

11月27日(金)フラッシュトークⅠ (13:00~14:50)

13:00~14:50 フラッシュトーク (C会場)

12:45~13:00 接続テスト

13:00~13:50 座長：藤間 祥子 (奈良先端科学技術大学院大学)

FC-I-01 * NZ-1ラベリングによる立体構造解析の一般化に向けたPAタグ挿入方法の最適化

○有賀理江・田村梨沙子・浴本享・廣瀬未果・大井里香・金子美華・加藤幸成・岩崎憲治・池口満徳・禾晃和
(横浜市大院生命医・阪大蛋白研・東北大院医・筑波大生存ダイナミクス・理研科技ハブ)

FC-I-02 * Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase PM α の立体構造解析

○大倉和貴・森真司・伊藤和央・米澤健人・清水伸隆・神谷信夫・宮原郁子
(大阪市大院理物質分子・大阪市大理生物地球・KEK 物構研・大阪市大人工光合成セ)

FC-I-03 * 非KIM型ERK2アロステリック阻害剤の作用機構の解明

○吉田茉由・森悠里花・木下誉富 (大阪府大院理)

FC-I-04 * 結晶構造とシミュレーションで解明する マウス由来IFN α とSortilinの相互作用様式

○渡邊ほのか・和田俊樹・海野昌喜 (茨城大院理工・茨城大iFRC・金沢医科大免疫学)

FC-I-05 * *T. brucei*由来酢酸:コハク酸CoA転移酵素のX線結晶構造解析

○倉沢花・嶋川夏帆・望月恒太・稲岡健ダニエル・原田繁・北潔・志波智生
(京工織大応生・長大熱研・長大熱医 グローバルヘルス・東大院医)

13:50~14:00 接続テスト

14:00~14:50 座長：沼本 修孝 (東京医科歯科大学)

FC-I-06 * 熱帯熱マalaria原虫由来ジヒドロオロト酸脱水素酵素の阻害剤開発に向けた構造生物学的研究

○大隅有紀子・天岡皓佑・松井洋樹・望月恒太・稲岡健ダニエル・原田繁春・北潔・志波智生
(京都工織大応用生物・長大熱研・長大院熱医 グローバルヘルス・東大院医)

FC-I-07 * サリドマイドの水酸化代謝物によるIMiD選択性の構造基盤

○降旗 大岳・山中 聡士・本田 敏章・柴田 哲男・田之倉 優・澤崎 達也・宮川 拓也
(東大院農生科・愛媛大PROS・名工大院工)

FC-I-08 * *Trypanosoma brucei* 由来イソクエン酸脱水素酵素D252N変異体の構造

○大谷百華・新井夏実・松城駿・王新穎・稲岡 健ダニエル・原田繁春・北潔・志波智生
(京工織大 応生・長大 熱研・長大院熱医 グローバルヘルス・東大院医)

FC-I-09 * シグナル伝達受容体Plexin B1と難溶性ペプチド挿入タンパク質の複合体結晶構造から明らかになった活性化構造モデル

○中村希・松永幸子・Nasir K. Bashiruddin・山下恵太郎・平田邦生・山本雅貴・菅裕明・高木淳一
(阪大蛋白研・東大院理・理研/SPring-8 Center)

FC-I-10 * 赤痢アメーバ由来グリセロールキナーゼの結晶構造

○千島卓・松城駿・E.O. Balogun・G. Jeelani・原田繁春・野崎智義・志波智生 (京工織大院応生・東大院医・生物医化学)

FC-I-01

NZ-1 ラベリングによる立体構造解析の一般化に向けた PA タグ挿入方法の最適化

○有賀 理江¹, 田村 梨沙子¹, 浴本 亨¹, 廣瀬 未果²,

大井 里香¹, 金子 美華³, 加藤 幸成³, 岩崎 憲治⁴, 池口満徳^{1,5}, 禾 晃和¹

(¹横浜市大・生命医, ²阪大・蛋白研, ³東北大・医, ⁴筑波大・生存ダイナミクス, ⁵理研・科技ハブ)

標的タンパク質に抗体断片を結合させる抗体ラベリング法は、立体構造解析を効率化する有用な手法の一つである。X線結晶構造解析では、抗体断片が標的タンパク質の結晶化を促進することが知られている一方、低分子量タンパク質の構造決定が困難だとされるクライオ電子顕微鏡単粒子解析では、抗体断片は標的の粒子サイズを増大させ、配向の推定に役立つと期待される。しかし、抗体ラベリング法を適用するためには、まず標的に対する抗体を取得することが前提となる。我々は、このように制約のある抗体ラベリング法の適用範囲を広げるため、既存の抗体のエピトープを標的に挿入し、抗体断片を結合させる方法を検討してきた。

抗体ラベリングへの応用を試みた抗体は、ラット由来のモノクローナル抗体 NZ-1 である。NZ-1 はヒトポドプラニンの 14 残基の部分配列 PA14 を免疫して得られた抗

体で、C 末端側の 12 残基分の PA12 にも高い親和性を示す。さらに、エピトープペプチドとの共結晶構造解析から、NZ-1 はループ状の構造を形成した PA12 と結合することも明らかになっている。先行研究では、モデルとなる標的タンパク質のループ領域に PA12 を挿入し、NZ-1 Fab と安定な複合体が形成されることを示した。しかし、結合に伴い、PA12 の末端間が引き離されるため、標的の構造変化が避けられないことも明らかになった。そこで本研究では、標的タンパク質の構造変化を抑えた状態で NZ-1 Fab が結合するよう、挿入配列の改変を行った。PA12 の N 末端に 2 残基付加した PA14 を標的タンパク質のループ領域に挿入した変異体を作製し、NZ-1 Fab との共結晶構造を解析することで挿入部位の最適化を行った。最適化された複合体については、分子動力学計算によって分子間相互作用や構造安定性の評価を行った。

FC-I-02

Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase PM α の立体構造解析

○大倉和貴¹, 森真司², 伊藤和央², 米澤健人³, 清水伸隆³,
神谷信夫^{1,4}, 宮原郁子¹

(1 大阪市大院理・物質分子, 2 大阪市大院理・生物地球, 3 KEK 物構研, 4 大阪市大・人工光合成セ)

我々は、*P. melaninogenica* の産出する酵素である Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase PM α (Endo-PM α) を、大腸菌組み換え体として発現、精製し諸性質を調べたところ、native な糖タンパク質から複合型糖鎖を遊離するのに対し、ハイマンノース型やハイブリッド型糖鎖は遊離しないことを明らかにした。さらに、本酵素は糖鎖転移活性を示し、複合型糖鎖の転移導入に有用であることが分かった。Endo-PM α は、全長 1009 アミノ酸残基で糖質加水分解酵素 (GH) のファミリー 85 に分類されるが、C 末端側 700-1009 残基の領域は他の酵素と相同性を持たない。本研究では、Endo-PM α の立体構造を原子レベルで明らかにすることにより、糖鎖の認識機構の解明を目指す。

ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化を行ったところ、緩衝剤に Bis-Tris、沈殿剤に硫酸アンモニウムを用いた条件で結晶が析出した。得られた結晶でマイクロレーディングを行うことにより、0.4 x 0.2 x 0.02 mm 程

度の板状の単結晶が再現性よく得られた。位相決定は、セレノメチオニン置換体による SAD 法で行い、最終的に、2.1 Å 分解能で N 末端の膜貫通ドメインを除く 28~1008 残基を含むモデルを構築することが出来た (図 1)。全体構造は 5 つのドメインから構成されている。N 末端側より、GH85 ファミリーに共通な触媒ドメイン、 β シートからなるドメイン 1、ドメイン 2 が存在する。さらに、 β シートで構成される新規なドメイン 3、外膜への輸送配列で構成されるドメイン 4 が存在する。触媒ドメインとドメイン 1, 2 は GH85 ファミリーに属する Endo-A や Endo-D と共通する構造であった。

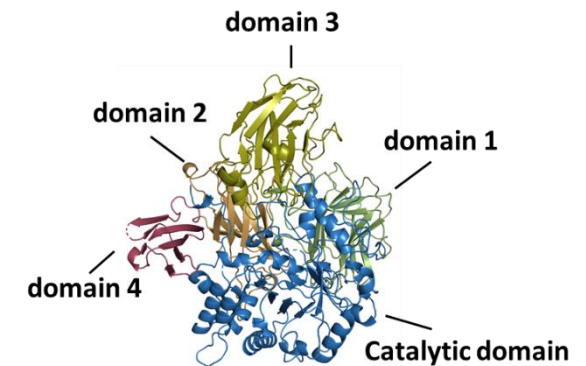


図 1. Endo-PM α の全体構造

非 KIM 型 ERK2 アロステリック阻害剤の作用機構の解明

○吉田 茉由、森 悠里花、木下 誉富
(大阪府大院理)

ERK2 は下流のキナーゼや転写因子のリン酸化を介して生理的調節を行うセリン・トレオニンキナーゼである。その基質のひとつ、転写因子 STAT3 は他のキナーゼによるリン酸化により活性化され、糖新生系酵素群の遺伝子発現を抑制する。ERK2 によるリン酸化は STAT3 の活性化を阻害する。したがって、STAT3 の ERK2 によるリン酸化を阻害することで糖新生が抑制され、2 型糖尿病の治療効果が期待できる。キナーゼの高選択性 ATP 拮抗阻害剤を創出することは難しい。そこで、アロステリックに作用する ATP 非拮抗阻害剤の創出を目指した。ERK2 は基質と相互作用する際に、リン酸化サイト（リン酸化を受けるとする部位）のほかに KIM サイトでのアロステリック相互作用が重要となる。KIM サイトは ERK2 に特有であるため、KIM サイトを標的とした阻害剤は高選択性が期待できる。我々はコンセンサス配列情報から KIM サイトに結合する STAT3 由来のペプチド阻害剤 (PEP) を設計した。PEP は 2 型糖尿病マウスに対して効果を示す。さ

らにインシリコスクリーニングによって KIM サイトに結合する非ペプチド型低分子阻害剤を見出した。これらの化合物の多くは PEP と競合する、つまり、KIM サイトに結合することが確認された。ところが、Hit-3 は PEP に対して非競合、すなわち非 KIM 結合型であることがわかった。今回、Hit-3 の阻害機構を解明することを目的とし、ERK2 との複合体について X 線結晶構造解析を行った。

大型放射光実験施設 SPring-8 の BL44XU において X 線回折測定を行い、2.25 Å 分解能のデータを取得した。XDS を用いて回折データの指数づけと積分、スケーリングを行った。既知の ERK2 の構造モデル (PDB code = 4qp1) を用いた分子置換法により初期位相を決定した。Coot / PHENIX を用いて構造の細密化を行った。その結果、Hit-3 は KIM サイトではなくリン酸化サイト付近に結合していることがわかった。このことは PEP との結合競合実験で得られた結果と一致する。非 KIM 型という新たなアロステリック阻害剤の創出に期待が高まる。

FC-I-04

結晶構造とシミュレーションで解明する マウス由来 IFN α と Sortilin の相互作用様式

○渡邊 ほか^{1,2}、和田 俊樹³、海野 昌喜^{1,2}
(¹茨城大院理工、²茨城大 iFRC、³金沢医科大免疫学)

抗ウイルス免疫に関与する形質細胞様樹状細胞 (pDC) の過剰反応によるインターフェロン(IFN) α の異常な分泌は、自己免疫疾患の増悪化に影響する。近年、pDC における IFN α 分泌に関わる分子として Sortilin が同定され¹、Sortilin の pH 依存性二量体化がサイトカイン輸送活性に重要であることが明らかにされた²。我々はこれまでにマウス由来の Sortilin 及び IFN α それぞれの結晶構造解析に成功したが、単量体-二量体の pH 依存的構造変化や IFN α の分泌機構との相関には不明な点が残る。そこで、本研究では Sortilin-IFN α 複合体の X 線結晶構造解析とシミュレーションによって相互作用様式を原子レベルで解明することを目的としている。

酸性条件下で得られ、電気泳動により複合体であると示唆された結晶を基に結晶化条件を精密化し、3.0 Å 程度の X 線回折強度データを収集することが出来た。

しかし、構造解析の結果、ほぼ同一条件下で Sortilin と IFN α がそれぞれ単独で結晶化していることが明らかになった。複合体構造が得られていない為、並行してドッキングシミュレーションにより Sortilin と IFN α の相互作用部位の予測を試みた。その結果、IFN α は二量体 Sortilin とは相互作用しにくく、単量体 Sortilin と相互作用することが示唆され、IFN α の相互作用残基を推定することが出来た。今後は、引き続き Sortilin-IFN α 複合体の結晶構造解明を目指すと共に、部位特異的変異体を用いた相互作用解析を行う。

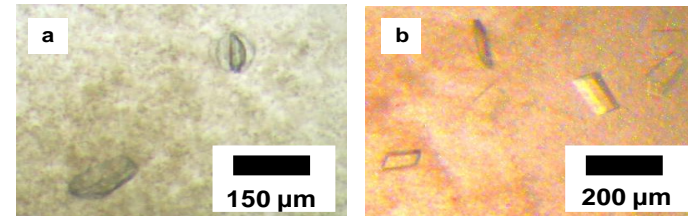


図: Sortilin, IFN α 共存下で得られた(a)Sortilin, (b)IFN α の結晶

1. Yabe-Wada T. et al., *Sci., Rep* 6, 26566 (2016)
2. Yabe-Wada T., et al., *FEBS Lett* 592, 2647–2657 (2018)

FC-I-05

T. brucei 由来酢酸:コハク酸 CoA 転移酵素の X 線結晶構造解析

○倉沢花¹、嶋川夏帆¹、

望月恒太²、稲岡健ダニエル^{2,3,4}、原田繁春¹、北潔^{2,3,4}、志波智生¹

(¹京工繊大応生、²長大熱研、³長大熱医・グローバルヘルス、⁴東大院医)

アフリカ睡眠病は *Trypanosoma brucei* という寄生原虫を病原体とするアフリカのサハラ以南における風土病である。感染後症状が進行すると死に至るが、現在使われている治療薬は副作用のリスクが大きいことからあらたな治療薬の開発が求められている。

T. brucei 由来酢酸:コハク酸 CoA 転移酵素は (TbASCT) は、ミトコンドリアにおいてスクシニル CoA 合成酵素 (SCS) と共に ASCT/SCS サイクルを形成し ATP を生産する。*T. brucei* のミトコンドリアでは、電子伝達系が消失しており ATP 生産は ASCT/SCS サイクルによる基質レベルのリン酸化に依存している^[1]ことが示唆されている。本研究はアフリカ睡眠病の創薬ターゲットとして TbASCT に着目し立体構造を明らかにした。

野生型 TbASCT を大腸菌 BL21Star(DE3) に形質転換し大量発現させた。精製は Ni-NTA カラムを用い、高純度の精製 TbASCT を得た。結晶化はハンギングドロップ蒸気

拡散法で行い、リガンドフリー TbASCT の結晶構造を 52% のアミノ酸相同性をもつヒトスクシニル-CoA : 3-ケト酸 CoA 転移酵素 (HsSCOT) をモデル分子とした分子置換法で 2.01 Å の分解能で決定した。構造を SCOT と比較したところ、SCOT は 2 量体であるのに対し、TbASCT は 4 量体からなり、SCOT と同様に E160 と R162 が静電的相互作用し 2 量体を形成するのに加え、2 量体の間で R162 が π - π 相互作用を形成していた。また、その付近で T161 同士が水素結合していた。この T161 は SCOT ではバリンであり水素結合は見られず、この水素結合によって R162 の π - π 相互作用が安定化されていると考えられる。



図 TbASCT 全体構造

[1]Mochizuki *et al.*, 2020. *BBA Bioenergetics*, 1861, 148283.

FC-I-06

熱帯熱マラリア原虫由来ジヒドロオロト酸脱水素酵素 の阻害剤開発に向けた構造生物学的研究

○大隅有紀子¹・天岡皓佑¹・松井洋樹¹・望月恒太²・稲岡健ダニエル^{2,3,4}・原田繁春¹・北潔^{2,3,4}・志波智生¹
(¹京都工繊大応用生物、²長大熱研、³長大院熱医・グローバルヘルス、⁴東大院医)

ジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)はピリミジン *de novo* 合成経路の中間代謝物であるジヒドロオロト酸を酸化し、共役してユビキノンに電子を伝達する酵素である。ヒトを含む哺乳類はピリミジンを *de novo* 合成経路およびサルベージ経路の二経路で得ることができる。しかし、固形系の癌細胞等においては血管新生が未発達なため、サルベージ経路の前駆体が供給されず、*de novo* 合成経路に依存している。また、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) やピロリ菌などの感染症病原体においては、サルベージ経路の遺伝子群が保存されておらず、ピリミジンを *de novo* 合成経路に依存している。このため、DHODH の活性阻害はピリミジン合成の抑制を引き起こし、これらの細胞にとって致命的である。したがって、DHODH は抗マラリア薬や抗がん剤の標的タンパク質として注目されている。

本研究では薬剤開発のための構造解析を目指して *P.*

falciparum 由来 DHODH (PfDHODH) の精製・結晶化を行い、再現性良く単結晶を得ることができた (図)。

得られた結晶を用いて、SPring-8 BL44XU で X 線回折強度データを収集し、分解能 4.2 Å のデータを得た ($R_{\text{merge}} = 11.9\%$)。アミノ酸の同一性 = 35% のヒト由来 DHODH (HsDHODH) をモデル分子として用いた分子置換法で構造を決定した ($R_{\text{work}} / R_{\text{free}} = 17.9 / 27.2\%$)。

PfDHODH と HsDHODH の構造の比較を行ったところ、全体構造は類似していたが、ユビキノンまたは阻害剤が結合する部位は異なっていた。今後、薬剤開発を進めるために、さらに詳細な構造を決定する予定である。

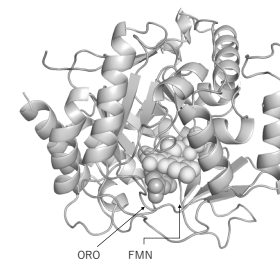
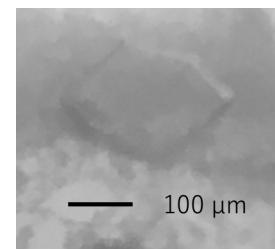


図 1. (右)タンパク質の結晶、(左)全体構造

FC-I-07

サリドマイドの水酸化代謝物による IMiD 選択性の構造基盤

○降旗 大岳¹、山中 聡士²、本田 敏章³、柴田 哲男³、田之倉 優¹、
澤崎 達也²、宮川 拓也¹
(¹東大院農生科、²愛媛大 PROS、³名工大院工)

サリドマイド (Thal) は、催奇性などの副作用を示すものの、免疫調節薬 (IMiD) として再発難治性の多発性骨髄腫の治療に使用されている。Thal の生体内における受容体 CRBN は E3 ユビキチンリガーゼの構成要素の 1 つであり、Thal 依存的に標的タンパク質 (ネオ基質) を結合して分解に導く。C2H2 ZF 型転写因子の SALL4 と IKZF1 が Thal による催奇性と免疫調節作用にそれぞれ関わるが、最近、生体内で Thal のフタルイミド環の 5 位が水酸化された代謝物 (5HT) が SALL4 の分解のみを引き起こすことが見出された。本研究では、ネオ基質に対する Thal の選択性が体内代謝で変化する仕組みに着目し解析を行った。

Thal と 5HT は鏡像異性体 (*R* 体及び *S* 体) をとるため、まず各鏡像異性体が SALL4 と CRBN の相互作用を誘導する効果を評価したところ、*S* 体が低濃度で作用することが示された。次に *S* 体の Thal 及び 5HT の存在下で

SALL4 の 2 番目の zinc finger ドメイン (ZF2) と CRBN のサリドマイド結合ドメイン (TBD) の複合体を形成させ、それらの立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。その結果、どちらの化合物も SALL4 ZF2 と CRBN TBD をつなぎとめる“分子のり”の役割を果たしていた。複合体構造において、Thal と 5HT の結合位置は同じであったが、5HT の 5 位水酸基が CRBN TBD と水を介した水素結合を形成し、複合体形成を促進する要因であることがわかった。一方、5HT の 5 位水酸基は複合体構造中で SALL4 ZF2 の β ヘアピンの 2 番目 (P2) と 9 番目 (P9) のアミノ酸残基の近くに位置しており、IKZF1 ではこれら残基の種類が異なることが見出された。実際に SALL4 と IKZF1 の残基を入れ替えると 5HT は SALL4 ではなく IKZF1 に作用できるようになり、特に P2 がネオ基質に対する 5HT の選択性の鍵となる構造であることが明らかになった。

FC-I-08

Trypanosoma brucei 由来イソクエン酸脱水素酵素 D252N 変異体の構造

○大谷百華¹、新井夏実¹、松城駿¹、王新穎^{2,4}、稲岡健ダニエル^{2,3,4}、
原田繁春¹、北潔^{2,3,4}、志波智生¹

(¹京工織大応生、²長大熱研、³長大院熱医・グローバルヘルス、⁴東大院医)

イソクエン酸脱水素酵素(IDH)はイソクエン酸(ICT)から α -ケトグルタル酸(α -KG)への反応を触媒する酵素で、TCA回路を構成する酵素のひとつである。アフリカトリパノソーマ症を引き起こす *Trypanosoma brucei* はミトコンドリアとグリコソーム(解糖系反応が進行する細胞小器官)内に IDH が存在する。しかし、TCA回路が機能していないため、主にグリコソーム内の IDH(TbIDHg)がイソクエン酸を代謝しており、また他種の IDH と違って NADP⁺と NAD⁺の両方を補酵素として利用する。本研究では活性部位付近に存在する D252 を変異させた D252N 変異体と NADP⁺または NAD⁺との複合体の結晶を共結晶化で作成した。得られた結晶を放射光で X線回折強度データを収集して、それぞれ、分解能 1.41 Å と 2.00 Å で決定した。

両方の複合体は、共結晶で用いた生成物 α -KG は結合しておらず、活性部位が開いた不活性型のコンフォメーションをとっていた。また、NADPH 複合体はカ

ルシウムイオンと結合していたが、NADH 複合体ではその結合は見られなかった。

一方、TbIDHg^{D252N}_NADP⁺-ICT (イソクエン酸) 複合体(分解能=1.80 Å)は、活性部位が閉じた活性型コンフォメーションをとっており、カルシウムイオンに配位した ICT の明瞭な電子密度を確認することができた。ICT の結合に関しては、Thr77, Ser94, Asn96, Arg100, Arg132, Asp274 などの多くのアミノ酸残基と相互作用していた。また、カルシウムイオンは、Asp274, 隣の分子の Asp251 と ICT の酸素原子 2 つと 3 つの水分子が配位した 7 配位の構造をとっていた。

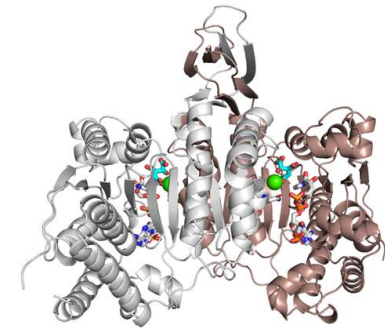


図 1.

TbIDHg^{D252N}_NADP⁺_ICT
複合体の全体構造

FC-I-09

シグナル伝達受容体 Plexin B1 と難溶性ペプチド挿入タンパク質の複合体結晶構造から明らかになった活性化構造モデル

○中村 希¹、松永 幸子¹、Nasir K. Bashiruddin²、山下 恵太郎³、
平田 邦生³、山本 雅貴³、菅 裕明²、高木 淳一¹
(¹阪大蛋白研、²東大院理、³理研/SPring-8 Center)

神経軸索伸長ガイダンス因子として発見された Semaphorin 4D (Sema4D) とその受容体 Plexin B1 (PlxnB1) を介したシグナル伝達は、様々な細胞の分化や組織の形態形成に重要な役割を果たしている。いずれも一回膜貫通型タンパク質として細胞膜上に発現し、両者の細胞外領域にある Sema ドメイン同士が結合して 2:2 複合体を形成する。この細胞外領域の相互作用により、PlxnB1 の細胞内 GTPase-活性化タンパク質(GAP)ドメインが活性化され、細胞形態や移動行動が劇的に変化する。この活性化には PlxnB1 の二量体化が必須だと考えられているが、特定の二量体構造が必要かどうかは不明である。

我々は PlxnB1 細胞外領域に結合する環状ペプチドを複数取得しており、それらを二量体化させると PlxnB1 の活性化を引き起こすものがあることを発見した。そこで、これらのペプチドと PlxnB1 の複合体結晶構造解析を目

指したが、ペプチドの難溶性のため結晶化が困難であった。溶解度を高めるために小型タンパク質にペプチド配列を挿入した人工タンパク質を作製したところ、PlxnB1 との複合体微小結晶を得て、マイクロビーム X 線を用いることで構造を決定することができた。興味深いことに、PlxnB1 の Sema ドメインに対する結合部位は、活性化作用をもつペプチドと持たないペプチドとでは正反対の位置にあり、天然のリガンドである Sema4D の結合部位とも異なっていた。さらに、得られた構造情報を用いて、PlxnB1 の二量体構造をモデリングしたところ、PlxnB1 は活性化作用を持つ二量体環状ペプチドにより二量体化が誘導され、Sema4D との複合体形成時と同じような二量体構造をとり得ることがわかった。以上の知見より、PlxnB1 のシグナル伝達には特定の配向で二量体化することが必要であることが示された。

FC-I-10

赤痢アメーバ由来グリセロールキナーゼの結晶構造

○千島卓¹, 松城駿¹, E.O. Balogun², G. Jeelani², 原田繁春¹,
野崎智義², 志波智生¹
(¹京工織大・院・応生, ²東大院・医・生物医化学)

アメーバ症は、寄生性原虫である赤痢アメーバによって引き起こされる。衛生環境の悪い発展途上国を中心に世界中で流行しており、推定5000万人が感染、毎年約5-10万人が亡くなっている。赤痢アメーバ由来グリセロールキナーゼ (EhGK) は、ATPのリン酸基をグリセロールに転移してADPとグリセロール-3-リン酸を生成する正反応だけでなく、逆反応も効率よく触媒することができる。この逆反応によって、赤痢アメーバはATP合成の低下を引き止めていると考えられる。本研究では、EhGKの触媒機構を明らかにするため結晶構造を決定した。

PEG3350を結晶剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で得た結晶を、基質等を含む溶液に浸して複合体結晶を調製、液体窒素温度で凍結し、大型放射光実験施設 (SPring-8) でX線回析強度データを収集して、トリパノソーマ由来GKをモデル分子(アミノ酸の相同性=38%)にした分子置換法で複合体構造を決定した。

EhGKの活性部位に、ADPが結合した構造を、分解能1.6Å、ADP結合部位とほぼ同じ位置にATPの非加水分解アナログであるAMPPNPが結合した構造を1.8Åで決定した。ADPのEhGKへの結合様式は、黄色ブドウ球菌由来GKに対するADPのそれとほぼ同じであった。すなわちADPはThr11, Thr12, Thr263, Gly306, Arg402と水素結合を形成し、アデニン環が疎水性残基Tyr321, Gly399, Val400と相互作用をしていた。

また、得られた複合体構造から、EhGK反応機構の考察が可能となった。



図. EhGK/ADPの結晶構造