

最近の研究から

世界初の Diels-Alderase

尾瀬農之¹、姚 閔¹、渡辺賢二²、三江 崇²、及川英秋³、田中 勲¹

¹北大理学部・生物科学、²北大農学部・応用生命、³北大理学部・化学

The first Diels-Alderase

Toyoyuki OSE¹, Min YAO¹, Kenji WATANABE², Takashi MIE², Hideaki OIKAWA³, Isao TANAKA¹

¹Division of Biological Science, Graduate School of Science, ²Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture,

³Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University

1. はじめに

1950年のノーベル化学賞は、ドイツ化学者のO. Dielsとその弟子K. Alderに授与された。彼らの功績は、新たなシクロヘキセン環合成手法を発見したことにある。この反応は後にDiels-Alder反応と呼ばれ、有機合成化学に対するブレークスルーをもたらしたのみならず、産業の発展に対する貢献は計り知れない。Diels-Alder反応は、ジエンおよびジエノフィルの4 π 、2 π 共役系の電子軌道の重なりから協奏的にシクロヘキセン環を合成する[4+2]付加反応であり、反応は穏やかな条件で進行する。これは、同じペリ環状反応である[2+2]付加反応—例えばDNA中のピリミジンが変異ピリミジン二量体を形成する反応—が紫外線照射などのエネルギーを要求することと、性質を大きく異にする。

1980年代になって、蛋白質工学に新たな領域が切り開かれた。すなわち触媒としての抗体の創製である。初めての例はScripps研究所のR. Lerner [1]とU.C. BerkeleyのP. Shultz [2]らの手によるもので、遷移状態類似体をハプテンとして認識できる抗体を作製し、エステルを加水分解することに成功している。さらに当時Scripps研究所のD. HilvertはDiels-Alder反応の遷移状態を認識できる抗体を利用し、人工的なDiels-Alderaseを作製するというアイデアを提唱、実践した [3]。具体的には、39A-11 [4]、13G5 [5]、IE9 [6]などのDiels-Alderase抗体触媒が遷移状態類似化合物との複合体の状態でX線結晶構造解析されている。後述するように、構造解析結果から、これらの抗体触媒は反応性を上げるための種々の工夫が施されていることが解明されている。

さて、人工型酵素である抗体触媒がDiels-Alder反応を触媒することが証明された訳ではあるが、果たして天然にDiels-Alder反応を触媒する酵素は存在するのだろうか？何事においてもそうであるが、天然型は人工型に比べて選択圧を受け生き残ったものであるため、効率性を比べると一般的に比較にならないくらい高い。もし天然型Diels-Alderaseが存在すれば、その触媒戦略は非常に精巧に設計されており、我々が学ぶべき叡知は計り知れないであろう。天然には多種類の炭素炭素結合反応を触媒する酵

素が知られるが、このうち化学構造から[4+2]付加物と予想される化合物は微生物、植物および海産動物には意外に多く見出される(100種以上) [7] (Fig. 1)。この中では、細胞レベルでの変換反応で酵素的Diels-Alder反応の存在を論じている研究などの魅力的な仮説、間接的な証明が数例あるが、実際にこうした付加物を与える酵素を単離すべく行った試みはほとんどが失敗に終わっていた。これまで具体的に存在が確認されている候補酵素は、僅か三種類のみであった。

天然型Diels-Alderaseを探すことは‘宝探し (seeking a holy grail quest)’などとも言われ、化学者のみならず多分野から注目を集めていた。本稿では世界で初めて構造解析、反応を説明することのできた天然型Diels-Alderase : macrophomate synthase (MPS) [8]が採用している触媒戦略について簡単に紹介する。

2. MPS

ツユクサの病原菌 *Macrophoma commelinae* IFO 9570は2-ピロン **2** から安息香酸誘導体マクロフォミン酸 **1** への珍しい変換を触媒する事が知られていた [9] (Fig. 2)。一般に2-ピロンは逆電子要求性Diels-Alder反応の基質と知られ、この変換反応中にDiels-Alder反応が含まれることが期待された。後の研究により、この複雑な変換反応はmacrophomate synthase (MPS) と名付けられた、たった一種の酵素によって触媒されることが判明した。MPSはMg²⁺を要求する分子量約36kDaの蛋白質である。MPSはもう一つの基質としてオキサロ酢酸を必要とする。

MPSの触媒反応はFig. 2に示したように三段階に分けることができる [10]。第一段階の脱炭酸反応にはMg²⁺が必須であり (K_d 0.99 × 10⁻⁷ M)、オキサロ酢酸のみを基質とした場合、生成したエノラートが水分子と反応しピルビン酸を与える。本酵素はピルビン酸も基質とするが、この場合非効率的な脱プロトン化が生じるためと説明できる。二段目の反応は2個の炭素炭素結合反応であり。最後の反応は脱水-脱炭酸による芳香環の形成である。このような観点からすれば脱水反応における脱プロトン化は中間体 **5**, **6**にあるカルボキシル基による分子内触媒反応であり、2段

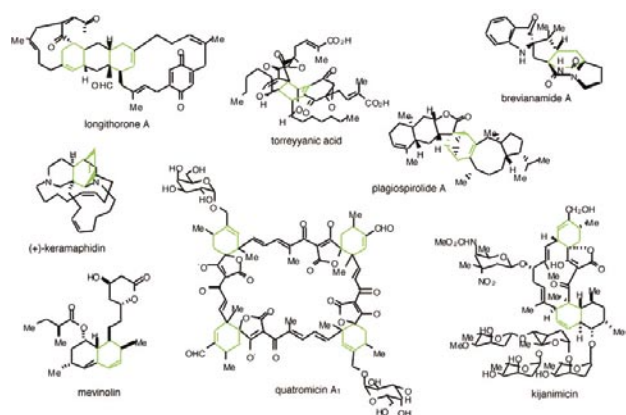


Figure 1
Representative examples of natural [4+2] type adducts.

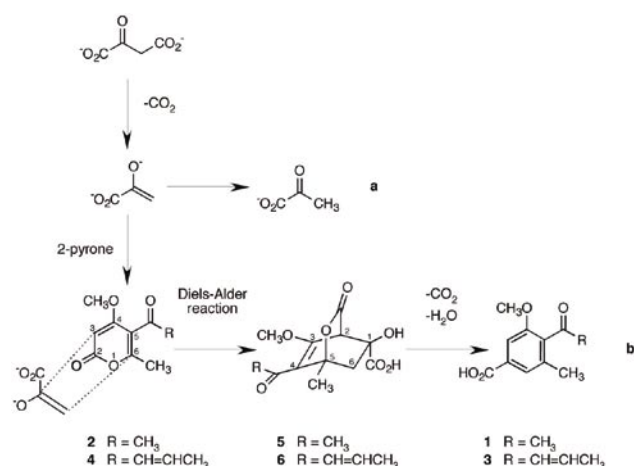


Figure 2
Enzymatic reactions catalyzed by MPS. (a) Decarboxylation without 2-pyrone. (b) Multi-step transformation with 2-pyrone. Macrophomate 1 and 2-pyrone 2 have been discovered in *Macrophoma commelinae*. MPS also can convert Pyrenocin A 4 into pyrenocheatic acid A 3, which are phytotoxins from onion pink rot.

階の反応が協奏的に進行するという反応経路を予想することができる。本変換反応全体を眺めると酵素の持つ本来の機能は脱炭酸であり、他の反応は後天的に付け加えられたものと考えるのが妥当であろう。

3. 実験

3.1 蛋白質の発現・精製と結晶化

Macrophoma commelinae 由来 MPS-cDNA を発現ベクター pET-30b(+) (Novagen 社) に導入し、大腸菌内で発現させ精製した。結晶化の為に標品精製は、(1) 陰イオン交換カラム Q-XL、(2) Butyl 基を利用した疎水性相互作用カラム、(3) 陰イオンカラム Mono-Q (いずれもアマシャムバイオサイエンス社) の三段階による液体カラムクロマトグラフィーにより行った。

MPS の結晶は、17% ポリエチレングリコール 3350、10% 2-プロパノール、5mM 塩化マグネシウム、10mM ピルビン酸、100mM HEPES を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で作製した。多波長異常分散法による構造決定を行うために、セレノメチオニン置換体結晶も作

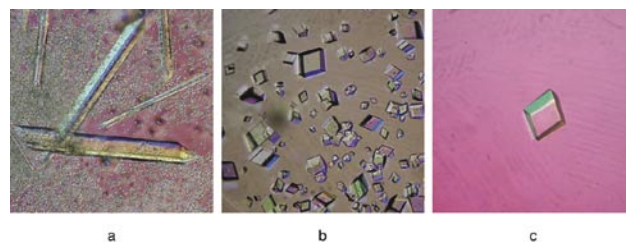


Figure 3
Crystals of MPS. a native type_A b native type_B c Selenomethionine substituent.

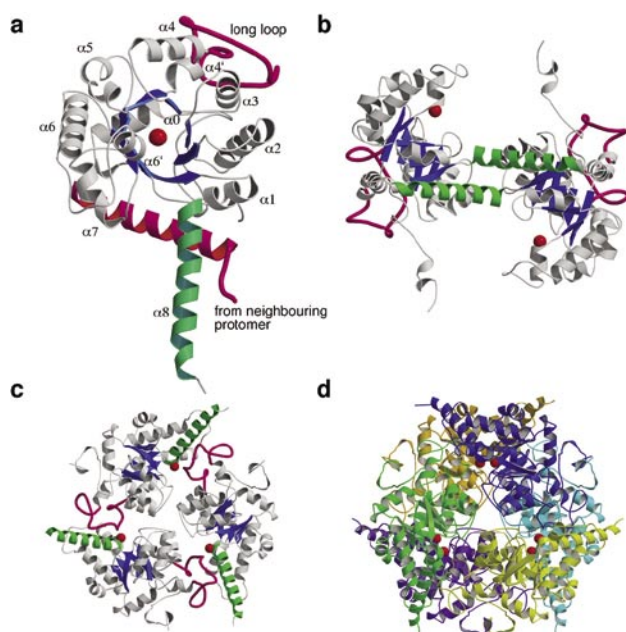


Figure 4
Overall structure of MPS. a, Protomer structure of MPS showing α -helices swapped (β/α)₈ barrel fold. The core β -barrel (blue) is surrounded by 11 α -helices. The long α 8-helix (colored in magenta) belongs to neighbouring protomer related by the 2-fold axis and joins to the β -barrel core to form a complete (β/α)₈ barrel. The divalent magnesium ion (red ball) is located at the C-terminal region of the β -barrel. A long loop (colored in magenta) opposite to the swapped helix is interacted with another adjacent protomer related by the 3-fold axis (as shown in c). b, Dimer structure formed by helix swapping. Two protomers related by the 2-fold axis are tightly associated by the hydrophobic interactions of the swapped helices (drawn in green). c, Three protomers related by the 3-fold axis. Each flexible loop colored in magenta (residues 139-171) joins to the active site of the next protomer. The flexibility of this region may help substrates migrate into catalytic pockets. d, The functional unit of MPS with point group symmetry 32.

製した (Fig. 3)。両者の結晶化条件には若干の相違が見られた。

精製サンプルの活性測定は、反応液をフィルターで濾過し、HPLC システムを用いた逆相カラムクロマトグラフィー (Wakosil- II 5C18 ϕ 4.6 \times 250mm, Wako) により生成物を定量した。また、セレノメチオニン化した MPS の比活性は、野生型酵素と同等であった。

3.2 結晶構造解析

回折強度測定は全て PF のビームラインを用いて、ク

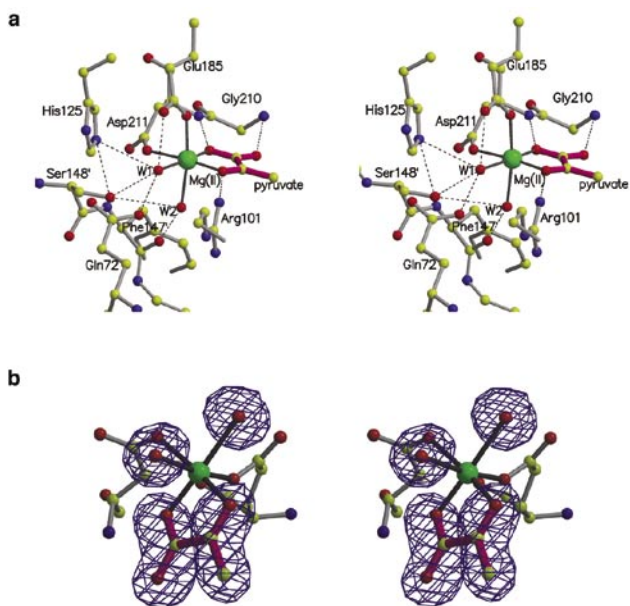


Figure 5
Stereo views of the active site showing Mg^{2+} coordination and the electron density map. **a**, Schematic representation depicting the detailed interactions of octahedrally coordinated Mg^{2+} (green ball) and its ligands. The ligands are the carboxyl oxygens of Glu185 and Asp211, C2-carbonyl and C1-carboxyl oxygen atoms of pyruvate enolate, and two water molecules. The figure also shows profound networks of the hydrogen bonds (dotted lines) around these ligands. The bonds and atoms are colored as follows: pyruvate moiety (magenta), MPS (gray), coordination bonds of Mg^{2+} (black), oxygen (red), nitrogen (blue), carbon (yellow) and magnesium (green). **b**, The final σ_A weighted $F_o - F_c$ omit electron density for pyruvate and two water molecules. The contour level of the electron density map is 3.0σ and the resolution is 1.7 \AA .

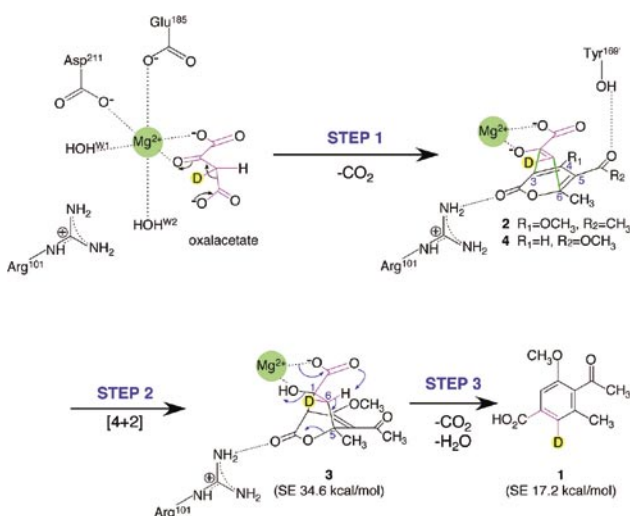


Figure 6
Details of individual reaction steps with macrophomate synthase. Step 1 is decarboxylation of oxalacetate. Step 2 is Diels-Alder reaction of the enolate and 2-pyrone **2** to form higher energied adduct **3**. Step 3 is degradation of **3** in which abstraction of hydrogen triggers C-O bond cleavage followed by decarboxylation and elimination of hydroxy group.

ライオ条件下 (100K) に行った。Native 結晶に関しては type A, B の二種の結晶が得られた。type_A 結晶 (空間群 $P6_322$) は BL-6A において分解能 1.7 \AA までの回折強度データを収集することができた ($\lambda=1.0 \text{ \AA}$)。type_B 結晶 (空

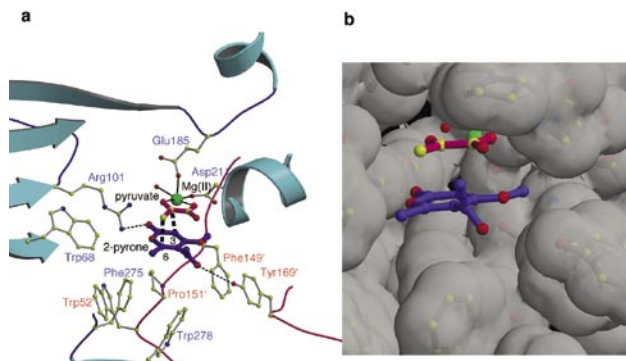


Figure 7
The early transition state model of Diels-Alder reaction. **a** The residues in the active site pocket and proposed model for the very early transition state of the Diels-Alder reaction. 2-pyrone **2** (blue thick bond) is placed in parallel with pyruvate enolate (red thick bond) which is bound to Mg^{2+} (green ball). C2 carbonyl and C5 acyl-carbonyl oxygens of 2-pyrone **2** are located respectively within hydrogen-bonding distance to guanidyl nitrogen of Arg101 and phenol oxygen of Tyr169' (here prime sign represents the residue from neighboring chain). Side chains of Arg101 and Tyr169' are drawn as they are found in the crystal and could slightly adjust their conformations for making hydrogen bonds to 2-pyrone **2**. The hydrogen bonds are drawn in thin dotted lines and the incoming carbon-carbon bonds between C2 (and C3) of pyruvate and C3 (and C6) of 2-pyrone are drawn in thick dotted lines. The wall of the active site pocket at the 2-pyrone side consists of mostly hydrophobic residues with bulky side chain such as Trp68, Phe275, Trp278, Phe149', Pro151', and Trp152'. No ionic residues except Arg101 and Tyr169' mentioned above is not present in the active site close to the 2-pyrone. The main chain trace drawn in red is of the neighboring protomer related by the 3-fold axis. **b** The space-filling model of the active site with transition state of substrates pyruvate enolate (red) and 2-pyrone **2** (blue).

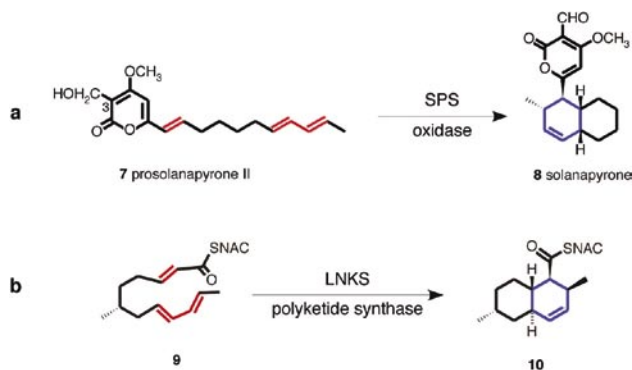


Figure 8
Comparison of Diels-Alderase. **a**, Solanapyrone synthase (SPS) catalyzes oxidation of alcohol **7** to the reactive formyl derivative which readily proceeds [4+2] cycloaddition to give solanapyrone A **8**. **b**, Lovastatin nonaketide synthase (LNKS) catalyzes intramolecular [4+2] cycloaddition from **9** to **10**. LNKS also catalyzes condensation of acetyl CoA and malonyl CoA to form enzyme bound analogue of **9**.

間群 R32) は BL-18B において 2.0 \AA までのデータを収集した。また、多波長異常分散法に必要な、セレンメチオン置換体結晶は BL-18B において分解能 2.3 \AA までの回折強度データを収集した。位相決定には SHARP を、電子密度改良には DM を用いて、 2.3 \AA までの異常分散データから Native_B 結晶の回折強度データを利用し 2.0 \AA まで位相拡張を行った後、ARP/wARP によるモデル構築を行った。Native_A 結晶の回折データを用い、 $20 \text{ \AA} - 1.7 \text{ \AA}$ の反射

を使用して CNS でモデルの精密化を行い、 $R=0.1811$, $R_{\text{free}}=0.2040$ の最終構造を得た。結晶学的データおよび精密化の統計値を Table (Appendix) に示した。

3.3 変異体の作製と活性測定

活性部位情報から、基質との相互作用が予想される Arg101, Tyr169 に対して PCR 法を利用して変異を導入し、オキサロ酢酸脱炭酸活性およびマクロフォミン酸合成活性の定量を行った。オキサロ酢酸脱炭酸活性は、反応液を NADH 存在下において乳酸脱水素酵素と混合し、乳酸脱水素酵素逆反応によるピルビン酸等量当たりの NADH の消費を OD₃₄₀ で定量化した。マクロフォミン酸合成活性は前述のとおり、逆相カラムクロマトグラフィーによる定量化を行った。

4. 結果と考察

4.1 MPS の全体構造

MPS の単量体は $\alpha 0-\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\alpha 4-\alpha 4'-\beta 5-\alpha 5-\beta 6-\alpha 6'-\alpha 6-\beta 7-\alpha 7-\beta 8-\alpha 8$ の順に二次構造を形成し、 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel からなるコア構造を持つ (Fig. 4)。 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel は TIM-barrel fold と呼ばれ、蛋白質のフォールドとして最も大きな fold-superfamily を形成する。 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel を持った酵素が持つ活性も様々なものが報告されている。MPS は $(\beta/\alpha)_8$ -barrel コアに加えて、その C 末端側は 23 残基 (275-298) からなる長い α ヘリックスを形成している。この長い α ヘリックスは結晶学的二回軸で関係付けられた単量体の $(\beta/\alpha)_8$ -barrel の一部となっている。すなわち、単量体間で強力に相互作用しているこの α ヘリックスの swapping によって $(\beta/\alpha)_8$ -barrel は完成する。 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel コアを持った酵素は、コア部以外の構造が様々に修飾されたものが見られるが、MPS と同様に二回軸間で swapping している α ヘリックスによって $(\beta/\alpha)_8$ -barrel が完成するようなトポロジーを持つ蛋白質として、phosphoenolpyruvate mutase (PDB ID: 1pym) および 2-keto-3-deoxy-D-glucarate (DDG) aldolase (PDB ID: 1dxe) が構造解析されている。アミノ酸配列の相溶性が 20% 弱である MPS と DDG aldolase の単量体立体構造は高い相溶性が見られる。MPS はさらに、この 'swapping dimer' が三回軸で関係付けられ、全体として点群 32 からなる六量体を形成する。主に疎水性によって会合している二回軸間の相互作用が、三回軸間のものよりも大きいことは、buried surface の計算からも明らかである。また、Fig. 4c に示すように三回軸間に於いても、隣の単量体からの長いループの挿入が見られる。このループは相手の活性部位付近まで挿入され、後述するように反応過程で重要な働きをする残基を保持している。

4.2 活性部位

$(\beta/\alpha)_8$ -barrel fold を形成する酵素の活性部位は、中央 β -barrel の C 末側に位置する。MPS が活性発現を行うためには二価マグネシウムイオンが必要であるが、他の金属イオンはコファクターとして働き得ない。マグネシウムイオン

は精製、結晶化条件において 5mM で添加している。マグネシウムイオンは Fo-Fc を係数としたマップ (3σ) から容易にアサインすることができ、Glu185 および Asp211 の二つの側鎖カルボン酸に配位している (Fig. 5a)。また、結晶化条件に加えたピルビン酸がマグネシウムイオンに配位している様子もマップより確認することができた (Fig. 5b)。得られた分解能のマップからは、ピルビン酸の二つのカルボキシル酸素が主鎖のアミドプロトンと水素結合をしている状態を明示しているため、ピルビン酸の方位を一義的に決定することができた。ピルビン酸はそのカルボニル酸素原子とカルボキシル酸素原子がマグネシウムイオンに配位している。

ピルビン酸は DDG aldolase においても活性部位に配位した状態で構造解析されている。全体構造だけではなく、活性部位のマグネシウムイオンおよびピルビン酸配位の認識様式も MPS と DDG aldolase の間に相溶性が見られる。ピルビン酸は DDG aldolase の基質の一つであり、MPS の基質にもなりうる。しかしながらマグネシウムイオンの親和性、選択性、基質の構造には大きな相違が見られ、触媒する反応も別種のものであると言って良い。

4.3 反応機構

MPS の反応経路は大別して 3 つに分けられる。構造解析により得られた情報をもとに、反応メカニズムを表したものが Fig. 6 である。第一段階目の反応はオキサロ酢酸を取り込み、速やかに脱炭酸反応を触媒してピルビン酸を生成するオキサロ酢酸脱炭酸酵素 (OAD) としての働きである。これまでにオキサロ酢酸が、脱炭酸を受ける酵素反応は二種知られている。すなわち、ビオチン要求性で細胞膜においてナトリウムイオンの輸送と連動しているものと、2 価の金属イオンを要求する水溶性蛋白質であり、ピルベートキナーゼ、マリックエンザイムおよび *Acetobacter xylinum* と *Pseudomonas putida* 由来の OAD が報告されている。MPS の脱炭酸反応機構は *Acetobacter xylinum* や *Pseudomonas putida* 由来の OAD と同様であると思われる。すなわち、2 価金属イオンによるオキサロ酢酸の脱炭酸触媒作用は、1 位カルボキシル基と 2 位カルボニル基との間にキレート構造を形成し、脱炭酸の結果生じるエノラートアニオンを効果的に安定化することができる。直接生成物はピルビン酸エノラートであるが、容易にプロトン付加されピルビン酸を生ずる。今回の構造解析がピルビン酸との複合体状態で成功したことから、オキサロ酢酸が活性部位に取り込まれる際の立体配置も明らかになった。

二段階目の反応はオキサロ酢酸またはピルビン酸から得られたピルビン酸エノラートと、2-ピロンが [4+2] 付加反応を行って、架橋型構造体 (bicyclo [2,2,2] octene) を形成する反応である。ここで、中間体の絶対配置が決定済みであること、および活性部位に配位しているピルビン酸の配置から、2-ピロンが活性部位で認識されるモデルを一義的に決定することができる。この Diels-Alder 反応初期遷移状態の様子を Fig. 7 に示した。この図によれば、疎水性の高

い基質 2-ピロンは Trp52', Trp68, Phe149', Pro151', Phe275, Trp278 などの疎水性の側鎖が集中している領域で認識されている。ここで、プライムのついた残基は三回軸で関係付けられた単量体由来であることを示す。特筆すべきは、モデル中、2-ピロンの 2 位カルボニル酸素および 5 位アシル酸素がそれぞれ Arg101 グアニジル窒素、Tyr169' フェノール酸素と水素結合距離に入ってくることである。この水素結合の効果を検証するために、R101S および Y169F の二種の変異体を作製し、速度論的解析を行った。その結果、両変異体共にオキサロ酢酸脱炭酸活性には影響せず、マクロフォミン酸合成活性に影響を与えた。R101S 変異体ではマクロフォミン酸合成活性は残存せず、Y169F に関しては K_m 値一定のまま V_{max} 値に 90% 以上の低下を認めた (0.87 から $0.07 \mu \text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)。このことは、二段階目の炭素炭素結合反応において、基質 2-ピロンと蛋白質残基との水素結合が重要な働きをしていることを示すと同時に、我々の遷移状態のモデルの合理性を強く示唆した結果となっている。

また、Fig. 7b では空間充填モデルによって両基質が認識されている様子を表している。既に置換基の異なる 2-ピロンを用いた MPS による酵素反応の基質特異性に関して調べられており、3 位置換体は全く基質とならないが 4 位、5 位、6 位置換体はそれぞれ benzyloxy 基、ethoxycarbonyl 基および phenyl 基とかなり大きな置換基を持つものも安息香酸誘導体に変換される。活性部位の立体構造はピロン環の 4 位、5 位、6 位周辺の空間には余裕があるものの 3 位付近は Mg^{2+} および水分子が占めるため込み合っており、上記基質特異性をうまく説明できることがわかった。

Diels-Alder 反応はジエンの HOMO とジエノフィルの LUMO との相互作用で進行するが、一般にジエノフィルに導入された電子吸引基や、ジエノフィルの反応溶液中の Lewis 酸との相互作用、水素結合の形成は LUMO エネルギーを低下させ、Diels-Alder 反応を加速することが知られている。構造解析された三種類の Diels-Alderase 抗体触媒は全てジエノフィルと蛋白質残基との間に水素結合を形成している。一方で、MPS 反応において基質 2-ピロンは逆電子要求性 Diels-Alder 反応の基質として有名であるが、この反応はジエノフィルの HOMO とジエンの LUMO との反応である。従って 2-ピロンと水素結合を形成するような戦略は極めて有効なのである。

最後の脱離反応では活性部位に中間体の pro-R プロトンを脱離する適当なアミノ酸残基が見あたらないことから、付加体が持つ 1 位カルボキシレートが塩基として機能することで、脱プロトン化と同時に antiperiplanar に位置する C—O 結合が切断され、脱炭酸、脱水が進行するものと推定している。

4.4 Natural Diels-Alderase の例

現在までに MPS を含めて三種類の天然型 Diels-Alderase が報告されている。ソラナピロン合成酵素 (SPS)、ロバスタチンノナケタイド合成酵素 (LNKS) の反応経路を

Fig. 8 に示した。SPS と LNKS の触媒する反応は分子内 Diels-Alder 反応である。一方 MPS が触媒する反応は分子間 Diels-Alder 反応である。全く異なった生合成経路中に発見されているこれらの酵素には共通点が存在する。すなわち、これら三種の酵素は Diels-Alderase とは別の機能を持ち、それぞれ固有の反応を触媒する。

例えば SPS は酸化酵素として働き、基質 prosolanapyrone II の 3 位アルコールをアルデヒドまで酸化する。プロソラナピロン類のピロン環 3 位置換基が CH_3 、 CH_2OH 、 CHO と酸化されるにつれジエノフィルの LUMO エネルギーが低下するので、SPS はより活性化された Diels-Alder 反応の基質を用意する酵素であることがわかる。LNKS はアセチル CoA およびマロニル CoA の縮合を繰り返すことによりポリケタイド鎖を伸長する反応を触媒するポリケタイド合成酵素である。この伸長過程で得られたジエノフィル、ジエンが分子内 Diels-Alder 反応により環化する。また、これまで見てきたように MPS は反応性の高いオキサロ酢酸脱炭酸酵素である。

三種類の酵素はそれぞれ、Diels-Alder 反応の基質を提供するような全く別の反応を触媒しているのである。言い方を変えると、ジエンもしくはジエノフィル、あるいはその両方を生成する酵素の活性部位が、引き続き [4+2] 付加反応が起こるようなコンフォメーションで生成物同士を接近させる場を提供した場合に、偶然にも Diels-Alderase として働くことができた。この性質を獲得した酵素が淘汰の結果、保存されたと考えるのが適当であろう。つまり、前反応で生じた、Diels-Alder 反応の基質であるジエンおよびジエノフィルを、いかに効率的にトラップできるかが鍵になってくる。三種の natural Diels-Alderase では、Diels-Alder 反応の基質（それぞれ前反応の生成物）は活性化された状態で酵素活性部位に結合しており、溶液中においては非常に不安定である。このように、活性化された基質が利用できるのは天然型酵素独特の戦略である。

5. まとめ

私たちは MPS の立体構造を、基質の一つであるピルビン酸との複合体の状態で X 線結晶構造解析することに成功した。得られた立体構造情報および以前の実験データから、世界で初めて天然型 Diels-Alderase の触媒機構を解明することができた。Diels-Alderase は長い間多くの生化学者、化学者が探し求めていたものである。これまで創製されていた Diels-Alderase 触媒抗体に比べ、天然型 Diels-Alderase は精緻な工夫を随所に施し、格段に高速な反応効率を実現していることが明らかになった。

この結果は、一見して散在しているように思える Diels-Alderase が、ある共通した概念の上に乗っていることを示唆するものである。今後微生物二次代謝経路上に次々に発見されるであろう Diels-Alderase の反応機構が解明され、私たちの提出した概念が一般化されることを期待する。

引用文献

- [1] Tramontano, A., Janda, K. D. & Lerner, R. A. *Science* **234**, 1566-1570 (1986).
- [2] Pollack, S. J., Jacobs, J. W. & Schultz, P. G. *Science* **234**, 1570-1573 (1986).
- [3] Hilvert, D., Hill, K. W., Nared, K. D. & Auditor, M-T. J. *Am. Chem. Soc.* **111**, 9261-9262 (1989).
- [4] Romesberg, F. E., Spiller, B., Schultz, P. G. & Stevens, R. C. *Science* **279**, 1929-1933 (1998).
- [5] Heine, A., Stura, E. A., Yli-Kauhaluoma, J. T., Gao, C., Deng, Q., Beno, B. R., Houk, K. N., Janda, K. D. & Wilson, I. A. *Science* **179**, 1934-1940 (1998).
- [6] Xu, J., Deng, Q., Chen, J., Houk, K. N., Bartek, J., Hilvert, D. & Wilson, I. A. *Science* **286**, 2345-2348 (1999).
- [7] Ichihara, A. & Oikawa, H. in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (eds. Barton, D., Nakanishi, K. & Meth-Cohn, O.) **Vol. 1**, 367-408 (Elsevier, Amsterdam, 1999).
- [8] Ose, T., Watanabe, K., Mie, T., Honma, M., Watanabe, H., Yao, M., Oikawa, H. & Tanaka, I. *Nature* **422**, 185-189 (2003).
- [9] Sakurai, I., Miyajima, H., Akiyama, K., Shimizu, S. & Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2003-2011 (1988).
- [10] Watanabe, K., Mie, T., Ichihara, A., Oikawa, H. & Honma, M. *J. Biol. Chem.* **275**, 38393-38401 (2000).

(2003年6月23日原稿受付)

著者紹介



尾瀬 農之 Toyoyuki OSE

北海道大学 博士研究員

大学院理学研究科

札幌市北区北10条西8丁目

TEL: 011-706-4481 FAX: 011-706-4481

E-mail: ose@castor.sci.hokudai.ac.jp

略歴：2003年3月北海道大学大学院理学研究科博士後期課程修了（2000年4月から2003年3月まで（財）日本学術振興会特別研究員）2003年4月博士研究員、現在に至る。理学博士。

最近の興味：活性化合物と蛋白質の複合体構造

趣味：スキーをするために北海道に来ました。あと、ほっとする穴場的スポットを見つけることです。

姚 閔 Min Yao

北海道大学・理学部・助手、博士（理学）。

渡辺 賢二 Kenji WATANABE

北海道大学・農学部・助手、農学博士。

三江 崇 Takashi MIE

北海道大学・農学部・大学院生、修士（農学）。

及川 英秋 Hideaki OIKAWA

北海道大学・理学部・教授、農学博士。

田中 勲 Isao TANAKA

北海道大学・理学部・教授、理学博士。

(Appendix)

Table Data & Refinement statistics

crystal	native	peak	Se-Met edge	remote
Crystallographic data				
Beam Line	PF BL-6A		PF BL-18B	
Space group	$P6_322$		$R32$	
Wavelength (Å)	1.0000	0.9795	0.9797	0.9803
Resolution (Å)	1.70(1.79-1.70)	2.30(2.42-2.50)	2.30(2.42-2.50)	2.30(2.42-2.50)
Number of Reflections				
Observed	266,163(17,767)	128,483(113,22)	141,293(20,517)	141,050(20,583)
Unique	41,139(3,901)	12,358(1,690)	12,509(1,805)	12,487(1,803)
Completeness (%)	91.3(61.0)	99.1(94.5)	100.0(100.0)	100.0(100.0)
Averaged redundancy	6.5(4.5)	10.4(6.7)	11.3(11.4)	11.3(11.4)
Averaged $I/\sigma(I)$	6.5(2.5)	8.2(4.6)	7.7(3.7)	7.8(3.6)
^a R_{merge}	0.08(0.31)	0.08(0.19)	0.09(0.22)	0.087(0.23)
^b R_{lambda}	-	0.028	0.031	-
Phasing				
^c Phasing power				
Iso	-	0.544	0.776	-
Ano	-	3.782	3.098	1.203
^d $R_{\text{cullis_iso}}$	-	0.71	0.61	-
^e Overall figure of merit	-		0.568	
Refinement				
Resolution (Å)	20-1.70	-	-	-
Total number of non-hydrogen atoms				
Protein	2271			
Others	273			
Solvent	266			
^f R -factor	0.1811			
^g R_{free} -Factor	0.2040			
Δ_{bonds} (Å)	0.008			
$\Delta_{\text{bond-angle}}$ (°)	1.417			
Averaged B-factor (Å ²)	18.58			
^h Ramachandran analysis (%)				
Most favored	90.2			
Additionally allowed	9.4			
generously allowed	0.4			

Values in the parentheses are for the highest resolution shell.

^a $R_{\text{meas}} = \sum_h [m/(m-1)]^{1/2} \sum_j |<I>_h - I_{h,j}| / \sum_h \sum_j I_{h,j}$, where $<I>_h$ is the mean intensities of symmetry-equivalent reflections and m is redundancy.

^b $R_{\text{lambda}} = \sum_j |F_{\lambda_j}| - |F_{\lambda_0}| / \sum_j |F_{\lambda_0}|$, where F_{λ_j} is the structure factor of the data collected at λ_j , and F_{λ_0} is the structure factor collected at 0.9803 Å.

^cPhasing power = $\langle |F_H(\text{calc})| \rangle / \langle \text{phase-integrated lack of closure} \rangle$.

^d $R_{\text{Cullis}} = \langle \text{phase-integrated lack of closure} \rangle / \langle |F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}| \rangle$.

^eFigure of merit after the initial phasing using the program SHARP

^f R -factor = $\sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{calc} are observed and calculated structure factor amplitudes.

^g R_{free} -factor was calculated for R -factor, using a random 10 % subset from all reflections.

^hRamachandran plot was calculated by PROCHECK.