二枚貝イガイ科の β -トレフォイル構造レクチンを応じた細胞機能解析

藤井 佑樹

Cell Function Research of β -Trefoil Lectins from Mytilidae

Yuki Fujii

Laboratory of Functional Morphology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University; 2825-7 Huis Ten Bosch Machi, Sasebo, Nagasaki 859-3298, Japan.

(Received September 19, 2020)

Two novel β -trefoil lectins, MytiLec-1 and SeviL were found from mussels in the coast of Yokohama and Nagasaki. MytiLec-1 was purified from gill and mantle of *Mytilus galloprovincialis*. It was consisted of 149 amino acid residues and there was no similarity with any other proteins when it was discovered. We advocate for this “Mytilectin” as a new protein family because of their novelty of its primary structure and homologues were also found in other mussels. Glycan array analysis revealed that MytiLec-1 specifically bound to the Gb3 and Gb4 glycan which contained the α -galactoside. MytiLec-1 caused the apoptosis against the Burkitt’s lymphoma cells through the interaction of Gb3 express in their cell surface. On the other hand, SeviL obtained from gill and mantle of *Mytilisepta virgata* showed the specific binding against GM1b, asialo GM1 and SSEA-4 which are known as glycosphingolipid glycan including the β -galactoside. In addition, SeviL was identified as R type lectin by confirmation of QXW motif within its primary structure. Messenger RNA of SeviL like R type lectins was also found among the mussels including *Mytilus galloprovincialis*. SeviL also showed the apoptosis against asialo GM1 expressing cells. To apply the anticancer lectin as a novel molecular target drug, primary structure of MytiLec-1 was analyzed to enhance the stabilization of confirmation by computational design technique. It was succeeded to produce a monomeric artificial β -trefoil lectin, Mitsuba-1 without losing the Gb3 binding ability. Comparison of biological function between Mitsuba-1 and MytiLec-1 is also described in this study.

Key words—Mytilidae; β -trefoil lectin; MytiLec-1; SeviL; Glyco-signal; transcriptome

1. はじめに

生物とウイルスには、糖鎖と可逆的に結合し細胞を凝集させる、糖鎖結合性タンパク質「レクチン」が存在する。いまから 130 年以上前（1888 年）、エストニアの医師スティルマークがヒマシ油の原料であるトウダイグサ科植物ヒマの種子に、タンパク毒素リシンをみつけ、そこに赤血球凝集性を発見したことから、レクチン研究は始まった。¹⁾ リシンは細胞膜上の糖鎖をつかみ、細胞を凝集し、それを取り込んだ哺乳動物の細胞増殖を止めた。それから今日まで、膨大な種類の構造と活性を持ったレクチンが発見されている。iPS 細胞やがん細胞のみが持つ糖鎖と結合するレクチンは、医療へ応じられる期待が

ある。²⁾

海に棲む動物の種類は、その 9 割以上が約 30 の動物門に分類される無脊椎動物である。それらは抗体を用いた獲得免疫を行わず、代わりに補体や抗菌ペプチド、パターン認識による自然免疫で身を守る。³⁾ 多様な構造と糖鎖結合特異性を持つレクチンは、それらの重要な防御因子の 1 つである。本著は、ムール貝のレクチンに存在した β -トレフォイル（三つ葉）型レクチンの特長を述べ、それが持つ特徴的な一次構造と、特殊な糖鎖結合性、及び細胞増殖調節活性について示した。

2. データベースからみた海洋無脊椎動物レクチン

UniLectin3D は、レクチンの立体構造情報を集めたデータベースである。⁴⁾ その構造の進化的理解、創薬へ役立つ情報として、2017 年から配信されている (<https://www.unilectin.eu/unilectin3D/>)。現在までに登録された 2200 種以上のレクチンを比較

長崎国際大学大学院薬学研究科機能形態学研究室
(〒859-3298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 2825-7)
e-mail: yfujii@niu.ac.jp

本総説は、2019 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Different Modes for Browsing the Database of UniLectin3D (<https://www.unilectin.eu/unilectin3D/>)

Two sunburst charts provide access to glycan ligand sequence (A) and classification (B). Representative structure of lectins are categorized in three types indicated in the scheme (C).

すると、1) ポリペプチド鎖内のドメインの繰り返し配列 (タンデムリピート)、2) ポリペプチド鎖内ドメイン間の対称配置 (シンメトリー)、3) ポリペプチド鎖間のサブユニットの多量体 (オリゴマー)、が特長づけられた [Fig. 1(C)]. 発見されたレクチンの 25% はガラクトースに結合し [Fig. 1(A)], 動物由来のレクチンは 17% を占めた [Fig. 1(B)]. レクチンを構成するタンパクの立体骨格は 28 種類存在し、それらは約 100 種の一次構造ファミリーから作られていた。これは、互いに異なる一次構造が同一の立体に収められていることを示唆する。海の無脊椎動物レクチンは、この 28 種のほとんどを含み、レクチン研究の恰好な材料と考えられた。

3. ガラクトースと二枚貝イガイ科

ガラクトース [Fig. 2(A)] は化学進化のなかでグルコース、フルクトース及びマンノースよりも遅れて出現した糖であると仮説が唱えられている。⁵⁾ そして糖鎖の非還元末端近傍にあらわれ、認識の役割を担うと考えられている。環状ガラクトース (ハワース式) の不斉炭素 C-1 につく水酸基が下向き (α -D-ガラクトース) と上向き (β -D-ガラクトース) のアノマー異性体が存在し、 α -D-ガラクトースは、血液型物質、O157 菌毒素のターゲット糖鎖 Gb3 の成分、⁶⁾ プタ臓器の移植拒絶抗原のエピトープなどに、⁷⁾ β -D-ガラクトースは、母乳ラクトースの成分、コレラ毒素のターゲット糖鎖ガングリオシドの成分などにあらわれる。⁸⁾

筆者の出身地、横浜の位置する神奈川県や、現在勤務する長崎県は、どちらも暮らしや文化、産業が

Fig. 2. Two Galactose Binding Lectins Were Purified from Marine Mussels

Haworth projection of galactose (A). Picture of shell of *Mytilus galloprovincialis* (B) and *Mytilisepta virgata* (C). Molecular size of MytiLec-1 and SeviL was shown by 17 and 15 kDa on SDS-PAGE, respectively.

海と密接に係わる海洋都市である。筆者は修士課程でレクチンの精製技術を学び、博士課程では構造決定と糖鎖結合の解明に取り組んだ。中でも注目したものに、原産地の地中海から世界各地へ帰化した二枚貝 (軟体動物) イガイ科がある。食用のそれはムール貝と呼ばれ、これはフランス語をカナ表記した「ムール」に由来する。英語ではマッスル (mussel) と記し、発音は「筋肉 (muscle)」と同じで、どちらも「形がネズミ (*Mus*) に似ている」を意味する。イガイ科の貝は世界に 50 種類以上の属があり、干潮帯から深海にまで幅広く生息している。黒～褐色の薄い殻を持ち、進化的にはアサリよりも早く地球上へ出現した。D-ガラクトースに結合するレクチンとして、2012 年にムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) から「マイティレック-1」を、2020 年にアジア産で極東地域に生息するムラサキイガイ (*Mytilisepta virgata*) から「セヴィル」を発見し、ともにそれらの構造と機能を明らかにし

藤井佑樹

2005 年成蹊大学工学部応用化学科卒業、2010 年横浜市立大学大学院国際総合科学研究科バイオ科学専攻 博士後期課程修了。博士 (理学)。2012 年 4 月長崎国際大学薬学部助教就任。2017 年 4 月同講師昇進 (現職)。2019 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞表彰。専門：機能形態学、糖鎖生物学。

Fig. 3. Primary Structure of Mussel Lectin

MytiLec-1 (A) and SeviL (B) consisted of 149 and 129 amino acid residues. Both lectin was composed of triple tandem repeat structure within the polypeptide. Each subdomain of MytiLec-1 had high similarity. SeviL contained the QXW which is the motif of R type lectin in the first subdomain. One tryptophan (W) was conserved in second (TXW) and third (EXW) domain. Primary sequence of each lectin was referred from reference 10) and 21).

た.^{9,10)}

4. ガラクトース結合性レクチン「マイティレック-1」と「セヴィル」

ムラサキイガイとムラサキイガイの形態はよく似ており、わずかに大きさや色、殻の縁の形が異なる程度である [Figs. 2(B) and (C)]. それぞれの貝を神奈川県、長崎県の沿岸から採集し、ホモジェナイズすると、その抽出液にはリシンと同じ赤血球凝集活性が認められ、ガラクトースの共存によりこの凝集は阻害された。マイティレック-1はメリビオース糖 (Gal α 1-6Glc) をビーズに固定したゲルを詰めたカラムにムラサキイガイの抽出液を通過させて精製した。カラムを洗浄後、メリビオースを含む緩衝液でレクチンを溶出すると、17 kDa のポリペプチド鎖を得ることができた [Fig. 2(D)]. セヴィルはラクトース (Gal β 1-4Glc) を固定したカラムにムラサキイガイの抽出液を通過させ、同様に15 kDa のポリペプチド鎖として得ることができた [Fig. 2(D)].

5. トリプルタンデム配列

マイティレック-1とセヴィルの一次構造決定は、報告時 (2012年と2020年) の時代と当時の技術を反映している。^{9,10)} マイティレック-1は、プロテアーゼによるポリペプチド鎖の消化と高速液体クロマトグラフィーによる断片化ペプチドの分取、エドマン反応と質量分析を組み合わせ、古典的な一次構造解析法により決定した。セヴィルは、ムラサ

キイガイのトランスクリプトーム解析をまず行い、全転写物の配列を解明後、精製したセヴィルのペプチド断片配列を酵素消化と質量分析で判明させ、全配列を明らかにした [Figs. 3(A) and (B)].

マイティレック-1の一次構造は149アミノ酸で、発表当時、類似する配列のない新規な構造を持つレクチンであった。その特長は、ポリペプチド鎖の中に、類似した50アミノ酸の配列からなるトリプルタンデムリピート (3回繰り返す) サブドメイン配列を有していた [Fig. 3(A)]. ドメイン内のC-末端側には、酸性アミノ酸が集まっており、Cys (システイン) は含まず、第二サブドメインに Trp (トリプトファン) を1残基含んでいた。

一方、セヴィルは129アミノ酸からなり、40アミノ酸の3回反復配列を有することはマイティレック-1と似ていた。しかしムラサキイガイと近縁の属にあるものの、セヴィルの一次構造は、マイティレック-1との類似性は10%以下であった。その代わり、セヴィルはスティルマークの発見したリシン (Ricin) のB鎖が有する配列特長である-Q-X-W-配列を持ち、「R-型レクチン」家系 (R-type lectin family) に属することが明らかとなった [Fig. 3(B)].

6. 多様な糖鎖結合性

生体に存在する種々の糖鎖を固定したマイクロチップに、蛍光標識した各レクチンを添加し、その結合を蛍光から測定して、マイティレック-1とセヴィルの糖鎖結合性を比較した (Fig. 4)。

Fig. 4. Glycan Array Analysis of MytiLec-1 and SeviL (A), and Summary of Glycan Binding Profile (B)

MytiLec-1 showed the specific binding to Gb3 and Gb4 glycan which contain the α -galactoside. SeviL specifically interacted with GM1b, asialo GM1 and SSEA-4 glycan containing the β -galactoside. Glycan binding profile of each lectin was referred from reference 9) and 10).

マイティレック-1は、グロボ系糖脂質糖鎖 Gb3 (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc), Gb4 (GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) への結合を示した。Gb3 は、O157 菌の分泌するベロ毒素が結合する標的糖鎖、Gb4 は自然免疫の主要分子 Toll 様レセプター (TLR4-MD2) の内在性リガンドとしてはたらく糖鎖である。¹¹⁾ これらは糖鎖末端又は末端の 2 番目に α -D-Gal を有している。

一方、セヴィルは、ガングリオシド系糖脂質糖鎖 GM1b (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc) 及び asialo GM1 (Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc), グロボ系糖脂質糖鎖 SSEA-4 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) に結合した。3 種の糖鎖は Gal β 1-3GalNAc β 1-3/4Gal 配列を有していた。

これらの結果、マイティレック-1 もセヴィルもともに糖脂質の糖鎖と特異的に結合したことが、どちらもガラクトースを持つ糖鎖と結合したが、互いに反対のアノマーを認識していることが判明した (Fig. 4)。それがムール貝の生理や生育環境とどういう関係にあるのかについては今後解明されてゆく

ことだろう。

7. β -トレフォイル構造

共同研究先である横浜市立大学大学院生命医科学研究科構造創薬科学研究室との共同研究から、2 種類のレクチンの立体構造が決定された。

互いに異なる一次構造と糖鎖結合性を持つマイティレック-1 とセヴィルであるが、立体はともに β -トレフォイル (三つ葉のクローバー) 構造を有することが立体構造解析から判明した。さらにどちらも 2 量体として存在したことも明らかとなった。マイティレック-1 は、三つ葉の各小葉に α -D-Gal を 1 分子ずつ結合できるポケット状の小さなくぼみを持ち、二量体として合計 6 個の糖鎖を結合した。¹²⁾ 一方セヴィルは、N-末端側の第一サブドメインのみが Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β と結合し、他の 2 つのサブドメインは糖鎖結合にはたらかなかった。セヴィルは 2 量体として合計 2 本の糖鎖を、クリップ状にはさむことが判明した (Fig. 5)。

8. 細胞増殖調節活性

マイティレック-1 とセヴィルは、Gb3 及び asialo GM1 糖鎖を持つ腫瘍細胞と結合し、細胞を凝集さ

Fig. 5. The Overall Structure of MytiLec-1 and SeviL

3D structure of MytiLec-1 with GalNAc (A) and SeviL with asialo GM1 (B) are displayed. Cartoon of “pocket” (C) and “clip” (D) are inserted which represent the binding form of MytiLec-1 (C) and SeviL (D) with each ligand.

Fig. 6. Effects of MytiLec-1 Treatment on Signal Transduction Molecules in Burkitt's Lymphoma Ramos Cells

Phosphorylation, expression levels and activation of MEK1/2, ERK1/2, p21 and caspase 3 were shown, respectively (A). Annexin V binding and propidium iodide (PI) incorporation in MytiLec-1 treated Raji (another Burkitt's lymphoma cells) and erythroleukemia K562 (negative control) cells were analyzed by FACS analysis (B). Various concentration of MytiLec-1 (MytiLec) were treated to both cells (a-f). (e) indicate the co-treatment of MytiLec-1 and melibiose (MEL: Gal α 1-6Glc) which is the hapten sugar of MytiLec-1. Horizontal axis: binding of FITC-labeled anti annexin V antibody. Phosphatidylserine externalization and PI incorporation were evaluated by FACS analysis. (A) (B) were referred from reference 13) and 9), respectively.

せ、その増殖を低下させた。^{9,10)} レクチンは糖鎖と結合した後、細胞内の MAP キナーゼ経路を活性化した [Fig. 6(A)].¹³⁾ 細胞周期依存キナーゼの阻害タンパク p21, 腫瘍壊死因子の過剰発現, カスパーゼ-9/3 の活性化と細胞死の誘導も認めた。¹³⁾ これらの活性化は、細胞へレクチンを加えるとき、レクチンの結合するガラクトースを共存させると阻害された [Fig. 6(B)]. これにより細胞表面のガラクトー

スを含む糖鎖にレクチンが結合し、増殖制御を起こしていることが示された。

9. 人工レクチンのデザインと多量体の重要

抗腫瘍活性を有したマイティレック-1 であるが、血中に投与したときに想定される赤血球凝集は、創薬上の課題でもあった。その克服に、二量体化を担う 6 アミノ酸 (⁴⁹R, ⁹²DFFN⁹⁵, ¹⁴⁸Y) を、親水性アミノ酸 (⁹²DDSN⁹⁵) へ置換し、単量体へ解

A

B

Fig. 7. Comparison of Mitsuba-1 with Threefoil

Sequence alignment of Mitsuba-1 with related β -trefoils (A). The secondary structure elements of Mitsuba-1 (detected automatically) are shown as arrows and coils. The figure was drawn using ESPRIPT. Agglutination of Raji cells (B). Mitsuba-1 showed no effect on cell structure in the absence (a) or presence (b) of melibiose. Mytilin-1 at the same concentration produced cell clumping (c). Labelled Mitsuba-1 binds to Raji cells in the absence (d) but not presence (e) of melibiose. Labelled Mytilin-1 is also bound to the cell membrane (f). (A) (B) were referred from reference 14).

離させた。すると赤血球凝集性は消失したものの、凍結した単量体マイティレック-1を室温に融解させるすぐ不溶化してしまった。これは分子の立体が非対称で、単量体になることで非対称性が強調され、水溶性を低下させた結果であると、考えられた。そこで、完全対称の立体をデザインし、マイティレック-1と同じ糖鎖結合性を持ちながら、赤血球は凝集しない、安定な人工レクチンの設計に取り組んだ。

コンピュータでの解析から、マイティレック-1のN-末端側の第1サブドメインは、他の2ドメインに比べて対称性に優れていた。これを既に構造決定された多くの β -トレフォイル骨格と比べ、逆分子進化的に祖先タンパク質を推定し完全対称となる配列を予測した。¹⁴⁾ これは、タンパク質が起源したときは、現在の立体より対称性がより高かったと仮定し、分子の進化を逆行させて安定な構造を見つける構造生物学の手法である。得られた配列を大腸菌で発現させ、単量体人工レクチン Mitsuba-1 (ミツバ-1) が生まれた (Fig. 7)。

ミツバ-1は血球凝集活性を失い、凍結融解の繰り返しと長期間の室温放置に安定的に存在した。パーキットリン腫細胞に結合したが、細胞死活性は失われた。これにより、イガイ科 β -トレフォイル骨格レクチンの細胞死活性には、二量体構造が必須であると知ることができた。ポリペプチド鎖内の

3サブドメインはそれぞれが糖鎖と結合しても、その結合面は狭い間隔に並び、細胞間をつなぐには適さないと考えられた。ほとんどのレクチンが二量体以上に会合して細胞を凝集させたのには、レクチンの生理機能が、細胞表面の糖鎖と結合し細胞内の情報伝達分子群を活性化させるために係わっていることを想像させた。

10. 展望

β -トレフォイルはR-型レクチンだけでなく、インターロイキン、繊維芽細胞成長因子 FGF, Kunitz 型プロテアーゼインヒビター、糖分解酵素、毒素の立体にも存在する。¹⁵⁻¹⁷⁾ それは細菌と古細菌も酵素や毒素として有しており、クロストリジウム属ボツリヌス毒素のR-型レクチンドメインの起源は、細菌に感染するバクテリオファージに由来した。これらの報告からも、このレクチンは、進化的に早い時期に出現したタンパクであることが推察できる。^{18,19)} 生物は、様々な場面において汎用性の高かった「 β -トレフォイル骨格」を使い、多様な機能のタンパクを作り、その1つがレクチンであるのかもしれない。セヴィルの遺伝子は、ムラサキイガイとムラサキイコガイの両方で転写しているが、²⁰⁾ マイティレック-1は、ムラサキイガイにのみ転写が行われていた。²¹⁾ そして近縁と思えるカキ (牡蠣) には、どちらのレクチンの遺伝子もなく、その一方、生物門の離れた腕足動物には存在したが、その

理由はまだ明らかでない。²²⁾ さらに、二枚貝には伝播性の腫瘍の存在することが報告されており、²³⁾ これに対するマイティレック-1 とセヴィルの抗腫瘍効果について、比較腫瘍学の点から大いに興味を持っている。

謝辞 2019 年度日本薬学会九州山口支部奨励賞を表彰頂いたことへ謝意を表します。一連の研究は、受賞者が横浜市立大学大学院博士後期課程進学時 (2007) より行い、就職後も長崎国際大学薬学部機能形態学研究室 (藤田英明教授) と横浜市立大学理学部 (大関泰裕教授, ジェレミー・テイム教授) との共同研究として継続し、発展させることができました。ムール貝の遺伝子解析はトリエステ大学生命科学部 [マルコ・ジェルドル研究員 (博士), アルベルト・パラピチーニ教授] との共同研究により行いました。本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C), 長崎国際大学学長裁量経費, 杉山産業化学研究所助成費, 横浜市リーディング事業トライアル助成を受けて行われました。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- Olsnes S., *Toxicon*, **44**, 361–370 (2004).
- Shimomura O., Oda T., Tateno H., Ozawa Y., Kimura S., Sakashita S., Noguchi M., Hirabayashi J., Asashima M., Ohkohchi N., *Mol. Cancer Ther.*, **17**, 183–195 (2018).
- Fernández Robledo J. A., Yadavalli R., Allam B., Pales Espinosa E., Gerdol M., Greco S., Stevick R. J., Gómez-Chiarri M., Zhang Y., Heil C. A., Tracy A. N., Bishop-Bailey D., Metzger M. J., *Dev. Comp. Immunol.*, **92**, 260–282 (2019).
- Bonnardel F., Mariethoz J., Salentin S., Robin X., Schroeder M., Perez S., Lisacek F., Imberty A., *Nucleic Acids Res.*, **47**, D1236–D1244 (2019).
- Hirabayashi J., *Q. Rev. Biol.*, **71**, 365–380 (1996).
- Tanaka D., Uzawa H., Nagatsuka T., Oba Y., Hiratsuka A., Tayama K. I., Yoshida T., Seto Y., Dohi H., Nishida Y., *Anal. Biochem.*, **580**, 42–48 (2019).
- Tector A. J., Mosser M., Tector M., Bach J. M., *Front. Immunol.*, **11**, 622 (2020).
- Kabbani A. M., Raghunathan K., Lencer W. I., Kenworthy A. K., Kelly C. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 14978–14986 (2020).
- Fujii Y., Dohmae N., Takio K., Kawsar S. M., Matsumoto R., Hasan I., Koide Y., Kanaly R. A., Yasumitsu H., Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Nitta K., Hamako J., Matsui T., Ozeki Y., *J. Biol. Chem.*, **287**, 44772–44783 (2012).
- Fujii Y., Gerdol M., Kawsar S. M. A., Hasan I., Spazzali F., Yoshida T., Ogawa Y., Rajia S., Kamata K., Koide Y., Sugawara S., Hosono M., Tame J. R. H., Fujita H., Pallavicini A., Ozeki Y., *FEBS J.*, **287**, 2612–2630 (2020).
- Kondo Y., Ikeda K., Tokuda N., Nishitani C., Ohto U., Akashi-Takamura S., Ito Y., Uchikawa M., Kuroki Y., Taguchi R., Miyake K., Zhang Q., Furukawa K., Furukawa K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4714–4719 (2013).
- Terada D., Kawai F., Noguchi H., Unzai S., Hasan I., Fujii Y., Park S. Y., Ozeki Y., Tame J. R., *Sci. Rep.*, **6**, 28344 (2016).
- Hasan I., Sugawara S., Fujii Y., Koide Y., Terada D., Iimura N., Fujiwara T., Takahashi K. G., Kojima N., Rajia S., Kawsar S. M., Kanaly R. A., Uchiyama H., Hosono M., Ogawa Y., Fujita H., Hamako J., Matsui T., Ozeki Y., *Mar. Drugs*, **13**, 7377–7389 (2015).
- Terada D., Voet A. R. D., Noguchi H., Kamata K., Ohki M., Addy C., Fujii Y., Yamamoto D., Ozeki Y., Tame J. R. H., Zhang K. Y. J., *Sci. Rep.*, **7**, 5943 (2017).
- Ellisdon A. M., Nold-Petry C. A., D'Andrea L., Cho S. X., Lao J. C., Rudloff I., Ngo D., Lo C. Y., Soares da Costa T. P., Perugini M. A., Conroy P. J., Whisstock J. C., Nold M. F., *Sci. Immunol.*, **2**, eaaj1548 (2017).
- Patil D. N., Chaudhary A., Sharma A. K., Tomar S., Kumar P., *FEBS J.*, **279**, 4547–4564 (2012).
- Ito T., Katayama T., Hattie M., Sakurama H., Wada J., Suzuki R., Ashida H., Wakagi T., Yamamoto K., Stubbs K. A., Fushinobu S., *J. Biol. Chem.*, **288**, 11795–11806 (2013).
- Rahmani N., Kahar P., Lisdiyanti P., Lee J.,

- Yopi, Prasetya B., Ogino C., Kondo A., *Bioresour. Technol.*, **272**, 315–325 (2019).
- 19) Abhinav K. V., Samuel E., Vijayan M., *Proteins*, **84**, 21–30 (2016).
- 20) Gerdol M., Fujii Y., Hasan I., Koike T., Shimojo S., Spazzali F., Yamamoto K., Ozeki Y., Pallavicini A., Fujita H., *BMC Genomics*, **18**, 590 (2017).
- 21) Hasan I., Gerdol M., Fujii Y., Rajia S., Koide Y., Yamamoto D., Kawsar S. M. A., Ozeki Y., *Mar. Drugs*, **14**, 92 (2016).
- 22) Gerdol M., Luo Y. J., Satoh N., Pallavicini A., *Dev. Comp. Immunol.*, **82**, 7–30 (2018).
- 23) Metzger M. J., Reinisch C., Sherry J., Goff S. P., *Cell*, **161**, 255–263 (2015).