖鎖欠損 MPL の作成とレポーターアッセイ

N117、178、298、358 の N-グリコシル化部位のアミノ酸をアスパラギン（N）からグルタミン（Q）に置換した MPL の発現は、PCR 変異導入により cDNA を作成し（Table S5）、pcDNA3.1 ベクター（Life Technologies）にサブクローニングした。V5 タグ付き変異体 MPL およびタグなし野生型 MPL を用いた。pGL4.52、pRL-TK、および発現ベクターを、lipofectamine 2000（Thermo Fisher）を使用して HEK293T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間もしくは 19 時間後、プロトコルに従って、GLOMAX luminometer（Promega）を用いて Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega #E1910）によりレポーター活性を測定した。

・細胞表面 MPL 量の測定

Ba/F3-HuMpl 細胞をサイトカインを含まない培地で一晩培養した後、TPO/ThC を添加し 5% CO_2、37℃で指定の時間培養を行った。ThC と TPO の相乗効果による MPL の動きを見る際には、ThC を添加し 2 時間前培養した後に TPO を添加し、指定の時間培養を行った。その後、Cell Surface Protein Isolation kit（Thermo Fisher）を用いて細胞表面の MPL を分離し、イムノブロット解析により検出した。

・統計解析

データは各ポイントにおいて同一の条件下で 3 回以上取得し、エラーバーは標準偏差を示している。ヒストグラムは、Dunnett's multiple comparison test を用いて解析した。Concentration-response curve の EC_{50} 値は nonlinear regression curve fit with four parameters で求めた。全てのグラフを GraphPad Prism 8.0.3 を用いて作成した。

参考文献

1. H. Safavi-Hemami *et al.*, Pain therapeutics from cone snail venoms: From Ziconotide to novel non-opioid pathways. *Journal of proteomics* **190**, 12-20 (2019).

2. K. Shiomi *et al.*, An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone Stichodactyla gigantea. *Toxicon* **41**, 229-236 (2003).

3. T. Ueda *et al.*, Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge Cinachyrella sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. *Glycobiology* **23**, 412-425 (2013).

4. B. A. Copits *et al.,* Modulation of ionotropic glutamate receptor function by vertebrate galectins. *The Journal of physiology* **592**, 2079-2096 (2014).

5. E. Delorme *et al.*, Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* **31**, 9871-9876 (1992).

6. M. Murakami *et al.*, Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity. *Science advances* **2**, e1500678 (2016).

7. Y. Maki, R. Okamoto *et al.,* Chemical Synthesis of an Erythropoietin Glycoform Having a Triantennary N-Glycan: Significant Change of Biological Activity of Glycoprotein by Addition of a Small Molecular Weight Trisaccharide. *Journal of the American Chemical Society* **142**, 20671-20679 (2020).

8. S. V. Bhoopalan, *et al.*, Erythropoietin regulation of red blood cell production: From bench to bedside and back. *F1000Research* **9**, (2020).

9. I. Vigon *et al.*, Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 5640-5644 (1992).

10. Y. Sohma *et al.*, Molecular cloning and chromosomal localization of the human

thrombopoietin gene. *FEBS letters* **353**, 57-61 (1994).

11. L. A. Harker *et al.*, Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* **88**, 511-521 (1996).

12. I. S. Hitchcock *et al.*, Thrombopoietin from beginning to end. *British journal of haematology* **165**, 259-268 (2014).

13. M. Kawakami *et al.*, Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* **76**, 1962-1964 (1990).

14. H. L. Corwin *et al.*, Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association* **288**, 2827-2835 (2002).

15. S. Amadori *et al.*, Use of glycosylated recombinant human G-CSF (lenograstim) during and/or after induction chemotherapy in patients 61 years of age and older with acute myeloid leukemia: final results of AML-13, a randomized phase-3 study. *Blood* **106**, 27-34 (2005).

16. J. Li *et al.*, Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* **98**, 3241-3248 (2001).

17. N. C. Wrighton *et al.*, Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* **273**, 458-464 (1996).

18. D. L. Johnson *et al.*, Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1. *Biochemistry* **37**, 3699-3710 (1998).

19. S. E. Cwirla *et al.*, Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* **276**, 1696-1699 (1997).

20. 石井明子 *et al.*, 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn. *日本薬理学雑誌*

136, 280-284 (2010).

21. David J. Kuter, Biology and Chemistry of Thrombopoietic Agents. *Seminars in Hematology* **47**, 243-248 (2010).

22. *FDA approves Novartis drug Promacta® for first-line SAA and grants Breakthrough Therapy designation for additional new indication*. 2018. https://www.prnewswire.com/news-releases/fda-approves-novartis-drug-promacta-for-first-line-saa-and-grants-breakthrough-therapy-designation-for-additional-new-indication-300752350.html

23. J. Goldberg *et al.*, Erythropoietin mimetics derived from solution phase combinatorial libraries. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 544-555 (2002).

24. S. A. Qureshi *et al.*, Mimicry of erythropoietin by a nonpeptide molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12156-12161 (1999).

25. S. S. Tian *et al.*, A small, nonpeptidyl mimic of granulocyte-colony-stimulating factor. *Science* **281**, 257-259 (1998).

26. K. Kusano *et al.*, A potential therapeutic role for small nonpeptidyl compounds that mimic human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **103**, 836-842 (2004).

27. T. Kimura *et al.*, A non-peptide compound which can mimic the effect of thrombopoietin via c-Mpl. *FEBS Letter* **428**, 250-254 (1998).

28. K. J. Duffy *et al.*, Hydrazinonaphthalene and azonaphthalene thrombopoietin mimics are nonpeptidyl promoters of megakaryocytopoiesis. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 3730-3745 (2001).

29. C. L. Erickson - Miller *et al.*, Preclinical Activity of Eltrombopag (SB - 497115), an Oral, Nonpeptide Thrombopoietin Receptor Agonist. *Stem cells* **27**, 424-430 (2009).

30. A. Sakamaki *et al.*, Lusutrombopag increases hematocytes in a compensated liver cirrhosis

patient. *Clinical Journal of Gastroenterology* **10**, 261-264 (2017).

31. A. Aihara *et al.*, Novel TPO receptor agonist TA-316 contributes to platelet biogenesis from human iPS cells. *Blood Advances***1**, 468-476 (2017).

33. R. Sakai *et al.*, Xanthocillins as thrombopoietin mimetic small molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 6388-6393 (2005).

34. T. Yamaguchi, Y. Miyake, A. Miyamura, N. Ishiwata, K. Tatsuta, Structure-activity relationships of xanthocillin derivatives as thrombopoietin receptor agonist. *The Journal of Antibiotics* **59**, 729-734 (2006).

35. A. Takatsuki *et al.*, New antiviral antibiotics; xanthocillin X mono- and dimethylether, and methoxy-xanthocillin X dimethylether. I. Isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* **21**, 671-675 (1968).

36. Y. Zhao *et al.*, SD118-xanthocillin X (1), a novel marine agent extracted from Penicillium commune, induces autophagy through the inhibition of the MEK/ERK pathway. *Marine Drugs* **10**, 1345-1359 (2012).

37. H. Watari., 海綿由来タンパク質　ThC　による新しい血小板産生メカニズムの解明. (2019).

38. H. Nakajima., ミクロネシア産海綿　Corticium　sp.　由来　新規トロンボポエチン様タンパク質の精製と一次構造. (2015).

39. A. Rath, *et al.*, Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 1760-1765 (2009).

40. H. Watari *et al.*, A novel sponge-derived protein thrombocorticin is a new agonist for thrombopoietin receptor. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* **221**, 82-88 (2019).

41. N. Garber *et al.*, Specificity of the fucose-binding lectin of Pseudomonas aeruginosa. *FEMS microbiology letters* **48**, 331-334 (1987).

42. E. Mitchell *et al.*, Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of Pseudomonas aeruginosa in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nature structural biology* **9**, 918-921 (2002).

43. H. Tateno *et al.*, Engineering of a potent recombinant lectin-toxin fusion protein to eliminate human pluripotent stem cells. *Molecules* **22**, 1151 (2017).

44. Y. Haramoto *et al.*, A technique for removing tumourigenic pluripotent stem cells using rBC2LCN lectin. *Regenerative therapy* **14**, 306-314 (2020).

45. J. Adam *et al.*, Engineering of PA-IIL lectin from Pseudomonas aeruginosa–Unravelling the role of the specificity loop for sugar preference. *BMC structural biology* **7**, 1-13 (2007).

46. M. Pokorná *et al.*, Unusual entropy-driven affinity of Chromobacterium violaceum lectin CV-IIL toward fucose and mannose. *Biochemistry* **45**, 7501-7510 (2006).

47. D. Sudakevitz *et al.*, A new Ralstonia solanacearum high - affinity mannose - binding lectin RS-IIL structurally resembling the Pseudomonas aeruginosa fucose-specific lectin PA-IIL. *Molecular microbiology* **52**, 691-700 (2004).

48. O. Sulák *et al.*, Burkholderia cenocepacia BC2L-C is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. *PLOS Pathogens* **7**, e1002238 (2011).

49. D. Tielker *et al.*, Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**, 1313-1323 (2005).

50. Z. Huang, *et al.*, Spartinivicinus ruber gen. nov., sp. nov., a novel marine gammaproteobacterium producing heptylprodigiosin and cycloheptylprodigiosin as major red pigments. *Frontiers in microbiology* **11**, 2056 (2020).

51. A. Iwasaki *et al.*, Kohamamides A, B, and C, cyclic depsipeptides from an Okeania sp. marine cyanobacterium. *Journal of natural products* **80**, 1948-1952 (2017).

52. K. Taori *et al.*, Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the

Floridian marine cyanobacterium Symploca sp. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 1806-1807 (2008).

53. O. Demirkiran *et al.*, Portobelamides A and B and Caciqueamide, Cytotoxic Peptidic Natural Products from a Caldora sp. Marine Cyanobacterium. *Journal of natural products* **84**, 2081-2093 (2021).

54. M. A. Mazlan *et al.*, Effects of L-fucose supplementation on the viability of cancer cell lines. *Makara Journal of Health Research* **24**, 1 (2020).

55. S. Okuyama *et al.*, Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga Hypnea japonica for core (alpha1-6) fucosylated N-glycans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 912-920 (2009).

56. D. J. Becker *et al.*, Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**, 41R-53R (2003).

57. Y. Kizuka *et al.*, An alkynyl-fucose halts hepatoma cell migration and invasion by inhibiting GDP-fucose-synthesizing enzyme FX, TSTA3. *Cell chemical biology* **24**, 1467-1478. e1465 (2017).

58. R. I. Albu, *et al.*, Extracellular domain N-glycosylation controls human thrombopoietin receptor cell surface levels. *Frontiers in Endocrinology* **2**, 71 (2011).

59. M. Araki *et al.*, Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127**, 1307-1316 (2016).

60. I. Chachoua *et al.*, Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **127**, 1325-1335 (2016).

61. L. N. Varghese *et al.*, The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Frontiers in Endocrinology* **8**, 59 (2017).

62. N. Masubuchi *et al.*, Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia* **34**, 499-509 (2020).

63. E. Leroy *et al.*, His499 regulates dimerization and prevents oncogenic activation by asparagine mutations of the human thrombopoietin receptor. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 2974-2987 (2016).

64. E. E. Matthews *et al.*, Thrombopoietin receptor activation: transmembrane helix dimerization, rotation, and allosteric modulation. *The FASEB Journal* **25**, 2234-2244 (2011).

65. S. Wilmes *et al.*, Mechanism of homodimeric cytokine receptor activation and dysregulation by oncogenic mutations. *Science* **367**, 643-652 (2020).

66. M.-J. Kim *et al.*, NMR structural studies of interactions of a small, nonpeptidyl Tpo mimic with the thrombopoietin receptor extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 14253-14261 (2007).

67. J. J. Caramelo *et al.*, How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. *Seminars in cell & developmental biology* **6**, 732-742 (2007).

68. A. R. Patil *et al.*, Kinetics and the mechanism of interaction of the endoplasmic reticulum chaperone, calreticulin, with monoglucosylated (Glc1Man9GlcNAc2) substrate. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 24348-24356 (2000).

69. C. Pecquet *et al.*, Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *blood* **133**, 2669-2681 (2019).

70. *遺伝子組換えヒイロチャワンタケ　レクチン*. COSMO BIO, https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/jom-20130118.asp?entry_id=10404

71. M. Haniu *et al.*, Disulfide structure and N-glycosylation sites of an extracellular domain of granulocyte-colony stimulating factor receptor. *Biochemistry* **35**, 13040-13046 (1996).

72. H. Raslova *et al.*, Eltrombopag, a potent stimulator of megakaryopoiesis. *Haematologica*

101, 1443-1445 (2016).

73. C. A. Di Buduo *et al.*, Revealing eltrombopag's promotion of human megakaryopoiesis through AKT/ERK-dependent pathway activation. *Haematologica* **101**, 1479 (2016).

74. M. Currao *et al.*, High doses of romiplostim induce proliferation and reduce proplatelet formation by human megakaryocytes. *PLoS One* **8**, e54723 (2013).

75. A. Nakamura‐Ishizu *et al.*, Multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1466**, 51-58 (2020).

76. L. Cui *et al.*, Tuning MPL signaling to influence hematopoietic stem cell differentiation and inhibit essential thrombocythemia progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, (2021).

77. 椿. 玲未, *カイメン すてきなスカスカ*. (岩波書店, 2021).

78. J. M. Musser *et al.*, Profiling cellular diversity in sponges informs animal cell type and nervous system evolution. *Science* **374**, 717-723 (2021).

79. M. T. Ashraf *et al,*. Mitogenic lectins. *Medical Science Monitor* **9**, 265-269 (2003).

80. Y. Saito, Self and nonself recognition in a marine sponge, Halichondria japonica (Demospongiae). *Zoological science* **30**, 651-657 (2013).

81. E. Gaino *et al.*, Self/non‐self recognition in sponges. *Italian Journal of Zoology* **66**, 299-315 (1999).

82. S. M. Gomes Filho *et al.*, Marine sponge lectins: Actual status on properties and biological activities. *Molecules* **20**, 348-357 (2015).

83. W. Atsuumi.

84. K. H. Sharp *et al.*, Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge Corticium sp. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 622-629 (2007).

85. T. Nakamura *et al.*, A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* **107**, 4300-4307 (2006).

86. N. Komatsu *et al.*, Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer research* **51**, 341-348 (1991).

87. N. Komatsu *et al.*, Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7.*blood* **82**, 456-464 (1993).

付録図表

目次

Figure S1. Anion exchange chromatography of the acid precipitate: DE52. 105
Figure S2. Hydrophobic interaction chromatography, Butyl Toyopearl 650M. 106
Figure S3. Size exclusion chromatography, TSKgel G2000SW. 107
Figure S4. Phylogenetic tree of ThC and putative bacterial fucose binding lectins and TPO.....108
Figure S5. LC-MS/MS and Edman degradation mapping......120
Figure S6. Surface Plasmon Resonance of ThC and fucose/mannose with Ca^{2+} 122
Figure S7. Results of ITC of BC2LC-ct (top) and PA-IIL (bottom).....123
Figure S8. Alignment of proteins with amino acid sequence homology to ThC.....125
Figure S9. Proliferation of Ba/F3-HuMpl cell with *serratia* lectin 126
Figure S10. A comparison of *Corticium* sponges collected at different areas by HPLC and SDS-PAGE 127
Figure S11. Gel filtration chromatography and SDS-PAGE of expressed proteins 128
Table S1. Blast search for similar proteins based on the amino acid sequence of ThC129
Table S2. Affinities and thermodynamic parameters of binding 130
Table S3. Data collection and refinement statistics 131
Table S4. Nucleotide sequences for protein expression and its primers.....132
Table S5. Primers used for the construction of MPL derivatives.....137

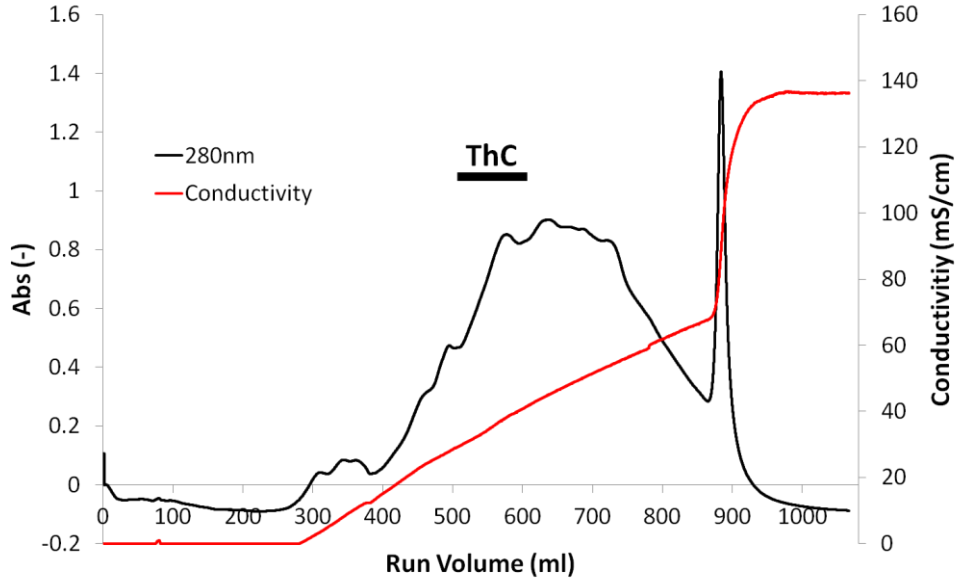


Figure S1. Anion exchange chromatography of the acid precipitate: DE52.

ThC was eluted in the conductivity range between 28.5 to 40.8. Protein was monitored by absorbance at 280 nm (-). Counter ion-concentration was monitored by Conductivity (-) .
*中島修論より引用

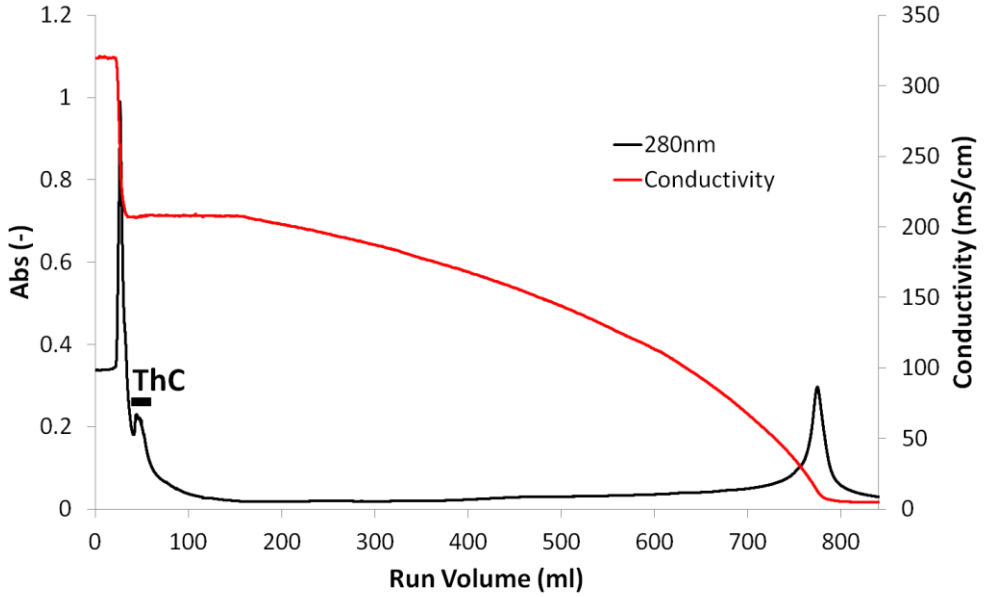


Figure S2. Hydrophobic interaction chromatography, Butyl Toyopearl 650M.

ThC was eluted in 1 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM Tris-HCl (pH8.0). Protein was monitored by absorbance at 280 nm (-). $(NH_4)_2SO_4$-concentration was monitored by Conductivity (-) .

*中島修論より引用

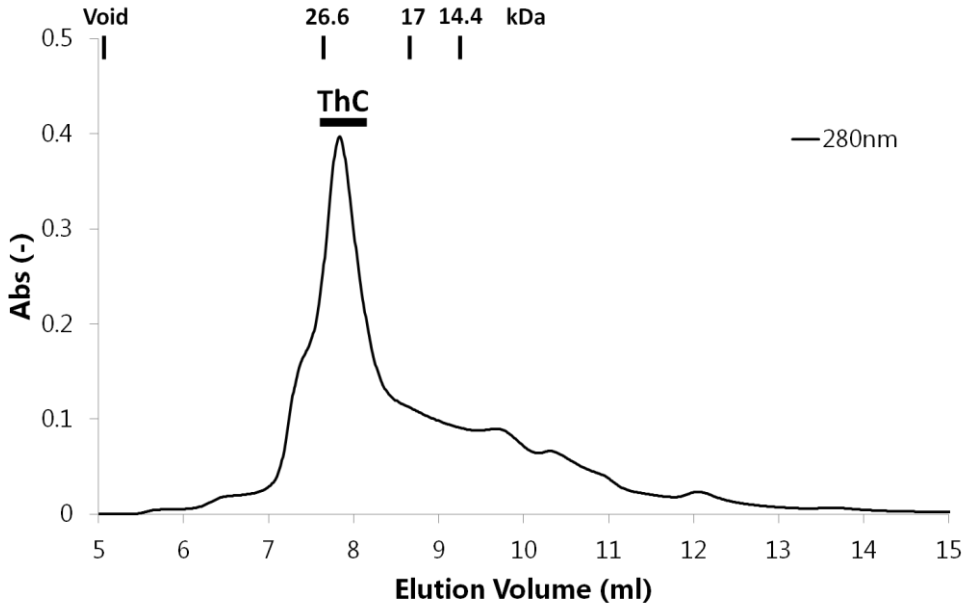


Figure S3. Size exclusion chromatography, TSKgel G2000SW.

ThC was eluted in run volume of 7.5 to 8.5 mL. Protein was monitored by absorbance at 280 nm (-). Molecular weights were estimated using polypeptide SDS standard.

*中島修論より引用

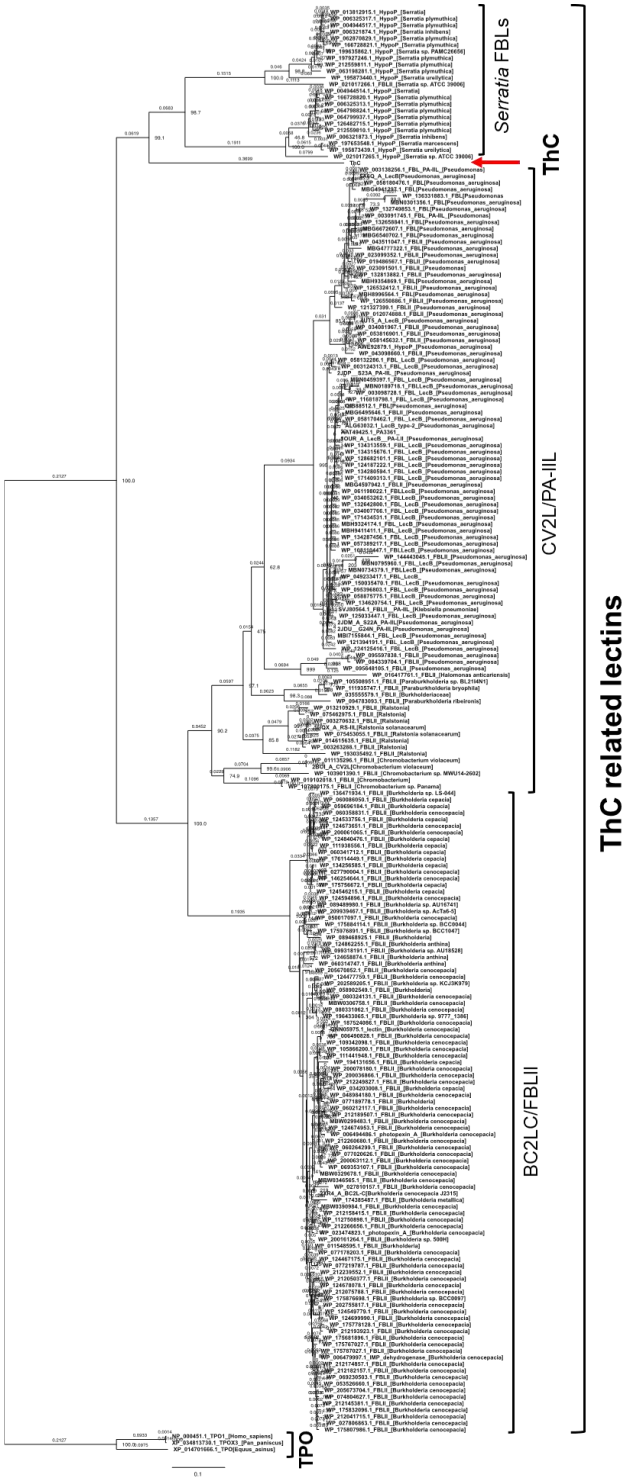


Figure S4. Phylogenetic tree of ThC and putative bacterial fucose binding lectins and TPO

Bootstrap probabilities of 1,000 replications are shown at each node. A scale bar indicates the genetic distance represented by the horizontal branches.

Figure S5A

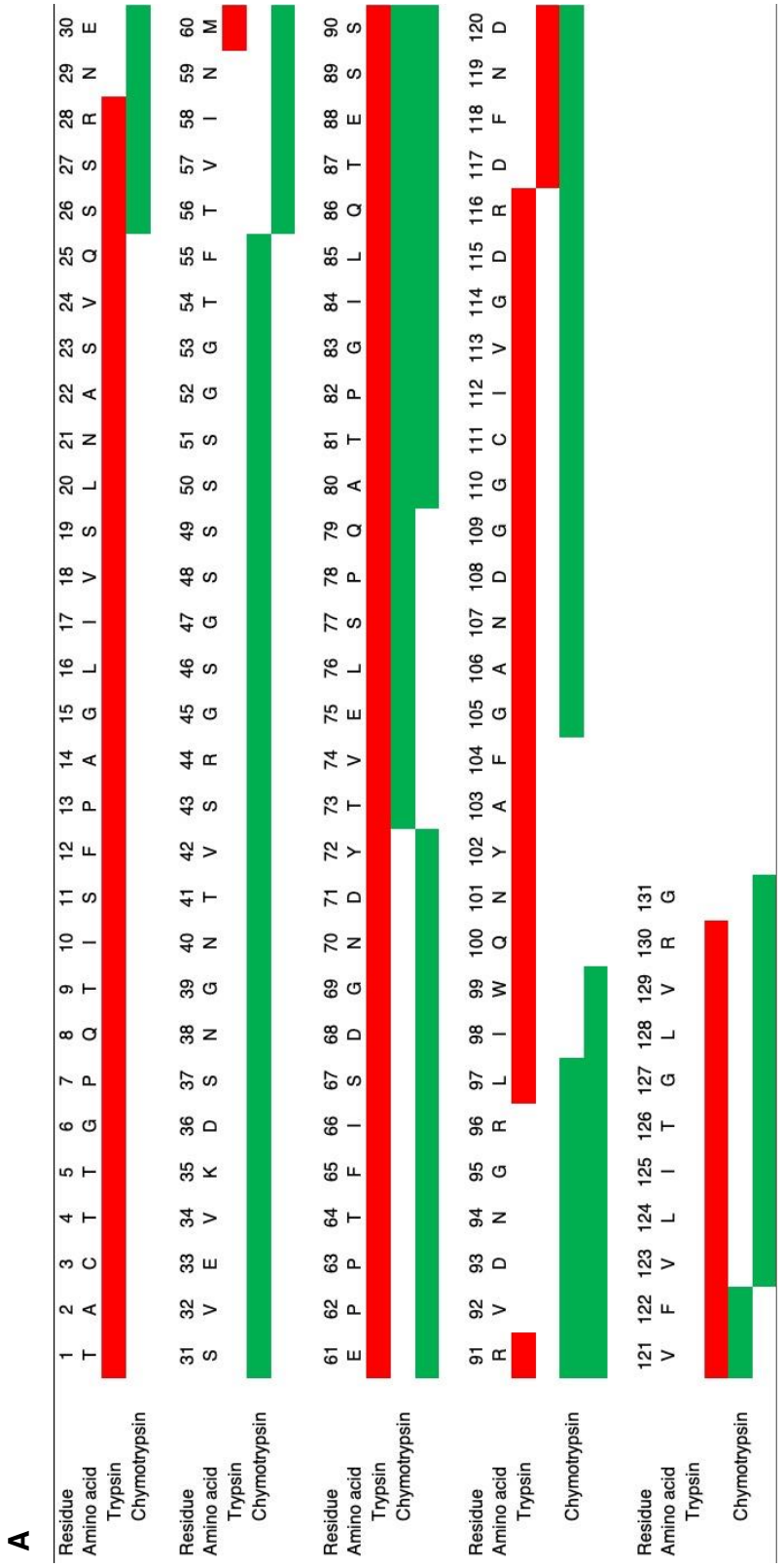
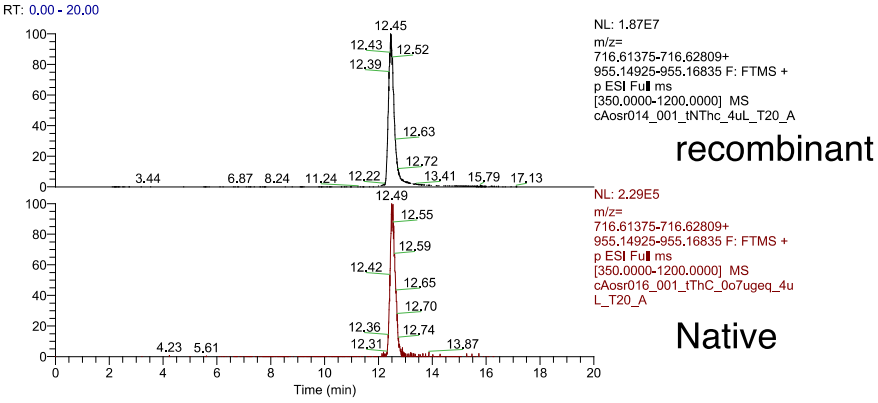
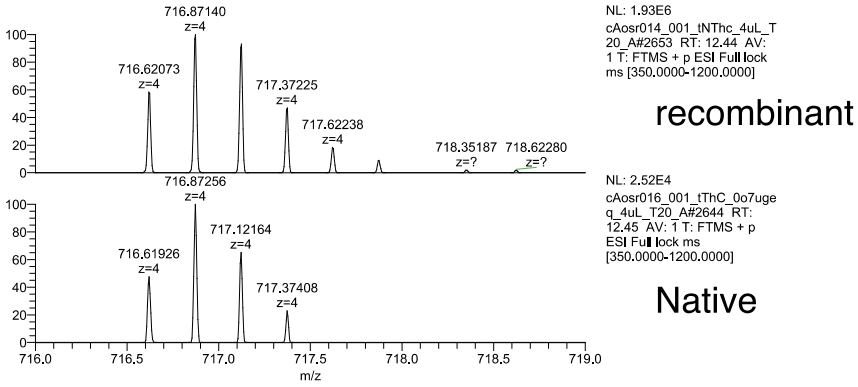

A
Residue 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Amino acid T A C T T G P Q T I S F P A G L I V S L N A S V Q S S R N E
Trypsin
Chymotrypsin
Residue 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
Amino acid S V E V K D S N G N T V S R G S G S S S G G T F T V I N M
Trypsin
Chymotrypsin
Residue 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
Amino acid E P P T F I S D G N D Y T V E L S P Q A T P G I L Q T E S S
Trypsin
Chymotrypsin
Residue 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
Amino acid R V D N G R L I W Q N Y A F G A N D G G C I V G D R D F N D
Trypsin
Chymotrypsin
Residue 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131
Amino acid V F V L I T G L V R G
Trypsin
Chymotrypsin

Figure S5B-1

B TAcTTGPQTISFPAGLIVSLNASVQSSR (res 1-28)



charge 4 (theoretical m/z=716.62092)
recombinant m/z=716.62140, RT=12.62 Δppm = 0.63 (PD)
Native



charge 3 (theoretical m/z=955.15880)
recombinant
Native m/z=955.15845, RT=12.38, Δppm=-0.41 (PD)

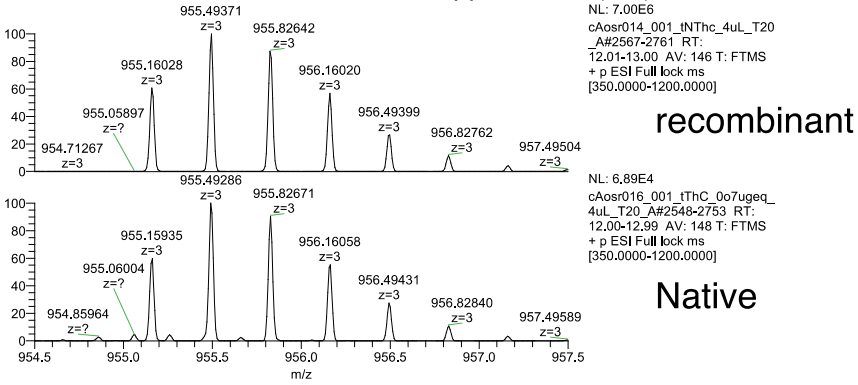
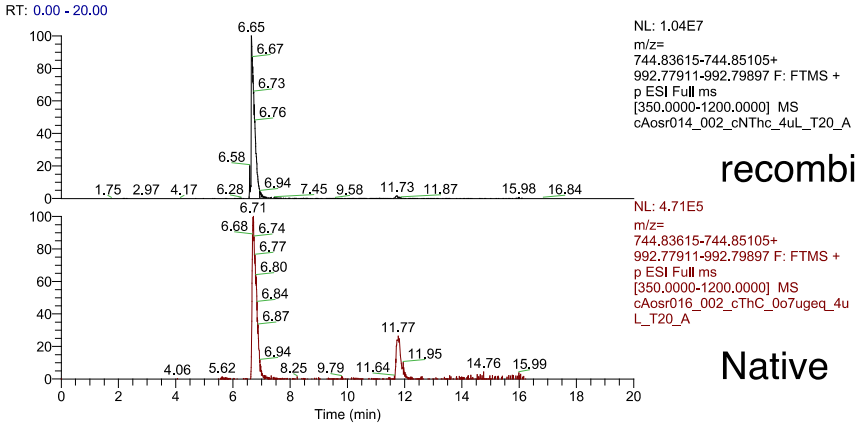
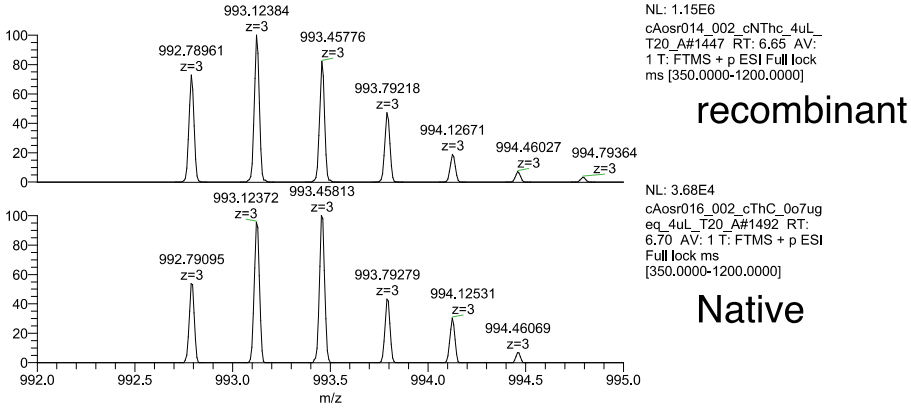


Figure S5B-2

SSRNESVEVKDSNGNTVSRGSGSSSSGGTF (res 26-55)



charge 3 (theoretical m/z=992.78904)
recombinant m/z=992.78967, RT=6.59, Δppm=0.60 (PD)
Native



charge 4 (theoretical m/z=744.84360)
recombinant m/z=744.8442, RT=6.57, Δppm=0.8 (PEAKS)
Native m/z=744.8444, RT=6.71, Δppm=1.0 (PEAKS)

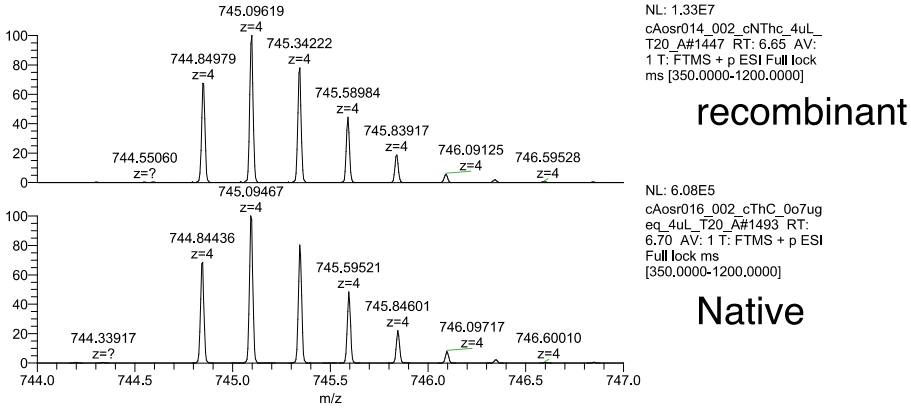
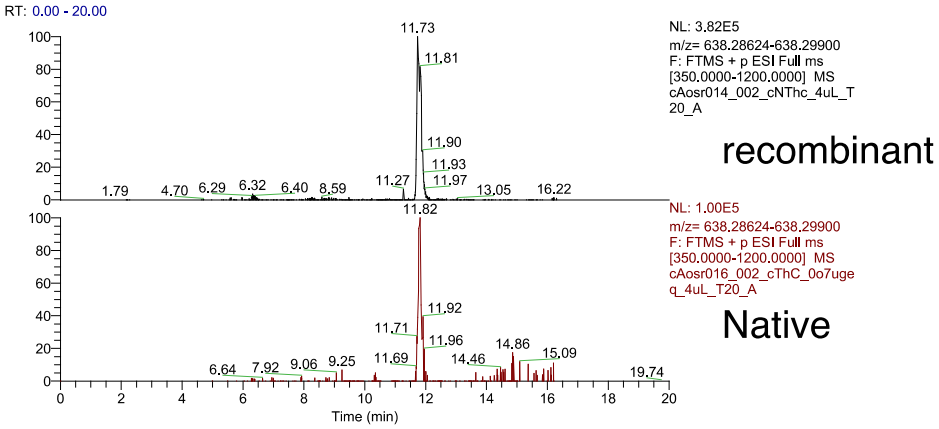


Figure S5B-3

TVINMEPPTFISDGNDY (res 56-72)



charge 3 (theoretical m/z=638.29262)
recombinant m/z=638.2927, RT=11.71, Δppm=0.2 (PEAKS)
Native m/z=638.2935, RT=11.80, Δppm=1.4 (PEAKS)

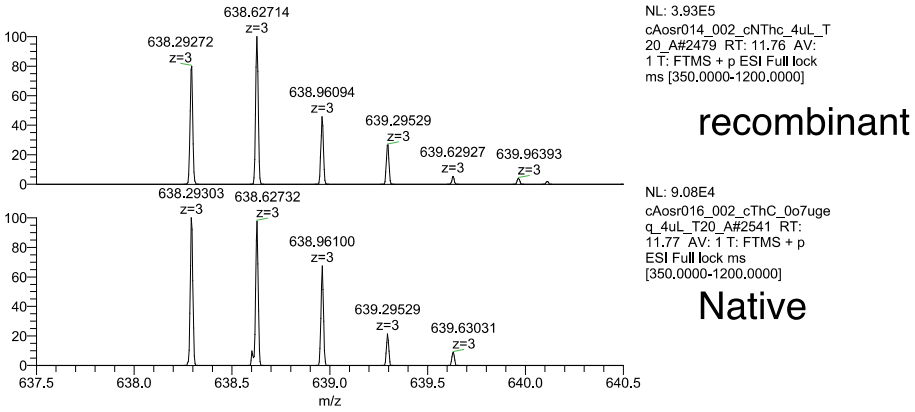
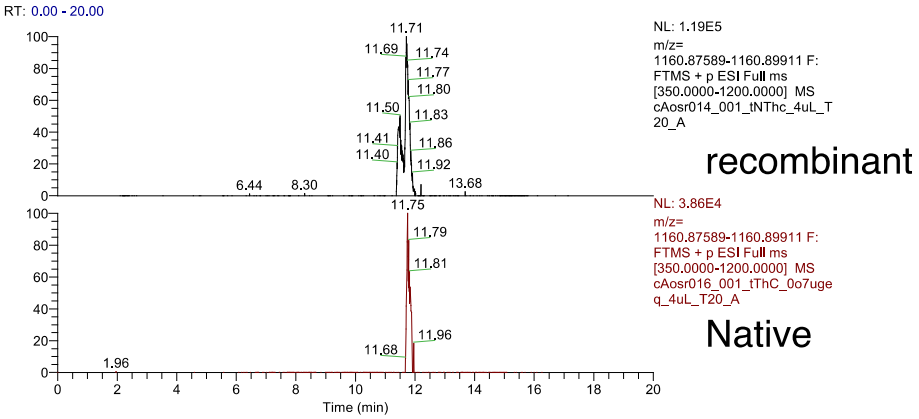


Figure S5B-4

MEPPTFISDGNDYTVELSPQATPGILQTESSR (res 60-91)



charge 3 (theoretical m/z=1160.88736)
recombinant
Native m/z=1160.8875, RT=11.75, Δppm=0.1 (PEAKS)

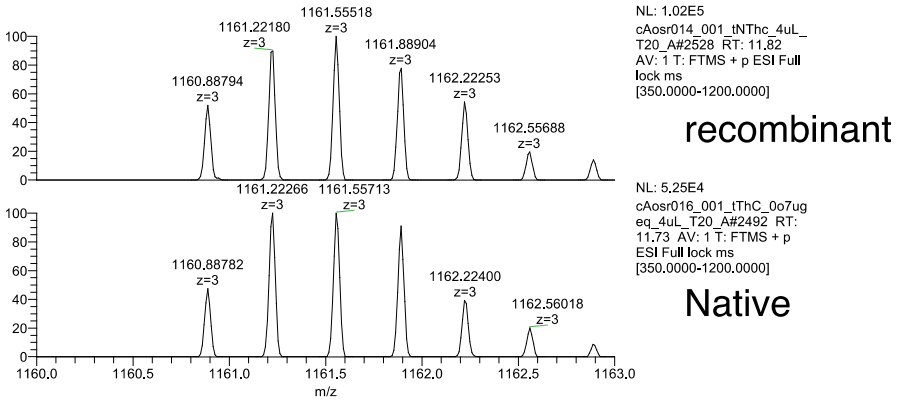
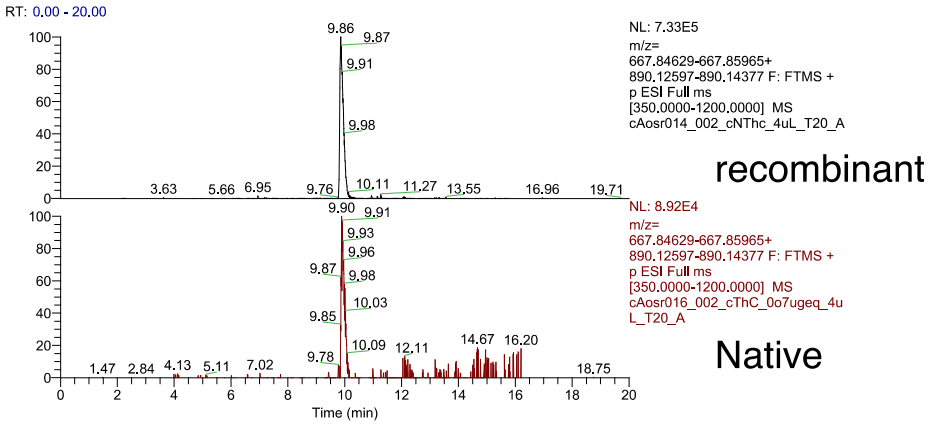
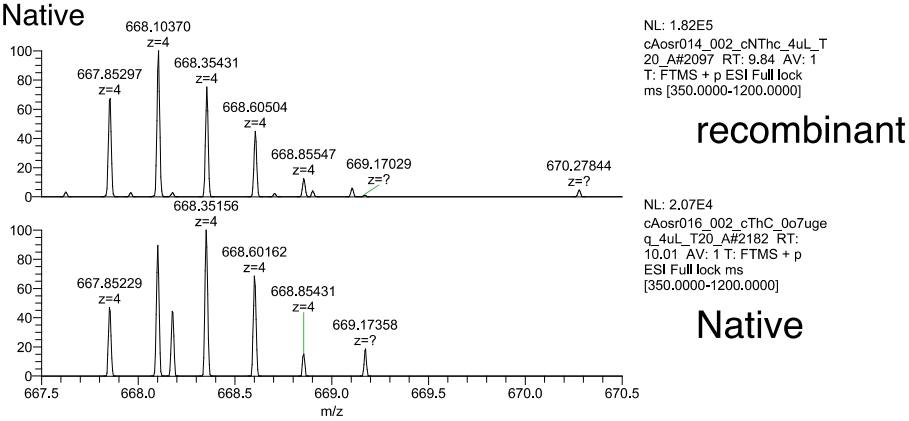


Figure S5B-5

TVELSPQATPGILQTESSRVDNGRL (res 73-97)



charge 4 (theoretical m/z=667.85297)
recombinant m/z=667.85278, RT=9.83, Δppm=-0.33 (PD)
Native



charge 3 (theoretical m/z=890.13487)
recombinant
Native m/z=890.13531, RT=9.89, Δppm=0.46 (PD)

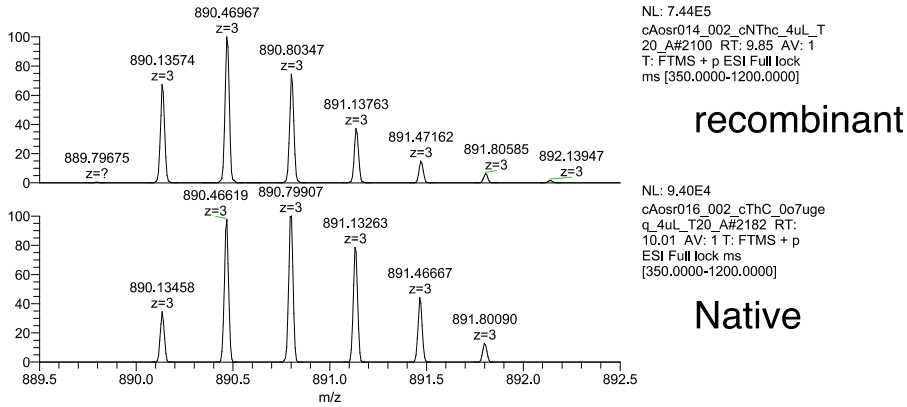
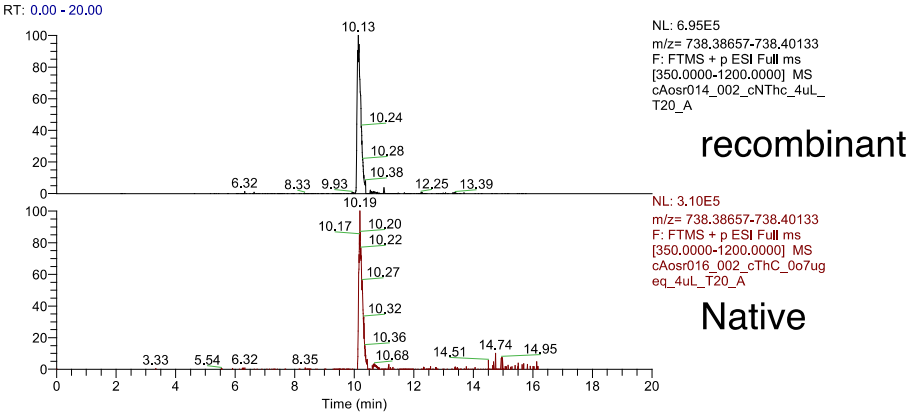


Figure S5B-6

ATPGILQTESSRVDNGRLIW (res 80-99)



charge 3 (theoretical m/z=738.39395)
recombinant m/z=738.39441, RT=10.09, Δppm=0.57 (PD)
Native m/z=738.39429, RT=10.14, Δppm=0.41 (PD)

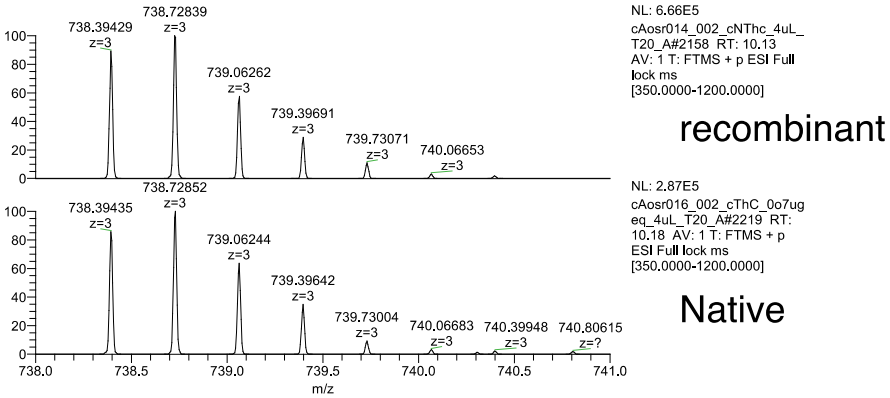
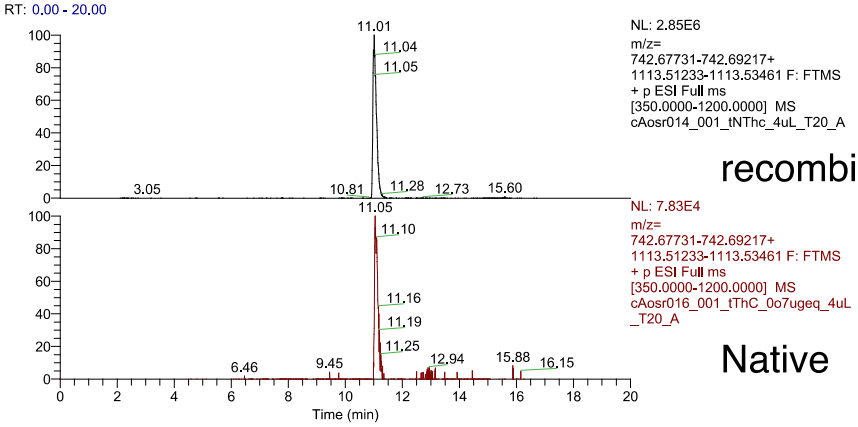
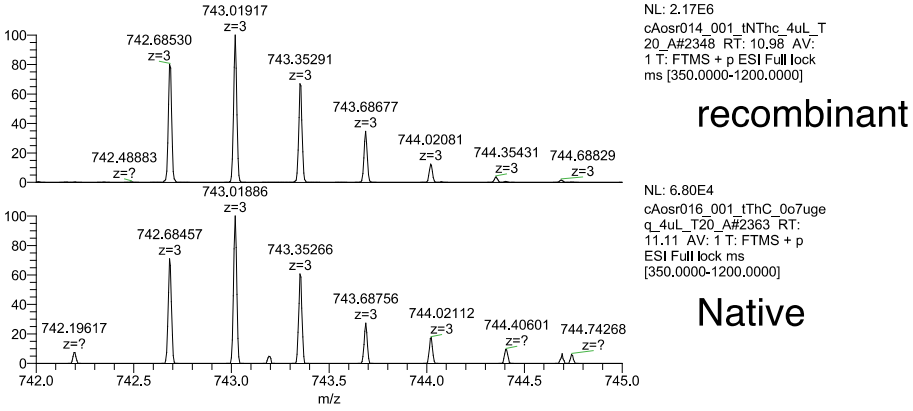


Figure S5B-7

LIWQNYAFGANDGGcIVGDR (res 97-116)



charge 3 (theoretical m/z=742.68474)
recombinant
Native m/z=742.68451, RT=11.06, Δppm=-0.36 (PD)



charge 2 (theoretical 1113.52347)
recombinant m/z=1113.52417, RT=10.96, Δppm=0.58 (PD)
Native

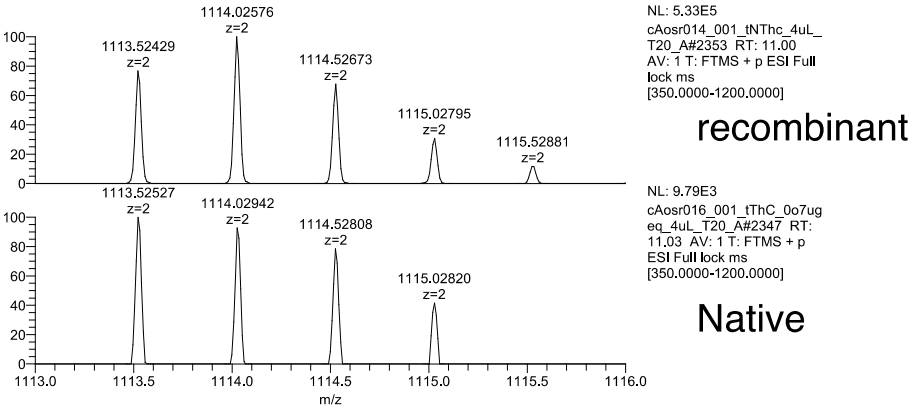
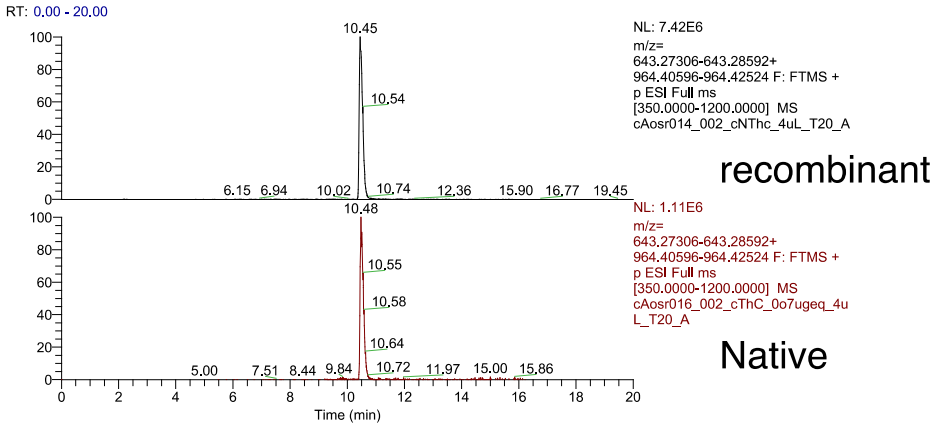


Figure S5B-8

GANDGGclVGDRDFNDVF (res 105-122)



charge 2 (theoretical m/z=964.41560)
recombinant m/z=964.41559, RT=10.41, Δppm=-0.06 (PD)
Native m/z=964.41583, RT=10.43, Δppm=0.19 (PD)

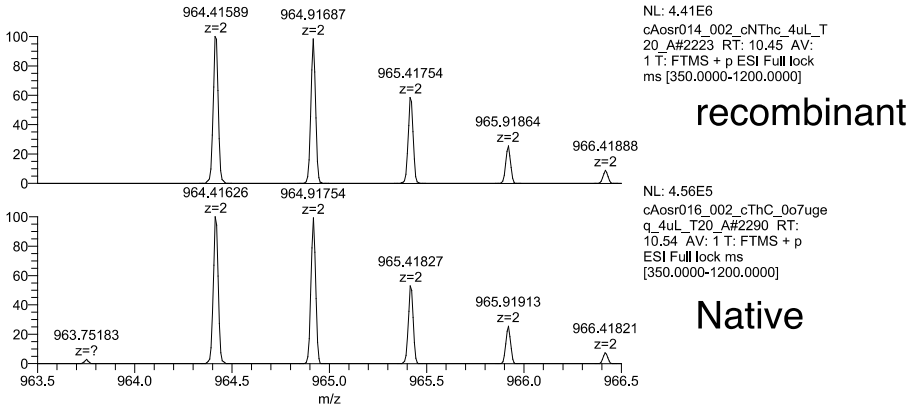
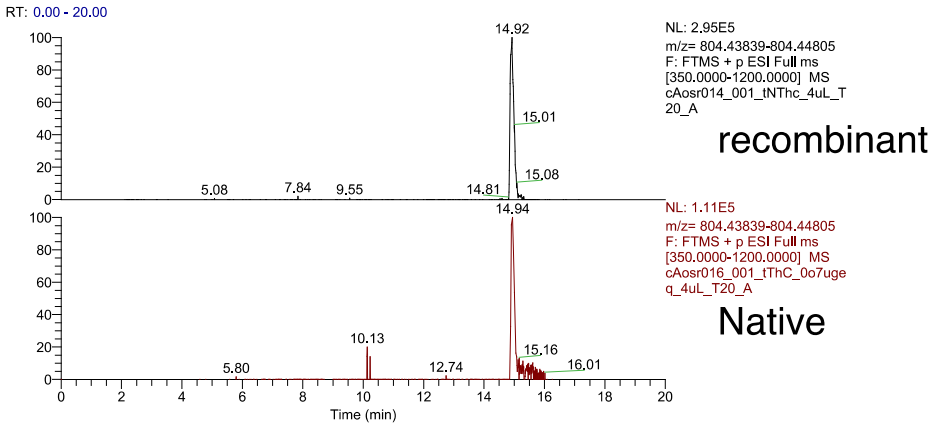


Figure S5B-9

DFNDVFVLITGLVR (res 117-130)



charge 2 (theoretical m/z=804.44322)
recombinant m/z=804.44360, RT=14.85, Δppm=0.42 (PD)
Native m/z=804.44287, RT=14.94, Δppm=-0.49 (PD)

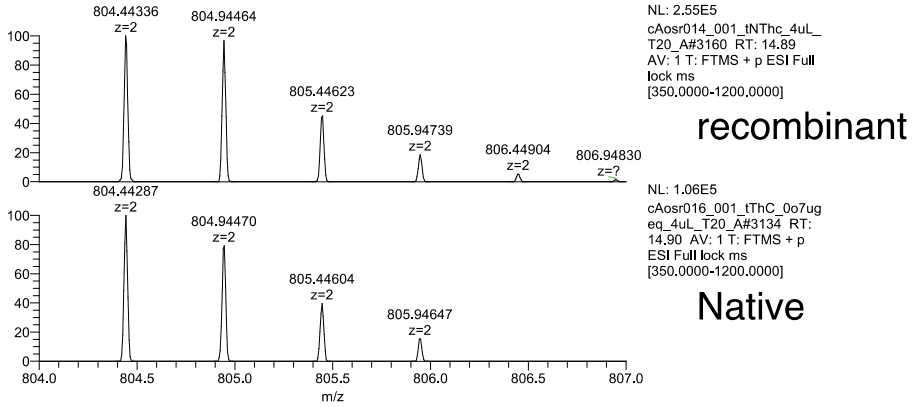
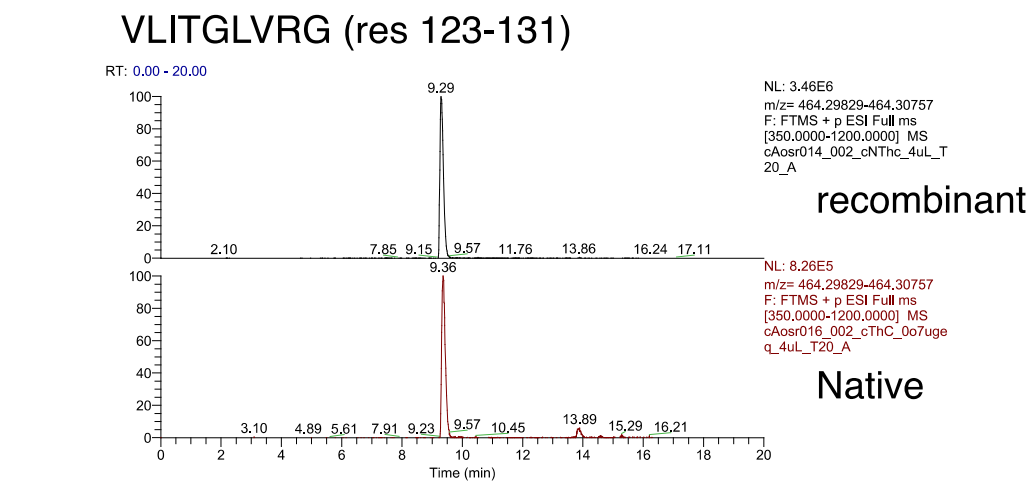


Figure S5B-10



charge 2 (theoretical m/z=464.30293)
recombinant
Native m/z=464.40289, RT=9.30, Δppm=-0.14 (PD)

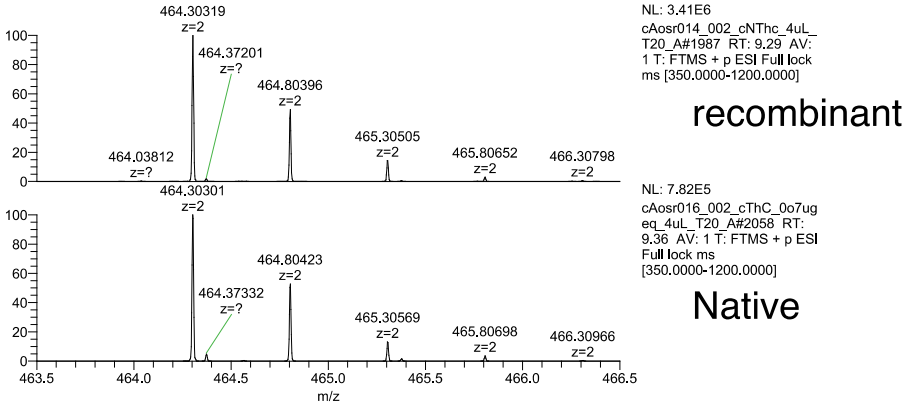


Figure S5C

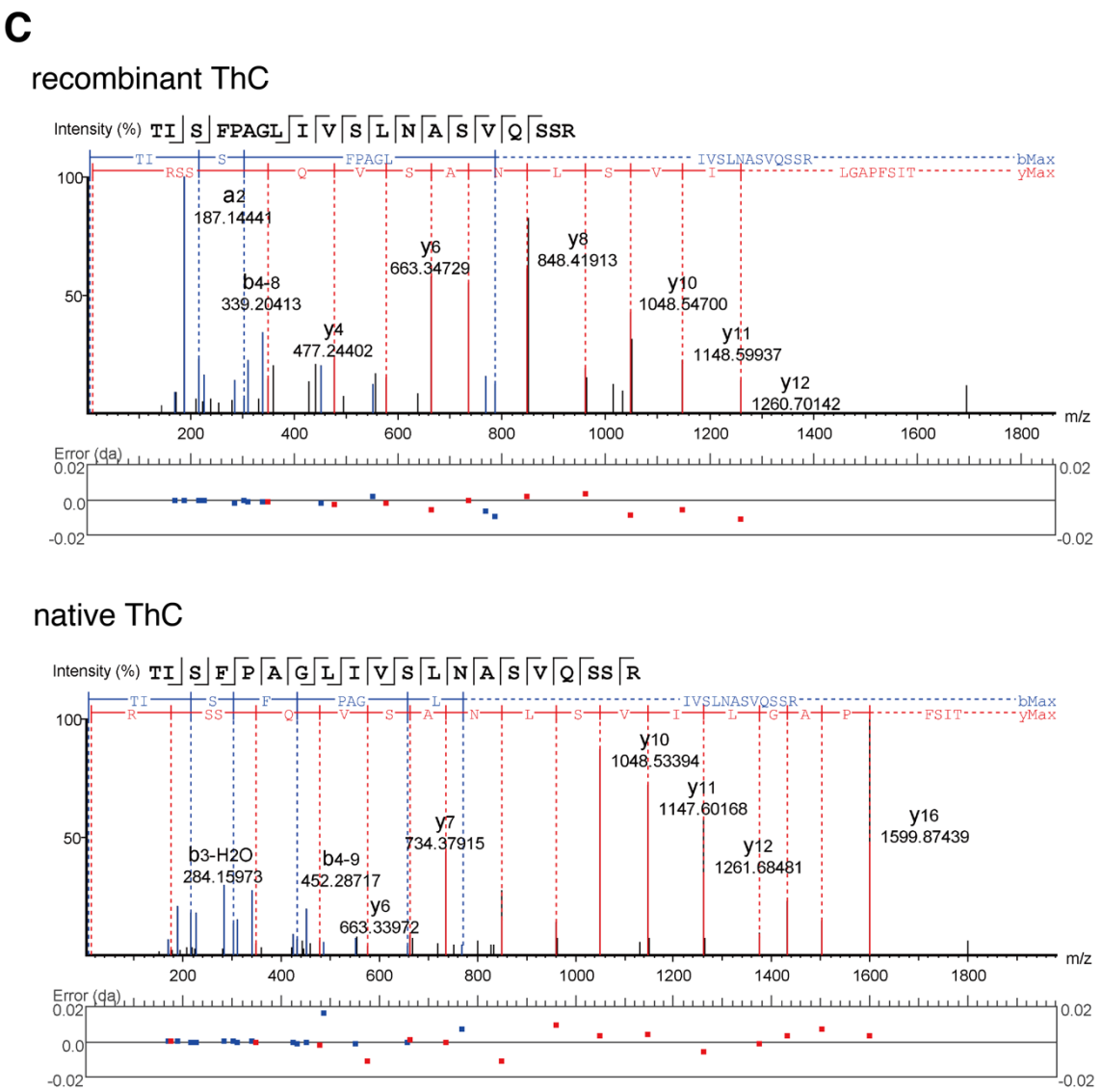
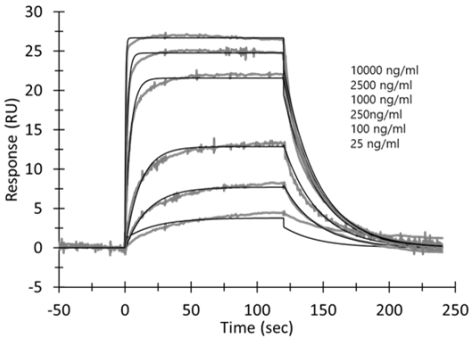


Figure S5. LC-MS/MS and Edman degradation mapping.

(**A**) Sequence coverage of n-ThC sequenced by LC-MS/MS. Peptide fragments, of which amino acid sequence were determined, generated by trypsin or chymotrypsin and shown red and green, respectively. Cys residue was treated with iodoacetamide to prevent from S-S bond reformation thus Cys residue was searched as Cys carbamidomethylation. (**B**) Mass spectrometry confirmation of the identified peptides of n-ThC compared with r-ThC. Extracted ion chromatograms (XICs) of the identified peptides of r-ThC and n-ThC were shown as black and red, respectively. MS spectra of the charged peptide ion from r-ThC (upper) and n-ThC (bottom) at the XIC peak are shown, respectively. RT, retention time; PD, the peptide identified by Proteome Discoverer (Thermo Scientific); PEAKS, the peptide identified by PEAKS studio X (Bioinformatics Solutions); Dppm, parts per million of the mass differences between observed

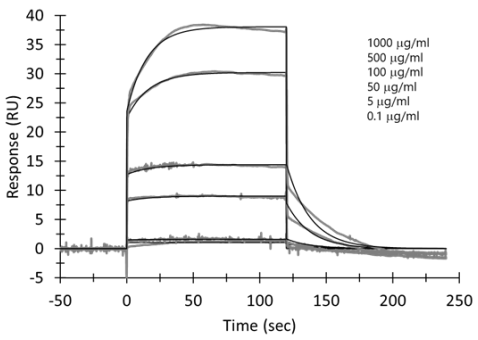
and theoretical m/z values. The m/z, RT, and Dppm of the peptide identified by PD or PEAKS were indicated. Carbamidomethyl-Cys residue was shown as lower case. (**C**) Annotated MS/MS fragmentation spectra for a putative N-terminal 9-28 residues, TISFPAGLIVSLNASVQSSR, derived from rThC (upper panel) and nThC (lower panel). MS/MS spectra were deconvoluted into singly charged ions from the observed spectra and theoretical m/z values for fragment ions were assigned for each peak. The identified matches for the N-terminal-containing ions are shown in blue and those for the C-terminal-containing ions in red. The m/z differences between theoretical and observed values for all assigned peaks were displayed in error map and were less than 0.02 Da. The MS/MS spectra confirmed that 25th residue was clearly assigned as Q. The exact masses and precursor isotope distribution of MS1 spectrum for the peptides derived from nThC and rThC (1-28 residues, 25Q) was also identical (B-1), in line with above sequence analyses confirming that 25th residue the N terminal sequence is Q, not E.

A (i)



ThC vs Fucose with Ca^{2+}

(ii)



ThC vs mannose with Ca^{2+}

B

	k_{on}	k_{off}	K_D
	$M^{-1}s^{-1}$	s^{-1}	M
L-(-)-Fucose	3.28×10^{4}	3.86×10^{-2}	1.18×10^{-6}
D-(+)-Mannose	1.70	5.60×10^{-2}	3.30×10^{-2}

Figure S6. Surface Plasmon Resonance of ThC and fucose/mannose with Ca^{2+}

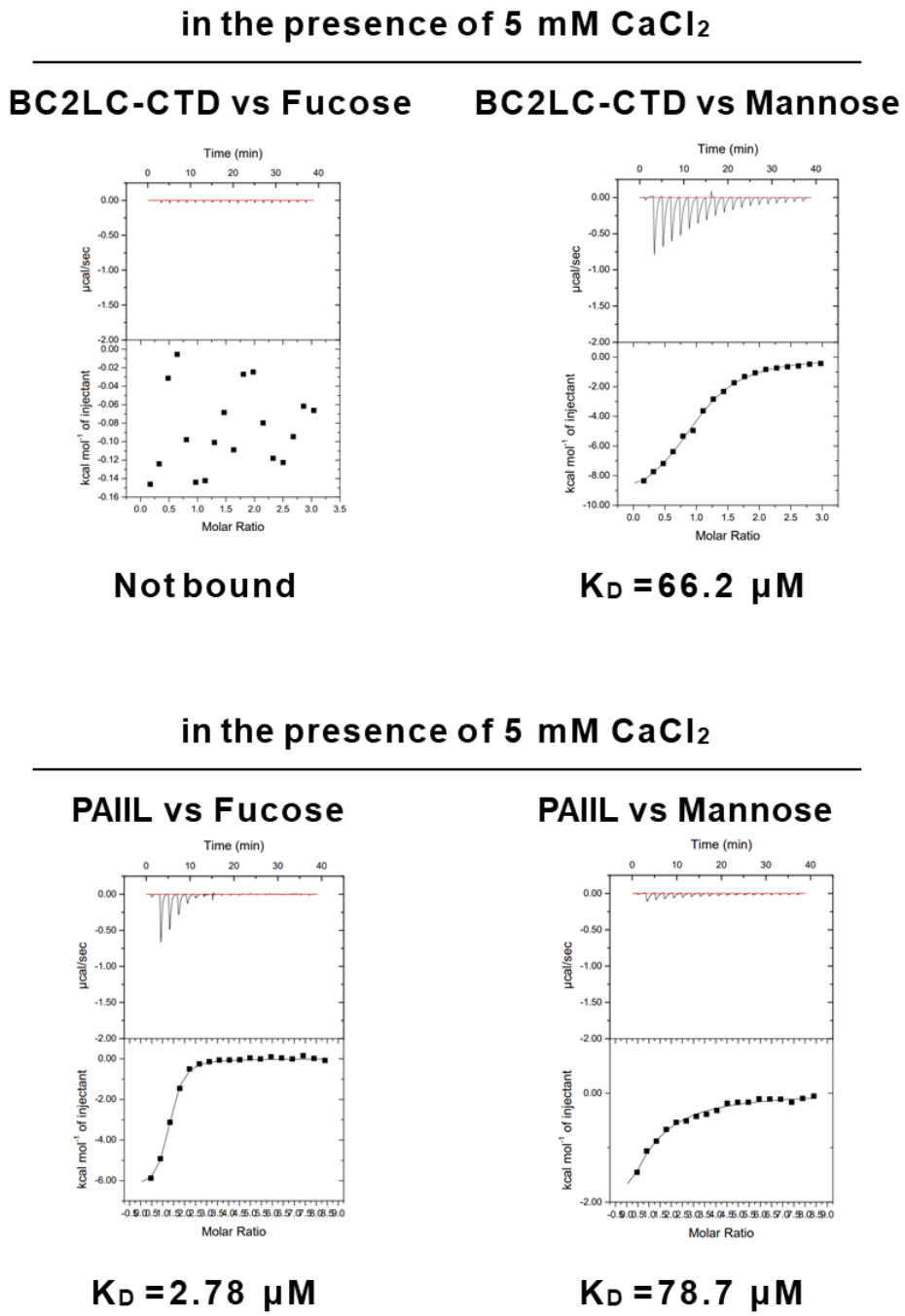
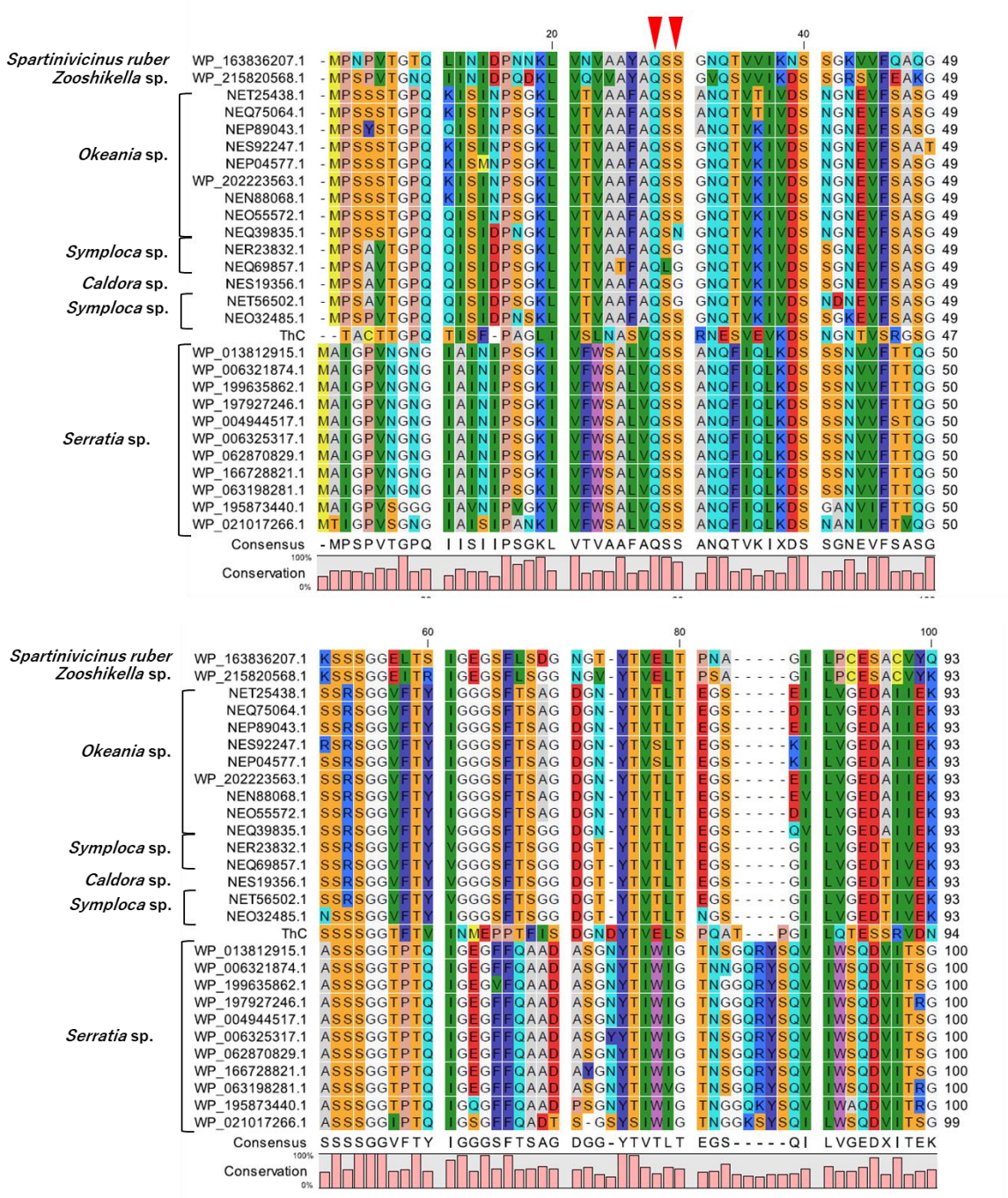


Figure S7. Results of ITC of BC2LC-ct (top) and PA-IIL (bottom)

K_D values are shown at the bottom. Thermodynamic parameters are shown in Table S2.


Spartinivicinus ruber
Zooshikella sp.
Okeania sp.
Symploca sp.
Caldora sp.
Symploca sp.
Serratia sp.
Consensus
Conservation

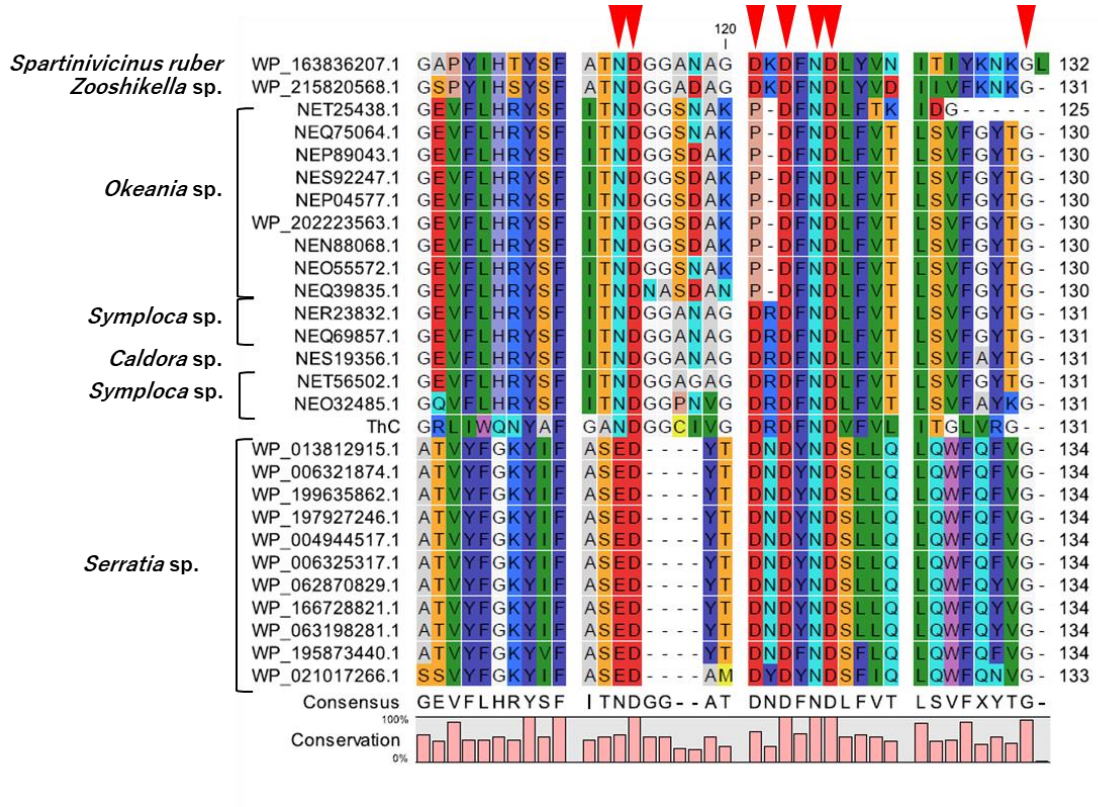


Figure S8. Alignment of proteins with amino acid sequence homology to ThC

Red arrows indicate amino acid residues that were found to be crucial for sugar binding by crystal structure analysis of ThC.

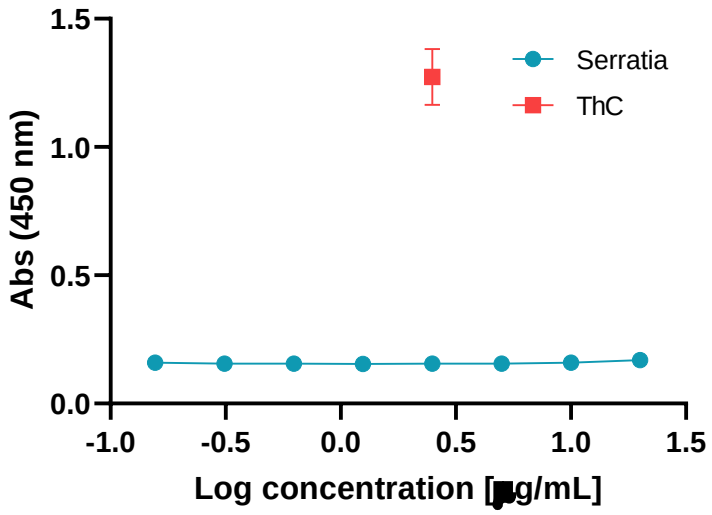


Figure S9. Proliferation of Ba/F3-HuMpl cell with *serratia* lectin

No cell proliferation observed at any concentration. ThC (1 μg/mL) was used as a control.

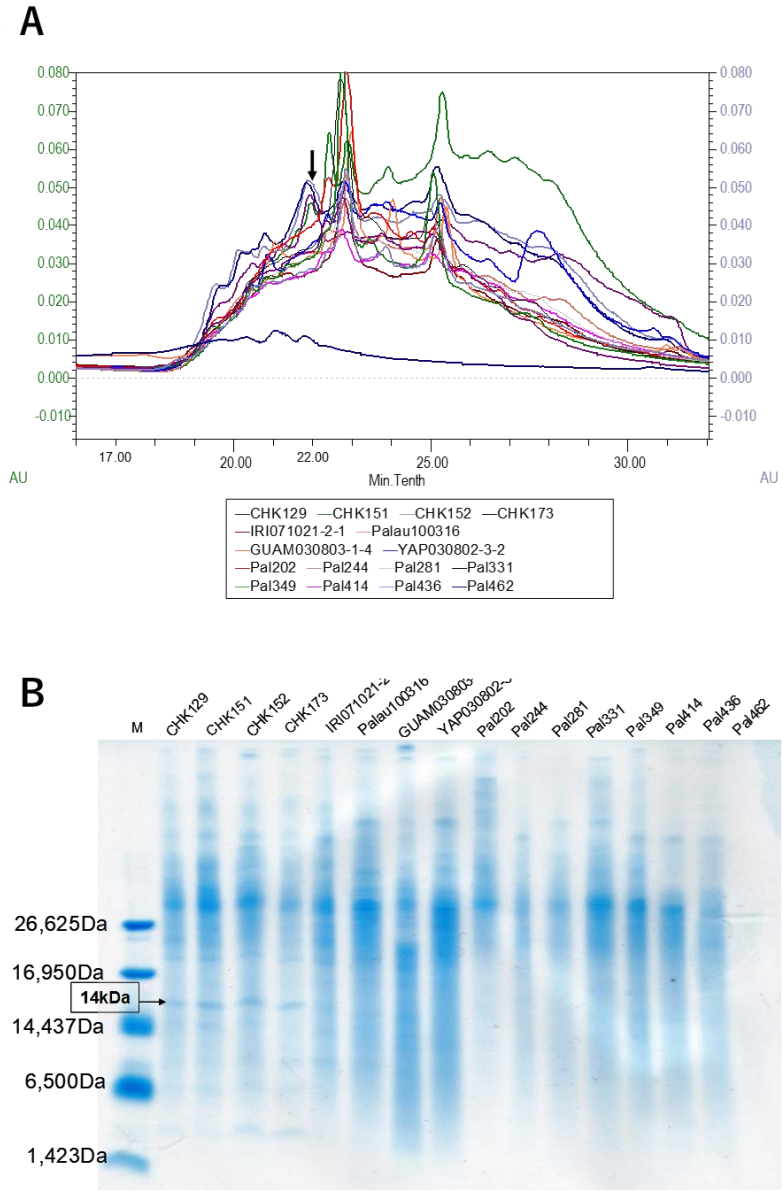


Figure S10. A comparison of *Corticium* sponges collected at different areas by HPLC and SDS-PAGE

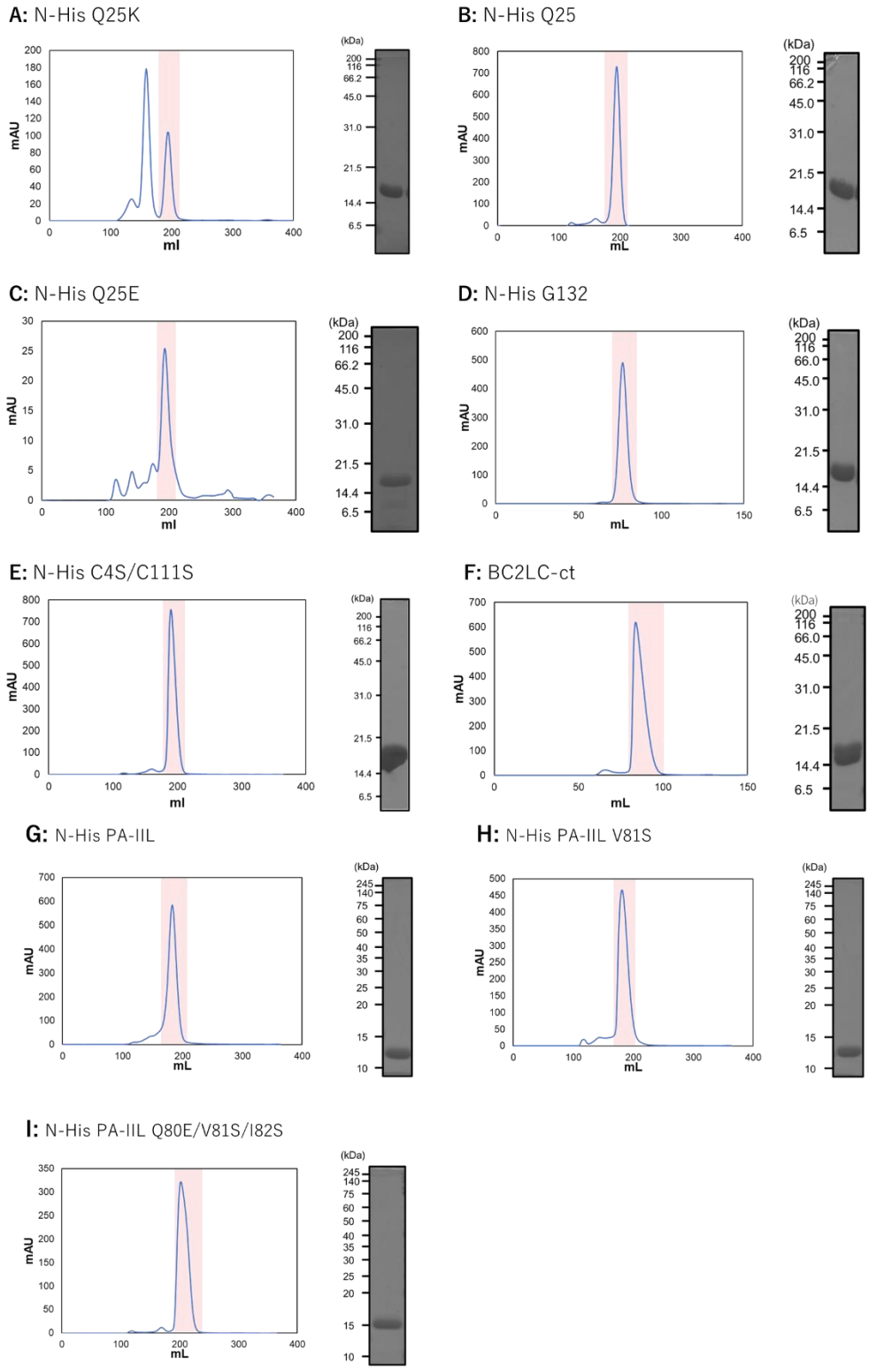


Figure S11. Gel filtration chromatography and SDS-PAGE of expressed proteins

Table S1. Blast search for similar proteins based on the amino acid sequence of ThC

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len	Accession
1	hypothetical protein [Spartinivicinus ruber]	Spartinivicinus ruber	88.6	88.6	93%	1.00E-19	46.77	131	WP_163836207.1
2	RICIN domain-containing protein [Myxococcales bacterium]	Myxococcales bacterium	87	87	94%	2.00E-17	44.8	278	MCA9688889.1
3	hypothetical protein [Zooshikella sp. WH53]	Zooshikella sp. WH53	82.4	82.4	93%	5.00E-17	45.97	131	WP_215820568.1
4	hypothetical protein [Okeania sp. SIO2B9]	Okeania sp. SIO2B9	76.6	76.6	95%	8.00E-15	41.27	130	NES92247.1
5	hypothetical protein [Symploca sp. SIO1C2]	Symploca sp. SIO1C2	74.7	74.7	95%	4.00E-14	44.44	131	NER23832.1
6	hypothetical protein [Caldora sp. SIO3E6]	Caldora sp. SIO3E6	74.7	74.7	95%	4.00E-14	44.44	131	NES19356.1
7	hypothetical protein [Symploca sp. SIO2E6]	Symploca sp. SIO2E6	73.9	73.9	95%	9.00E-14	44.44	131	NET56502.1
8	hypothetical protein [Symploca sp. SIO2D2]	Symploca sp. SIO2D2	70.9	70.9	95%	2.00E-12	42.86	131	NEQ69857.1
9	hypothetical protein [Symploca sp. SIO3C6]	Symploca sp. SIO3C6	70.5	70.5	93%	2.00E-12	46.34	131	NEO32485.1
10	hypothetical protein [Okeania sp. SIO4D6]	Okeania sp. SIO4D6	67.8	67.8	95%	2.00E-11	43.65	130	NEP04577.1
11	hypothetical protein [Okeania sp. SIO2C2]	Okeania sp. SIO2C2	67	67	95%	4.00E-11	43.65	130	NEP89043.1
12	hypothetical protein [Okeania sp. KiyG1]	Okeania sp. KiyG1	67	67	95%	4.00E-11	43.65	130	WP_202223563.1
13	hypothetical protein [Okeania sp. SIO1I7]	Okeania sp. SIO1I7	66.2	66.2	96%	6.00E-11	44.09	125	NET25438.1
14	hypothetical protein [Okeania sp. SIO3H1]	Okeania sp. SIO3H1	66.6	66.6	95%	7.00E-11	42.86	130	NEN88068.1
15	hypothetical protein [Okeania sp. SIO3B5]	Okeania sp. SIO3B5	66.2	66.2	95%	8.00E-11	43.65	130	NEO55572.1
16	hypothetical protein [Okeania sp. SIO2C9]	Okeania sp. SIO2C9	66.2	66.2	95%	8.00E-11	43.65	130	NEQ75064.1
17	hypothetical protein [Okeania sp. SIO3I5]	Okeania sp. SIO3I5	57.4	57.4	95%	2.00E-07	39.68	130	NEQ39835.1
18	hypothetical protein [Serratia]	Serratia	46.6	46.6	88%	0.003	28.57	134	WP_195873440.1
19	hypothetical protein [Serratia plymuthica]	Serratia plymuthica	45.4	45.4	84%	0.007	31.58	134	WP_004944517.1
20	Fucose-binding lectin II [Serratia sp. ATCC 39006]	Serratia sp. ATCC 39006	45.4	45.4	87%	0.008	33.05	133	WP_021017266.1
21	hypothetical protein [Serratia]	Serratia	45.4	45.4	84%	0.008	31.58	134	WP_013812915.1
22	hypothetical protein [Serratia plymuthica]	Serratia plymuthica	45.4	45.4	84%	0.008	31.58	134	WP_062870829.1
23	hypothetical protein [Serratia plymuthica]	Serratia plymuthica	45.4	45.4	84%	0.008	31.15	134	WP_166728821.1
24	hypothetical protein [Serratia plymuthica]	Serratia plymuthica	44.7	44.7	84%	0.014	31.58	134	WP_063198281.1
25	hypothetical protein [Serratia sp. PAMC26656]	Serratia sp. PAMC26656	44.7	44.7	84%	0.016	30.7	134	WP_199635862.1
26	hypothetical protein [Serratia plymuthica]	Serratia plymuthica	44.3	44.3	84%	0.019	31.58	134	WP_006325317.1
27	hypothetical protein [Serratia inhibens]	Serratia inhibens	43.9	43.9	84%	0.025	30.7	134	WP_006321874.1
28	hypothetical protein [Serratia plymuthica]	Serratia plymuthica	43.9	43.9	84%	0.028	30.7	134	WP_197927246.1

Table S2. Affinities and thermodynamic parameters of binding

protein	ligand	5mM $CaCl_2$	K_D (μM)[a]	ΔH (kcal mol^{-1})[b]	ΔS (cal mol^{-1} K^{-1})[b]	K_A (M^{-1} x 10^4)[b]	K_D in the previous report (μM)
rThC	fucose	+	4.72 ± 0.25	-8.14	-2.94	21.2 ± 1.12	
		-	NB	NB	NB	NB	
	mannose	+	66.2 ± 15.3	-0.76	16.6	1.51 ± 0.35	
		-	NB	NB	NB	NB	
Q25K	fucose	+	NB	NB	NB	NB	
G132	fucose	+	NB	NB	NB	NB	
BC2LC-CTD	fucose	+	NB	NB	NB	NB	
	mannose	+	17.7 ± 0.32	-10.0	-11.9	5.65 ± 0.42	37.4[c]
PA-IIL	fucose	+	2.78 ± 0.30	-6.46	3.75	35.9 ± 3.90	2.9 ± 0.03[d]
	mannose	+	78.7 ± 23.6	-9.46	-12.9	1.27 ± 0.38	(Me-α-Man: 71 ± 3)[d]

Not bound is indicated by "NB".

a $K_D = 1/K_A$

b $RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$

c https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002238

d https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2006.01.030

Table S3. Data collection and refinement statistics

		Native ThC	SeMet Substituted rThC	rThC in complex with Ca^{2+} and fucose	rThC in complex with Ca^{2+} and mannose	rThC Q25K in complex with Ca^{2+}
PDB ID		7F9F	7F91	7F9G	7FBL	7F9J
Beamline		APS BL 21-ID-F	Photon Factory BL-1A	Photon Factory NE3A	Photon Factory NE3A	Photon Factory NE3A
Data collection						
Space group		$P\,2_1$	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$
Cell dimensions						
	a, b, c (Å)	42.46, 92.44, 58.54	41.80, 45.00, 109.91	41.52, 44.72, 108.58	41.57, 44.98, 109.26	41.66, 44.88, 109.56
	α, β, γ (°)	90, 102.8, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å) [a]		30.47 - 1.41 (1.43 - 1.41)	41.64 - 1.40 (1.49 - 1.40)	41.35 -1.33 (1.41 - 1.33)	41.59 - 1.42 (1.50 - 1.42)	38.94 - 1.10 (1.17 - 1.10)
R_{sym} (%) [a]		9.9 (64.2)	9.6 (66.3)	5.7 (37.7)	7.7 (50.3)	5.3 (65.8)
$<I/\sigma(I)>$ [a]		25.15 (2.17)	11.28 (2.14)	26.05 (5.64)	22.27 (4.64)	21.83 (2.70)
Completeness (%) [a]		99.9 (99.7)	99.9 (99.6)	99.8 (98.7)	99.7 (98.7)	99.4 (96.6)
Redundancy [a]		5.7 (4.4)	7.04 (7.07)	9.60 (9.48)	9.51 (9.31)	9.19 (7.57)
Wilson B-factor ($Å^2$)		10.3	13.6	9.1	9.6	10.9
Refinement						
No. of reflections used in refinement		81704	41580	47088	39532	83639
No. of reflections used for R_{free}		1950	2080	1642	1369	2900
R_{work} / R_{free}		0.169 / 0.194	0.175 / 0.200	0.155 / 0.168	0.162 / 0.182	0.185 / 0.197
No. atoms						
	Protein	3854	1940	2009	2017	2023
	Ligand	2	0	26	27	2
	Water	799	247	323	317	332
R.m.s deviations						
	Bond lengths (Å)	0.005	0.005	0.005	0.007	0.005
	Bond angles (°)	0.89	0.89	0.93	0.97	0.93
Average B-factor ($Å^2$)		15.4	17.0	11.6	11.1	14.3
	Protein	13.5	16.1	10.0	9.7	12.8
	ligand	7.9	-	14.7	7.4	18.1
	Water	24.9	24.3	21.6	20.4	23.2
Ramachandran plot						
	Favored (%)	97.67	97.67	97.67	97.28	98.05
	Allowed (%)	2.33	2.33	2.33	2.33	1.95
	Disallowed (%)	0	0	0	0.39	0

a The values in parentheses refer to data in the highest resolution shell.

Table S4. Nucleotide sequences for protein expression and its primers

(**A**)Sequences for ThC (**B**)BC2LC-ct (**C**)PA-IIL (**D**) Serratia fucose binding lectin.

S5-A

>base_seq_ThC_K25 [*Corticium* sp.] ATGACAGCCTGTACCACAGGTCCGCAGACCATCTCGTTTCCTGCTGGCTTGAT TGTGAGCCTGAATGCGTCCGTGAAAAGCTCGCGCAATGAGAGCGTTGAGGTC AAAGACTCCAACGGCAACACTGTCAGTCGTGGCTCTGGCTCGTCAAGCTCTG GTGGGACGTTTACCGTTATCAACATGGAACCACCGACCTTCATCAGCGATGGC AACGACTATACGGTCGAACTGAGTCCGCAAGCAACTCCCGGCATTCTGCAGAC CGAATCAAGTCGCGTAGACAATGGACGTCTGATTTGGCAGAACTACGCGTTT GGTGCCAATGATGGTGGCTGCATTGTAGGAGATCGGGATTTCAACGATGTGT TCGTGCTCATTACGGGGTTAGTTCGCGGT
>a.a._seq_ThC_K25Q MTACTTGPQTISFPAGLIVSLNASVQSSRNESVEVKDSNGNTVSRGSGSSSSGGTFT VINMEPPTFISDGNDYTVELSPQATPGILQTESSRVDNGRLIWQNYAFGANDGGCI VGDRDFNDVFVLITGLVRG
N-His_ThC_Q25K_pET28M >ThC_NdeI_forward NNNNNNNCATATGACAGCCTGTACCACAGGTC >ThC_XhoI_back NNNNCTCGAGTTAACCGCGAACTAACCCCG
N-His_ThC_K25Q_pET28M >ThC_K25Q_forward TCCGTGCAAAGCTCGCGCAATGAGAGC >ThC_K25Q_back CGAGCTTTGCACGGACGCATTCAGGCT
N-His_ThC_K25E_pET28M >ThC_K25E_forward TCCGTGGAAAGCTCGCGCAATGAGAGC >ThC_K25E_back

CGAGCTTTCCACGGACGCATTCAGGCT
N-His_ThC_G132_pET28M >ThC_G132_forward TTCGCGGTGGCTAACTCGAGCACC >ThC_G132_back GCTCGAGTTAGCCACCGCGAACTAAC
N-His_ThC_C4A_C111S_pET28M >ThC_C4S_forward CCATATGATGACAGCCAGCACCACAGGTCCGCAGAC >ThC_C111S_forward GGTGCCAATGATGGTGGCAGCATTGTAGGAGATCG

S5-B

>base_seq_BC2L-C_C-terminal_domain ATGGAACGGGATGGCACCTTCAATCTCCCACCGCATATCAAGTTCGGTGTGAC TGCACTGACCCATGCGGCGAACGATCAGACAATTGACATCTATATTGACGATG ACCCGAAACCAGCAGCGACGTTTAAAGGTGCCGGTGCACAAGACCAGAACTTG GGTACCAAAGTACTGGATAGTGGCAATGGCCGTGTTCGCGTCATCGTTATGG CCAATGGTCGCCCTTCCCGCTTGGGCTCTCGTCAGGTTGACATCTTCAAGAA GTCGTACTTCGGTATCATCGGTAGCGAGGATGGTGCCGATGATGACTATAAC GACGGCATTGTGTTTCTGAACTGGCCTTTAGGC
> a.a._seq_BC2L-C_C-terminal_domain MERDGTFNLPPHIKFGVTALTHAANDQTIDIYIDDDPKPAATFKGAGAQDQNLGT KVLDSGNGRVRVIVMANGRPSRLGSRQVDIFKKSYFGIIGSEDGADDDYNDGIVFL NWPLG
N-His_BC2L-C_C-terminal_domain_pET28M >BC2L-C_C-term_NdeI_forward NNNNNNNNCATATGGAACGGGATGGCACCTTC > BC2L-C_C-term _XhoI_back NNNNCTCGAGTTAGCCTAAAGGCCAGTTCAGAAACAC

S5-C:

>base_seq_PA-IIL ATGGCCACTCAAGGCGTTTTCACCCTTCCAGCGAATACGCGCTTTGGCGTAAC TGCCTTTGCGAATTCCGCAGGAACACAGACCGTTAACGTGCTGGTGAATAACG AGACAGCTGCGACGTTTTCGGGTCAGAGCACGAACAATGCGGTGATTGGGAC CCAAGTCCTGAACAGCGGTAGTAGCGGGAAAGTTCAGGTTCAGGTGTCAGTC AATGGTCGTCCGTCTGATCTGGTAAGTGCCCAGGTCATTCTGACCAACGAACT CAACTTCGCATTGGTAGGCTCGGAAGATGGCACCGACAACGACTATAACGATG CTGTGGTCGTGATCAATTGGCCGTTAGGT
> a.a._seq_PA-IIL MATQGVFTLPANTRFGVTAFANSAGTQTVNVLVNNETAATFSGQSTNNAVIGTQ VLNSGSSGKVQVQVSVNGRPSDLVSAQVILTNELNFALVGSEDGTDNDYNDAVVV INWPLG
N-His_PA-IIL_pET28M >PA-IIL_NdeI_forward NNNNNNNCATATGGCCACTCAAGGCG >PA-IIL_XhoI_back NNNNNCTCGAGTTAACCTAACGGCCAATTG
N-His_PA-IIL_V81S_pET28M >PA-IIL_V81S_forward GGTAAGTGCCCAGAGCATTCTGACCAACG > PA-IIL_V81S _back CGTTGGTCAGAATGCTCTGGGCACTTACC
N-His_PA-IIL_Q80E/V81S/I82S_pET28M >PA-IIL_ Q80E/V81S/I82S _forward GCTCTCTGACCAACGAACTCAACTTCG > PA-IIL_ Q80E/V81S/I82S _back TTTCGGCACTTACCAGATCAGACGG

S5-D:

>base_seq_SL-II ATGACCATTGGTCCGGTATCAGGGAATGGTATTGCGATTAGCATTCCAGCGA ACAAGATCGTCTTTTGGTCTGCCTTAGTCCAGAGCTCAGCTAACCAGTTTATC CAGCTGAAAGACTCCAATGCCAATATCGTGTTTACGGTTCAAGGAGCTTCAAG TAGCGGTGGTATTCCGACCCAAATTGGCAGTGGCTTCTTTCAGGCAGATACC TCTGGATCCTATTCGATCTGGATTGGCACTAATGGCGGCAAAAGCTATTCGCA GATCTTGTGGAGCCAAGATGTGATTACAAGCGGTTCCAGTGTGTATTTCGGC AAATACATCTTTGCATCGGAAGATGCGATGGATTACGACTACAACGACTCTTT CATTCAACTGCAGTGGTTCCAGAACGTTGGG
> a.a._seq_SL-II MTIGPVSGNGIAISIPANKIVFWSALVQSSANQFIQLKDSNANIVFTVQGASSSGGIP TQIGSGFFQADTSGSYSIWIGTNGGKSYSQILWSQDVITSGSSVYFGKYIFASEDAMD YDYNDSFIQLQWFQNVG
N-His_Serratia_FBL-II_pET28M >Serratia_FBL-II_NdeI_forward NNNNNNNNCATATGATGACCATTGGTCCGGTATCAGG > Serratia_FBL-II _XhoI_back NNNNCTCGAGTTACCCAACGTTCTGGAACCACTG

Table S5. Primers used for the construction of MPL derivatives

Primer name	Primer sequence
MPL N117Q_Fw	5'-GTGTTCCTACAGCAGACTCGGACTCAGCGAGTCC-3'
MPL N117Q_Rev	5'-CGAGTCTGCTGTAGGAACACATTCTTCACCCAG-3'
MPL N178Q_Fw	5'-GATCCCAAGCAGTCCACTGGTCCCACGGTCATACAG-3'
MPL N178Q_Rev	5'-CCAGTGGACTGCTTGGGATCTCTGGGGCCATAGC-3'
MPL N298Q_Fw	5'-GACCTGAAGCAGGTTACCTGTCAATGGCAGCAAC-3'
MPL N298Q_Rev	5'-CAGGTAACCTGCTTCAGGTCCAAGGTAAAGCATTGC-3'
MPL N358Q_Fw	5'-CAAGTCACGACAGGACAGCATTATTCACATCCTTG-3'
MPL N358Q_Rev	5'-GCTGTCCTGTCGTGACTTGAAGTGGCAGCGAGAG-3'