最近の研究から

アミノ酸残基特異的プロテアーゼの構造と機能

塩野義製薬(株)創薬第一研究所 北所健悟

Kengo KITADOKORO: The Structure and Function of the Amino Acid Specific Protease

Serine proteases have been classified into three groups on the basis of their substrate specificities: those with broad substrate specificity (subtilisin), those that recognize and cleave after positively charged residues of lysine and arginine (trypsin), and those that cleave after negatively charged residues of glutamic and aspartic acid (V8 protease). The first two categories are structurally well characterized, but no three-dimensional structure has been reported for protease with acidic amino acid specificity.

In this study, the structure of SFase-2, a serine protease with broad substrate specificity from *Streptomyces fradiae* has been determined by X-ray analysis and is possible to predict the structure of SFase-1, an acidic amino acid specific protease from the same organism.

1. はじめに

蛋白質分解酵素であるプロテアーゼは、生体内において多くの重要な生理機能発現にかかわっている。生体細胞におけるさまざまな反応はプロテアーゼにより触媒されており、それ故プロテアーゼの構造を知ることが、生体の機能を理解する上で極めて重要である。従来より、プロテアーゼは触媒機構を基に4つに分類されている。すなわち、セリン、システイン、酸性、および金属プロテアーゼが知られている。

この内、本稿で紹介するセリンプロテアーゼは、基質特異性を基にして3つに大別されている。すなわち、基質特異性の広いプロテアーゼと、塩基性のアルギニン残基等を認識して切断するもの、グルタミン酸残基のような酸性のアミノ酸を認識するものに分類される。

この基質特異性の様な酵素の機能を調べるためには、その酵素の立体構造情報が必須であり、正確な立体構造を原子レベルで調べる必要がある。セリンプロテアーゼについては従来よりX線構造解析によって、構造と基質特異性の相関が幅広く調べられて来ている。

基質特異性の広いプロテアーゼとしては、バクテリア属が産出するズブチリシン¹⁾が良く知られており、また放線菌 *Streptomyces* 属が生産する各種セリンプロテアーゼもこれに属する。^{2), 3)} この分類のプロテアーゼの基質特異性の広さについては、活性部位が比較的広い空間を持つことが要因となっていると考えられている。

塩基性のアミノ酸残基を特異的に認識するプロテアー

ゼについては、トリプシン⁴⁾等の活性部位のポケットの底の部分に、アルギニン残基を呼び込むアンカーとなるアスパラギン酸の存在がX線構造解析の結果から提唱されている(図1)。

しかしながら、酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの立体構造解析を行なった例は今までになく、どのようにして、グルタミン酸残基を好んで認識しているかについては明らかになっていなかった。

塩基性アミノ酸特異的プロテアーゼ
トリプシン

図1 塩基性アミノ酸特異的プロテアーゼにおける模式的な基質認識機構。

筆者らは、放線菌 *S. fradiae* より2種類のプロテアーゼ、すなわち酸性アミノ酸特異的プロテアーゼである SFase-1⁵⁾ と疎水性のアミノ酸に特異性の高いプロテアーゼである SFase-2⁶⁾ を発見した。また枯草菌 *Bacillus licheniformis* から酸性アミノ酸特異的プロテアーゼである BLase を見出した⁷⁾。このうち、SFase-2 の立体構造を X 線構造解析により決定し、従来の同種の酵素の構造と比較した。⁸⁾ 前述したように現時点では不明である酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの基質認識機構を明らかにする事を目的として、SFase-2 の立体構造を基に、これと 57 % のアミノ酸配列の相同性を持つ酸性アミノ酸特異的プロテアーゼ SFase-1 の立体構造を、力場計算、エネルギー極小法により予測した。このようにして得られた両者の活性部位付近の立体構造を比較し、アミノ酸残基特異的プロテアーゼの基質認識に重要な役割を演じていると思われる残基を推定した。⁸⁾

2. 酸性アミノ酸特異的プロテアーゼ (SFase-1) の発見

グルタミン酸などの酸性アミノ酸を特異的に認識し、切断するプロテアーゼとしては、Drapeau らによって病原菌 *Staphylococcus aureus* Strain V8 の生産する V8 プロテアーゼが報告され、⁹⁾ 一次構造決定などの蛋白質化学の分野で広く利用されている。V8 プロテアーゼについては 1985 年に結晶化の論文が出ているが、¹⁰⁾ 今までところ立体構造決定に関する報告はない。一方、非病原菌由来の酸性アミノ酸特異的プロテアーゼについては、N.Yoshida らのグループ¹¹⁾ と、Carlsberg 研究所のグループ¹²⁾ により放線菌 *Streptomyces griseus* の生産する酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの発見が報告されている。また、酸性アミノ酸のうち、とりわけグルタミン酸に対する作用の強いプロテアーゼが、枯草菌 *Bacillus* 属より2種類発見されている。^{7), 13)} これらのプロテアーゼについては、その蛋白質化学的性状や酵素学的な研究がさまざまなグループによってなされてきた。例えば、*S. griseus* の生産する酸性アミノ酸特異的プロテアーゼ¹²⁾ については、同種の菌からの疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼである SGPA²⁾ および SGPB³⁾ と 60 % 程度の高いアミノ酸配列の相同性を有するにもかかわらず、どのような基質認識機構で酸性アミノ酸だけに特異的に作用するのかがまったく解明されておらず、したがって酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの立体構造決定が待たれていた。

時期を同じくして、筆者等は、放線菌 *S. fradiae* より酸性アミノ酸特異的プロテアーゼ (SFase-1) を見出し、その酵素学的・蛋白質化学的性状を明らかにした。⁵⁾ その結果、SFase-1 は、187 個のアミノ酸から成るプロテアーゼで、グルタミン酸やアスパラギン酸に特異的に作用し、その C 末端側で切断する酵素であることがわかった。

SFase-1 は、上述の同じ放線菌由来の *S. griseus* の酸性アミノ酸特異的プロテアーゼと 82 % のアミノ酸配列の高い相同性を示したが、同一の働きを持つ枯草菌 *Bacillus licheniformis* 由来の BLase との相同性は 25 % 以下であった。そこで酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの立体構造決定とその基質認識機構の解明を目的として SFase-1 の X 線構造解析を目指したが、残念なことに、放線菌 *S. fradiae* における SFase-1 の生産量は非常に低く、結晶化は非常に困難であった。

3. 疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼ (SFase-2) の X 線構造解析

一方、放線菌 *S. fradiae* より、酸性アミノ酸特異的プロテアーゼを精製する過程において大量に得られたのが SFase-2 である。⁶⁾ SFase-2 は、広い基質特異性を持つが、とりわけフェニルアラニンやロイシンなどの疎水性アミノ酸に特異的に作用するプロテアーゼで、比較的短いペプチドへの親和性が弱く、ある程度の長さを持つ基質ないと作用しにくいという特徴を持っていた。SFase-2 は 191 個のアミノ酸から成り、酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの SFase-1 と 57 % のアミノ酸配列の相同性を示した。また、同種の *S. griseus* の産出する疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼである SGPA²⁾ ならびに SGPB³⁾ と、76 % および 67 % の一次構造の相同性を示した。幸いなことに SFase-2 のサンプルが純度良く大量に得られ、この結晶化に成功した。結晶化については、最初双晶しか得られ

図2 SFase-2 の三次元構造のリボンモデル。²⁹⁾ 図中の3残基はいわゆる活性発現に必要な catalytic triad と言われる His, Asp, Ser 残基である。

なかったが、ジオキサンを添加することによりこれを解決し、柱状の結晶を得ることができた。

SFase-2の結晶は、空間群が $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 69.18 \text{ \AA}$ 、 $b = 72.81 \text{ \AA}$ 、 $c = 29.88 \text{ \AA}$ であり、溶媒占有率37.5%で非対称単位中に1分子を含んでいた。回折データの測定は、理学電機 のR-AXIS IICを用いて行った。SFase-2の結晶は、X線に対してダメージが少なく、1個の結晶で $1.64 \text{ \AA}$ という高分解能のデータを収集することができた。また、測定された $F > 1.0\sigma$ (F) 以上の49756個の反射についてデータ処理の結果、得られた独立な反射数は16320個であり、R-mergeは、5.3% (データの完全性は、85.2%) であった。

構造解析は、上述の放線菌 *S. griseus* 由来の疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼであるSGPAを初期モデル分子として、MERLOT¹⁴⁾を用いた分子置換法で行った。その結果、得られた解を基にした初期モデルのR-因子は0.443であった。PROLSQ¹⁵⁾による立体構造の精密化と

FRODO¹⁶⁾でのモデル構築を繰り返した結果、最終的な結晶学的R-因子は $F > 2.0\sigma$ (F) の16128個の反射に対し18.2%であり、その分解能の範囲は $8.0 \sim 1.64 \text{ \AA}$ である。結果として得られた電子密度図は、191個のアミノ酸残基のすべての側鎖の電子密度図も確認することができ、分子モデルを正しく構築することができた。最終モデルは1337個の原子と86個の水分子を含んでいた。すべての蛋白質の原子に対する温度因子の平均値は $11.7 \text{ \AA}^2$ であった。また、温度因子が大きくなっている部分は、予測されたとおり、主として分子表面のループ上に存在した。

ラマチャンドラプロットの結果は妥当なものであった。また、62番目のプロリンはcis-コンフォメーションをとっていたが、このことはSFase-2とアミノ酸配列の相溶性の高いSGPA (76%) およびSGPB (67%) においても、この位置に相当するプロリンがcis-コンフォメーションを取ることと良く一致する。SFase-2の4個のシステイン残基は2個のS-S結合を作り、Cys16-Cys38、

図3 疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼの立体構造の比較 (立体図)。

a. SFase-2 (太線) と SGPA (実線), b. SFase-2 (太線) と SGPB (実線), いずれも、主鎖が合うようにグラフィックス上で重ね合わせた。(文献8より引用)

Cys148-Cys175が架橋していた。この結果も、SGPA¹⁷⁾とSGPB¹⁸⁾の報告と一致していた。

4. SFase-2の立体構造

SFase-2の全体的な立体構造は典型的なキモトリプシン型の構造をとっていた。すなわち分子は二つのドメインからなっており、2本の α -ヘリックスと6つの逆平行 β ストランドがループでつながった逆平行 β バレル構造をとっていた(図2)。このことは、CDスペクトルデータに基づいて、Robsonの方法¹⁹⁾で計算した二次構造予測の結果と良く一致していた。活性発現に必要な3つの残

基はいずれも2つのドメインの間のくぼみの中に位置し、ストランドをつなぐループ上に存在していた。SFase-2分子の2つのドメインは、一次構造はまったく違っているが、よく似た3次元構造を持っている。このことは、この二つのドメインが遺伝子的重複によりできた可能性のあることを示唆するものである。図3に示すのは、SFase-2のC α 原子のワイヤーモデルである。SFase-2の3次元構造は、SGPA¹⁷⁾ SGPB¹⁸⁾と良く似ていた(図3(a)(b))。SFase-2とSGPAとの主鎖の平均的な位置のずれは、179個の共通のC α 原子に対し0.95 Å、SFase-2とSGPBでは177個の共通のC α 原子に対し1.22 Åであっ

図4 疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼの活性部位の比較(立体図)。

a. SFase-2(太線)とSGPA(実線), b. SFase-2(太線)とSGPB(実線), アミノ酸残基番号は図5のSFase-2の番号に合わせている。(文献8より引用)

た、SGPA および SGPB との立体構造の違いは主としてループ部分で起こっている。Thr48-Leu56 の部分については、SGPA では deletion があり (図3 (a))、この部分については SGPB と相同性が高かった。また、Asn76-Ala80 の部分は SGPB より短くなっており、Tyr85-Tyr92 は SGPB より広がった形になっていた (図3 (b))。これらの領域は分子の表面に位置しており、どちらの部分も活性部位からは離れたところにあった。したがってこれらの残基の違いが基質の結合に直接的な効果を及ぼす物ではないと思われる。SFase-2 の全体的な構造は SGPA および SGPB と非常に良く似ており、基質特異性の相同性と良く一致するものであった。⁶⁾ この結果からこれら3つの酵素は進化的に関連があり、1つの共通の祖先を起源としているのではないかと考えられる。

図4は、SFase-2、SGPA および SGPB の活性部位を抽出したものである。活性部位のコンフォメーションは、すべての3つの酵素で良く一致する。SFase-2 の触媒基である His37, Asp68, Ser154 の残基も SGPA, SGPB と同じ幾何学的配置を取っていた。SFase-2 の活性部位は比較的広いポケットになっており、基質特異性の広さを特徴づけていた。Delbaere 等が提唱したように、²⁰⁾ SGPB の S1 サイト (便宜上、Schechter & Berger²¹⁾ の命名法により、基質ペプチドの各アミノ酸残基を切断点より N-末端側へ P1, P2... とし、対応する酵素上の部位を S1, S2... とする) は、おそらく主として2つの短い主鎖のセグメント (Ala149-Pro151 と Ser169-Gly173 の残基) から成っている。この S1 サイトの2番目のセグメント (Ser169-Gly173)

は主にグリシン残基から成り、結合領域全体としては原則的に大きな疎水性の側鎖を好むような主鎖の骨格になっている。SFase-2 と SGPA との S1 サイトの平均的な位置のずれは、44個の原子に対して 0.37 Å (図4 (a))、SFase-2 と SGPB では44個の原子に対して 0.41 Å であった (図4 (b))。SFase-2 と SGPA および SGPB との S1 サイトにおける三次構造の類似性は、速度論の研究の結果と良く一致する。つまり、SFase-2 は、広い基質特異性を持ち、基質の P1 の位置²¹⁾ に疎水性の残基が来ると良く切断するが、短い基質では切断しにくいということである。⁶⁾ しかしながら、これら3つの酵素の活性部位における最も大きな違いは、His37, Phe64 および Tyr132-Asp136 より成る S2 のサイトである。Brayer 等²²⁾ は、SGPA において S2 のポケットはおそらく基質が正しい方向に向くために絶対に必要であり、結果として S1 サイトにおける特異性が減るのであろうと報告している。SFase-2 の速度論の研究⁶⁾ より、P2 位の Ala 残基を Pro に換える事により k_{cat}/K_m 値は 10 倍上昇し、この結果は SGPA²⁾ や SGPB³⁾ でも同様であった。したがって、S1 や S2 サイトにおける SFase-2 と阻害剤との結合様式を SGPA および SGPB の結合様式と比較することは非常に興味深いと思われる。

5. 酸性アミノ酸特異的プロテアーゼ (SFase-1) の三次元構造予測

図5は、放線菌群が産出するプロテアーゼの一次構造を並べたものである。SFase-2 と SFase-1 とのアミノ酸配

図5 放線菌が産出するプロテアーゼのアミノ酸配列の比較。

アミノ酸残基が一致するところは box で囲んである。活性発現に必要な triad の His, Asp, Ser は影を付けている。特徴的な3つのヒスチジン残基は星印で示してある。ダッシュは配列を最適にするためにギャップとして入れている。h は α ヘリックス, s は β ストランド, SF は SFase, SGPA は, *S. griseus* protease A; SGPB は, *S. griseus* protease B; SGPE は, *S. griseus* protease E を示す。(文献8より引用)

列の相同性は57%で、SGPEとの相同性は56%であった。疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼである上の3つと酸性アミノ酸特異的プロテアーゼである下の2つで、非常にアミノ酸配列が似ているにもかかわらず、どのような違いで基質特異性が異なっているのかについて、配列を比較して検討した。セリンプロテアーゼの基質認識部位と言われるのは、いわゆる活性セリンであるSer155の近傍で、この付近でpositiveな電荷を持つ可能性のあるアミノ酸残基を特定した。その結果、図5で示す星印を付けた3つのヒスチジンのある部分、すなわちHis158, His168, His185が疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼと酸性アミノ酸特異的プロテアーゼとの間で違っていた。したがって、これらの残基が、基質の認識に重要ではないかと考えられた。

そこで、X線構造解析により決定したSFase-2の座標を基にして酸性アミノ酸特異的プロテアーゼであるSFase-1の三次元構造を予測し、活性部位付近の構造の違いについて比較した。SFase-1の分子モデリングの第一段階として、*PS-FRODO*¹⁶⁾でSFase-2のアミノ酸残基をSFase-1に変換し、SFase-1の立体構造を構築した。第2段階として、主鎖と側鎖の空間的な配置を挿入と欠損を考慮しながら手動で直した。最終的には、エネルギー極小化をSYBYL5.5 (Tripos社)を用いて行い、Kollman_unitedの力場²³⁾を使った。計算は、エネルギー差のR.M.Sの値が、0.01kcal/mol/Åに到達するまで行った。立体化学の正しさはラマチャンドラプロットでチェックした。

6. 酸性アミノ酸特異的プロテアーゼと疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼの基質認識機構の比較

図6は、SFase-2と酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの

両者の活性部位付近について抽出してきたもので、実線で示したのが疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼのSFase-2、太線が予測した酸性アミノ酸特異的プロテアーゼのSFase-1である。両者を見比べて顕著に違っているのは、先に述べた3つのヒスチジンのある部分つまりHis158, His168, His185の付近であった。この部分は実線の疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼのSFase-2では、疎水性のアミノ酸残基である。一方、太線の酸性アミノ酸特異的プロテアーゼのSFase-1では特徴的な3つのヒスチジンが集まってできたヒスチジンクラスターがあり、この部分のアミノ酸残基の違いによって認識するアミノ酸が異なっているのではないかと考えられた。したがって、酸性アミノ酸特異的プロテアーゼではこの3つのヒスチジンクラスターのプラスの吸引力により、グルタミン酸残基を好んで認識し、また、SFase-2では、疎水性のアミノ酸を認識しやすくなっているのではないかと推測した。²⁴⁾

そこで、ヒスチジンクラスターの配置を見ると、いわゆる基質認識ポケットの底の部分に3つのヒスチジン、つまり、His158, His168, His185が存在し、一番表面に出てきているのがHis168、次にHis185があり、そして一番奥のほうにHis158があった。これらの3つのヒスチジンは約3.0Åずつの距離に位置し、それぞれのN原子が水素結合し得る距離内にあった。したがって、おそらく一番表面にあるHis168が、プラスの電荷に帯電することによってグルタミン酸のマイナスの電荷を引き付けるアンカーになるであろう。

しかしながら、SFase-1の至適pHは8.2付近であることから、⁵⁾このpHで、His168は通常中性であり、それ単独ではプラスに帯電することができない。そこで、先程の

図6 酸性アミノ酸特異的プロテアーゼと疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼの基質認識部位近傍の比較（立体図）。酸性アミノ酸特異的プロテアーゼのSFase-1（太線）と疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼのSFase-2（実線）。

図7 疎水性アミノ酸特異的プロテアーゼと酸性アミノ酸特異的プロテアーゼにおける基質認識機構の違いの模式図。

ヒスチジンクラスターについて考えると、各々のヒスチジンの互いに隣接しているN原子同士がネットワークを作り、このヒスチジンクラスターによって、His168がプラスに帯電しているのではないかと考えた。

一方、*S. griseus*が産出する酸性アミノ酸特異的プロテアーゼにおいてもこのヒスチジンクラスターが存在していると推測され、同一のメカニズムが成り立つものと思われる。したがって、放線菌群が産出する酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの基質認識の上でkeyとなる重要なアミノ酸残基は、3つのヒスチジンであり、ヒスチジンクラスターによって基質認識部位のポケットがプラスに帯電し、マイナスのグルタミン酸を認識しやすくなっているのではないと思われる。図7は、SFase-1とSFase-2の基質認識機構を模式的に示している。疎水性のアミノ酸に特異的なSFase-2では、Leu151とPhe176の疎水性相互作用で、疎水性の残基を好んで認識切断し、一方、SFase-1ではヒスチジンクラスターのプラスの電荷がアンカーとなって静電的に酸性アミノ酸を引きつけていると結論づけた。

7. おわりに

この研究の成果については、平成5年10月の日本薬学会近畿支部会で発表したが、²⁴⁾非常に残念なことに、その12月のBiochemistryの速報で先のCarlsbergのグループによって、放線菌*S. griseus*の酸性アミノ酸特異的プロテアーゼであるSGPEのX線構造解析の論文が発表された。²⁵⁾彼らも筆者らと同様に3つのヒスチジンが酸性アミノ酸を特異的認識するkeyとなる側鎖であると結論づけており、Novel Histigine Tiradと言うサブタイトルを付けていた。

また、酸性アミノ酸特異的なシステインプロテアーゼとして、細胞のアポトーシスに関与しているIL-1 β Converting Enzyme (ICE)のX線構造解析による立体構造が、1994年の6月末のNature²⁶⁾とCell²⁷⁾にそれぞれ掲載された。いずれの結果もまったく同一の阻害剤との複合体の構造で、この酵素はアスパラギン酸に特異的で、そのアンカーとなっているのは、Arg179とArg341のプラスの電荷であった。この結果は、SFase-1とは違っているが、非常に理解しやすい基質認識作用の提唱であった。

現在筆者は、先述の枯草菌*Bacillus licheniformis*由来のグルタミン酸特異的プロテアーゼであるBLaseの結晶化に成功しており、²⁸⁾X線構造解析が進みつつある。この立体構造が明らかとなれば、SFase-1並びにICEとの比較によって、酸性アミノ酸特異的プロテアーゼの基質認識機構に関するさらに詳細な研究ができると考えている。

最後に、この研究を行うに当たり、貴重なご助言を頂いた塩野義製薬(株)研究所の皆様ならびにR-AXISでのデータ測定の際お世話になりました理学電機(株)佐藤貴久氏に感謝いたします。また、この原稿に対してご助言下さった京都大学理学部の三木邦夫教授に感謝いたします。

文 献

- 1) C.S. Wright, R.A. Alden and J. Kraut: *Nature* **221**, 235-242 (1969) .
- 2) Y. Narahashi: *Methods in Enzymol.* **19**, 651-664 (1970) .
- 3) W.M. Awad, A.R. Soto, S. Siegel, W.E. Shiba, G.G. Bernstrom and M.S. Ochoa: *J. Biol. Chem.* **247**, 4144-4154 (1972) .
- 4) A. Ruhlmann, D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels and R. Huber: *J. Mol. Biol.* **77**, 417-436 (1973) .
- 5) K. Kitadokoro, E. Nakamura, M. Tamaki, T. Horii, H. Okamoto, M. Shin, T. Sato, T. Fujiwara, H. Tsuzuki, N. Yoshida and H. Teraoka: *Biochim. Biophys. Acta.* **1163**, 149-157 (1993) .

- 6) K. Kitadokoro, H. Tsuzuki, E. Nakamura, T. Sato and H. Teraoka: *Eur. J. Biochem.* **220**, 55-61 (1994) .
- 7) S. Kakudo, N. Kikuchi, K. Kitadokoro, T. Fujiwara, E. Nakamura, H. Okamoto, M. Shin, M. Tamaki, H. Teraoka, H. Tsuzuki and N. Yoshida: *J. Biol. Chem.* **267**, 23782-23788 (1992) .
- 8) K. Kitadokoro, H. Tsuzuki, H. Okamoto and T. Sato: *Eur. J. Biochem.* **224**, 735-742 (1994) .
- 9) G.R. Drapeau, Y. Boily and J. Houmard: *J. Biol. Chem.* **247**, 6720-6726 (1972) .
- 10) L.M.B. Gehrig, L.T.J. Delbaere and G.R. Drapeau: *J. Mol. Biol.* **185**, 651 (1985) .
- 11) N. Yoshida, S. Tsuruyama, K. Nagata, K. Hirayama, K. Noda and S. Makisumi: *J. Biochem. (Tokyo)* **104**, 452-456 (1988) .
- 12) I.Svendsen, M.R. Jensen and K.Breddam: *FEBS Lett.* **292**, 165-166 (1991) .
- 13) T. Niidome, N. Yoshida, F. Ogata, A. Ito and K. Noda: *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 965-970 (1990) .
- 14) P.M.D. Fitzgerald: *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 273-278 (1988) .
- 15) W.A. Hendrickson: *Methods Enzymol.* **115**, 252-270 (1985) .
- 16) T.A. Jones: *Methods Enzymol.* **115**, 157-171 (1985) .
- 17) A.R. Sielecki, W.A. Hendrickson, C.G. Broughton, L.T. Delbaere, G.D. Brayer and M.N. James: *J. Mol. Biol.* **134**, 781-804 (1979) .
- 18) M.N. James, G.D. Brayer, L.T. Delbaere, A.R. Sielecki and A. Gellter: *J. Mol. Biol.* **139**, 423-438 (1980) .
- 19) J. Garnier, D.J. Osguthorpe and B. Robson: *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120 (1978) .
- 20) L.T. Delbaere, W.L. Huctcheon, M.N. James and W.E. Thiessen: *Nature* **257**, 758-763 (1975) .
- 21) T. Schechter and A. Berger: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162 (1967) .
- 22) G.D. Brayer, L.T. Delbaere and M.N. James: *J. Mol. Biol.* **124**, 261-283 (1978) .
- 23) S.J. Weiner and P.A. Kollman: *J. Comput. Chem.* **7**, 230-252 (1986) .
- 24) K. Kitadokoro, H. Tsuzuki, H. Teraoka and T. Sato: *Abstracts of the 43rd Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Osaka, October 24 (1993)* p. 74.
- 25) V.L. Nienaber, K. Breddam and J.J. Birktoft: *Biochemistry* **32**, 3456 (1993) .
- 26) K.P. Wilson, J.F. Black, J.A. Thomson, E.E. Kim, J.P. Griffith, M.A. Navia, M.A. Murcko, S.P. Chambers, R.A. Aldape, S.A. Raybuck and D.J. Livingston: *Nature* **370**, 270-275 (1994) .
- 27) N.P.C. Walker, R.V. Talanian, K.D. Brady, L.C. Dang, N.J. Bump, C.R. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, M.C. Hackett, L.D. Hammill, L. Herzog, M. Hugunin, W. Houy, J.A. Mankovich, L. McGuinness, E. Orlewicz, M. Paskind, C.A. Pratt, P. Reis, A. Summani, M. Terranova, J.P. Welch, L. Xiong, A. Moller, D.E. Tracey, R. Kamen and W.W. Wong: *Cell* **78**, 343-352 (1994) .
- 28) K. Kitadokoro: *Acta. Cryst.* **D51**, 835-836 (1995) .
- 29) P.J. Kraulis: *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950. (1991) .

プロフィール

北所健悟 Kengo KITADOKORO

塩野義製薬(株)創業第一研究所, 〒553 大阪市福島区鷺洲5丁目12-4

SHIONOGI RESEARCH LABORATORIES, 12-4, Sagisu, 5-chome, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan
e-mail. kengo.kitadokoro@shionogi.co.jp

最終学歴：大阪大学大学院工学研究科応用精密化学専攻修士課程 1990 年修了, 博士 (理学), 京都大学

専門分野：蛋白質結晶学, X線結晶学, 構造生物学
現在の研究テーマ：酵素と薬物との複合体のX線構造解析, 新規酵素の立体構造決定

趣味：AV鑑賞, 子供 (愛娘) と遊ぶこと