Mn(II) イオンの結合によって誘起される 結晶相ADP リボース加水分解酵素反応の観察

自然科学研究機構分子科学研究所協奏分子システム研究センター 古池美彦

大阪市立大学大学院理学研究科 宮原郁子

大阪市立大学複合先端研究機構 神谷信夫

Yoshihiko FURUIKE, Ikuko MIYAHARA and Nobuo KAMIYA: Observation of ADP-Ribose Pyrophosphatase Reaction in Crystalline-State Induced by Mn(II) Ion Binding

ADP-Ribose pyrophosphatase (ADPRase) reaction was observed in crystalline-state at atomic resolutions around 1 Å. ADPRase achieves the general acid-base catalysis in the presence of divalent metal cations. Crystals of ADPRase alone, ADPRase-ADPR binary (ES-state) complex were prepared, and reaction intermediates were captured by the cryo-trapping after the soaking of MnCl₂ into ES-state crystals. Just after two metal binding sites were successively occupied along with the soaking time, ADPR was hydrolyzed and reaction products were released, indicating the completion of the crystalline-state reaction. The key structures of ADPRase-ADPR-two Mn²⁺ ions complex revealed the various enzymatic phenomena including electrostatic, proximity and orientation effects and preferential binding for the transition states. The details of the metal assisting mechanism and the general base catalysis have been discussed.

1. はじめに

タンパク質・酵素が機能するとき、化学的には何が起きているのだろうか。この問いを究極まで突き詰めるのはきわめて困難な作業である。アミノ酸残基、水分子、基質、補因子の構造や配置、それらのプロトン化状態や電荷の分布が刻一刻と変わっていく。一般に構造生物学という、化学的要素の配置情報を提供する「空間」の学問分野とされているかもしれない。しかし機能という言葉の本来の意味を考えれば、「時間」の情報を無視するわけにはいかない。「空間」と「時間」が有機的に統合された「機能」としての酵素の仕組みを明らかにしたい。本稿ではADPリボース加水分解酵素 (ADPRase) を題材にし、高分解能で「空間」情報を確保しつつ、クライオトラップ法によって各反応時間を固定することで「時間」情報を抽出した時分割結晶構造解析の研究を紹介する。

ADPリボース加水分解酵素 (ADPRase) はADPリボース (ADPR) の二リン酸部位を加水分解し、アデノシン一リン酸 (AMP) とリボース-5'-リン酸 (R5P) を生成する酵素である (図1)。分子量はモノマー当たり 19 kDaで、ホモダイマーを形成したうえで機能する。スクレオチド誘導体の二リン酸部位を加水分解する Nudix ファミリーに属し、活性部位には Nudix モチーフ [GX₅EX₇REUXEEXGU (U, 疎水性アミノ酸残基; X,

任意のアミノ酸残基)] を有する。ADPRaseの反応には Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ といった二価の金属イオンが不可欠であり、Nudix モチーフの Glu 残基がその結合サイトを構成する。ADPRaseの反応機構解明に向けてX線結晶構

図1 高度好熱菌由来ADPRaseの全体構造とADPR加水分解反応。(Overall structure of ADPRase from *Thermus thermophilus* HB8, and its ADPR hydrolysis reaction.) (A) 黄色のNudixモチーフのすぐそばに基質ADPRと金属イオンの結合部位がある。点線部分はフレキシブルループ。(B) ADPR加水分解時の一般酸塩基触媒。一般塩基 (Base) と一般酸 (Acid) が協奏的に働く。(C) 結晶相ADPR加水分解反応を追跡する実験系のデザイン。編集部注: カラーの図はオンライン版を参照下さい。

造解析や変異体の機能解析といった研究の成果がこれまで10年以上にわたって蓄積されてきたが、その仕組みはなお完全には解明されていなかった.¹⁻⁸⁾

ADPRase 反応機構において重要な論点は、金属イオンがどのように関与し、一般塩基触媒がどのように作用するのか、という2つである。これまでに議論されてきたポイントを以下に整理すると、(i) 求核性水分子の攻撃を受けるのはADPRの二リン酸のうちアデノシン側に位置する α -リン原子である、(ii) 求核性水分子は α -リン酸とNudixモチーフに配位した2つの金属イオンの間に挟みこまれて固定される、(iii) 活性部位を囲うように配置されたフレキシブルループ(図1モデル中の点線部分)のGlu残基が活性部位に入り込んできて求核性水分子からプロトンを引き抜く、というストーリーになる。(i)は同位体を利用した加水分解物の質量分析によって明らかにされたものであり、²⁾(ii)と(iii)はAMPCPRという加水分解を受けない基質類似阻害剤(ADPRの二リン酸部位の中央の酸素が炭素に入れ替わっている)との複合体結晶を用いた構造解析研究²⁻⁴⁾に基づくものである。

特に今回は、(ii)と(iii)に着目し、本来の基質であるADPRが実際に加水分解される様子を結晶中で直接観察することを目指して研究を進めてきた。われわれは今回、ソーキングによって低分子の反応トリガー因子を外部から酵素結晶内部に送り込んで反応を開始させ、任意の反応時間で100 Kのクライオ温度に移すことで結晶相反応を停止させるクライオトラップ法を採用した。結晶相反応を特定の反応時間で固定した構造には複数の反応中間体が混在し、空間平均の結果、電子密度分布から特定の反応中間体を占有率1で観察することができない場合がある。しかし1 Å付近の高分解能での観察となれば、1つ1つ丁寧に構造モデルを構築して精密化を進めれば複数の反応中間体が混在した電子密度図であっても解釈が可能となる。そこでわれわれは、ADPRase結晶の高分解能化、結晶相反応の実験的デザイン、構造解析というステップを一段階ずつクリアしながらADPRase反応機構の詳細に迫った。

2. 研究方法

2.1 結晶化

結晶の高分解能化を目指して検討した点は、サンプル純度の徹底した高品質化と結晶化条件の見直しであった。高度好熱菌HB8由来のADPRase (*Tt*ADPRase)を大腸菌体内に発現させ、すべての精製操作を4℃条件下で進めた。サンプル純度を保つため、各ステップにおいて電気泳動を行い、極少数のフラクションのみを選別して高品質のサンプルを調製した。結晶化に際しては、従来報告されてきた条件⁵⁾に手を加え、酢酸バッファpH 4.6、10% (w/v) PEG20000、30% (w/v) グリセロールという新たな組み合わせを導入した。結晶化にはADPRや二価金属イオンはまったく使用しなかったため、析出した結晶はアポ状態の*Tt*ADPRaseである。

2.2 結晶相反応の追跡

1 Å分解能の反射を与える高品質の*Tt*ADPRase結晶を全部で11個用意して、結晶相反応を追跡した(表1)。11個のうち2個の結晶にはいかなる処理も施さずに、直接にデータ収集へと進めた(表1)。残った9個のうち2個の結晶には5 mM ADPRをオーバーナイトでソーキングし、*Tt*ADPRaseとADPRの二元複合体を形成させた(表1)。この操作ではADPRase反応に不可欠な二価金属イオンを使用しなかったため、結晶中のADPR加水分解は開始されなかった。残った7個の結晶にはまずADPRをソーキングして活性部位に結合させたのち、さらに15 mM MnCl₂を室温でソーキングした。Mn²⁺イオンの挿入によって反応に必要な要素がすべて揃い、あらかじめ活性部位に結合していたADPRの加水分解がスタートした。3, 6, 10, 15, 20, 30, 50分のソーキングの後、クライオトラップにより反応中間体構造を結晶内で固定した(表1)。

実際には結晶相反応の条件を決定する作業を前もって行っており、試行錯誤の結果、上述の条件(pH 4.6, 15 mM MnCl₂)に辿りついた。ADPRase反応は酸塩基触媒反応であるため、結晶化条件であるpH 4.6での反応速度は生理条件に比べて1/100程度に抑えられており、さらに結晶中でのADPR加水分解に要する時間は10分～1時間の範囲に入った。次にソーキング時のMn²⁺イオン濃度を検討し、15 mM MnCl₂を用いた場合にはADPR

表1 全11データの結晶化後処理の条件、分解能、*R*値、原子座標誤差およびProtein Data Bankの登録コード。(Conditions of post-crystallization treatments, resolutions, *R* factors, atomic coordinate errors, and PDB codes of 11 crystals analyzed in this study.)

ADPR ソーキング	—	—	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
MnCl ₂ ソーキング	—	—	—	—	3分	6分	10分	15分	20分	30分	50分
分解能/Å	0.91	0.92	0.97	1.00	1.15	1.12	1.09	1.22	1.14	1.15	1.10
<i>R</i> (%)	13.6	13.5	13.1	13.9	14.9	15.2	15.4	15.6	15.3	14.3	14.5
原子座標誤差/Å	0.026	0.026	0.027	0.031	0.037	0.036	0.035	0.044	0.037	0.038	0.036
PDB コード	3XOI	3XOJ	3XOK	3XOL	3XOM	3XON	3XOO	3XOP	3XOQ	3XOR	3XOS

加水分解が50分で完全に終了することを予備的な構造解析によって確認した(図1C図中のE, ES, ESM, ESM, E'については後述). ADPRaseの結晶のように大きさが1 mm以下で薄い板状であれば Mn^{2+} イオンのソーキングに要する時間は1分程度以内と期待され, これは全反応時間50分に対して十分に小さい. したがって, この条件では Mn^{2+} イオンの拡散の不均一性による結晶の内部と表面付近とで予想される反応開始時のズレは無視できると考えられる.

2.3 データ処理

こうして調製した11個の結晶をSPRING-8に持ち込み, BL38B1およびBL44XUにてX線回折強度データを収集した. 積分強度の計算にはHKL2000を用いた. Molrepによる分子置換で反射に位相をつけ, Refmac5で精密化を進め, 構造のモデリング, 修正にはcootを用いた. 最高分解能での精密化ではSHELXLを用いて最終的には R_{free} 計算のためにストアしておいた反射も含めて精密化し, 11個すべての結晶についてモデル構築に成功した(表1).

3. 結果

3.1 分解能の向上

従来報告されていた*Tt*ADPRase結晶構造⁵⁾の分解能は最高で1.5 Åであったが, 新しい結晶化条件で析出したアポ状態の*Tt*ADPRase結晶は最高で0.91 Å分解能に到達し, Mn^{2+} イオンをソーキングした反応中間体結晶でも1.22 Å以上の高分解能を維持していた(表1). 分解能の向上により温度因子の小さい主鎖や疎水性のアミノ酸残基の側鎖においては正の|F_o|-|F_c|差フーリエマップのピークとして水素原子が確認された. しかしながらGlu残基側鎖のカルボキシル基やArg残基側鎖のguanidinium基といった比較的温度因子の大きい官能基においては水素原子位置を特定することはできなかったため, 水素原子はモデルに取り入れなかった. 後述するGlu82, Glu85, Glu86のプロトン化状態は水素結合の様式や化学的環境に基づいて推測したものである. 結晶中において*Tt*ADPRaseは結晶学的2回軸で関係づけられたホモダイマー構造を形成しており, 2つのプロトマー間でのア

ロステリーな活性調節機構の有無は議論していない.

3.2 ADPRの結合による構造変化とES状態の同定

結晶化後にいかなる処理も施さずにデータを収集したアポ状態の*Tt*ADPRase結晶(E状態)の活性部位には結晶化剤のグリセロールと硫酸イオン, 多数の水分子が観察されたが, ADPRをソーキングしたデータではこれらに替わってADPRが捕捉されている様子が確認された(図2). ADPRは占有率0.7~0.8で同定され, 残った正の|F_o|-|F_c|差フーリエマップのピークには水分子を占有率0.2~0.3で同定することで過不足なくモデルを構築することができた(図3). このことから, ADPRをソーキングした結晶中には, 70~80%の*Tt*ADPRase-ADPR二元複合体(ES状態)と, ADPRと結合していないE状態のままの*Tt*ADPRaseが20~30%混在していることがわ

図2 ES, ESM, ESM状態を確認された活性部位における化学種の配置および化学的相互作用のまとめ. (Spatial arrangement of chemical species in the active site and chemical interactions in ES, ESM, and ESM states.)

図3 ADPRの結合部位における電子密度図. (Electron density map at ADPR binding site.) (A) ADPR(占有率0.7)と水分子(占有率0.3)を同定したときの電子密度. (B) ADPRのみを同定した場合, 水分子に該当する正の差フーリエピークが残っている. (C) ADPRと水分子をオミットした場合.

図4 活性部位内の化学種の占有率(表)とE, ES, ESM, ESMM, E'状態の存在比のMnCl₂ソーキング時間に依存した変化(表およびグラフ)。(Estimated occupancies of chemical species in the active site, and abundance ratio of E, ES, ESM, ESMM, E'-states.) E + E'は水色, ESは赤色, ESMは黄色, ESMMは緑色で示す。編集部注: カラーの図はオンライン版を参照下さい。

図5 MnCl₂ソーキング時間6分におけるGlu82の2つのコンホメーション。(Two different conformations of Glu82 observed at the soaking time of 6 min.)

かった(図4)。

Nudixモチーフで最も重要な役割をもつのはGlu86とGlu82で、これらを変異させると活性は劇的に減少する。Glu86は α -リン酸と末端リボース基の側にある β -リン酸の間に、Glu82は α -リン酸の近傍に位置していた(図2)。とくにGlu82はアポ状態の結晶(E状態)では親水性領域にむき出しになって水分子と水素結合ネットワークを形成していたが、ADPRをソーキングした結晶では疎水性のポケットに押し込まれるように配向に変化を受けた第二の側鎖構造が観察された(図5)。この新たに見つかったGlu82の側鎖構造の占有率は0.7~0.8となり、ADPRの占有率と対応していた。したがってGlu82はE状態では親水性領域にむき出しであるが、ES状態では α -リン酸との負電荷反発によって側鎖が疎水性領域に押し込

図6 ESM状態の同定。(Identification of ESM state.) MnCl₂ソーキング時間6分におけるM1錯体形成とADPRの構造変化。配位結合距離はÅ単位。

まれると結論づけることができた。

3.3 Mn²⁺イオンソーキング6分までに観察された構造変化とESM状態の同定

MnCl₂をソーキングして3分以降のデータで、早速Nudixモチーフと基質ADPRの間にMn²⁺イオンが明確に確認された(図2)。ソーキング時間6分になると、このMn²⁺イオンの占有率はさらに高くなりその後一定に達した。この1つめのMn²⁺イオン(M1)はADPRの α -リン酸と β -リン酸の間に入り込み、保存されたGlu86とAla66、2つの水分子(W1, W2)を配位子としてきれいな八面体の錯体構造を形成した。この錯形成に伴ってADPRの α -リン酸の配向が歪み、構造に変化が見られた(図6)。この新しい構造をADPR*とし、配位前の構造と区別した。このようにES状態にMn²⁺イオンが1つ導入され、ADPR*構造が完成した段階をESM状態と名づけた。ソーキング時間6分ではすべてのADPRがADPR*構造に変化しているため、この段階で結晶中にはADPRと結合していない20%のE状態と、ES状態に替わって立ち現れた80%のESM状態が混在した状態となった(図4)。

3.4 Mn²⁺イオンソーキング20分までに観察された構造変化とESMM状態の同定

ソーキング時間10, 15, 20分のデータでは、ADPR*の α -リン酸の近傍に2つめのMn²⁺イオン(M2)のピークが確認された(図2)。興味深いことにM2の占有率の上昇に伴って、ES状態で疎水性領域に押し込まれていたGlu82の配向が変化し、ふたたび親水性領域における占有率が高くなっていた(図4中の表)。親水性領域におけるGlu82の側鎖はM2に対して配位結合距離にあるため、この占有率の上昇はM2とGlu82の静電的な相互作用によるものと考えられた(図7)。以上のことから、ESM状態にさらにもう1つMn²⁺イオンが挿入され、Glu82が配位結合を形成した段階をESMM状態とした。ソーキ

図7 ESM状態におけるM2周辺の構造。(M2 binding site and its surrounding structure in ESM state.) MnCl₂ソーキング時間20分においてM2の配位子としてGlu82, W3, および α -リン酸が観測され, 求核性水分子が空いた配位子サイト(ほぼ中央のシアンボール)を埋めると考えられる。配位結合および水素結合距離はÅ単位。編集部注: カラーの図はオンライン版を参照下さい。

ング時間が20分のデータではADPR*の占有率は0.7であったのでE状態は結晶中で30%の画分を占めていた。疎水性領域に押し込まれたままのGlu82の側鎖の占有率は0.25であったため, ESM状態の存在比は25%となる。親水性領域にむき出しのGlu82の側鎖の占有率0.75のうちE状態の寄与である0.3を差し引いた0.45はESMM状態に帰属され, ESM状態の存在比は45%程度であることがわかった(図4)。ここで明瞭に確認することができたM2の配位子は α -リン酸の酸素原子, 親水性領域に引き戻されたGlu82のカルボキシル基, そしてGlu85と水素結合を形成した水分子(W3)の3つであった(図7)。

3.5 Mn²⁺イオンソーキング30~50分における構造と結晶相反応の終了

ソーキング時間が30分以降になると, 基質ADPRに対応する電子密度が完全に消失し, 活性部位内の様子はE状態と同一な状況となった。ADPRが実際に加水分解されたのち, 生成物のAMPとR5PおよびMn²⁺イオンが酵素外部に放出され, ADPRase反応サイクルが一回まわった状態であると考えられたので, これをE'状態とした。E'状態はソーキング時間10~20分のデータにおいても混在していたであろうが, E'状態は原初からのE状態と区別ができないので, その存在比はE状態とE'状態の合計として見積もった(図4)。

4. 考察

4.1 1つめのMn²⁺イオン(M1)とGlu86のプロトン化状態

E, ES, ESM, ESM, E'状態の存在比(図4)を時間軸上で見ていくと, ESM状態の過渡的な出現に続いてESMM状態が現れることからADPR*構造は反応の必要

条件を満たす重要な前駆体であることがわかる。ADPR*構造では α -リン酸と β -リン酸に含まれる酸素原子間の距離が近くなり, 不安定な構造的歪みが蓄積されている(図6)。基質の開裂部位にあえて, 後に解放されるべき不安定性をもたせることで反応がスムーズになるという拷問台機構が連想される。M1と配位する前のE状態では, Glu86は対面するAla66の主鎖と2本の水素結合を形成しており, そのうちの1本はAla66のカルボニル基との水素結合であったため, Glu86はプロトン化していたと推定される。一方ESM状態では, Glu86は脱プロトン化して負電荷を帯び, 正電荷をもつM1との静電的な相互作用により安定化されている。Glu86はM1への配位を通してADPR*の安定化に寄与すると考えられ, これがNudixモチーフに実装された第一の重要な仕掛けであろう。

4.2 2つめのMn²⁺イオン(M2)の配位圏における水分子の活性化と一般塩基

ESMM状態がその後E'状態へと変化していく事実を踏まえると, ESM状態こそが, 水分子からプロトンが引き抜かれて生成した水酸化物イオンが α -リン原子を求核攻撃して二リン酸結合を開裂させるステップであると考えられる。上述の α -リン酸の酸素原子, Glu82のカルボキシル基, W3という3つの配位子の位置関係は, M2がさらに2~3個の水分子を動的に配位させて六配位八面体もしくは五配位三方両錘の錯体構造をとることを予想させる。いずれの錯体構造をとったとしても, 興味深いことに, 1個の水分子は加水分解されるリン-酸素結合に対してインラインの配置になる(図7中ほぼ中央のシアンボール)。

さて, M2の配位圏内で求核性水分子が分極して活性化され反応が進行するならば, 最終的にプロトンを引き抜く一般塩基の正体は一体何であろうか。M2近傍で負電荷を有する化学種を探索すると, 2つのGlu残基が候補として挙がった。1つはGlu82そのもので, 求核性水分子のサイトに最も近く, 水素結合距離にある。Glu82はESM状態では疎水性領域にあってプロトン化しており, ESM状態ではM2と静電的な相互作用を形成している様子から, 親水性領域への引き戻しの際に脱プロトン化したと考えられる。ここで反応場における電荷の収支を調べると, ADPRの二リン酸の負電荷(-2), M1の正電荷(+2), Glu86の負電荷(-1), M2の正電荷(+2)の合計では正味+1の電荷が余る。ESMM状態で脱プロトン化し負電荷を帯びてM2に配位したGlu82は, 余剰の正電荷と相殺して電荷のバランスを整えるとともに, 求核性水分子からプロトンを引き抜く一般塩基として働く可能性がある。もう1つの一般塩基の候補はGlu85である。Glu85はNudixモチーフに保存されているが, その役割についてはまったくわかっていなかった。このGlu85

図8 ADPR加水分解のその場観察に基づいて提案されたADPRaseの反応機構モデルおよび各化学種の結晶構造中での立体的な位置関係。(Proposed mechanism of ADPRase and spatial arrangements of chemical species in the active site.) 黄色の化学式およびモデルはNudixモチーフに保存されたアミノ酸残基。W_nは求核性水分子。編集部注：カラーの図はオンライン版を参照下さい。

はW3との水素結合によってM2錯体を安定化しており、求核性水分子のサイトを挟んで α -リン酸と対極の位置にある(図7)。求核性水分子の解離過程はADPRase反応の律速段階であり、高い反応効率を実現するにはプロトンと水酸化物イオンの再結合を防ぐ何らかの工夫が必要になる。Glu85と求核性水分子と α -リン酸の位置関係は示唆的であり、Glu85が直接プロトンを引き抜くのか、もしくはGlu82が引き抜いたプロトンをバルク領域へと廃棄するために手助けするのは定かではないが、いずれにしてもGlu85は何らかの形で求核性水分子の活性化およびプロトン排出に関与していると示唆される。以上のことから、Glu82とGlu85がGlu86に加えてNudixモチーフに組み込まれた第二の最重要な仕掛けだと考えられる。

4.3 従来のADPRase研究との相違点

本研究により、ADPRase反応には全部で2つの金属イオン(M1とM2)が連続的に関与していることが明らかとなったが、これまでの基質類似阻害剤AMPCPRを用いた構造研究では3つの金属イオンが関与すると提唱されてきた。^{3,4)} われわれの構造解析結果に見られたM1とM2と同様の位置で似通った配位構造をとる2つの金属イオンに加え、もう1つの金属イオン(M3)が求核性水分子を挟み込む形でM2と協同的に働くとされていた。しかしながら今回の研究においてM3に対応するピークは一連の反応を通して観察されなかった。また、Nudixモチーフの外側にあるフレキシブルループのGlu残基が活性部位に入り込んできて一般塩基として働くという提案もなされていたが、^{3,4)} 今回の構造解析ではフレキシブルループの固定化は確認されなかった。基質類似阻害剤を用いた静的な構造解析の結果は、本来刻一刻と様相を変える動的な酵素の反応場を反映していないのかも

しれない。本研究により、Glu86とGlu82は金属イオンの配位サイトを形成し、Glu82のプロトン化状態を変えることで反応場における電荷のバランスを整えることが明らかになった。このようなGlu86とGlu82の金属イオン結合サイトとしての重要性は以前から指摘されており、^{4,5)} これらの点変異体の活性は野生型に比べて著しく低いことがわかっていて、しかしながら活性測定研究では一般塩基の正体にまで切り込むことはできておらず、Glu85は保存されているが、その役割についてはまったく議論されてこなかった。本研究により初めて、Glu82とGlu85による求核性水分子の活性化とプロトン排出への関与が示唆されることとなった。

5. ADPRaseが実現しているさまざまな触媒効果と反応機構

結晶相反応が進行している「その場」の構造をクライオトラップ法により固定し、得られた構造を時間軸上で並べて比較することによって、従来の静的な構造解析では見出されていなかったADPRaseの酵素としての動的で詳細な機序が明らかとなり、さまざまな触媒効果が複合的に組み合わされていることがわかった。最終的に、生成物R5Pに対するプロトン供給すなわち一般酸触媒を含めて、ADPRaseのすべてのプロトン収支と電荷収支を満足させる化学反応機構を図8のように提唱するに至った。⁹⁾

6. おわりに

結晶相反応が進行している状態をクライオトラップ法によって固定し、高分解能の構造情報を取得することにより、酵素反応のその場観察に成功した。時間軸に沿って空間情報を並べることにより、阻害剤や変異体の利用

によって人工的に固定化あるいは改変した構造とは異なる観察結果が得られた。これまでのタンパク質結晶構造解析では空間情報に特化した研究が多く時間軸にそった情報は今なお十分とは言えない。もちろん、これまでの研究から大変目覚ましい技術的な進歩や生物分子に対する莫大な化学的理解が蓄積されてきていることは言うまでもないが、今後筆者らは、現在もなお発展途上にある時間方向への構造学を1本の筋としてこれからの研究にも取り組んでいきたい。

謝 辞

SPRING-8のBL38B1およびBL44XUのスタッフの皆様
の技術的なサポートと適切な御助言により、回折実験を円滑に進めることができました。お礼を申し上げます
(課題番号: 2011B1428および2012B1203)。この研究は
科学研究費補助金の助成を受けて実施されました(課題
番号: 21370049および13J05019)。

文 献

- 1) S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, M. J. Bessman and L. M. Amzel: *Nat. Struct. Biol.* **8**, 467 (2001).
- 2) S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, Y. Ohnishi, Y. Ichikawa, J. B. Maurice and L. M. Amzel: *Biochemistry* **41**, 9279 (2002).
- 3) L. Kang, S. B. Gabelli, E. C. Cunningham, S. F. O'Handley and L. M. Amzel: *Structure* **11**, 1015 (2003).
- 4) M. Zha, Q. Guo, Y. Zhang, B. Yu, Y. Ou, C. Zhong and J. Ding: *J. Mol. Biol.* **379**, 568 (2008).
- 5) S. Yoshida, T. Ooga, N. Nakagawa, T. Shibata, Y. Inoue, S. Yokoyama, S. Kuramitsu and R. Masui: *J. Biol. Chem.* **279**, 37163 (2004).
- 6) T. Ooga, S. Yoshida, N. Nakagawa, S. Kuramitsu and R. Masui: *Biochemistry* **44**, 9320 (2005).
- 7) T. Wakamatsu, N. Nakagawa, S. Kuramitsu and R. Masui: *J. Bacteriology* **190**, 1108 (2008).
- 8) A. S. Mildvan, Z. Xia, H. F. Azurmendi, V. Saraswat, P. M. Legler, M. A. Massiah, S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, L. W. Kang and L. M. Amzel: *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 129 (2005).
- 9) Y. Furuike, I. Miyahara, Y. Akita and N. Kamiya: *Biochemistry* **55**, 1801 (2016).

プロフィール

古池美彦 Yoshihiko FURUIKE
自然科学研究機構分子科学研究所協奏分子システム研究センター
Research Center of Integrative Molecular Systems,
Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Science
〒444-0867 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38
38 Saigo-naka, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-0867, Japan
e-mail: furuike@ims.ac.jp
最終学歴: 大阪市立大学大学院理学研究科後期博士課程単位取得退学, 博士(理学).
専門分野: 構造生物化学

宮原郁子 Ikuko MIYAHARA
大阪市立大学大学院理学研究科
Graduate School of Science, Osaka City University
〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本3-3-138
3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka, Osaka 558-8585, Japan
e-mail: miyahara@sci.osaka-cu.ac.jp
最終学歴: 大阪市立大学大学院理学研究科前期博士課程修了, 博士(理学).
専門分野: 構造生物化学

神谷信夫 Nobuo KAMIYA
大阪市立大学複合先端研究機構
The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka City University
〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本3-3-138
3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka, Osaka 558-8585, Japan
e-mail: nkamiya@sci.osaka-cu.ac.jp
最終学歴: 名古屋大学大学院理学研究科博士課程, 博士(理学).
専門分野: 構造生物化学
現在の研究テーマ: 光合成・光化学系IIなどのタンパク質・酵素の構造生物化学