銅含有アミン酸化酵素の翻訳後修飾トパキノン生成過程の時系列構造解析

関西学院大学理工学部 山口 宏, 金 美沙

Hiroshi YAMAGUCHI and Misa KIM: Time-Series Structural Studies of Topaquinone Biogenesis in Copper Containing Amine Oxidase

Copper-containing amine oxidase contains a covalently bound organic cofactor, 2, 4, 5-trihydroxyphenylalanine (topa) quinone, which is formed by post-translational modification of a specific tyrosine residue in the presence of copper ion and oxygen molecule. Apo-enzyme crystals were anaerobically soaked in the mother liquor that contains copper ion and were freeze-trapped to determine the initial structure of the biogenesis. In order to see the structures in the following stages, we started the reaction by exposing the copper-bound crystals to the air, and freeze-trapped them immediately, and also trapped long after the exposure. The structures of three distinct intermediates have been determined. The molecular mechanism of the topa quinone biogenesis will be discussed on the basis of these X-ray snapshots.

1. はじめに

X線構造解析法を用いた構造生物学的な研究において、静的なタンパク質構造を決定するだけでなく、実際にタンパク質が働いているときに、タンパク質自身や基質などがどのように構造変化を起こすかを調べ、タンパク質作用の過程における構造情報を得ることの重要性が強調されるようになってきた。この目的のため、種々の方法で作用過程を解析する試みがなされている。例えば、静的な構造解析の延長線上として、反応が中間状態で停止するように設計した変異型タンパク質を用いて構造解析を行うことや、中間体アナログを合成してタンパク質との複合体を作製し構造解析を行うことなどが考えられる。これらに加えて、最も直接的な手法としては、結晶中で酵素反応などの変化を実際に起こさせ、1つの結晶中で変化していく姿を時間分割的に構造解析することが挙げられる。また、同様に結晶中で変化を起こさせ、複数の結晶を用い、変化の開始から種々の時間を経た結晶の構造解析を行い、その構造をつなぎ合わせるにより擬似的な時間分割構造解析を行うこともできる。

これらの時間分割構造解析では、結晶中での反応の制御が必須であり、特に大切なことは反応をいかに同期して進行させるかである。多くの反応は多段階で進行するため、たとえ反応の開始が同期していたとしても、それぞれの段階での反応速度によって中間体の蓄積の度合いは異なり、種々の中間体構造のミクスチャーとなり、構造解析が困難となってしまう。一般には、律速段階のように反応速度が

遅い段階の前の中間体のみが蓄積し、そして観測されることになる。ミクスチャーになっている構造の数が少なく、分光学的手法などX線以外の方法でそれぞれの構造がほぼ確実に推定できるのであれば、その構造を基にデコンボリュートすることで、それぞれの構造の詳細を解析することが可能な場合も考えられる。

次に、結晶中での反応を同期させる問題を解決した後、どのようなデータ収集法を適応するかという問題点が残される。結晶中での反応の進行よりも十分に早い時間で、回折強度データを収集しなければならない。ごく短時間でのデータ収集が可能なラウエ法に注目が集まったこともあるが、白色X線を照射するため結晶のダメージが大きく、また結晶のモザイシティが小さくなくては良好な回折斑点を得ることはできない。すなわち、たとえ結晶性がよくとも、X線照射に耐えてモザイシティが増大せずにいくたびかの露光に耐え得る結晶でなければラウエ法を用いた時間分割解析を行うことができない。さらに、ラウエ法では、低分解能のデータが欠損するなど、解析精度などの問題もあり、微少な構造変化を追跡するためにはさらにいくつかの問題を克服することが必要であろう。

これに対して、結晶中での反応の進行が十分に遅ければ、ラウエ法を適用せずとも単色光を用いた高速のデータ収集を用いて時間分割構造解析が可能である。また、反応を実質上止めてしまうことができれば、単色光を用いてゆっくりとデータ収集することもできる。結晶中での反応は、溶液中での反応に比べて遅いことが一般的であり、温度を下げることによって、反応速度を低下させることが

できる。反応の種類によっては、液体窒素温度条件に結晶を移すことによって、反応を実質上停止させることが可能である。また、複数の基質を必要とする酵素反応であれば、必要な基質を除いておくことによって、その物質を必要とする一步手前の中間状態で反応を止めることも可能である。

今回、われわれがターゲットにしたタンパク質であるアミン酸化酵素の翻訳後修飾反応は、酸素と銅イオンがその進行に必要である。そこで、系から完全に酸素を除去した後に銅イオンを添加することによって、まず酸素依存の反応の直前の段階で反応を止め構造解析を行った。引き続いて、酸素を添加することによって、酸素依存の反応を進行させ、低温トラップをかけることによって反応進行に伴う構造変化の解析を試みた。この一連の構造解析の結果、翻訳後修飾過程における3つの反応中間体の構造を初めて明らかにすることができ、構造を基にして反応機構を詳細に議論することが可能になった。

2. 銅含有アミン酸化酵素

タンパク質中では、遺伝子情報としては通常のアミノ酸としてコードされているが、タンパク質の生合成の後に修飾を受けているアミノ酸も多い。これらの翻訳後修飾を受けたアミノ酸のうち、タンパク質中で補酵素として働いている例が見つかっている。FADやNADPHなど一般的な補酵素は、ほかで作られた後タンパク質に取り込まれる。これに対し、アミノ酸の翻訳後修飾によって誘導される補酵素は、遺伝子中に一般のアミノ酸としてコードされているので、最初からその前駆体がタンパク質中に存在することになる。このことから、これらの一連の補酵素をビルトイン補酵素と呼ぶ。今までに見つかっているビルトイン補酵素は、キノンを含むキノイド補酵素であり、銅含有アミン酸化酵素中の2, 4, 5-トリヒドロキシフェニルアラニルキノン(トパキノン, TPQ, 図1)¹⁾やリシン酸化酵素中のリシルチロシルキノン,²⁾キノプロテインアミン脱水素酵素中のトリプトファントリプトファンキノン³⁾やキノヘモアミン脱水素酵素中のシステイントリプトファンキノン^{4,5)}がある。ビルトイン補酵素に関しては、昨年の結晶学会誌に大阪市立大学の佐藤敦子氏と広津建教授がキノヘモアミン脱水素酵素の構造

解析について書かれた記事とクリスタリットに詳しく述べられているのでご参照願いたい。⁶⁾われわれは、これらの酵素のうち銅含有アミン酸化酵素を取り上げ、ビルトインキノイド補酵素であるトパキノンがチロシン残基からどのようにして生成するのかを明らかにするために翻訳後修飾過程の構造研究を行ってきた。

銅含有アミン酸化酵素は、バクテリア、植物、動物など種々の生物種にわたって広く存在しており、ヒスタミンやフェニルエチルアミンなど一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素である。生物種により生物学的役割は異なっていると考えられており、バクテリアでは、アミン類を窒素源として用いるためと考えられているが、高等動植物ではその生理的意義は詳しくは解明されていない。現在一次構造が明らかになっている銅含有アミン酸化酵素間のアミノ酸配列のホモロジーは、異なった生物種間ではあまり高くないが、銅に配位するヒスチジン残基やトパキノンに変換されるチロシン残基前後のアミノ酸残基は保存されており、NY (D/E) がトパキノン生成のためのコンセンサス配列であると考えられている。現在までに、大腸菌やエンドウ豆の芽生えなど数種の生物種由来のアミン酸化酵素の翻訳後修飾を受けた成熟体の構造が解析されている。^{7,8)}

土壌菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅含有アミン酸化酵素の1つであるフェニルエチルアミン酸化酵素 (AGAO) は、同一サブユニットからなる2量体構造をとり、各サブユニットは638アミノ酸残基からなる。本酵素の場合、Tyr382が翻訳後修飾を受けトパキノンに変換される(図1)。この翻訳後修飾は、ほかの触媒酵素を必要とせず、タンパク質がフォールディングした後に銅イオンと酸素が存在することにより自動的に進行することが示されている。¹⁰⁾つまり、まず銅もトパキノンも含まない前駆体の酵素が作られた後、銅が結合し、トパキノンが作られて活性型の酵素に変化する。このトパキノン自動生成過程のことをバイオジェネシスと呼ぶ。本酵素では、この銅もトパキノンも含まない前駆体をアポ型、銅とトパキノンを含む活性型をホロ型と呼ぶ。タンパク質中のトパキノンは480 nmに極大値をもつブロードな吸収を示し、その結果、ホロ型酵素は赤みがかった色を呈するが、アポ型や銅イオンが結合しているだけでは無色である。この吸収を目安に、トパキノンが生成しているか否かを見極めることができる。

3.1 AGAOの結晶構造と実験系の設計

本研究によるトパキノン生成過程の一連の構造変化を追跡することに先立って、われわれは、前駆体アポ型および活性ホロ型をそれぞれ構造解析し、両者の違いが金属結合部位近傍のみで観測されることを明らかにしていた。¹¹⁾

われわれは次の段階として、実際に構造変化を明らかにしてトパキノン生成機構を解明するために、時系列の構造解析に取り組むことにした。無酸素条件では、反応は銅イ

図1 アミン酸化酵素中のトパキノンのバイオジェネシス反応。(Topaquinone biogenesis in amine oxidase.)

オンが結合した初期中間体で止まるはずである。その後、酸素を系に加えてやれば、この初期中間体を出発として反応の同期が可能である。時間分割的な解析には、結晶中での反応の同期が最も重要であり、第2番目以降の中間体を観測するために初期中間体を出発として用いることができるのは非常に有利である。以下の項でわれわれの行った時系列構造解析¹²⁾について述べる。

3.2 試料調製および嫌気条件下での結晶化

実験を進めるにあたり、まず酸素を含まないアポ型結晶を得る必要があった。普通に結晶化させた結晶から酸素を除去することも検討したが、溶液状態で脱気するほうがより完全に無酸素条件を達成できると考えた。本酵素の結晶は、母液交換などに伴う浸透圧の変化にとっても弱く、結晶化は微量透析法によって行っていたが、無酸素条件で結晶を作製するにあたって、微量透析法での結晶化条件を確立していたことが非常に役に立った。結晶化に用いた試料は、菌体培養、酵素精製時にキレート剤を存在させ、金属イオンフリーにした状態で調製した前駆体アポ型酵素を用いた。結晶化のすべての操作は、真空グローブボックス中で真空引きとアルゴン充填を数回繰り返した後に行ったが、このグローブボックス中には、ピロガロールアルカリ溶液を入れたビーカーを内部に置いて残っている酸素を吸収させた。試料溶液は、真空引きを行い脱気した。透析外液は、真空引きを行った後、不純物として存在する酸素を除去するため、ピロガロールアルカリ溶液を通したアルゴンでバブリングを行ったものを用いた。以上のような方法で無酸素条件を達成した系において、10 mg/mlの前駆体アポ型溶液を微量透析セルに入れ、1.05 Mの酒石酸ナトリウムカリウム溶液に透析するようにセットし、容器を密閉した。この密閉容器を、一回り大きな密閉容器にピロガロールアルカリ溶液を入れたバイアルとともに入れてからグローブボックスより取り出し、インキュベータ中で20℃に保ち、目的の結晶を得た。

3.3 結晶中での反応の進行と中間体トラップ

同様の手法で無酸素条件にした10 mMの硫酸銅と45%のグリセロールを含んだ母液にアポ型結晶を透析セルごと移し、24時間20℃に保ち、アポ酵素に銅イオンが結合した初期中間体結晶を作製した。この結晶を、グローブボックス中において、液体CF₄中に瞬時にインジェクトすることによって冷却し、液体窒素温度で保存した(Bio-I-AGAO)。

次に、上記の手法で作製した初期中間体結晶を空気で飽和させた母液に移すことにより、酸素を必要とする反応を開始・進行させた。空気飽和の母液に移してから結晶を20℃に保ち、さまざまな反応進行段階で中間状態をトラップするため、1分から数時間の間で種々の時間を経過した後、100 Kの窒素気流を用いてフラッシュクーリングを行った。これらの結晶は顕微分光を行い、トパキノン生成の有無を確認した。これらの結晶の回折強度データ収集は、

図2 各結晶の顕微分光.(Single crystal microspectroscopy.)

SPring-8やPFを用いて行い、実際に構造解析計算を行った。最終的に、空気飽和の母液に移してから、10分間(Bio-2-AGAO)および100分間(Bio-3-AGAO)反応を進行させた結晶の構造解析を終了させた。さらに、空気飽和の母液中で3日間反応を進行させ、トパキノンが生成した480 nmに吸収を示す結晶の構造も解析した(Holo-AGAO)。

図2に、それぞれの結晶の顕微分光の結果を示す。Bio-1, 2, 3-AGAO結晶はどれも吸収を示さず、トパキノンがまだ生成していないことが確認できる。これに対し、Holo-AGAOでは、480 nmに吸収極大を示し、結晶中でトパキノンが生成していることを示している。

3.4 反応中間体の構造解析

Bio-1, 2, 3, およびHolo-AGAO結晶の回折強度データ収集は、SPring-8のBL44XUとBL44B2において、CCDカメラを用いて行った(表1)。構造解析は、室温で解析したホロ型の構造を基に分子置換法で行った。低温条件下では、結晶学的2回軸と分子の2回軸が一致せず、格子体積が室温での解析時の2倍になったため、室温型との比較を容易にするため、空間群を $I2$ ととり解析を行った。Bio-1-AGAOの構造解析は、室温で解析したホロ型分子モデルの382番をチロシンにした後、結晶学的2回軸で回転させて2量体分子を発生させ、剛体近似精密化、シミュレイトドアニーリング、原子位置、温度因子の精密化、マニュアルリビルディング、水分子の同定などを繰り返して精密化を進めた。その結果、3つのヒスチジン残基のイミダゾール窒素と前駆体チロシン残基の水酸基が四面体を作り、その中心部分に金属に相当する大きな電子密度が観測された。この電子密度中に銅原子を置いて精密化を進めた(図3a)。Schwartzらは、酵母由来酵素を用いた分光学的、速度論的研究より、酸素が存在しない場合、初期中間体構造においてチロシン残基は銅イオンに配位せず、酸素が存

表1 データ収集および構造精密化. (Data collection and structure refinement statistics.)

	Bio-1-AGAO	Bio-2-AGAO	Bio-3-AGAO	Holo-AGAO
データ収集				
X線源	SPring-8/BL44XU	BL44B2	BL44B2	BL44B2
波長/Å	0.7	0.7	0.7	0.7
検出器	OXFORD PX210	MAR CCD 165	MAR CCD 165	MAR CCD 165
温度/K	100	100	100	100
R_{merge}	0.081	0.073	0.077	0.044
独立反射数	140,354	65,490	120,950	98,905
完全性/%	98.7	81.3	98.2	99.7
空間群	$I2$	$I2$	$I2$	$I2$
格子定数				
$a/\text{\AA}$	157.9	157.8	157.0	158.0
$b/\text{\AA}$	63.2	63.1	62.9	63.2
$c/\text{\AA}$	184.3	183.5	182.9	184
$\beta/^\circ$	111.8	111.6	111.8	111.7
精密化				
分解能/Å	7.0–1.9	7.0–2.1	7.0–1.9	10.0–2.2
R	0.199	0.189	0.209	0.217
R_{free}	0.258	0.263	0.262	0.292

アホ型結晶の室温でのデータ収集時は、空間群 $C2$, $a=158.7$, $b=64.6$, $c=93.3$ Å, $\beta=112.3^\circ$

図3 382番残基のAnnealed Fo-Fc omit map [左]および2Fo-Fc map [右]と最終モデルとの重ね合わせ. a: Bio-1-AGAO, b: Bio-2-AGAO, c: Bio-3-AGAO, d: Holo-AGAO. (The final models superimposed on the annealed Fo-Fc omit maps of the Residue 382 (left) and superimposed on the 2Fo-Fc maps (right).)

在してはじめて配位するという報告を行っているが、¹³⁾ 今回の結果は、酸素が存在しなくても銅イオンは四面体配位構造をとるとことを示している。

Bio-2-, Bio-3-およびHolo-AGAOの精密化は、Bio-1-AGAOの水分子を除いた構造を初期モデルとして、382番の残基はチロシンのまま精密化を行った。Bio-1-AGAOと同様の手法で精密化を進めた後、382番のアミノ酸残基の化学種を慎重に検討した。Bio-2-AGAOでは、Fo-Fc図中に、チロシン残基と置いたC3位の近傍に 3σ レベルのピークが表れた。このピークはC3と共有結合距離にあり、トパキノン生成反応で最初に付加された酸素原子であると解釈した。この酸素原子が水酸基かカルボニル基かは、この分解能のX線解析では決定できないが、反応機構の考察よりドーパキノンであるとして構造の精密化を進め

た。Fo-Fc, 2Fo-Fc, アニールドオミットマップなど種々の電子密度図を比較検討して(図3b)、最終的にドーパキノンと前駆体チロシンが混ざっていると結論づけ、酸素の占有率が0.5であるとした。

Bio-3-AGAOでは、Fo-Fc図中にチロシン残基のC2位とC5位の近傍に 2.8σ レベルのピークが表れた。この部分に酸素原子を置くと、382番のアミノ酸はトパキノンもしくは、還元型トパキノンであるトパということになる。顕微分光の結果では、Bio-3-AGAOは480 nmに吸収を示さず、トパキノンが生成していないので、382番のアミノ酸の化学種はトパであるとして構造の精密化を進めた(図3c)。また、C2位の酸素原子は、Thr403の主鎖のカルボニル酸素と水素結合を形成していると考えられる距離にあり、この酸素原子が水酸基であることと矛盾しない。

Holo-AGAO に関しては、顕微分光の結果からトパキノンが生成していることが明らかであり、Bio-1-AGAO モデルの 382 番の氨基酸残基をトパキノンに変えて構造解析を行った。これまでの一連の構造はすべて、382 番の残基のチロシンの水酸基に相当する酸素原子は銅イオンのほうを向いていたが、Holo-AGAO では $C\alpha-C\beta$ 結合で回転し、トパキノン環は銅イオンから遠ざかるほうを向いていた。また、室温でのホロ型の解析時には、電子密度が曖昧で $C\beta-C\gamma$ での環の回転がわからなかったが、今回は決定することができた。しかし、電子密度はかなり低く、本質的に温度因子が大きいことを示していた (図 3d)。

4. トパキノン生成の反応機構について

今までは室温で構造解析したアポ型とホロ型酵素の構造および分光学的な実験データなどを基に反応機構を推定していたが、¹¹⁾ 今回新たに 3 つの中間体構造およびホロ型のトパキノン環の回転を明らかにすることができた。図 4 にこれらの構造を基に精密化した反応機構を示す。

まず、遺伝子情報を基に、382 番目がチロシンである前駆体アポ型タンパク質が作られる (図 4A)。このチロシン残基と金属が結合し得る 3 つのヒスチジン残基は分子の奥深くに存在し、トンネルのように長くのびた溶媒チャンネルによって分子表面とつながっている。このチャンネルの入り口は負電荷に富んでおり、効果的に銅イオンの取り込みを行っていると考えられる。この入り口付近に引きつけられた銅イオンは、チャンネルの内部が疎水性の壁でできているため、水和水を奪われて金属結合

部位に到達する。前駆体アポ型の構造では、3 つのヒスチジンのイミダゾール窒素と Tyr382 の水酸基が四面体の配位をとっており (図 4A)、銅イオンは、この中心に結合し、四面体の配位構造をとる (図 4B)。このときの銅イオンとチロシン残基の距離は、電荷移動を起こすほど近い距離ではなく ($\sim 2.5 \text{ \AA}$) チロシンラジカル^{14),15)} は生成しない。平面四配位構造をもつ 2 価の銅イオンは酸化還元電位が低い、配位構造の平面性が崩れていくに従い酸化還元電位が上昇するので、この配位環境では、銅イオンの酸化還元電位が上昇し、チロシン環から電子を吸引すると考えられる (図 4C、図 4D)。そして電子の欠乏した状態のチロシン環の C3 位を分子状酸素が攻撃し、Bio-2-AGAO の構造で示されたドーパキノンを生成する (図 4E)。次に、2 番目の酸素原子が結合し、Bio-3-AGAO の構造であるトパが生成するが、このときには、 $C\beta-C\gamma$ 間で約 180° の回転が必要である。この酸素原子は、溶媒の水に由来することがわかっているので、¹⁶⁾ まず溶媒の水から生じた水酸化物イオンが銅イオンに結合し中間体 F を形成する。この水酸化物イオンがドーパキノンを求核攻撃し、還元型トパキノンであるトパが生成する (図 4G)。最後のトパからトパキノンへの酸化過程において、 $C\alpha-C\beta$ で回転し、トパキノンが銅イオンから離れたコンフォメーションをとる。最終的に、3 つのヒスチジン残基と 1 つの水分子が銅イオンに平面配位し、さらに 1 つの水分子が軸配位し銅イオンはピラミッドの底面に位置している構造をとる。このときには、コンセンサス配列の Asn381 が生成したトパキノンの背後に存在するが、Asn381 の役割はトパキノン環のこのコン

図4 中間体構造を基にした反応機構。(Refined mechanism of topa quinone biogenesis.)

フォメーションの安定化であると考えられる。銅イオンは、配位構造を変化させ、自身の酸化還元電位を変化させながら反応物の活性化を行うだけでなく、反応物の位置関係、すなわち、酸素もしくは過酸化水素、水や水酸化物イオン、チロシンや各中間体、さらにはトパキノンの位置を規定するためにも重要な役割を担っているといえる。

5. おわりに

今回の研究では、アミン酸化酵素のアポ型・ホロ型両者の立体構造をふまえて、チロシン残基からトパキノンへの翻訳後修飾過程の構造変化を明らかにすることができた。第1の中間体の構造が四面体配位構造であることや、ほかの手法で確認できなかったドーパキノンの構造などを確認することができ、立体構造を基にして詳細にトパキノン生成の過程について議論をすることができた。キノノイドビルトイン補酵素を含むタンパク質以外にも、翻訳後修飾を受けるタンパク質が次々と見つかり、ポストゲノム研究のなかで、翻訳後修飾によるタンパク質の成熟過程の研究や、その修飾の意義の研究などもさらに重要になっていくものと考えられる。

今回示したように、直接中間体構造を明らかにすることは、アミノ酸側鎖の動きを明らかにしたり、反応機構を解明したりするうえで大きなアドバンテージである。そのためポストゲノム時代において、翻訳後修飾過程に限らず、タンパク質の作用機構の研究を行ううえで、時間分割的な構造変化の解析や中間体構造解析など作用中の構造情報の取得の必要性はますます増してくるものと考えられる。目的とする系の反応の速度や結晶の性質によって、ラウエ法や低温トラップ法など構造解析手法を駆使してこれらの情報を得、機能解析に結びつけることが今後さらに期待されることになろう。

本研究は、大阪大学産業科学研究所の谷澤克行先生、岡島俊秀先生、関西学院大学理工学部を今年定年退職された河盛阿佐子先生との共同研究として遂行してきたものである。また、アポ型酵素とホロ型酵素の構造決定は、オーストラリア、シドニー大学のFreeman先生、Guss先生らとの共同研究である。最後に、結晶の顕微分光でお世話になった、理化学研究所播磨研究所の足立伸一博士にこの場を借りてお礼を述べたい。

文 献

- 1) S. M. Janes, D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame and J. P. Klinman: *Science* **248**, 981 (1990).
- 2) S. X. Wang, M. Mure, K. F. Medzhradszky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan and J. P. Klinman: *Science* **273**, 1078 (1996).
- 3) W. S. McIntire, D. E. Wemmer, A. Chistoserdov and M. E. Lidstrom: *Science* **252**, 817 (1991).
- 4) S. Datta, Y. Mori, K. Takagi, K. Kawaguchi, Z. W. Chen, T.

- Okajima, S. Kuroda, T. Ikeda, K. Kano, K. Tanizawa and F. S. Mathews: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14268 (2001).
- 5) A. Satoh, J. K. Kim, I. Miyahara, B. Devreese, I. Vandenberghe, A. Hacisalihoglu, T. Okajima, S. Kuroda, O. Adachi, J. A. Duine, J. Van Beeumen, K. Tanizawa and K. Hirotsu: *J. Biol. Chem.* **277**, 2830 (2002).
- 6) 佐藤敦子, 広津 建: 日本結晶学会誌 **44**, 176 (2002).
- 7) M. R. Parsons, M. A. Convery, C. M. Wilmot, K. D. Yadav, V. Blakeley, A. S. Corner, S. E. Phillips, M. J. McPherson, P. F. Knowles: *Structure* **3**, 1171 (1995).
- 8) V. Kumar, D. M. Dooley, H. C. Freeman, J. M. Guss, I. Harvey, M. A. McGuirl, M. C. Wilce and V. M. Zubak: *Structure* **4**, 943 (1996).
- 9) R. Li, J. P. Klinman and F. S. Mathews: *Structure* **6**, 293 (1998).
- 10) R. Matsuzaki, T. Fukui, H. Sato, Y. Ozaki and K. Tanizawa: *FEBS Lett.* **351**, 360 (1994).
- 11) M. C. Wilce, D. M. Dooley, H. C. Freeman, J. M. Guss, H. Matsunami, W. S. McIntire, C. E. Ruggiero, K. Tanizawa and H. Yamaguchi: *Biochemistry* **36**, 16116 (1997).
- 12) M. Kim, T. Okajima, S. Kishishita, M. Yoshimura, A. Kawamori, K. Tanizawa and H. Yamaguchi: *Nature Struct. Biol.* **9**, 591 (2002).
- 13) B. Schwartz, A. K. Olgin, J. P. Klinman: *Biochemistry* **40**, 2954 (2001).
- 14) R. Matsuzaki, S. Suzuki, K. Yamaguchi, T. Fukui and K. Tanizawa: *Biochemistry* **34**, 4524 (1995).
- 15) C. E. Ruggiero, J. A. Smith, K. Tanizawa and D. M. Dooley: *Biochemistry* **36**, 1953 (1997).
- 16) N. Nakamura, R. Matsuzaki, Y. H. Choi, K. Tanizawa and J. Sanders-Loehr: *J. Biol. Chem.* **271**, 4718 (1996).

プロフィール

山口 宏 Hiroshi YAMAGUCHI
 関西学院大学理工学部
 School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University
 〒669-1337 三田市学園2-1
 Gakuen 2-1, Sanda, Hyogo 669-1337, JAPAN
 TEL. 079-565-8576, FAX. 079-565-9077
 e-mail: hiroshi@kwansei.ac.jp
 最終学歴: 大阪大学大学院理学研究科博士後期課程
 専門分野: タンパク質結晶学, 構造生物学
 現在の研究テーマ: タンパク質成熟過程の構造生物学, タンパク質の構造機能相関

金 美沙 Misa KIM
 理化学研究所播磨研究所
 RIKEN HARIMA Institute
 〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都1丁目1-1
 Koto 1-1-1, Mikazuki-cho, Sayo, Hyogo 679-5148, JAPAN
 TEL. 0791-58-2817, FAX. 0791-58-2818
 e-mail: kimmisa@sp8sun.spring8.or.jp
 最終学歴: 関西学院大学大学院理学研究科博士後期課程
 専門分野: タンパク質結晶学, 構造生物学
 現在の研究テーマ: タンパク質の構造解析, タンパク質の反応中間体結晶構造を基盤とした触媒反応機構解析