

Ustilago sphaerogena 由来リボ核酸分解酵素 RNase U₂ の

立体構造のX線結晶構造解析による研究

野口 修 治

Ustilago sphaerogena 由来リボ核酸分解酵素 RNase U₂ の
立体構造のX線結晶構造解析による研究

野口 修治

目次	
1 序	7
2 方法	13
2-1 RNase U_2 の精製	13
2-1-1 <i>Ustilago sphaerogena</i> の培養	13
2-1-2 精製	14
2-2 RNase U_2 の結晶化	18
2-3 RNase U_2 結晶の回折強度測定	25
2-4 結晶構造決定と結晶学的構造精密化	28
2-4-1 II型 RNase U_2 結晶の構造決定と構造精密化	28
2-4-2 III、IV、V、VI、VII及びVIII型 RNase U_2 結晶の構造決定と構造精密化	36
3 結果	37
3-1 RNase U_2 一次構造の修正	37
3-2 異常分散効果を用了結晶構造の検討	39
3-3 RNase U_2 の全体構造	45
3-4 結晶構造に共通に存在する水分子	58
3-5 II型結晶 isoaspartate 45 の構造	61
3-6 RNase U_2 と 3'-AMP の相互作用	68
3-7 RNase U_2 と 2'-AMP 及び カルシウムイオンとの相互作用	79
3-8 触媒部位の構造と比較	90
4 考察	103
4-1 RNase U_2 の全体構造	103
4-2 RNA 加水分解反応機構	108
4-3 RNase U_2 の塩基認識	112
4-4 RNase U_2 の結晶内蛋白質分子間相互作用	116
4-5 RNase U_2 の異性化	118

图 目次

Figure 1. Schematic drawings of RNA hydrolysis	11
Figure 2. Column chromatography of RNase U ₂	16
Figure 3. RNase U ₂ crystals.....	20
Figure 4. Difference Fourier map at Glu 49 and Asp 50 of RNase U ₂ type II crystal....	34
Figure 5. Comparison of base-recognition site sequences of fungal and bacterial ribonucleases.....	38
Figure 6. Pt-binding sites in RNase U ₂ type II crystal.....	41
Figure 7. Bijvoet difference maps at the disulfide bonds in RNase U ₂ type II crystal. ..	43
Figure 8. Stereo view of the ribbon drawing of RNase U ₂ type VIII crystal.....	48
Figure 9. Schematic drawing of the secondary structure of RNase U ₂	49
Figure 10. Stereo view of the C _{α} traces of the RNase U ₂ structure of type II crystal and RNase T ₁	50
Figure 11. Comparison of the amino-acid sequences of RNases U ₂ and RNase T ₁	51
Figure 12. Comparison of the overall structures of RNase U ₂ type II, III, IV, V, VI, VII, and VIII crystals.....	52
Figure 13. Positional root-mean square difference of RNase U ₂ crystal structures along the residue numbers.....	53
Figure 14. Average temperature factors of RNase U ₂ crystal structures.....	54
Figure 15. Water molecules commonly observed in RNase U ₂ type II, III, IV, and VI crystal structures.....	59
Figure 16. Stereo view of the water molecules deeply buried inside the RNase U ₂ molecule.....	60
Figure 17. Isomerization of aspartic acid.....	63
Figure 18. Stereo view of the F _o -F _c difference Fourier map at the residues from 44 to 46 of RNase U ₂	64
Figure 19. Stereo view of the structure around isoAsp 45.....	65
Figure 20. Comparison between the structures around residues 45 in type II and type	

VII crystals.	66
Figure 21. Overall structure of RNase U ₂ complexed with 3'-AMP.	73
Figure 22. Difference Fourier map for the 3'-AMP molecule bound to RNase U ₂	74
Figure 23. Stereo view of the adenine-recognition and catalytic sites in RNase U ₂ complexed with 3'-AMP.	75
Figure 24. Superposition of the adenine recognition sites of type IV and VIII crystal structures.	76
Figure 25. Overall structure of RNase U ₂ type VII crystal.	82
Figure 26. Difference Fourier map for the 2'-AMP molecule bound to RNase U ₂	83
Figure 27. Stereo view of the structure around bound 2'-AMP molecule in type VII crystal.	84
Figure 28. Stereo view of the superposition of C _α -traces of RNase U ₂ type VII and VIII crystal structures.	85
Figure 29. Stereo view of calcium ion binding site in type VII crystal structure.	86
Figure 30. Stereo view of the catalytic sites of RNase U ₂	94
Figure 31. Superposition of the catalytic residues of RNase U ₂	98
Figure 32. Space-filling model of RNase U ₂ type VIII crystal structure.	105
Figure 33. Schematic drawing of possible interactions between RNase U ₂ and RNA.	107
Figure 34. Schematic drawing of the mechanism for RNA cleavage.	111
Figure 35. The base recognition by RNases belonging to RNase T ₁ super family.	115
Figure 36. Schematic drawing of the isomerization reaction at Asp 45.	124
Figure 37. Difference Fourier map at the succinimide 101 - Gly 102 region.	125
Figure 38. Overall structure of the succinimide lysozyme complexed with tri-N-acetylchitotriose.	126
Figure 39. Stereo view of the region around succinimide 101 and the tri-N-acetylchitotriose ligand.	127
Figure 40. Stereo view of the structures at Asn - Gly pairs in RNase U ₂ type II crystal.	128

表 目次

Table 1. Properties of RNase U ₂	12
Table 2. Crystallization and crystal data for RNase U ₂	24
Table 3. Statistics on diffraction data of RNase U ₂ crystals	27
Table 4. Results of the molecular replacement solution	32
Table 5. Structural refinement of RNase U ₂ type II crystal structure	33
Table 6. Sulfur anomalous difference of the diffraction data of type II crystal	44
Table 7. Statistics of the refined crystal structures of RNase U ₂	56
Table 8. Positional rmsd between RNase U ₂ crystal structures	57
Table 9. Bond distances and torsion angles for isoaspartate 45 in RNase U ₂	67
Table 10. Conformational parameters for the 3'-AMP molecule bound to RNase U ₂	77
Table 11. Possible hydrogen-bond interactions between the 3'-AMP and RNase U ₂ molecules	78
Table 12. Coordination of calcium ion in type VII crystal structure	87
Table 13. Conformational parameters for the 2'-AMP molecule bound to RNase U ₂	88
Table 14. Possible hydrogen-bond interactions between the 2'-AMP and RNase U ₂ molecules	89
Table 15. Positional rmsd of the catalytic site residues, Tyr 39, His 41, Glu 62, Arg 85, and His 101.	99
Table 16. Hydrogen bonds of the sulfate ion at the active site of the type II and III crystal structures	100
Table 17. Torsion angles of the catalytic-site residues, His 41 and Glu 62	101
Table 18. Inter-atomic distances between the O _{ε1} or O _{ε2} atoms of Glu 62 and the side chains of His 41 and Arg 85	102
Table 19. Examples of isomerization of aspartate and asparagine in proteins	129
Table 20. Torsion angles of Asp 45	130

1 序

リボ核酸分解酵素 (RNase) U_2 は Arima らがクロボキン *Ustilago sphaerogena* の培養液中に見いだした、四種の RNase の一つである (Arima *et al.*, 1968a; Table 1)。RNase U_2 は 1 本鎖 RNA のプリン塩基の 3' 側のホスホジエステル結合を切断して、2', 3'-環状ヌクレオチドを生成し、更に 3'-プリン-リン酸へと加水分解する (Arima *et al.*, 1968b)。RNase U_2 が触媒能を持つのは、弱酸性側の pH 3.5 - 5.5 の領域である。RNase U_2 の一次構造はエドマン分解法により決定され、114 アミノ酸残基からなり 3 個のジスルフィド結合を有すると報告されている (Sato & Uchida, 1975a; Kanaya & Uchida, 1986; Kanaya & Uchida, 1995)。また、RNase U_2 には RNase U_2A と U_2B の異性体が存在し (Uchida & Shibata, 1981)、RNase U_2B は通常のポリヌクレオチド鎖からなる RNase U_2A の Asn 32 がスクシンイミド (Suc) を経てイソアスパラギン酸 (isoAsp) に変化して生じるものと考えられている (Kanaya & Uchida, 1986)。以下では特に断らない限り RNase U_2A を RNase U_2 と呼ぶ。RNase U_2 の一次構造は、*Aspergillus oryzae* の産生する RNase T_1 と比較すると、アミノ酸配列は 10 % ほど長く、アミノ酸の一致度も 28 % と低い。しかし、RNase T_1 で触媒活性に重要と考えられている His 40、Glu 58、Arg 77、His 92 (Takahashi & Moore, 1982) が His 41、Glu 62、Arg 85、His 101 として共通に存在すると考えられることから、RNase U_2 は微生物由来の RNase T_1 ファミリーに属する蛋白質に分類されている。この RNase T_1 ファミリーには RNase Ms (*Aspergillus saitoi* 由来; Watanabe *et al.*, 1982)、 C_2 (*Aspergillus clavatus* 由来; Bezborodova *et al.*, 1983)、 F_1 (*Fusarium moniliforme* 由来; Hirabayashi & Yoshida, 1983)、 U_1 (*Ustilago sphaerogena* 由来; Takahashi & Hashimoto, 1988) といった真核生物由来の RNase に加えて、Barnase (*Bacillus amyloliquefaciens* 由来; Hartley & Barker, 1972)、RNase St (*Streptomyces erythreus* 由来; Yoshida *et al.*, 1976)、Bi (*Bacillus intermedius* 7p 由来; Aphanasenko *et al.*, 1979)、Sa

(*Streptomyces aureofaciens* 由来; Shlyapnikov *et al.*, 1986) といった原核生物由来の RNase も含まれている。RNase T_1 ファミリーの蛋白質に共通する特徴は、第一にアミノ酸残基数がほぼ 100 程度であり、RNase T_1 において触媒活性に重要と考えられている前述のアミノ酸残基のうち、Glu 58、Arg 77、His 92 に相当するものが共通に保存されていること、第二に触媒反応の過程で 2',3'-環状ヌクレオチド中間体が生成し、最終的にヌクレオシド 3' - リン酸に加水分解されることが挙げられる。

RNase T_1 ファミリーの触媒反応は、RNase T_1 で代表され、次のように提案されている (Takahashi & Moore, 1982; Heinemann & Hahn, 1989; Figure 1)。まず第一段階として、リボース $O_{3'}$ がリン原子を求核的に攻撃し、リン原子からリボース $O_{5'}$ が脱離して 2',3'-環状ヌクレオチドが形成される。この段階には、リボース $O_{3'}$ からプロトンを受け取る塩基触媒の役割を果たす残基と、脱離するリボース $O_{5'}$ へプロトンを渡す酸触媒の役割を果たす残基が関与し、それぞれ Glu 58 と His 92 であると考えられている。第二段階では、水分子が 2',3'-環状ヌクレオチドのリン原子に付加し、リボース $O_{3'}$ がリン原子から脱離してヌクレオシド 3' - リン酸が生成する。第二段階では酸塩基触媒の役割が交代し、Glu 58 は酸触媒としてリボース $O_{3'}$ にプロトンを渡し、His 92 は塩基触媒として水分子からプロトンを受け取ると考えられている。第一段階のリン酸基転移反応の速度は、第二段階の加水分解反応に比べて RNase U_2 と RNase T_1 では共に約 10^3 倍速い (Egami *et al.*, 1980)。ほ乳類由来の RNase A では、酸塩基触媒残基は二つの His と考えられているが (Breslow, 1989)、中間体として 2',3'-環状ヌクレオチドが生成すること、及び各段階の反応速度の関係は RNase U_2 と同じである。RNase A によるジヌクレオチドの分解産物の分析から、RNase A ではリン酸基転移反応と加水分解反応は同一の基質分子に対して連続的に起こるのではなく、まず存在する基質に対してリン酸基転移反応が終了してから、リン酸基転移反応の逆反応として加水分解反応が起こることが示され、この事実から RNase A は加水分解酵素ではなくリン

酸基転移酵素であり、RNase T₁ ファミリーの RNase でも同様であるとの主張がある (Cuchillo *et al.*, 1993)。RNase U₂ の RNA の分解産物の分析では、2',3'-環状ヌクレオチドがかなりの割合含まれており (Arima *et al.*, 1968b)、Cuchillo らの主張は RNase U₂ の場合にも当てはまると考えられる。

上述の RNase T₁ の反応機構に対して、酸塩基触媒の役割を果たすのは Glu 58 - His 92 ではなく、RNase A と同じく二つのヒスチジン、すなわち His 40 と His 92 であるとする説も提案されている。この提案は RNase T₁ の Glu 58 を Ala に変異させたものには活性が残存するにも関わらず、His 40 を Ala に変化したものはほとんど活性がないという知見に基づいている (Nishikawa *et al.*, 1986; Nishikawa *et al.*, 1987)。一方、Steyaert らは RNase T₁ の野生体及び変異体の反応速度を種々の pH で測定した結果から、RNase T₁ が最大の活性を示す pH 7.5 では、His 40 はプロトンが結合した共役酸の状態にあり塩基として機能し得ないこと、Glu 58 を Ala に改変した場合には His 40 の pK_a が低下し、Glu 58 に代わって塩基として機能し得ることを示し、Glu 58 と His 92 が酸塩基触媒の役割を果たすと主張している (Steyaert *et al.*, 1990)。しかし、RNase T₁ とグアノシン 3' - リン酸 (3'-GMP) の複合体の結晶構造では Glu 62 と共に His 40 もリボース O_{2'} と水素結合を形成していることから、His 40 はリボース O_{2'} からのプロトン脱離に直接関するとの主張も再びなされており (Gohda *et al.*, 1994)、RNase T₁ ファミリーにおいて RNA 切断反応でどの残基がどの役割を果たすのかは依然として不明瞭である。

RNase U₂ は塩基特異性に関して一つの興味深い特徴を有している。RNase T₁ ファミリーに属する類似の RNase はすべてグアニン特異的またはグアニンを優先的に認識するのに対し、RNase U₂ はアデニンを優先的に認識する。高分子量 RNA の RNase U₂ による分解産物の 3' 末端ヌクレオチドの分析から RNase U₂ の塩基特異性は Adenine > Guanine >> Cytosine > Uracil と報告されており (Uchida *et al.*, 1970)、この特異性はジヌクレオチドの場合も同じ

である (Uchida & Machida, 1978)。また、pH 4.5、30 °C における アデノシン 2' - リン酸 (2'-AMP) に対する解離定数は 2.3×10^{-6} M であるのに対し、グアノシン 2' - リン酸 (2'-GMP) に対する解離定数は 1.3×10^{-4} M (Sato & Uchida, 1975b) と大きく、阻害剤においてもアデニンに対する親和性が高い。エンドリボヌクレアーゼ の塩基特異性には大きく分けて、ほ乳類由来の RNase A に代表されるピリミジン特異的なもの、RNase T₁ に代表されるグアニン特異的なもの、RNase Rh に代表される非特異的なものが見つかっているが、RNase U₂ はプリン特異的な RNase として単独で独自の群に分類できる。

RNase U₂ は、透析法により I 型結晶が、硫酸を沈殿剤として III 型結晶が得られている (Matsuzaki *et al.*, 1989)。I 型結晶については重原子同型置換法による解析が試みられているが、良好な位相情報が得られておらず、その立体構造は不明である。

本研究では、RNase U₂ の RNA 加水分解反応機構とアデニン優先的な塩基特異性発現の機構を原子レベルで立体構造から解明するため、RNase U₂ 単独及び核酸との複合体の X 線結晶構造解析を行い、RNase U₂ と核酸の相互作用様式を決定した。その際、特定の溶媒条件下で得られた一種類の結晶構造に依存して考察するのではなく、種々の溶媒条件下で生じた複数の結晶構造を定量的に比較することで、特定の溶媒条件や結晶内分子間接触の影響の少ない RNase U₂ の立体構造情報を抽出し、それを基に酵素反応機構と塩基特異性について考察した。更にその過程でアスパラギン酸がイソアスパラギン酸に異性化した蛋白質の立体構造を初めて決定し、その蛋白質立体化学的特徴を明らかにした。以下に得られた知見を記す。

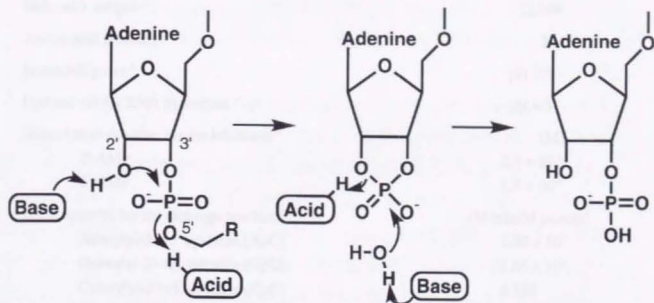


Figure 1. Schematic drawings of RNA hydrolysis.

Table 1. Properties of RNase U₂.

Molecular weight ^a	12,389
Amino-acid residues ^a	114
Isoelectric point ^b	pH 3.3
Optimal pH for RNA hydrolysis ^c	pH 4.5
Dissociation constant for the inhibitors ^d	(M)
2'-AMP	2.3×10^{-5}
2'-GMP	1.3×10^{-4}
Initial velocity for the cleavage reaction ^e	(M/min/M protein)
Adenylyl-3'→5'-cytosine (ApC)	1.08×10^3
Guanylyl-3'→5'-cytosine (GpC)	1.88×10^2
Cytosylyl-3'→5'-cytosine (CpC)	0.359
Uracilyl-3'→5'-cytosine (UpC)	0.046

^a Kanaya & Uchida, 1985; Kanaya & Uchida, 1995.

^b Egami *et al.*, 1980.

^c Arima *et al.*, 1968a.

^d Sato & Uchida, 1975b.

^e Uchida & Machida, 1978.

2 方法

2-1 RNase U_2 の精製

2-1-1 *Ustilago sphaerogena* の培養

菌体の培養及び RNase U_2 の精製は、基本的に Uchida & Shibata (1981) の方法に従った。

担子菌類のクロボキン *Ustilago sphaerogena* は American Type Culture Collection (Maryland, USA) から購入し、培養液の凍結乾燥物がアンプルに封入された状態で輸入した。この凍結乾燥物に蒸留水を 400 μ l 加えて混合し、ポテトフレーク寒天培地上に植え付け、28 $^{\circ}$ C の恒温槽内に静置した。2 日後に形成されていたコロニーを 500 ml 坂口フラスコ中の Corn-meal 培地 (Hirai *et al.*, 1972) 100 ml に植え付け、振とう数 150 回転/分 (rpm)、28 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。Corn-meal 培地に使用したトウモロコシの品種は、交 1 号 (雪印種苗社製) である。培養液に pH 4.5 における RNA 加水分解活性があることを Arima らの方法 (Arima *et al.*, 1968a) により測定して確認した後、培養液にグリセロールを最終濃度が 33 % になるように加え -80 $^{\circ}$ C で保存した。以後、RNase U_2 精製のための *Ustilago sphaerogena* 培養には、このグリセロールストックからの菌体を使用した。

大量培養は以下に記す手順で行った。まず、グリセロールストックから試験管内の Corn-meal 培地 6 ml に菌体を植え付け、振とう数 150 rpm、28 $^{\circ}$ C で 3 日間培養し、培養液をポテトフレーク寒天培地上に植え付け、28 $^{\circ}$ C の恒温槽内に静置した。3 日後に生じたコロニーひとつを 500 ml 坂口フラスコ中の Corn-meal 培地 100 ml に植え付け、振とう数 150 rpm、28 $^{\circ}$ C で 2 日間培養した。培養液の pH 4.5 における RNA 加水分解活性が 20~30 ユニットに達した時点でファメンター内の Corn-meal 培地 5 l に植え付けた。ファメンターの動作条件は、空気流量約 8 l/分、攪拌回転数は 350 rpm である。pH 4.5 における RNA 加水分解活性を経時的に調べ、4 ~ 5 日後に最大の約 60 unit/ml 達したとき、培養を停止した。

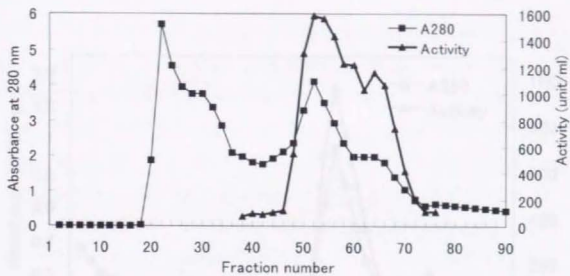
2-1-2 精製

培養液は 4 °C、7000 rpm で 20 分間遠心し、菌体及び培養液中のトウモロコシなどの不溶物を除いた。更にガラス繊維濾紙 GF/A (Wattman社製) を使って培養液中の細かい浮遊物も除去した。ろ過した培養外液約 4 l を蒸留水で 10 l に希釈し、5 N NaOH 水溶液で pH 8.5 に調整した。これに 10 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.5 (以下ではバッファー A と略す) で平衡化した陽イオン交換樹脂 DE23 の乾燥重量 33 g 相当を加え、時々攪拌しながら水中に 40 分間おいた。DE23 を濾取し、濾液に DE23 の乾燥重量 17 g 相当を加え時々攪拌しながら水中に 30 分おいた。濾取した DE23 をあわせ、1 l のバッファー A で洗った。洗浄した DE23 を 0.7 M NaCl を含むバッファー A で 200 ml × 2 回バッチ溶出し、続いて 0.5 M NaCl を含むバッファー A で 200 ml × 4 回バッチ溶出した。溶出液は蒸留水に対して 4 °Cで一晩透析し、外液は一回交換した。透析した溶出液は、再び 5 N NaOH 水溶液で pH 8.5 に合わせた後、バッファー A で平衡化しておいた DE23 乾燥重量 5 g 相当を加え時々攪拌しながら 4 °Cに 30 分おいた。DE23 を濾取し、バッファー A に懸濁して直径 1.5 cm のカラム中に 5 cm の高さに詰めておいた DE23 の上に積層し、全長約 45 cm とした。このカラムを 150 ml のバッファー A で平衡化し、NaCl 濃度 0 → 0.4 M の総量 380 ml の塩濃度勾配で溶出した。流速は約 12 ml/h、1 フラクシオンの体積は約 4 ml とした。pH 4.5 における RNA 加水分解活性はフラクション番号 45 から 70 付近に溶出された (Figure 2(a))。RNA 加水分解活性の含まれるフラクションを回収し、酢酸で pH 4.7 に調整した。これをあらかじめ 1 M NaCl、100 mM 酢酸緩衝液 pH 5.0 (以下ではバッファー B と略す) で平衡化しておいた、5'-アデノシン酸を結合させたセファロースカラム (直径1.5 cm × 40 cm) に通し、RNase U₂ を吸着させた。約 80 ml のバッファー B でカラムを洗浄し、バッファー B に、100 mM 酢酸ナトリウム、1M NaCl 水溶液を直線的に加える塩濃度勾配をかけ RNase U₂ を溶出した。流速は約 20 ml/h、1 フラクシオンの体積は約 4 ml とした。

RNase U_2A はフラクション番号 50 付近に、 U_2B はフラクション番号 68 付近に溶出された (Figure 2(b))。RNase U_2A のフラクションを 20 mM 酢酸アンモニウム溶液を酢酸で pH 6 に調整したものに対して透析し、凍結乾燥する事で白色粉末の RNase U_2A 標品を得た。培養液 1 l 当たりの収量は約 10 mg である。RNase U_2A の凍結乾燥物は -80°C で保存した。

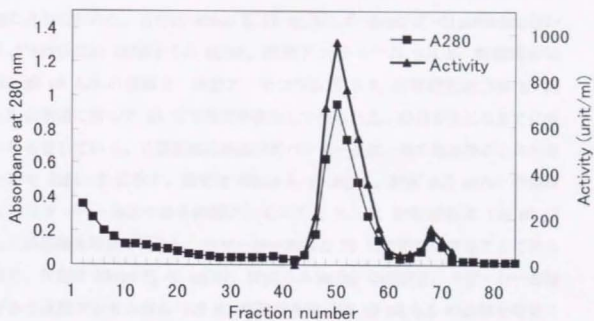


Figure 2. (b) Elution profile of RNase U_2A and U_2B from a DEAE ion exchange column.



(a) DEAE-cellulose chromatography.

Figure 2. Column chromatography of RNase U₂.



(b) 5'-Adenylate-aminohexyl-sepharose affinity chromatography.

Figure 2. Column chromatography of RNase U₂ (continued)

2-2 RNase U₂ の結晶化

RNase U₂ II型、III型、IV型の結晶化は三菱化学総研の佐々木千津子と松崎尹雄により行われた。II型は RNase U₂ 20 mg/ml、2'-deoxy-2'-fluoroadenylyl-3',5'-cytidine (AfpC) 1.5 mg/ml、硫酸アンモニウム 0.4 M、酢酸緩衝液 100 mM pH 4.5 の溶液を、硫酸アンモニウム 0.9 M、酢酸緩衝液 100 mM pH 4.5 の溶液に対して 20 °Cで蒸気平衡化して得られた。結晶が生じるまでに約 1 年を要している。II型結晶の結晶学的パラメータは、他の結晶型のものとまとめて Table 2 に示す。III型は RNase U₂ 20 mg/ml、AfpC 3.0 mg/ml の溶液と、リザーバー溶液である硫酸アンモニウム 2.5 M、酢酸緩衝液 100 mM pH 4.5 の溶液を等量に混合し、リザーバー溶液と 20 °Cで平衡化することで得られた。IV型は RNase U₂ 40 mg/ml、AfpC 3.0 mg/ml の溶液と、リザーバー溶液である硫酸アンモニウム 1.2 M、酢酸緩衝液 100 mM pH 4.5 の溶液を等量に混合し、リザーバー溶液と 20 °Cで平衡化することで得られた。II型結晶に関しては、結晶を、7.5 mM K₂PtCl₄ を含む 0.9 M 硫酸アンモニウム、酢酸緩衝液 100 mM pH 4.5 に三日間浸すことにより、白金誘導体結晶も作成した。

V、VI、VII及びVIII型結晶はすべて 20 °Cで結晶化を行った。V型結晶は、RNase U₂ 20 mg/ml、2'-AMP 20 mM の溶液を 3 μ l、ZnCl₂ 50 mM を 1.5 μ l、リザーバー溶液である硫酸アンモニウム 1.6 M、トリス緩衝液 50 mM pH 7.5 を 3 μ l 混合し、リザーバー溶液に対して蒸気平衡化させて得た。V型結晶は、2'-AMP と ZnCl₂ の両方が共存するときのみ生成した。V型結晶は、薄板状の外形を呈した (Figure 3(a))。

VI型結晶は、酢酸緩衝液 10 mM pH 4.5 中の RNase U₂ 20 mg/ml を 2 μ l、MnCl₂ 100 mM を 1 μ l、リザーバー溶液である MPD 50 % (v/v)、クエン酸緩衝液 10 mM pH 4.5、2 μ l を混合し、リザーバー溶液に対して蒸気平衡化させて得た。VI型結晶は、柱状の外形を呈した (Figure 3(b))。MnCl₂ が存在しないときも、格子定数がほぼ等しい結晶が成長するが、結晶は立方体状の外形を呈し、ひび割れが例外なく生じた (Figure 3(c))。

VII型結晶は、RNase U₂ 20 mg/ml、2'-AMP 20 mM 3 μ l と、リザーバー溶液である PEG 8000 21 % (w/v)、酢酸カルシウム 200 mM、カコジル酸ナトリウム 100 mM、pH 6.5、3 μ l を混合し、リザーバー溶液に対して蒸気平衡化させて、まず多結晶として得た (Figure 3(d))。次に、2'-AMP 20 mM 3 μ l と、リザーバー溶液である PEG 8000 18 % (w/v)、酢酸カルシウム 200 mM、カコジル酸ナトリウム 100 mM、pH 6.5、5 μ l を混合し、リザーバー溶液に対して 6 日間蒸気平衡化させておいた蛋白質溶液に、VII型多結晶から streak-seeding 法 (Stura & Wilson, 1992) により結晶の種を供給し、VII型の単結晶を得た。VII型結晶は、板状の外形を呈した (Figure 3(e))。

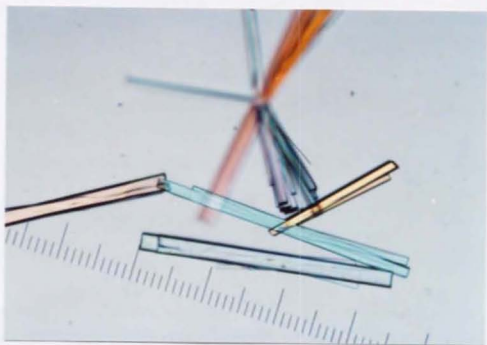
VIII型結晶は、RNase U₂ 20 mg/ml、アデノシン 3' -リン酸 (3'-AMP) 8 mM 3 μ l と、リザーバー溶液である PEG 8000 12 % (w/v)、カコジル酸ナトリウム 100 mM、酢酸カルシウム 200 mM pH 3.5、3 μ l を混合し、リザーバー溶液に対して蒸気平衡化させて得た。VIII型結晶は、板状の外形を呈した (Figure 3(f))。



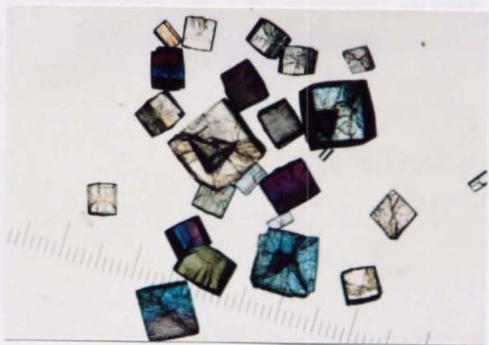
(a) RNase U_2 type V crystal.

Figure 3. RNase U_2 crystals.

(1 division = 25 μm for each photograph in Figure 3)

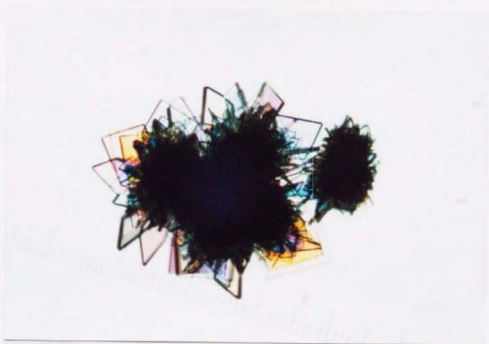


(b) RNase U_2 type VI crystal, grown in the presence of $MnCl_2$.

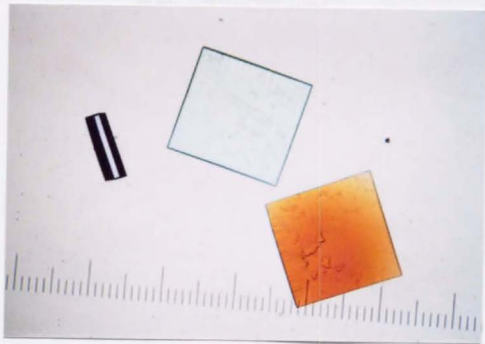


(c) RNase U_2 type VI crystal, grown in the absence of $MnCl_2$.

Figure 3. RNase U_2 crystals (continued).

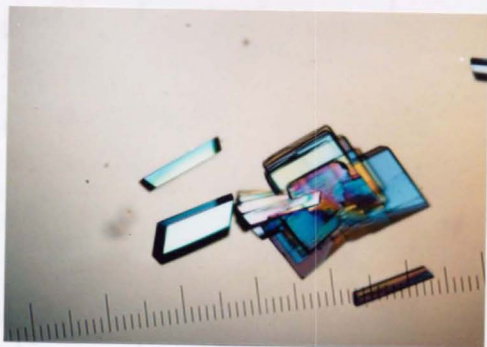


(d) RNase U_2 type VII crystal, obtained by the vapour-diffusion method.



(e) RNase U_2 type VII crystal, obtained by the streak-seeding method.

Figure 3. RNase U_2 crystals (continued).



(f) RNase U_2 type VIII crystal.

Figure 3. RNase U_2 crystals (continued).

Table 2. Crystallization and crystal data for RNase U₂.

Crystal type	I*	II	III*	IV	V	VI	VII	VIII
Crystallization								
Precipitant†	(Dialysis)	AS	AS	AS	AS	MPD	PEG 8000	PEG 8000
Additive	-	AfpC	AfpC	AfpC	ZnCl ₂ 2'-AMP	MnCl ₂	Ca(CH ₃ COO) ₂ 2'-AMP	Ca(CH ₃ COO) ₂ 3'-AMP
pH of crystallization	-	4.5	4.5	4.5	7.5	4.5	6.5	3.5
Crystal data								
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>R</i> 3	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Cell parameters	<i>a</i> = 50.98 <i>b</i> = 59.20 <i>c</i> = 27.52	<i>a</i> = 49.32 <i>b</i> = 61.27 <i>c</i> = 34.95	<i>a</i> = 47.99 <i>b</i> = 59.40 <i>c</i> = 35.19	<i>a</i> = 95.44 <i>c</i> = 29.04	<i>a</i> = 40.28 <i>b</i> = 67.92 <i>c</i> = 36.72	<i>a</i> = 50.11 <i>b</i> = 63.01 <i>c</i> = 26.95	<i>a</i> = 39.83 <i>b</i> = 36.59 <i>c</i> = 36.73 <i>β</i> = 104.25	<i>a</i> = 39.99 <i>b</i> = 40.10 <i>c</i> = 38.41 <i>β</i> = 124.12
Molecules per asymmetric unit	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>V</i> _m ‡ (Å ³ /dalton)	1.68	2.13	2.02	2.06	2.03	1.72	2.10	2.06
Solvent content (%)	26.8	42.3	39.3	40.1	39.4	28.5	41.4	40.3
Resolution (Å)	1.0	1.8	1.8	2.0	2.5	2.0	1.8	1.8

* From Matsuzaki *et al.* (1989).

† AS, ammonium sulfate; MPD, 2-methyl-2,4-pentanediol; PEG, polyethylene glycol.

‡ Crystal volume per unit molecular mass of protein (Matthews, 1968).

2-3 RNase U₂ 結晶の回折強度測定

II型結晶の回折強度データは高エネルギー物理学研究所放射光施設 BL-14A (Satow & Iitaka, 1989) で行った。測定には大きさが $80 \times 80 \times 150 \mu\text{m}$ の結晶を一つ用い、波長は 0.9000 \AA 、測定温度は 11°C に設定した。四軸回折計を振動カメラとして使用し、回折像はイメージングプレートに記録してイメージングプレートスキャナー (Amemiya *et al.*, 1988) を使いフォトン数の情報に変換した。積分回折強度の算出はプログラム OSCMR (Rossmann, 1979) を改良したものを、スケーリングとポストリファインメントはプログラム TOMOKO と MARIKO (Satow *et al.*, 1986) を用いて行った。II型結晶の回折強度データの統計は、IIIからVIII型結晶の回折強度データの統計とまとめて Table 3 に示す。II型結晶の白金誘導体においては、波長 1.0713 \AA と 1.0723 \AA の二つの回折強度データを同一の結晶から収集した。II型結晶の回折強度データ測定では、Bijvoet 対の反射は常に同一のイメージングプレート上に記録されるように、結晶のいずれかの軸を振動軸と一致させた。白金誘導体結晶では、各波長において、それぞれ分解能 2.1 \AA 、 2.5 \AA までの 6,288 反射と 3,871 反射を観測した。これらは観測可能な反射の 96.2 % と 99.9 % に相当する。

III型、IV型結晶の回折強度測定は三菱化成の佐々木、松崎らにより行われた。X線源は、銅X線管球と銅回転対陰極X発生装置を、測定装置は、四軸回折計 CAD4 (Enraf-Nonius 社製) が使用された。それぞれ、分解能 1.8 \AA 、 2.0 \AA までの独立な反射が 7340、5142 個観測されている。

V、VI、VII及びVIII型結晶の回折強度データには銅回転対陰極X線発生装置を使用した。装置は 50 kV 、 100 mA の出力で運転した。Cu $K\alpha$ 線は白金を蒸着した鏡を二枚使って集光し、ニッケルフィルターにより単色化した。コリメーターの径は、V型とVI型結晶の場合は 0.2 mm 、VII型とVIII型結晶の場合は 0.3 mm である。X線による損傷を低減するため結晶は 7°C に冷却した。X線回折像の記録はイメージングプレート読み取り装置一体型振動カメラを使用し、II

型結晶の回折強度データ処理と同じプログラムを使用して各々の結晶の回折強度データを得た。Ⅶ型とⅧ型結晶の場合は結晶が平板状のため、X線に対する結晶の方位によりX線の吸収による回折強度の変化の影響が強く現れ、同価な回折点の積分強度の一致度を示す $R_{\text{merge}}(I) \left[\frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \overline{I(h)}|}{\sum_h \sum_i I_i(h)} \right]$ の値が約 30 % と異常に高くなる回折像が得られた。この吸収による影響を低減するため、異常に高い $R_{\text{merge}}(I)$ の値を示すデータセットは回折点をイメージングプレート上に記録された位置により二つのグループに分割し、それぞれ別のスケール因子を適用した。この処理により各イメージングプレートの $R_{\text{merge}}(I)$ の値は、最大のもので 10 % 程度にまで低下した。

Table 3. Statistics on diffraction data of RNase U₂ crystals.

Crystal type	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Crystal size (mm)	0.03 × 0.03 × 0.05	0.3 × 0.3 × 1.0	0.1 × 0.1 × 0.7	0.2 × 0.2 × 0.025	0.08 × 0.08 × 0.80	0.30 × 0.50 × 0.10	0.25 × 0.30 × 0.08
Wavelength (Å)	0.9000	1.5418	1.5418	1.5418	1.5418	1.5418	1.5418
Spacing (Å)							
Maximum	12.0	35.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Minimum	1.8	1.8	2.0	2.5	2.0	1.8	1.8
Observed reflections	39,316	7,340	7,989	11,716	17,884	38,127	46,904
Unique reflections	9,872	7,340	5,142	3,440	5,535	8,938	8,913
Completeness* (%)	96.1	74.6	73.5	91.2	89.5	89.3	92.1
$R_{\text{merge}}(I)$	0.034	-	0.107	0.143	0.107	0.056	0.050

* Ratio of number of observed reflections to that of theoretically observable reflections.

2-4 結晶構造決定と結晶学的構造精密化

2-4-1 II型 RNase U_2 結晶の構造決定と構造精密化

II型結晶構造の決定は分子置換法により行った。モデル分子は子囊菌 *Aspergillus oryzae* 由来 RNase T_1 と 2'-GMP の複合体の結晶構造 (Arni *et al.*, 1988; PDB ID 1RNT) を使用した。その理由は、第一に RNase U_2 と RNase T_1 のアミノ酸配列の一致度は 28 % と非常に低いものの、RNase T_1 分子内部のアミノ酸残基は RNase U_2 において比較的保存されており、立体構造は基本的に良く似ていると考えられたため、第二に RNase T_1 と 2'-GMP の複合体の結晶構造は分解能 1.9 Å で構造精密化が進められており、構造モデルの座標データの精度が比較的高いと考えられたためである。RNase T_1 と 2'-GMP の複合体の構造モデルから溶媒分子と 2'-GMP を除き、RNase U_2 と RNase T_1 で共通の残基の側鎖は残し、その他の残基は Ala または Gly に置き換え、アミノ酸の欠失や挿入のある部分はその両側の残基と共に除いたモデル分子を作成した。除かれた領域は RNase T_1 の残基番号で、34 から 37、47 から 49、62 から 71、81 から 82 及び 97 から 98 である。モデル分子の残基数は 84 残基、原子数は 492 個である。これは、RNase U_2 の 74 % の残基数と 57 % の原子数に相当する。

分子置換法の計算は、プログラム X-PLOR (Brünger *et al.*, 1991) を使用した。分子の方位の探索には、バターソン関数に現れるピークのうち、原点からの距離が 5 - 4 Å にあるものを使用して回転関数を計算した。回転関数で高い値を与える方位に対して、面間隔が 5 - 4 Å の反射を用いてバターソン相関係数 (PC coefficient) の精密化 (PC-refinement) を行ったところ、バターソン相関係数が 0.142 と顕著に高い方位が得られた。PC-refinement に用いる反射の面間隔を種々の値に変更しても、この方位は常に最大の相関係数を与えた。この方位のモデル分子を使い、並進位置の探索を行った。規格化された構造因子の平方の実測値と計算値の相関係数を結晶内 1 Å 刻みの各位置

で計算した。計算には面間隔 5 - 4 Å の反射を用いた。その結果、相関係数の値が 0.361 となる並進位置が得られた。この相関係数の値は平均値よりも標準偏差の 5.6 倍大きい値であった。計算に用いる反射の面間隔範囲を種々の値に変更しても、この並進位置は常に最大の相関係数の値を与えた。分子置換法の計算結果はⅢ型からⅧ型結晶の計算結果と共に Table 4 にまとめて示す。

このようにして得られた分子置換法の解は、free R -value (Brünger *et al.*, 1992) の手法により検証した。面間隔 8 - 4 Å の反射のうち 90 % を無作為に取り出し、それらの反射を使って構造精密化を進め、残りの 10 % の反射と精密化構造からの構造振幅の計算値との相関係数を調べた。上記の解は 10 % の相関係数は 0.227 となったが、それ以外の解はみな 0.1 以下であった。また、上記の方位と並進位置においたモデルから位相を求めて電子密度を計算すると、モデルには含まれていない Trp 60 の側鎖の位置にインドール環に対応すると考えられる電子密度が存在するなど、構造因子の計算に含まれていない部分の構造に対応する電子密度が存在していた。これらの事実は上記の方位と並進位置に置いた構造モデルが実際の RNase U_2 の結晶構造に近いことを強く示すものである。

上記の方位と並進位置に置いたモデル分子を RNase U_2 の初期構造として結晶学的構造精密化を進めた。Table 5 に構造精密化の過程を示す。最初にモデル分子全体を N 末から 2 本鎖 β シート構造、 α ヘリックス、5 本鎖 β シート構造の三つに分割し、rigid-body refinement を行ったところ、面間隔 6 - 3 Å で R 因子 ($R = \Sigma(|F_o - F_c|) / \Sigma F_o$, F_o と F_c はそれぞれ構造振幅の観測値と計算値) は 0.525 になった。次に、 β シートは各 β 鎖ごとに分割し、ループ部もひとつの剛体として扱い、分子全体を 12 個に分割して rigid-body refinement を行ったところ、面間隔 6 - 3 Å で $R = 0.496$ となった。以降は各原子の座標と温度因子を精密化し、各段階での分子モデルから計算される位相を使って電子密度を計算し分子モデル構築を進めた。 R が 0.30 より大き

な段階では、フーリエ係数として構造振幅の観測値 F_o を使用した電子密度図を、それ以降は $(2F_o - F_c)$ を係数とするフーリエ図を多用した。差フーリエ図と annealed-omit map (Hodel *et al.*, 1992) は構造モデル構築過程の全体で良く使用した。構造精密化の計算には、前半はプログラム X-PLOR を、後半はプログラム PROLSQ (Hendrickson, 1985) を使用した。構造モデルの構築はプログラム TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1990) を使用した。初期構造には RNase U_2 分子の 57 % しか含まれていないため、構造モデルすべての部位について電子密度と比較しつつ詳細に検討し、ほとんどの部分は精密化の過程で幾度か修正を行った。Cys 1 - Ser 6, Asp 45 - Ser 57, Tyr 67 - Val 79, Ala 105 - Gly 109, 及び α ヘリックスの C 末部を含む Leu 27 - Asp 37 の領域については完全に新たなモデルを組み立てた。構造モデル構築と結晶学的構造精密化を 23 回くり返し、面間隔 8.0 - 1.8 Å で $R = 0.166$ に収束した。この段階で、Val 86 と Tyr 107 の各側鎖が二つのコンフォメーションをとっている兆候が電子密度に現れたため、各々二つのコンフォメーションのモデルを導入し、各コンフォメーションの占有率は温度因子が同程度になるように設定した。この段階で $R = 0.148$ に収束した。

残基 49 - 50 は Asp - Gln であると報告されている (Kanaya & Uchida, 1986)。しかし、残基 49 を Asp とすると Figure 4 (b) に示すように構造精密化後の後もアスパラギン酸のカルボキシル基の先端にモデルに対応しない電子密度が残り、残基 50 を Glu とすると Figure 4 (d) に示すように Glu 側鎖の C_γ 原子が電子密度の中心から外れた位置に収束する。これらの事実は、残基 49 - 50 が Asn - Glu ではないことを示している。電子密度の形状及び RNase T_1 のアミノ酸配列との比較から、残基 49 - 50 の配列は Glu - Asp と考えてモデルを構築し構造精密化を進めた。その結果、Figure 4 (a) と (c) にそれぞれ示すように、構造精密化後の Glu 49 と Asp 50 は電子密度に良く適合し、構造モデルに対応しない電子密度も存在しなかった。 R 因子は面間隔 8.0 - 1.8 Å で 0.146 に収束した。

この段階においても Asp 45 は、主鎖の N 原子と C_α 原子との距離が 1.513 Å (理想値は 1.470 Å)、 C_α 原子と C_β 原子との距離が 1.591 Å (理想値は 1.522 Å) となるなど理想値から大きくずれたものであった。Tyr 44 と Glu 46 は電子密度に良く適合しているにも関わらず、Asp 45 はどのようなコンフォメーションにしても電子密度に適合させることはできなかった。残基 45 の主鎖の電子密度は異常に長く、側鎖に対応する電子密度から推察される残基 45 の C_α 原子の位置と Glu 46 とのペプチド結合の位置から推察されるカルボニル炭素原子との距離は約 3 Å であり、中央で約 110° 屈曲していた (Figure 18)。残基 45 の側鎖の電子密度は異常に短く、 C_β に対応する電子密度が存在しなかった。電子密度の形状から残基 45 はイソアスパラギン酸であると考え、その構造モデルを組み込んだ。イソアスパラギン酸の構造モデルの理想値は、 β -L-aspartyl-L-alanine の結晶構造 (Görbitz, 1987) から得た。精密化後の isoAsp 45 周辺の差フーリエ図には、 F_o を係数とするフーリエ図の標準偏差の 0.11 倍の電子密度しか現れなかった。また free R-value は、通常のアスパラギン酸の構造モデルでは 0.1778 であったが、イソアスパラギン酸の構造モデルでは 0.1771 と低下した。

II 型結晶の白金誘導体の結晶構造も波長 1.0713 Å の回折強度データを用いて結晶学的構造精密化を進めた。初期構造は精密化された II 型結晶を用いた。白金原子の位置は、ネイティブ結晶との差フーリエ図、Bijvoet 差フーリエ図、dispersive 差フーリエ図を用いて決定した。面間隔 8.0 - 2.1 Å で $R = 0.178$ に収束した。白金誘導体の結晶構造でも、残基 45 の電子密度は isoAsp である兆候を示していた。

Table 4. Results of the molecular replacement solution.

Crystal type	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Search model ^{*1}	RNase T ₁ ^{*2}	RNase U ₂ type II	RNase U ₂ type II	RNase U ₂ type II	RNase U ₂ type II	RNase U ₂ type II	RNase U ₂ type II
PC refinement							
Spacing (Å)	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0	5.0 - 3.5	5.0 - 4.0	8.0 - 4.0
Orientation ^{*3} (deg)							
α	325.3	38.0	120.1	340.8	303.0	30.6	25.6
β	80.1	75.5	106.2	22.7	80.5	58.9	44.2
γ	191.8	292.9	152.4	65.4	207.8	305.4	117.6
PC coefficient	0.142	0.200	0.220	0.150	0.145	0.285	0.277
Translation search							
Spacing (Å)	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0	5.0 - 3.5	5.0 - 4.0	5.0 - 4.0
Translation ^{*4}							
x	0.100	0.483	0.000	0.106	0.061	0.353	0.289
y	0.400	0.450	0.283	0.273	0.364	0.000	0.000
z	0.267	0.117	0.600	0.288	0.242	0.210	0.237
Correlation coefficient ^{*5}	0.361	0.605	0.636	0.618	0.462	0.570	0.502
Peak height ^{*6}	5.6	7.1	7.5	8.9	7.6	4.7	3.7

*1 Search model was translated so that the center of the gravity of the model was on the origin.

*2 Coordinates of RNase T₁ complexed with 2'-GMP (Arni *et al.*, 1988; PDB ID 1RNT).

*3 Euler angles.

*4 Fractions of unit-cell edges.

*5 Correlation coefficient between the squares of normalized amplitudes calculated from the search model and those observed.

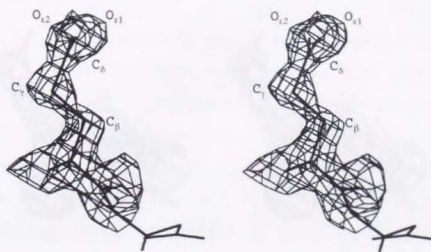
*6 Deviation from the average, on the unit of the standard deviation.

Table 5. Structural refinement of RNase U₂ type II crystal structure.

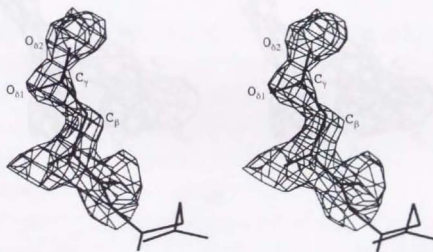
Stages	Used program	Refined parameters*	Spacing limits (Å)	Number of non-H atoms	R†
1 - 3	X-PLOR	Rigid-body	6.0 - 3.0	492	0.496
4 - 5	PROLSQ	xyz	6.0 - 3.0	585	0.386
6 - 7	X-PLOR	xyz	6.0 - 2.5	602	0.410
8	X-PLOR	xyz, B _{indiv}	5.0 - 2.5	608	0.353
9	X-PLOR	xyz, B _{indiv}	5.0 - 2.5	628	0.348
10	X-PLOR	xyz, B _{overall}	6.0 - 3.0	636	0.366
11 - 12	X-PLOR	xyz, B _{indiv}	5.0 - 2.5	649	0.324
13 - 21	X-PLOR	xyz, B _{indiv}	8.0 - 2.5	852	0.253
22	PROLSQ	xyz, B _{indiv}	8.0 - 2.5	891	0.209
23 - 26	PROLSQ	xyz, B _{indiv}	8.0 - 1.8	1025	0.148
27 - 28	PROLSQ	xyz, B _{indiv}	8.0 - 1.8	1025	0.146
29	PROLSQ	xyz, B _{indiv}	8.0 - 1.8	1025	0.143

* Rigid-body, orientation and translation parameters for the molecular model divided into three parts; xyz, atomic coordinates; B_{indiv}, individual temperature-factor; B_{overall}, overall temperature-factor.

$$\dagger R = \frac{\sum_h |F_o(h) - F_c(h)|}{\sum_h F_o(h)}$$



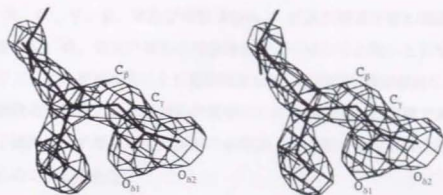
(a)



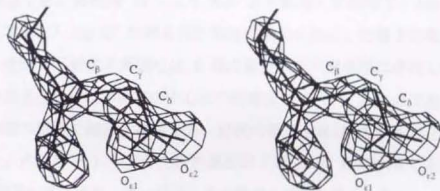
(b)

Figure 4. Difference Fourier map at Glu 49 and Asp 50 of Rnase U₂ type II crystal.

The $F_o - F_c$ difference Fourier map for Glu 49 is contoured at 1.6 times the rms value of electron densities. The Glu 49 model is superposed on the map in (a), and the Asp 49 model is superposed on the map in (b). In the calculation of the map, a model without residues 49 and 50 was subjected to 5 cycles of the PROLSQ refinements. The phases from the model thus refined was used in the $F_o - F_c$ Fourier synthesis.



(c)



(d)

Figure 4. Difference Fourier map at Glu 49 and Asp 50 of Rnase U₂ type II crystal (continued).

The $F_o - F_c$ difference Fourier map for Asp 50 is contoured at 1.6 times the rms value of electron densities. The Asp 50 model is superposed on the map in (c), and the Glu 49 model is superposed on the map in (d).

2-4-2 III、IV、V、VI、VII及びVIII型 RNase U₂ 結晶の構造決定と構造精密化

III、IV、V、VI、VII及びVIII型の結晶構造は、溶媒分子を除いたII型結晶をモデル分子として分子置換法により初期構造を得、結晶学的構造精密化を進めた。分子置換法の計算法と構造精密化の手順はII型結晶の場合と同様である。各結晶の分子置換法の計算に用いた反射の面間隔、及び解の相関係数の値は Table 4 にまとめて示してある。

VII型の構造精密化の過程では初期構造の Asp 28 から Asp 37 部分の電子密度は現れず、この領域の構造がII型結晶構造とは異なることが示唆された。そのため、最初にこの領域を初期構造から除き、構造精密化の過程で新たにモデルを組み立てた。面間隔 $10 - 1.8 \text{ \AA}$ の $R = 0.239$ の段階で、Asp 29、Val 30、Asn 32 及び Asp 37 に囲まれた領域に球状の独立した電子密度が見いだされた。その電子密度の周囲には 6 個の原子が正八面体型に存在しており、それらの原子と球状電子密度の中心との距離は 2.3 から 2.5 \AA であった。こうした周囲の環境と結晶化条件から、球状の電子密度は Ca^{2+} イオンであると判断した。占有率を 1.0 とした時の温度因子は 20.0 \AA^2 に収束した。また、2'-AMP 分子も電子密度に従い同時にその構造モデルを導入した。

VIII型結晶構造の精密化においては、面間隔 $10.0 - 1.8 \text{ \AA}$ で $R = 0.221$ の段階で、3'-AMP 分子全体の電子密度が明確に現れたため、電子密度に従い構造モデルを導入した。

3 結果

3-1 RNase U_2 一次構造の修正

Figure 4 に示すII型結晶での電子密度から、残基 49 は Glu または Gln、残基 50 は Asp または Asn であることが示唆されたが、その傾向は残基 49 周辺の電子密度が明瞭でないIII型結晶を除くすべての結晶型でみられた。Figure 5 に RNase U_2 と類似の RNase のアミノ酸配列を並べたものを示す。類似の RNase では塩基と二つの水素結合を形成する Glu と塩基認識部位の底部に位置する Tyr (細菌由来の RNase では Phe) が共通に保存されている。RNase U_2 が Glu 49 の配列を持つとすると、2 残基の挿入を考えると、RNase U_2 の塩基認識部位の Glu を類似の RNase のものと良く一致させることができる。また Asp 50 とすると、VII型の結晶構造において残基 50 側鎖と隣接分子の Gln 5 の主鎖の窒素原子との水素結合を合理的に説明できる。

こうした知見に基づき、RNase U_2 の残基 44 から 53 のペプチドフラグメントの配列がエドマン分解法により改めて決定された。その結果、残基 49 と 50 の配列は Glu - Asp であることが確認された (Kanaya & Uchida, 1995)。

Figure 5. Comparison of base-recognition site sequences of fungal and bacterial ribonucleases.

RNase	Source	Base preference	Base-recognition site sequence*			Amino acid identity to (%)	
						RNase U ₂	RNase T ₁
Fungi			45	50	55		
U ₂	<i>Ustilago sphaerogena</i>	A > G	Y Y D E A S	E D I T L - -	C C	100	28
U ₁	<i>Ustilago sphaerogena</i>	G	Y N N Y - -	E G F D F S D Y C		44	48
F ₁	<i>Fusarium moniliforme</i>	G	Y N N Y - -	E G F D F P - -	V	32	59
Ms	<i>Aspergillus saitoi</i>	G > A	Y H D Y - -	E G F D F P - -	V	30	65
T ₁	<i>Aspergillus oryzae</i>	G	Y N N Y - -	E G F D F S - -	V	28	100
Bacteria							
Ba	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G	F S N R - -	E G K L P G K		< 10	< 10
Sa	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	G	F Q N R - -	E S V L P T Q		< 10	< 10

* The numbering is based on the sequence of RNase U₂.

Reference: U₂ (Kanaya & Uchida, 1986; Kanaya & Uchida, 1995), U₁ (Takahashi & Hashimoto, 1988), F₁ (Hirabayashi & Yoshida, 1983), Ms (Watanabe *et al.*, 1982), T₁ (Takahashi, 1985), Ba (Hartley & Barker, 1972), Sa (Shlyapnikov *et al.*, 1986)

3-2 異常分散効果を用いた結晶構造の検討

分子置換法は初期構造として別の蛋白質分子を使用している。したがって、初期構造の影響が結晶構造解析の最終結果にまで残り、最後まで構造モデルの誤りを修正できない可能性がある。しかし、分子置換法による解析とは独立な事象から得られる情報と分子置換法で得られた構造に矛盾がなければ、結晶構造解析が正しく進められ構造も正しいものと考えることができる。そこで RNase T₁ を初期構造として構造解析を進めた II 型結晶について、白金誘導体結晶の白金の位置と硫黄の異常分散効果を利用して求められる硫黄原子の位置が RNase U₂ II 型結晶構造と矛盾がないかを検証した。

$(F_{\text{pl}} - F_{\text{native}})$ (F_{pl} は II 型白金誘導体結晶の構造振幅の観測値、 F_{native} は II 型結晶の構造振幅の観測値) を係数とするフーリエ図では、白金原子の位置を示すと考えられる顕著なピークが Cys 1 S_γ の近傍に得られた (Figure 6(a))。その位置には波長 1.0713 Å における構造振幅と II 型結晶構造から計算した位相による Bijvoet difference フーリエ図 (Figure 6(b))、及び波長 1.0713 Å と 1.0723 Å の構造振幅の差と II 型結晶構造から計算した位相による dispersive difference フーリエ図 (Figure 6(c)) においてもピークが現われており、白金原子が存在していることを強く示している。波長 1.0713 Å の回折データを用いて構造精密化を行った結果、白金原子の占有率は 0.124、温度因子は 27.4 Å² に収束した。この白金原子は RNase U₂ の分子表面に露出している Cys 1 S_γ から 2.1 Å の距離にあり、Cys 1 S_γ に結合していると考えられる。Figure 6 に示すように白金原子から 2.1 Å のところにも小さなピークが存在しており、より占有率の小さい白金原子の結合位置が存在する可能性が考えられる。

Table 6 に II 型ネイティブ結晶のフリーデル対の反射の統計を示す。波長 0.9000 Å では、S 原子の異常分散効果の虚数項 f'' は 0.198 electron (Sasaki, 1989) と小さいが、フリーデル対の反射の構造振幅の違いは構造振

幅の誤差よりも大きく、硫黄原子の異常分散効果が観測できていることを示唆している。フリーデル対の構造振幅の差を硫黄原子を除いた構造モデルで位相付けしたフーリエ図では、RNase U₂ に 3 個存在するジスルフィド結合部の位置すべてに硫黄原子の位置を示すピークが現われた (Figure 7)。Cys 1 - Cys 54 のジスルフィド結合部のピークの高さは 3.5σ であり、Cys 55 - Cys 96 の 4.0σ や Cys 9 - Cys 113 の 5.0σ に比べて低い。これは、分子内部に存在する Cys 55 - Cys 96、Cys 9 - Cys 113 のジスルフィド部の平均温度因子が共に 7.6 \AA^2 であるのに対し、分子表面に存在する Cys 1 - Cys 54 のジスルフィド結合部の平均温度因子は 8.3 \AA^2 と大きく、硫黄原子の熱振動が大きいとためと考えられる。

このように白金原子の位置と硫黄原子の位置が精密化された構造と良く対応することは、精密化された構造と実際の結晶構造が一致することを強く示している。

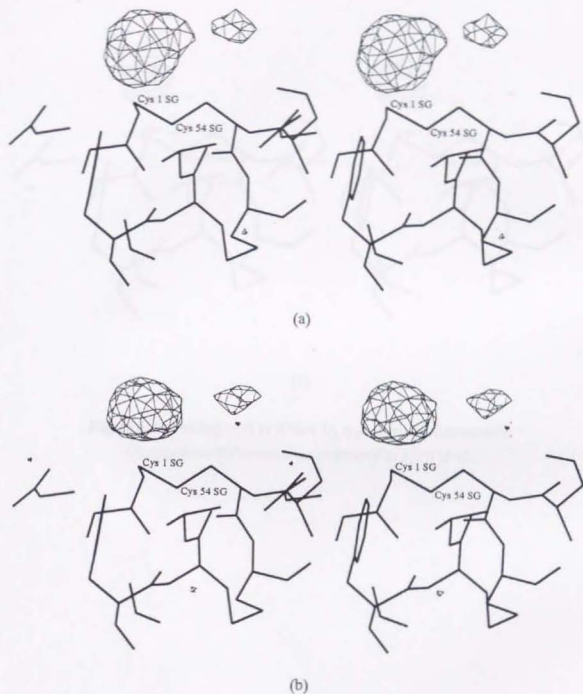
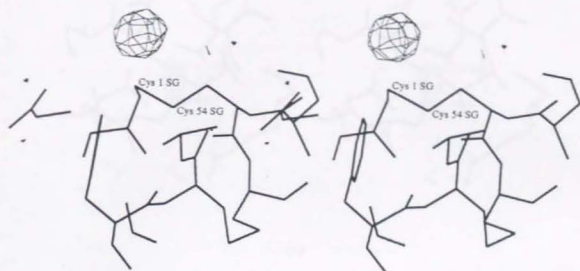


Figure 6. Pt-binding sites in RNase U₂ type II crystal.

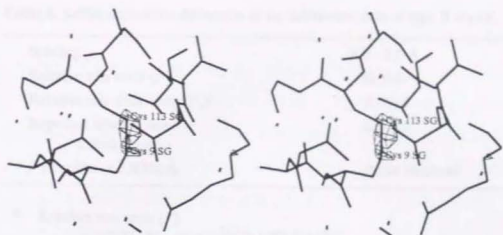
(a) Difference map contoured at 5.0 σ level (b) Bijvoet difference map contoured at 3.5 σ level. σ is standard deviation of the map.



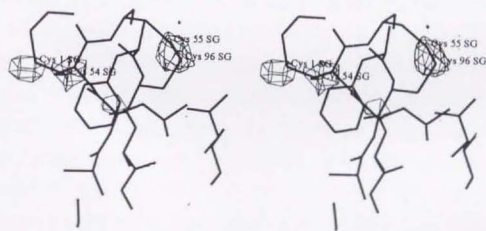
(c)

Figure 6. Pt-binding sites in RNase U₂ type II crystal (continued).

(c) dispersive difference map contoured at 3.0 σ level.



(a)



(b)

Figure 7. Bijvoet difference maps at the disulfide bonds in RNase U₂ type II crystal.

Reflections between 8.0 Å and 2.5 Å spacings were used in the calculation of the map. (a) Cys 9 - Cys 113, contoured at 3.0 σ , (b) Cys 55 - 96 and Cys 1 - Cys 54, contoured at 2.5 σ . σ is a standard deviation of the map.

Table 6. Sulfur anomalous difference of the diffraction data of type II crystal.

Spacing	8.0 - 2.5 Å
Relative rms error (F)*	0.0147
Relative rms difference (F_z)†	0.0169
Expected relative rms difference (F_z)	0.0035
f'' of sulfur at 0.9000 Å	0.198 electron [‡]

* Relative rms error (F)

$$= ((\Sigma \Sigma (F_i(\mathbf{h}) - \langle F(\mathbf{h}) \rangle)^2)^{1/2}) / (\Sigma \Sigma F_i(\mathbf{h})^2)^{1/2}$$

† Relative rms difference (F)

$$= 2 (\Sigma (F_i(\mathbf{h}) - F(\mathbf{h}))^2)^{1/2} / (\Sigma (F_i(\mathbf{h})^2 + F(\mathbf{h})^2))^{1/2}$$

F_i, F . Friedel pair of structure amplitudes.

‡ Sasaki, 1989.

3-3 RNase U₂ の全体構造

RNase U₂ の各結晶型の精密化後の構造の統計を、Table 7 にまとめて示す。RNase U₂ はII型とIII型は硫酸イオンと、VII型は 2'-AMP 及び Ca²⁺ イオンと、VIII型は 3'-AMP と複合体を形成している。II型の Asp 45 は isoAsp に異性化しており、III型の Glu 46 から Glu 49 は電子密度が低くモデルを組み入れていない。Figure 8 に RNase U₂ VII型の全体構造を、Figure 9 に二次構造の模式図を示す。7 種の結晶構造でほぼ共通な構造モチーフとして、N 末から 2 本鎖βシート (Gln 5 - Cys 9, Asn 12 - Ser 15)、4.4 回転のαヘリックス (Asn 16 - Asn 32)、5 本鎖βシート (His 41 - Tyr 43, Trp 60 - Ile 65, Asp 84 - Gln 89, Glu 94 - His 101, Phe 110 - Cys 113) があり、αヘリックスとβ鎖がほぼ直交した形で積み重なっている。さらに 1 回転の 3₁₀-ヘリックス (Ala 47 - Glu 49) と、分子表面に突き出たβヘアピン (Ser 74 - Asn 77) が存在する。ジスルフィド結合は Cys 1 - Cys 54, Cys 9 - Cys 113 及び Cys 55 - Cys 96 の組み合わせで形成されていることは電子密度からも確認された。8 個のプロリンのうち残基 40、59 と 70 の 3 個が *cis*-プロリンである。すべてのアミノ酸残基の主鎖のねじれ角は Ramachandran プロットで許容される範囲内に存在している。Asp 37, Asn 38 と Asn 68 は左巻きαヘリックスのコンフォメーションをとっており、すべて分子表面の折り返し構造を形成している。

二次構造を形成するアミノ酸の主鎖原子を用いて RNase U₂ を RNase T₁ に重ね合わせた場合、原子位置のずれの根二乗平均 (rms) は 1.02 Å である。アミノ酸配列の一致度が 28 % と低く、構成アミノ酸残基数も RNase U₂ の方が 10 % も多いにもかかわらず低い値である。Figure 10 に RNase U₂ と RNase T₁ の重ね合わせ図を、Figure 11 に立体構造に基づいて RNase U₂ と T₁ のアミノ酸配列を並べたものを示す。RNase U₂ とモデル分子である RNase T₁ との構造の大きな違いは、αヘリックス C 末部、Asp 45 から Glu 49 の領域、Ser 74 から Asn 77 の領域、及び分子表面のループ構造部に存在する。RNase

U_2 の α ヘリックスは RNase T_1 のそれに比べて C 末部分で Asp 34 から Asp 37 のループ部の方向に約 10° 折れ曲がっている。これは RNase U_2 では α ヘリックス C 末部につながる Asp 34 から Asp 37 の領域が RNase T_1 に比べて 2 残基短いためである。RNase U_2 の Ala 47 から Glu 49 の 3_{10} -ヘリックスに対応する部分には RNase T_1 では Asn 44 から Gly 47 の β ターン I 型構造が存在している。RNase U_2 の分子表面に突き出た Ser 74 から Asn 77 の β ヘアピン構造は RNase T_1 をはじめとする類縁の RNase には全く存在していない。

Figure 12 に II 型から VIII 型の 7 種の結晶構造を重ねあわせたものを、Figure 13 に重ね合わせた結晶構造間の原子位置の変異を残基番号に沿って表したグラフを示す。二次構造を形成する部分は良く重なっており結晶構造間の変差は小さい。しかし、分子表面に存在する特定の領域、すなわち α ヘリックス C 末部の Asp 28 から Asp 37、Asp 45 から Glu 49、Ser 74 から Asn 77、Ala 105 から Gly 109 の領域では結晶構造間の変異は顕著である。これら変異の大きい領域は Figure 14 に示すように、温度因子の大きな部位に対応している。結晶内分子間接触の様式や分子間接触に関与する残基は付表に示す通り 7 種の結晶構造で多様である。すなわち、必ずしも特定の領域が結晶内分子間接触に関与しているわけではないにも関わらず、温度因子が大きく揺らぎが大きいと考えられる領域に結晶構造間の変差が局在しているのである。したがって、蛋白質の結晶構造間で変差がどの領域に生じるかを決定する主たる要因はその蛋白質構造がもつ揺らぎやすさであると考えられる。

Table 8 に結晶構造間の変異が特に大きい部分を除いて各結晶構造間の根二乗平均変差 (rmsd) を計算したものを示す。主鎖原子のみを使用した場合にはその値は $0.43 - 0.67 \text{ \AA}$ 、すべての原子を考慮した場合は $0.84 - 1.19 \text{ \AA}$ である。この主鎖原子位置の変異は Luzzati plot から見積もられる各構造の座標の誤差の値 $0.13 - 0.25 \text{ \AA}$ より大きい。この事実は RNase U_2 の立体構造は pH、イオン強度、誘電率等の溶液の物性や結晶内分子間接触によって、蛋白質分子内部の残基も含めた分子全体の主鎖原子位置も rmsd で 0.4 \AA 程度

は変化し得る柔軟なものであることを示している。

蛋白質内部に埋もれている残基では、Val 86 と Ile 87 の各側鎖のコンフォメーションに結晶型間で変異がみられた。Val 86 は分子表面からは約 7 Å 内部にある残基で、Ile 19、Ala 22、Leu 65 及び Thr 95 の各側鎖に囲まれた疎水的な環境に存在する。Val 86 側鎖は、III型からVII型の結晶構造では χ^1 は 60° 近辺の値であるが、II型では $\chi^1 = 54^\circ$ (占有率 0.6)、 -62° (占有率 0.4) の二つのコンフォメーションをとっており、どちらのコンフォマーも周囲の原子と合理的なファンデルワールス接触距離内にある。Ile 87 側鎖は、Tyr 43、Leu 53、Glu 62 及び Val 99 の各側鎖に囲まれた領域に存在する。Ile 87 の χ^2 の値は、II、III、IV、V及びVI型では 142° から 184° の範囲内に分布しているが、VII型では -53° 、VIII型では占有率が共に 0.5 である -54° と 175° の二つの値をとっている。

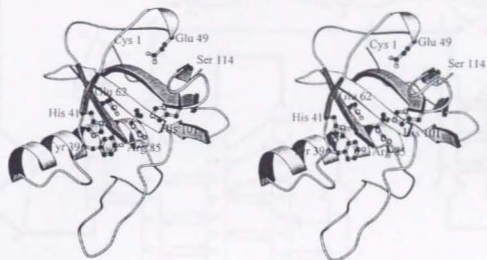


Figure 8. Stereo view of the ribbon drawing of RNase U₂ type VIII crystal.

The side-chains of the catalytic and base-recognition residues are drawn with ball-and-stick model. C, N, and O atoms are drawn with black, dark gray, and white spheres, respectively.

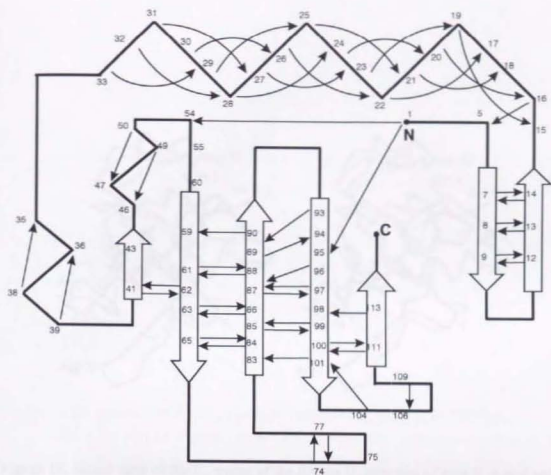


Figure 9. Schematic drawing of the secondary structure of RNase U₂.

Amino-acid residues are indicated with the residue numbers. Large white arrows represent the β -strand. Hydrogen-bonds from main-chain N atoms to main-chain O atoms are shown with thin arrows.

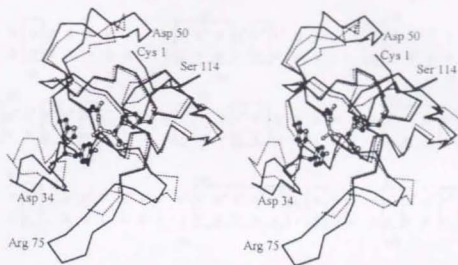


Figure 10. Stereo view of the C_{α} traces of the RNase U_2 structure of type II crystal and RNase T_1 .

The C_{α} trace (solid line) for the RNase U_2 structure of type II crystal is superposed on the C_{α} trace (dotted line) for the RNase T_1 structure (Arni *et al.*, 1988). The RNase U_2 side-chains of the catalytic site residues as well as the sulfate ion are also shown.

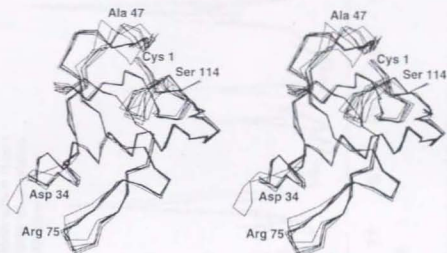


Figure 12. Comparison of the overall structures of RNase U₂ type II, III, IV, V, VI, VII, and VIII crystals.

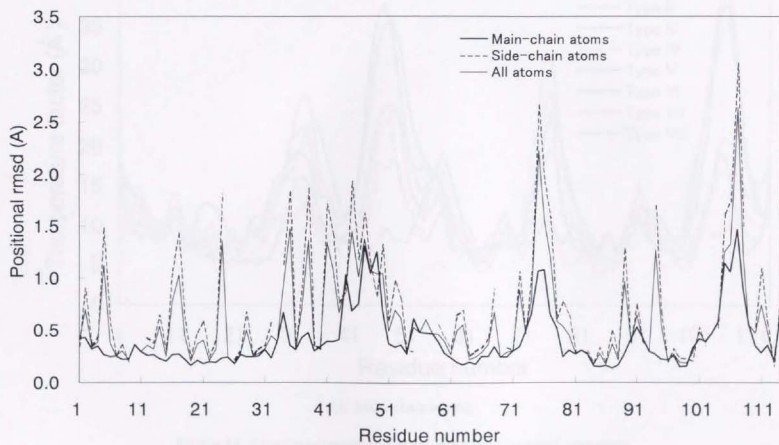
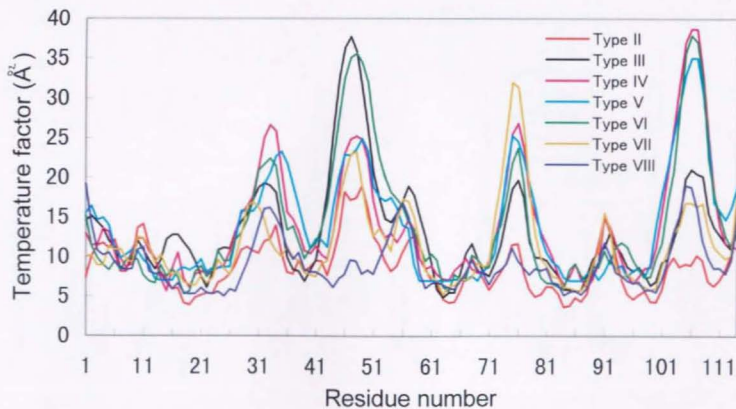
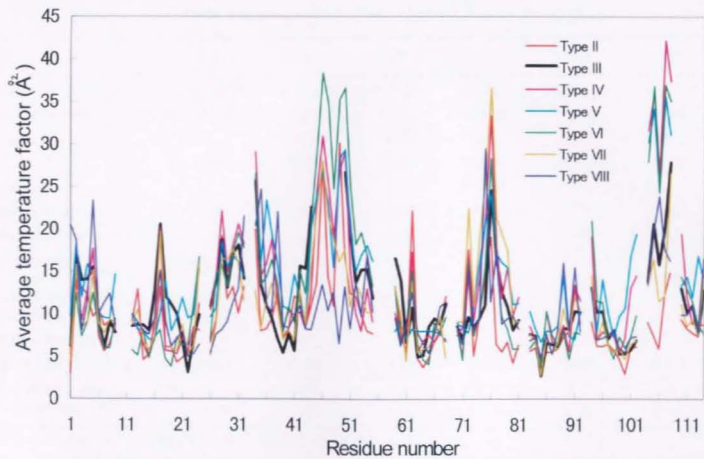


Figure 13. Positional root-mean square difference of RNase U₂ crystal structures along the residue numbers.



(a) Main-chain atoms.

Figure 14. Average temperature factors of RNase U₂ crystal structures.



(b) Side-chain atoms.

Figure 14. Average temperature factors of RNase U₂ crystal structures (continued).

Table 7. Statistics of the refined crystal structures of RNase U₂.

Crystal type	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Spacing (Å)	8.0 - 1.8	8.0 - 1.8	8.0 - 2.0	5.0 - 2.5	6.0 - 2.0	8.0 - 1.8	10.0 - 1.8
Number of reflections	9,807	7,206	5,042	2,934	5,218	8,861	8,859
Completeness (%)	96.5	74.6	73.5	90.2	88.5	90.2	91.2
R factor	0.143	0.198	0.150	0.249	0.191	0.185	0.164
Structural model							
Number of Protein atoms	879	850 [†]	875	870	870	870	871
Number water molecules	141	103	120	19	48	92	102
Bound ligands	SO ₄ 1	SO ₄ 1				Ca ²⁺ 1 2'-AMP 1	3'-AMP 1
Residues with multiple conformers	Val 86 Tyr 107	-	His 41	-	-	-	Ile 87
Rmsd from the ideality							
Bond length (Å)	0.014	0.016	0.016	0.010	0.019	0.017	0.017
Bond angle (degree)	1.1	1.0	1.6	1.8	1.9	1.4	0.8
Estimated coordinate error * (Å)	0.13	0.16	0.15	0.25	0.18	0.16	0.16

* Coordinate error is estimated by the method of Luzzati (1952).

† Residues from Glu 46 to Glu 49 are not included in the structural model of type III crystal, because of their poor electron densities.

Table 8. Positional rmsd between RNase U₂ crystal structures.

Crystal type	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
II		1.00	1.01	1.13	1.11	1.19	0.93
III	0.47		0.88	0.90	0.96	0.98	1.08
IV	0.43	0.45		0.89	0.93	0.84	1.00
V	0.56	0.57	0.53		1.03	0.94	1.04
VI	0.59	0.53	0.61	0.67		1.18	0.88
VII	0.64	0.55	0.42	0.67	0.77		1.12
VIII	0.47	0.49	0.52	0.57	0.42	0.62	

Upper-right off-diagonal region shows the rmsd of all atoms, and lower-left off-diagonal region shows that of main-chain atoms. The unit is in Å. Because of large conformational differences among 7 crystal structures, the following regions are excluded from the calculation: Asp 45 to Glu 49 in type II crystal structure, Glu 46 to Glu 49 in type III crystal structure, Asp 28 to Asp 37 in type VII crystal structure, Ala 105 to Gly 109 in all crystal structures. Side-chains of multiple conformers are also excluded.

3-4 結晶構造に共通に存在する水分子

ヌクレオチドの結合していないII、III、IV、VとVI型の結晶構造のうちV型を除くものは2.0 Å以上の分解能で溶媒分子も含めて構造精密化されている。II、III、IV及びVI型の結晶構造を蛋白質の主鎖原子を用いて重ね合わせたとすると、20個の水分子は原子位置のずれが1 Å以内でRNase U₂の共通の部位に結合しているのを発見した。Figure 15に、共通に存在する水分子を示す。多くの水分子は蛋白質表面にある残基間の間隙に埋められるように存在している。これらの水分子は結晶化がおこなわれた溶媒条件が多様であるにも関わらずRNase U₂の共通の部位に結合していることから、RNase U₂の立体構造を構築する必須の要素と考えられる。

これらの水分子(Wat)のうち最も深く埋もれているものはWat 302、Wat 303及びWat 309である(水分子の残基番号はII型構造のもの)。Figure 16に示す通り、これらの水分子は、αヘリックスN末部とPro 64からTyr 71のループ構造部に挟まれた直径約4 Å、深さ約6 Åのチャンネル状の間隙に存在しており、V、VII及びVIII型結晶にも同じく存在する。Wat 302はチャンネル状間隙の最奥部に位置し、ループ構造部のPro 64 O、Tyr 71 N、及び同じ間隙内のWat 303と水素結合している。Wat 303はαヘリックスのAsp 18 O、ループ構造部のVal 66 O及びWat 302と水素結合を形成し、αヘリックスとループ構造部をつなぎ合わせる役目を果たしている。チャンネル状間隙の入り口付近に存在するWat 309はαヘリックスのAsp 18 O₂及びGly 69 Nと水素結合しており、Wat 302と同じくαヘリックスとループ構造部をつなぎ合わせている。RNase U₂に類似するRNase T₁においても、このチャンネル状間隙に相当する領域は4個の水分子によって満たされている(Malin *et al.*, 1991; Pletinckx *et al.*, 1994)。このことは、これら分子内部に深く埋もれた水分子は1本のαヘリックスとβシートから成るRNase T₁ファミリーに属する蛋白質の立体構造の共通する構築要素な要素であることを示している。

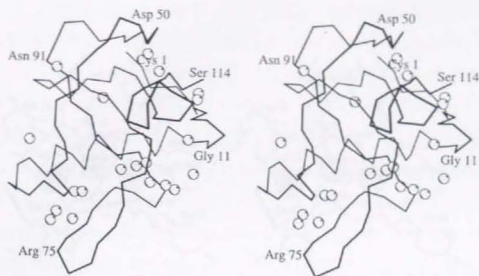


Figure 15. Water molecules commonly observed in RNase U₂ type II, III, IV, and VI crystal structures.

Water molecules are drawn with white spheres.

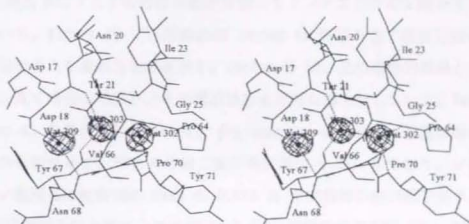


Figure 16. Stereo view of the water molecules deeply buried inside the RNase U_2 molecule.

Hydrogen bonds are drawn with dotted lines. Waters 302, 303, and 309 are located in the crevice between the α -helix (upper side) and the long loop from Pro 64 to Tyr 71 (lower side). The model with the buried water molecules are superposed on the $F_o - F_c$ difference Fourier map contoured at 3.5 times the rms value. In the preparation of the map, the model without the water molecules was subjected to 5 cycles of the PROLSQ refinements, and resultant phases were used in the Fourier synthesis.

3-5 II型結晶 isoaspartate 45 の構造

II型結晶の isoAsp 45 は Figure 17 に示すように、まず Asp 45 側鎖と Glu 46 N が脱水縮合してスクシンイミドが生じ、次にスクシンイミドの Asp 45 主鎖由来のアミド結合部が加水分解してイソアスパラギン酸が生じたと考えている。Figure 18 にII型結晶の isoAsp 45 周辺の電子密度に精密化された構造モデルを重ねたものを示す。IsoAsp 45 は、その前後の残基と共に電子密度に良く適合しており、その構造統計も良好な値を示している。Table 9 に isoAsp 45 の結合長とねじれ角を β -L-aspartyl-L-alanine 結晶構造の値と比較したものを示す。結合長の根二乗平均変差は 0.011 \AA であり、II型の他のアミノ酸残基の結合長の rmsd の 0.014 \AA と同程度の低い値である。IsoAsp 45 の温度因子は主鎖部分で平均 14.3 \AA^2 、側鎖部分で平均 12.1 \AA^2 である。主鎖のねじれ角 θ と θ' は β -L-aspartyl-L-alanine の値に近く、このコンフォメーションはペプチド鎖中の isoAsp の安定なものの一つと考えられる。側鎖のねじれ角 θ'' は両者で異なっているが、isoAsp 45 の $\theta'' = 44.5^\circ$ は、隣接原子間との接触が最も少なく、内部回転エネルギーが低いコンフォメーションの一つである。Figure 19 に isoAsp 45 周辺の構造を示す。IsoAsp 45 の側鎖の O_1 原子は、隣接蛋白質分子の Asp 37' O_{62} と Tyr 78' O_{61} とそれぞれ 2.5 \AA 、 2.6 \AA の水素結合を、 O_2 原子は Ala 47 N と 3.0 \AA の水素結合を形成している（隣接分子の残基は ' をつけて区別する。以下同じ）。IsoAsp 45 には Wat 348 と Wat 330 の二つの水分子が水素結合している。Wat 348 は isoAsp 45 O_2 と Tyr 44 O とそれぞれ 3.2 \AA の距離で水素結合を形成している。Wat 330 は isoAsp 45 O_6 、Tyr 43 O_6 、Ile 51 O とそれぞれ 2.7 \AA 、 2.8 \AA 、 2.8 \AA の距離で水素結合を形成している。これらの水素結合が isoAsp 45 のコンフォメーションの安定化に寄与している。以下では、isoAsp 45 を持つ RNase U_2 を RNase U_2C と呼んで区別する。

Figure 20 に、isoAsp 45 への異性化反応が起きているII型結晶と起きているIII型結晶の Tyr 43 から Ile 51 の領域の構造を同じ方向から見たものを

示す。両者を比較すると Tyr 43 及び Ile 51 の各側鎖はほぼ同じコンフォメーションであるが、Tyr 44 から Asp 50 の領域の主鎖と側鎖のコンフォメーション及びそれらの空間的な配置に違いが見られる。Tyr 44 から Asp 50 の領域は、Ⅶ型結晶構造には Glu 46 O と Glu 49 N 間、Ala 47 O と Asp 50 N 間の二つの水素結合で特徴付けられる Ala 47 から Glu 49 の 3_{10} -ヘリックスが存在するが、Ⅱ型結晶構造には 3_{10} -ヘリックスはなく、代わって isoAsp 45 O₁ と Ala 47 N 間、Ser 48 O₁ と Ile 51 N 間に二つの水素結合が形成されている。こうした主鎖構造の違いにより Glu 46、Ser 48、Glu 49 及び Asp 50 の側鎖の向きはⅡ型とⅦ型でほぼ反対方向である。Glu 46、Ser 48 及び Glu 49 は、Ⅶ型では後述するように Figure 20 の紙面奥方向にある塩基認識部位に向かって延びているが、Ⅱ型では塩基認識部位とは反対の分子外側を向いている。Asp 50 はⅡ型結晶では塩基認識部位の方向を向いているが、Ⅶ型結晶では塩基認識部位の正反対の分子外側を向いている。Ⅱ型とⅦ型結晶の Tyr 44 から Asp 50 の領域で最大の変差を示す残基は Glu 46 であり、その原子位置の変差は C_α 原子で 6.7 Å、C_γ 原子では 12.2 Åである。

残基 45 が Asp であるⅣ、Ⅴ、Ⅵ及びⅦ型結晶では Tyr 44 から Asp 50 の領域はⅦ型結晶とほぼ同一のコンフォメーションであることから、Ⅱ型とⅦ型結晶構造間にみられる Tyr 44 から Asp 50 の領域の構造変差は、isoAsp 45 への異性化に起因すると考えられる。IsoAsp への異性化による構造変差が Tyr 44 から Asp 50 の領域に局在しているのは、その領域が溶媒領域に露出しており他の蛋白質部分との相互作用が少ないため、及びその領域の両端の Tyr 43 と Ile 51 の側鎖は分子内部の残基との多くのファンデルワールス接触によりコンフォメーションが固定されているためと考えられる。

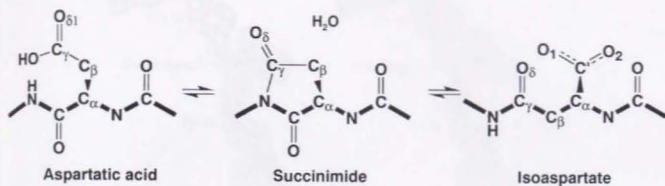


Figure 17. Isomerization of aspartic acid.

Atoms are indicated with their corresponding labels. The bonds in the main chains are drawn with bold lines.

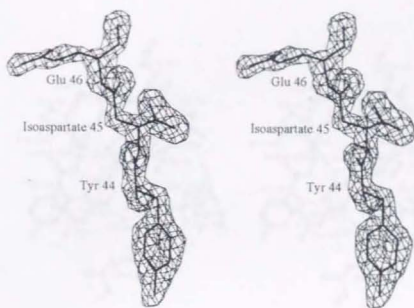


Figure 18. Stereo view of the $F_o - F_c$ difference Fourier map at the residues from 44 to 46 of RNase U₂.

In the calculation of the map, coordinates for a model without the residues from 44 to 46 were shaken by moving all atoms at random up to 0.25 Å. Then the shaken model was subjected to 5 cycles of the PROLSQ refinements. The map was phased with the model thus refined, and was contoured at 3.0 times the rms value of electron densities. The final model with the isoaspartate structure is superposed on the map.

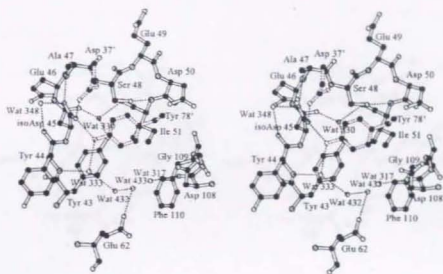
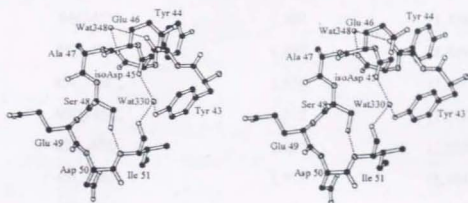
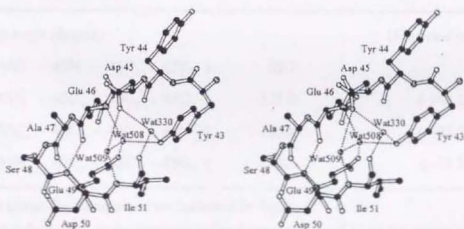


Figure 19. Stereo view of the structure around isoAsp 45.

C, N, and O atoms are drawn with black, dark gray, and light gray spheres, respectively. Hydrogen bonds are drawn with dotted lines. Residues of the neighboring protein molecule are indicated with primed numbers and are drawn with dotted lines.



(a)



(b)

Figure 20. Comparison between the structures around residues 45 in type II and type VII crystals.

(a) Type II with isoAsp 45, (b) type VIII with normal Asp 45. C, N, and O atoms are drawn with black, dotted gray, and white spheres, respectively. Hydrogen bonds are drawn with dotted lines.

Table 9. Bond distances and torsion angles for isospartate 45 in RNase U₂.

Bond distance* (Å)		(Target value [†])
44C-45N	1.304	(1.320)
45N-45C _α	1.499	(1.489)
45C _α -45C _β	1.516	(1.535)
45C _β -45C _γ	1.512	(1.518)
45C _γ -45O ₅	1.232	(1.235)
45C _γ -46N	1.353	(1.344)
45C _α -45C'	1.528	(1.530)
45C'-45O ₁	1.251	(1.256)
45C'-45O ₂	1.247	(1.251)
rms deviation	0.011	

Torsion angle (degree)		(Reported values [‡])
ϕ (44C - 45N - 45C _α - 45C _β)	69.7	
θ^1 (45N - 45C _α - 45C _β - 45C _γ)	-171.0	(-168.2)
θ^2 (45C _α - 45C _β - 45C _γ - 46N)	-132.8	(-122.5)
θ' (45N - 45C _α - 45C - 45O ₁)	44.5	(-12.2)

* Atom names for isospartate are indicated in Figure 17.

† Target values used in the structure refinement are derived from the crystal structure of β-L-aspartyl-L-alanine (Görbitz, 1987).

‡ Reported values for the torsion angles are also from the β-L-aspartyl-L-alanine structure.

3-6 RNase U_2 と 3'-AMP の相互作用

VIII型結晶では、酵素反応産物の 3'-AMP が RNase U_2 と複合体を形成している。Figure 21 に RNase U_2 と 3'-AMP との複合体の全体構造を、Figure 22 に 3'-AMP の電子密度図を示す。3'-AMP は、Tyr 44 と Asp 109 の間から触媒部位にかけて存在する RNase U_2 分子表面の幅約 9 Å の溝に沿って結合している。3'-AMP のねじれ角を Table 10 に示す。3'-AMP はグリコシル結合のねじれ角 $\chi = 31.1^\circ$ の *syn* の配置をとり、リボースのバックリングは C_{β} -endo である。リボース O_5' は、リン酸基の $O1P$ と 2.9 Å の分子内水素結合を形成している。温度因子はアデニン塩基部分が平均 7.9 Å²、リボース部分が 10.7 Å²、リン酸基部分が 12.1 Å² と、塩基からリン酸基に向かうにしたがって値が大きくなっており、分子の熱振動が大きくなることを示している。

Figure 23 に 3'-AMP 結合部位周辺の構造を示す。3'-AMP のアデニン塩基は Tyr 44、Glu 49 及び Asp 108 に囲まれた領域に結合している。Table 11 に 3'-AMP と RNase U_2 間に形成されている水素結合を示す。アデニン塩基と RNase U_2 との水素結合は、Glu 46 側鎖とアデニン N_6 及び N_1 原子との間に 2 個、Tyr 44 主鎖の N 及び O 原子とアデニン N_7 及び N_6 原子間に 2 個の計 4 個形成されており、これらの水素結合がアデニン塩基の特異的認識を担っている。アデニンと 2 個の水素結合を形成する Glu 49 側鎖のカルボキシル基の平面、すなわち Glu 49 C_1 、 C_6 、 O_{e1} 、 O_{e2} の 4 原子の最適平面と、アデニン塩基の平面は 24.7° の角度をなしている。Asp 108 O はアデニン C_2 と 3.3 Å の距離にある。塩基認識部位の底部には Tyr 43 と Phe 110 の各側鎖が存在し、アデニン塩基とファンデルワールス接触している。アデニン塩基の溶媒領域側には、Glu 46 の側鎖とそれに水素結合で連なる Wat 537 と Wat 538 が存在し、アデニン塩基を覆っている。Glu 46 O_{e2} と Wat 537 の距離は 2.8 Å、Wat 537 と Wat 538 の距離は 2.8 Å である。Glu 46 側鎖のカルボキシル基の原子、Wat 537 及び Wat 538 はほぼ同一平面上に位置し、各原子の平面からの rmsd は 0.10 Å である。その平面とアデニン塩基が成す角度は

3.2° とほぼ平行である。Glu 46 側鎖のカルボキシル基とアデニン塩基の平面との距離の平均は 3.3 Å、Wat 537 及び Wat 538 とアデニン塩基との距離はそれぞれ 3.2 Å である。こうした構造上の特徴から、Glu 46 側鎖はいわば塩基認識部位の蓋に相当すると考えられる。RNase U₂ の Glu 46 に立体構造上対応する位置に存在し、結合した塩基の表面を覆っている残基は、類似の微生物由来 RNase にも存在している。カビ由来の RNase では Tyr (T₁ では Tyr 45 (Gohda *et al.*, 1994)、F₁ では Tyr 45 (Vassilyev *et al.*, 1993)、Ms では Tyr 44 (Nonaka *et al.*, 1993)) であり、細菌由来の RNase では Arg (Barnase では Arg 59 (Buckle & Fersht, 1994)、RNase Sa では Arg 40 (Sevcik *et al.*, 1993)) である。

Glu 49 近傍には三つの水分子、Wat 508、Wat 509 及び Wat 330 が位置して、Tyr 44 から Glu 49 で形成される塩基認識部位の構造安定化に寄与している。Wat 508 は塩基認識部位の底に位置する Tyr 43 O_n と 2.9 Å、Glu 46 N と 2.9 Å、Wat 509 と 2.9 Å の距離で水素結合している。Wat 509 は、Asp 45 O₈₂ と 3.4 Å の、Ile 51 N とは 2.7 Å の距離で水素結合している。Wat 330 は Asp 45 O₈₁、Tyr 43 O_n 及び Ile 51 O とそれぞれ 2.9 Å、2.8 Å 及び 2.8 Å の距離で水素結合している。これら三個の水分子に対応する位置には、塩基認識部位にアデニン塩基が結合していない IV 型、VI 型及び VII 型結晶構造でも水分子が存在して同様の水素結合網を形成している。

3'-AMP のリン酸基部分は、Tyr 39、His 41、Glu 62、Arg 85 及び His 101 に囲まれた領域に結合し、His 41 を除く残基の側鎖がリン酸基と水素結合を形成している。このリン酸基の結合している領域が、ホスホジエステル結合の切断が起こる触媒部位と考えられる。溶媒領域側に露出しているリン酸基の O1P 原子は His 101 N₆₂ と水素結合し、His 101 N₆₁ は Gly 109 O と 2.7 Å の距離で水素結合している。同じく溶媒領域側に露出しているリン酸基の O2P 原子は Tyr 39 O_n、Wat 548 及び Wat 549 と水素結合を形成している。リン酸基の O3P 原子は触媒部位の奥の方向を向いているため水分子との相互作用は

なく、Glu 62 $O_{\epsilon 2}$ と Arg 85 N_{ϵ} の両方に水素結合している。Glu 62 $O_{\epsilon 1}$ と Arg 85 N_{ϵ} は、その幾何学的な配置から水素結合は形成されていないが、3.1 Å の距離にあることから静電相互作用をしている可能性が考えられる。

リボース部分と RNase U_2 との相互作用は、リボース 2' 位にのみ見られる。リボース C_2' は Glu 62 $O_{\epsilon 2}$ と 3.1 Å の距離でファンデルワールス接触をしている。リボース O_2' には His 41 $N_{\epsilon 1}$ が水素結合している。His 41 側鎖のもう一つの N 原子、His 41 $N_{\epsilon 2}$ は Wat 347 と 2.7 Å の距離で水素結合しており、Wat 347 は Asp 37 O と 2.5 Å の距離で水素結合している。リボース O_2' は隣接分子の Glu 94' $O_{\epsilon 1}$ との距離が 3.0 Å であるが、その幾何学的配置から水素結合は形成されていないと考えられる。

3'-AMP が結合したⅦ型結晶構造と結合していないⅣ、Ⅵ及びⅦ型結晶構造の塩基認識部位を比較すると、Glu 46 側鎖のコンフォメーションに変差が見られる。塩基認識部位にアデニン塩基が結合していない場合には、分子表面に位置する Glu 46 側鎖の温度因子は 20 から 30 Å² と高く、揺らぎが大きいと考えられる。Glu 46 の側鎖のコンフォメーションは、Ⅳ型やⅦ型の様に分子外側を向いたりⅥ型の様に塩基認識部位の方向の分子内側を向くなど各結晶型で多様である。一方、Ⅶ型結晶では Glu 46 側鎖の温度因子は平均 13.5 Å² に低下している。Figure 14 に示した通り、Ⅶ型結晶のアデニン認識に関与する Tyr 44 から Asp 50 の領域の主鎖原子の平均温度因子も約 9 Å² と、アデニン塩基の結合していない結晶型の値に比べて低下している。このような温度因子の低下は、Ⅶ型結晶の塩基認識部位の残基が前述のようにアデニン塩基と水素結合やファンデルワールス接触を形成して一定のコンフォメーションに安定化されるためと考えられる。

塩基認識部位の幅は Tyr 44 O と Asp 108 O の距離によって表すことができる。この距離はⅦ型では 9.5 Å であるが、分解能 2 Å 以上で精密化されているⅣ、Ⅵ、Ⅶ型では平均 8.9 Å、標準偏差は 0.1 Å である。したがって、アデニン塩基の結合により塩基認識部位の幅は 0.6 Å 拡大する。

RNase U_2 の 3'-AMP 結合部位には、3'-AMP が結合していない結晶型では水分子が結合している。VIII型結晶構造を 3'-AMP が結合していないIV型結晶と比較すると、3'-AMP は RNase U_2 に結合する際に 5 個の水分子を置換していることがわかる。置換される水分子のうち Wat 321、Wat 386 及び Wat 387 の 3 個は 3'-AMP のアデニン塩基部分、Wat 322 はリボース部分、Wat 319 はリン酸基部分に対応している。Figure 24 にVIII型結晶とIV型結晶の塩基認識部位を重ね合わせたものを示す。IV型結晶の Wat 321 は Tyr 44 O と 2.8 Åの、Glu 46 O₂ と 2.9 Åの、Glu 49 O₂ と 2.8 Åの水素結合を形成している。Wat 386 と Wat 387 はそれぞれ Glu 49 O₃ と Tyr 44 N に 3.1 Å、3.3 Åの水素結合を形成している。これら 3 個の水分子はアデニン塩基の N₆、N₁、N₇ 原子の位置に対応しており、塩基認識部位の水分子の構造がアデニン塩基の結合様式を反映していることを示している。3'-AMP のリン酸基とリボース部分により、触媒部位の最奥部にある Glu 62 側鎖は溶媒領域から完全に遮断される。

アミノ酸配列で類縁の RNase T₁ と 3'-GMP の複合体結晶構造 (Gohda *et al.*, 1994) と触媒部位を比較すると、Tyr 39、Glu 62、Arg 85 及び His 101 の側鎖のコンフォメーションは、対応する RNase T₁ の残基とほぼ共通である。これらの残基の C_α とヌクレオチドのリン原子の位置の rmsd は 0.46 Å である。しかし、RNase U_2 には His 41 と Glu 62 の両残基とヌクレオチドとの相互作用様式に RNase T₁ とは異なる特徴がある。RNase U_2 では His 41 の N_{δ1} 原子が触媒部位を向き、3'-AMP のリボース O_{2'} と水素結合しているが、RNase T₁ では His 40 の N_{ε2} 原子がリボース O_{2'} と水素結合している。RNase U_2 の His 41 N_{ε2} は水分子を介して Asp 37 O と水素結合しているが、RNase T₁ の His 40 N_{δ1} は主鎖の二つの酸素原子、Asn 36 O 及び Ser 37 O と水素結合している。したがって、ヌクレオチドが結合している場合 RNase U_2 の His 41の方が対応する RNase T₁ の His 41 よりもコンフォメーションを一定に保つ要因が少ないと考えられる。RNase U_2 の Glu 62 は 3'-AMP のリン酸基とのみ

水素結合を形成しているが、RNase T_1 では 3'-GMP のリボース $O_{3'}$ とリン酸基の両方と水素結合している。この違いは、ヌクレオチドのグリコシル結合のねじれ角 χ に起因する。3'-AMP の χ (31.1°) は 3'-GMP の χ (58.8°) よりも 27.7° 小さく、リボース $O_{3'}$ は触媒部位の奥にある Glu 62 から離れた、より分子表面に近いところに存在している。このためリボース $O_{3'}$ と Glu 62 間に水素結合が形成されていないと考えられる。

ヌクレオチドのリン酸基は RNase U_2 と RNase T_1 では共に二つの His 残基に挟まれており、それらの距離は触媒部位の幅を示している。RNase U_2 の His 41 $N_{\delta 1}$ と His 101 $N_{\delta 2}$ との距離は 7.7 Å、RNase T_1 の His 41 $N_{\delta 2}$ と His 101 $N_{\delta 2}$ との距離は 8.7 Åであり、触媒部位の幅は RNase U_2 の方が 1 Å狭くなっている。

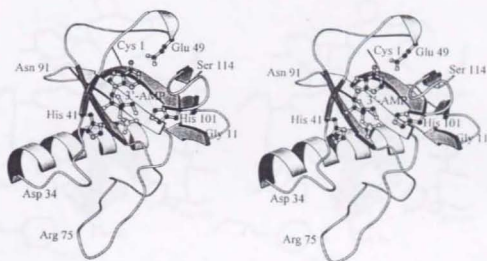


Figure 21. Overall structure of RNase U₂ complexed with 3'-AMP.

The 3'-AMP molecule is shown as a ball-and-stick model. C, N, and O atoms are drawn with black, dark gray, and white spheres, respectively. The P atom is drawn with a larger white sphere.

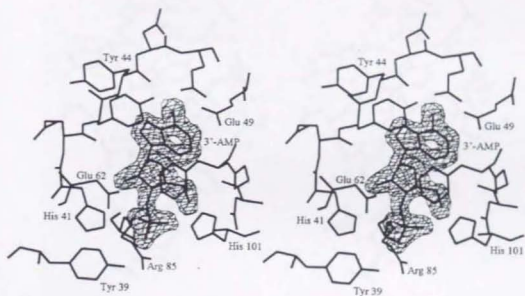


Figure 22. Difference Fourier map for the 3'-AMP molecule bound to RNase U_2 .

The model for the 3'-AMP is superposed on the $F_o - F_c$ difference Fourier map that is contoured at 3.5 times the rms value of electron densities. In the calculation of the map, the model without 3'-AMP was subjected to 5 cycles of the PROLSQ refinements. The phases from the model thus refined was used in the $F_o - F_c$ Fourier synthesis. The structural model for RNase U_2 is depicted for the 3'-AMP model.

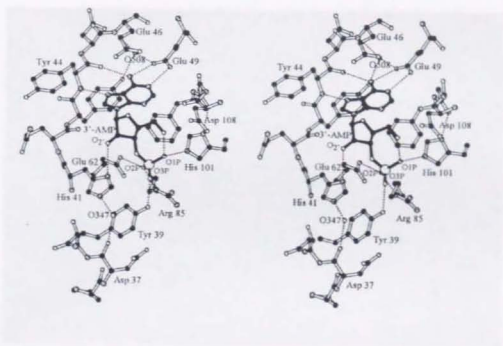


Figure 23. Stereo view of the adenine-recognition and catalytic sites in RNase U₂ complexed with 3'-AMP.

C, N, and O atoms are drawn with black, dotted, and white spheres, respectively. The P atom is drawn with larger white sphere. The covalent bonds in the 3'-AMP molecule are drawn with solid sticks. Hydrogen bonds are drawn with dotted lines.

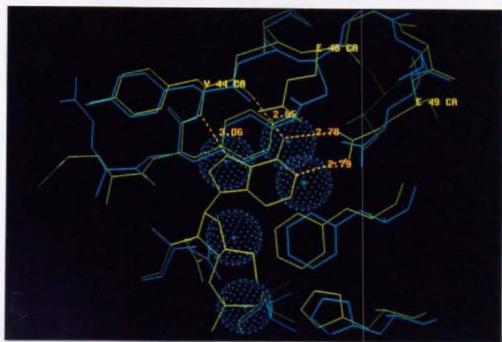


Figure 24. Superposition of the adenine recognition sites of type IV and VIII crystal structures.

Type IV crystal structure is shown with blue lines, and type VIII crystal structure with yellow lines. Water molecules are shown with dotted spheres. Hydrogen bonds are drawn with orange dotted-lines.

Table 10. Conformational parameters for the 3'-AMP molecule bound to RNase U₂.

Backbone torsion angle	
O ₃ -C ₅ -C ₄ -C ₃	-79.9°
C ₅ -C ₄ -C ₃ -O ₃	92.6°
C ₄ -C ₃ -O ₃ -P	-114.2°
Glycosyl torsion angle	
O ₄ -C ₁ -N ₉ -C ₂	31.1° (<i>syn</i>)
Ribose ring torsion angle	
C ₄ -O ₄ -C ₁ -C ₂	6.8°
O ₄ -C ₁ -C ₂ -C ₃	-23.0°
C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	30.5°
C ₂ -C ₃ -C ₄ -O ₄	-27.5°
C ₃ -C ₄ -O ₄ -C ₁	13.0°
Pseudorotation phase angle, <i>P</i> [†]	
	6.4° (C ₃ - <i>endo</i>)

[†] Altona & Sundaralingam, 1972.

Table 11. Possible hydrogen-bond interactions between the 3'-AMP and RNase U₂ molecules.

3'-AMP atom	Protein residue atom*	Interatomic distance (Å)
N ₁	Glu 49 O ₁₂	2.8
N ₆	Tyr 44 O	2.9
	Glu 49 O ₁₁	2.8
N ₇	Tyr 44 N	3.1
O ₂	His 41 N ₀₁	3.0
	Wat 536	2.7
O1P	His 101 N ₁₂	2.5
	Wat 549	3.3
O2P	Tyr 39 O _n	2.5
	Wat 548	3.0
	Wat 549	2.9
O3P	Glu 62 O ₁₁	3.1
	Glu 62 O ₁₂	2.5
	Arg 85 N ₁	3.1

* Water molecules in interaction with the 3'-AMP molecule are also listed with Wat labels and their identification numbers.

3-7 RNase U_2 と 2'-AMP 及び カルシウムイオンとの相互作用

Ⅶ型結晶では RNase U_2 は 2'-AMP 及び Ca^{2+} イオンと複合体を形成している。Figure 25 にⅦ型結晶構造の全体図を、Figure 26 に 2'-AMP の電子密度図を、Figure 27 に 2'-AMP 周辺の構造を示す。2'-AMP は RNase U_2 の触媒部位から His 101 側鎖にかけて五本鎖 β シート部の β 鎖に沿うように結合している。Table 13 に 2'-AMP のねじれ角を示す。アデニン塩基はグリコシル結合 $\chi = 66.2^\circ$ の *syn* の配置をとり、リボースのバックリングは C_2' -endo である。リボース O_5' はアデニン N_3 とは 2.8 Å の距離にあり、分子内水素結合が形成されている。2'-AMP の温度因子はリン酸基が平均 11.4 Å²、リボースが 14.2 Å²、アデニン塩基は 10.5 Å² である。RNase U_2 と 2'-AMP との相互作用の大部分はアデニン塩基とリン酸基で生じており、リボース部分に最も近い RNase U_2 原子は結晶内で隣接する分子の Tyr 67' C_{α} で、リボース O_5' との距離は 3.4 Å である。リボース部の温度因子が 2'-AMP 中で最大であり揺らぎが大きいと考えられるのは、ファンデルワールス接触や水素結合などリボース部分を特定のコンフォメーションに安定化する相互作用が少ないためである。

2'-AMP と RNase U_2 間で形成されている水素結合を Table 14 に示す。リン酸基は Tyr 39、His 41、Glu 62、Arg 85 と His 101 に囲まれた領域に結合しており、これらの残基の側鎖すべてがリン酸基と水素結合を形成している。

アデニン塩基は Asp 108 と Gly 82 の主鎖の間に存在する溝状の部分に結合している。アデニン結合部の底部には His 101 の側鎖が位置し、アデニン塩基の五員環部分とほぼ重なっている。His 101 のイミダゾール環とアデニン塩基のなす角度は 14.7° である。隣接分子の Tyr 67' のフェノール環は、His 101 が接しているのとは反対側のアデニン塩基の面に覆い被さるように位置し、二つの環のなす角度は 13.6° である。アデニン塩基を挟みこんでいる His 101 イミダゾール環と、Tyr 67' フェノール環は、アデニン塩基からそれぞれ約 3.2 Å と約 3.5 Å の距離にあり、アデニン塩基は His 101 側鎖のイミダゾール環により密に接触している。2'-AMP のアデニン塩基結合により、

His 101 イミダゾール環は溶媒領域から完全に遮断される。アデニン塩基が関与する水素結合は、アデニン N_6 と N_7 原子が隣接する RNase U_2 分子の Asn 68' O_{61} と N_{72} 原子と形成しているもののみである。

Ca^{2+} イオンは α ヘリックス C 末部に結合している。Figure 28 に二次構造を形成する残基の主鎖原子を用いた VII 型と VIII 型結晶構造の重ね合わせを示す。 Ca^{2+} イオンが結合している Asp 28 から Asp 37 の領域及びそれに隣接する Ser 74 から Asn 77 の β ヘアピン構造部に Ca^{2+} イオンの結合により引き起こされたと考えられる構造の違いがみられる。VII 型結晶の Asp 28 から Asn 32 は、他の結晶型にみられるような α ヘリックス構造ではなく、Asp 29 から Asp 37 が Ca^{2+} イオンに巻き付くような構造をとっている。Figure 29 に Ca^{2+} イオン結合部の構造を示す。 Ca^{2+} イオンには、Asp 29 O_{61} 、Val 30 O 、Asn 32 O_{61} 、Asp 37 O_{61} 、Wat 545 及び Wat 550 の 6 原子が配位している。4 個の蛋白質原子と Ca^{2+} イオンはほぼ同一平面上に存在し、その平面の上下から Wat 545 と Wat 550 が Ca^{2+} イオンに配位している。 Ca^{2+} イオンの配位の様子を Table 12 に示す。蛋白質原子と Ca^{2+} イオンとの距離が 2.3 Å から 2.4 Å であるのに対し、水分子と Ca^{2+} イオンの距離は 2.5 Å とやや長く、 Ca^{2+} イオンに配位している 6 個の原子は正八面体の配置から水分子の方向に伸びた形をしている。VII 型結晶が得られる pH 6.5 では Asp 29 と Asp 37 の側鎖は負電荷を帯び、 Ca^{2+} イオンの 2 価の正電荷をこれらの側鎖が中和していると考えられる。VII 型結晶の Ser 74 から Asn 77 の β ヘアピン構造部は、重ね合わせた VIII 型構造のものと比べると、 Ca^{2+} イオン結合部の方向に角度で約 15° 、先端部の Arg 75 C_α で約 3 Å 移動している。 Ca^{2+} イオンが結合していない結晶型では、 α ヘリックス C 末部につながる Asp 33 から Asp 37 の領域と β ヘアピン構造部の間隙に結晶構造間で共通に存在する水分子が Wat 335、Wat 336 及び Wat 357 の 3 個存在するが、VII 型結晶では Wat 357 が失われている。 Ca^{2+} イオンは RNase U_2 の RNA 加水分解活性に影響を与えないこと (Arima *et al.*, 1968b)、 Ca^{2+} イオンが同じく 200 mM と高濃度存在していても pH 3.5

で析出したⅧ型結晶には Ca^{2+} イオンが結合していないことから、Ⅶ型結晶に見られる Ca^{2+} イオンの結合は Asp 29 と Asp 37 の両側鎖が負電荷を帯びている pH で Ca^{2+} イオンが高濃度に存在しているときのみ起こるものと考えている。



Figure 2. The structure of the protein-ligand complex. The structure shows the protein backbone and the position of the calcium ions (Ca2+) and aspartate residues (Asp 29 and Asp 37). The structure is rendered in a light, sketchy style, showing the general shape of the protein backbone and the position of the calcium ions (Ca2+) and aspartate residues (Asp 29 and Asp 37). The structure is positioned side-by-side, with the left one slightly behind the right one, suggesting a comparison or a different view of the same complex.

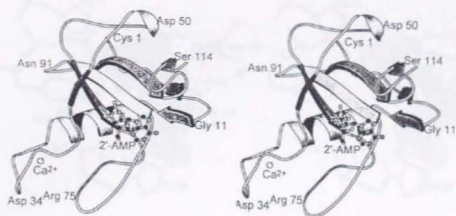


Figure 25. Overall structure of RNase U₂ type VII crystal.

The 2'-AMP molecule is shown by a ball-and-stick model. C, N, O, and calcium atoms are drawn with black, dotted gray, small white, and large white spheres, respectively.

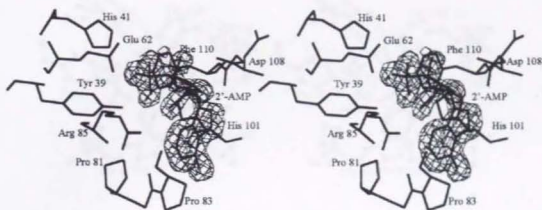


Figure 26. Difference Fourier map for the 2'-AMP molecule bound to RNase U₂.

The model for 2'-AMP structure is superposed on the *F_o-F_c* difference Fourier map that is contoured at 2.8 times the rms value of electron densities. In the calculation of the map, the model without 2'-AMP was subjected to 5 cycles of the PROLSQ refinements. The phases from the model thus refined was used in the *F_o-F_c* Fourier synthesis.

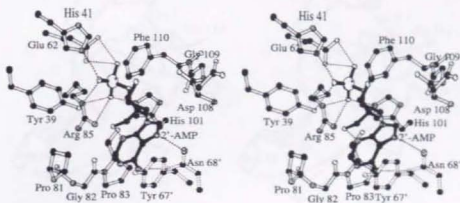


Figure 27. Stereo view of the structure around bound 2'-AMP molecule in type VII crystal.

C, N, and O atoms are drawn with black, dotted, and small white spheres, respectively. The P atom is drawn with larger white sphere. The covalent bonds in the 2'-AMP molecule are drawn with solid sticks. Hydrogen bonds are drawn with dotted lines.

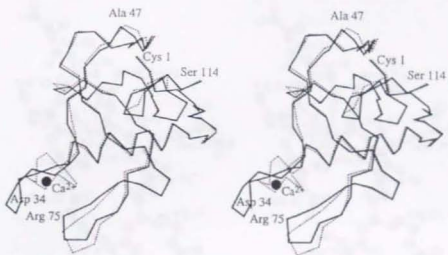


Figure 28. Stereo view of the superposition of C_{α} -traces of RNase U_2 type VII and VIII crystal structures.

Type VII and VIII crystal structures are drawn with solid and dotted lines, respectively. The calcium ion is drawn as a black sphere.

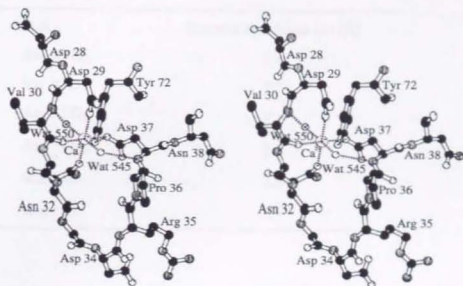


Figure 29. Stereo view of calcium ion binding site in type VII crystal structure.

C, N, O, and calcium atoms are drawn with black, dotted gray, small white, and large white spheres, respectively.

Table 12. Coordination of the calcium ion in the type VII crystal structure.

(a) Bond distances

Atom	Distance to calcium ion (\AA)
Asp 29 O _{δ2}	2.4
Val 30 O	2.3
Asn 32 O _{δ1}	2.4
Asp 37 O _{δ1}	2.3
Wat 545	2.5
Wat 550	2.5

(b) Bond angles (in degree)

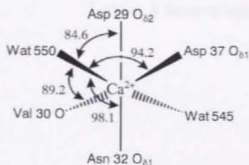
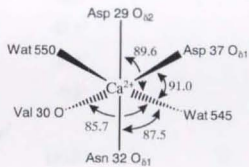
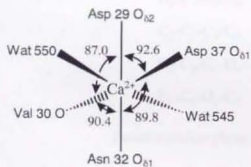


Table 13. Conformational parameters for the 2'-AMP molecule bound to RNase U₂.

Backbone torsion angle	
O ₅ -C ₅ -C ₄ -C ₃	44.4°
C ₅ -C ₄ -C ₃ -O ₃	92.6°
C ₄ -C ₃ -O ₃ -P	-114.2°
Glycosyl torsion angle	
O ₄ -C ₁ -N ₉ -C ₄	66.2° (<i>syn</i>)
Ribose ring torsion angle	
C ₄ -O ₄ -C ₁ -C ₂	-20.9°
O ₄ -C ₁ -C ₂ -C ₃	32.5°
C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	-33.1°
C ₂ -C ₃ -C ₄ -O ₄	22.4°
C ₃ -C ₄ -O ₄ -C ₁	-0.8°
Pseudorotation phase angle, <i>P</i> [†]	163.5° (C ₂ - <i>endo</i>)

[†] Altona & Sundaralingam, 1972.

Table 14. Possible hydrogen-bond interactions between the 2'-AMP and RNase U₂ molecules.

2'-AMP atom	Protein residue atom*		Interatomic distance (Å)
N ₆	Asn	68' O ₆₁	3.0
N ₇	Asn	68' N ₆₂	3.0
O1P	His	41 N _{ε2}	2.7
	Tyr	39 O _n	2.8
O2P	Arg	85 N _ε	3.1
	Arg	85 N _{η2}	2.9
	His	101 N _{ε2}	2.6
O3P	Glu	62 O _{ε1}	2.9
	Glu	62 O _{ε2}	3.1

* Residues of the neighboring protein molecule are indicated with primed numbers.

3-8 触媒部位の構造と比較

Figure 30 にIIからVII型の触媒部位のアミノ酸残基をステレオ図で示す。Table 15 に触媒部位の残基である Tyr 39、His 41、Glu 62、Arg 85 と His 101 を重ね合わせたときの原子位置の rmsd を示す。主鎖原子のみを用いた値は 0.17 - 0.39 Å であるのに対し、側鎖原子を用いた場合は 0.44 - 1.09 Å と高い傾向にあり、触媒部位の構造の多様性は側鎖のコンフォメーションの違いが主たる要因であることを示している。側鎖間の比較ではIV型とVI型間、III型とVII型間、II型とVIII型間で値が低い、これは後述するように結晶型間で変異の最も大きな His 41 側鎖のコンフォメーションがそれぞれ似ているためである。

RNase U_2 の触媒部位には、II型とIII型では硫酸イオンが結合している。硫酸イオンが形成している水素結合とその距離を Table 16 に示す。II型結晶では、硫酸イオンには Tyr 39、Glu 62、Arg 85、His 101、Wat 396 及び Wat 445 が水素結合を形成している。硫酸イオンの O1、O2 及び O4 原子は RNase U_2 と水素結合を形成しているが、O2 原子は Wat 396 のみと水素結合している。Glu 62 側鎖の O 原子のうち、硫酸イオンと水素結合していない O₄₁ 原子は Phe 110 の側鎖の近傍に位置する Wat 433 と水素結合している。His 41 は硫酸イオンの近くに位置し N_{δ1} 原子が触媒部位に向いているが、硫酸イオンとの間に水素結合は形成されていない。His 41 N_{δ2} は Wat 347 と 2.8 Å の水素結合を形成し、Wat 347 は Asp 37 O と 2.5 Å の強固な水素結合を形成している。

III型結晶で結合している硫酸イオンは Tyr 39、Glu 62、Arg 85、His 101 に加えて、His 41 とも水素結合を形成している。III型結晶の硫酸イオンの O1、O3 及び O4 原子は RNase U_2 と水素結合しているが、O2 原子に水素結合している原子はない。III型結晶の硫酸イオンの向きはII型の硫酸イオンを S - O2 原子間の共有結合を軸に約 60° 回転したものに近い。II型とIII型の触媒部位の構造は His 41 側鎖の向きに最も顕著な違いが見られるので、この His 41

側鎖の向きが触媒部位の硫酸イオンの方位を決定する最大の要因と考えられる。またⅢ型結晶の硫酸イオンの結合位置と分子の方位は、Ⅶ型結晶の 2'-AMP のリン酸基と良く似ており、2'-AMP の O_p 、 O_{1P} 、 O_{2P} 、 O_{3P} 原子がそれぞれⅢ型結晶の硫酸イオンの O_2 、 O_3 、 O_4 、 O_1 原子に対応している。この理由は後述するように His 41 のコンフォメーションがⅦ型とⅢ型ではよく似ているためと考えている。

Ⅳ型結晶は硫酸アンモニウムを沈澱剤として得られたが、硫酸イオンは結合していない。Ⅳ型の触媒部位の近傍には隣接分子の Asp 2' 側鎖が位置し、Asp 2' O_{s1} は Asp 37 O_{s2} と 3.0 Å の距離で、Asp 2' O_{s2} は Tyr 39 O_n と 2.6 Å の距離で水素結合を形成している。Asp 2' O_{s2} と Arg 85 N_{η} との距離は 3.4 Å である。この Asp 2' 側鎖が存在するため、立体障害により硫酸イオンが触媒部位に結合していないと考えられる。Ⅳ型結晶構造の His 41 は二つのコンフォメーションをとっている。占有率 0.75 のコンフォメーションではイミダゾール環は触媒部位とは反対側を向き、His 41 $N_{\delta 1}$ 、 $N_{\epsilon 2}$ はそれぞれ隣接分子の Glu 49 O 、Asp 45 $O_{\delta 1}$ と 3.0 Å、2.7 Å の距離で水素結合を形成している。His 41 の占有率 0.25 のコンフォマーは側鎖が触媒部位を向き、 $N_{\epsilon 2}$ 原子が Glu 62 $O_{\epsilon 2}$ と 2.5 Å の水素結合を形成している。Ⅴ型結晶でも硫酸イオンは結合しておらず、His 41 $N_{\delta 1}$ は Glu 62 $O_{\epsilon 2}$ と 2.5 Å の水素結合を形成している。

Ⅵ型の触媒部位にも同じく隣接分子の Asp 2' の側鎖が存在しているが、Ⅵ型の場合は Asp 2' は触媒部位のより奥に位置している。Asp 2' O_{s1} は His 41 $N_{\epsilon 2}$ と 3.0 Å の、Asp 2' O_{s2} は Glu 62 $O_{\epsilon 1}$ 及び His 101 $N_{\epsilon 2}$ とそれぞれ 2.8 Å、3.1 Å の水素結合を形成している。His 41 $N_{\delta 1}$ は Asn 38 O と 2.8 Å の水素結合をしている。

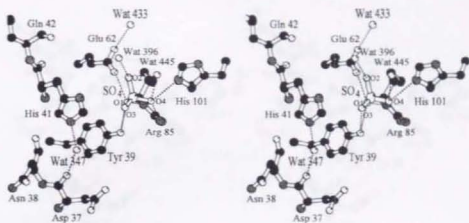
触媒部位の残基では、Tyr 39、Arg 85、His 101 は 7 種の結晶型でほぼ同じコンフォメーションである。Tyr 39 は Asp 37、His 41、Pro 64、Pro 82 及び Tyr 71 の各側鎖に囲まれており、Tyr 39 側鎖の芳香環は Pro 64 と

ファンデルワールス接触をしている。Tyr 39 O_H と Arg 85 $N_{H\alpha}$ の距離はII型では 3.6 Å、V型では 3.8 Åと離れているが、その他の結晶型では 2.9 から 3.4 Åであり、水素結合形成が可能である。His 101 側鎖は Phe 110 側鎖と環が平行になるようにファンデルワールス接触しており、His 101 $N_{H\beta}$ は Gly 109 O と 2.6 から 3.2 Åの水素結合を形成している。Arg 85 側鎖は $N_{H\beta}$ 原子が Gly 82 O と 2.5 から 3.0 Åの、Asp 84 O とは 2.7 から 3.0 Åの距離で水素結合を形成している。Arg 85 側鎖のアルキル鎖部分は Glu 62 側鎖及び Pro 81 から Asp 84 の領域とファンデルワールス接触している。このような多数の相互作用が Tyr 39、Arg 85 及び His 101 を一定のコンフォメーションに安定化していると考えられる。

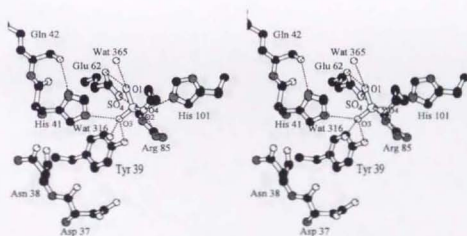
これに対して、His 41 と Glu 62 のコンフォメーションには各結晶型間で大きな変差が見られる。Table 17 に His 41 と Glu 62 の側鎖のねじれ角を、Figure 31 に触媒部位のアミノ酸残基の重ね合わせ図を示す。7 種の結晶構造における His 41 のコンフォメーションは 4 種類に分類できる。第一のタイプは、II型とVIII型に見られる χ^1 が約 -70° 、 χ^2 が約 170° のコンフォメーションで、His 41 $N_{H\beta}$ が触媒部位の方向を向いている。第一のタイプでは、Wat 347 が His 41 $N_{H\beta}$ 及び Asp 37 O と水素結合をし、His 41 側鎖のコンフォメーションの安定化に寄与している。Wat 347 と Asp 37 O 間の水素結合距離はII型とVIII型で共に 2.5 Åと短い特徴がある。第二のタイプは、III型、V型、VII型に見られるもので χ^1 が約 -65° 、 χ^2 が約 80° のコンフォメーションであり、His 41 $N_{H\beta}$ が触媒部位の方向を向いている。第二のタイプでは His 41 $N_{H\beta}$ と Gln 42 O 間または His 41 $N_{H\beta}$ と Glu 62 O_{H2} 間に水素結合が形成されている。第三のタイプは、VI型に見られる $\chi^1 = -59^\circ$ 、 $\chi^2 = 73^\circ$ のコンフォメーションある。このタイプでは、His 41 $N_{H\beta}$ が触媒部位の方向を向いているものの、III型、V型、VII型に見られる His 41 の第二のタイプとはイミダゾール環の向きが正反対であり、His 41 $N_{H\beta}$ は Asn 38 O と水素結合を形成している。第四のタイプは、IV型に見られる His 41 が二つのコンフォメーションを

とるもので、一方のコンフォメーションでは触媒部位とは反対を向いて隣接蛋白分子と水素結合し、もう一方では His 41 N₆₁ が触媒部位を向いて Glu 62 O₆₁ と水素結合を形成している。後者の His 41 のコンフォメーションはVI型のものに近いが、His 41 N₆₁ と Asn 38 O の間に水素結合は形成されていない点異なる。どのタイプもイミダゾール環が直接または水分子を介して自身の蛋白質分子の酸素原子と水素結合を形成しており、その水素結合がコンフォメーションの安定化に寄与している。このように各結晶型において His 41 が多様なコンフォメーションをとることは、His 41 には分子内水素結合により安定化される複数のコンフォマーが存在することを示している。

Glu 62 は His 41、Arg 85 及び Ile 87 に囲まれた領域の触媒部位最奥部に位置している。Table 18 に各結晶構造における Glu 62 側鎖のカルボキシル基と、His 41 または Arg 85 側鎖の窒素原子との距離をまとめて示す。Glu 62 O₆₁ と Arg 85 N₆ との距離は 7 種の結晶型で 3.1 から 3.5 Å の距離にあり、水素結合または静電的相互作用を形成し得る。Glu 62 と His 41 は、IV型とV型では前述の通り水素結合が形成され、VI型では Glu 62 O₆₂ と His 41 N₆₂ の距離は 3.4 Å と静電相互作用が可能である。しかし、II、III、VII及びVIII型では、Glu 62 O₆₂ と His 41 N₆₁ または N₆₂ との距離は 3.7 から 4.2 Å であり、相互作用は弱いかなと考えられる。このように触媒部位の最奥部にある Glu 62 側鎖がその周囲の残基と多様な相互作用様式を形成し得るのは、Glu 62 側鎖のまわりにはコンフォメーション変化が可能な間隙が存在するためである。その間隙は His 41 N₆₁ が触媒部位を向く II型とVIII型のコンフォメーションでは特に大きい。3'-AMP が結合しているVIII型結晶の場合でも Glu 62 の周りには χ^2 が約 +30° 回転できるだけの間隙がある。したがって、Glu 62 側鎖のコンフォメーションは基質の RNA が結合している触媒反応進行中でも変化し得ると考えられる。



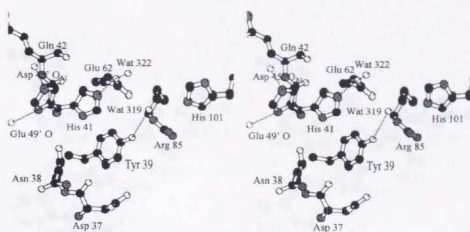
(a) Type II



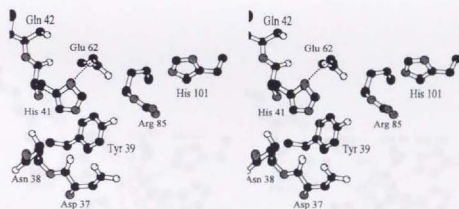
(b) Type III

Figure 30. Stereo view of the catalytic sites of RNase U₂.

(a) Type II, (b) type III, (c) type IV, (d) type V, (e) type VI, (f) type VII, and (g) type VIII. C, N, O, and S atoms are drawn with black, dotted gray, small white, and large white circles, respectively. Hydrogen bonds are drawn with dotted lines.

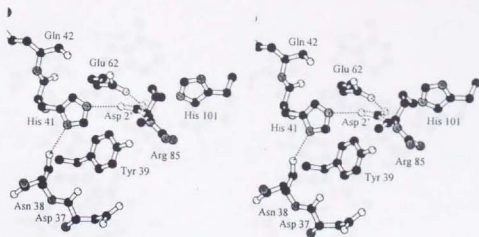


(c) Type IV

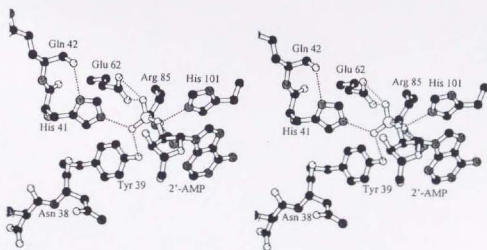


(d) Type V

Figure 30. Stereo view of the catalytic sites of RNase U₂ (continued).

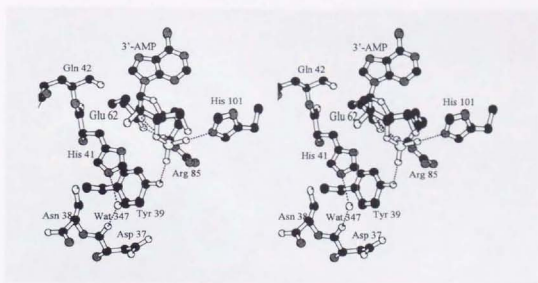


(e) Type VI



(f) Type VII

Figure 30. Stereo view of the catalytic sites of RNase U₂ (continued).



(e) Type VIII

Figure 30. Stereo view of the catalytic sites of RNase U₂ (continued).

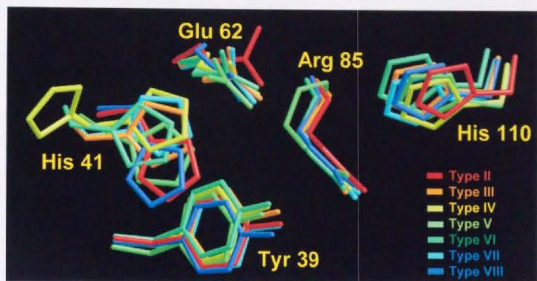


Figure 31. Superposition of the catalytic residues of RNase U₂.

Table 15. Positional rmsd of the catalytic site residues, Tyr 39, His 41, Glu 62, Arg 85, and His 101.

Crystal type	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
II		0.92	1.09	0.95	1.09	1.13	0.59
III	0.38		0.87	0.82	0.87	0.61	1.04
IV	0.30	0.17		0.84	0.44	0.71	1.01
V	0.39	0.33	0.29		0.86	0.78	0.82
VI	0.49	0.20	0.29	0.34		0.75	1.00
VII	0.43	0.18	0.22	0.33	0.20		1.05
VIII	0.31	0.36	0.38	0.39	0.38	0.36	

Upper-right off-diagonal region shows the rmsd of side-chain atoms, and lower-left off-diagonal region shows that of main-chain atoms. Unit is Å.

Table 16. Hydrogen bonds of the sulfate ion at the active site of the type II and III crystal structures.

Type II crystal				Type III crystal	
		Protein or solvent atoms	Hydrogen-bonding distance (Å)	Protein or solvent atoms	Hydrogen-bonding distance (Å)
Sulfate	O1	Tyr 39 O _η	2.8	Glu 62 O _{ε1}	3.1
		Glu 62 O _{ε2}	3.0	Glu 62 O _{ε2}	2.8
		Arg 85 N _ε	2.7		
	O2	Wat 396	2.4		
	O3	Tyr 39 O _η	3.3	Tyr 39 O _η	2.5
				His 41 N _{ε2}	2.8
				Glu 62 O _{ε2}	2.8
				Arg 85 N _ε	2.8
				Arg 85 N _{η2}	2.8
	O4	Arg 85 N _{η2}	3.1	His 101 N _{ε2}	2.7
		His 101 N _{ε2}	2.7		
		Wat 445	3.3		

Table 17. Torsion angles of the catalytic-site residues, His 41 and Glu 62.

Crystal type		II	III	IV*		V	VI	VII	VIII
His 41	χ^1	-69	59	-168	66	28	59	69	-66
	χ^2	168	75	82	-136	84	73	84	170
Glu 62	χ^1	81	75	55		21	57	50	54
	χ^2	146	169	149		122	169	165	114
	χ^3	44	78	-46		30	-57	-77	-26

Unit is degree.

* Angles for two conformers are listed.

Table 18. Inter-atomic distances between the O_{e1} or O_{e2} atoms of Glu 62 and the side chains of His 41 and Arg 85.

Crystal type	His 41 N ₈₁		His 41 N ₄₂		Arg 85 N _e	
	Atom*	Distance (Å)	Atom*	Distance (Å)	Atom*	Distance (Å)
II	O _{e1}	4.2			O _{e1}	3.5
III	O _{e2}	3.9			O _{e1}	3.1
IV			O _{e2}	2.5	O _{e1}	3.1
V	O _{e2}	2.4			O _{e1}	3.3
VI			O _{e2}	3.4	O _{e1}	3.3
VII			O _{e1}	3.5	O _{e1}	3.4
VIII	O _{e2}	3.8			O _{e1}	3.1

* Side-chain atoms of Glu 46.

4 考察

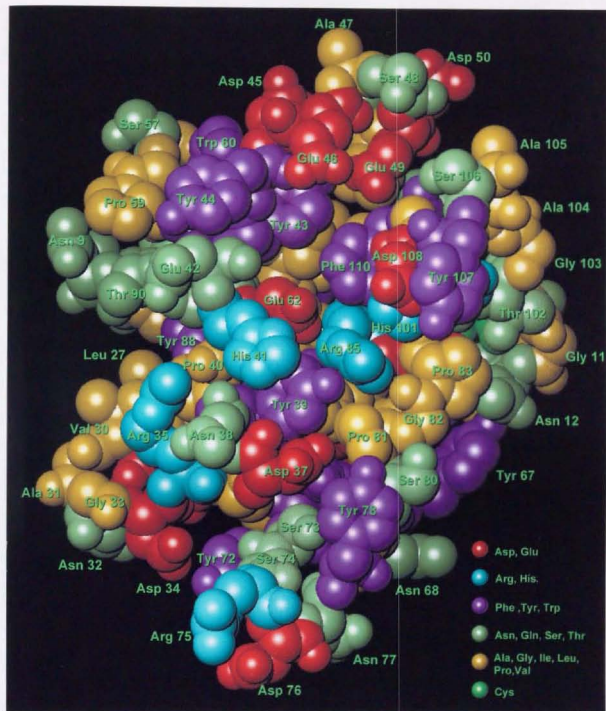
4-1 RNase U₂ の全体構造

Figure 32 に RNase U₂ VII型の全体構造を空間充填モデルで示す。モノヌクレオチドは Figure 32(a) の中央上下に存在する溝に結合しており、基質である RNA もこの溝に沿って結合すると考えられる。この溝のほぼ中央部にある触媒部位には、塩基性残基の His 41 と His 101 が溝を挟んで向かい合っている。触媒部位の奥には正電荷を持つと考えられる Arg 85 と酸性残基の Glu 62 が位置している。Tyr 39 の側鎖は His 41 側鎖に覆われている。Figure 32(a) において触媒部位の上方には塩基認識部位が存在しており、Tyr 43 と Phe 110 の芳香族性側鎖が溝の底の部分にあり、酸性残基の Glu 46、Glu 49 及び Asp 108 が溝の周囲に並んでいる。触媒部位の下方向には、溝の左側に Asp 37 と Asn 38、右側に Ser 80 という親水性の残基が存在している。溝の右側では芳香族性の Tyr 78 と His 101 側鎖、及びそれらの間にある Pro 80 と Pro 82 が疎水性の領域を形成している。更に図の下側には正電荷を持つと考えられる Arg 35 と Arg 75 が溝の両側に並んでいる。

RNase U₂ のホスホジエステル結合切断反応では、切断されるホスホジエステル結合の 5' 側にヌクレオチドが結合していると最大 2 ヌクレオチドまで長く連なるにしたがって解離定数 (K_s) は大きく変化しないが反応速度 (k_{cat}) が上昇する (Yasuda & Inoue, 1982; 基質が Ap-CH₃ のとき $k_{cat} = 0.19 \text{ min}^{-1}$, $K_s = 1.26 \times 10^{-4} \text{ M}$; 基質が ApCp のとき $k_{cat} = 577 \text{ min}^{-1}$, $K_s = 0.774 \times 10^{-4} \text{ M}$; 基質が ApCpGp のとき $k_{cat} = 13720 \text{ min}^{-1}$, $K_s = 1.29 \times 10^{-4} \text{ M}$; p はリン酸エステル基またはリン酸基を示す)。このことは、ホスホジエステル結合 5' 側のヌクレオチド、すなわち RNA 切断反応の結果リン酸基から脱離するヌクレオチドが、強くはないが結合するサブサイトが少なくとも 2 ヌクレオチド残基分存在する事を示しており、そのサブサイトに基質の RNA が結合することで加水分解されるのに適したコンフォメーションを RNA がとるようになると考えられる。RNase U₂ の His 101 及び Pro 81 から Pro 83 で形成される疎水性の

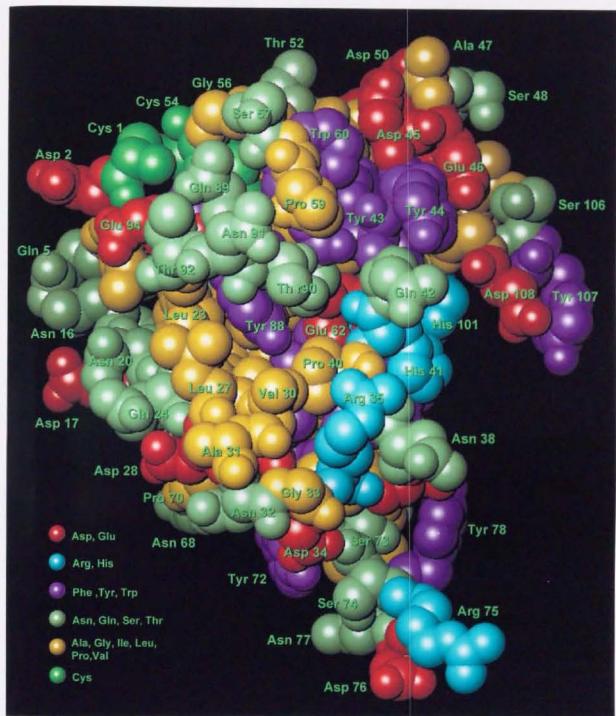
領域にはⅦ型結晶ではアデニン塩基が結合しており、His 101 のイミダゾール環部分はアデニン塩基と密な疎水的相互作用を形成している。付表に示すように、pH 4.5 で結晶化したⅡ型とⅢ型ではⅦ型結晶のアデニン結合部位の近傍には隣接分子の Tyr 44' と Tyr 78' の側鎖がそれぞれ位置しており、その領域は芳香族性の分子に対する親和性が高いことを示している。Ⅶ型結晶のアデニン結合部はグアニン、シトシン、ウラシルの各塩基も結合できる大きさがある。これらのことから、RNA 切断反応の時にはホスホジエステル結合 5' 側の塩基が結合する一つめの塩基結合サブサイトは、Ⅶ型結晶において 2'-AMP のアデニン塩基が結合している部位であると考えている。主として疎水的相互作用により塩基がサブサイトに結合することは、RNase U₂ は脱離するヌクレオチドの塩基に対する特異性が低い知見と一致する (Uchida & Machida, 1978)。同様の塩基結合サブサイトに塩基が結合している結晶構造の例は類似の RNase T₁ と Ms において報告されている (Ding *et al.*, 1991; Lenz *et al.*, 1991; Nonaka *et al.*, 1993)。

ホスホジエステル結合の 5' 側のヌクレオシドがⅦ型結晶における 2'-AMP に似た配置で結合すると考えると、更にその下流の RNA 鎖は Asn 38 と Ser 80 の間に配置されることになり、Figure 33 に示すように Asn 38、Asp 37、Ser 80、Tyr 78 及び Arg 85 の各側鎖が水素結合、静電相互作用またはファンデルワールス接触を形成し得る位置に存在している。



(a) Front view.

Figure 32. Space-filling model of RNase U₂ type VIII crystal structure.



(b) Side view.

Figure 32. Space-filling model of RNase U₂ type VIII crystal structure (continued).

4-2 RNA 加水分解反応機構

3'-AMP の結合しているVIII型結晶構造は、アデノシン 2',3'-環状一リン酸 (2',3'-cAMP) 加水分解後の RNase U_2 とヌクレオチドとの相互作用様式を示している。3'-AMP のリン酸基の O1P と O2P 原子は溶媒領域側を向き、そのまわりには RNA 鎖が連なり得る空間が存在している。また、3'-AMP の $O_{3'}$ は蛋白質分子の表面側に存在しており、 $O_{3'}$ に RNA 鎖が結合していても RNase U_2 と不合理な原子間接触は生じない。以上のことから、基質である RNA もこの結合様式をとり得ると考えられる。

3'-AMP リン酸基の O1P 原子は、リン原子に関してリボース $O_{2'}$ とは反対側に位置している。この配置は、2',3'-cAMP の形成の際には、リボース $O_{2'}$ がリン原子を O1P 原子が結合している側の反対側から求核的に攻撃することを示している (Figure 34)。したがって、RNA 切断反応においてリボース $O_{2'}$ がリン原子を求核攻撃した直後に生じると考えられる三角両錐型五配位のリン原子遷移状態では、O1P に対応する酸素原子はリン原子に付加したリボース $O_{2'}$ と共に両錐の頂上部を占め、O2P に対応する酸素原子は平面三配位部の一角を占める。O1P が脱離するヌクレオチドのリボース $O_{3'}$ の位置を表すと考えみると、O1P が His 101 N_{H_2} と水素結合を形成していることから、His 101 が脱離するリボース $O_{3'}$ にプロトンを供給する酸触媒の役割を果たすことになる。この場合は、リン原子に結合した原子の配座が変わる in-line メカニズム (Eckstein *et al.*, 1972) で反応が進行することになる。一方 O2P がリン原子から脱離するヌクレオチドのリボース $O_{3'}$ の位置を表すと考えみると、O2P が五配位の両錐頂上部を占めてリン原子から脱離するためには、リン原子に結合した原子が偽回転を起こす必要がある。その場合脱離するリボース $O_{3'}$ が偽回転前に Tyr 39 O_H から、または偽回転後に His 101 N_{H_2} からプロトンを受け取るという二つの可能性がある。前節で述べたように脱離するヌクレオチドは His 101 側鎖の近傍に存在する塩基結合サブサイトに結合すると考えているが、その結合位置は触媒部位のリン原子に関して、リン原子に求核攻撃するリボ-

ス $O_{2'}$ の位置の反対側に相当する。この配置は、リボース $O_{2'}$ がリン原子を求核攻撃して五配位リン原子遷移状態が生じる際には、脱離するヌクレオチドの $O_{3'}$ 原子がリボース $O_{2'}$ とは反対側の両錘頂上部を占めるのに適している。したがって塩基結合サブサイトの位置を考慮に入れると His 101 の方が酸触媒として脱離するヌクレオチドの $O_{3'}$ 原子にプロトンを供与するのに適している。反応中間体である 2',3'-環状ヌクレオチドの加水分解は、RNA 切断の逆反応としてヌクレオチドが脱離した方向から水分子がリン原子に付加して起こると考えられる。

RNase U_2 による RNA の切断反応ではリボース $O_{2'}$ が求核的にリン原子を攻撃するため、リボース $O_{2'}$ の求核性を高める機構が存在すると考えられる。His 41 $N_{\delta 1}$ は 3'-AMP のリボース $O_{2'}$ に水素結合しており、His 41 はリボース $O_{2'}$ が接近してきたときに塩基触媒としてリボース $O_{2'}$ からプロトンを引き寄せることでリボース $O_{2'}$ の求核性を高める可能性がある。一方、VIII型結晶ではリボース $O_{2'}$ の近傍には Glu 62 側鎖も存在している。Glu 62 $O_{\epsilon 2}$ とリボース $O_{2'}$ の距離は 3.6 Å であるが、3'-AMP のアデニン塩基を固定したままグリコシル結合を +25° 回転させると、リボース $O_{2'}$ と Glu 62 $O_{\epsilon 2}$ の距離は 3.4 Å になる。この回転を行ってもリン酸基部分の方位を多少修正すればリボース部分と蛋白質部分間に不合理な原子間接触は生じない。したがって Glu 62 も塩基触媒としてリボース $O_{2'}$ からプロトンを受け取って求核性を高める役割を果たし得る。Glu 62 側鎖がイオン化しているとなると、基質が結合していないときは水分子と相互作用して溶媒和の効果で安定化されているが、基質が結合して触媒部位の水分子が置換されて溶媒和の効果が失われると、プロトンを受け取る塩基触媒として機能し易くなる可能性が考えられる。

正電荷を持つ Arg 85 側鎖は触媒部位の底部に位置しており、リン酸基の酸素原子と水素結合または静電相互作用を形成している。この相互作用により Arg 85 側鎖はリン原子の求電子性を高めてリン原子の反応性を高め、またリボース $O_{2'}$ がリン原子を求核攻撃した直後に生じる五配位リン酸遷移状態を安

定化して遷移エネルギーを低下させて、RNA 切断反応を促進すると考えられる。ホスホジエステル結合切断反応において、リン酸基の O 原子が正電荷を持つイオンと静電相互作用したり、プロトンを受け取ることで 2',3'-環状ヌクレオチドの生成が促進されることは、3',5'-uridylyluridine の切断反応においても報告されている (Breslow *et al.*, 1989)。また、His 41 は側鎖の回転により $N_{\epsilon 2}$ 原子が触媒部位のリン酸基と相互作用し得る位置にあるため、共役酸の形態で触媒部位の RNA のリン酸基と静電相互作用または水素結合を形成して Arg 85 と同じ役割を果たすことができる。His 41 側鎖は前述の通り種々のコンフォメーションをとる特徴を有するので、RNA 加水分解反応の過程ではプロトンの授受とリン原子の活性化という複数の役割を別のコンフォメーションで担う可能性が考えられる。

Figure 74. Schematic drawing of the reaction site for RNA cleavage.

The reaction between the RNA and the metal ion is shown in the reaction scheme. The metal ion is coordinated to the 2' and 3' hydroxyl groups of the RNA. The metal ion is also coordinated to the phosphate group of the RNA. The metal ion is also coordinated to the phosphate group of the RNA. The metal ion is also coordinated to the phosphate group of the RNA.

When the metal ion is coordinated to the 2' and 3' hydroxyl groups of the RNA, the metal ion is also coordinated to the phosphate group of the RNA. The metal ion is also coordinated to the phosphate group of the RNA. The metal ion is also coordinated to the phosphate group of the RNA.

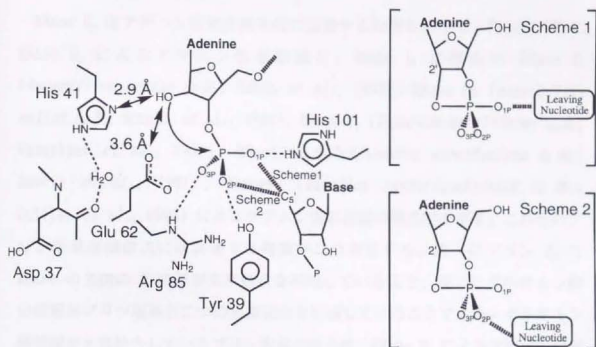


Figure 34. Schematic drawing of the mechanism for RNA cleavage.

When the leaving-group $O_{5'}$ atom is regarded to take up the position of the O_{1P} atom (scheme 1), the $O_{5'}$ atom is located at a suitable position to accept a proton from His 101 $N_{\epsilon 2}$. In the transition state in which the $O_{2'}$ atom is placed in line with the P and $O_{5'}$ atoms, the ribose $O_{2'}$ and $O_{5'}$ atoms would occupy apical positions on the penta-valent phosphorus atom.

When the leaving-group $O_{5'}$ atom is regarded to take up the position of the phosphate O_{2P} (scheme 2), the pseudorotation at the penta-valent phosphorus atom is necessary to place the leaving $O_{5'}$ atom in an apical position.

4-3 RNase U_2 の塩基認識

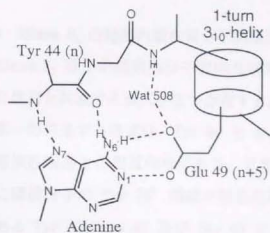
RNase U_2 はアデニン塩基を優先的に認識する特徴を有する。Figure 35 に RNase U_2 によるアデニン塩基認識と、RNase U_2 に類似の RNase T_1 (*Aspergillus oryzae* 由来; Gohda *et al.*, 1994)、RNase Ms (*Aspergillus saitoi* 由来; Nonaka *et al.*, 1993)、RNase F_1 (*Fusarium moniliforme* 由来; Vassilyev *et al.*, 1993)、RNase Sa (*Streptomyces aureofaciens* 由来; Sevcik *et al.*, 1991)、Barnase (*Bacillus amyloliquefaciens* 由来; Guillet *et al.*, 1993) によるグアニン塩基認識の模式図を示す。これらのプリン塩基認識様式には共通する特徴が二つ存在する。第一にプリン N_7 と RNase の主鎖の N 原子が水素結合を形成していること、第二にグルタミン酸の側鎖がプリン塩基と二つの水素結合を形成していることである。グルタミン酸側鎖が水素結合しているプリン塩基の原子は、RNase U_2 によるアデニン塩基認識の場合は N_1 と N_6 原子、グアニン特異的またはグアニン優先的な RNase によるグアニン塩基認識の場合は N_1 と O_6 原子という違いはあるが、両者でグルタミン酸の立体構造上の配置は非常に良く似ている。アデニン塩基とグアニン塩基の認識機構の違いはプリン 6 位の原子と RNase の主鎖原子との相互作用様式、及びその領域の蛋白質側の構造に見られる。アデニンの 6 位の原子は水素供与体であるアミノ基の N 原子であり、RNase U_2 では水素受容性の Tyr 44 0 が塩基認識部位を向いてアデニン N_6 に水素結合している。グアニンの 6 位の原子は水素受容性であるカルボニル基の O 原子であり、グアニン特異的またはグアニン優先的な RNase では水素供与性である主鎖の N 原子が塩基認識部位を向いてグアニン O_6 に水素結合している。つまり、プリン 6 位の原子と水素結合を形成する RNase の主鎖部分の構造が塩基特異性を決定しているのである。塩基認識部位の構造の違いはそれを形成するアミノ酸残基数に起因している。グアニン特異的または優先的な RNase では、グアニン N_7 と水素結合している残基を n 番目とすると、(n+1) 番目、(n+2) 番目の主鎖の N 原子がグアニン O_6 と水素結合し、(n+3) 番目の Glu がグアニンと 2 本の水

素結合を形成しており、 $(n+1)$ から $(n+4)$ 番目の残基は β ターン I 型構造を形成している。 β ターン構造からなるグアニン塩基認識部位の構造モチーフ、及びグアニン塩基と RNase 間の水素結合様式は、カビ（真核生物）由来の RNase T_1 、 F_1 、 Ms だけではなく、触媒部位と塩基認識部位にしかアミノ酸配列の一致が見られず、種として進化の系統から遠く離れた細菌（原核生物）由来の barnase、RNase Sa においても完全に共通である。RNase U_2 のアデニン認識様式を類似の RNase によるグアニン認識様式を比較すると、RNase U_2 ではグアニン N_7 と水素結合している Tyr 44 が n 番目の残基に相当し、アデニン N_6 には同じく n 番目の Tyr 44 の主鎖の O 原子が水素結合している。RNase U_2 において塩基認識に関与する Glu 49 は $(n+5)$ 番目に相当している。つまり Figure 35 及び Figure 5 に示す通り、プリン塩基の 7 位と水素結合している残基と Glu との間に介在するアミノ酸残基数は、グアニンを特異的又は優先的に認識する RNase T_1 ファミリーの RNase ではすべて 2 残基であるのに対し、アデニンを優先的に認識する RNase U_2 では 4 残基となっている。この残基数の違いにより、RNase U_2 の塩基認識部位は 3_{10} -ヘリックスを持つ特有の構造モチーフを形成し、Tyr 44 主鎖の O 原子が塩基認識部位を向いて Glu 49 側鎖と共にアデニン塩基を認識できると考えている。

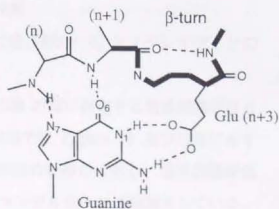
RNase U_2 はグアニン塩基も認識して RNA を加水分解する。グアニン塩基を RNase U_2 に結合しているアデニン塩基に重ね合わせると、グアニン N_7 と Tyr 44 N、グアニン O_6 と Glu 49 O_{61} 、グアニン N_1 と Glu 49 O_{62} の間に水素結合が形成され得る。しかし、グアニン O_6 と Tyr 44 O の間に 2.8 Å の、及びグアニン N_2 と Asp 108 O の間に 2.0 Å の原子間接触が生じる。グアニン O_6 と Tyr 44 O の接触は Tyr 44 - Glu 46 間のペプチド結合の向きを多少変更するだけで解消できる。また Figure 14 に示した通り、Asp 108 周辺の温度因子は高く構造が柔軟であることを考慮すれば、グアニン N_2 と Asp 108 O 間の接触も Asp 108 を約 1 Å 移動させ水素結合を形成させることで解消できる。アデニン塩基が結合するときは、Tyr 44 O と Asp 108 O 間の距離が 0.6 Å

拡大するが、グアニン塩基が上述の様式で結合するときは更に 1 Å 拡大する必要がある。RNase U_2 がアデニン塩基に対してより親和性が高いのは、この塩基認識部位の幅に起因している可能性がある。

RNase U_2 によるグアニン塩基認識様式のもう一つの可能性として、類似の微生物由来 RNase と同様にグアニン N_1 と Glu 49 $O_{\epsilon 1}$ の間、及びグアニン N_2 と Glu 49 $O_{\epsilon 2}$ の間で水素結合が形成される様式も考えられる。この場合はグアニン O_6 と Tyr 44 O の原子間接触が更にきついものになるが、類似の微生物由来 RNase のグアニン認識様式の様に Tyr 44 - Asp 45 間のペプチド結合が 180° 回転して Asp 45 N が塩基認識部位を向けば、グアニン O_6 と水素結合を形成することができる。RNase U_2 ではプリン 7 位の原子と水素結合しているアミノ酸残基 (Tyr 44) とプリンと二つの水素結合を形成するグルタミン酸 (Glu 49) の間が 3 アミノ酸残基と長いために、Glu 49 側鎖の空間的な配置に影響を与えずに Tyr 44 - Asp 45 間のペプチド結合が 180° 回転することができ、グアニンを塩基認識部位に受け入れると考えられる。

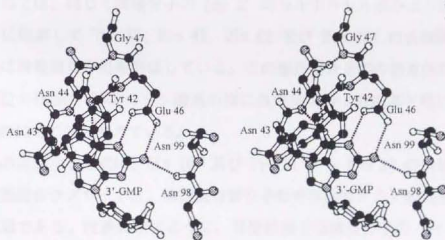


RNase U₂



RNase T₁, Ms, F₁ (Fungi)
RNase Sa, Barnase (Bacteria)

(a)



(b)

Figure 35. The base recognition by RNases belonging to RNase T₁ super family.

(a) Schematic drawing of the base recognition. (b) Stereo drawings of the guanine recognition by RNase T₁ (Arni *et al.*, 1988).

4-4 RNase U₂ の結晶内蛋白質分子間相互作用

RNase U₂ 分子の結晶内分子間相互作用には、RNase U₂ とヌクレオチドとの相互作用と共通する様式が三つ存在する。

第一の共通する様式は、Tyr 44 と Asp 108 の間に存在する塩基認識部位と芳香族性残基との相互作用である。II型結晶では Figure 19 及び付表に示す様に隣接分子の Tyr 78' 側鎖が塩基認識部位の近傍に存在し、塩基認識部位にある Tyr 43、Asp 45 及び Ser 48 とファンデルワールス接触をしている。この蛋白質分子間の相互作用様式は RNase U₂ の塩基認識部位が芳香族性の分子に対して親和性を持つために生じると考えている。

第二の共通する様式は、触媒部位のアミノ酸残基と隣接分子の酸性アミノ酸残基側鎖との水素結合または静電相互作用である。IV型結晶では隣接分子の Asp 2' のカルボキシル基が触媒部位の Arg 85 と Tyr 39 の各側鎖、及び触媒部位近傍にある Asp 37 側鎖と水素結合または静電相互作用を形成している。VI型結晶では、同じく隣接分子の Asp 2' のカルボキシル基がより触媒部位の奥深くに位置して Tyr 39、His 41、Glu 62 及び His 101 の各側鎖と水素結合または静電相互作用を形成している。この蛋白質分子間の相互作用様式は、触媒部位の残基が RNA のリン酸基の様に負電荷を持つ官能基と高い親和性を持つために生じると考えている。

第三の共通する様式は、His 101 及び Pro 81 から Pro 83 の領域で形成される塩基結合サブサイトと、隣接蛋白質分子の芳香族性アミノ酸残基側鎖との相互作用である。付表に示すように、II型結晶では隣接分子の Tyr 44' 側鎖が Gly 82 と His 101 の間の領域に、III型結晶では Tyr 107' 側鎖が Pro 83 と His 101 の間の領域に位置してファンデルワールス接触している。この結晶内分子間相互作用は、塩基結合サブサイトが芳香族性の分子に対して高い親和性を持つために生じると考えている。

このように RNase U₂ の結晶内分子間接触には RNase U₂ と RNA の相互作用様式を RNase U₂ の分子表面のアミノ酸側鎖が模倣していると考えられるもの

が複数の結晶構造に見られる。このような RNase U₂ 分子間の相互作用は、結晶化の過程における蛋白質分子の凝集を引き起こす要因の一つと考えられる。

4-5 RNase U₂ の異性化

アスパラギン酸またはアスパラギンがスクシンイミドを経てイソアスパラギン酸に異性化する反応はペプチドにおいても (Geiger & Clarke, 1987)、また Table 19 に示す通り蛋白質においても起こることが報告されている。ヘキサペプチドの場合、アスパラギン酸からスクシンイミドへの異性化は pH 4 付近で最も速やかに進行する (Oliyai & Borchardt, 1993)。II 型結晶が pH 4.5 の条件下で約 1 年かけて生成したことから、RNase U₂C は Asp 45 がスクシンイミドを経て isoAsp に異性化して生成したと考えている。II 型結晶中の RNase U₂C の位置に、RNase U₂A の構造を重ねると、Glu 46 から Glu 49 の領域が隣接分子と重なる。したがって、RNase U₂C への異性化は、II 型結晶中ではなく、RNase U₂A が結晶化するときに凝集する過程またはそれ以前に起こっていることになる。

ペプチド中のアスパラギン酸がスクシンイミドを形成するためには、そのアスパラギン酸の C 末側残基の主鎖の N 原子とアスパラギン酸の C_γ 原子が共有結合を形成する必要がある。アスパラギン酸の C 末側残基の主鎖の N 原子とアスパラギン酸の C_γ 原子が最も接近するときのねじれ角は $\psi = -120^\circ$ 、 $\chi^1 = 120^\circ$ 、 $\chi^2 = -90^\circ$ または 90° で、そのときの距離は約 2 Å である。IV、V、VI、VII 及び VIII 型結晶の Asp 45 のねじれ角の値を Table 20 に示す。Asp 45 のコンフォメーションは IV、VI、VII 及び VIII 型で ψ は約 130° 、 χ^1 は約 170° 、 χ^2 は約 70° とほぼ共通であり、これが Asp 45 の最も安定なコンフォメーションと考えられる。このねじれ角は、上述のアスパラギン酸異性化に適した値に近い。Figure 20(b) に示した通り Asp 45 近傍には IV、VI、VII 及び VIII 型結晶で共通の位置に Wat 330、Wat 508 及び Wat 509 の三個の水分子が結合しており、Asp 45 C_γ を求核攻撃すると考えられる Glu 46 N や Asp 45 側鎖と水素結合してスクシンイミド形成に適したコンフォメーションを安定化している。これら三個の水分子のうち、Wat 330 に対応する位置には II 型結晶でも水分子が存在し、IV、VI、VII 及び VIII 型結晶と同様に isoAsp 45 O₃、Tyr 43 O₁

及び Ile 51 O に水素結合している。Asp 45 O_{δ1} は異性化した isoAsp 45 では O_γ 原子に対応するが、どちらの原子も立体構造上共通の位置の存在している Wat 303 と水素結合を形成しているのである。スクシンイミドの五員環は平面的な構造をとると報告されているが (Capasso *et al.*, 1989; Capasso *et al.*, 1992)、スクシンイミドのモデルをⅧ型結晶構造の Asp 45 部分に重ねても、蛋白質の他の部分と原子間接触は生じず、Asp 45 の δ 位の O 原子に由来するスクシンイミドのアミド結合部分の O 原子と Wat 330 の距離は 3.4 Å 以下であり、水素結合形成が可能である。このことは、反応中間体の Suc 45 も Asp 45 や isoAsp 45 と同様に Wat 330 と水素結合を形成できることを示している。

以上の Asp 45 及び isoAsp 45 周辺の構造上の特徴から、Asp 45 の異性化反応は Figure 36 に示すように進行すると考えている。まず Asp 45 C_γ が Glu 46 N に接近して、カルボキシル基の平面が Glu 46 N の方向を向き、そのコンフォメーションは Asp 45 O_{δ1} と二つの水分子、Wat 330 と Wat 509 との水素結合形成により安定化される。次に Glu 46 N が Asp 45 C_γ を求核的に攻撃する。Glu 46 N と Asp 45 C_γ に共有結合が形成されると Glu 46 N からはプロトンが遊離するが、そのプロトンは Glu 46 N に水素結合していた Wat 508 が塩基触媒の役割を果たして受け取る。また、Asp 45 C_γ からは Asp 45 O_{δ1} または O_{δ2} が脱離してスクシンイミドが形成される。Asp 45 O_{δ1} が脱離するときはプロトンを Wat 330 または Wat 509 から受け取り、O_{δ2} が脱離するときは溶媒中の水分子からプロトンを受け取る。スクシンイミド体では、Asp 45 C_γ に結合している酸素原子は Wat 330 と水素結合を形成する。最後に、Asp 45 C に由来するカルボニル炭素に対して水分子が求核攻撃し、スクシンイミドの五員環の加水分解が起き、isoAsp 45 形成される。水分子が求核攻撃してくる方向としては、Tyr 43 や Wat 508 が存在する分子内側からの方向と、その反対側の分子外側からの可能性がある。分子内側からの場合は Glu 46 N から受け取ったプロトンを放出した後の Wat 508 が、分子外側からの場合は

溶媒中の水分子が求核攻撃すると考えられる。通常の Asp やスクシンイミドよりも主鎖のコンフォメーションの自由度が高い isoAsp 45 が形成されると、Tyr 44 から Asp 50 の領域にコンフォメーション変化が起き、II型結晶に見られるような塩基認識部位が溶媒領域に対して大きく開いた構造をとる。IsoAsp へ異性化した後でも、Asp 45 C 由来の炭素原子に結合している酸素原子と Wat 330 の間の水素結合は保持される。このように Asp 45 の異性化反応では、蛋白質分子表面に結合した水分子が水素結合によってペプチド鎖を異性化反応に適したコンフォメーションに安定化し、またアスパラギン酸の脱水縮合過程で塩基触媒としてプロトンの授受を行うことで異性化反応を促進すると考えている。

アスパラギン酸の異性化反応はニワトリ卵白リゾチームの Asp 101 でも生じると報告されており (Tomizawa *et al.*, 1994)、Asp 101 がスクシンイミドに異性化したスクシンイミド体リゾチームとトリ-Nアセチルキトリオースとの複合体の結晶構造解析を行った。Figure 37 に Suc 101 の電子密度を示す。スクシンイミドの二つのカルボニル酸素が明瞭に現れている。Figure 38 にスクシンイミド体リゾチームとトリ-Nアセチルキトリオースとの複合体の全体図を示す。Suc 101 はリガンド結合部の縁に位置し、リガンドとファンデルワールス接触している。Figure 39 に Asp 101 が異性化していないリゾチームとスクシンイミド体リゾチームの立体構造を重ね合わせたものを示す。スクシンイミド形成により、ネイティブ体リゾチームに見られる Asp 101 とリガンドとの二つの水素結合がなくなり、かつスクシンイミドがリガンド結合部により突き出ているため、リガンドの結合位置がスクシンイミド部分で約 0.8 Å 移動している。この結果 Asn 103 とリガンドとの水素結合もなくなり、Asn 103 はリガンドとは別方向の Ala 107 を向いている。Asp 101 がスクシンイミドに異性化するとトリ-Nアセチルキトリオースに対する解離定数が増大する (Tomizawa *et al.*, 1994) のは、この水素結合数の減少に起因していると考えられる。

アスパラギンもスクシンイミドを経由してイソアスパラギン酸に変化し、その反応は $\text{Asn} - \text{X}$ のアミノ酸配列で X が Gly のときは他のアミノ酸の時よりも速やかに進行することが報告されている (Stephenson & Clarke, 1989)。RNase U_2 ではアルカリ条件下で $\text{Asn} 32 - \text{Gly} 33$ の配列部分で isoAsp 32 が形成されて RNase U_2B が生じる。しかし、 $\text{Asn} 68 - \text{Gly} 69$ では異性化反応が起こらない (Kanaya & Uchida, 1986)。Asn は Asp の場合と同様に $\psi = -120^\circ$ 、 $\chi^1 = 120^\circ$ 、 $\chi^2 = -90^\circ$ または 90° となると、Asn の C_γ 原子と Gly の N 原子が接近し、スクシンイミドを形成するのに適したコンフォメーションとなる。II型では Asn 32 のねじれ角は $\psi = 3^\circ$ 、 $\chi^1 = -66^\circ$ 、 $\chi^2 = -51^\circ$ 、Asp 68 のねじれ角は $\psi = 49^\circ$ 、 $\chi^1 = -63^\circ$ 、 $\chi^2 = -59^\circ$ であり、他の結晶型でもほぼ同様である。Figure 40 に両部位の構造を示す。どちらの Asn も側鎖は溶媒領域に露出しているため、側鎖がスクシンイミド形成に適したコンフォメーションをとることは可能である。Asp 32 - Gly 33 の配列部分は分子表面に存在する Asp 34 から Asp 37 のループ構造部に連なっており、主鎖のコンフォメーションは強く束縛されていない。これに対して Asn 68 の主鎖は、分子内部の残基とファンデルワールス接触をしている Gly 69 から Pro 70 の領域に強く束縛されている。こうした立体構造上の制約のため、Asn 68 ではスクシンイミドを形成するための主鎖のコンフォメーション変化を生じ得ず、異性化反応が進行しないと考えられる。

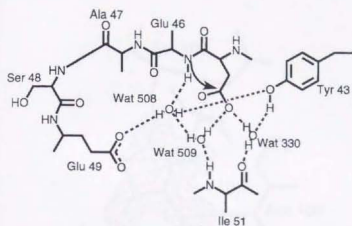
IsoAsp 32 を持つと考えられる RNase U_2B では adenylyl-3',5'-adenosine (ApA) に対する触媒活性が RNase U_2A に比べて約 3/4 に低下する (Uchida & Shibata, 1981)。Asn 32 はループ部分を通して Tyr 39、His 41 につながっている。Tyr 39 と His 41 はVIII型結晶で 3'-AMP と水素結合を形成しており、触媒部位を形成する残基である。Asp 32 のイソアスパラギン酸への変化による RNase U_2 のコンフォメーション変化が、Tyr 39 や His 41 の空間的配置や動的挙動に影響を与え、RNase U_2B の活性を低下させると考えられる。

RNase U_2B は RNase U_2A に比べて α ヘリックスの含量が低い (Uchida &

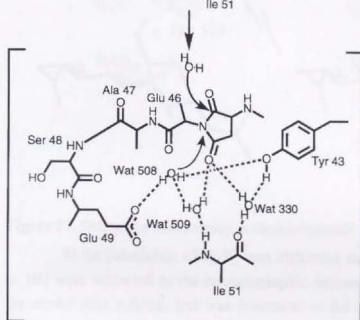
Shibata, 1981)。Asn 32 は α ヘリックス C 末端に位置しており、isoAsp の形成はヘリックス C 末部のコンフォメーションに影響を与えると考えられる。VII型では Ca^{2+} イオンの結合により分子全体の立体構造は保持されたまま Asp 28 から Asn 32 の α ヘリックス 1 回転がほどけて Ca^{2+} イオンに巻き付くコンフォメーションをとっており、 α ヘリックス C 末部はほどけやすい性質を持つことを示している。RNase U_2B でも Asn 32 の異性化の影響により、同じ部分の α ヘリックス C 末部が 1 回転分ほどけている可能性が考えられる。

アスパラギン酸とアスパラギンの異性化が生体内で実際に生じていることは、成長ホルモン (Wood *et al.*, 1989)、serine hydroxymethyltransferase (Artigues *et al.*, 1990)、 β -アミロイドペプチド (Rohrer *et al.*, 1993)、 α A-crystallin (Fujii *et al.*, 1994a)、 α B-crystallin (Fujii *et al.*, 1994b)、tubulin (Najbauer *et al.*, 1996) において見いだされている。生体内で異性化により生じたイソアスパラギン酸は protein L-isoaspartyl methyltransferase により可逆的にメチル化される。メチル化されたイソアスパラギン酸はスクシンイミドを形成する方向に平衡が傾いているため、スクシンイミドを経由して通常のアスパラギン酸が生じて蛋白質の修復が行われると考えられている (Johnson *et al.*, 1987; McFadden & Clarke, 1987; Galleiti *et al.*, 1988)。実際、protein L-isoaspartyl methyltransferase の阻害剤であるアデノシンジアルデヒド共存下でラット PC12 細胞を培養するとイソアスパラギン酸を持つ tubulin が蓄積される (Najbauer *et al.*, 1996)。この protein L-isoaspartyl methyltransferase はラットでは精巣と脳で強く発現されており (Mizobuchi *et al.*, 1994)、またヒトの場合では脳における protein L-isoaspartyl methyltransferase 活性と死亡時の年齢には正の相関がある (Johnson *et al.*, 1991)。これらの事実はイソアスパラギン酸を持つ異性化蛋白質の存在が老化現象と関連があることを間接的に示している。アスパラギン酸が異性化した蛋白質では、異性化した残基周辺で構造変化が生じることに起因して、その蛋白質の機能と物性が変化すると考えられる。

RNase U₂ の場合には Asp 45 異性化によって塩基認識の役割を持つ Glu 49 側鎖の C_δ 原子は 9.8 Å 離れた位置に存在するようになり、このため塩基認識能を失っていると考えられる。ニワトリ卵白リゾチームの例では、Asp 101 がスクシンイミドに異性化すると蛋白質の溶解度が減少し、リガンドとの相互作用様式が変化して結合が弱くなる。アスパラギン酸異性化により機能または物性が変化した蛋白質が生体内に蓄積していけば、その蛋白質が生体内で担う機能が低下したり不溶物が生じ、老化やそれに伴う疾病を引き起こす可能性が考えられる。



Glu 46 N attacks Asp 45 C_γ nucleophilically, resulting in succinimide formation.



Water molecule from the solvent region or Wat 508 attacks the carbonyl carbon of succinimide 45, resulting in isospartate formation.

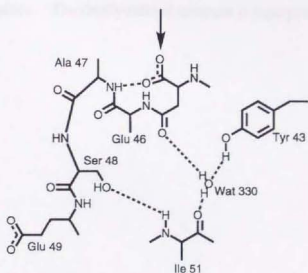


Figure 36. Schematic drawing of the isomerization reaction at Asp 45.

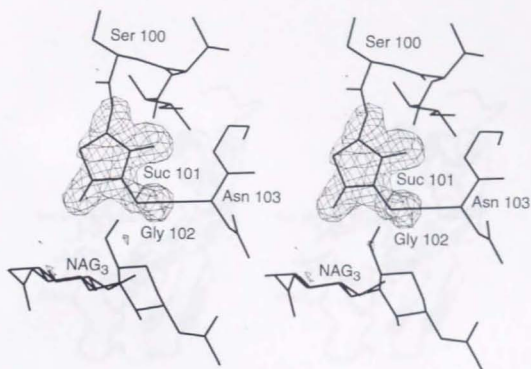


Figure 37. Difference Fourier map at the succinimide 101 - Gly 102 region.

In the calculation of $F_o - F_c$ map difference maps, a model without residue 101 to 102 were subjected to the crystallographic refinement. The map was phased with the model thus refined, and was contoured at 2.5 times the rms value of electron densities. The finally-refined structure is superposed on the map.

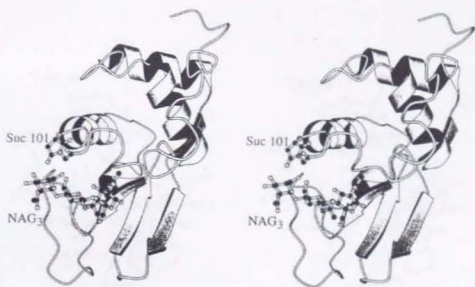


Figure 38. Overall structure of the succinimide lysozyme complexed with tri-*N*-acetylchitotriose.

The region from Suc 101 to Gly 102 and the tri-*N*-acetylchitotriose ligand are drawn as ball-and-stick models. C, N, and O atoms are drawn with black, dark gray, and white spheres, respectively.

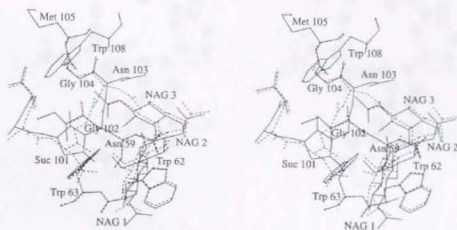
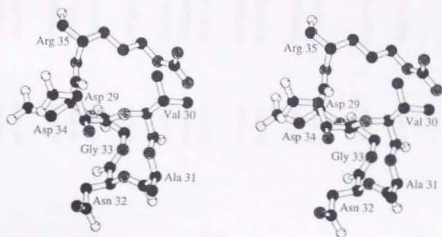
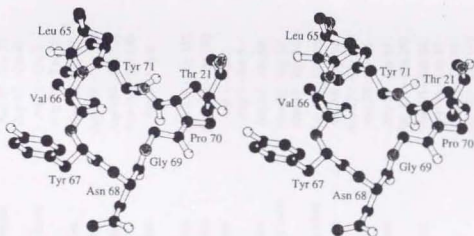


Figure 39. Stereo view of the region around succinimide 101 and the tri-*N*-acetylchitotriose ligand.

C, N, and O atoms are drawn with black, dark gray, and white spheres, respectively. The S atom is drawn with larger white sphere.



(a)



(b)

Figure 40. Stereo view of the structures at Asn - Gly pairs in RNase U₂ type II crystal.

(a) Asn 32 - Gly 33, (b) Asn 68 - Gly 69. C, N, and O atoms are drawn with black, dotted gray, and white spheres, respectively.

Table 19. Examples of isomerization of aspartate and asparagine in proteins.

Protein	Source	Sequence	Isomerize to	<i>in vivo/in vitro</i>	Reference
RNase U ₂	Smut fungus	Asn 32 - Gly 33 Asp 45 - Glu 46	isoAsp L-isoAsp	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i>	Kanai & Uchida, 1986 Noguchi <i>et al.</i> , 1995
Calmodulin	Bovine brain	Asp 2 - Gln 3 Asp 78 - Tyr 79	IsoAsp IsoAsp	<i>in vitro</i>	Ota & Clarke, 1989
Calbindin D9k	Bovine	Asn 56 - Gly 57	IsoAsp	<i>in vitro</i>	Chazin <i>et al.</i> , 1989
Growth hormone	Bovine	Asp 128 - Gly 129	isoAsp	<i>in vivo</i>	Wood <i>et al.</i> , 1989
Growth hormone	Human	Asp 130 - Gly 131 Asn 149 - Ser 150	isoAsp isoAsp, Asp	<i>in vitro</i>	Johnson <i>et al.</i> , 1989
Serine hydroxy- methyltransferase	Rabbit	Asn 5 - Gly 6	isoAsp	<i>in vivo</i>	Artigues <i>et al.</i> , 1990
Growth hormone	Human	Asp 130 - Gly 131	Suc, isoAsp	<i>in vitro</i>	Teshima <i>et al.</i> , 1991
Growth hormone	Porcine	Asp 129 - Gly 130	Suc, isoAsp	<i>in vitro</i>	Violand <i>et al.</i> , 1992
β -Amyloid	Human	Asp 1 - Ala 2 Asp 7 - Ser 8	D-Asp, DL-isoAsp D-Asp, DL-isoAsp	<i>in vivo</i>	Roher <i>et al.</i> , 1993
RNase A	Bovine	Asn 67 - Gly 68	IsoAsp, Asp	<i>in vitro</i>	Di Donato <i>et al.</i> , 1993
Hirudin	Medicinal leech	Asn 53 - Gly 54 Asn 33 - Gly 34	Suc Suc	<i>in vitro</i>	Bischoff <i>et al.</i> , 1993
Lysozyme	Hen egg-white	Asp 101 - Gly 102	Suc, IsoAsp	<i>in vitro</i>	Tomizawa <i>et al.</i> , 1994
Plasminogen activator	Human	Asn 58 - Gly 59 Asn 177 - Ser 178 Asn 37 - Ser 38	isoAsp isoAsp isoAsp	<i>in vitro</i>	Paranandi <i>et al.</i> , 1994
α A-Crystallin	Human	Asp 58 - Ser 59 Asp 151 - Ala 152	D-Asp, isoAsp D-Asp, isoAsp	<i>in vivo</i>	Fujii <i>et al.</i> , 1994a
α B-Crystallin	Human	Asp 25 - Gln 26 Asp 36 - Leu 37 Asp 62 - Thr 63 Asp 109 - Glu 110 Asp 140 - Gly 141 Asn 146 - Gly 147	D-Asp D-Asp, DL-isoAsp D-Asp D-Asp D-Asp DL-Asp	<i>in vivo</i>	Fujii <i>et al.</i> , 1994b
Synapsin I	Bovine	-	isoAsp	<i>in vitro</i>	Paranandi & Aswad, 1995
IgE	Human	Asp 32 - Gly 33	Suc, IsoAsp	<i>in vitro</i>	Cacia <i>et al.</i> , 1996
Tubulin	Rat	Asp	isoAsp	<i>in vivo, in vitro</i>	Najbauer <i>et al.</i> , 1996

Table 20. Torsion angles of Asp 45.

Crystal type	IV	V	VI	VII	VIII
ψ (degree)	128	-179	131	127	131
χ^1 (degree)	166	44	173	153	174
χ^2 (degree)	49	70	70	88	56

5 引用文献

- Amemiya, Y.; Matsushita, T.; Nakagawa, A.; Satow, Y.; Miyahara, J.; and Chikawa, J. (1988) Design and performance of an imaging plate system for X-ray diffraction study. *Nucl. Instr. Meth.* **A266**, 645-653.
- Aphanasenko, G. A.; Dudkin, S. M.; Kaminir, L. B.; Leshchinskaya, I. B.; and Severin, E. S. (1979) Primary structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P. *FEBS Letters*, **97**, 77-80.
- Arima, Terukatsu; Uchida, Tsuneko; and Egami, Fujio (1968a) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*: purification and properties. *Biochem. J.* **106**, 601-607.
- Arima, Terukatsu; Uchida, Tsuneko; and Egami, Fujio (1968b) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*: characterization of substrate specificity with special reference to purine-specific ribonucleases. *Biochem. J.* **106**, 609-613.
- Arni, Raghuvir K.; Heinemann, Udo; Tokuoka, Ryouji; and Saenger, Wolfram (1992) Three-dimensional structure of the ribonuclease T₁ * 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **263**, 15358-15368.
- Artigues, A.; Birkett, A.; Schirch, V. (1990) Evidence for the *in vivo* deamidation and isomerization of an asparaginy residue in cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.* **265**, 4853-4858.
- Altona, C; and Sundaralingam, M. (1972) Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation. *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 8205-8212.
- Bezborodova, S. I.; Khodova, O. M., and Stepanov, V. M. (1983) The complete amino acid sequence of ribonuclease C2 from *Aspergillus clavatus*. *FEBS Letters*, **159**, 256-258.
- Bischoff, R.; Lepage, P.; Jaquinod, M.; Cauet, G.; Achker-Klein, M.; Clesse, D.;

- Laporte, M.; Bayol, A.; Van Corsselaer, A.; and Roitsch, C. (1993) Sequence-specific deamidation: isolation and biochemical characterization of succinimide intermediates of recombinant hirudin. *Biochemistry* **32**, 725-734.
- Breslow, Ronald; Huang, Deeng-Lih; and Anslyn, Eric (1989) On the mechanism of action of ribonucleases: Dinucleotide cleavage catalyzed by imidazole and Zn^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1746-1750.
- Brünger, Axel T. (1991) Solution of Fab (26-10)/digoxin complex by generalized molecular replacement. *Acta Cryst. A* **47**, 195-204.
- Brünger, Axel T. (1992) Free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Buckle, Ashley M.; and Fersht, Alan R. (1994) Subsite binding in RNase: Structure of a Barnase-tetranucleotide complex at 1.76-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 1644-1653.
- Cacia, Jerry; Keck, Rodney; Presta, Leonard G.; and Frenz, John (1996) Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: identification and effect on binding affinity. *Biochemistry* **35**, 1897-1903.
- Capasso, Sante; Mazzarella, Lelio; Sica, Filomena; and Zagari, Adriana. (1989) Solid-state conformations of aminosuccinyl peptides: Crystal structure of *tert*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-aminosuccinyl-L-phenylalaninamide. *Biopolymers* **28**, 139-147.
- Capasso, Sante, Mazzarella, Lelio, Sica, Filomena, and Zagari, Adriana. (1992) Solid-state conformations of aminosuccinyl peptides: Structure of *tert*-butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-aminosuccinyl-glycyl-L-alanine methyl ester (Boc-L-Pro-L-Asu-Gly-L-Ala-OMe). A case of pseudo-translational symmetry. *Acta Cryst. B* **48**, 285-290.
- Chazin, W. J.; Kordel, J.; Thulin, E.; Hofmann T.; Drakenberg T.; and Forsen S. (1989) Identification of an isoaspartyl linkage formed upon deamidation of bovine calbindin D9k and structural characterization by 2D 1H NMR. *Biochemistry* **28**,

- Cuchillo, Claudi M.; Pares, Xavier; Guasch, Alicia; Barman, Tom; Travers, Franck; & Nogues, M. Vicoria (1993) The role of 2',3'-cyclic phosphodiester in the bovine pancreatic ribonuclease A catalyzed cleavage of RNA: intermediates or products ? *FEBS Letters* **333**, 207-210.
- Di Donato, A.; Ciardiello, M. A.; de Nigris, M.; Piccoli, R.; Mazzarella, L.; and D'Alessio, G. (1993) Selective deamidation of ribonuclease A. Isolation and characterization of the resulting isoaspartyl and aspartyl derivatives. *J. Biol. Chem.* **268**, 4745 (1993)
- Ding, Jianping; Koellner, Gertraud; Grunert, Hans-Peter; and Saenger, Wolfram (1991) Crystal structure of ribonuclease T₁ complexed with adenosine 2'-monophosphate at 1.8-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **266**, 15128-15314.
- Eckstein, Fritz; Schulz, Hans H; Rüterjans, Heinrich; Haar, Wolfgang; and Maurer, Wolfgang (1972) Stereochemistry of the transesterification step of ribonuclease T₁. *Biochemistry* **11**, 3507-3512.
- Egami, Fujio; Oshima, T.; and Uchida, Tsuneko (1980) Specific interaction of base-specific nucleases with nucleosides and nucleotides. in *Molecular Biol. Biochem. and Biophys.*, Vol.32 (Chapeville, F., & Haenni, A.-L. Eds.) pp 250-270, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Fujii, Noriko; Ishibashi, Yoshihiro; Satoh, Kenshi; Fujino, Masahiko; and Harada, Kaoru (1994b) Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in α B-crystallin from the aged human lens. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 157-163.
- Fujii, Noriko; Satoh, Kenshi; Harada, Kaoru; and Ishibashi, Yoshihiro (1994a) Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in α A-crystallin from human lens. *J. Biochem.* **116**, 663-669.
- Galleiti, P.; Ciardiello, A.; Ingrosso, D.; Di Donato, A.; and D'Alessio, G. (1988) Repair of isopeptide bonds by protein carboxyl O-methyltransferase: seminal ribonuclease as a model system. *Biochemistry* **27**, 1752-1757.

- Geiger, Terrence and Clarke, Steven (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. *J. Biol. Chem.* **262**, 785-794.
- Gohda, Keigo; Oka Ken-ichi; Tomita, Ken-ichi; and Hakoshima, Toshio (1994) Crystal structure of RNase T₁ complexed with the product nucleotide 3'-GMP. *J. Biol. Chem.* **269**, 17531-17536.
- Görbitz, C. H. (1987) Crystal and molecular structures of the isomeric dipeptides α -L-aspartyl-L-alanine and β -L-aspartyl-L-alanine. *Acta Chem. Scand.* **B 41**, 679-685.
- Guillet, Valerie; Laphtorn, Adrian; and Manguen, Yves (1993) Three-dimensional structure of a barnase-3'GMP complex at 2.2 Å resolution. *FEBS Letters* **330**, 137-140.
- Hartley, R. W. and Barker, E. A. (1972) Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nature New Biol.*, **235**, 15-16.
- Heinemann, Udo and Hahn, Ulrich (1989) in *Protein-Nucleic Acid Interaction* (Saenger, W. and Heinemann, U., eds), PP.111-141, Macmillan, London.
- Hendrickson, Wayne A. (1985) Stereochemically restrained refinement of macromolecular structures. in *Methods Enzymol.* **115**, 252-270.
- Hirabayashi, J. and Yoshida, H. (1983) The primary structure of ribonuclease F₁ from *Fusarium moniliforme*. *Biochem. Internat.*, **7**, 255-262.
- Hirai, Akira; Terui, Koji; and Motonaga, Kazuo. (1972) Studies on cultural media for the production of ribonucleases by *Ustilago sphaerogena*. *Ann. Sankyo Res. Lab.* **24**, 116-120.
- Hodel, Alec; Kim, Sung-Hou; and Brünger, Axel T. (1992) Model bias in macromolecular crystal structures. *Acta Cryst.* **A48**, 851-858.

- Johnson, B. A.; Murray, E. D. Jr.; Clarke S.; Glass, DB.; and Aswad, DW. (1987) Protein carboxyl methyltransferase facilitates conversion of atypical L-isoaspartyl peptides to normal L-aspartyl peptides. *J. Biol. Chem.* **262**, 5622-5629.
- Johnson, B. A.; Shirokawa, J. M.; Geddes, J. W.; Choi, B. H.; Kim, R. C.; and Aswad, D. W. (1991) Protein L-isoaspartate methyltransferase in postmortem brains of aged humans. *Neurobiol. Aging* **12**, 19-24.
- Johnson, B. A.; Shirokawa, J. M.; Hancock, W. S.; Spellman, M. W.; Basa, L. J.; and Aswad, D. W. (1989) Formation of isoaspartate at two distinct sites during *in vitro* aging of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* **264**, 14262-14271.
- Kanaya, Shigenori; and Uchida, Tsuneko (1986) Comparison of the primary structures of ribonuclease U₂ isoforms. *Biochem. J.* **240**, 163-170.
- Kanaya, Shigenori; and Uchida, Tsuneko (1995) Revised sequence of ribonuclease U2 in the substrate-binding region. *J. Biochem.* **118**, 681-682.
- Lenz, Andrea; Cordes, Frank; Heinemann, Udo; and Saenger; Wolfram (1991) Evidence for a substrate-binding subsite in ribonuclease T₁. *J. Biol. Chem.* **266**; 7661-7667.
- Luzzati, V. (1952) Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst.* **5**;802-810.
- Maenaka, K., Matsushima, M., Song, H., Sunada, F., Watanabe, K., Kumagai, I. (1995) Dissection of protein-carbohydrate interactions in mutant hen egg-white lysozyme complexes and their hydrolytic activity. *J. Mol. Biol.* **247**, 281-293.
- Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491 - 497.
- McFadden, P. N. and Clarke, S. (1987) Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2595-2599.

- Malin, Reinhard; Zielenkiewicz, Piotr; and Saenger, Wolfram (1991) Structurally conserved water molecules in ribonuclease T₁. *J. Biol. Chem.* **266**, 4848-4852.
- Matsuzaki, Takao; Sasaki, Chizuko; Okumura, Chieko; and Uchida, Tsuneko. (1989) The X-ray analysis of ribonuclease U₂. in *Proc. of the first international meeting of structure and chemistry of ribonucleases* (Pavlovsky, A. & Polyakov, K., Eds.) pp 286-290, Academy of sciences of the USSR, Moscow.
- Mizobuchi, M.; Murao, K.; Takeda, R.; and Kakimoto, Y. (1994) Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis. *J. Neurochem.* **62**, 322-328.
- Najbauer, J.; Orpiszewski, J.; and Aswad, DW. (1996) Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo. *Biochemistry* **35**, 5183-5190.
- Nishikawa, Satoshi; Morioka, Hiroshi; Fuchimura, Kayoko; Tanaka, Toshiki; Uesugi, Seiichi; Hakoshima, Toshio; Tomita, Ken-ichi; Ohtsuka, Eiko; and Ikehara, Morio (1986) Modification of Glu 58, an amino acid of the active center of ribonuclease T₁, to Gln and Asp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 789-794.
- Nishikawa, Satoshi; Morioka, Hiroshi; Kim, H. J.; Fuchimura, Kayoko; Tanaka, Toshiki; Uesugi, Seiichi; Hakoshima, Toshio; Tomita, Ken-ichi; Ohtsuka, Eiko; and Ikehara, Morio (1987) Two histidine residues are essential for ribonuclease T₁ activity as is the case for ribonuclease A. *Biochemistry* **26**, 8620-8624.
- Nonaka, Takamasa; Nakamura, Kazuo T.; Uesugi, Seiichi; Ikehara, Morio; Irie, Masachika; and Mitsui, Yukio. (1993) Crystal structure of ribonuclease Ms (as a ribonuclease T₁ homologue) complexed with a guanylyl-3',5'-cytidine analogue. *Biochemistry* **32**, 11825-11837.
- Oliyai, Cecilia and Borchardt Ronald T. (1993) Chemical pathways of peptide degradation. IV. Pathways, kinetics, and mechanism of degradation of an aspartyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* **10**, 95-102

- Ota, Irene M.; and Clarke, Steven (1989) Enzymatic methylation of L-isospartyl residues derived from aspartyl residues in affinity-purified calmodulin. *J. Biol. Chem.* **246**, 54-60.
- Paranandi, M. V.; Guzzetta, A. W.; Hancock, W. S.; and Aswad, D. W. (1994) Deamidation and isoaspartate formation during in vitro aging of recombinant tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **269**, 243-253.
- Paranandi, M. V.; and Aswad, D. W. (1995) Spontaneous alterations in the covalent structure of synapsin I during in vitro aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 442-448.
- Pletinckx, Jurgen; Steyaert, Jan; Zegers, Ingrid; Choe, Hui-Woog; Heinemann, Udo; and Wyns, Lode (1994) Crystallographic study of Glu58Ala RNase T₁ · Guanosine Monophosphate at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 1654-1662.
- Roher, Alex E.; Lowenson, Jonathan D.; Clarke, Steven; Wolkow, Cathy; Wang, Rong; Cotter, Robert J.; Reardon, Ilene M.; Zurcher-Neely, Heidi A.; Heinrichson, Robert L.; Ball, Melvyn J.; and Greenberg, Barry D. (1993) Structural alterations in the peptide backbone of b-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 3072-3083.
- Rossmann, Michael G. (1979) Processing oscillation Diffraction data for very large unit cells with an automatic convolution technique and profile fitting. *J. Appl. Cryst.* **12**, 225-238.
- Roussel, A. & Cambillau, C. (1990) TURBO-FRODO version 1.1 release b. Faculte de Medecine Nord, 13326 Marseille Cedex 15, France.
- Sasaki, S. (1989) Numerical tables of anomalous scattering factors calculated by the Cromer and Liberman's methods. *KEK report 88-14*, KEK Natl. Lab. for High Energy Phys., Tsukuba, Japan.
- Sato, Showbu and Uchida, Tsuneko (1975a) The amino acid sequence of ribonuclease U₂ from *Ustilago sphaerogena*. *Biochem. J.* **145**, 353-360.

- Sato, Showbu and Uchida, Tsuneko (1975b) On the interaction of ribonuclease U₂ and substrate analogues. *Biochim. Biophys. Acta* **383**, 168-177.
- Satow, Yoshinori; Cohen, Gerson H.; Padlan, Eduardo A.; and Davies, David R. (1986) Phosphocholine binding immunoglobulin Fab McPC603. An X-ray diffraction study at 2.7 Å. *J. Mol. Biol.* **190**, 593-604.
- Satow, Yoshinori and Iitaka, Yoichi (1989) Horizontal-type four-circle diffractometer station of the vertical wiggler beamline at the Photon Factory. *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 2390-2393.
- Sevcik, J.; Dodson, E. J.; and Dodson, G. G (1991) Determination and restrained least-squares refinement of the structures of ribonuclease Sa and its complex with 3'-guanylic acid at 1.8 Å resolution. *Acta Cryst.* **B 47**, 240-253.
- Shlyapnikov, S. V.; Both, V.; Kulikov, V. A.; Dementiev, A. A.; Sevcik, J.; and Zelinka, J. (1986) Amino acid sequence determination of guanyl-specific ribonuclease Sa from *Streptomyces aureofaciens*. *FEBS Letters*, **209**, 335-339.
- Stephenson, Robert C. and Clarke, Steven (1989) Succinimide formation from aspartyl and asparaginyll peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 6164-6170.
- Steyaert, Jan; Hallenga, Klaas; Wyns, Lode; and Stanssens, Patrick (1990) Histidine-40 of ribonuclease T₁ acts as base catalyst when the true catalytic base, glutamic acid-58, is replaced by alanine. *Biochemistry* **29**, 9064-9072.
- Stura, E. A. and Wilson, I. A. (1992) in *Crystallization of nucleic acids and proteins*, Eds. A. Ducruix and R. Giegé, (IRL Press, Oxford), P.107.
- Takahashi, Kenji (1985) A revision and confirmation of the amino acid sequence of ribonuclease T₁. *J. Biochem* **98**, 815-817.
- Takahashi, Kenji; and Hashimoto, Junji (1988) The amino acid sequence of ribonuclease U₁, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Ustilago spheerogena*. *J. Biochem.* **103**, 313-320.

- Takahashi, Kenji and Moore, Stanford (1982) *The Enzymes* **15**, 435-467.
- Teshima, Glen; Stults, John T.; Ling, Victor; and Canova-Davis, Eleanor (1991) Isolation and characterization of a succinimide variant of methionyl human growth hormone. *J. Biol. Chem.* **266**, 13544-13547.
- Tomizawa, Hideyuki; Yamada, Hidenori; Ueda, Tadashi; and Imoto, Taiji (1994) Isolation and characterization of 101-succinimide lysozyme that possesses the cyclic imide at Asp101-Gly102. *Biochemistry* **33**, 8770-8774.
- Uchida, Tsuneko; Arima, Terukatsu; and Egami, Fujio (1970) Specificity of RNase U₂. *J. Biochem.* **67**, 91-102.
- Uchida, Tsuneko and Shibata, Yasuyuki (1981) An affinity adsorbent, 5'-adenylate-aminohexyl-sepharose. I. Purification and properties of two forms of RNase U₂. *J. Biochem.* **90**, 463-471.
- Uchida, Tsuneko; and Machida, Chiyoko (1978) The specificity for dinucleoside monophosphates of RNase U₂ and urea-treated RNase U₂. *Nucleic acids Res., Special Pub.* **5**, s409-s412.
- Vassilyev, D. G.; Katayanagi, K.; Ishikawa, K.; Tshujimoto-Hirano, M.; Danno, M.; Pähler, A.; Matsumoto, O.; Matsushima, M.; Yoshida, H.; and Morikawa, K. (1993) Crystal structure of ribonuclease F₁ of *Fusarium moniliforme* in its free form and in complex with 2'GMP. *J. Mol. Biol.* **230**, 979-996.
- Violand, B. N.; Schlittler, M. R.; Kolodziej, E. W.; Toren, P. C.; Cabonce, M. A.; Siegel, N. R.; Duffin, K. L.; Zobel, J. F.; Smith, C. E.; and Tou, J. S. (1992) Isolation and characterization of porcine somatotropin containing a succinimide residue in place of aspartate 129. *Protein Science* **1**, 1634-1641.
- Watanabe, Hideki; Ohgi, Kazuo; and Irie, Masachika. (1982) Primary structure of a minor ribonuclease from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.* **91**, 1495-1405.
- Wood, D. C.; Salsgiver, W. J.; Kasser, T. R.; Lange, G. W.; Rowold, E.; Violand, B. N.; Johnson, A.; Leimgruber, R. M.; Parr, G. R.; and Siegel, N. R. (1989)

Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. *J. Biol. Chem.* **264**, 14741-14747

Yasuda, Toshihiro & Inoue, Yasuo. (1982) Studies of catalysis by ribonuclease U₂. Steady-state kinetics for transphosphorylation of oligonucleotide and synthetic substrates. *Biochemistry* **21**, 364-369.

Yoshida, N.; Sasaki, A., Rashid, M. A.; and Otsuka, H. (1976) The amino acid sequence of ribonuclease St. *FEBS Letters*, **64**, 122-125.

6 付表

以下に RNase U_2 の II 型から VIII 型の 7 種の結晶構造に見られる結晶内蛋白質分子間の水素結合および 4 Å 以下の原子間距離にある原子の組を各結晶毎に記す。(4-4) 節で述べた RNase U_2 と RNA 間の相互作用に似た結晶内蛋白質分子間相互作用は、#印を付けて示す。

II 型結晶

P2,2,2,

$a = 49.32 \text{ \AA}$, $b = 61.27 \text{ \AA}$, $c = 34.95 \text{ \AA}$

symm# 1 = (x, y, z)

symm# 2 = (-x+1/2, -y, z+1/2)

symm# 3 = (x+1/2, -y+1/2, -z)

symm# 4 = (-x, y+1/2, -z+1/2)

水素結合

Atom	Atom	Distance
ASP 2 OD1 - ARG 35 NH1	(sym# 4)	3.29 A
ASP 2 OD1 - ARG 35 NH2	(sym# 4)	2.84 A
ASP 2 OD1 - TYR 107A OH	(sym# 3)	3.27 A
ASP 2 OD2 - TYR 107A OH	(sym# 3)	2.27 A
ASN 20 ND2 - GLY 103 O	(sym# 3)	2.97 A
THR 21 OG1 - ASP 76 OD1	(sym# 4)	3.25 A
GLY 33 N - CYS 54 O	(sym# 4)	3.22 A
ARG 35 NH2 - GLU 94 OE2	(sym# 4)	2.92 A
ARG 35 NE - GLU 94 OE1	(sym# 4)	2.98 A
GLN 42 NE2 - TYR 107A O	(sym# 2)	3.09 A
GLN 42 NE2 - TYR 807 O	(sym# 2)	3.09 A
ASP 45 N - TYR 78 OH	(sym# 2)	3.19 A
ASP 45 OD1 - TYR 78 OH	(sym# 2)	2.54 A
ASP 50 OD1 - ASP 76 O	(sym# 2)	3.29 A
GLY 69 O - TYR 78 NH1	(sym# 4)	3.06 A
GLY 69 O - ARG 75 NH2	(sym# 4)	2.96 A
ASN 77 ND2 - SER 106 OG	(sym# 2)	3.09 A
ASN 77 OD1 - ALA 105 N	(sym# 2)	3.03 A
TYR 78 O - PHE 110 N	(sym# 2)	2.86 A

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 Å 以下の原子間距離

Atom	Atom	Distance
CYS 1 C - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.63 A
CYS 1 CA - VAL 30 O	(sym# 4)	3.12 A
CYS 1 CB - ALA 31 C	(sym# 4)	3.79 A
CYS 1 CB - ALA 31 O	(sym# 4)	3.39 A
CYS 1 CB - VAL 30 O	(sym# 4)	3.20 A
CYS 1 N - GLY 33 CA	(sym# 4)	3.80 A
CYS 1 O - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.84 A
ASP 2 CG - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.97 A
ASP 2 CG - TYR 107A OH	(sym# 3)	3.07 A
ASP 2 CG - VAL 30 CG1	(sym# 4)	3.50 A
ASP 2 N - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.74 A
ASP 2 OD1 - ARG 35 C2	(sym# 4)	3.49 A
ASP 2 OD1 - VAL 30 CG1	(sym# 4)	3.52 A
ASP 2 OD2 - TYR 107A CE2	(sym# 3)	3.50 A
ASP 2 OD2 - TYR 107A C2	(sym# 3)	3.30 A
ASP 2 OD2 - VAL 30 CG1	(sym# 4)	3.54 A
ASN 16 C - ALA 105 CB	(sym# 3)	3.90 A
ASN 16 CB - ALA 105 O	(sym# 3)	3.88 A
ASN 16 ND2 - ALA 105 O	(sym# 3)	3.61 A
ASN 16 ND2 - SER 106 CB	(sym# 3)	3.92 A
ASN 16 O - ALA 105 CB	(sym# 3)	3.72 A
ASP 17 CA - ALA 105 CB	(sym# 3)	3.77 A
ASP 17 CB - SER 74 CB	(sym# 4)	3.75 A
ASP 17 CB - SER 74 OG	(sym# 4)	3.42 A
ASP 17 CG - ASN 77 CB	(sym# 4)	3.76 A
ASP 17 CG - ASN 77 N	(sym# 4)	3.89 A
ASP 17 CG - ASP 76 C	(sym# 4)	3.86 A
ASP 17 CG - ASP 76 N	(sym# 4)	3.69 A
ASP 17 CG - SER 74 CB	(sym# 4)	3.50 A
ASP 17 CG - SER 74 OG	(sym# 4)	3.67 A

ASP 17 N - ALA 105 CB	(sym# 3)	3.93 A
ASP 17 OD1 - ASN 77 CB	(sym# 4)	3.43 A
ASP 17 OD1 - ASN 77 N	(sym# 4)	3.44 A
ASP 17 OD1 - ASP 76 C	(sym# 4)	3.08 A
ASP 17 OD1 - ASP 76 CA	(sym# 4)	3.43 A
ASP 17 OD1 - ASP 76 CB	(sym# 4)	3.27 A
ASP 17 OD1 - ASP 76 N	(sym# 4)	3.57 A
ASP 17 OD1 - ASP 76 O	(sym# 4)	3.26 A
ASP 17 OD2 - ARG 75 C	(sym# 4)	3.95 A
ASP 17 OD2 - ARG 75 CG	(sym# 4)	3.65 A
ASP 17 OD2 - ARG 75 N	(sym# 4)	3.56 A
ASP 17 OD2 - ASN 77 N	(sym# 4)	3.82 A
ASP 17 OD2 - ASP 76 C	(sym# 4)	3.89 A
ASP 17 OD2 - ASP 76 CA	(sym# 4)	3.71 A
ASP 17 OD2 - ASP 76 CB	(sym# 4)	3.90 A
ASP 17 OD2 - ASP 76 N	(sym# 4)	2.95 A
ASP 17 OD2 - SER 74 C	(sym# 4)	3.88 A
ASP 17 OD2 - SER 74 CB	(sym# 4)	2.97 A
ASP 17 OD2 - SER 74 OG	(sym# 4)	3.26 A
ASN 20 CB - ALA 105 CA	(sym# 3)	3.95 A
ASN 20 CB - ALA 105 CB	(sym# 3)	3.80 A
ASN 20 CG - ALA 105 CA	(sym# 3)	3.86 A
ASN 20 CG - ALA 105 N	(sym# 3)	3.97 A
ASN 20 CG - GLY 103 O	(sym# 3)	3.84 A
ASN 20 ND2 - ALA 104 C	(sym# 3)	3.51 A
ASN 20 ND2 - ALA 104 CA	(sym# 3)	3.98 A
ASN 20 ND2 - ALA 104 O	(sym# 3)	3.88 A
ASN 20 ND2 - ALA 105 CA	(sym# 3)	3.78 A
ASN 20 ND2 - ALA 105 N	(sym# 3)	3.44 A
ASN 20 ND2 - GLY 103 C	(sym# 3)	3.94 A
ASN 20 OD1 - GLY 103 O	(sym# 3)	3.94 A
THR 21 CB - ASP 76 OD1	(sym# 4)	4.00 A
THR 21 CG2 - ASP 76 OD1	(sym# 4)	3.45 A
THR 21 OG1 - ASP 76 CB	(sym# 4)	3.53 A
THR 21 OG1 - ASP 76 CG	(sym# 4)	3.82 A
ALA 31 O - CYS 54 CA	(sym# 4)	3.95 A
ALA 31 O - CYS 54 CB	(sym# 4)	3.48 A
ALA 31 O - CYS 54 O	(sym# 4)	3.56 A
ASN 32 C - CYS 54 C	(sym# 4)	3.84 A
ASN 32 C - CYS 54 O	(sym# 4)	3.64 A
ASN 32 CA - CYS 54 O	(sym# 4)	3.56 A
ASN 32 O - CYS 54 C	(sym# 4)	3.80 A
ASN 32 O - CYS 54 O	(sym# 4)	3.29 A
ASN 32 O - CYS 55 C	(sym# 4)	3.59 A
ASN 32 O - CYS 55 CA	(sym# 4)	3.57 A
ASN 32 O - CYS 55 N	(sym# 4)	3.93 A
ASN 32 O - GLY 56 N	(sym# 4)	3.77 A
GLY 33 CA - CYS 54 O	(sym# 4)	3.65 A
GLY 33 CA - GLU 94 CD	(sym# 4)	3.77 A
GLY 33 CA - GLU 94 OE2	(sym# 4)	3.37 A
ARG 35 CD - GLU 94 OE1	(sym# 4)	3.83 A
ARG 35 CE - GLU 94 OE1	(sym# 4)	3.80 A
ARG 35 CE - GLU 94 OE2	(sym# 4)	3.65 A
ARG 35 NE - GLU 94 CD	(sym# 4)	3.60 A
ARG 35 NE - GLU 94 OE2	(sym# 4)	3.46 A
ARG 35 NH2 - GLU 94 CD	(sym# 4)	3.71 A
ARG 35 NH2 - GLU 94 OE1	(sym# 4)	3.70 A
ASP 37 C - ALA 47 CB	(sym# 2)	3.79 A
ASP 37 CG - ALA 47 CB	(sym# 2)	3.76 A
ASP 37 CG - ASP 45 OD1	(sym# 2)	3.36 A
ASP 37 O - ALA 47 CB	(sym# 2)	3.29 A
ASP 37 OD1 - ALA 47 CB	(sym# 2)	3.98 A
ASP 37 OD1 - ASP 45 C	(sym# 2)	3.29 A
ASP 37 OD1 - ASP 45 OD1	(sym# 2)	2.47 A
ASP 37 OD1 - ASP 45 OD2	(sym# 2)	3.46 A
ASP 37 OD2 - ALA 47 C	(sym# 2)	3.47 A
ASP 37 OD2 - ALA 47 CB	(sym# 2)	3.40 A
ASP 37 OD2 - ALA 47 O	(sym# 2)	3.59 A
ASP 37 OD2 - ASP 45 C	(sym# 2)	3.93 A
ASP 37 OD2 - ASP 45 OD1	(sym# 2)	3.50 A

ASP 37 OD2 - ASP 45 OD2 (sym# 2) 3.87 A
 ASP 37 OD2 - SER 48 CA (sym# 2) 3.91 A
 ASP 37 OD2 - SER 48 N (sym# 2) 3.59 A
 ASN 38 OD1 - ALA 47 CA (sym# 2) 3.92 A
 ASN 38 OD1 - ALA 47 CB (sym# 2) 3.58 A
 GLN 42 CD - TYR 107A O (sym# 2) 3.80 A
 GLN 42 CD - TYR 107B CD2 (sym# 2) 3.93 A
 GLN 42 CD - TYR 107B O (sym# 2) 3.80 A
 GLN 42 NE2 - TYR 107A C (sym# 2) 3.91 A
 GLN 42 NE2 - TYR 107A CB (sym# 2) 3.76 A
 GLN 42 NE2 - TYR 107A CD1 (sym# 2) 3.65 A
 GLN 42 NE2 - TYR 107B C (sym# 2) 3.91 A
 GLN 42 NE2 - TYR 107B CB (sym# 2) 3.76 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107A CB (sym# 2) 3.90 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107A O (sym# 2) 3.46 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107B CB (sym# 2) 3.90 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107B CD2 (sym# 2) 3.04 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107B CE2 (sym# 2) 3.92 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107B CG (sym# 2) 3.94 A
 GLN 42 OE1 - TYR 107B O (sym# 2) 3.66 A
 TYR 43 CE2 - TYR 78 CE2 (sym# 2) 3.59 A #
 TYR 43 CE2 - TYR 78 CE (sym# 2) 3.97 A #
 TYR 44 C - TYR 78 OH (sym# 2) 3.93 A #
 TYR 44 CB - PRO 81 CD (sym# 2) 3.93 A #
 TYR 44 CB - PRO 81 CG (sym# 2) 3.67 A #
 TYR 44 CD2 - GLY 82 O (sym# 2) 3.69 A #
 TYR 44 CD2 - SER 80 CG (sym# 2) 3.75 A
 TYR 44 CE1 - HIS 101 CD2 (sym# 2) 3.53 A #
 TYR 44 CE2 - GLY 82 C (sym# 2) 3.57 A #
 TYR 44 CE2 - GLY 82 O (sym# 2) 3.41 A #
 TYR 44 CE - GLY 82 C (sym# 2) 3.95 A #
 TYR 44 CE - GLY 82 O (sym# 2) 3.61 A #
 TYR 44 OH - HIS 101 CB (sym# 2) 3.99 A
 TYR 44 OH - HIS 101 CD2 (sym# 2) 3.92 A
 TYR 44 OH - PRO 83 CA (sym# 2) 3.60 A
 TYR 44 OH - PRO 83 CB (sym# 2) 3.62 A
 TYR 44 OH - PRO 83 N (sym# 2) 3.98 A
 ASP 45 C - TYR 78 CE1 (sym# 2) 3.92 A
 ASP 45 C - TYR 78 OH (sym# 2) 3.35 A
 ASP 45 CA - TYR 78 OH (sym# 2) 3.41 A
 ASP 45 OD1 - TYR 78 CE1 (sym# 2) 3.30 A
 ASP 45 OD1 - TYR 78 CE (sym# 2) 3.35 A
 SER 48 CB - TYR 78 CD1 (sym# 2) 3.53 A
 SER 48 CB - TYR 78 CE1 (sym# 2) 3.76 A
 SER 48 OG - TYR 78 CD1 (sym# 2) 3.57 A
 SER 48 OG - TYR 78 CG (sym# 2) 3.92 A
 GLU 49 C - ARG 75 O (sym# 2) 3.50 A
 GLU 49 CA - ARG 75 O (sym# 2) 3.93 A
 GLU 49 CB - ARG 75 CA (sym# 2) 3.77 A
 GLU 49 CB - ARG 75 O (sym# 2) 3.31 A
 GLU 49 CD - ARG 75 CA (sym# 2) 3.99 A
 GLU 49 O - ARG 75 O (sym# 2) 3.85 A
 GLU 49 OE1 - ARG 75 CB (sym# 2) 3.84 A
 ASP 50 CA - ARG 75 O (sym# 2) 3.87 A
 ASP 50 CB - ARG 75 O (sym# 2) 3.31 A
 ASP 50 CB - ASP 76 CA (sym# 2) 3.86 A
 ASP 50 CG - ARG 75 O (sym# 2) 3.91 A
 ASP 50 CG - ASP 76 C (sym# 2) 3.90 A
 ASP 50 N - ARG 75 O (sym# 2) 3.47 A
 ASP 50 OD1 - ASN 77 N (sym# 2) 3.68 A
 ASP 50 OD1 - ASP 76 C (sym# 2) 3.32 A
 ASP 50 OD1 - ASP 76 CA (sym# 2) 3.82 A
 ASP 50 OD1 - TYR 78 N (sym# 2) 3.82 A
 ASP 50 OD2 - TYR 78 CB (sym# 2) 3.31 A
 ASP 50 OD2 - TYR 78 N (sym# 2) 3.83 A
 ILE 51 CD1 - TYR 78 CB (sym# 2) 3.88 A
 ILE 51 CD1 - TYR 78 CD2 (sym# 2) 3.85 A
 ILE 51 CD1 - TYR 78 CG (sym# 2) 3.93 A
 SER 57 CB - ASN 68 ND2 (sym# 1) 3.39 A
 SER 57 OG - TYR 67 CB (sym# 1) 3.49 A

SER 57 OG - TYR 67 CD1 (sym# 1) 3.84 A
 SER 57 OG - TYR 67 CD2 (sym# 1) 3.84 A
 SER 57 OG - TYR 67 CG (sym# 1) 3.44 A
 GLY 58 O - ASN 68 ND2 (sym# 1) 3.51 A
 GLY 58 O - TYR 107B OH (sym# 2) 3.97 A
 PRO 59 CA - TYR 107B CD2 (sym# 2) 3.75 A
 PRO 59 CA - TYR 107B CE2 (sym# 2) 3.53 A
 PRO 59 CB - TYR 107A CB (sym# 2) 3.89 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CB (sym# 2) 3.89 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CD1 (sym# 2) 3.63 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CD2 (sym# 2) 2.90 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CE1 (sym# 2) 3.83 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CE2 (sym# 2) 3.15 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CG (sym# 2) 3.14 A
 PRO 59 CB - TYR 107B CE (sym# 2) 3.60 A
 PRO 59 CD - TYR 107B CD1 (sym# 2) 3.85 A
 PRO 59 CD - TYR 107B CE1 (sym# 2) 3.30 A
 PRO 59 CD - TYR 107B CE2 (sym# 2) 3.60 A
 PRO 59 CD - TYR 107B CE (sym# 2) 3.15 A
 PRO 59 CD - TYR 107B OH (sym# 2) 3.46 A
 PRO 59 CG - TYR 107B CD1 (sym# 2) 3.45 A
 PRO 59 CG - TYR 107B CD2 (sym# 2) 3.72 A
 PRO 59 CG - TYR 107B CE1 (sym# 2) 3.51 A
 PRO 59 CG - TYR 107B CE2 (sym# 2) 3.78 A
 PRO 59 CG - TYR 107B CG (sym# 2) 3.54 A
 PRO 59 CG - TYR 107B CE (sym# 2) 3.66 A
 PRO 59 N - TYR 107B CE2 (sym# 2) 3.66 A
 PRO 59 N - TYR 107B CE (sym# 2) 3.63 A
 PRO 59 N - TYR 107B OH (sym# 2) 3.75 A
 ASN 68 C - ARG 75 CE (sym# 4) 3.79 A
 ASN 68 C - ARG 75 NH1 (sym# 4) 3.71 A
 ASN 68 C - ARG 75 NH2 (sym# 4) 3.77 A
 ASN 68 CA - ARG 75 CE (sym# 4) 3.61 A
 ASN 68 CA - ARG 75 NE (sym# 4) 3.95 A
 ASN 68 CA - ARG 75 NH1 (sym# 4) 3.72 A
 ASN 68 CA - ARG 75 NH2 (sym# 4) 3.94 A
 ASN 68 O - ARG 75 NH2 (sym# 4) 3.94 A
 ASN 68 OD1 - ARG 75 CD (sym# 4) 3.59 A
 ASN 68 OD1 - ARG 75 NE (sym# 4) 3.44 A
 GLY 69 C - ARG 75 NH1 (sym# 4) 3.87 A
 GLY 69 N - ARG 75 CE (sym# 4) 3.96 A
 GLY 69 N - ARG 75 NH1 (sym# 4) 3.43 A
 GLY 69 O - ARG 75 CE (sym# 4) 3.44 A
 ASN 77 CB - ALA 105 CB (sym# 2) 3.77 A
 ASN 77 CG - ALA 105 CB (sym# 2) 3.52 A
 ASN 77 CG - ALA 105 N (sym# 2) 3.79 A
 ASN 77 CG - SER 106 OG (sym# 2) 3.89 A
 ASN 77 ND2 - ALA 105 CB (sym# 2) 3.98 A
 ASN 77 ND2 - SER 106 CB (sym# 2) 3.84 A
 ASN 77 ND2 - SER 106 N (sym# 2) 3.95 A
 ASN 77 OD1 - ALA 104 C (sym# 2) 3.92 A
 ASN 77 OD1 - ALA 104 CB (sym# 2) 3.55 A
 ASN 77 OD1 - ALA 105 CA (sym# 2) 3.71 A
 ASN 77 OD1 - ALA 105 CB (sym# 2) 3.61 A
 ASN 77 OD1 - GLY 109 C (sym# 2) 3.96 A
 ASN 77 OD1 - GLY 109 CA (sym# 2) 3.39 A
 ASN 77 OD1 - SER 106 N (sym# 2) 3.58 A
 ASN 77 OD1 - SER 106 OG (sym# 2) 3.87 A
 TYR 78 C - PHE 110 N (sym# 2) 3.99 A
 TYR 78 CB - PHE 110 G (sym# 2) 3.91 A
 TYR 78 N - PHE 110 O (sym# 2) 3.34 A
 TYR 78 O - ASP 108 O (sym# 2) 3.95 A
 TYR 78 O - GLY 109 C (sym# 2) 3.49 A
 TYR 78 O - GLY 109 CA (sym# 2) 3.23 A
 TYR 78 O - PHE 110 CA (sym# 2) 3.90 A
 TYR 78 O - PHE 110 CB (sym# 2) 3.87 A
 TYR 78 O - PHE 110 CD2 (sym# 2) 3.83 A
 VAL 79 CD1 - ASP 108 CG (sym# 2) 3.97 A
 VAL 79 CD1 - ASP 108 OD1 (sym# 2) 3.62 A
 VAL 79 CG2 - ASP 108 OD2 (sym# 2) 3.88 A

注) Tyr 107 の二つのコンフォーマーは
それぞれ残基番号を 107A と 107 B
で示した。

III型結晶

P2₁2₁2₁

a = 47.99 Å, b = 59.40 Å, c = 35.19 Å

symm1 = (x, y, z)

symm2 = (-x, -y, z)

symm3 = (x+1/2, -y+1/2, -z)

symm4 = (-x+1/2, y+1/2, -z)

水素結合

Atom	Atom	Distance
ASN 8 ND2 - ASN 32 OD1 (sym# 1)		3.17 Å
GLN 24 NE2 - ASN 77 OD1 (sym# 3)		3.28 Å
ASP 37 OD2 - ASN 38 OD1 (sym# 2)		2.92 Å
SER 80 OG - ASP 108 OD2 (sym# 2)		2.81 Å
SER 80 OG - ASP 108 OH (sym# 2)		2.97 Å
HIS 101 NE2 - TYR 107 OH (sym# 2)		3.25 Å

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 Å以下 の原子間距離

Atom	Atom	Distance
GLN 5 CB - GLY 48 O (sym# 4)		3.45 Å
GLN 5 CD - GLY 48 O (sym# 4)		3.17 Å
GLN 5 CG - GLY 48 O (sym# 4)		2.99 Å
GLN 5 NE2 - GLY 48 O (sym# 4)		3.74 Å
GLN 5 OE1 - GLY 48 O (sym# 4)		3.51 Å
ASN 8 CG - ASN 32 OD1 (sym# 1)		3.78 Å
ASN 8 OD1 - ASN 32 OD1 (sym# 1)		3.71 Å
GLY 10 C - ASN 32 O (sym# 1)		3.92 Å
GLY 10 CA - ASN 32 CA (sym# 1)		3.97 Å
GLY 10 CA - ASN 32 O (sym# 1)		3.41 Å
GLY 11 N - ASN 32 CG (sym# 1)		3.79 Å
GLY 11 N - ASN 32 OD1 (sym# 1)		3.58 Å
GLY 11 O - CYS 54 C (sym# 3)		3.93 Å
GLY 11 O - CYS 54 CA (sym# 3)		3.54 Å
GLY 11 O - CYS 54 O (sym# 3)		3.94 Å
GLN 11 O - LEU 53 O (sym# 3)		3.75 Å
ASN 16 ND2 - ASP 76 OD1 (sym# 3)		3.74 Å
ASN 16 OD1 - ASP 76 OD1 (sym# 3)		3.63 Å
ASN 20 OD1 - ASP 76 CB (sym# 3)		3.88 Å
GLN 24 CD - ASN 77 CG (sym# 3)		3.96 Å
GLN 24 CD - ASN 77 OD1 (sym# 3)		3.57 Å
GLN 24 NE2 - ASN 77 CG (sym# 3)		3.43 Å
GLN 24 NE2 - ASN 77 ND2 (sym# 3)		3.84 Å
GLN 24 OE1 - ASN 77 OD1 (sym# 3)		3.36 Å
ASN 32 O - THR 102 CG2 (sym# 1)		3.73 Å
ASP 37 C - ASN 38 CB (sym# 2)		3.96 Å
ASP 37 CA - ASN 38 CB (sym# 2)		3.92 Å
ASP 37 CA - ASN 38 OD1 (sym# 2)		3.66 Å
ASP 37 CG - ASN 38 OD1 (sym# 2)		3.93 Å
ASP 37 OD2 - ASN 38 CB (sym# 2)		3.44 Å
ASP 37 OD2 - ASN 38 CG (sym# 2)		3.59 Å
HIS 41 CD2 - TYR 78 CE1 (sym# 2)		3.83 Å
HIS 41 CE1 - TYR 78 CE1 (sym# 2)		3.60 Å
HIS 41 CE1 - TYR 78 CE2 (sym# 2)		3.63 Å
HIS 41 CE1 - TYR 78 CF (sym# 2)		3.33 Å
HIS 41 CE1 - TYR 78 OH (sym# 2)		3.65 Å
HIS 41 CG - TYR 78 OD1 (sym# 2)		3.92 Å
HIS 41 ND1 - TYR 78 OD1 (sym# 2)		3.85 Å
HIS 41 ND1 - TYR 78 OD2 (sym# 2)		3.90 Å
HIS 41 ND1 - TYR 78 CE1 (sym# 2)		3.86 Å
HIS 41 ND1 - TYR 78 CE2 (sym# 2)		3.90 Å
HIS 41 ND1 - TYR 78 CG (sym# 2)		3.87 Å
HIS 41 ND1 - TYR 78 CF (sym# 2)		3.86 Å

HIS 41 NE2 - TYR 78 CE1 (sym# 2)	3.52 Å
HIS 41 NE2 - TYR 78 CE2 (sym# 2)	3.60 Å
HIS 41 NE2 - TYR 78 OH (sym# 2)	3.76 Å
TYR 44 CE2 - TYR 78 O (sym# 2)	3.73 Å
TYR 44 OH - TYR 78 N (sym# 2)	3.48 Å
TYR 44 OH - TYR 78 O (sym# 2)	3.96 Å
THR 52 CG2 - TYR 67 CE1 (sym# 3)	3.86 Å
THR 52 CG2 - TYR 67 CE2 (sym# 3)	3.89 Å
THR 52 OD1 - TYR 67 CE2 (sym# 3)	3.89 Å
ASN 68 O - ASN 91 CB (sym# 3)	3.70 Å
ASN 68 O - ASN 91 O (sym# 3)	3.95 Å
GLY 69 O - ASN 91 CB (sym# 3)	3.75 Å
PRO 70 CD - THR 92 CG2 (sym# 3)	3.72 Å
PRO 70 O - THR 92 CG2 (sym# 3)	3.53 Å
TYR 72 CB - THR 92 CB (sym# 3)	3.64 Å
TYR 72 CD1 - THR 92 O (sym# 3)	3.46 Å
TYR 72 CE1 - GLU 94 CA (sym# 3)	3.74 Å
TYR 72 CE1 - GLU 94 CB (sym# 3)	3.91 Å
TYR 72 CE2 - GLU 94 CG (sym# 3)	3.83 Å
TYR 72 CE2 - GLU 94 CB (sym# 3)	3.78 Å
TYR 72 CE2 - GLU 94 CG (sym# 3)	3.68 Å
TYR 72 OH - GLU 94 CG (sym# 3)	3.66 Å
TYR 78 OH - SO4 201 O2 (sym# 2)	3.66 Å
TYR 78 OH - SO4 201 O3 (sym# 2)	3.98 Å
TYR 78 OH - SO4 201 O4 (sym# 2)	3.87 Å
SER 80 CB - ASP 108 CG (sym# 2)	3.90 Å
SER 80 CB - ASP 108 OD2 (sym# 2)	3.60 Å
SER 80 OG - ASP 108 CB (sym# 2)	3.74 Å
SER 80 OG - ASP 108 CG (sym# 2)	2.86 Å
GLY 82 C - TYR 107 OD1 (sym# 2)	3.75 Å
GLY 82 CA - ASP 108 OD1 (sym# 2)	3.62 Å
GLY 82 CA - ASP 108 OD2 (sym# 2)	3.83 Å
GLY 82 N - ASP 108 OD1 (sym# 2)	3.71 Å
GLY 82 N - ASP 108 OD2 (sym# 2)	3.92 Å
GLY 82 O - TYR 107 OD1 (sym# 2)	3.67 Å
GLY 82 O - TYR 107 CE1 (sym# 2)	3.49 Å
PRO 83 CA - TYR 107 OD1 (sym# 2)	3.89 Å
PRO 83 CB - TYR 107 CB (sym# 2)	3.87 Å
PRO 83 CB - TYR 107 CG (sym# 2)	3.83 Å
PRO 83 N - TYR 107 OD1 (sym# 2)	3.83 Å
HIS 101 CB - TYR 107 OD2 (sym# 2)	3.51 Å
HIS 101 CB - TYR 107 CE2 (sym# 2)	3.21 Å
HIS 101 CB - TYR 107 CE (sym# 2)	3.98 Å
HIS 101 CD2 - TYR 107 CE2 (sym# 2)	3.48 Å
HIS 101 CD2 - TYR 107 CE (sym# 2)	3.75 Å
HIS 101 CD2 - TYR 107 OH (sym# 2)	3.06 Å
HIS 101 CE1 - TYR 107 OH (sym# 2)	3.85 Å
HIS 101 CG - TYR 107 CE2 (sym# 2)	3.33 Å
HIS 101 CG - TYR 107 CE (sym# 2)	3.68 Å
HIS 101 CG - TYR 107 OH (sym# 2)	3.65 Å
HIS 101 NE2 - TYR 107 CE (sym# 2)	3.97 Å
TYR 107 CD2 - TYR 107 CE2 (sym# 2)	3.99 Å
TYR 107 CE2 - TYR 107 CE2 (sym# 2)	3.56 Å
TYR 107 CE2 - TYR 107 CE (sym# 2)	3.95 Å
TYR 107 CE2 - TYR 107 O (sym# 2)	3.83 Å
TYR 107 CE - TYR 107 CE (sym# 2)	3.87 Å
TYR 107 CE - TYR 107 OH (sym# 2)	3.80 Å
TYR 107 OH - SO4 201 O3 (sym# 2)	3.68 Å
TYR 107 OH - TYR 107 OH (sym# 2)	3.77 Å

IV 型結晶

R3 (Hexagonal setting)

a = 95.44 Å, c = 29.03 Å

symm1 = (x, y, z)

symm2 = (-y, x-y, z)

symm3 = (y-x, -x, z)

symm4 = (x+1/3, y+2/3, z+2/3)

symm5 = (-y+1/3, x-y+2/3, z+2/3)

symm6 = (y-x+1/3, -x+2/3, z+2/3)

symm7 = (x+2/3, y+1/3, z+1/3)

symm8 = (-y+2/3, x-y+1/3, z+1/3)

symm9 = (y-x+2/3, -x+1/3, z+1/3)

水素結合

Atom	Atom	Distance
ASP 2 OD1 - ASP 37 OD1 (sym# 1)		3.01 Å #
ASP 2 OD2 - TYR 39 OH (sym# 1)		2.64 Å #
ILE 3 O - TYR 78 OH (sym# 1)		3.18 Å
GLN 5 OE1 - SER 80 OG (sym# 1)		3.10 Å
SER 6 OG - ASN 68 ND2 (sym# 6)		3.21 Å
ASN 8 NE - TYR 67 O (sym# 6)		3.12 Å
ASN 20 ND2 - ARG 75 O (sym# 1)		3.07 Å
ARG 35 NH2 - ASP 50 OD2 (sym# 9)		3.46 Å
HIS 41A ND1 - GLU 49 O (sym# 9)		3.02 Å
HIS 41A NE2 - ASP 45 OD2 (sym# 9)		2.72 Å
GLN 42 NE2 - LEU 53 O (sym# 9)		2.94 Å
GLN 42 NE1 - LEU 53 N (sym# 9)		2.77 Å
GLU 46 OE1 - GLN 89 NE2 (sym# 5)		3.09 Å
GLU 46 OE1 - SER 57 N (sym# 5)		3.33 Å
GLU 46 OE1 - SER 57 OG (sym# 5)		3.15 Å
SER 48 OG - GLN 89 OE1 (sym# 5)		3.44 Å
ASN 68 O - SER 114 OG (sym# 8)		3.10 Å
ASN 91 ND2 - ASP 108 OD1 (sym# 9)		3.11 Å
ASN 91 ND2 - ASP 108 OD2 (sym# 9)		2.76 Å
ASN 91 ND2 - SER 106 OG (sym# 9)		3.24 Å

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 Å 以下の原子間距離

Atom	Atom	Distance
ASP 2 CG - ASP 37 OD1 (sym# 1)		3.89 Å
ASP 2 CG - PRO 81 CG (sym# 1)		3.73 Å
ASP 2 CG - TYR 39 OH (sym# 1)		3.35 Å
ASP 2 OD1 - ASP 37 CG (sym# 1)		3.91 Å
ASP 2 OD1 - TYR 39 OH (sym# 1)		3.32 Å #
ASP 2 OD1 - TYR 39 CE2 (sym# 1)		3.58 Å
ASP 2 OD1 - TYR 39 CE (sym# 1)		3.92 Å
ASP 2 OD2 - PRO 81 CG (sym# 1)		3.56 Å
ASP 2 OD2 - TYR 39 CE (sym# 1)		3.79 Å
ASP 2 OD2 - ARG 85 NH2 (sym# 1)		3.43 Å #
ILE 3 CA - TYR 78 OH (sym# 1)		3.98 Å
ILE 3 CB - TYR 78 CE2 (sym# 1)		3.87 Å
ILE 3 CB - TYR 78 CE (sym# 1)		3.85 Å
ILE 3 CB - TYR 78 OH (sym# 1)		3.74 Å
ILE 3 N - TYR 78 OH (sym# 1)		3.49 Å
GLN 5 CD - SER 80 OG (sym# 1)		3.70 Å
GLN 5 NE2 - SER 80 OG (sym# 1)		3.87 Å
GLN 5 OE1 - SER 80 CB (sym# 1)		3.83 Å
SER 6 C - ASN 68 ND2 (sym# 6)		3.55 Å
SER 6 C - ASN 68 OD1 (sym# 6)		3.94 Å
SER 6 CB - ASN 68 ND2 (sym# 6)		3.82 Å
SER 6 O - ASN 68 CG (sym# 6)		3.88 Å
SER 6 O - ASN 68 ND2 (sym# 6)		3.71 Å
SER 6 O - ASN 68 OD1 (sym# 6)		3.40 Å
SER 6 OG - ASN 68 CG (sym# 6)		3.82 Å

SER 6 OG - ASN 68 OD1 (sym# 6)	3.72 Å
THR 7 C - ASN 68 ND2 (sym# 6)	3.33 Å
THR 7 CA - ASN 68 ND2 (sym# 6)	3.49 Å
THR 7 N - ASN 68 ND2 (sym# 6)	3.43 Å
THR 7 O - ASN 68 ND2 (sym# 6)	3.80 Å
ASN 8 CB - ASN 68 CB (sym# 6)	3.94 Å
ASN 8 CB - ASN 68 ND2 (sym# 6)	3.92 Å
ASN 8 CB - TYR 67 O (sym# 6)	3.65 Å
ASN 8 CG - TYR 67 O (sym# 6)	3.87 Å
ASN 8 N - ASN 68 ND2 (sym# 6)	3.45 Å
GLY 11 CA - VAL 79 CG1 (sym# 6)	3.92 Å
GLY 11 N - VAL 79 CG1 (sym# 6)	3.84 Å
ASN 16 CB - TYR 78 CD2 (sym# 1)	3.99 Å
ASN 16 CB - TYR 78 CE2 (sym# 1)	3.83 Å
ASN 16 ND2 - SER 80 CB (sym# 1)	3.48 Å
ASN 16 ND2 - TYR 78 CE2 (sym# 1)	3.97 Å
ASN 20 CB - TYR 78 CB (sym# 1)	3.92 Å
ASN 20 CG - ARG 75 O (sym# 1)	3.87 Å
ASN 20 CG - TYR 78 CB (sym# 1)	3.55 Å
ASN 20 ND2 - TYR 78 CB (sym# 1)	3.64 Å
ASN 20 OD1 - TYR 78 CB (sym# 1)	3.91 Å
GLN 24 CD - ARG 75 CB (sym# 1)	3.78 Å
GLN 24 CD - ARG 75 O (sym# 1)	3.86 Å
GLN 24 CG - ARG 75 O (sym# 1)	3.37 Å
GLN 24 OE1 - ARG 75 CB (sym# 1)	3.56 Å
ARG 35 CD - ASP 50 CG (sym# 9)	3.70 Å
ARG 35 CD - ASP 50 OD1 (sym# 9)	3.54 Å
ARG 35 CE - ASP 50 CB (sym# 9)	3.39 Å
ARG 35 CE - ASP 50 CG (sym# 9)	3.69 Å
ARG 35 CE - ASP 50 OD2 (sym# 9)	3.84 Å
ARG 35 NE - ASP 50 CB (sym# 9)	3.43 Å
ARG 35 NE - ASP 50 CG (sym# 9)	3.31 Å
ARG 35 NE - ASP 50 OD1 (sym# 9)	3.63 Å
ARG 35 NE - ASP 50 OD2 (sym# 9)	3.58 Å
ARG 35 NH1 - ASP 50 CB (sym# 9)	3.91 Å
ARG 35 NH2 - ASP 50 CB (sym# 9)	3.58 Å
ARG 35 NH2 - ASP 50 CG (sym# 9)	3.78 Å
ARG 35 NH2 - GLU 49 O (sym# 9)	3.51 Å
ASN 38 CB - ALA 47 O (sym# 9)	3.79 Å
ASN 38 OD1 - SER 48 O (sym# 9)	3.75 Å
PRO 40 O - ASP 50 OD2 (sym# 9)	3.96 Å
HIS 41A CD2 - ASP 45 OD1 (sym# 9)	3.87 Å
HIS 41A CD2 - ASP 45 OD2 (sym# 9)	3.79 Å
HIS 41A CE1 - ALA 47 C (sym# 9)	3.99 Å
HIS 41A CE1 - ALA 47 CA (sym# 9)	3.98 Å
HIS 41A CE1 - ALA 47 O (sym# 9)	3.55 Å
HIS 41A CE1 - ASP 45 OD2 (sym# 9)	3.46 Å
HIS 41A CE1 - GLU 46 C (sym# 9)	3.99 Å
HIS 41A CE1 - GLU 46 O (sym# 9)	3.08 Å
HIS 41A CE1 - GLU 49 C (sym# 9)	3.97 Å
HIS 41A CE1 - GLU 49 O (sym# 9)	2.78 Å
HIS 41A ND1 - ALA 47 O (sym# 9)	3.52 Å
HIS 41A NE2 - ASP 45 CG (sym# 9)	3.47 Å
HIS 41A NE2 - ASP 45 OD1 (sym# 9)	3.40 Å
HIS 41A NE2 - GLU 46 O (sym# 9)	3.45 Å
GLN 42 CD - LEU 53 N (sym# 9)	3.54 Å
GLN 42 CD - LEU 53 O (sym# 9)	3.95 Å
GLN 42 CD - THR 52 CG2 (sym# 9)	3.86 Å
GLN 42 NE2 - LEU 53 C (sym# 9)	3.94 Å
GLN 42 NE2 - LEU 53 N (sym# 9)	3.55 Å
GLN 42 NE2 - THR 52 CG2 (sym# 9)	3.89 Å
GLN 42 OE1 - ILE 51 O (sym# 9)	3.52 Å
GLN 42 OE1 - LEU 53 CA (sym# 9)	3.87 Å
GLN 42 OE1 - LEU 53 CB (sym# 9)	3.84 Å
GLN 42 OE1 - LEU 53 CG (sym# 9)	3.88 Å
GLN 42 OE1 - LEU 53 O (sym# 9)	3.98 Å
GLN 42 OE1 - THR 52 C (sym# 9)	3.49 Å
GLN 42 OE1 - THR 52 CA (sym# 9)	3.24 Å
GLN 42 OE1 - THR 52 CG2 (sym# 9)	3.90 Å
TYR 44 CD1 - TRP 60 CH2 (sym# 9)	3.66 Å

TYR 44 CD1 - TRP 60 C22	(sym# 9)	3.91 A
TYR 44 CD2 - ASP 45 OD1	(sym# 9)	3.72 A
TYR 44 CE1 - TRP 60 CH2	(sym# 9)	3.62 A
TYR 44 CE1 - TRP 60 C22	(sym# 9)	3.85 A
TYR 44 CE2 - ASP 45 CB	(sym# 9)	3.62 A
TYR 44 CE2 - ASP 45 CG	(sym# 9)	3.27 A
TYR 44 CE2 - ASP 45 OD1	(sym# 9)	3.22 A
TYR 44 CE2 - ASP 45 OD2	(sym# 9)	3.78 A
TYR 44 OH - ASP 45 CG	(sym# 9)	3.94 A
TYR 44 OH - ASP 45 OD2	(sym# 9)	3.83 A
TYR 44 OH - LEU 53 CD1	(sym# 9)	3.80 A
TYR 44 OH - LEU 53 CG	(sym# 9)	3.80 A
GLU 46 CD - GLN 89 NE2	(sym# 5)	3.88 A
GLU 46 CD - SER 57 OG	(sym# 5)	3.84 A
GLU 46 OE1 - GLY 56 C	(sym# 5)	3.91 A
GLU 46 OE1 - GLY 56 CA	(sym# 5)	3.41 A
GLU 46 OE2 - SER 57 OG	(sym# 5)	3.82 A
ALA 47 CB - GLU 94 CD	(sym# 5)	3.95 A
ALA 47 CB - GLU 94 OE2	(sym# 5)	3.18 A
SER 48 CB - THR 92 CB	(sym# 5)	3.93 A
SER 48 CB - THR 92 OG1	(sym# 5)	3.95 A
SER 48 OG - THR 92 CB	(sym# 5)	3.79 A
SER 48 OG - THR 92 CG2	(sym# 5)	3.59 A
SER 48 OG - THR 92 OG1	(sym# 5)	3.56 A
THR 52 CG - PRO 59 CB	(sym# 5)	3.47 A
THR 52 CG2 - PRO 59 CG	(sym# 5)	3.64 A
PRO 59 CD - ASP 108 OD1	(sym# 9)	3.84 A
ASN 68 CB - SER 114 C	(sym# 8)	3.80 A
ASN 68 CB - SER 114 O	(sym# 8)	3.94 A
ASN 68 CB - SER 114 OG	(sym# 8)	3.89 A
ASN 68 CB - SER 114 OT	(sym# 8)	3.65 A
ASN 68 CG - SER 114 O	(sym# 8)	3.91 A
ASN 68 CG - SER 114 OT	(sym# 8)	3.80 A
ASN 68 O - SER 114 CB	(sym# 8)	3.68 A
ASN 68 OD1 - SER 114 OT	(sym# 8)	3.69 A
ASN 77 CB - GLY 103 CA	(sym# 8)	3.90 A
ASN 77 CG - GLY 103 CA	(sym# 8)	3.47 A
ASN 77 CG - GLY 103 N	(sym# 8)	3.89 A
ASN 77 ND2 - GLY 103 CA	(sym# 8)	3.87 A
ASN 77 OD1 - GLY 103 CA	(sym# 8)	3.49 A
ASN 77 OD1 - GLY 103 N	(sym# 8)	3.44 A
ASN 77 OD1 - THR 102 CG2	(sym# 8)	3.76 A
ASN 91 CB - SER 106 CB	(sym# 9)	3.14 A
ASN 91 CB - SER 106 OG	(sym# 9)	3.20 A
ASN 91 CG - ASP 108 OD2	(sym# 9)	3.72 A
ASN 91 CG - SER 106 CB	(sym# 9)	3.35 A
ASN 91 CG - SER 106 OG	(sym# 9)	3.42 A
ASN 91 ND2 - ASP 108 CG	(sym# 9)	3.33 A
ASN 91 ND2 - SER 106 CB	(sym# 9)	3.62 A
ASN 91 OD1 - SER 106 CB	(sym# 9)	3.95 A
ASN 91 OD1 - TYR 107 CE2	(sym# 9)	3.77 A
ASN 91 OD1 - TYR 107 OH	(sym# 9)	3.94 A

注) His 41 の二つのコンフォマーのうち、占有率の高いものを残基番号を 41A で示した。

V 型結晶

P2₁2₁2₁

a = 40.28 Å, b = 67.92 Å, c = 36.72 Å

sym# 1 = (x, y, z)

sym# 2 = (-x+1/2, -y, z+1/2)

sym# 3 = (x+1/2, -y+1/2, -z)

sym# 4 = (-x, y+1/2, -z+1/2)

水素結合

Atom	Atom	Distance
ASP 2 OD1 - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.24 Å
VAL 13 O - TYR 78 OH	(sym# 4)	2.94 Å
ASN 20 OD1 - GLN 42 NE2	(sym# 4)	2.97 Å
GLN 24 NE2 - ASP 45 OD1	(sym# 4)	2.88 Å
ASP 28 OD2 - ASP 45 OD2	(sym# 4)	3.31 Å
ASN 32 ND2 - SER 114 OG	(sym# 3)	2.53 Å
TYR 44 OH - GLY 93 O	(sym# 4)	3.24 Å
ASN 68 ND2 - ASP 108 OD1	(sym# 4)	3.17 Å
ASN 68 ND2 - TYR 107 O	(sym# 4)	2.99 Å
TYR 72 N - TYR 107 OH	(sym# 4)	2.62 Å
TYR 72 O - TYR 107 OH	(sym# 4)	2.84 Å

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 Å 以下の原子間距離

Atom	Atom	Distance
CYS 1 C - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.64 Å
CYS 1 CA - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.48 Å
CYS 1 CB - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.98 Å
ASP 2 CG - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.42 Å
ASP 2 N - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.24 Å
ASP 2 OD1 - ARG 35 CG	(sym# 4)	3.80 Å
ASP 2 OD1 - ARG 35 NE	(sym# 4)	4.00 Å
ASP 2 OD1 - PRO 40 O	(sym# 4)	3.65 Å
ASP 2 OD2 - ARG 35 CG	(sym# 4)	3.98 Å
ASP 2 OD2 - ARG 35 NH2	(sym# 4)	3.50 Å
ILE 3 CD1 - GLN 42 CD	(sym# 4)	3.81 Å
ILE 3 CD1 - GLN 42 OE1	(sym# 4)	2.76 Å
ILE 3 CD1 - TYR 44 OH	(sym# 4)	3.62 Å
ILE 3 CG1 - GLN 42 OE1	(sym# 4)	3.90 Å
SER 6 OG - TYR 78 O	(sym# 4)	3.96 Å
ASN 8 ND2 - ALA 31 O	(sym# 3)	3.80 Å
VAL 13 C - TYR 78 CE2	(sym# 4)	3.84 Å
VAL 13 C - TYR 78 CE	(sym# 4)	3.79 Å
VAL 13 CB - TYR 78 CD1	(sym# 4)	3.36 Å
VAL 13 CB - TYR 78 CE1	(sym# 4)	3.67 Å
VAL 13 CB - TYR 78 CG	(sym# 4)	3.66 Å
VAL 13 CG1 - TYR 78 CB	(sym# 4)	3.11 Å
VAL 13 CG1 - TYR 78 CD1	(sym# 4)	3.25 Å
VAL 13 CG1 - TYR 78 OD2	(sym# 4)	3.42 Å
VAL 13 CG1 - TYR 78 CE1	(sym# 4)	3.96 Å
VAL 13 CG1 - TYR 78 CG	(sym# 4)	2.96 Å
VAL 13 O - TYR 78 CD2	(sym# 4)	3.86 Å
VAL 13 O - TYR 78 CE1	(sym# 4)	3.33 Å
VAL 13 O - TYR 78 CE2	(sym# 4)	3.18 Å
VAL 13 O - TYR 78 CE	(sym# 4)	2.84 Å
SER 15 CB - SER 80 CB	(sym# 4)	3.74 Å
SER 15 N - TYR 78 CE2	(sym# 4)	3.93 Å
SER 15 OG - SER 80 CB	(sym# 4)	3.58 Å
SER 15 OG - SER 80 OG	(sym# 4)	3.70 Å
ASN 16 CG - ASN 91 ND2	(sym# 4)	3.86 Å
ASN 16 ND2 - ASN 91 CG	(sym# 4)	3.76 Å
ASN 16 ND2 - ASN 91 ND2	(sym# 4)	3.10 Å
ASN 16 ND2 - ASN 91 OD1	(sym# 4)	3.62 Å
ASN 16 ND2 - PRO 59 CD	(sym# 4)	3.87 Å

ASN 16 ND2 - PRO 59 CG	(sym# 4)	3.32 Å
ASN 16 OD1 - ASN 91 ND2	(sym# 4)	3.82 Å
ASP 17 OD1 - GLY 98 O	(sym# 4)	3.60 Å
ASN 20 CB - PRO 59 CB	(sym# 4)	3.77 Å
ASN 20 CG - PRO 59 CA	(sym# 4)	3.76 Å
ASN 20 CG - PRO 59 CB	(sym# 4)	3.68 Å
ASN 20 CG - PRO 59 N	(sym# 4)	3.94 Å
ASN 20 OD1 - GLN 42 CD	(sym# 4)	3.80 Å
ASN 20 OD1 - PRO 59 CA	(sym# 4)	3.32 Å
ASN 20 OD1 - PRO 59 CB	(sym# 4)	3.32 Å
ASN 20 OD1 - PRO 59 N	(sym# 4)	3.95 Å
ILE 23 CB - TYR 44 CE1	(sym# 4)	3.88 Å
ILE 23 CD1 - GLN 42 OE1	(sym# 4)	3.91 Å
ILE 23 CD1 - TYR 44 CE1	(sym# 4)	3.26 Å
ILE 23 CD1 - TYR 44 CE	(sym# 4)	3.55 Å
ILE 23 CD1 - TYR 44 OH	(sym# 4)	3.08 Å
ILE 23 CG2 - TYR 44 CE1	(sym# 4)	3.94 Å
GLN 24 CB - ASP 45 OD1	(sym# 4)	3.40 Å
GLN 24 CD - ASP 45 OD1	(sym# 4)	3.25 Å
GLN 24 CG - ASP 45 OD1	(sym# 4)	3.33 Å
GLN 24 NE2 - TRP 60 CE3	(sym# 4)	3.60 Å
GLN 24 NE2 - TRP 60 CH2	(sym# 4)	3.21 Å
GLN 24 NE2 - TRP 60 CE2	(sym# 4)	3.84 Å
GLN 24 NE2 - TRP 60 CE3	(sym# 4)	3.09 Å
ASP 28 CG - ASP 45 OD2	(sym# 4)	3.83 Å
ASP 28 OD1 - ASP 45 OD2	(sym# 4)	3.83 Å
ASN 32 CB - SER 114 OG	(sym# 3)	3.37 Å
ASN 32 CG - SER 114 OG	(sym# 3)	3.04 Å
ASN 32 ND2 - SER 114 CB	(sym# 3)	3.33 Å
ASN 32 O - SER 114 OT	(sym# 3)	3.94 Å
ASN 32 OD1 - SER 114 OG	(sym# 3)	3.88 Å
GLY 33 CA - ASP 76 CA	(sym# 2)	3.74 Å
GLY 33 O - ASP 76 CA	(sym# 2)	3.86 Å
GLY 33 O - ASP 76 O	(sym# 2)	3.63 Å
GLY 33 O - ASP 76 OD1	(sym# 2)	3.74 Å
TYR 44 CD2 - THR 92 O	(sym# 4)	3.62 Å
TYR 44 CE1 - GLY 93 O	(sym# 4)	3.99 Å
TYR 44 CE2 - GLY 93 C	(sym# 4)	3.62 Å
TYR 44 CE2 - GLY 93 O	(sym# 4)	3.29 Å
TYR 44 CE2 - THR 92 O	(sym# 4)	3.96 Å
TYR 44 CE - GLY 93 C	(sym# 4)	3.99 Å
TYR 44 CE - GLY 93 O	(sym# 4)	3.23 Å
VAL 66 CG2 - TYR 107 CE1	(sym# 4)	3.74 Å
TYR 67 CE1 - TYR 78 OH	(sym# 4)	3.51 Å
TYR 67 O - TYR 107 CD1	(sym# 4)	3.36 Å
ASN 68 CB - TYR 107 C	(sym# 4)	3.44 Å
ASN 68 CB - TYR 107 CA	(sym# 4)	3.66 Å
ASN 68 CB - TYR 107 CB	(sym# 4)	3.76 Å
ASN 68 CB - TYR 107 O	(sym# 4)	3.08 Å
ASN 68 CG - HIS 101 CE1	(sym# 4)	3.74 Å
ASN 68 CG - HIS 101 ND1	(sym# 4)	3.73 Å
ASN 68 CG - TYR 107 C	(sym# 4)	3.77 Å
ASN 68 CG - TYR 107 O	(sym# 4)	3.16 Å
ASN 68 ND2 - ASP 108 CA	(sym# 4)	3.61 Å
ASN 68 ND2 - ASP 108 CB	(sym# 4)	3.77 Å
ASN 68 ND2 - ASP 108 CG	(sym# 4)	3.67 Å
ASN 68 ND2 - ASP 108 N	(sym# 4)	3.66 Å
ASN 68 ND2 - HIS 101 CE1	(sym# 4)	3.38 Å
ASN 68 ND2 - HIS 101 ND1	(sym# 4)	3.63 Å
ASN 68 ND2 - TYR 107 C	(sym# 4)	3.43 Å
ASN 68 O - TYR 107 CA	(sym# 4)	3.38 Å
ASN 68 O - TYR 107 CB	(sym# 4)	3.87 Å
ASN 68 O - TYR 107 CD1	(sym# 4)	3.95 Å
ASN 68 O - TYR 107 O	(sym# 4)	3.92 Å
ASN 68 OD1 - HIS 101 CD2	(sym# 4)	3.79 Å
ASN 68 OD1 - HIS 101 CE1	(sym# 4)	3.48 Å
ASN 68 OD1 - HIS 101 CG	(sym# 4)	3.79 Å
ASN 68 OD1 - HIS 101 ND1	(sym# 4)	3.62 Å
ASN 68 OD1 - HIS 101 NE2	(sym# 4)	3.60 Å
PRO 70 O - TYR 107 CE1	(sym# 4)	3.85 Å

PRO 70 O - TYR 107 CE (sym# 4) 3.94 A
 PRO 70 O - TYR 107 OH (sym# 4) 3.87 A
 TYR 71 C - TYR 107 OH (sym# 4) 3.36 A
 TYR 71 CA - TYR 107 CE (sym# 4) 3.87 A
 TYR 71 CA - TYR 107 OH (sym# 4) 3.02 A
 TYR 71 CB - TYR 107 OH (sym# 4) 3.73 A
 TYR 71 CD1 - TYR 107 OH (sym# 4) 2.92 A
 TYR 71 CE1 - TYR 107 OH (sym# 4) 3.76 A
 TYR 71 CG - TYR 107 OH (sym# 4) 3.59 A
 TYR 72 C - TYR 107 OH (sym# 4) 3.62 A
 TYR 72 CA - TYR 107 OH (sym# 4) 3.69 A
 TYR 72 N - TYR 107 CE (sym# 4) 3.60 A
 TYR 72 O - TYR 107 CE2 (sym# 4) 3.76 A
 TYR 72 O - TYR 107 CE (sym# 4) 3.75 A
 VAL 79 CB - TYR 107 CE2 (sym# 4) 3.95 A
 VAL 79 CG1 - TYR 107 CE2 (sym# 4) 3.46 A
 VAL 79 CG1 - TYR 107 CE (sym# 4) 3.96 A
 VAL 79 CG2 - TYR 107 CE2 (sym# 4) 3.95 A

VI 型結晶

P2,2₁

a = 50.11 Å, b = 63.01 Å, c = 26.95 Å

sym# 1 = (x, y, z)

sym# 2 = (-x+1/2, -y, z+1/2)

sym# 3 = (x+1/2, -y-1/2, -z)

sym# 4 = (-x, y+1/2, -z+1/2)

水素結合

Atom	Atom	Distance
CYS 1 SG	- ASP 108 OD1 (sym# 1)	3.20 Å
ASP 2 O	- ASP 108 OD1 (sym# 1)	3.09 Å
ASP 2 OD1	- HIS 41 NE2 (sym# 1)	2.96 Å #
ASP 2 OD2	- GLU 62 OE1 (sym# 1)	2.80 Å #
ASP 2 OD2	- HIS 101 NE2 (sym# 1)	3.08 Å #
ASP 2 OD2	- TYR 39 OH (sym# 1)	3.29 Å #
ASN 8 ND2	- SER 57 OG (sym# 3)	3.13 Å
GLY 11 O	- SER 80 N (sym# 2)	3.33 Å
GLY 11 O	- SER 80 OG (sym# 2)	3.33 Å
ASN 12 OD1	- SER 15 OG (sym# 2)	3.19 Å
VAL 13 N	- SER 80 OG (sym# 2)	2.99 Å
ASN 16 OD1	- TYR 78 OH (sym# 1)	2.80 Å
ASN 20 OD1	- ASP 37 OD2 (sym# 1)	2.80 Å
ASP 28 OD1	- ARG 75 NH2 (sym# 1)	2.42 Å
ASN 32 O	- ARG 75 NH1 (sym# 2)	2.76 Å
ARG 35 NH1	- SER 48 O (sym# 3)	3.20 Å
ASN 38 ND2	- ASP 50 OD1 (sym# 3)	3.67 Å
GLN 42 OD1	- ALA 104 O (sym# 3)	2.91 Å
ASN 91 ND2	- SER 114 OT (sym# 3)	2.85 Å

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 Å 以下の原子間距離

Atom	Atom	Distance
CYS 1 SG	- ASP 108 CG (sym# 1)	3.53 Å
CYS 1 SG	- ASP 108 OD2 (sym# 1)	3.92 Å
ASP 2 CB	- HIS 101 NE2 (sym# 1)	3.65 Å
ASP 2 CB	- TYR 39 OH (sym# 1)	3.78 Å
ASP 2 CG	- GLU 62 OE1 (sym# 1)	3.69 Å
ASP 2 CG	- GLU 62 OE2 (sym# 1)	4.00 Å
ASP 2 CG	- HIS 101 NE2 (sym# 1)	3.79 Å
ASP 2 CG	- TYR 39 OH (sym# 1)	3.30 Å
ASP 2 O	- ASP 108 CB (sym# 1)	3.19 Å
ASP 2 O	- ASP 108 CG (sym# 1)	3.45 Å
ASP 2 OD1	- GLU 62 CD (sym# 1)	3.87 Å
ASP 2 OD1	- GLU 62 OE1 (sym# 1)	3.81 Å #
ASP 2 OD1	- GLU 62 OE2 (sym# 1)	3.57 Å #
ASP 2 OD1	- HIS 41 CE1 (sym# 1)	3.48 Å
ASP 2 OD1	- TYR 39 OH (sym# 1)	3.62 Å #
ASP 2 OD2	- ARG 85 NE (sym# 1)	3.71 Å #
ASP 2 OD2	- ARG 85 NH2 (sym# 1)	3.76 Å #
ASP 2 OD2	- GLU 62 CD (sym# 1)	3.52 Å
ASP 2 OD2	- GLU 62 OE2 (sym# 1)	3.45 Å #
ASP 2 OD2	- HIS 101 CE1 (sym# 1)	3.84 Å #
PRO 4 CA	- TYR 107 O (sym# 1)	3.94 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CB (sym# 1)	3.79 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CD1 (sym# 1)	3.34 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CD2 (sym# 1)	3.45 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CE1 (sym# 1)	3.69 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CE2 (sym# 1)	3.79 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CG (sym# 1)	3.22 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 CE (sym# 1)	3.88 Å
PRO 4 CB	- TYR 107 O (sym# 1)	3.62 Å
PRO 4 CD	- ASP 108 OD1 (sym# 1)	3.72 Å

PRO 4 CG	- ASP 108 OD1 (sym# 1)	3.93 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 CD1 (sym# 1)	3.50 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 CD2 (sym# 1)	3.30 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 CE1 (sym# 1)	3.28 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 CE2 (sym# 1)	3.06 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 CG (sym# 1)	3.53 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 CE (sym# 1)	3.03 Å
PRO 4 CG	- TYR 107 OH (sym# 1)	3.63 Å
GLN 5 CB	- TYR 67 CD1 (sym# 2)	3.98 Å
GLN 5 CB	- TYR 67 CG (sym# 2)	3.90 Å
GLN 5 CD	- GLY 82 CA (sym# 1)	3.96 Å
GLN 5 CD	- PRO 83 CD (sym# 1)	3.51 Å
GLN 5 CD	- PRO 83 N (sym# 1)	3.91 Å
GLN 5 CD	- TYR 67 CD1 (sym# 2)	3.68 Å
GLN 5 CD	- TYR 67 CE1 (sym# 2)	3.65 Å
GLN 5 NE2	- GLY 82 C (sym# 1)	3.53 Å
GLN 5 NE2	- GLY 82 CA (sym# 1)	2.99 Å
GLN 5 NE2	- PRO 83 CD (sym# 1)	2.97 Å
GLN 5 NE2	- PRO 83 N (sym# 1)	3.46 Å
GLN 5 NE2	- TYR 67 CE1 (sym# 2)	3.73 Å
GLN 5 O	- TYR 67 CD2 (sym# 2)	3.73 Å
GLN 5 O	- TYR 67 CE2 (sym# 2)	3.54 Å
GLN 5 OE1	- PRO 83 CD (sym# 1)	3.66 Å
GLN 5 OE1	- PRO 83 CG (sym# 1)	3.94 Å
GLN 5 OE1	- TYR 67 CD1 (sym# 2)	3.39 Å
GLN 5 OE1	- TYR 67 CE1 (sym# 2)	3.76 Å
SER 6 CB	- TYR 67 CD2 (sym# 2)	3.73 Å
SER 6 O	- TYR 107 CD1 (sym# 1)	3.48 Å
SER 6 O	- TYR 107 CE1 (sym# 1)	3.33 Å
SER 6 OG	- TYR 67 CB (sym# 2)	4.00 Å
THR 7 OG1	- TYR 107 CE1 (sym# 1)	3.98 Å
THR 7 OG1	- TYR 107 OH (sym# 1)	3.62 Å
ASN 8 CB	- SER 57 OG (sym# 3)	3.93 Å
ASN 8 CG	- SER 57 OG (sym# 3)	3.98 Å
ASN 8 ND2	- VAL 79 CG2 (sym# 2)	3.88 Å
GLY 10 O	- ASP 17 OD1 (sym# 2)	3.41 Å
GLY 11 C	- SER 80 N (sym# 2)	3.93 Å
GLY 11 CA	- ASP 17 OD1 (sym# 2)	3.63 Å
GLY 11 CA	- TYR 78 O (sym# 2)	3.37 Å
GLY 11 O	- SER 80 CA (sym# 2)	3.64 Å
GLY 11 O	- SER 80 CB (sym# 2)	3.23 Å
GLY 11 O	- VAL 79 C (sym# 2)	3.76 Å
ASN 12 C	- SER 80 OG (sym# 2)	3.86 Å
ASN 12 CA	- SER 80 OG (sym# 2)	3.92 Å
ASN 12 CG	- SER 15 CB (sym# 2)	3.77 Å
ASN 12 CG	- SER 15 OG (sym# 2)	3.95 Å
ASN 12 ND2	- SER 15 CB (sym# 2)	3.82 Å
ASN 12 OD1	- ASP 17 CB (sym# 2)	3.70 Å
ASN 12 OD1	- SER 15 CB (sym# 2)	3.29 Å
VAL 13 CA	- SER 80 OG (sym# 2)	3.83 Å
VAL 13 CB	- SER 80 OG (sym# 2)	3.53 Å
VAL 13 CG2	- SER 80 O (sym# 2)	3.87 Å
VAL 13 CG2	- SER 80 OG (sym# 2)	3.82 Å
VAL 13 CG2	- VAL 79 CG1 (sym# 2)	3.87 Å
ASN 16 CG	- TYR 78 OH (sym# 1)	4.00 Å
ASN 16 OD1	- PRO 81 CD (sym# 1)	3.58 Å
ASN 16 OD1	- SER 80 CB (sym# 1)	3.92 Å
ASN 16 OD1	- TYR 78 CE2 (sym# 1)	3.62 Å
ASN 16 OD1	- TYR 78 CE (sym# 1)	3.64 Å
ASP 17 CA	- TYR 78 CE2 (sym# 1)	3.87 Å
ASP 17 CB	- TYR 78 CD2 (sym# 1)	3.88 Å
ASP 17 CB	- TYR 78 CE2 (sym# 1)	3.99 Å
ASP 17 CG	- TYR 78 CD2 (sym# 1)	3.37 Å
ASP 17 CG	- TYR 78 CE2 (sym# 1)	3.96 Å
ASP 17 OD1	- TYR 78 CD2 (sym# 1)	3.63 Å
ASP 17 OD2	- TYR 78 CB (sym# 1)	3.91 Å
ASP 17 OD2	- TYR 78 CD2 (sym# 1)	3.49 Å
ASP 17 OD2	- TYR 78 CG (sym# 1)	3.72 Å
ASN 20 CB	- TYR 78 OH (sym# 1)	3.71 Å
ASN 20 CG	- ASP 37 OD2 (sym# 1)	3.53 Å

ASN 20 CG - TYR 78 CE1 (sym# 1) 3.97 A
 ASN 20 CG - TYR 78 OH (sym# 1) 3.57 A
 ASN 20 ND2 - ASP 37 OD2 (sym# 1) 3.88 A
 ASN 20 ND2 - TYR 78 CE1 (sym# 1) 3.65 A
 ASN 20 OD1 - ASP 37 CG (sym# 1) 3.91 A
 ASN 20 OD1 - TYR 78 OH (sym# 1) 3.63 A
 GLN 24 CG - ARG 75 NH2 (sym# 1) 3.64 A
 GLN 24 OE1 - ARG 75 NH1 (sym# 1) 3.76 A
 ASP 28 CG - ARG 75 NH2 (sym# 1) 3.38 A
 ASP 28 OD1 - ALA 47 CB (sym# 4) 3.61 A
 ASP 28 OD1 - ARG 75 CB (sym# 1) 3.46 A
 ASP 28 OD1 - ARG 75 NH1 (sym# 1) 3.71 A
 ASP 28 OD2 - ARG 75 NH1 (sym# 1) 3.61 A
 ASP 28 OD2 - ARG 75 NH2 (sym# 1) 3.61 A
 ALA 31 O - ARG 75 CG (sym# 2) 3.93 A
 ASN 32 C - ARG 75 CD (sym# 2) 3.65 A
 ASN 32 C - ARG 75 NH1 (sym# 2) 3.82 A
 ASN 32 O - ARG 75 CD (sym# 2) 3.44 A
 ASN 32 O - ARG 75 CE (sym# 2) 3.71 A
 ASN 32 O - ARG 75 NE (sym# 2) 3.99 A
 GLY 33 C - SER 48 CB (sym# 3) 3.69 A
 GLY 33 CA - SER 48 CB (sym# 3) 3.44 A
 GLY 33 CA - SER 48 OG (sym# 3) 3.80 A
 GLY 33 O - SER 48 CA (sym# 3) 3.80 A
 GLY 33 O - SER 48 CB (sym# 3) 3.65 A
 ARG 35 CD - SER 48 O (sym# 3) 3.90 A
 ARG 35 CZ - SER 48 O (sym# 3) 3.97 A
 ARG 35 NE - SER 48 O (sym# 3) 3.98 A
 ARG 35 NH1 - ASP 50 OD1 (sym# 3) 3.80 A
 ASN 38 CG - ASP 50 OD1 (sym# 3) 3.62 A
 ASN 38 OD1 - ASP 50 OD1 (sym# 3) 2.82 A
 GLN 42 CD - ALA 104 N (sym# 3) 3.92 A
 GLN 42 CD - ALA 104 O (sym# 3) 3.54 A
 GLN 42 CD - GLY 103 C (sym# 3) 3.75 A
 GLN 42 CD - GLY 103 CA (sym# 3) 3.55 A
 GLN 42 CG - ALA 104 O (sym# 3) 3.36 A
 GLN 42 CG - GLY 103 C (sym# 3) 3.90 A
 GLN 42 NE2 - GLY 103 CA (sym# 3) 3.65 A
 GLN 42 OE1 - ALA 104 C (sym# 3) 3.79 A
 GLN 42 OE1 - ALA 104 N (sym# 3) 3.44 A
 GLN 42 OE1 - GLY 103 C (sym# 3) 3.70 A
 GLN 42 OE1 - GLY 103 CA (sym# 3) 3.73 A
 TYR 44 OH - GLY 103 CA (sym# 3) 3.28 A
 TYR 44 OH - GLY 103 N (sym# 3) 3.86 A
 GLU 46 CG - ASP 76 OD1 (sym# 4) 3.59 A
 GLY 56 C - ASN 77 OD1 (sym# 4) 3.97 A
 GLY 56 CA - ASN 77 CB (sym# 4) 3.97 A
 GLY 56 CA - ASN 77 OD1 (sym# 4) 3.55 A
 SER 57 OG - VAL 79 CG2 (sym# 4) 3.78 A
 GLY 58 O - ASN 68 ND2 (sym# 4) 3.72 A
 GLN 89 CD - SER 114 CB (sym# 3) 3.82 A
 GLN 89 NE2 - SER 114 OG (sym# 3) 3.90 A
 GLN 89 OE1 - SER 114 CB (sym# 3) 3.61 A
 THR 90 CG2 - ALA 105 C (sym# 3) 3.90 A
 THR 90 CG2 - SER 104 N (sym# 3) 3.99 A
 ASN 91 CB - SER 114 OT (sym# 3) 3.70 A
 ASN 91 CG - SER 114 OT (sym# 3) 3.73 A
 ASN 91 CG - TYR 107 CD1 (sym# 3) 4.00 A
 ASN 91 CG - TYR 107 CG (sym# 3) 3.81 A
 ASN 91 ND2 - SER 114 C (sym# 3) 3.73 A
 ASN 91 ND2 - TYR 107 CB (sym# 3) 3.44 A
 ASN 91 ND2 - TYR 107 CD1 (sym# 3) 2.91 A
 ASN 91 ND2 - TYR 107 CD2 (sym# 3) 3.74 A
 ASN 91 ND2 - TYR 107 CE1 (sym# 3) 3.48 A
 ASN 91 ND2 - TYR 107 CG (sym# 3) 3.08 A
 ASN 91 OD1 - SER 106 C (sym# 3) 3.46 A
 ASN 91 OD1 - SER 106 CA (sym# 3) 3.74 A
 ASN 91 OD1 - SER 106 O (sym# 3) 3.96 A
 ASN 91 OD1 - TYR 107 CB (sym# 3) 3.71 A
 ASN 91 OD1 - TYR 107 CG (sym# 3) 3.81 A

ASN 91 OD1 - TYR 107 N (sym# 3) 3.37 A
 THR 92 CG2 - SER 114 CA (sym# 3) 3.94 A
 THR 92 CG2 - SER 114 CB (sym# 3) 3.69 A
 THR 98 OG1 - TYR 107 OH (sym# 1) 3.23 A
 TYR 107 CE1 - SER 114 O (sym# 1) 3.61 A

VII 結晶

P2₁

$a = 39.01 \text{ \AA}$, $b = 36.58 \text{ \AA}$, $c = 36.75 \text{ \AA}$

$\beta = 104.25^\circ$

sym# 1 = (x, y, z)

sym# 2 = (-x, y+1/2, -z)

水素結合

Atom	Atom	Distance
ILE 3 N	- GLY 33 O (sym# 2)	2.95 \AA
GLN 5 N	- ASP 50 OD1 (sym# 2)	3.14 \AA
GLN 5 N	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.09 \AA
ASP 28 O	- TYR 44 OH (sym# 2)	2.24 \AA
ASP 28 OD1	- GLN 42 N (sym# 2)	3.23 \AA
ASP 34 O	- PHE 95 N (sym# 2)	2.90 \AA
CYS 55 O	- ASN 77 OD1 (sym# 1)	3.26 \AA
SER 57 OG	- ASP 76 OD1 (sym# 1)	3.24 \AA
SER 57 OG	- ASP 76 OD2 (sym# 1)	2.94 \AA
ASN 68 ND2	- ZAP 120 N7 (sym# 2)	2.95 \AA
ASN 68 ND2	- TYR 107 O (sym# 2)	2.96 \AA
ASN 68 OD1	- ZAP 120 N6 (sym# 2)	3.02 \AA
PRO 70 O	- TYR 107 OH (sym# 2)	3.13 \AA
TYR 72 N	- TYR 107 OH (sym# 2)	2.89 \AA

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 \AA 以下の原子間距離

Atom	Atom	Distance
CYS 1 C	- ASP 34 CB (sym# 2)	3.45 \AA
CYS 1 O	- ASP 34 CA (sym# 2)	3.62 \AA
CYS 1 O	- ASP 34 CB (sym# 2)	3.29 \AA
CYS 1 O	- ASP 34 O (sym# 2)	3.89 \AA
ASP 2 C	- GLY 33 O (sym# 2)	3.71 \AA
ASP 2 CA	- ASP 34 CA (sym# 2)	3.88 \AA
ASP 2 CA	- ASP 34 CB (sym# 2)	3.84 \AA
ASP 2 CA	- GLY 33 C (sym# 2)	3.95 \AA
ASP 2 C	- GLY 33 O (sym# 2)	3.44 \AA
ASP 2 CB	- GLY 33 O (sym# 2)	3.88 \AA
ASP 2 N	- ASP 34 CB (sym# 2)	3.73 \AA
ASP 2 OD1	- ASP 34 CB (sym# 2)	3.73 \AA
ASP 2 OD1	- ASP 34 N (sym# 2)	3.68 \AA
ASP 2 OD1	- GLY 33 C (sym# 2)	3.55 \AA
ASP 2 OD1	- GLY 33 CA (sym# 2)	3.80 \AA
ASP 2 OD1	- GLY 33 O (sym# 2)	3.88 \AA
ILE 3 CA	- GLY 33 O (sym# 2)	3.94 \AA
ILE 3 CB	- GLY 33 O (sym# 2)	3.81 \AA
ILE 3 CG1	- GLY 33 O (sym# 2)	3.85 \AA
PRO 4 C	- ASP 50 OD1 (sym# 2)	3.76 \AA
PRO 4 C	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.91 \AA
PRO 4 CA	- ASP 50 OG (sym# 2)	3.66 \AA
PRO 4 CA	- ASP 50 OD1 (sym# 2)	3.41 \AA
PRO 4 CA	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.83 \AA
PRO 4 CB	- ASP 50 CG (sym# 2)	3.76 \AA
PRO 4 CB	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.77 \AA
GLN 5 CA	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.85 \AA
GLN 5 CB	- ASP 50 OD1 (sym# 2)	3.95 \AA
GLN 5 CB	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.64 \AA
GLN 5 CG	- ASP 50 OD1 (sym# 2)	3.81 \AA
GLN 5 N	- ASP 50 CG (sym# 2)	3.47 \AA
SER 6 N	- ASP 50 OD2 (sym# 2)	3.90 \AA
ASN 12 OD1	- ZAP 120 C5' (sym# 2)	3.59 \AA
VAL 13 CB	- TYR 78 CE2 (sym# 2)	3.76 \AA
VAL 13 CG1	- TYR 78 CD2 (sym# 2)	3.92 \AA
VAL 13 CG1	- TYR 78 CE2 (sym# 2)	3.70 \AA

ASN 16 O	- ALA 31 CB (sym# 2)	3.91 \AA
ASP 17 OD1	- ALA 31 CB (sym# 2)	3.73 \AA
ASP 17 OD1	- ALA 31 N (sym# 2)	3.91 \AA
ASN 20 CB	- ALA 31 CB (sym# 2)	3.48 \AA
ASN 20 CG	- ALA 31 CB (sym# 2)	3.80 \AA
ASN 20 O	- PRO 36 CG (sym# 2)	3.90 \AA
ASN 20 OD1	- PRO 36 CA (sym# 2)	3.37 \AA
ASN 20 OD1	- PRO 36 CB (sym# 2)	3.63 \AA
ASN 20 OD1	- PRO 36 CD (sym# 2)	3.95 \AA
ASN 20 OD1	- PRO 36 CG (sym# 2)	3.51 \AA
ASN 20 OD1	- PRO 36 N (sym# 2)	3.57 \AA
ILE 23 CB	- PRO 36 CG (sym# 2)	3.87 \AA
ILE 23 CG2	- PRO 36 CD (sym# 2)	3.50 \AA
ILE 23 CG2	- PRO 36 CG (sym# 2)	3.44 \AA
GLN 24 N	- PRO 36 CG (sym# 2)	3.71 \AA
ASP 28 C	- TYR 44 OH (sym# 2)	3.26 \AA
ASP 28 CA	- TYR 44 OH (sym# 2)	3.91 \AA
ASP 28 CB	- TYR 44 OH (sym# 2)	3.72 \AA
ASP 28 CG	- GLN 42 CB (sym# 2)	3.63 \AA
ASP 28 CG	- GLN 42 N (sym# 2)	3.60 \AA
ASP 28 O	- TYR 44 CE2 (sym# 2)	3.47 \AA
ASP 28 O	- TYR 44 C2 (sym# 2)	3.18 \AA
ASP 28 OD1	- GLN 42 CB (sym# 2)	3.54 \AA
ASP 28 OD1	- HIS 41 CA (sym# 2)	2.95 \AA
ASP 28 OD2	- GLN 42 CB (sym# 2)	3.94 \AA
ASP 28 OD2	- GLN 42 N (sym# 2)	3.48 \AA
ASP 28 OD2	- HIS 41 CB (sym# 2)	3.42 \AA
VAL 30 CG1	- TYR 44 CD2 (sym# 2)	3.78 \AA
VAL 30 CG1	- TYR 44 CE2 (sym# 2)	3.34 \AA
VAL 30 CG1	- TYR 44 C2 (sym# 2)	3.89 \AA
VAL 30 CG2	- TYR 44 CE1 (sym# 2)	3.99 \AA
VAL 30 CG2	- TYR 44 C2 (sym# 2)	3.91 \AA
ASP 34 O	- GLU 94 C (sym# 2)	3.59 \AA
ASP 34 O	- GLU 94 CA (sym# 2)	3.37 \AA
ASP 34 O	- GLU 94 CB (sym# 2)	3.95 \AA
ASP 34 O	- GLY 93 O (sym# 2)	3.87 \AA
ASP 34 O	- PHE 95 CA (sym# 2)	3.89 \AA
ASP 34 O	- PHE 95 CB (sym# 2)	3.72 \AA
ASP 34 OD1	- GLU 94 CD (sym# 2)	3.78 \AA
ASP 34 OD1	- GLU 94 CG (sym# 2)	3.74 \AA
ASP 34 OD1	- GLU 94 OE1 (sym# 2)	3.75 \AA
ARG 35 CA	- GLY 93 O (sym# 2)	3.77 \AA
ARG 35 CB	- GLU 94 CA (sym# 2)	3.97 \AA
ARG 35 CB	- GLY 93 C (sym# 2)	3.68 \AA
ARG 35 CB	- GLY 93 O (sym# 2)	3.30 \AA
ARG 35 CD	- THR 92 O (sym# 2)	3.61 \AA
ARG 35 NH1	- THR 92 CB (sym# 2)	3.72 \AA
ARG 35 NH1	- THR 92 O (sym# 2)	3.85 \AA
ARG 35 NH2	- GLU 94 CB (sym# 2)	3.92 \AA
ARG 35 NH2	- GLU 94 CG (sym# 2)	3.99 \AA
PRO 36 CD	- GLY 93 O (sym# 2)	3.93 \AA
ALA 47 CB	- SER 114 C (sym# 2)	3.77 \AA
ALA 47 CB	- SER 114 CA (sym# 2)	3.69 \AA
ALA 47 CB	- SER 114 O (sym# 2)	3.63 \AA
CYS 54 C	- ASN 77 OD1 (sym# 1)	3.32 \AA
CYS 54 CA	- ASN 77 OD1 (sym# 1)	3.64 \AA
CYS 54 O	- ASN 77 OD1 (sym# 1)	3.43 \AA
CYS 55 C	- ASN 77 OD1 (sym# 1)	3.86 \AA
CYS 55 N	- ASN 77 OD1 (sym# 1)	3.77 \AA
CYS 55 O	- ASP 76 O (sym# 1)	3.98 \AA
SER 57 CB	- ASP 76 CG (sym# 1)	3.98 \AA
SER 57 CB	- ASP 76 OD2 (sym# 1)	3.71 \AA
SER 57 N	- ASP 76 CB (sym# 1)	3.97 \AA
SER 57 OG	- ASP 76 CB (sym# 1)	3.34 \AA
SER 57 OG	- ASP 76 CG (sym# 1)	2.82 \AA
VAL 66 CB	- TYR 107 CB (sym# 2)	3.84 \AA
VAL 66 CB	- TYR 107 CD (sym# 2)	3.89 \AA
VAL 66 CG2	- TYR 107 CD1 (sym# 2)	3.72 \AA
VAL 66 CG2	- TYR 107 CG (sym# 2)	3.72 \AA
TYR 67 CB	- ZAP 120 C5' (sym# 2)	3.48 \AA

TYR 67 CB - 2AP 120 C6 (sym# 2) 3.68 A
 TYR 67 CB - 2AP 120 N6 (sym# 2) 3.73 A
 TYR 67 CB - 2AP 120 N7 (sym# 2) 3.42 A
 TYR 67 CD1 - 2AP 120 C6 (sym# 2) 3.87 A
 TYR 67 CD1 - 2AP 120 N1 (sym# 2) 3.81 A
 TYR 67 CD2 - 2AP 120 C4 (sym# 2) 3.42 A
 TYR 67 CD2 - 2AP 120 C5 (sym# 2) 3.63 A
 TYR 67 CD2 - 2AP 120 C8 (sym# 2) 3.92 A
 TYR 67 CD2 - 2AP 120 N3 (sym# 2) 3.78 A
 TYR 67 CD2 - 2AP 120 N7 (sym# 2) 3.97 A
 TYR 67 CD2 - 2AP 120 N9 (sym# 2) 3.61 A
 TYR 67 CD1 - 2AP 120 O1' (sym# 2) 3.65 A
 TYR 67 CE2 - 2AP 120 C4 (sym# 2) 3.80 A
 TYR 67 CE2 - 2AP 120 C5' (sym# 2) 3.83 A
 TYR 67 CE2 - 2AP 120 N3 (sym# 2) 3.68 A
 TYR 67 CE2 - 2AP 120 O1' (sym# 2) 3.44 A
 TYR 67 CG - 2AP 120 C4 (sym# 2) 3.76 A
 TYR 67 CG - 2AP 120 C5 (sym# 2) 3.49 A
 TYR 67 CG - 2AP 120 C6 (sym# 2) 3.61 A
 TYR 67 CG - 2AP 120 N1 (sym# 2) 3.93 A
 TYR 67 CG - 2AP 120 N7 (sym# 2) 3.91 A
 TYR 67 O - TYR 107 CB (sym# 2) 3.74 A
 TYR 67 O - TYR 107 CD1 (sym# 2) 3.33 A
 TYR 67 O - TYR 107 CG (sym# 2) 3.88 A
 ASN 68 CB - HIS 101 O (sym# 2) 3.97 A
 ASN 68 CG - 2AP 120 N6 (sym# 2) 3.87 A
 ASN 68 CG - 2AP 120 N7 (sym# 2) 3.84 A
 ASN 68 CG - HIS 101 CB (sym# 2) 3.67 A
 ASN 68 CG - HIS 101 O (sym# 2) 3.76 A
 ASN 68 ND2 - 2AP 120 C5 (sym# 2) 3.99 A
 ASN 68 ND2 - 2AP 120 C8 (sym# 2) 3.79 A
 ASN 68 ND2 - HIS 101 CB (sym# 2) 3.39 A
 ASN 68 ND2 - HIS 101 O (sym# 2) 3.92 A
 ASN 68 ND2 - TYR 107 C (sym# 2) 3.98 A
 ASN 68 O - TYR 107 CD1 (sym# 2) 3.58 A
 ASN 68 O - TYR 107 CE1 (sym# 2) 3.50 A
 ASN 68 OD1 - 2AP 120 N7 (sym# 2) 3.84 A
 ASN 68 OD1 - HIS 101 CB (sym# 2) 3.47 A
 ASN 68 OD1 - PRO 83 CB (sym# 2) 3.70 A
 PRO 70 C - TYR 107 OH (sym# 2) 3.99 A
 PRO 70 O - TYR 107 CE1 (sym# 2) 3.73 A
 PRO 70 O - TYR 107 CE (sym# 2) 3.68 A
 TYR 71 C - TYR 107 OH (sym# 2) 3.54 A
 TYR 71 CA - TYR 107 CE2 (sym# 2) 3.98 A
 TYR 71 CA - TYR 107 CE (sym# 2) 3.49 A
 TYR 71 CA - TYR 107 OH (sym# 2) 3.44 A
 TYR 71 CD1 - TYR 107 CD2 (sym# 2) 3.91 A
 TYR 71 CD1 - TYR 107 CE2 (sym# 2) 3.50 A
 TYR 72 CA - TYR 107 OH (sym# 2) 3.83 A
 TYR 72 N - TYR 107 CE (sym# 2) 3.81 A
 TYR 72 O - TYR 107 OH (sym# 2) 3.50 A
 VAL 79 CG2 - TYR 107 CD2 (sym# 2) 3.56 A
 VAL 79 CG2 - TYR 107 CE2 (sym# 2) 3.44 A

注) 2AP は 2'-AMP 分子を示す。

VIII型結晶

P2

$a = 39.99 \text{ \AA}$, $b = 40.10 \text{ \AA}$, $c = 38.41 \text{ \AA}$

$\beta = 124.12^\circ$

symm 1 = $[-x, y, z]$

symm 2 = $[-x, y+1/2, -z]$

水素結合

Atom	Atom	Distance
CYS 1 O	- GLN 42 NE1 (symm 2)	2.63 A
ASP 2 OD1	- ARG 35 CE (symm 2)	2.80 A
ASP 2 OD1	- ARG 35 NH1 (symm 2)	2.38 A
ASP 2 OD1	- ARG 35 NH2 (symm 2)	3.10 A
ASN 16 ND2	- ASN 91 OD1 (symm 2)	2.94 A
ASP 17 OD1	- ASN 91 ND2 (symm 2)	3.14 A
GLN 24 NE2	- ASP 45 N (symm 2)	2.84 A
GLN 24 OE1	- ASP 45 O (symm 2)	2.95 A
ASP 28 OD1	- ARG 75 NH1 (symm 2)	3.21 A
GLN 42 N	- GLU 94 OE1 (symm 2)	2.99 A
GLN 42 OE1	- PHE 95 N (symm 2)	2.89 A
GLN 42 O	- GLU 94 OE2 (symm 2)	2.64 A
TYR 44 OH	- GLY 93 O (symm 2)	3.39 A
ASP 45 OD1	- ASP 76 OD1 (symm 1)	2.60 A
ASP 45 OD1	- ASP 76 OD2 (symm 1)	3.14 A
TYR 67 O	- TYR 107 OH (symm 2)	2.55 A
ASN 68 ND2	- ASP 108 OD1 (symm 2)	2.90 A

結晶内隣接蛋白質分子間の 4 Å 以下の原子間距離

Atom	Atom	Distance
CYS 1 C	- GLN 42 OE1 (symm 2)	3.69 A
CYS 1 O	- GLN 42 CD (symm 2)	3.73 A
ASP 2 CA	- GLN 42 OE1 (symm 2)	3.89 A
ASP 2 CG	- ARG 35 CE (symm 2)	3.59 A
ASP 2 CG	- ARG 35 NH1 (symm 2)	3.31 A
ASP 2 OD1	- ARG 35 NE (symm 2)	3.65 A
ASP 2 OD2	- ARG 35 CE (symm 2)	3.94 A
ASP 2 OD2	- ARG 35 NH1 (symm 2)	3.56 A
ILE 3 CD1	- GLN 42 CG (symm 2)	3.91 A
ILE 3 CD1	- TYR 44 OH (symm 2)	3.99 A
ILE 3 CG1	- GLN 42 CD (symm 2)	3.93 A
ILE 3 N	- GLN 42 OE1 (symm 2)	3.96 A
SER 6 CB	- TYR 78 CB (symm 2)	3.76 A
SER 6 CB	- TYR 78 CD2 (symm 2)	3.95 A
SER 6 OG	- TYR 78 CB (symm 2)	3.96 A
VAL 13 CG1	- TYR 78 CB (symm 2)	3.68 A
VAL 13 CG1	- TYR 78 CD1 (symm 2)	3.43 A
VAL 13 CG1	- TYR 78 CD2 (symm 2)	3.77 A
VAL 13 CG1	- TYR 78 CE1 (symm 2)	3.89 A
VAL 13 CG1	- TYR 78 CG (symm 2)	3.34 A
VAL 13 O	- TYR 78 CE (symm 2)	3.64 A
VAL 13 O	- TYR 78 OH (symm 2)	3.49 A
TYR 14 C	- TYR 78 CE2 (symm 2)	3.88 A
SER 15 CB	- SER 80 CB (symm 2)	3.95 A
SER 15 CB	- TYR 78 CE2 (symm 2)	3.99 A
SER 15 N	- TYR 78 CD2 (symm 2)	3.76 A
SER 15 OG	- SER 80 CB (symm 2)	3.76 A
ASN 16 ND2	- ASN 91 CG (symm 2)	3.83 A
ASN 16 ND2	- ASN 91 ND2 (symm 2)	3.95 A
ASN 16 ND2	- PRO 59 CG (symm 2)	3.95 A
ASP 17 CG	- PRO 59 CD (symm 2)	3.92 A
ASP 17 OD1	- PRO 59 CD (symm 2)	3.21 A
ASP 17 OD1	- PRO 59 CG (symm 2)	3.54 A

ASN 20 CB	- PRO 59 CB (symm 2)	3.93 A
ASN 20 CB	- PRO 59 CG (symm 2)	3.78 A
ASN 20 CG	- PRO 59 CA (symm 2)	3.75 A
ASN 20 CG	- PRO 59 CB (symm 2)	3.69 A
ASN 20 ND2	- PRO 59 CA (symm 2)	3.73 A
ASN 20 OD1	- PRO 59 CA (symm 2)	3.92 A
ASN 20 OD1	- PRO 59 CB (symm 2)	3.80 A
ASN 20 OD1	- TYR 44 CE1 (symm 2)	3.30 A
ILE 23 CD1	- TYR 44 OH (symm 2)	3.58 A
ILE 23 CG2	- TYR 44 CE1 (symm 2)	3.66 A
ILE 23 CG2	- TYR 44 CE2 (symm 2)	3.94 A
ILE 23 CG2	- TYR 44 CE (symm 2)	3.53 A
ILE 23 CG2	- TYR 44 OH (symm 2)	3.76 A
GLN 24 CD	- ASP 45 N (symm 2)	3.45 A
GLN 24 CD	- ASP 45 O (symm 2)	3.88 A
GLN 24 NE2	- ASP 45 CA (symm 2)	3.85 A
GLN 24 NE2	- ASP 45 CB (symm 2)	3.71 A
GLN 24 NE2	- TRP 60 CE3 (symm 2)	3.69 A
GLN 24 NE2	- TYR 44 C (symm 2)	3.68 A
GLN 24 NE2	- TYR 44 CA (symm 2)	3.56 A
GLN 24 NE2	- TYR 44 CB (symm 2)	3.65 A
GLN 24 NE2	- TYR 44 CD1 (symm 2)	3.85 A
GLN 24 OE1	- ASP 45 C (symm 2)	3.86 A
GLN 24 OE1	- ASP 45 CB (symm 2)	3.98 A
GLN 24 OE1	- ASP 45 N (symm 2)	3.66 A
LEU 27 CD1	- TYR 44 CB (symm 2)	3.52 A
LEU 27 CD1	- TYR 44 CD2 (symm 2)	3.81 A
LEU 27 CD1	- TYR 44 CG (symm 2)	3.62 A
ASP 28 CG	- ARG 75 NH1 (symm 2)	4.00 A
ASP 28 CG	- ARG 75 NH2 (symm 2)	3.99 A
ASP 28 OD1	- ARG 75 CE (symm 2)	3.77 A
ASP 28 OD1	- ARG 75 NH2 (symm 2)	3.71 A
ASP 28 OD1	- ASP 45 O (symm 2)	3.80 A
HIS 41 C	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.83 A
HIS 41 CA	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.72 A
HIS 41 CB	- GLU 94 CD (symm 2)	3.55 A
HIS 41 CB	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.42 A
GLN 42 C	- GLU 94 OE2 (symm 2)	3.58 A
GLN 42 CA	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.87 A
GLN 42 CA	- GLU 94 OE2 (symm 2)	3.98 A
GLN 42 CB	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.82 A
GLN 42 CB	- GLU 94 OE2 (symm 2)	3.94 A
GLN 42 CD	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.53 A
GLN 42 N	- GLU 94 CD (symm 2)	3.72 A
GLN 42 N	- GLU 94 OE2 (symm 2)	3.69 A
GLN 42 OE1	- GLU 94 C (symm 2)	3.66 A
GLN 42 OE1	- GLU 94 CA (symm 2)	3.41 A
GLN 42 OE1	- GLU 94 CB (symm 2)	3.93 A
GLN 42 OE1	- GLU 94 CD (symm 2)	3.85 A
GLN 42 OE1	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.35 A
GLN 42 OE1	- PHE 95 CA (symm 2)	3.80 A
GLN 42 OE1	- PHE 95 CB (symm 2)	3.53 A
GLN 42 O	- GLU 94 CD (symm 2)	3.55 A
GLN 42 O	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.78 A
GLN 42 OE1	- GLU 94 OE1 (symm 2)	3.82 A
TYR 44 CE2	- GLY 93 C (symm 2)	3.57 A
TYR 44 CE2	- GLY 93 O (symm 2)	3.15 A
TYR 44 CE	- GLY 93 O (symm 2)	3.52 A
ASP 45 CG	- ARG 75 NH1 (symm 1)	3.39 A
ASP 45 CG	- ASP 76 CG (symm 1)	3.91 A
ASP 45 CG	- ASP 76 OD1 (symm 1)	3.35 A
ASP 45 CG	- ASP 76 OD2 (symm 1)	3.72 A
ASP 45 O	- ARG 75 NH1 (symm 1)	3.92 A
ASP 45 OD1	- ASP 76 CG (symm 1)	3.16 A
ASP 45 OD2	- ARG 75 CD (symm 1)	2.97 A
ASP 45 OD2	- ARG 75 CE (symm 1)	3.19 A
ASP 45 OD2	- ARG 75 NE (symm 1)	3.39 A
ASP 45 OD2	- ARG 75 NH1 (symm 1)	2.41 A
ASP 45 OD2	- ASP 76 OD1 (symm 1)	3.39 A
ASP 45 OD2	- ASP 76 OD2 (symm 1)	3.89 A

ALA 47 CA - ASP 76 OD1 (sym# 1) 3.43 A
 ALA 47 CB - ARG 75 CE (sym# 1) 3.59 A
 ALA 47 CB - ARG 75 NE (sym# 1) 3.90 A
 ALA 47 CB - ARG 75 NH1 (sym# 1) 3.52 A
 ALA 47 CB - ARG 75 NH2 (sym# 1) 3.94 A
 ALA 47 CB - ARG 75 O (sym# 1) 3.80 A
 ALA 47 CB - ASP 76 OD1 (sym# 1) 3.87 A
 ALA 47 N - ARG 75 NH1 (sym# 1) 3.64 A
 SER 48 CB - SER 114 OT (sym# 2) 3.43 A
 ASP 50 C - ASP 76 O (sym# 1) 3.50 A
 ASP 50 CA - ASP 76 O (sym# 1) 3.31 A
 ASP 50 CB - ASP 76 O (sym# 1) 3.78 A
 ASP 50 O - ASP 76 O (sym# 1) 3.87 A
 ILE 51 C - ASP 76 CB (sym# 1) 3.96 A
 ILE 51 O - ASP 76 CB (sym# 1) 3.27 A
 ILE 51 O - ASP 76 CG (sym# 1) 3.26 A
 ILE 51 O - ASP 76 OD1 (sym# 1) 3.80 A
 ILE 51 O - ASP 76 OD2 (sym# 1) 3.39 A
 THR 52 CG2 - ASN 77 CB (sym# 1) 3.46 A
 THR 52 CG2 - ASP 76 CB (sym# 1) 4.00 A
 THR 52 CG2 - ASP 76 O (sym# 1) 3.87 A
 VAL 66 CB - TYR 107 OH (sym# 2) 3.73 A
 VAL 66 CG2 - TYR 107 OH (sym# 2) 3.94 A
 TYR 67 C - TYR 107 OH (sym# 2) 3.65 A
 TYR 67 N - TYR 107 OH (sym# 2) 3.75 A
 TYR 67 O - TYR 107 CE1 (sym# 2) 3.17 A
 TYR 67 O - TYR 107 CE (sym# 2) 3.27 A

ASN 68 CB - ASP 108 OD1 (sym# 2) 3.68 A
 ASN 68 CG - ASP 108 OD1 (sym# 2) 3.69 A
 ASN 68 CG - HIS 101 CD2 (sym# 2) 3.85 A
 ASN 68 ND2 - ASP 108 CG (sym# 2) 3.91 A
 ASN 68 ND2 - HIS 101 CD2 (sym# 2) 3.91 A
 ASN 68 ND2 - HIS 101 NE2 (sym# 2) 3.83 A
 ASN 68 O - TYR 107 CD1 (sym# 2) 3.90 A
 ASN 68 O - TYR 107 CE1 (sym# 2) 3.48 A
 ASN 68 OD1 - HIS 101 CD2 (sym# 2) 3.57 A
 THR 92 CA - 3AP 150 O4' (sym# 2) 3.75 A
 THR 92 CB - 3AP 150 O4' (sym# 2) 3.48 A
 THR 92 CG2 - 3AP 150 O4' (sym# 2) 3.92 A
 THR 92 O - 3AP 150 C1' (sym# 2) 3.43 A
 THR 92 O - 3AP 150 CB (sym# 2) 3.54 A
 THR 92 O - 3AP 150 H9 (sym# 2) 3.58 A
 THR 92 O - 3AP 150 O4' (sym# 2) 3.49 A
 GLU 94 CD - 3AP 150 O2' (sym# 2) 3.20 A
 GLU 94 CG - 3AP 150 O2' (sym# 2) 3.59 A
 GLU 94 OE1 - 3AP 150 O2' (sym# 2) 3.85 A
 GLU 94 OE2 - 3AP 150 C1' (sym# 2) 3.37 A
 GLU 94 OE2 - 3AP 150 C2' (sym# 2) 3.58 A
 GLU 94 OE2 - 3AP 150 CB (sym# 2) 3.67 A
 GLU 94 OE2 - 3AP 150 H9 (sym# 2) 3.96 A
 GLU 94 OE2 - 3AP 150 O2' (sym# 2) 3.80 A

謝辞

本研究に関し、ご指導を賜りました東京大学薬学部佐藤能雅教授に感謝致します。

RNase U₂ II型結晶試料、及びIII型とIV型結晶のX線回折データを提供して下さい助言も賜りました三菱化学の松崎尹雄、佐々木千津子、内田庸子各博士に感謝致します。

スクシンイミド体蛋白質の立体構造研究における共同研究者の宮脇一生氏に感謝致します。

