最近の研究から

スルホトランスフェラーゼの構造生物学

大阪大学大学院理学研究科生物科学 角田佳充

NIEHS/NIH (U.S.A.) Lars C. Pedersen, 根岸正彦

Yoshimitsu KAKUTA, Lars C. PEDERSEN and Masahiko NEGISHI: Structural Biology of Sulfotransferase

The crystal structures of the estrogen sulfotransferase and the sulfotransferase domain (NST1) of human heparan sulfate NDST-1 (N-deacetylase/N-sulfotransferase) have been solved in the presence of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP). These structures reveal structural similarity between sulfotransferase and nucleotide kinase.

1. はじめに

スルフリル基 ($-\text{SO}_3^-$) は細胞内、外においてさまざまな場面で働いており、ステロイドホルモン、神経伝達物質などの内因性物質の不活性化とその活性濃度の制御、薬物、癌原物質などの外来性物質の不活性化、糖鎖を通じたシグナル伝達などの重要な役割を担っている^{1), 2)} このスルフリル基の転移反応を触媒する酵素を歴史的にスルホトランスフェラーゼ (硫酸転移酵素, Sulfotransferase: ST) と呼ぶ。ST は基質分子の水酸基やアミン基などに 3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルフェート (PAPS) からスルフリル基を転移する反応を触媒する (図1)。PAPS は反応後、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスフェート (PAP) になる。

ST は、細胞質型のものと膜結合型のものに大別できる。細胞質型のは、疎水性低分子を基質としてとるものが多く、対象となる基質ごとにそれぞれ命名されており、エストロゲン ST、アンドロゲン ST、フラボノール ST などがある。それに対して膜結合型の ST には、親水性の高分子を基質としてとるものが多く、糖鎖 (ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸) の生合成過程において働くもの、基質として糖脂質、HNK 糖鎖抗原、蛋白質のチロシン残基をとるものなどがある。

今までに数多くの ST が報告、研究されているが、立体構造については我々が研究を始めた時点 (1995 年) では一つも報告されていなかった。我々は細胞質型のマウスエストロゲンスルホトランスフェラーゼ (EST) の結晶構造を ST として初めて決定し³⁾ その後、膜結合型のヒトヘパラン硫酸 N デアセチラーゼ/N スルホトランスフェラーゼ I の ST ドメイン (NST1) の結晶構造を決定した⁴⁾

前半に EST, 後半は NST1 を EST と比較しながら紹介する。

2. マウスエストロゲンスルホトランスフェラーゼの X 線結晶構造解析

EST は分子量約 3 万 3 千の可溶性蛋白質で、ヒトでは主に肝臓で、マウスでは主に精巣で発現している。基質の女性ホルモンであるエストロゲンの 3 位のフェノール基に $-\text{SO}_3^-$ を転移する反応を触媒し、さらに、基質として体外から摂取した物質も取りうる。転移反応により基質分子はエストロゲン活性を消失し、可溶性が上がる。我々はマウス EST の結晶構造を 2 種類決定した³⁾ 一つは PAP との複合体 (EST-PAP 複合体) であり、もう一つは、さらにエストロゲンの代表的な物質である β -estradiol (E_2) を結合した 3 分子複合体 (EST-PAP- E_2 複合体) である。

EST は、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として大腸菌に発現させ、トロニンによる

図1 スルホトランスフェラーゼの酵素活性の模式図。(Schematic representation of the reaction of sulfotransferase.)

り GST と分離, 精製後, PEG6000 を沈殿剤として PAP 存在下で結晶化に成功した.⁵⁾ この結晶は, 実験室系の装置 (理学 RU300 と RAXIS-IV) を用いて約 2.5 Å 分解能まで回折した. 空間群は $P2_12_12$, 格子定数 $a = 96.4$ Å, $b = 79.1$ Å, $c = 80.5$ Å で非対称単位中に二つの EST 分子が含まれていた. その後, ソーキング法により EST-PAP-E₂ 複合体の作成にも成功した. 位相決定には EST-PAP 複合体結晶から作成した三つの重原子誘導体による MIR 法を用いた. 重原子試薬スクリーニングの結果, EST 結晶を CH₃HgCl 入りの結晶化母液に浸すと徐々に結晶にひびが入り, 小さな断片になることがわかった. 何度か試行錯誤した結果, 顕微鏡下で観察しながら結晶を高濃度 (溶解できる最高濃度) の CH₃HgCl 入りの結晶安定化溶液に浸し, 断片化して回折測定可能の限界まで小さくなった結晶を, クライオ溶液条件に素早く移しクライオストリームで -170 度に冷却することで, 良質な誘導体を得ることができた. 二つ目の誘導体は, EST 結晶を E₂ の 2 位と 4 位の水素が臭素原子に置換された物質 (BrE₂) を溶かした溶液に一晩浸すことで得ることができた. BrE₂ は基質結合部位に結合していた. 二つの臭素原子の位置は NCS 平均化の際に非常に有用であった. 三つ目の誘導体結晶は EST 結晶を BrE₂ と CH₃HgCl の両方に浸すことで作成した. これら三つの重原子誘導体結晶から得られた位相情報 (Xtalview⁶⁾ および CCP4⁷⁾ を用いる) と, NCS 平均化, 溶媒平滑化により解釈可能な電子密度を得ることができた. モデルビルディングは O⁸⁾ で行い, XPLOR⁹⁾ で精密化を進めた. EST-PAP-E₂ 複合体は, EST-PAP 複合体から構造変化がほとんどなかった為, 同様に精密化を進めることができた. その後, シンクロトロン (Brookhaven National Laboratories beamline X9b) で収集したデータに対して, 分解能 1.6 Å (EST-PAP-E₂ 複合体) と 1.75 Å (EST-PAP 複合体) でそれぞれ精密化し, 最終的な R/Rfree-factor はそれぞれ 21.8 % / 25.1 % と 21.8 % /

24.8 % となった.¹⁰⁾ EST-PAP 複合体と EST-PAP-E₂ 複合体は, EST-PAP 部分がほとんど同じ構造をしていたので, この後は EST-PAP-E₂ 複合体について説明していく.

3. EST の立体構造

EST は 5 本のストランドからなる大きな平行 β シートと 2 組の短い逆平行 β シート, そしてその間をつなぐ多くの α ヘリックスで形づくられており, α/β 構造に分類される (図 2). E₂ 分子, PAP 分子とも蛋白質にほとんど覆われる状態で結合していた. 基質結合部位と補酵素結合部位はつながったトンネルになっており, 基質と補酵素がそれぞれ外から蛋白質内部に入ってきて, 分子中央の活性部位で反応し, また外に出ていくということが想像できる. 非常に疎水的な E₂ 分子に対応して, EST の多くの疎水性アミノ酸が E₂ 分子全体を覆っていると同時に, E₂ 分子の両端の 3 位のフェノール基と 17 位の水酸基には, EST の Lys106 と His108, Asn86 がそれぞれ水素結合していた (図 3). したがって, EST は疎水性相互作用と水素結合の両方によって, 基質分子を酵素反応に適切な位置と方向に決めていていると考えられる. PAP は, 5' と 3' の二つのリン酸基との間の水素結合と, アデニンリングとの間のスタッキング結合 (Phe229 と Trp53) によって認識されていた. 3' リン酸基は, PAP, PAPS に特異的に存在している為, EST 分子が PAP, PAPS 分子を選択するにあたって, この水素結合が重要であると考えられる.

4. 構造比較

EST の立体構造に類似のものがあるかどうかを Dali サーバー¹¹⁾ で検索を行った結果, スクレオチドキナーゼ (NK: uridylate kinase, adenylate kinase, guanylate kinase などを含む酵素ファミリー)¹²⁾ が見つかった. この蛋白質ファミリーは, ATP を補酵素としてそれぞれ基質の AMP, UMP, GMP を ADP, UDP, GDP にする酵素である. NK と EST との間には分子全体にわたって構造の類似性があるにもかかわらず, アミノ酸配列には類似性はない. 特に

図 2 EST-PAP-E₂ 複合体のリボンモデル図. (Overall structure of EST-PAP-E₂ complex.) PAP, E₂ 分子をスティックモデルで表示している. Molscript²³⁾ で作図.

図 3 EST-PAP-E₂ 複合体の E₂ と PAP の結合に関与している部位の水素結合および疎水的相互作用の模式図. (Schematic representation of the active site of EST-PAP-E₂.)

構造が似ている部分の重ね合わせを図4に示しており、ESTとNKのそれぞれに結合している基質と反応後の補酵素も一緒に表示している。ESTはEST-PAP-E₂複合体、NKは反応後の補酵素ADPと基質AMPとの複合体を用いている。ESTに結合しているPAPとE₂にそれぞれ対応して、NKにはADPとAMPがほぼ同じ部位に結合していた。図4からわかるように、非常に似た構造をしており、かつ基質と補酵素の結合している位置がこの二つの蛋白質の間で、ほぼ一致していることになる。さらに2次構造の繋がり方も一致していた。我々は、ESTとNKの構造の類似性に対して、分岐的進化を考えている。2次構造の繋がり方も同じであるということがその根拠である。つまりヌクレオチドキナーゼとスルホトランスフェラーゼには共通の祖先が存在し、そこから分岐的に進化した結果、これら二つの酵素ファミリーが現存しているであろうと考えられる。

我々がESTの立体構造を決定して、NKとの構造の類似性を考察している頃、スルファターゼの結晶構造が決定され、この構造がフォスファターゼの立体構造と類似していることが報告された。¹³⁾ このことから、SO₃転移反応とPO₃転移反応の間には、広範囲な進化的な関係の存在が想像できる。

5. ESTの酵素反応のメカニズム

EST-PAP-E₂複合体の活性部位の構造から、SO₃⁻は直接直線的にPAPSからE₂に転移することが考えられた。このことから、SO₃⁻転移の遷移状態において、平面構造をとってtrigonal bipyramid構造(硫黄原子を中心とした3つの酸素原子を頂点とした三角形の平面構造の両側に1

つずつ酸素原子が配置している構造)をとると予想した。リン酸基転移反応の遷移状態に擬似的な構造をとる化合物としてバナジン酸が使われているので、STにもこの物質が使える可能性があると考えた。そこで、EST-PAP複合体結晶をバナジン酸溶液に浸したところ、期待したとおりPAP分子の5'リン酸の先にバナジン酸と考えられる電子密度が観測された。¹⁰⁾ バナジン酸はVO₃を中心にして、PAPの5'リン酸の一つの酸素ともう一つの酸素原子の二つをapical酸素としてtrigonal bipyramid構造をとって結合していた(図5)。この構造をEST-PAP-E₂複合体の構造と重ね合わせると、E₂の3位の酸素(SO₃⁻が転移される位置)が、バナジン酸の一方のapical酸素の位置にほとんど一致した。したがって、このapical酸素をE₂の3位の酸素に置き換えて考えると、EST-PAP-バナジン酸複合体の構造はESTの酵素反応の遷移状態に擬似的なものであると考えられる。水素結合が可能な距離にあるものの間を点線で示しており、Lys48, Lys106, His108がバナジン酸のそれぞれの酸素に水素結合が可能な位置にあった。この構造に基づきESTの酵素反応のメカニズムを考えることができる。我々は図6のモデルを提案している。His108がプロトン受容体として働くことで、基質のフェノール基のプロトンを引き抜き、基質の酸素原子がPAPSの硫黄原子を求核原子攻撃し、SO₃⁻が転移していく。また、Lys48は5'リン酸基とSO₃⁻を結んでいるブリッジ酸素原子にプロトンを供給することで、PAPSからSO₃⁻を外れやすくする。遷移状態にあるSO₃⁻を正電荷を持ったHis108とLys106が安定化し、反応を円滑に進めていくといったものである。これら3つの側鎖(His108, Lys106, Lys48)を変異させたmutantESTは、そのどれもが活性を失った。すべての細胞質型のSTにおいて、Lys48とHis108は完全に保存されているので、このメカニズムは少なくとも細胞質型のSTについては、ほぼ共通なものであると考えられる。

ここで図3を参照して頂く。PAPの5'リン酸からThr51, Thr45, His108, E₂のフェノール基へと続く水素結

図4 ESTとNKの立体構造が特に類似している部分の重ね合わせ。(Superposition of similar structural elements of EST and NK.) NKにはuridylylate kinaseを用いており、結合しているAMPとADPも一緒に白いラインで表示している。ESTは黒いラインで、アミノ酸番号を「'」付きで表示している。Setor²⁴⁾で作図。

図5 EST-PAP-バナジン酸複合体のバナジン酸付近の構造。Setor²⁴⁾で作図。(Structure of the active site from the EST-PAP-vanadate.)

図6 ESTの酵素反応機構のモデル。(Schematic representation of the proposed reaction mechanism of EST.)

合のネットワークが存在し、チャージリレーとして働く可能性が考えられるが、Thr45をValに置換した場合にも約15%程度の活性が観測され、酵素活性に必須ではないようである。¹⁰⁾

6. 細胞質型と膜結合型に共通な二つの配列モチーフ

本文の最初の方で説明した様に、STファミリーは大きく細胞質型と、膜結合型のものに分けられる。細胞質型にはアミノ酸配列の類似性が広く存在しているのに対して、膜結合型においては、その類似性は報告されていなかった。(その後HS3OSTがクローニングされ、¹⁴⁾ NST1と間に比較的高い類似性があることが示されている。)また、対象となる基質は、細胞質型のものは主に疎水性の低分子、膜結合型のものは糖鎖や蛋白質といった親水性の高分子などであり、大きく異なっている。これらの理由からか、細胞質型と膜結合型の相互の関係は、ほとんど研究されていなかった。しかしPAPSはすべてのSTで共通に使われており、PAPSを結合するのに共通の構造がファミリー全体に存在している可能性があると考えた。シーケンズアライメントを行った結果、我々は細胞質型と膜結合型の両方に保存されているアミノ酸配列を2カ所見出すことができた(図7)。¹⁵⁾

この二つのアミノ酸配列の保存領域は、ESTの立体構造において、PAPの5'リン酸基と3'リン酸基に結合している部位であった。そこで、我々はそれぞれ5'PSBモチーフ、3'PBモチーフと命名した(図8)。5'PSB、3'PSBとも側鎖でリン酸基と相互作用している部分(5'PSBのLys48, Thr51, Thr52, 3'PBのArg130, Ser138)が特によく保存されていた。1次構造に類似性があり、その位置がPAPの結合部位であるということは、すべてのSTにこの二つのモチーフが存在していることを示唆する。このことをより確かにするために膜結合型のSTの立体構造を決定することを計画した。我々は膜結合型のSTの内、ヘパラン硫酸の生合成過程で働くヒトヘパラン硫酸Nデアセチラーゼ/Nスルホトランスフェラーゼ(NDST-1)を選んだ。

図7 すべてのSTに保存されているPAPS結合モチーフ(Multiple sequence alignments of sulfotransferases.) (5'PSBモチーフと3'PBモチーフ部分のアライメント)。アライメントにはプログラムMEME²⁵⁾を使用。5'PSB、3'PBのESTにおける2次構造を一番上に表示している。PAPの結合に関与している側鎖部分を2次構造の下小さな四角で表示している。

図8 ESTの5'PSBと3'PBの立体構造。側鎖はPAPと水素結合しているもののみ表示している。(Structural representation of the 5'PSB and 3'PB motifs.) Setor²⁴⁾で作図。

7. ヒトヘパラン硫酸Nデアセチラーゼ/NスルホトランスフェラーゼのNスルホトランスフェラーゼドメインのX線結晶構造解析

ヘパラン硫酸は、細胞増殖因子や細胞外基質成分など、様々な蛋白質と結合して、細胞の増殖、分化、胚発生、形態形成など、多様な生物機能に関与している。これらの結合には、ヘパラン硫酸鎖のスルフィル基が必須である。ヘパラン硫酸Nデアセチラーゼ/Nスルホトランスフェラーゼ(NDST-1)は、ヘパラン硫酸の生合成過程において、Nアセチルグルコサミンのアセチル基をアミノ基へ置換し、さらにスルフィル基を転移するという二つ

の反応を触媒する酵素である。¹⁶⁾ 前章のアライメントでヒト NDST-1 の C 端側に 5'PSB と 3'PB が見つけれられたことから, C 端側に ST ドメインが存在していることが予想できた. そこで, C 端側 325 残基のみを大腸菌で発現させたところ, 上記二つの酵素活性の内, ST 活性のみのある可溶性の蛋白質 (NST1) を得ることに成功した. 発現は EST と同様に GST との融合蛋白質として大腸菌に発現させ, トロンピンにより GST 部分を切り取り, 精製した. PEG3000 を沈殿剤として用い, PAP 存在下で結晶化した.¹⁶⁾ 二種類 (空間群 $P2_1$ と $P2_12_12$) の結晶が同一の結晶化条件下で形成された. $P2_1$ の場合, 格子定数 $a = 45.4$ Å, $b = 54.5$ Å, $c = 68.9$ Å, $\beta = 100.1$, $P2_12_12$ の場合, $a = 89.1$ Å, $b = 55.4$ Å, $c = 66.4$ Å でどちらの結晶も非対称単位中には NST1 分子が 1 分子含まれていた. SerMet 置換した蛋白質の結晶化においては, $P2_12_12$ の結晶のみが得られた. この結晶を用いて 3 波長の MAD 測定をシンクロトロン (Brookhaven National Laboratories beamline X9b) で行った結果, 分解能 2.85 Å までのデータが得られた. これらのデータから初期位相を得 (SHELEX,¹⁷⁾ SHARP¹⁸⁾ を使用), ほぼ全体のモデルを組み立てることができた (O を使用). その後, 実験室系の装置 (理学 RU300 と RAXIS-IV) を用いて, $P2_1$ タイプの結晶を使って 2.3 Å の分解能のデータが得られたので, 分子置換法 (X-PLOR を使用) を用いて初期位相を得ることで, こちらのデータに対して精密化し, R/Rfree-factor は 21.0 % / 25.7 % となった.⁴⁾

8. NST1 の立体構造

NST1 は特徴的な大きな溝を持った構造をしており, この溝の奥の中央部分に PAP が結合している (図 9). 5 本

図 9 NST1 のリボンモデル図. PAP 分子をスティックモデルで表示している. (Overall structure of NST1-PAP.) Molscript²³⁾ で作図.

のストランドからなる平行 β シートと, 3 本のストランドからなる逆平行 β シートとそれらをつなぐ多くの α ヘリックスから形成されている. 図 2 の EST と比較すると, どちらも 5 本の β ストランドを中心とした α/β 構造で, ヘリックスの配置などもかなり類似している. その反面, NST1 の大きな溝の部分は EST では逆平行 β シートであるなどの大きな違いも存在している.

NST1 の基質との複合体の構造は得られていないが, 基質であるヘパラン硫酸の前駆体は, 分子量が数万にもおよぶ鎖状ポリマーであり, 大きくあいた溝は基質の結合に非常に適している. EST の場合は, 蛋白質にあいた穴のような形状をした疎水性のポケットで基質を結合していたことと比較すると, 興味深い結果である.

9. すべてのスルトランスフェラーゼに共通な PAPS 結合モチーフ

「6. 細胞質型と膜結合型に共通な二つの配列モチーフ」の中で予想した PAPS 結合モチーフは, NST1 にも存在していた. EST と NST1 の PAPS 結合モチーフを重ね合わせたものを図 10 に示す. 5'PSB モチーフ, 3'PB モチーフとも EST とほとんど同じ構造をとって PAP 分子に結合していることがわかる. 側鎖については, PAP の 5' リン酸と結合している Lys48 (EST) と Lys614 (NST1), 3' リン酸と結合している Ser138 (EST) と Ser712 (NST1) が, 位置, コンホメーションとも一致している. Lys48 (EST) は酵素活性に重要な役割を果たしており, Lys614 (NST1) も Lys48 (EST) と同様の役割をしていることが予想される. まとめると, 膜結合型 (NST1) と細胞質型 (EST) の両方にまたがって 5'PSB モチーフ, 3'PB モチーフが存在し, この構造モチーフがすべての ST に共通に存在していることを強く示唆する結果となった. さらに言えば, 酵素反応のメカニズムの共通性も示唆される.

図 10 EST と NST1 の 5'PSB モチーフと 3'PB モチーフ部分の重ね合わせのステレオ図. (Superposition of 5'PSB and 3'PB motifs of EST and NST1.) 黒いラインは EST でアミノ酸番号を「」付きで表示している. 白いラインが NST1. 側鎖は, 保存性の高い Lys, Ser についてのみ表示している. Setor²⁴⁾ で作図.

10. おわりに

我々は二つのSTの結晶構造を決定することにより、(1) これまでアミノ酸配列に類似性が見出されていなかった細胞質型と膜結合型にまたがるすべてのSTに共通のPAPS結合構造モチーフの存在を示唆することができた。(2) STの立体構造がNKの構造によく似ていることを発見し、NKとSTという似て異なる反応を触媒する酵素に進化的なつながりを示唆することができた。(3) STの酵素反応メカニズムについて提案することができた。その後、細胞質型のSTについては、ESTの立体構造を用いた分子置換法によって、フェノールST、アンドロゲンSTの結晶構造が明らかにされ、^{19) - 21)} 立体構造に基づいたmutation実験を含めて基質特異性に関する研究も進んで来ている。²²⁾

現在は、毎月複数の新しいSTのクローニングが報告されているといった状況であることから、STの新しい生理的な役割が次々と明らかにされていくことであろう。今後の更なるSTに関する研究の展開が待たれる。

謝 辞

本文で紹介した研究は、アメリカ合衆国ノースキャロライナ州NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) の根岸正彦博士の研究室で行ったものです。共著者の方以外にも、多くの研究室内外の皆様にご助力いただいたことに感謝いたします。特に末吉達也博士(NIEHS)には、研究全般にわたりお世話になりましたことに、感謝いたします。また、構造決定過程において、田中 勲先生(北大)、中川敦史先生(阪大)、近藤英昌博士(北工研)に御助言を頂きましたことに感謝いたします。NST1の活性測定に関してお世話になりました木全弘治先生、羽瀧弘子先生(愛知医科大学)に感謝いたします。福山恵一先生(阪大)には本文章に対してご助言を頂きましたことに感謝いたします。

文 献

- 1) C. N. Falany: *J. FASEB*, **11** (1): 1-2 (1997).
- 2) 木全弘治: 細胞工学 Vol.18, No.3 318-323 (1999).
- 3) Y. Kakuta, L. G. Pedersen, C. W. Carter, M. Negishi and L. C. Pedersen: *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 904-908 (1997).
- 4) Y. Kakuta, T. Sueyoshi, M. Negishi and L. C. Pedersen: *J. Biol. Chem.*, **274**, 10673-106762 (1999).
- 5) Y. Kakuta, L. C. Pedersen, K. Chae, W. C. Song, D. Leblanc, R. London, C. W. Carter and M. Negishi, *Biochem Pharmacol.*, **55** (3), 313-317 (1998).
- 6) D. E. McRee: *J. Struct. Biol.*, **125**, 156-165 (1999).
- 7) COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". *Acta Cryst.* **D50**, 760-763 (1994).
- 8) T. A. Jones, J.-Y. Zou, S. W. Cowan and M. Kjeldgaard: *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763 (1994).

- 9) A. T. Brunger, J. Kuriyan and M. Karplus: *Science* **235**, 458-460 (1987).
- 10) Y. Kakuta, E. V. Petrotchenko, L. C. Pedersen and M. Negishi: *J. Biol. Chem.*, **273**, 27325-27330 (1998).
- 11) L. Holm and C. Sander: *Structure* **5**, 165-171 (1997).
- 12) H. J. Muller-Dieckmann, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **236** (1), 361-367 (1994).
- 13) C. S. Bond, P. R. Clements, S. J. Ashby, C. A. Collyer, S. J. Harrop, J. J. Hopwood and J. M. Guss: *Structure*, **5** (2), 277-89 (1997).
- 14) N. W. Shworak, J. Liu, L. M. Fritze, J. J. Schwartz, L. Zhang, D. Logeart and R. D. Rosenberg: *J. Biol. Chem.* **272** (44), 28008-28019 (1997).
- 15) Y. Kakuta, L. G. Pedersen, L. C. Pedersen and M. Negishi: *Trends in Biochem. Sci.*, **23**, 129-130 (1998).
- 16) T. Sueyoshi, Y. Kakuta, L. C. Pedersen, F. E. Wall, L. G. Pedersen and M. Negishi: *FEBS Lett.*, **433** (3), 211-214 (1998).
- 17) G. M. Sheldrick, Z. Dauter, K. S. Wilson, H. Hope and L. C. Sieker: *Acta Crystallogr.* **D49**, 18-23 (1993).
- 18) E. de la Fortelle and G. Bricogne: *Methods Enzymol.* **276**, 472-494 (1997).
- 19) R. Dajani, A. Cleasby, M. Neu, A. J. Wonacott, H. Jhoti, A. M. Hood, S. Modi, A. Hersey, J. Taskinen, R. M. Cooke, G. R. Manjee and M. W. Coughtrie: *J. Biol. Chem.* **274** (53) 37862-37868 (1999).
- 20) L. M. Bidwell, M. E. McManus, A. Gaedigk, Y. Kakuta, M. Negishi, L. C. Pedersen and J. L. Martin: *J. Mol. Biol.* **293** (3) 521-530 (1999).
- 21) L. C. Pedersen, E. V. Petrotchenko and M. Negishi: *FEBS Lett.*, **475**, 61-64 (2000).
- 22) E. V. Petrotchenko, M. E. Doerflein, Y. Kakuta, L. C. Pedersen and M. Negishi: *J. Biol. Chem.* **274** (42) 30019-30022 (1999).
- 23) P. J. Kraulis: *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950 (1991).
- 24) S. V. Evans: *J. Mol. Graphics* **11**, 134-138 (1993).
- 25) T. L. Bailey and C. Elkan: (1994) in Proceedings of the Second International Conference on Intelligent systems for Molecular Biology, 28-36, AAAI Press, Menlo Park, CA, USA.

プロフィール

角田佳充 Yoshimitsu KAKUTA
 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻
 Department of Biology, Graduate School of Science,
 Osaka University
 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1
 TEL. 06-6850-5422, FAX 06-6850-5425
 e-mail: kakuta@bio.sci.osaka-u.ac.jp
 最終学歴: 北海道大学大学院理学研究科高分子学
 専攻博士課程
 専門分野: 構造生物学
 現在の研究テーマ: 糖鎖に関する構造生物学

Lars C. Pedersen
 Laboratory of Reproductive and Developmental
 Toxicology, NIEHS, National Institutes of Health,
 Research Triangle Park, NC 27709 USA.
 e-mail: pederse2@niehs.nih.gov

根岸正彦 Masahiko Negishi
 Laboratory of Reproductive and Developmental
 Toxicology, NIEHS, National Institutes of Health,
 Research Triangle Park, NC 27709 USA.
 TEL. +1-919-541-2404, Fax: +1-919-541-0696;
 e-mail: negishi@niehs.nih.gov