

博士論文

微生物ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV の
構造生物学的研究

岩手医科大学

薬学研究科・医療薬学専攻・生命薬学コース

創薬基盤薬学分野

六本木 沙織

目次


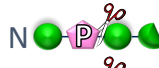

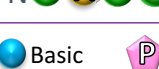
I	序論	1
I-1	ジペプチジルアミノペプチダーゼ	2
I-2	ジペプチジルアミノペプチダーゼの役割	3
I-3	ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV	4
I-4	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> WO24 由来 DAP IV	5
I-5	ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV の構造生物学	6
I-6	研究の意義と目的	8
II	実験方法	9
II-1	標的分子	10
II-2	PmDAP IV の発現と精製	10
II-3	結晶化	11
II-4	PmDAP IV の X 線回折強度データ測定とデータ処理	59
II-5	PmDAP IV の構造決定と精密化	61
III	PmDAP IV の立体構造	62
III-1	全体構造	63
III-2	触媒ドメイン	66
III-3	β プロペラドメイン	67
III-4	アポ体立体構造と複合体立体構造	71
III-5	基質との複合体立体構造	73
III-6	阻害剤との複合体立体構造	76
III-7	アシル中間体	79
IV	PmDAP IV の基質認識	81
IV-1	ダブル Glu モチーフ	82
IV-2	基質認識に関与する PmDAP IV の Arg106	82
IV-3	PmDAP IV における Arg106 の重要性	83
IV-4	PmDAP IV における基質認識・ジペプチド産生機構	84
IV-5	PmDAP IV 結晶構造で見られたアシル中間体	85
IV-6	PmDAP IV の基質特異性ポケット	86

V	基質の取り込みと生成物の排出	87
V-1	PmDAP IV による基質の取り込み	88
V-2	PmDAP IV からの生成物の排出	90
VI	微生物 DAP IV と哺乳類 DPP IV	91
VI-1	微生物 DAP IV と哺乳類 DPP IV	92
VI-2	ヒト由来ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV (ヒト DPP IV) の役割	92
VI-3	哺乳類 DPP IV の構造生物学的な研究背景	92
VI-4	PmDAP IV とヒト DPP IV の全体構造比較	93
VI-5	PmDAP IV とヒト DPP IV の活性部位	94
VI-6	基質ペプチド N 末端認識に関与する二次構造の比較	96
VI-7	PmDAP IV の Arg106 とヒト DPP IV の Arg125	97
VI-8	結晶構造で見る PmDAP IV とヒト DPP IV の反応中間体	98
VI-9	PmDAP IV とヒト DPP IV で異なる中間反応体の結晶構造が見られる理由	99
VII	まとめ	100
	引用文献	102

I 序論

I-1 ジペプチジルアミノペプチダーゼ

ペプチダーゼはペプチド結合の加水分解を触媒する酵素であり、自然界に広く存在し生物の様々な機能に関与する¹。ジペプチジルアミノペプチダーゼ (Dipeptidyl aminopeptidase; DPP もしくは DAP; EC 3.4.14) は、主に基質であるオリゴペプチドの N 末端から 2 番目のアミノ酸残基を認識し、ジペプチドを産生する酵素である。ジペプチジルアミノペプチダーゼは、ペプチダーゼデータベース MEROPS² により、Clan PA の S46 ファミリーと Clan SC の S9 ファミリーに分類されている。Clan PA S46 ファミリーには疎水性アミノ酸や塩基性アミノ酸を認識する DAP BII^{3,4,5} や DPP7、酸性アミノ酸を認識する DPP11 が属し、Clan SC S9 ファミリーにはプロリンを特異的に認識する Prolyl oligopeptidase (POP)⁶、アラニン、プロリンを認識する DPP IV^{7,8}、アルギニンを認識する DAP BI^{9,10}、疎水性アミノ酸残基を認識する DAP BIII³ などが属している。MEROPS において、Clan (族) は、類似した立体構造、触媒三残基の順序、触媒残基付近における共通の配列モチーフなどを参考にした進化起源により分類される。また、ファミリーはアミノ酸配列の相同性によって分類される。興味深いことに、Clan PA S46 ファミリーに属する DPP は微生物のみに存在する一方で、Clan SC S9 ファミリーに属する DPP は微生物や哺乳類などに幅広く存在することがわかっている¹¹。

	DAP BII DPP7	DPP11	DAP BI	DAP BIII	DPP IV	POP
Substrate specificity	N-A-P				N-P-P	
	N-E-P	N-D-P	N-R-P	N-E-P	DAP IV	
	N-L-P					
	N-I-P					
	N-R-P	N-E-P	-R-P	N-Y-P		
	N-K-P					
	N-Y-P					
	N-P-P					
Family	Clan PA S46		Clan SC S9			




図 1. DPP の基質特異性

I-2 ジペプチジルアミノペプチダーゼの役割

ジペプチジルアミノペプチダーゼの中で最もよく知られているのは、ヒトの DPP IV であろう。ヒト DPP IV は、血糖依存的にインスリン分泌を促進するグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1; glucagon-like peptide 1) やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP; glucose-dependent insulintropic polypeptide) といったインクレチンの活性を制御し^{12,13}、グルコース恒常性を保つ役割を担う。このことから、医療では 2 型糖尿病治療薬として選択的 DPP4 阻害剤が使われている^{14,15}。またヒト DPP IV は、CD26 と同一分子であることも明らかになっており、T 細胞の共刺激分子としての機能も併せ持つことが知られている。

一方、微生物 DPP は、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* や多剤耐性菌として知られる *Stenotrophomonas maltophilia* など、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌 (Non-Fermenting Gram-Negative Rods: NFGNR) に存在し、NFGNR の栄養源供給を担っている。DPP は主に NFGNR のペリプラズム内に存在し、ペリプラズム内においてオリゴペプチドからジペプチドを産生する。産生されたジペプチドは、POT (Proton-dependent oligopeptide transporter)¹⁶ により、アミノ酸単体よりも優先的に NFGNR のサイトプラズムに取り込まれる。これまでの研究で DPP 欠損株の生育は抑制されることがわかっていることから、DPP は NFGNR の生育に非常に重要な酵素であることが言える。

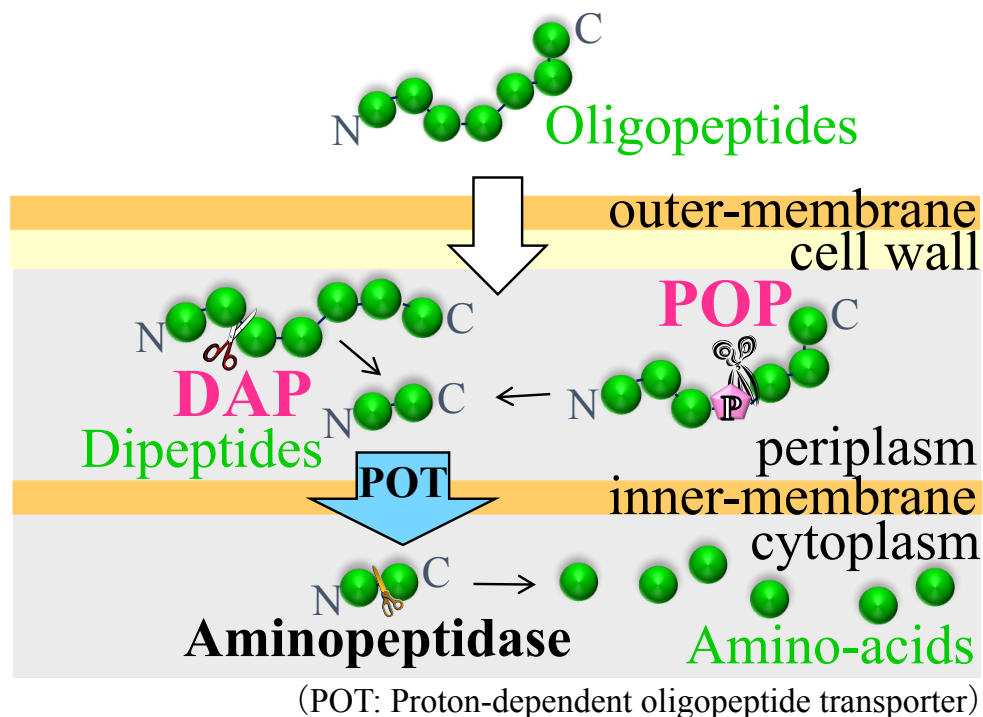


図 2. NFGNR のペプチド代謝経路

I-3 ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV

本研究で着目したのは、ジペプチジルアミノペプチダーゼの中でも、プロリンを特異的に認識してジペプチドを産生する「ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV」である。ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV はホモダイマーを形成するセリンペプチダーゼであり、1 分子は約 700 アミノ酸残基からなる。また、ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV は MEROPS において Clan SC S9 ファミリーに分類され、微生物^{17,18,19,20,7,21,22,8}、真菌^{23,24}、哺乳類^{25,26,27,28,29}などに幅広く存在することが知られている。(ここで、本論文において、微生物由来のジペプチジルアミノペプチダーゼ IV を DAP IV、哺乳類由来のジペプチジルアミノペプチダーゼ IV を DPP IV と区別して記載することとする。) 哺乳類 DPP IV は、基質ペプチドの N 末端から 2 番目のプロリンやアラニン（NH₂-P₂-P₁(Pro/Ala)-P₁'-P₂'...）を認識してジペプチドを産生する（NH₂-P₂-P₁(Pro/Ala)-P₁'-P₂'...）。その一方で、微生物 DAP IV はプロリンやアラニンに加えて、ヒドロキシプロリンをも認識する（NH₂-P₂-P₁(Pro/Hyp/Ala)-P₁'-P₂'...）という違いがある。

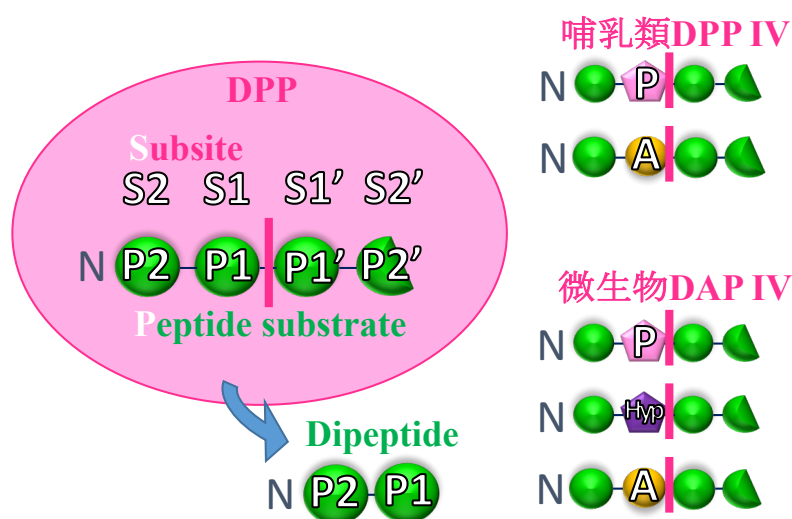


図 3. 哺乳類 DPP IV と微生物 DAP IV による基質 P1 認識

DAP IV は歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis*³⁰ や多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia*³¹ などの、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌 NFGNR に存在し、他のペプチダーゼと協同的に NFGNR への栄養源の供給を行っている³²。NFGNR の主な栄養源として、グリシン、プロリン、ヒドロキシプロリンの繰り返し構造をとるペプチド「コラーゲン (-(Gly-Pro-Hyp)n-)」が知られている。コラーゲンにはプロリンやヒドロキシプロリンが多く含まれることから、プロリンやヒドロキシプロリンを特異的に認識してジペプチドを産生する DAP IV は、NFGNR の栄養源供給に非常に重要な酵素であると言える。

I-4 *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DAP IV

本研究では、豆腐工場廃液の曝気槽から発見された糖非発酵グラム陰性細菌である *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来の DAP IV (PmDAP IV) を用いた。

PmDAP IV の触媒三残基は Ser613、Asp689、His721 である。PmDAP IV のアミノ酸配列を他の DPP4 のアミノ酸配列と比較すると、相同性は多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia* DAP IV とは 74.2%、歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis* DPP IV とは 25.5%、ヒト DPP IV とは 22.8%であった。

I-5 ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV の構造生物学

2型糖尿病治療薬として選択的 DPP IV 阻害剤が使われていることから、ヒト DPP IV の構造生物学的な研究がこれまでに数多くなされている。例えば、選択的 DPP IV 阻害剤である Saxagliptin は、構造が類似している Vildagliptin よりも 5 倍高い阻害がある^{33,34}。この理由は、まず Saxagliptin のシアノピロリジン部分にはシクロプロパン部分があり、このシクロプロパン部分が DPP IV の Tyr666 側鎖との疎水性相互作用をもつことが挙げられている。2つ目に、Saxagliptin の場合、アダマンチル基についているヒドロキシ基が DPP IV の Tyr547 側鎖と水素結合を形成していることが挙げられている。また両薬剤とも、シアノピロリジン環は DPP IV への選択的結合性に、ニトリル基は DPP IV の触媒残基 Ser630 と共有結合を形成することにより DPP IV 阻害の持続性に、アダマンチル基の立体的な嵩高さは DPP IV への結合安定化に寄与している。このように、標的分子とそのリガンドに関する構造生物学的な知見は、薬の標的分子に対する選択性や効果を考える上で非常に重要である。

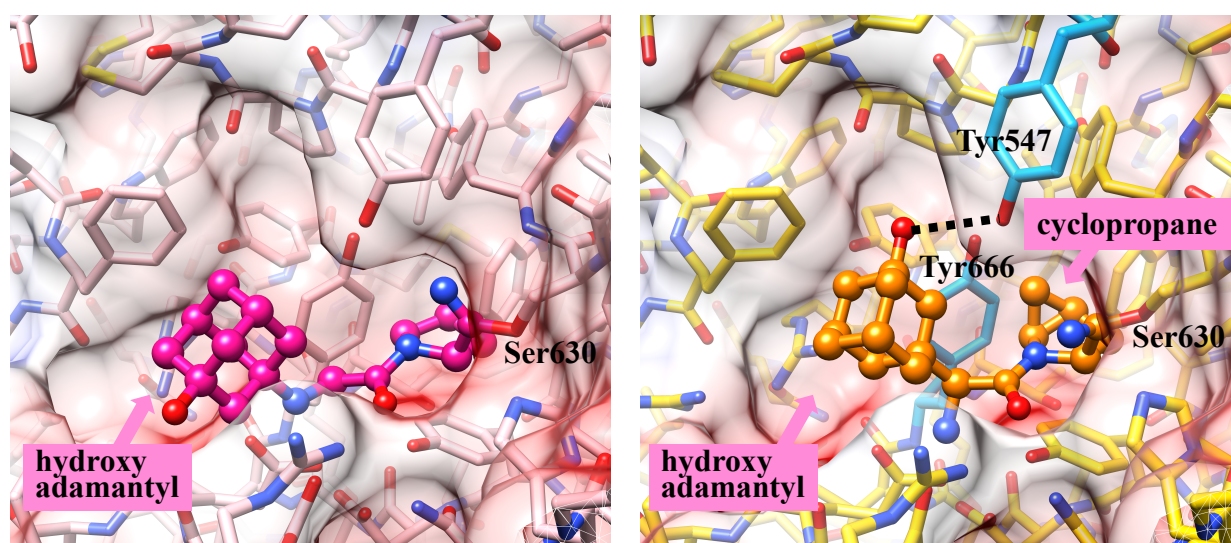


図4. ヒト DPP IV とヒト DPP IV 阻害薬の立体構造

左 : Vildagliptin 右 : Saxagliptin

さらにヒト DPP IV は、C 末端側の触媒ドメインに α/β 加水分解酵素フォールドという、 β シートが α ヘリックスに挟まれている構造を有し、N 末端側の β プロペラドメインには 8 枚の羽 (ブレード) が並ぶような特徴的な構造を有する^{35,36,37,38}。 β プロペラドメインのブレードの 4 つ目には短いヘリックスが存在し、そのヘリックス中のダブル Glu モチーフ (Glu205-Glu206)³⁹ が基質ペプチドの N 末端認識に関与していることがわかっている。また、 β プロペラドメインのブレード 2 に存在する Arg125 は基質ペプチドのカルボニル基の認識に関与していることがわかっている^{37,38} (各ドメイン、ダブル Glu モチーフ、基質認識に関与する Arg については第 III~V 章にて後述する)。P1 が結合するポケットは疎水性アミノ酸残基 Tyr547、Tyr662、Tyr666 から構成されており、大きな置換基が存在するためスペースは狭い。

一方、微生物 DAPIV に関しては、*S. maltophilia* 由来の DAPIV (SmDAPIV) のアポ体立体構造 (2.8Å 分解能、PDB ID: 2ECF)⁴⁰、*P. gingivalis* 由来の DAPIV (PgDPP IV) のアポ体立体構造 (2.2Å 分解能、PDB ID: 5OLJ)⁴¹ が明らかになっており、微生物 DAPIV と化合物との相互作用に関する知見は明らかになってはいない。SmDAPIV と PgDPP IV の立体構造を比較すると、PgDPP IV の全体構造や基質結合部位は、SmDAPIV よりもむしろ、ヒト DPP IV に似ていた。基質ペプチドのカルボニル基を認識するヒト DPP IV の Arg125 に関しても、PgDPP IV では Arg115 として立体構造上保存されていた。これらのことから、立体構造上、ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV は、ヒト DPP IV タイプと SmDAPIV タイプの 2 つのタイプに分類できることが考えられた。ここで、PgDPP IV はヒト DPP IV タイプに分類されることが考えられたため、*P. gingivalis* 由来のジペプチジルアミノペプチダーゼ IV を PgDAP IV ではなく PgDPP IV と記述することとした。

I-6 研究の意義と目的

これまで述べてきたように、DAPIV は、歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis* や多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia* などの、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌 NFGNR に存在し、ジペプチドを産生することで NFGNR の栄養源供給を担っている重要な酵素である。この微生物 DAPIV が NFGNR に栄養を供給するためにジペプチドを産生するメカニズムを明らかにするためには、微生物 DAPIV による基質認識機構や微生物 DAPIV とリガンドとの相互作用を理解する必要がある。

さらに、本研究により微生物 DAPIV の基質認識機構が明らかになれば、これまで数多くの研究により明らかになっているヒト DPP IV による基質認識機構との比較も可能である。

したがって本研究では、まず NFGNR 由来の DAPIV のアポ体立体構造と、NFGNR 由来の DAPIV とリガンドとの複合体の立体構造を決定することを目指した。さらに、そこから微生物 DAPIV による基質認識機構、微生物 DAPIV とリガンドとの相互作用、ヒト DPP IV との基質認識の違いについて考察した。

これらの立体構造情報は、微生物 DAPIV を新たな標的とした抗菌薬の開発に役立つ可能性がある。

II 実験方法

II-1 標的分子

本研究では、豆腐工場廃液の曝気槽から発見された糖非発酵グラム陰性細菌である *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来の DAP IV を用いて実験を行った。

II-2 PmDAP IV の発現と精製

長岡技大グループが、下記の手順にて PmDAP IV を大腸菌で発現、精製した。

まず、*P. mexicana* WO24 のゲノム DNA ライブラリから *P. mexicana* WO24 の DAP IV 遺伝子をクローニングした。ペリプラズム型の PmDAP IV は 723 アミノ酸残基からなっており、分子量は 79981.58、等電点は 5.80 である。発現プラスミドとしては pUC19 (Takara Bio) を、発現宿主としては *E. coli* JM109 (Takara Bio) を使用し、2x YT 培地で 37°C にて培養した。さらに、OD₆₀₀ が約 0.6 となった時点で IPTG (終濃度 0.1 mM) で誘導をかけた。誘導から 6 時間後に 8000 x g で遠心分離をし、集菌した。集菌した菌体を BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) により菌体破碎後、菌体破碎物を 27,000 x g で 30 分間遠心した。上清を 35 から 70% の濃度で硫酸沈殿させ、20-ml HiPrep 16/10 Butyl column (GE Healthcare) で粗精製した。その後、粗精製サンプルを 50-ml HiPrep 26/10 desalting column (GE Healthcare) にて脱塩した。最終的に、陰イオン交換カラム 1-ml Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare) にて精製し、PmDAP IV が含まれる画分を集め 80mM Tris-HCl pH8.5 の緩衝液にバッファー交換した。バッファー交換したサンプルを Vivaspin 20 concentrator (GE Healthcare) で濃縮した。タンパク質濃度はブラッドフォード法にて牛血清アルブミンをスタンダードとして測定した。カラムクロマトグラフィーは 25°C で、他の精製については 4°C で実施した。

II-3 結晶化

PmDAP IV の結晶化は、長岡技大グループが精製したサンプルを用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法、ゲル拡散法にて行った。精製後の結晶化用サンプルについては、SDS-PAGE を行い、PmDAP IV の推定分子量の泳動予想位置にシングルバンドを確認し夾雑物がないことを確認した（長岡技大グループ）。PmDAP IV の結晶化条件を検討するため、Initial sparse-matrix crystal screening⁴²を行った。Initial sparse-matrix crystal screening とは、目的タンパク質の結晶化条件が不明である場合、または既知の結晶化条件で生成した結晶が低品質である場合に、さまざまな種類や濃度の沈殿剤、バッファー、塩、添加剤を組み合わせた結晶化条件にて結晶化条件を検討する方法である。後述の結晶化スクリーニングでは、スクリーニングキット（Crystal Screen, Crystal Screen 2, Crystal Screen Cryo, PEG/Ion, PEG/Ion 2, Index (Hampton Research), Wizard I, II, III, Ozma 1K, 4K, 8K, 10K, Cryo I, II (Rigaku Reagents), PACT, JCSG+ Suites (Qiagen)）の中でも、PmDAP IV の結晶化条件の基礎となった条件を含むスクリーニングキット Crystal Screen 2 について記載した。

なお結晶化実験は、岩手医科大学 構造生物薬学講座、大阪大学 蛋白質研究所、及び ISS きぼう日本実験棟にて行った。

II-3-1 PmDAP IV-WT (アポ体) の結晶化条件の探索

結晶化スクリーニング

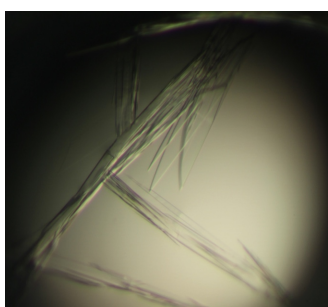
結晶化スクリーニングキットである Crystal Screen 2 (48 条件) を用いて、PmDAP IV の結晶化を行った。

PmDAP IV の結晶化条件	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	10
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	Crystal Screen 2 (1-48)
Volume of drop	1 μ L protein + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μ L)	200

Crystal Screen 2 の 48 条件のうち、下記の条件で結晶が生成した。

12% (w/v) PEG (Polyethylene glycol) 20000

0.1M MES (2-(N-Morpholino) ethane sulfonic acid) monohydrate pH6.5



結晶化条件の最適化

(1) の結晶化スクリーニングで得られた結晶化条件をもとに、PEG20000 の濃度を 7~17%(w/v)に設定し、PmDAP IV の結晶化条件の最適化を行った。

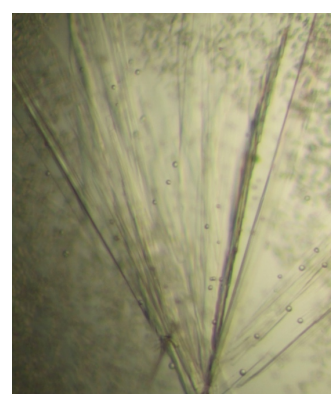
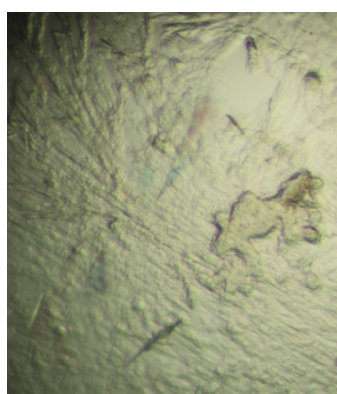
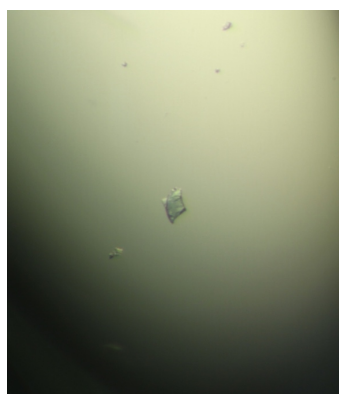
PmDAP IV の結晶化条件の最適化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	10
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	7, 9, 11, 13, 15, 17% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5
Volume of drop	1 μ L protein + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

最適化の結果を以下に示す。

PmDAP IV の結晶化条件最適化の結果

7% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5	13% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5	15% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5
--------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------



結晶であるかは不明。

脆くて細い結晶。

脆くて細い結晶。

X線回折強度データ測定を行う必要あり。

X線回折強度データ測定には不向き。

X線回折強度データ測定には不向き。

結晶は生成したものの、上記の3条件について、どれも再現性が悪い結果となった。

なお、9, 11, 17% (w/v) PEG 20000 の条件で結晶は生成しなかった。

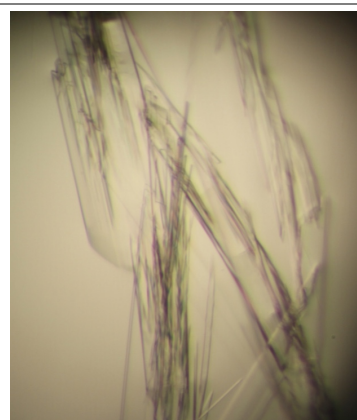
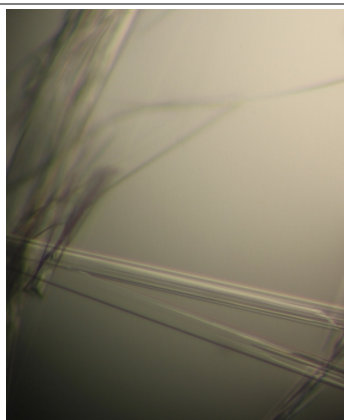
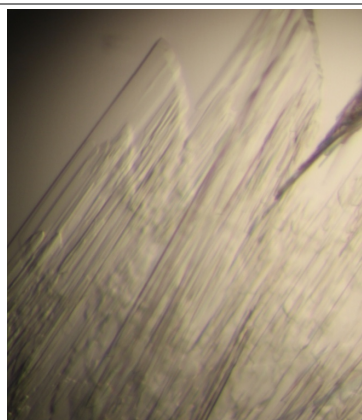
また、最適化実験のコントロール実験として、結晶化スクリーニングで得られた条件（12% (w/v) PEG 20000、0.1M MES pH6.5）でも同様に結晶化を行った。

結果を以下に示す。

PmDAP IV の結晶化条件最適化 コントロール実験の結果

12% (w/v) PEG 20000

0.1M MES pH6.5



X線回折強度データ測定 を行うことが可能。	X線回折強度データ測 定を行うことが可能。	X線回折強度データ測定 を行うことが可能。
--------------------------	--------------------------	--------------------------

再現性がよく、どの結晶もX線回折強度データ測定に適した結晶であった。

II-3-2 抗凍結剤を加えた結晶化条件での結晶化

*なぜ適切な抗凍結剤（クライオプロテクタント）が必要なのか

生成した結晶を用いて X 線回折強度データ測定を行うにあたり、結晶（結晶をすくったループ）を低温の窒素気流（約 95K）で冷却しながら測定を行う方法が現在の主流となっている。その理由は、結晶の冷却は、放射線照射で発生するラジカルによるタンパク質結晶の破壊を低減するためである。抗凍結剤の濃度や種類が適切でないと、冷気中で結晶または結晶の周りに存在する結晶化溶液中の水が結晶性の氷となる（結晶は白濁する）ため、タンパク質結晶のデータ測定が不可能となること、水の体積増加による結晶へのダメージにより分解能が上がらないこと、X線回折像にアイスリング（氷のパウダーディフラクション）が見られることがある。適切な抗凍結剤を用いることによりこれらを防ぐことができ、分解能の向上が期待できる。

結晶化溶液条件に抗凍結剤が含まれている場合、結晶を回折装置に直接マウントすることができる。その一方で、結晶化溶液条件に抗凍結剤が含まれていない場合、結晶を、抗凍結剤を加えた母液（生成した結晶の結晶化溶液）に浸漬してから回折装置にマウントする必要があり、ハンドリング（結晶をすくったり浸漬する操作）によっては結晶を傷めつけてしまう可能性が高まる。

前述した PmDAP IV の結晶化条件には抗凍結剤が含まれていない。抗凍結剤入り母液への浸漬による結晶損傷を防ぐ目的で、抗凍結剤を加えた条件で結晶が生成するかを確認した。適切な抗凍結剤の種類や濃度はタンパク質の種類によって異なるが、今回は代表的な抗凍結剤である Glycerol を用いた。前述で X 線回折強度データ測定に最も適する条件と判断した 12% (w/v) PEG 20000、0.1M MES pH6.5 の結晶化溶液に、Glycerol を加え 20% (v/v) Glycerol 溶液とした。

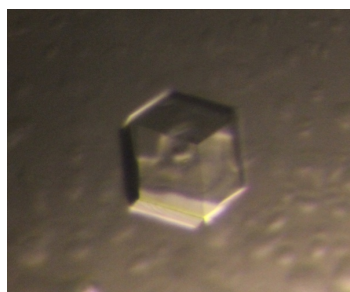
PmDAP IV の結晶化（抗凍結剤入り）	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	10
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	9.6% (w/v) PEG 20000
	0.08M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV の結晶化（抗凍結剤入り）の結果

9.6% (w/v) PEG 20000

0.08M MES pH6.5

20% (v/v) Glycerol



X線回折強度データ測定を行うことが可能。

再現性がよく、X線回折強度データ測定に適した結晶であった。

II-3-3 PmDAP IV-WT (複合体) の結晶化

PmDAP IV の基質認識様式を明らかにするため、PmDAP IV (アポ体) の結晶化条件をもとに、PmDAP IV とリガンドとの複合体の共結晶化を行った。

PmDAP IV は基質ペプチドの N 末端から 2 番目の Pro や Hyp を認識することがわかっていることから、PmDAP IV のペプチド系のリガンドとして、N 末端から 2 番目に Pro や Hyp がくるものを選択した。

(Gly-Pro, Gly-Pro-pNA, Lys-Pro-Tyr, Lys-Pro-4MbNA, Diprotin A (Ile-Pro-Ile), Gly-Hyp, Pro-Hyp, Diprotin B (Val-Pro-Leu), Val-Hyp-Leu)

また、ヒト DPP4 を阻害する化合物は微生物 DPP4 にも結合する可能性があると考え、ヒト DPP4 阻害化合物を PmDAP IV のリガンドとして選択した。

(Inhibitor 1c, KR62436, Berberine, K579, Lisinopril, Pefabloc SC, DFP)

以下に PmDAP IV とペプチド系リガンドとの共結晶化の条件、結果を示す。

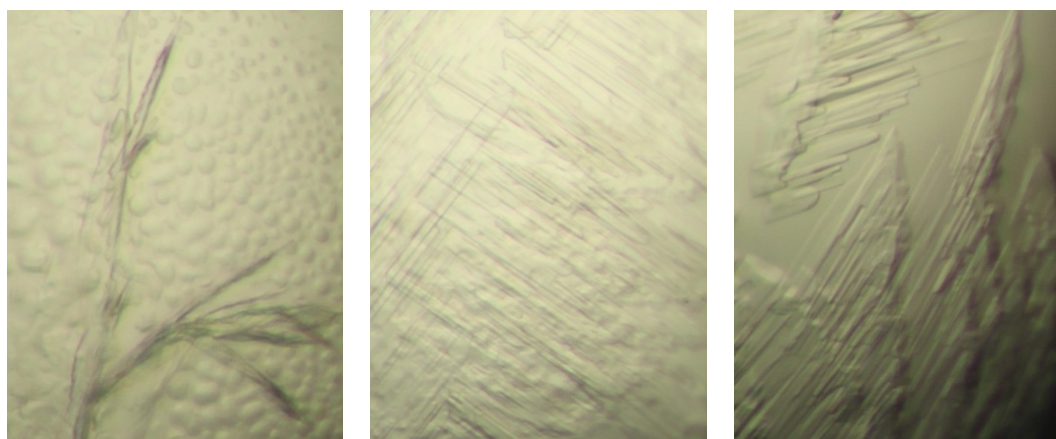
PmDAP IV と Gly-Pro の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	10
Ligand concentration (mM)	20
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
	12% (w/v) PEG 20000, 0.1M MES pH6.5
Reservoir	----- 9.6% (w/v) PEG 20000, 0.08M MES pH6.5, 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (10mg/mL PmDAP IV) + 1 μ L reservoir (20mM Gly-Pro)
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Gly-Pro の共結晶化の結果

Reservoir

12% (w/v) PEG 20000

0.1M MES pH6.5



板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Gly-Pro-pNA · ToS の共結晶化

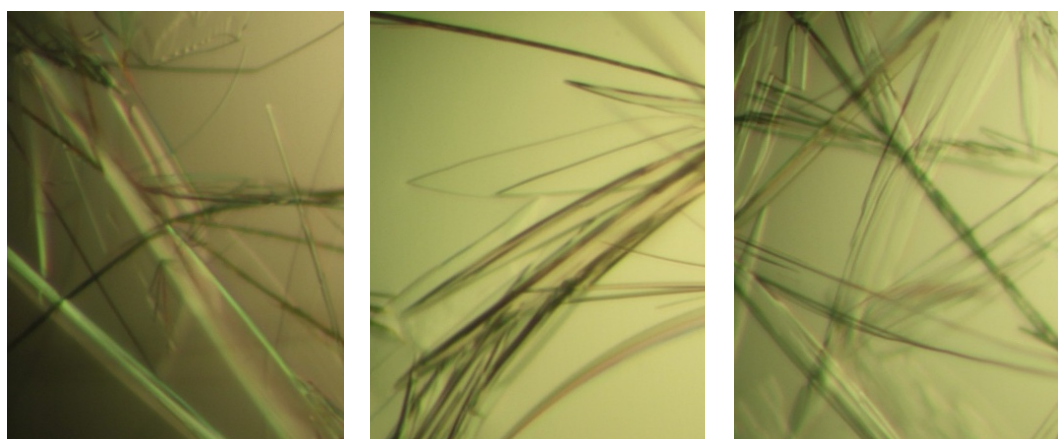
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	10
Ligand concentration (mM)	20
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
	12% (w/v) PEG 20000, 0.1M MES pH6.5
Reservoir	----- 9.6% (w/v) PEG 20000, 0.08M MES pH6.5, 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (10mg/mL PmDAP IV) + 1 μ L reservoir (20mM Gly-Pro-pNA · ToS)
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Gly-Pro-pNA · ToS の共結晶化の結果

Reservoir

12% (w/v) PEG 20000

0.1M MES pH6.5

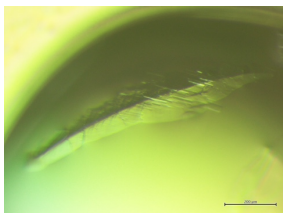
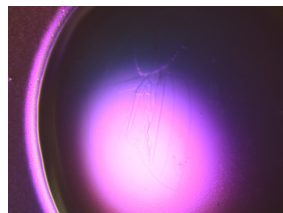


板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Lys-Pro-Tyr の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5, 4.75, 9
Ligand concentration (mM)	5 (4.5, 4.75mg/mL PmDAP IV のとき) 4 (9mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol

	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	15% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5
	1μL protein (9mg/mL PmDAP IV, 4mM Lys-Pro-Tyr または 4.5, 4.75mg/mL PmDAP IV, 5mM Lys-Pro-Tyr) + 1μL reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Lys-Pro-Tyr の共結晶化の結果

Protein concentration	9mg/mL	4.5mg/mL	4.75mg/mL
Ligand concentration	4mM		5mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol		15% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5
	写真なし		
Crystal			

板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Lys-Pro-4MbNA の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration (mM)	4
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, 4mM Lys-Pro-4MbNA) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Lys-Pro-4MbNA の共結晶化の結果

Reservoir

12% (w/v) PEG 20000

0.08M MES pH6.5

20% (v/v) Glycerol

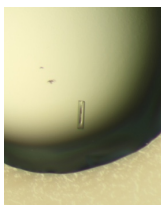
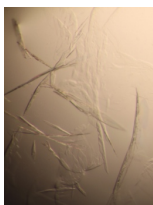
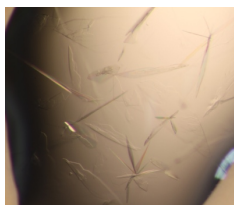
写真なし

板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Diprotin A (Ile-Pro-Ile)の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24, 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	8.2, 9, 9.6
Ligand concentration (mM)	5.5 (8.2mg/mL PmDAP IV のとき) 4 (9mg/mL PmDAP IV のとき) 1.5 (9.6mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 ----- 7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 8, 8.8, 9.6, 10.4, 11.2, 12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9 mg/mL PmDAP IV, 4mM Diprotin A または 8.2mg/mL PmDAP IV, 5.5mM Diprotin A) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500 (24-well), 200 (48-well)

PmDAP IV と Diprotin A (Ile-Pro-Ile)の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	8.2mg/mL / 5.5mM	9.6mg/mL / 1.5mM	9mg/mL / 4mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	11% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Crystal			

写真なし

板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

11~12% (w/v) PEG20000 が最適な条件であった。

なお、7.0~10.4% (w/v) PEG 20000 の条件で結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と Gly-Hyp の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration	Sat. Gly-Hyp
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, Sat. Gly-Hyp) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

* Saturated Gly-Hyp: 100%飽和 Gly-Hyp と 10mg/mL PmDAP IV を 1:9 の割合で混合し、タンパク質溶液とした。

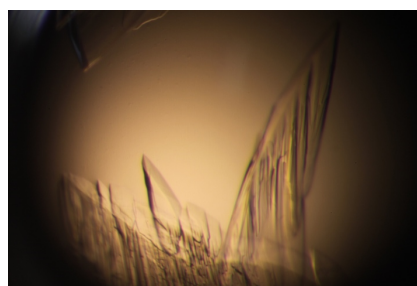
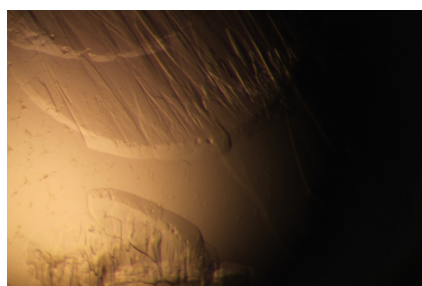
PmDAP IV と Gly-Hyp の共結晶化の結果

Reservoir

12% (w/v) PEG 20000

0.08M MES pH6.5

20% (v/v) Glycerol



板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Pro-Hyp の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration (mM)	4
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000
	0.08M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, 4mM Pro-Hyp) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

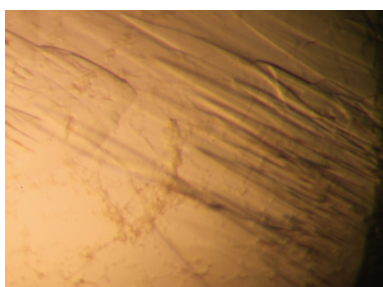
PmDAP IV と Pro-Hyp の共結晶化の結果

Reservoir

12% (w/v) PEG 20000

0.08M MES pH6.5

20% (v/v) Glycerol



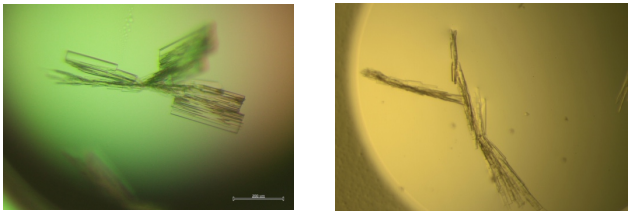
板状の結晶が生成。

X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Diprotin B (Val-Pro-Leu)の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5, 4.75, 5
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 15% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5 または 4.75mg/mL PmDAP IV, 5mM Val-Pro-Leu) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV) + 0.65 μ L reservoir (5mM Val-Pro-Leu)
Volume of reservoir (μL)	200

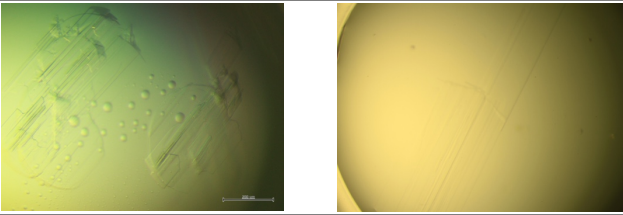
PmDAP IV と Diprotin B (Val-Pro-Leu)の共結晶化の結果

Protein concentration	4.5mg/mL	4.75mg/mL
Ligand concentration	5mM	
Reservoir	15% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5	
Crystal		
	板状の結晶が生成。 X線回折強度データ測定を行うことが可能。	

PmDAP IV と Val-Hyp-Leu の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5, 4.75
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 15% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5 または 4.75mg/mL PmDAP IV, 5mM Val-Hyp-Leu) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Val-Hyp-Leu の共結晶化の結果

Protein concentration	4.5mg/mL	4.75mg/mL
Ligand concentration	5mM	
Reservoir	15% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5	
Crystal		
	板状の結晶が生成。 X線回折強度データ測定を行うことが可能。	

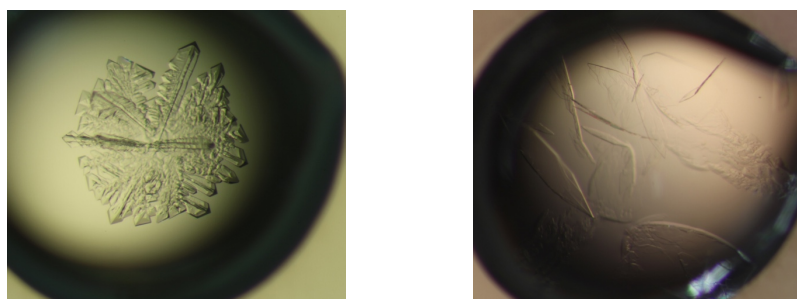
以下に PmDAP IV とヒト DPP4 阻害化合物との共結晶化の条件、結果を示す。

PmDAP IV と Inhibitor 1c の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24, 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	8.2, 9.6
Ligand concentration (mM)	5.5 (8.2mg/mL PmDAP IV のとき) 1.5 (9.6mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 ----- 7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 8, 8.8, 9.6, 10.4, 11.2, 12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (8.2mg/mL PmDAP IV, 5.5mM Inhibitor 1c または 9.6mg/mL PmDAP IV, 1.5mM Inhibitor 1c) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500 (24-well), 200 (48-well)

PmDAP IV と Inhibitor 1c の共結晶化の結果

Protein/Ligand concentration	8.2mg/mL / 5.5mM	9.6mg/mL / 1.5mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	

Crystal



板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。


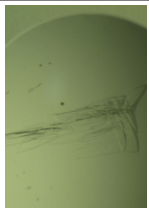
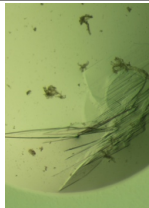
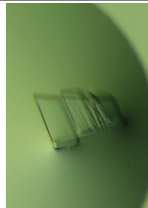
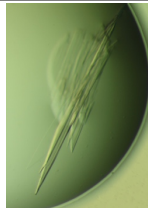
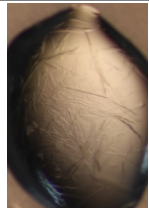
12% (w/v)PEG20000 が最適な条件であった。

なお、7.0~10.4% (w/v) PEG 20000 の条件で結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と KR62436 の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24, 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	8.2, 9.5
Ligand concentration (mM)	5.5 (8.2mg/mL PmDAP IV のとき) 1.5 (9.5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5 7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 ----- 7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol -----
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 23, 27, 30, 33, 37, 40% (v/v) Glycerol ----- 8, 8.8, 9.6, 10.4, 11.2, 12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol -----
Volume of drop	1 μ L protein (8.2mg/mL PmDAP IV, 5.5mM KR62436 または 9.5mg/mL PmDAP IV, 1.5mM KR62436) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500 (24-well), 200 (48-well)

PmDAP IV と KR62436 の共結晶化の結果

Protein/Ligand concentration	8.2mg/mL / 5.5mM		9.5mg/mL / 1.5mM			
		12% (w/v) PEG 20000	7% (w/v) PEG 20000	9% (w/v) PEG 20000	10% (w/v) PEG 20000	11% (w/v) PEG 20000
Reservoir	0.1M MES pH6.5	0.1M MES pH6.5	0.1M MES pH6.5	0.1M MES pH6.5	0.1M MES pH6.5	0.05M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol	23% (v/v) Glycerol
Crystal						

板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Berberine の共結晶化

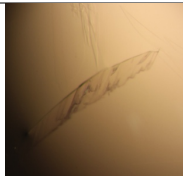
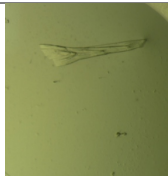
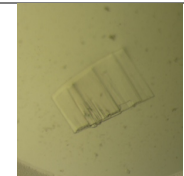
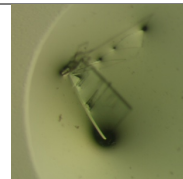
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24, 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9.2
Ligand concentration (mM)	1.5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
	7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5

	7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol

Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 23, 27, 30, 33, 37, 40% (v/v) Glycerol

	8, 8.8, 9.6, 10.4, 11.2, 12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9.2mg/mL PmDAP IV, 1.5mM Berberine) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500 (24-well), 200 (48-well)

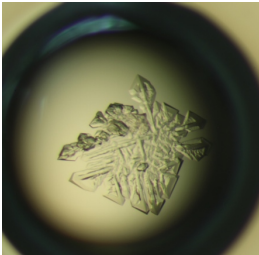
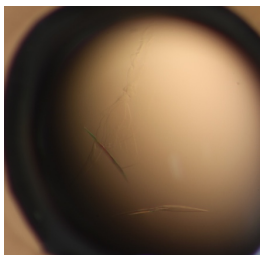
PmDAP IV と Berberine の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	9.2mg/mL / 1.5mM			
	12% (w/v) PEG 20000	7% (w/v) PEG 20000	11% (w/v) PEG 20000	12% (w/v) PEG 20000
Reservoir	0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	0.1M MES pH6.5	0.1M MES pH6.5	0.1M MES pH6.5
Crystal				

板状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と K579 の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24, 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	8.2, 9.6
Ligand concentration (mM)	5.5 (8.2mg/mL PmDAP IV のとき) 1.5 (9.6mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5
	7, 8, 9, 10, 11, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
	8, 8.8, 9.6, 10.4, 11.2, 12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (8.2mg/mL PmDAP IV, 5.5mM K579 または 9.6mg/mL PmDAP IV, 1.5mM K579) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μ L)	500 (24-well), 200 (48-well)

PmDAP IV と K579 の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	8.2mg/mL / 5.5mM	9.6mg/mL / 1.5mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	12% (w/v) PEG 20000 0.08M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Crystal		

板状の結晶が生成。

X線回折強度データ測定を行うことが可能。

12% (w/v) PEG20000 が最適な条件であった。

なお、7.0~10.4% (w/v) PEG 20000 の条件で結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と Lisinopril の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration (mM)	1
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, 1mM Lisinopril) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500

PmDAP IV と K579 の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と Pefabloc SC の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	8.2
Ligand concentration (mM)	5.5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (8.2mg/mL PmDAP IV, 5.5mM Pefabloc SC) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500

PmDAP IV と Pefabloc SC の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と DFP の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	8.2
Ligand concentration (mM)	5.5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (8.2mg/mL PmDAP IV, 5.5mM DFP) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500

PmDAP IV と DFP の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と NVP DPP 728 の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration (mM)	3
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, 3mM NVP DPP 728) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500

PmDAP IV と NVP DPP 728 の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と Inhibitor III の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration (mM)	3
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, 3mM Inhibitor III) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500

PmDAP IV と Inhibitor III の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

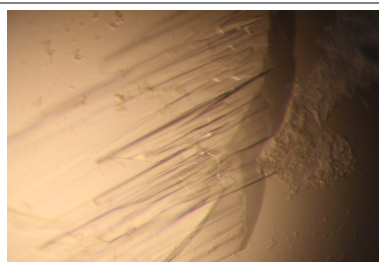
PmDAP IV と Z-HYP の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 24-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	9
Ligand concentration (mM)	4 (10% DMSO)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (9mg/mL PmDAP IV, 4mM Z-HYP) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	500

PmDAP IV と Z-HYP の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	9mg/mL / 4mM (10% DMSO)
--	-------------------------

Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
------------------	---

Crystal



板状の結晶が生成。

X線回折強度データ測定を行うことが可能。

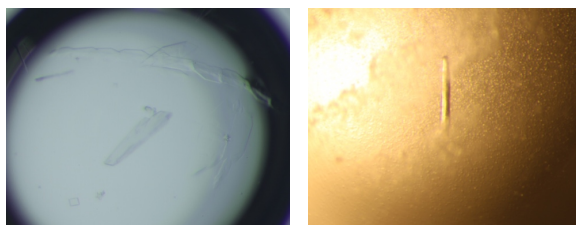
以下に PmDAP IV とヒト DPP4 阻害剤との共結晶化の条件、結果を示す。

PmDAP IV と Vildagliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5
Ligand concentration (mM)	9.56
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 9.56mM Vildagliptin) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Vildagliptin の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	4.5mg/mL / 9.56mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol

Crystal



板状、棒状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Saxagliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5
Ligand concentration (mM)	8.56
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Reservoir	-----
	19% (w/v) PEG 8000
	0.18M Magnesium Formate
	0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 8.56mM Saxagliptin) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Saxagliptin の共結晶化の結果

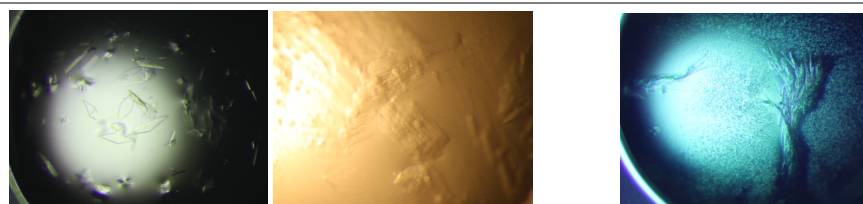
結晶は生成しなかった。

PmDAP IV と Linagliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5 5
Ligand concentration (mM)	2 (4.5mg/mL PmDAP IV のとき) 5 (5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 2mM Linagliptin) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV) + 0.65 μ L reservoir (5mM Linagliptin)
Volume of reservoir (μ L)	200

PmDAP IV と Linagliptin の共結晶化の結果

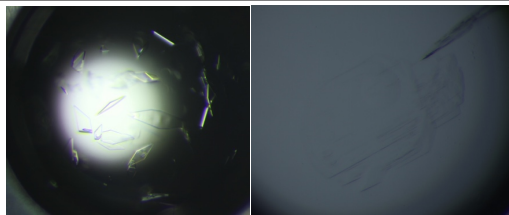
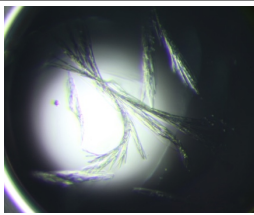
Protein/ Ligand concentration	4.5mg/mL / 2mM	
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5

Crystal



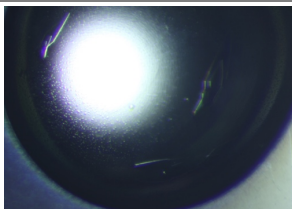
板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

繊維状の結晶が生成。X線回折強度データ測定には不向き。

PmDAP IV と Trelagliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5 5
Ligand concentration (mM)	2 (4.5mg/mL PmDAP IV のとき) 5 (5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1μL protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 2mM Trelagliptin) + 1μL reservoir または 0.65μL protein (5mg/mL PmDAP IV) + 0.65μL reservoir (5mM Trelagliptin)
Volume of reservoir (μL)	200
PmDAP IV と Trelagliptin の共結晶化の結果	
Protein/ Ligand concentration	4.5mg/mL / 2mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Crystal	 
	<p>板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。</p> <p>繊維状の結晶が生成。X線回折強度データ測定には不向き。</p>

PmDAP IV と Sitagliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
	4.5
Protein concentration (mg/mL)	4.68
	5
Ligand concentration (mM)	2 (4.5mg/mL PmDAP IV のとき) 15 (6.4% DMSO)(4.68mg/mL PmDAP IV のとき) 5 (5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 2mM Sitagliptin または 4.68mg/mL PmDAP IV, 15mM Sitagliptin) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV) + 0.65 μ L reservoir (5mM Sitagliptin)
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Sitagliptin の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	4.5mg/mL / 2mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Crystal	

板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Teneligliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
	4.5
Protein concentration (mg/mL)	4.69
	5
Ligand concentration (mM)	2 (4.5mg/mL PmDAP IV のとき) 7 (6.1% DMSO) (4.69mg/mL PmDAP IV のとき) 5 (5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 2mM Teneligliptin または 4.69mg/mL PmDAP IV, 7mM Teneligliptin) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV) + 0.65 μ L reservoir (5mM Teneligliptin)
Volume of reservoir (μ L)	200

PmDAP IV と Teneligliptin の共結晶化の結果

Protein/Ligand concentration	4.69mg/mL / 7mM (6.1% DMSO)
------------------------------	-----------------------------

Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
-----------	---

Crystal	 
---------	--

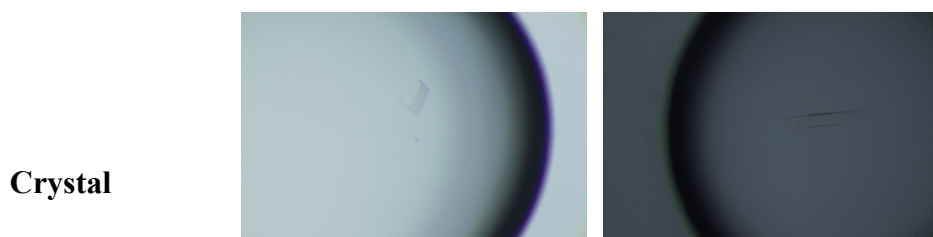
板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

粒状の結晶が生成。X線回折強度データ測定には不向き。

PmDAP IV と Anagliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	3.31 4.5
Ligand concentration (mM)	15 (3.31mg/mL PmDAP IV のとき) 4.43 (4.5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol ----- 19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (3.31mg/mL PmDAP IV, 15mM Anagliptin または 4.5mg/mL PmDAP IV, 4.43mM Anagliptin) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV と Anagliptin の共結晶化の結果

Protein/ Ligand concentration	4.5mg/mL / 4.43mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol



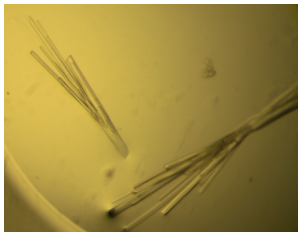
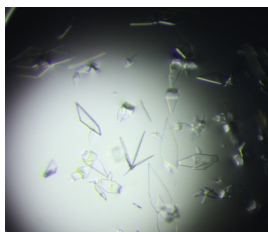
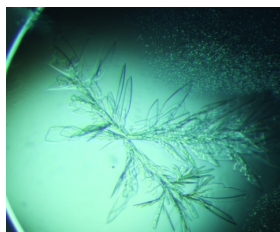
板状の結晶が生成。

X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV と Omarigliptin の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5
	4.69
Ligand concentration (mM)	5
	2 (4.5mg/mL PmDAP IV のとき)
	7 (6.3% DMSO) (4.69mg/mL PmDAP IV のとき) 5 (5mg/mL PmDAP IV のとき)
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Reservoir	-----
	19% (w/v) PEG 8000
	0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV, 2mM Omarigliptin または 4.69mg/mL PmDAP IV, 7mM Omarigliptin) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV) + 0.65 μ L reservoir (5mM Omarigliptin)
Volume of reservoir (μ L)	200

PmDAP IV と Omarigliptin の共結晶化の結果

Protein/Ligand concentration	4.69mg/mL / 7mM (6.3% DMSO)	4.5mg/mL / 2mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	19% (w/v) PEG 8000 0.18M Magnesium Formate 0.08M Tris/HCl pH8.5

Crystal			
---------	---	--	---

棒状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV 変異体の結晶化

* PmDAP IV-HDS

PmDAP IV の基質の挿入機構を明らかにするため、触媒三残基 (His721, Asp689, Ser613) を Ala に置換した変異体 PmDAP IV と基質との共結晶化を行った。

* PmDAP IV-R106A

* PmDAP IV-R106K

基質ペプチドの N 末端認識や基質結合時の立体構造変化に関与する Arg106 による基質認識を明らかにするため、Arg106 を Ala と Lys に置換した変異体 PmDAP IV と基質との共結晶化を行った。


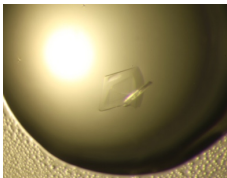
* PmDAP IV-Q581L/N614Y

基質ペプチドの Hyp 認識についての知見を得るため、基質ペプチドの Hyp 認識に関与する Gln581 と Asn614 を、立体構造上、等価な位置に存在するヒト DPP4 の Leu と Tyr に置換した変異体 PmDAP IV と基質との共結晶化を行った。

PmDAP IV-HDS の結晶化

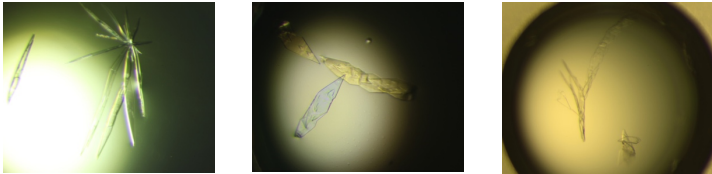
PmDAP IV-HDS と Diprotin A (Ile-Pro-Ile) の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.2
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
	20% (w/v) PEG 6000 0.1M HEPES pH7.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.2mg/mL PmDAP IV-HDS, 5mM Diprotin A) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μ L)	200

PmDAP IV-HDS と Diprotin A (Ile-Pro-Ile) の共結晶化の結果

Protein concentration	4.2mg/mL	
Ligand concentration	5mM	
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	20% (w/v) PEG 6000 0.1M HEPES pH7.5
		
Crystal	板状の結晶が生成。 X線回折強度データ測定を行うことが可能。	繊維状の結晶が生成。 X線回折強度データ測定には不向き。

PmDAP IV-HDS と Diprotin B (Val-Pro-Leu) の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.75, 5
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.75mg/mL PmDAP IV-HDS, 5mM Diprotin B) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV-HDS) + 0.65 μ L reservoir (5mM Diprotin B)
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-HDS と Diprotin B (Val-Pro-Leu) の共結晶化の結果

Protein concentration	4.75mg/mL	5mg/mL
Ligand concentration	5mM	
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	
Crystal		

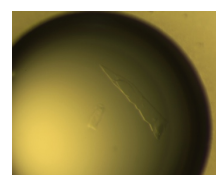
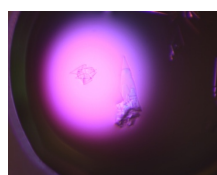
板状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV-HDS と Val-Hyp-Leu の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.75, 5
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.75mg/mL PmDAP IV-HDS, 5mM Val-Hyp-Leu) + 1 μ L reservoir または 0.65 μ L protein (5mg/mL PmDAP IV-HDS) + 0.65 μ L reservoir (5mM Val-Hyp-Leu)
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-HDS と Val-Hyp-Leu の共結晶化の結果

Protein concentration	4.75mg/mL	5mg/mL
Ligand concentration	5mM	
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	

Crystal



板状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

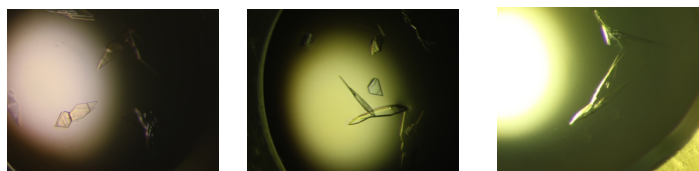
PmDAP IV-HDS と Lys-Pro-Tyr の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.75
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.75mg/mL PmDAP IV-HDS, 5mM Lys-Pro-Tyr) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-HDS と Lys-Pro-Tyr の共結晶化の結果

Protein concentration	4.75mg/mL
Ligand concentration	5mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol

Crystal



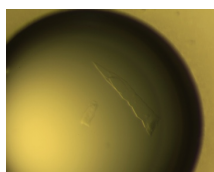
板状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV-HDS と Lys-Pro-4MbNA の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	5
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.75mg/mL PmDAP IV-HDS) + 1 μ L reservoir (5mM Lys-Pro-4MbNA)
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-HDS と Lys-Pro-4MbNA の共結晶化の結果

Protein concentration	5mg/mL
Ligand concentration	5mM
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol

Crystal


板状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

PmDAP IV-HDS と Gly-Hyp の共結晶化

Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.2
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.2mg/mL PmDAP IV-HDS, 5mM Gly-Hyp) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-HDS と Gly-Hyp の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

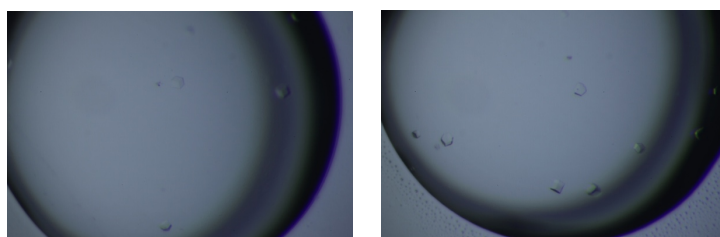
PmDAP IV-R106A、PmDAP IV-R106K の結晶化

PmDAP IV-R106A, PmDAP IV-R106K とヒト DPP4 阻害剤の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5
Ligand concentration (mM)	9.56mM Vildagliptin 8.56mM Saxagliptin 2mM Linagliptin 2mM Trelagliptin 2mM Sitagliptin 2mM Teneligliptin 4.43mM Anagliptin 2mM Omarigliptin
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV-R106A または 4.5mg/mL PmDAP IV-R106K, 各 Ligand) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-R106A とヒト DPP4 阻害剤の共結晶化の結果

Protein concentration	4.5mg/mL	
Ligand concentration	9.56mM Vildagliptin	2mM Trelagliptin
Reservoir	10% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	

Crystal



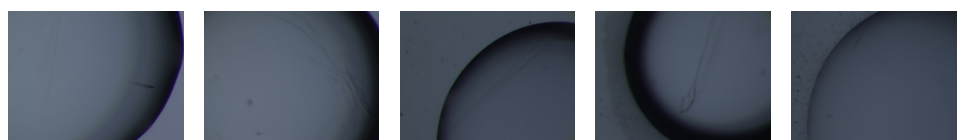
立方体状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

10% (w/v) PEG 20000 で結晶が生成した。なお、Saxagliptin、Linagliptin、Sitagliptin、Teneligliptin、Anagliptin、Omarigliptin の結晶は生成しなかった。

PmDAP IV-R106K とヒト DPP4 阻害剤の共結晶化の結果

Protein concentration	4.5mg/mL				
Ligand concentration	2mM Linagliptin	2mM Trelagliptin	2mM Teneligliptin	4.43mM Anagliptin	2mM Omarigliptin
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol				

Crystal



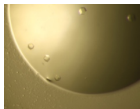

板状の結晶が生成。
X線回折強度データ測定を行うことが可能。

12% (w/v) PEG 20000 で結晶が生成した。



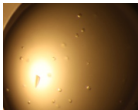


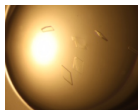
なお、Vildagliptin、Saxagliptin、Sitagliptin の結晶は生成しなかった。

PmDAP IV-R106A, PmDAP IV-R106K とペプチドの共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.5
Ligand concentration (mM)	3mM GYPQ 3mM GYPN 3mM GYP 3mM VYPQ 3mM VYPN 3mM VYP 3mM GYPTQV 3mM CDPGYIGSR
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	8, 10, 12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
Volume of drop	1 μ L protein (4.5mg/mL PmDAP IV-R106A または 4.5mg/mL PmDAP IV-R106K, 各 3mM Ligand) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200


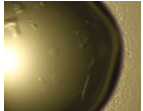
PmDAP IV-R106A とペプチドの共結晶化の結果 (1)

Protein concentration	4.5mg/mL	
Ligand concentration	3mM GYP	3mM VYPN
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	
Crystal		
	立方体状の結晶が生成。 X線回折強度データ測定を行うことが可能。	

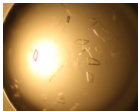
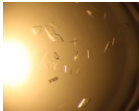

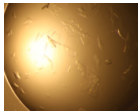


PmDAP IV-R106A とペプチドの共結晶化の結果 (2)

Protein concentration	4.5mg/mL					
Ligand concentration	3mM GYPQ	3mM GYPN	3mM VYPQ	3mM VYP	3mM GYPTQ V	3mM CDPGYI GSR
Reservoir	10% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol					
Crystal						
	板状、立方体状の結晶が生成。 X線回折強度データ測定を行うことが可能。					

PmDAP IV-R106K とペプチドの共結晶化の結果 (1)

Protein concentration	4.5mg/mL			
Ligand concentration	3mM GYPN	3mM GYP	3mM GYPN	3mM GYP
Reservoir	10% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol		12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol	
Crystal				
	薄い板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。		板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。	

PmDAP IV-R106K とペプチドの共結晶化の結果 (2)

Protein concentration	4.5mg/mL					
Ligand concentration	3mM GYPQ	3mM VYPQ	3mM VYPN	3mM VYP	3mM GYPTQ V	3mM CDPGYI GSR
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol					
Crystal	     					
	板状の結晶が生成。X線回折強度データ測定を行うことが可能。					

PmDAP IV-Q581L/N614Y

PmDAP IV-Q581L/N614Y と Gly-Pro の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.2
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000
	0.1M MES pH6.5
	20% (v/v) Glycerol
Reservoir	-----
	20% (w/v) PEG 6000 0.1M HEPES pH7.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.2mg/mL PmDAP IV-Q581L/N614Y, 5mM Gly-Pro) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-Q581L/N614Y と Gly-Pro の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

PmDAP IV-Q581L/N614Y と Gly-Hyp の共結晶化	
Method	Hanging-drop vapour diffusion
Plate type	Hampton Research 48-well plates
Temperature (K)	293
Protein concentration (mg/mL)	4.2
Ligand concentration (mM)	5
Buffer composition of protein solution	80mM Tris/HCl pH8.5
Reservoir	12% (w/v) PEG 20000 0.1M MES pH6.5 20% (v/v) Glycerol
	----- 20% (w/v) PEG 6000 0.1M HEPES pH7.5
Volume of drop	1 μ L protein (4.2mg/mL PmDAP IV-Q581L/N614Y, 5mM Gly-Hyp) + 1 μ L reservoir
Volume of reservoir (μL)	200

PmDAP IV-Q581L/N614Y と Gly-Hyp の共結晶化の結果

結晶は生成しなかった。

II-3 PmDAP IV の X 線回折強度データ測定とデータ処理

主に 20% Glycerol を含む結晶化条件にて結晶化を行ったため、X 線回折強度データの収集では、結晶をクライオプロテクタントに浸漬せずにそのまま凍結し測定を行った。結晶化条件にクライオプロテクタントとなる成分が入っていなかった場合は、結晶を 20% Glycerol を含む結晶化溶液中に数秒間浸漬させた後、凍結し測定を行った。結晶はナイロンループに直接マウントし、データ測定前に 100K の窒素ガス気流にてフラッシュクーリングを行った。X 線回折強度データは、ADSC 社の CCD 検出器を用いて 100K にて結晶を回しながら収集した。測定は、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所の Photon Factory PF-BL1A、PF-BL17A、PF-AR NW12A、PF-AR NE3A、理化学研究所 播磨事業所 SPring-8 BL44XU（大阪大学蛋白質研究所ビームライン）、BL41XU で行った。結晶の質は、生成結晶に X 線を当てて得られたスナップショットから分解能、Mosaicity、結晶の重なりがないかなどを基準に判断した。約 3Å 以上の回折能を有する結晶については、連続データ測定（必要な角度分、結晶を回しながら X 線を当て、連続した X 線回折強度データを得る）を行った。ラウエ群と格子定数のパラメータは、*xia2*⁴³ および *XDS*⁴⁴ を用いて決定した。PmDAP IV の主要なデータの収集条件および統計値を（表 1）に示した。

表 1. PmDAP IV の主要なデータ収集条件および統計値

Data set	Free	Inhibitor-1c	Ile-Pro	Lys-Pro
Facility Beamline	Photon Factory BL17A	Photon Factory BL1A	Photon Factory BL17A	Photon Factory BL17A
Wavelength (Å)	0.9800	1.1000	0.9788	0.9800
Detector	ADSC Q315	PILATUS-2M	ADSC Q270	ADSC Q270
Crystal-to-detector distance (mm)	395.3	242.2	368.3	250.1
Rotation angle per image (°)	0.50	0.30	0.15	0.15
Total rotation range (°)	190.0	160.2	190.05	200.1
Exposure time per image (sec)	5.00	2.50	0.75	1.00
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P1$
Cell dimensions				
a (Å)	149.73	59.88	119.88	88.66
b (Å)	326.19	120.22	120.12	104.49
c (Å)	71.00	231.89	262.53	112.84
α (°)	90	90	90	67.42
β (°)	90	90	90	68.83
γ (°)	90	90	90	65.46
Number of molecules per ASU	4	2	4	4
Mosaicity (°)	0.175	0.124	0.174	0.111
Resolution (Å) (outer shell)	2.47 (2.51-2.47)	2.13 (2.17-2.13)	2.44 (2.48-2.44)	1.90 (2.00-1.90)
No. of observed reflections	939,942 (30,274)	540,380 (22,266)	931,829 (19,145)	540,678 (59,278)
No. of unique reflections	125,591 (6,043)	93,976 (4,211)	137,770 (5,748)	245,086 (27,199)
Completeness (%)	99.9(97.5)	99.3 (90.8)	97.5 (82.1)	94.2 (71.5)
Redundancy	7.5 (5.0)	5.8 (5.3)	6.8 (3.3)	2.2 (2.2)
$I / \sigma(I)$	14 (2.0)	9.0 (2.0)	14.4 (2.1)	6.5 (2.0)
CC_{half}	0.998 (0.643)	0.994 (0.610)	0.998 (0.880)	0.989 (0.781)
$R_{\text{merge}} (I)$	0.125 (0.834)	0.140 (0.876)	0.087 (0.413)	0.082 (0.316)
$R_{\text{meas}} (I)$	0.135 (0.932)	0.154 (0.972)	0.093 (0.490)	0.110 (0.425)
B -factor (Å ²)	31.8	29.1	39.8	19.2

II-4 PmDAP IV の構造決定と精密化

PmDAP IV の位相決定は、CCP4⁴⁵ の MOLREP⁴⁶ を用い、分子置換法により行った。モデル分子として、すでに立体構造が決定されている *Stenotrophomonas maltophilia* DAP IV (SmDAP IV, PDB ID: 2ECF)⁴⁰ の単量体を用いた。分子置換法には、明らかにしたい立体構造と類似していると推測できるモデル分子を用いる。SmDAP IV と PmDAP IV のアミノ酸配列相同性は 74% であり、両者の立体構造は類似していると推定できるため、SmDAP IV をモデル分子として使用した。モデル構築と精密化には、REFMAC5⁴⁷、COOT⁴⁸、ARP/wARP⁴⁹ を用いた。PmDAP IV の主要データの精密化の統計値を (表 2) に示す。

表 2. PmDAP IV 主要データの精密化の統計値

Data set	Free	Inhibitor-1c	Ile-Pro	Lys-Pro
PDB ID	5YP1	5YP2	5YP3	5YP4
Resolution range (Å)	40.00-2.47	40.00-2.13	40.00-2.44	40.00-1.90
Completeness (%)	99.78	99.23	97.21	94.17
No. of reflections working set	119,191	89,236	130,819	232,846
test set	6,289	4,652	6,835	12,222
<i>R</i> -factor	0.218	0.178	0.238	0.164
Free <i>R</i> -factor	0.284	0.226	0.286	0.213
No. of protein atoms (avg. <i>B</i> -factors (Å ²))	22,059 (45.4)	11,320 (32.5)	22,640 (44.4)	22,270 (22.2)
No. of ligand atoms (avg. <i>B</i> -factors (Å ²))	-	40 (2 x 20) (24.5)	60 (4 x 15) (25.7)	65 (3x16 + 1x17) (20.7)
No. of glycerol atoms (avg. <i>B</i> - factors (Å ²))	6 (1 x 6) (48.0)	18 (3 x 6) (46.0)	6 (1 x 6) (52.3)	126 (21 x 6) (38.35)
No. of water molecules (avg. <i>B</i> - factors (Å ²))	598 (33.6)	700 (33.5)	452 (31.3)	2,877 (39.2)
Ramachandran plot statistics				
favored (%)	2,617 (93.2)	1,392 (96.4)	2,710 (93.8)	2,747 (97.1)
allowed (%)	164 (5.8)	52 (3.6)	172 (6.0)	82 (2.9)
outlier (%)	27 (1.0)	0 (0.0)	6 (0.2)	0 (0.0)
RMSD				
bonds (Å)	0.01	0.02	0.01	0.02
angles (°)	1.70	1.84	1.77	1.90

III

PmDAP IV の立体構造

III-1 全体構造

本研究において、リガンドが結合していない PmDAP IV のアポ体の立体構造と、PmDAP IV と基質や阻害剤とが結合している複合体の立体構造が明らかになった。

PmDAP IV は、723 アミノ酸残基からなるサブユニット (Glu23-Pro745) が、ホモ二量体を形成している (図 4)。二量体の分子量は約 160kDa である。PmDAP IV は触媒ドメイン (22-35, 474-745) と β プロペラドメイン (36-475) の2つのドメインを保持し、2つのドメインの間に存在する大きな窪みによりドメインが区切られている (図 5)。

本研究により得られた立体構造情報をもとに、単量体 PmDAP IV の全体構造の模式図を (図 6) に示した。

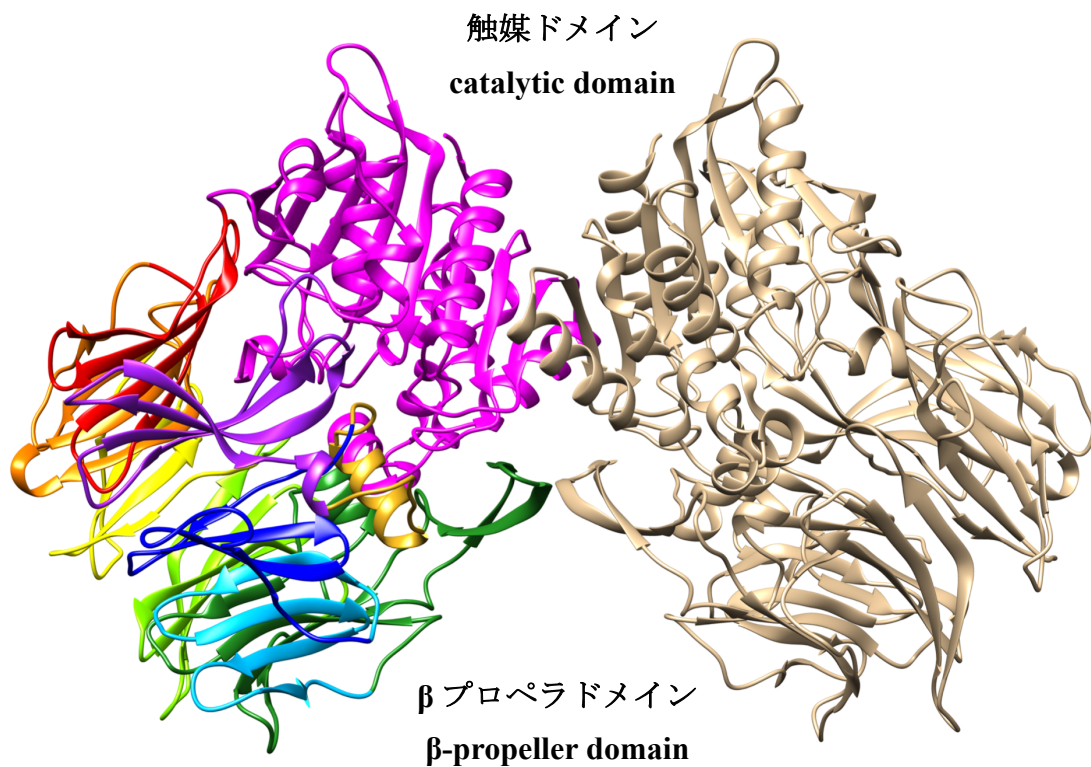


図 4. PmDAP IV のホモ二量体 立体構造 (複合体)
Dimeric structure of PmDAP IV.

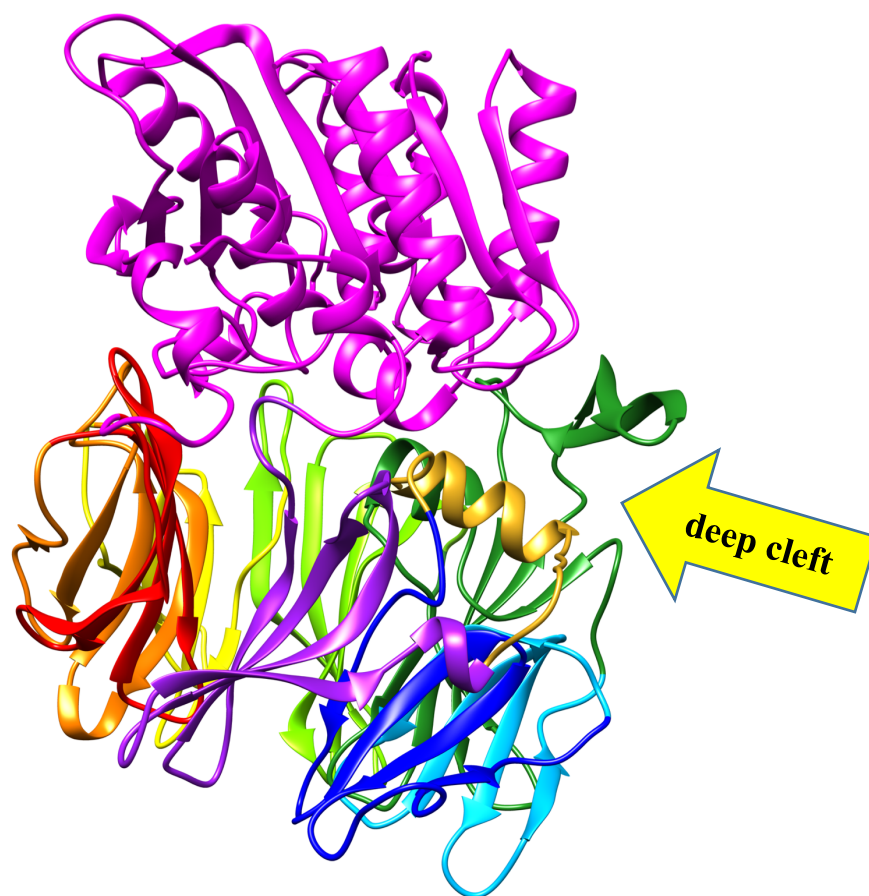


図 5. 窪みにより 2つのドメインが区切られている
The protomer of PmDAP IV consists of two domains
separated by a deep cleft.

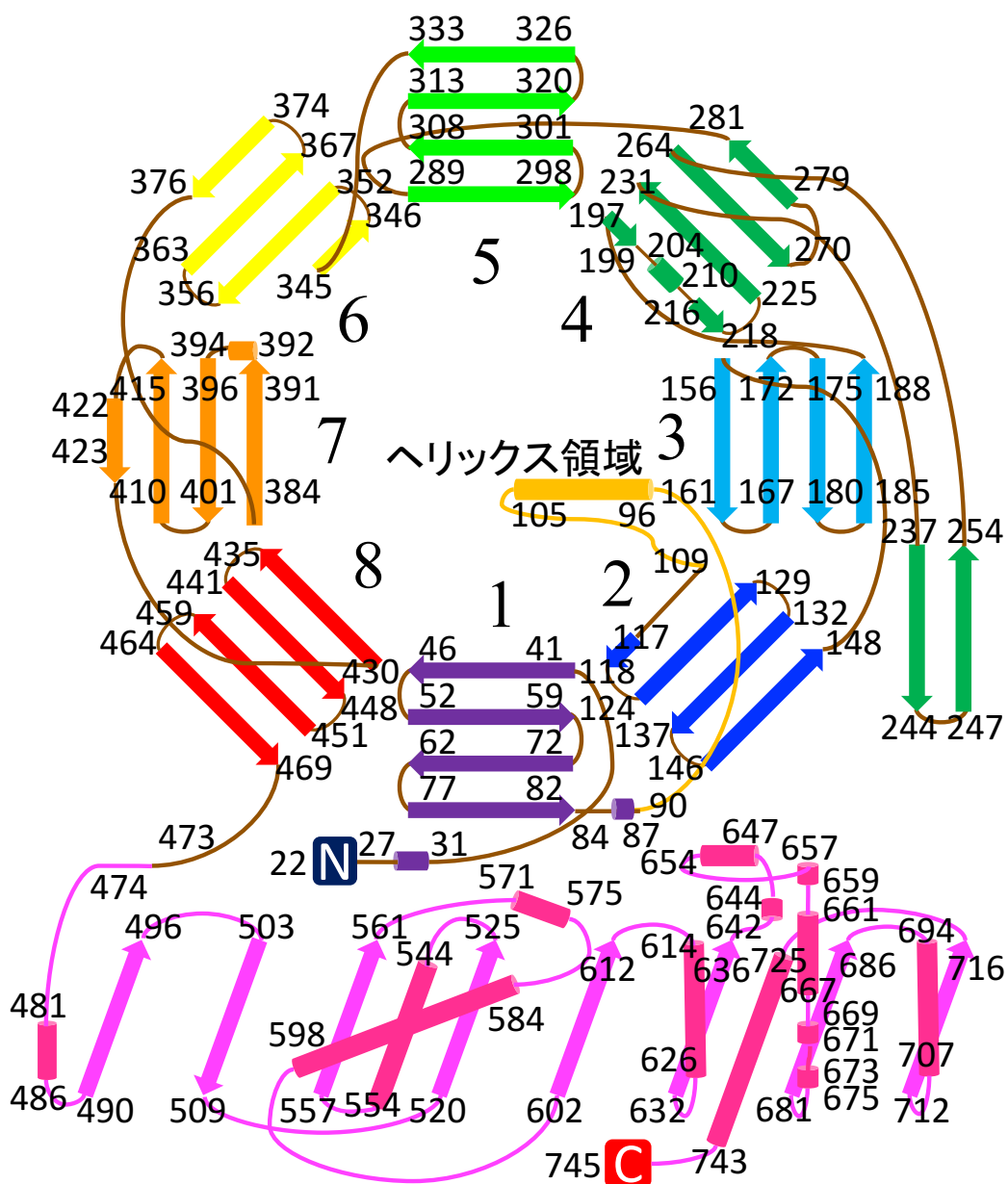


図 6. PmDAP IV の全体構造の模式図

A topology diagram of the PmDAP IV protomer.

III-2 触媒ドメイン

触媒ドメインは、22-35 アミノ酸残基と 474-745 アミノ酸残基を含む。8本鎖からなる1枚の β シートが13本の α ヘリックスに挟まれている α/β 加水分解酵素フォールドという特徴的な構造をもつ(図7)。 α/β 加水分解酵素フォールドは、プロテアーゼ・ペプチダーゼデータベース MEROPS における分類の Clan SC のペプチド分解酵素に特徴的な構造である。触媒ドメインには、セリンペプチダーゼの触媒三つ組残基である His721, Asp689, Ser613 が含まれる。

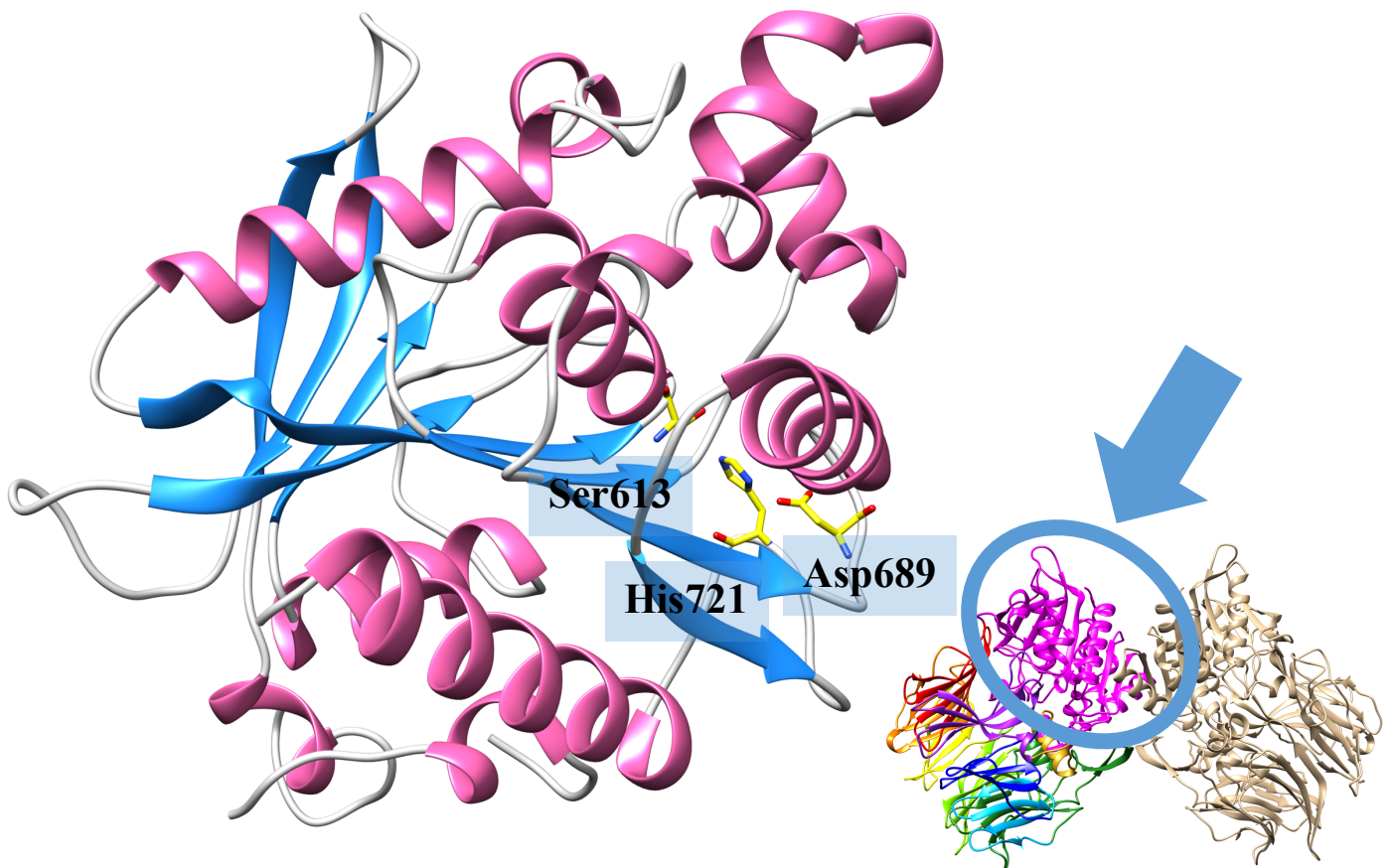


図7. 触媒ドメイン

The catalytic domain includes residues 22-35, 474-745 and forms an α/β hydrolase fold comprising a central eight-stranded β -sheet sandwiched by thirteen α -helices.

III-3 β プロペラドメイン

β プロペラドメイン (図 8) は、8枚の羽根のような β シート (Blade) が、中心を空洞にして円を描く様に並び、 β プロペラドメイン全体の構造としては漏斗のような形を形成している。1つの β シート (Blade) は、4つの逆平行 β ストランドからなる。

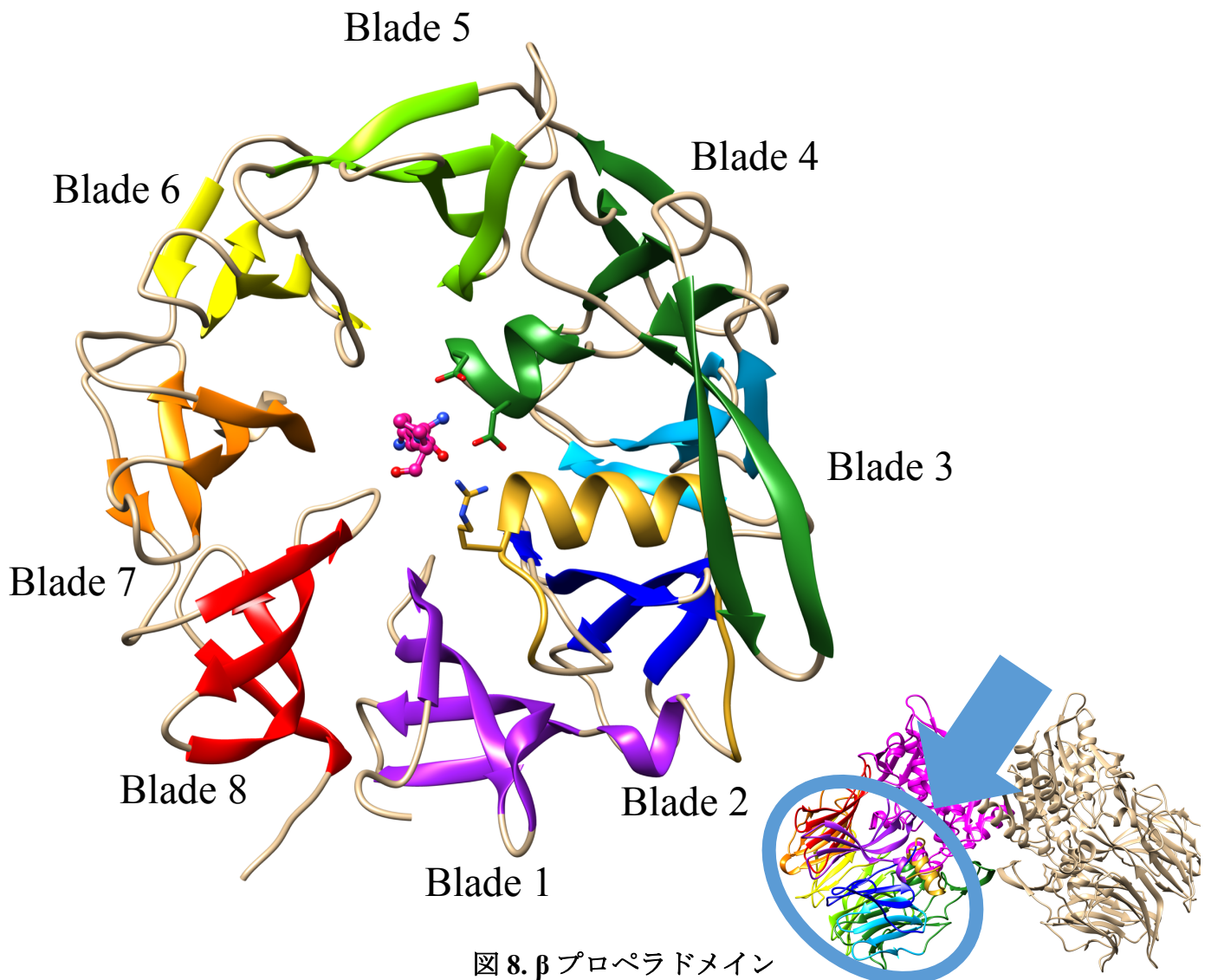


図 8. β プロペラドメイン

The β -propeller domain forms a funnel-shaped structure comprising eight blades, each of which comprises four anti-parallel β -strands.

III PmDAP IV の立体構造

Blade 4 の 1 つ目と 2 つ目の β ストランドの間には、ダブル Glu モチーフ (Glu208・Glu209) を含む短いヘリックスが存在する。このダブル Glu モチーフ (Glu208・Glu209) は、基質の N 末端と塩橋を形成する (図 9)。また Blade 4 には、2 つ目と 3 つ目の β ストランドの間に突き出た逆平行 β シートがあり、二量体の形成に関与している。

さらに、PmDAPIV と基質・阻害剤との複合体立体構造では、主にアポ体の立体構造では見えていない領域 (Blade 1 と Blade 2 の間の領域) が確認できた。Blade 1 と Blade 2 の間に存在するヘリックスには、Arg106 が含まれる。この Arg106 は、Glu208 と塩橋を形成し、基質の N 末端の認識に関与することが明らかとなった (図 9)。

また、Blade 4~8 は、 β プロペラドメインと触媒ドメインとの分子内接触に関与している。一方、Blade 1~3 は触媒ドメインとの分子内接触が少なく、Blade 4~8 よりも柔軟性が高いことが考えられる (図 10)。

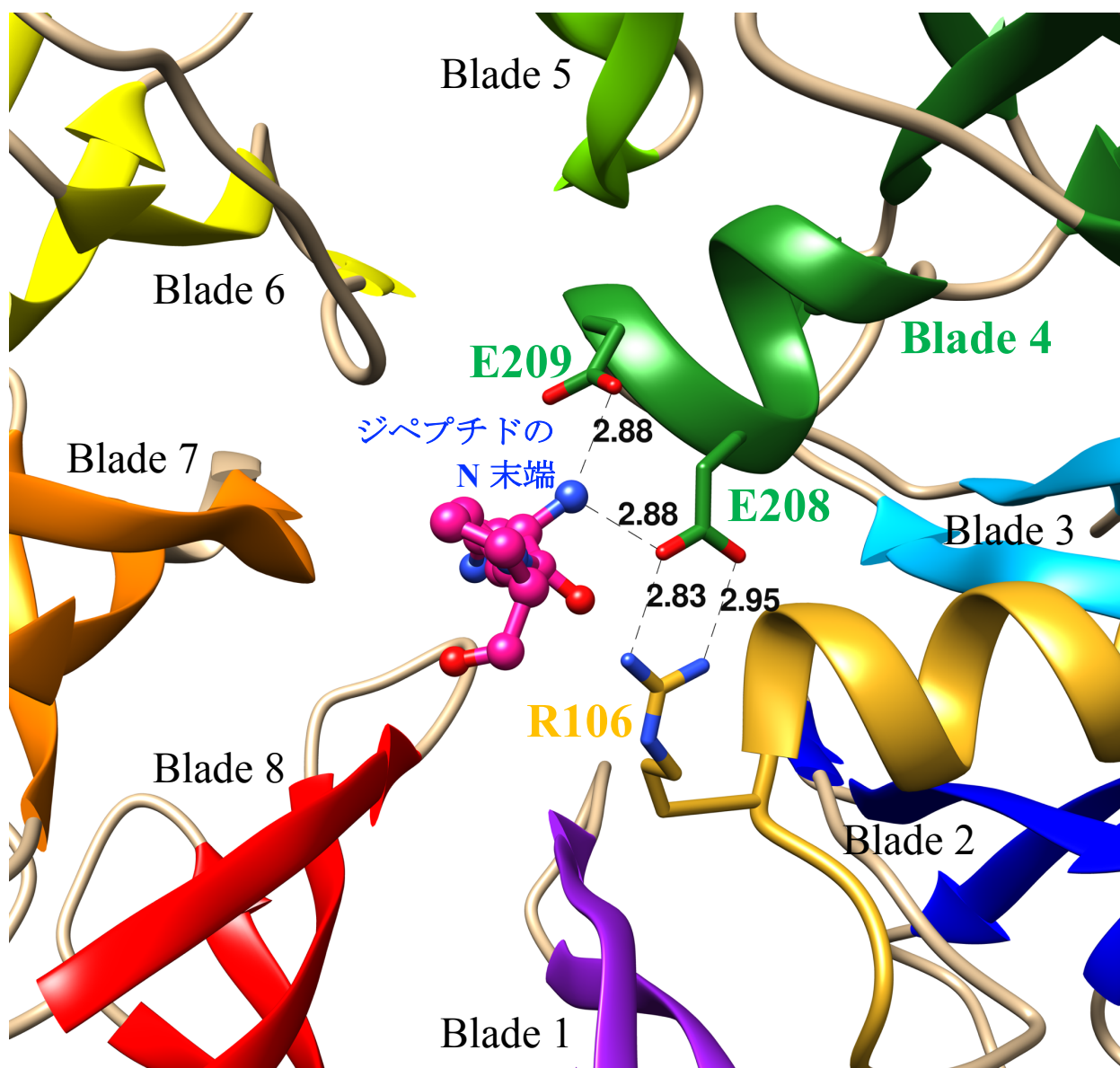


図9. ダブル Glu モチーフ (Glu208・Glu209)

This helix contains a double-Glu motif, Glu208-Glu209, which forms salt bridges to the N-terminus of a peptide substrate.

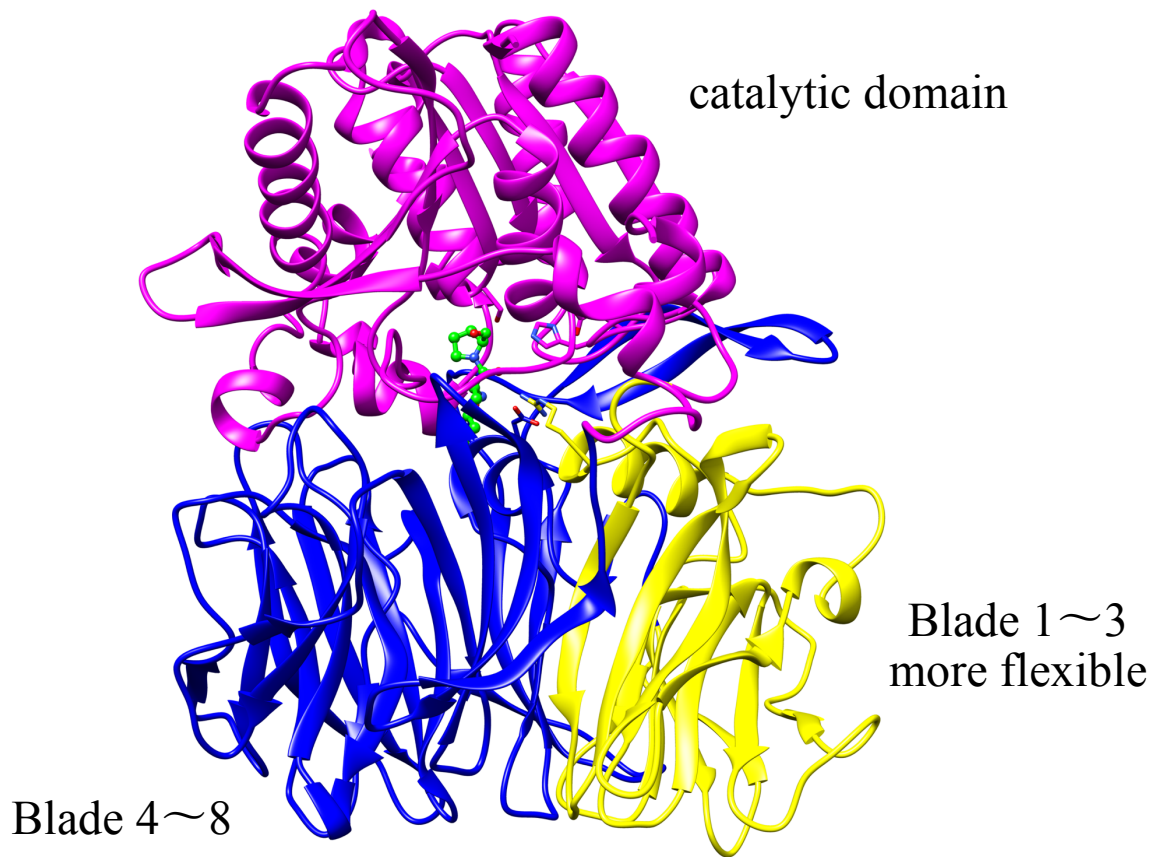


図 10. 分子内接触と Blade の柔軟性

Inter-domain contacts between the catalytic and β -propeller domains are observed for blades 4 to 8 of the β -propeller domain and the catalytic domain. Blades 1 to 3 of the β -propeller domain have less contact with the catalytic domain and appear to be more flexible than blades 4 to 8.

III-4 アポ体立体構造と複合体立体構造

PmDAP IV のアポ体立体構造と基質・阻害剤との複合体立体構造を比較した。その結果、複合体立体構造において、 β プロペラドメインの一部が、基質 N 末端認識に関与する Arg106 を含むヘリックスに引っ張られるように閉じる構造をとっていた。この Arg106 を含むヘリックス構造は、PmDAP IV のアポ体立体構造でディスオーダーしていた領域である (90-109 アミノ酸残基)。主に構造が異なっていたのは β プロペラドメインの Blade 1、Blade 2、Blade 4 の 2 番目と 3 番目の β ストランド間に存在し突き出た構造をとる逆平行 β シート (β -hairpin region) であり、触媒ドメインと β プロペラドメイン間の窪みを埋めるような構造をとっていた。(図 11) において、触媒ドメインを重ねたとき PmDAP IV のアポ体立体構造と基質・阻害剤との複合体立体構造で 7Å 以上異なっていた部分を赤色で示した。

また、PmDAP IV のアポ体立体構造の非対称単位中にあるサブユニットうちの 1 つは、基質や阻害剤が結合していないにもかかわらず複合体立体構造のような閉じた構造をとっており、90-109 アミノ酸残基のヘリックス構造も複合体立体構造と同様に見ることができた。

これらの結果より、PmDAP IV は基質や阻害剤が結合するとき、構造変化もしくは Conformational selection (構造選択)^{50,51} を起こす可能性が示唆された。

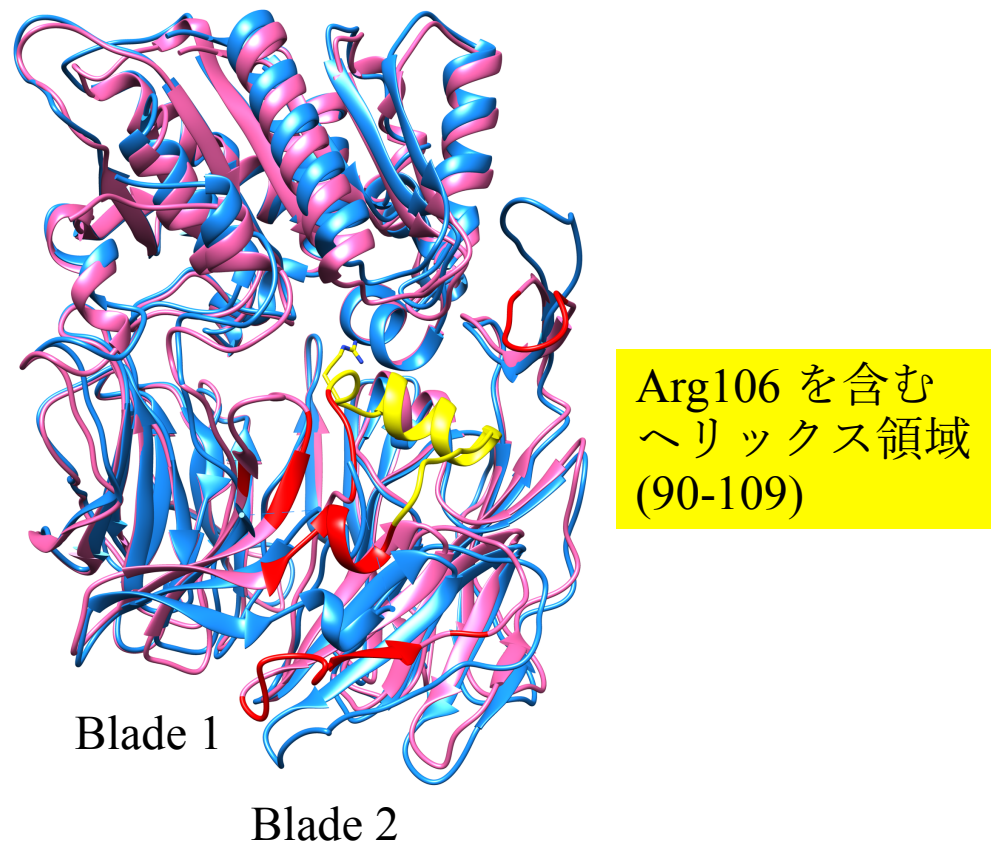


図 11. アポ体立体構造と複合体立体構造の違い

Peptide-free (cyan) and dipeptide-bound (magenta) forms of PmDAP IV are shown. Least-square fitting was performed with respect to all C α atoms of each molecule. C α -C α deviations larger than 7 Å are shown in red for the dipeptide-bound form.

III-5 基質との複合体立体構造

PmDAP IV とジペプチド Lys-Pro、Ile-Pro との複合体立体構造を、それぞれ 1.90Å 分解能 (図 12, 14)、2.47Å 分解能 (図 13, 15) で決定した。Lys-Pro 複合体は、PmDAP IV と Lys-Pro-Tyr との共結晶化から得られたもの、Ile-Pro 複合体は PmDAP IV とヒト DPP IV のペプチド系阻害剤として知られる Diprotin A (Ile-Pro-Ile)^{52,53} との共結晶化から得られたものである。これらの複合体立体構造の決定により、PmDAP IV による基質の認識機構が明らかになった。基質ジペプチドは、触媒ドメインと β プロペラドメインの窪みの触媒三つ組残基とダブル Glu モチーフ Glu208・Glu209 に挟まれる位置に結合していた。

PmDAP IV は、基質ペプチドの N 末端から 2 番目の位置に Ala、Pro、Hyp がきたときジペプチド (NH₂-P2-P1-COOH) を産生する。したがって、PmDAP IV がジペプチドを産生するためには、PmDAP IV による基質の N 末端認識が重要となる。この基質 N 末端の認識は、 β プロペラドメインの Blade 4 に存在するダブル Glu モチーフ Glu208 と Glu209 により行われる。また、 β プロペラドメインの Blade 1 と Blade 2 の間に存在する Arg106 の側鎖は、Glu208 の側鎖と塩橋を形成し、間接的に基質の N 末端認識に関与していることが明らかになった。Arg106 の側鎖はその他にも基質 P2 位のカルボニル基と水素結合を形成していた。PmDAP IV のアポ体では見えていなかった領域 (90-109 アミノ酸残基) は短いヘリックスとして観察され、Arg106 はこのヘリックス領域に含まれている。さらに、Asn691 の側鎖もまた基質 P2 位のカルボニル基と水素結合を形成していた。

基質 P1 位の Pro は、Tyr527、Asn614、Val639、Trp642、Tyr645、Tyr649、Val692 の側鎖から構成される S1 ポケットに收容されていた (図 14, 15)。基質 P2 位の側鎖と PmDAP IV との相互作用は少なかった。Lys-Pro 複合体における基質 P2 位の Lys は活性部位に存在する水分子に囲まれている一方で、Ile-Pro 複合体における基質 P2 位の Ile の周りには水分子が少なかった。この理由は、Ile が疎水性であるためであるとも考えられるが、Ile-Pro 複合体立体構造の分解能は 2.47Å であり水分子の考察を行うには分解能が低すぎるので、定かではない。基質 P1 位のカルボニル酸素は、Tyr527 や Asn614 で構成されるオキシアニオンホール^{54,55,56} と呼ばれるポケットに收容され、Asn614 主鎖のイミノ基や Tyr527 側鎖のヒドロキシ基と水素結合を形成していた。

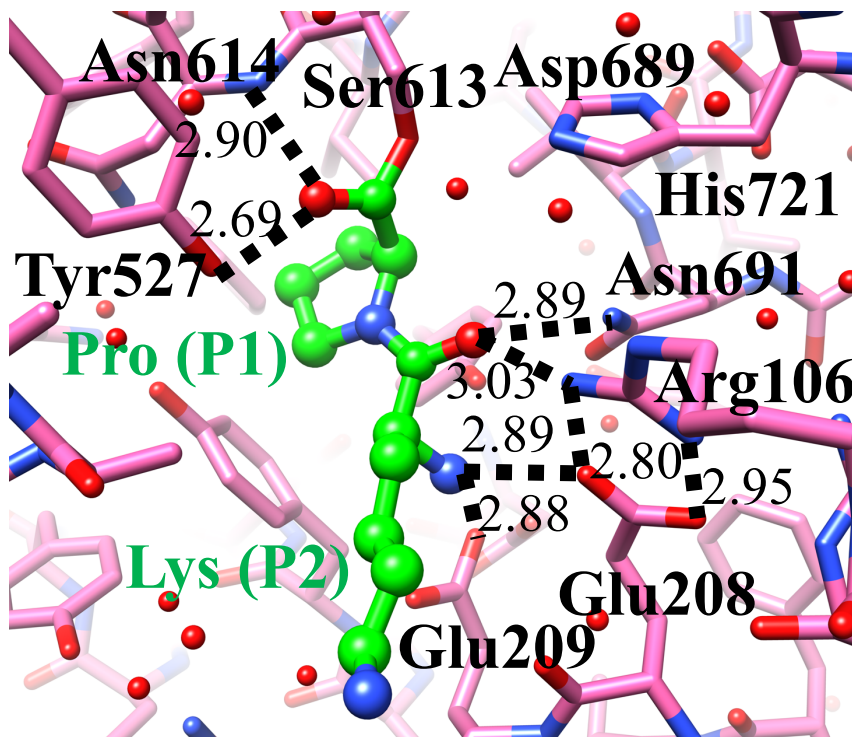


図 12. PmDAP IV と Lys-Pro との複合体立体構造

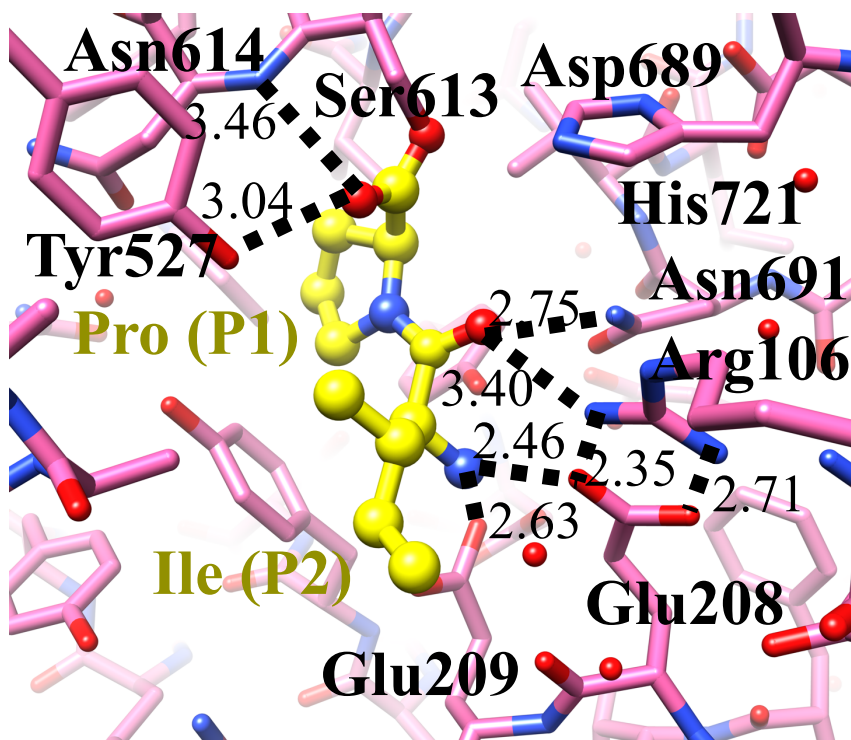


図 13. PmDAP IV と Ile-Pro との複合体立体構造

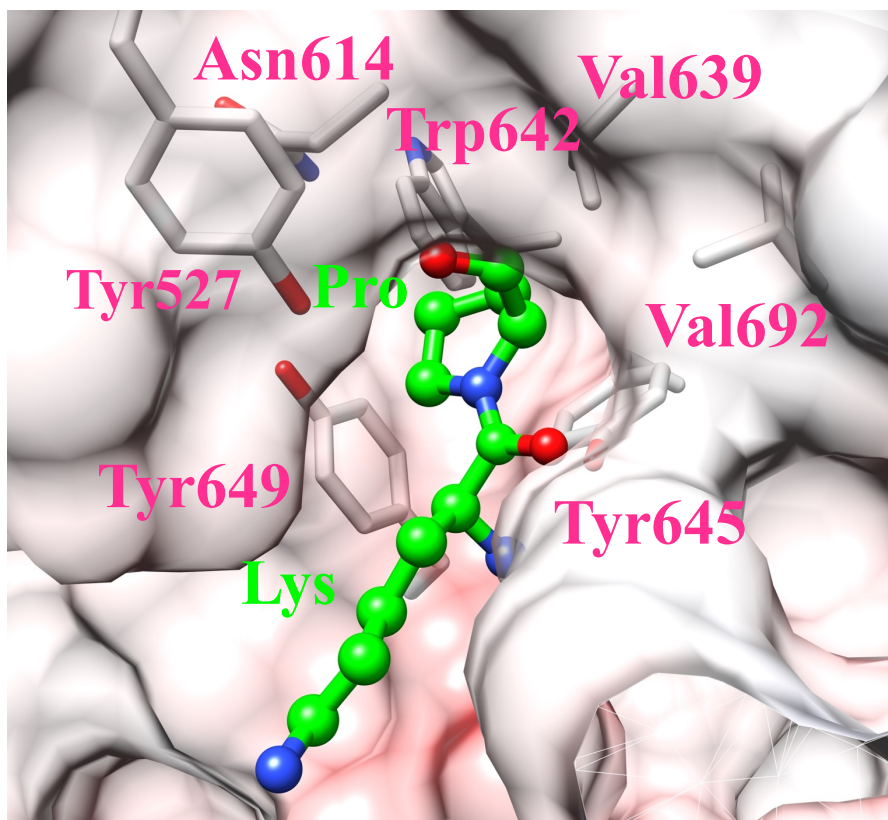


図 14. PmDAP IV と Lys-Pro 複合体の S1 ポケット

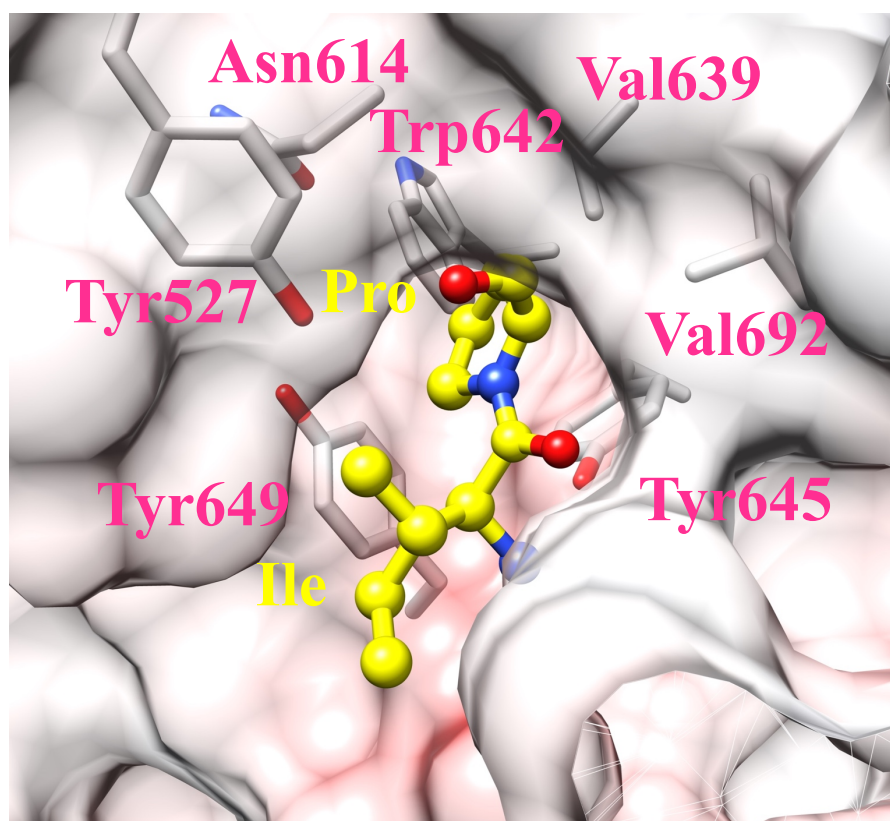


図 15. PmDAP IV と Ile-Pro 複合体の S1 ポケット

III-6 阻害剤との複合体立体構造

PmDAP IV と非ペプチド系阻害剤 Inhibitor 1c との複合体立体構造を 2.43Å 分解能で決定した (図 16, 17)。Inhibitor 1c⁵⁷ はヒト DPP IV 阻害剤として知られ、塩酸塩として市販されている化合物である (図 18)。Inhibitor 1c との複合体立体構造もまた、活性部位における立体構造的な特徴を示した。

Inhibitor 1c の片方のニトリル基は、触媒残基の Ser613 により求核攻撃され共有結合を形成していた。Inhibitor 1c のピロリジン環は S1 ポケット (Tyr527、Asn614、Val639、Trp642、Tyr645、Tyr649、Val692) に収容されていた。

基質ペプチド P2 主鎖の N 末端に相当する Inhibitor 1c のアミノ基は Glu208 と Glu209 の側鎖との相互作用により認識され、基質ペプチド P2 主鎖のカルボニル基に相当する Inhibitor 1c のカルボニル基は Arg106 と Asn691 の側鎖との相互作用により認識されていた。

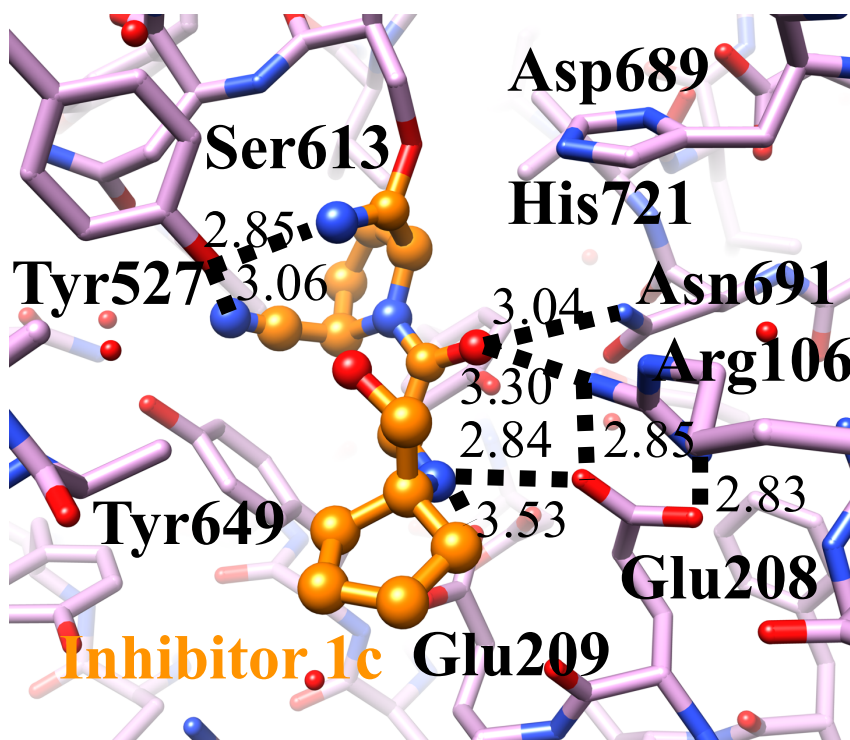


図 16. PmDAP IV と Inhibitor 1c との複合体立体構造

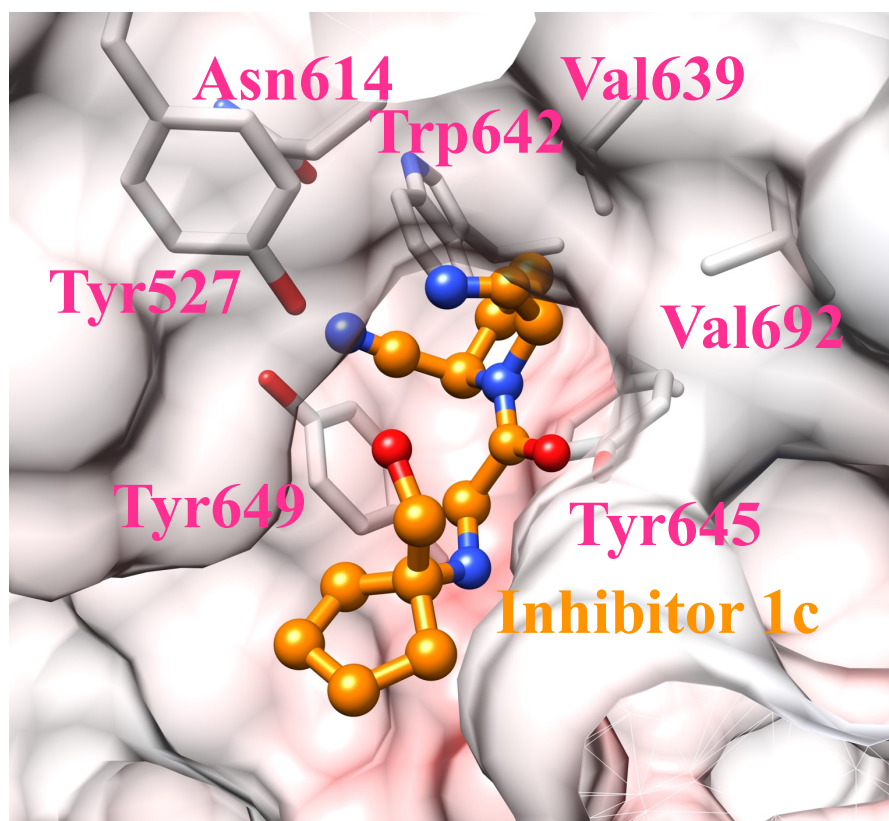


図 17. PmDAP IV と Inhibitor 1c 複合体の S1 ポケット

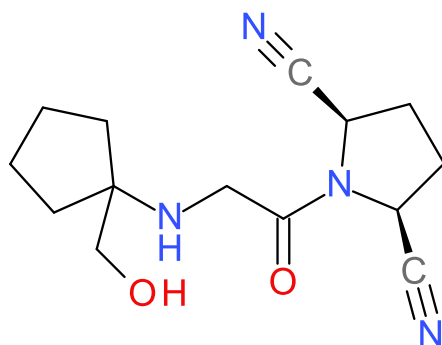


図 18. Inhibitor 1c

1-([1- (hydroxymethyl)cyclopentyl]amino)-acetyl)
pyrrolidine-2,5-cis-dicarbonitrile

Inhibitor 1c is known to be an achiral inhibitor of mammalian DPP IV.

Inhibitor 1c のシクロペンタン部分は、活性部位との相互作用が少なかった。ここで、PmDAP IV と Inhibitor 1c との複合体立体構造における、Inhibitor 1c のゆらぎを示した (図 19)。(図 19) において、赤色が濃くなるほど分子がゆらいでおり、ピロリジン環部分よりもシクロペンタン部分のゆらぎが大きいことがわかる。このシクロペンタンのゆらぎは、PmDAP IV と Inhibitor 1c のシクロペンタン部分との相互作用が少ないことに起因すると考えた。

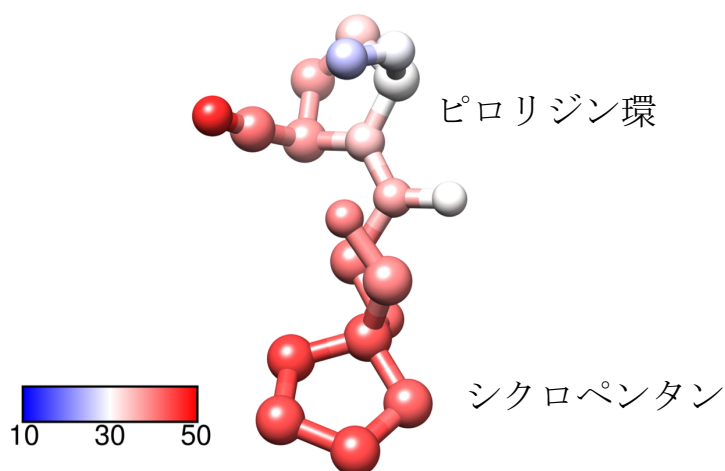


図 19. 温度因子 (B factor) で見る Inhibitor 1c のゆらぎ

III-7 アシル中間体

PmDAP IV と Lys-Pro との複合体立体構造が、PmDAP IV と Lys-Pro-Tyr との共結晶化による X 線結晶構造解析により明らかになった。得られた基質ペプチドの電子密度マップは、トリペプチドである Lys-Pro-Tyr のうち Lys-Pro のみであり、基質ペプチドのうち残りの Tyr の電子密度マップは見られなかった。これは、共結晶化実験で PmDAP IV 溶液と Lys-Pro-Tyr 溶液を混合した際、PmDAP IV の酵素反応により Lys-Pro-Tyr の N 末端側のジペプチドである Lys-Pro (P2-P1) と C 末端側の Tyr (P1') がそれぞれ産生され、Lys-Pro のみが活性部位に残ったためであると考えられる。

また本研究では、触媒残基である Ser613 の O γ 原子が基質の Pro のカルボニル炭素と結合している電子密度マップ (omit electron map) が見られ (図 20)、産生された Lys-Pro が、アシル中間体として活性部位に残っている状態を観測することができた。結晶中の非対称単位中には PmDAP IV と Lys-Pro との複合体分子が 4 分子存在し、そのうちの 3 分子はアシル中間体として、残りの 1 分子は、完全なジペプチドの状態 (NH₂-Lys-Pro-COOH) として存在していた。

このほかアシル中間体として観測されたものとして、ペプチド系のヒト DPP IV 阻害剤として知られる Diprotin A (Ile-Pro-Ile) と PmDAP IV との共結晶化と X 線結晶構造解析から得られた、PmDAP IV と Ile-Pro との複合体立体構造がある。この PmDAP IV と Ile-Pro との複合体では、非対称単位中のどの分子も、アシル中間体として存在していた。

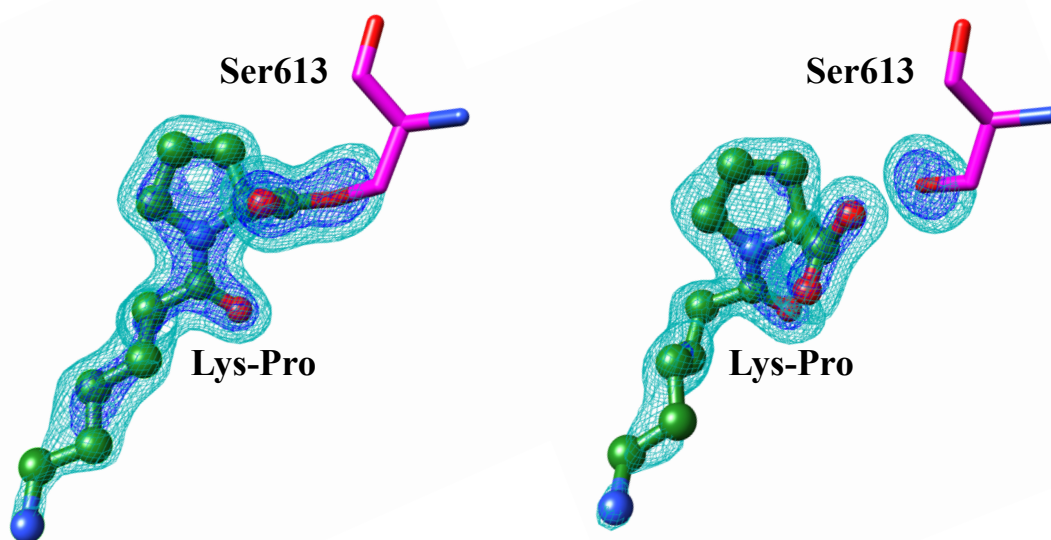


図 20. PmDAP IV と Lys-Pro との omit electron map
左 : アシル中間体 右 : 完全なジペプチドとして存在

IV

PmDAP IV の基質認識

IV-1 ダブル Glu モチーフ (Glu208・Glu209)

PmDAP IV とジペプチドとの複合体の立体構造において、隣り合う Glu208 と Glu209 が、基質の N 末端と塩橋を形成し、PmDAP IV と基質の結合を安定させている特徴的なモチーフが見られた (図 9)。

IV-2 基質認識に関与する PmDAP IV の Arg106

微生物 DAPIV である PmDAPIV は、基質ペプチドの N 末端から 2 番目の Pro、Hyp、Ala を特異的に認識し、ジペプチドを産生する。PmDAPIV が基質や阻害剤を認識する機構を解明するため、本研究では、PmDAPIV 単体の結晶構造に加え、PmDAPIV とジペプチド・阻害剤との複合体の結晶構造を決定した (詳細は「III PmDAP IV の立体構造」を参照)。

PmDAP IV とジペプチドとの複合体の立体構造において、 β プロペラドメインの Blade 1 と Blade 2 の間に存在する Arg106 の側鎖が、基質 P2 位のカルボニル酸素と水素結合を形成していた (図 12, 図 13)。また、Arg106 の側鎖は、ダブル Glu モチーフの Glu208 の側鎖と塩橋を形成し、間接的に基質の N 末端認識に関与していることが明らかになった。これらの相互作用は、PmDAP IV と非ペプチド系阻害剤である Inhibitor 1c との複合体の立体構造においても同様に存在した (図 16)。

この Arg106 を含む β プロペラドメインの Blade 1 と Blade 2 の間の立体構造 (90-109 アミノ酸残基) は、すでに立体構造が明らかになっていた *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 DAP IV のアポ体の立体構造や、一部を除いた PmDAP IV アポ体の立体構造では見えていない。この理由の 1 つとして、基質や阻害剤のようなリガンドと微生物 DAPIV の活性部位とが相互作用することにより安定化し、基質認識に関与する Arg106 を含む 90-109 アミノ酸残基領域の構造のふらつきが抑えられたことが推測できる。また、一部の PmDAPIV アポ体の立体構造は、リガンドが結合していないにもかかわらず、複合体立体構造と同様に 90-109 アミノ酸残基領域の構造を見ることができ、 β プロペラドメインの一部が閉じた構造をとっていた。したがって、誘導適合により微生物 DAPIV の立体構造が変化して安定化する可能性や

Conformational selection (構造選択) を起こす可能性も示唆された。

さらに、このディスオーダーしている領域中の一部は、PmDAP IV の立体構造において、ジペプチドや阻害剤が結合することにより短いヘリックス構造を形成していた。また、PmDAP IV の複合体立体構造では、このヘリックスを中心にしてβプロペラドメインの一部がドメイン間の窪みを埋めるような閉じた構造をしていた。

IV-3 PmDAP IV における Arg106 の重要性

PmDAP IV における Arg106 の重要性を確認するため、長岡技大グループが PmDAP IV の Arg106 における部分特異的変異解析を行った。

その結果、Arg106 を Ala や Lys に置換した変異体 PmDAP IV の Gly-Pro-MCA に対する酵素活性は、野生型 PmDAP IV の酵素活性に対して大きく低下した (表 3)。この結果から、Arg106 は、PmDAP IV の基質認識において重要な役割を果たしているとともに、Glu208 の安定化にも重要であることが示唆された。

表 3. Gly-Pro-MCA に対する PmDAP IV の生化学的解析

Enzyme	Specific activity (U mg ⁻¹)	Relative activity (%)	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (sec ⁻¹ μM ⁻¹)
PmDAP IV wild-type	14.4 ± 0.3 [#]	100	19.2 ± 0.4	19.4 ± 0.8	0.989 ± 0.035
PmDAP IV R106A	2.04 ± 0.05	14.2	2.72 ± 0.07	26.8 ± 0.9	0.102 ± 0.001
PmDAP IV R106K	5.36 ± 0.09	37.2	7.14 ± 0.12	34.5 ± 1.0	0.207 ± 0.003
Human DPP IV	4.13 ± 0.12	-	35.3 ± 1.0	37.1 ± 1.6	0.952 ± 0.013

IV-4 PmDAP IV における基質認識・ジペプチド産生機構

一般的にセリンプロテアーゼの触媒作用に必要な構造的特徴は 4 つ存在する⁵⁸。

1. 触媒トライアド（触媒三つ組残基）
2. オキシアニオンホール
3. セリンプロテアーゼの主鎖と基質の結合
4. 特異性ポケット

また、セリンプロテアーゼは基質と四面体型遷移状態中間体やアシル中間体を形成して⁵⁹ ペプチド結合を切断すること、反応を触媒する水分子が存在することが知られている。

これらのことに着目しながら、本研究により得られた PmDAP IV の立体構造情報を基に、PmDAP IV の基質認識・ジペプチド産生機構について推測した。PmDAP IV の触媒三つ組残基は、His721・Asp689・Ser613 である。

～第一段階～

(1) (2)

His721 は Ser613 の水酸基からプロトンを受け取ることで、Ser613 の求核性を高める。Asp689 はプロトンを受け取った His721 の正電荷を安定化させ、反応を触媒する。

(3) (4)

求核性の高まった Ser613 の酸素原子は基質 P1 位 (Pro) のカルボニル炭素に求核攻撃を行い、四面体型遷移状態中間体を形成する。基質 P1 位 (Pro) の酸素原子は、PmDAP IV の Asn614 主鎖の NH 基、Tyr527 側鎖の OH 基と水素結合を作る。Asn614 と Tyr527 はオキシアニオンホールとして知られる PmDAP IV 内部のポケットに存在し、四面体型遷移状態中間体の形成を促進・安定化する。また、ダブル Glu モチーフの Glu208・Glu209 は基質 P2 の N 末端と塩橋を形成し、さらに Glu208 は Arg106 と塩橋を形成することで基質の結合を安定させている。

(4) (5)

ペプチド結合が切断される時、生成したペプチドのうち P1 位 (Pro) を含むジペプチドは **アシル中間体 (Ser613-P1-P2)** を形成して PmDAP IV に結合している。なお、この反応は His721 により触媒され、切断されたもう片方の基質ペプチド (P1'-P2'-...) はすみやかに遊離する。

～第二段階～

(6) (7)

水分子がアシル中間体に求核攻撃を行い、反応機構 (3) ~ (5) での基質ペプチド NH 基の代わりとして、四面体型遷移状態中間体を形成する反応を触媒する。ここでも、オキシアニオンホールを形成する Asn614 と Tyr527 は基質 P1 位 (Pro) の酸素原子と水素結合を作り、四面体型遷移状態中間体の形成を促進・安定化する。

(8)

C 末端のあるジペプチド (P2-P1) が遊離し、反応機構 (1) (2) に戻る。

IV-5 PmDAP IV 結晶構造で見られたアシル中間体

PmDAP IV とトリペプチド Lys-Pro-Tyr との共結晶から得られた電子密度マップにおいて、触媒残基 Ser613 の酸素原子と基質の P1 (Pro) の炭素原子とが繋がっている電子密度マップが見られた。このとき、基質はジペプチド (Lys-Pro) として Ser613 に結合していた。これは、上記反応機構における (5) の状態、つまり、基質ペプチドが P1 位で切断され、P1 (Pro) を含むジペプチド Lys-Pro がアシル中間体 (Ser613-P1 (Pro) -P2 (Lys)) を形成して、PmDAP IV に共有結合している状態であると考えた。また、ダブル Glu モチーフの Glu208・Glu209 と基質の結合や Glu208 と Arg106 との結合を見ることができた。

また、このアシル中間体は、PmDAP IV と Diprotin A (Ile-Pro-Ile) との共結晶から得られた結晶構造でも見ることができ、ジペプチド (Ile-Pro) として PmDAP IV の Ser613 に結合

していた。

IV-6 PmDAP IV の基質特異性ポケット

PmDAP IV の基質特異性ポケットは、触媒三つ組残基 His721・Asp689・Ser613、サブサイト 1 (S1) ポケットのアミノ酸残基、S2 ポケットのアミノ酸残基、オキシアニオンホールを構成する Asn614 と Tyr527、ダブル Glu モチーフの Glu208 と Glu209 により形成されていた。

表 4. PmDAP IV の基質特異性ポケット構成アミノ酸残基の分類

	触媒残基	S1 ポケット		S2 ポケット	
			オキシアニオンホール		ダブル Glu モチーフ
PmDAP IV	His721	Val639 Trp642	Asn614 Tyr527	Arg106	Glu208 Glu209
	Asp689	Tyr645 Tyr649		Ala531	
	Ser613	Val692		Asn691	

V

基質の取り込みと 生成物の排出

V-1 PmDAP IV による基質の取り込み

本研究において PmDAP IV の立体構造を明らかにしたことにより、基質が PmDAP IV の活性部位へ辿り着くルートを考察できる。可能性のあるルートとしては、 β プロペラドメインの中央にあるチャンネルを抜けていくルートと、 β プロペラドメインと触媒ドメインの間にある side opening から入り込むルートの 2 通りである。

この 2 つのルートのうち最も可能性の高いものは、 β プロペラドメインと触媒ドメインの間にある side opening から入り込むルートである。その理由は、 β プロペラドメインの中央にあるチャンネルを抜けていくルートからの基質の取り込みは、困難であると予想できるからである。

β プロペラドメインのチャンネルから基質ペプチドを取り込む場合、基質ペプチドは傘の持ち手のような形 (umbrella handle-shaped conformation) をとらなければならない、エネルギー的には好ましくない。この umbrella handle-shaped conformation は、基質ペプチドの N 末端が PmDAP IV のダブル Glu モチーフに向かってのび、基質ペプチドの C 末端が β プロペラドメインのチャンネルにある状態である。

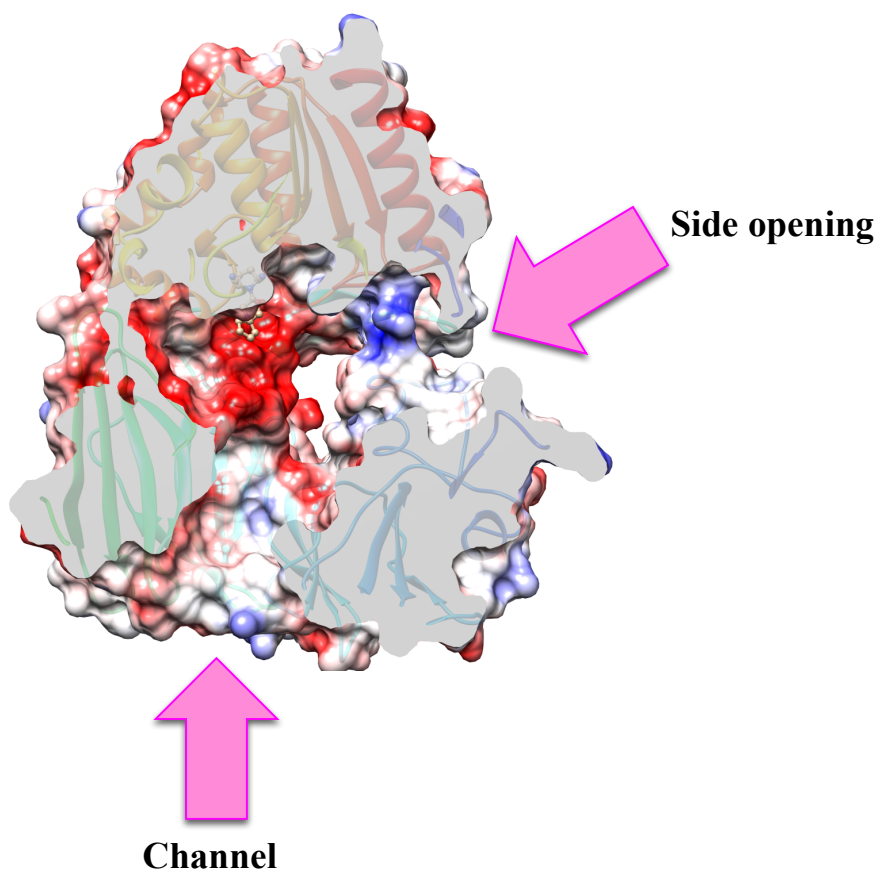


図 21. 基質取り込みと生成物排出のルート

V-2 PmDAP IV からの生成物の排出

生成物の排出ルートとしては、 β プロペラドメインと触媒ドメインの間にある side opening から生成物が出て行くルートが簡単そうではあるが、本研究の結果からは、 β プロペラドメインのチャンネルから生成物が出て行くルートを否定することはできない。

本研究で明らかになった PmDAP IV とペプチドや阻害剤との複合体の立体構造では、触媒ドメインと β プロペラドメイン間の窪みはある程度閉じていた。また、基質は PmDAP IV の活性部位を埋めるように結合し、溶液中に活性部位がむき出しという状態ではなかった。したがって、このドメイン間の窪みが閉じた構造から開いた状態にならない限り、生成物は活性部位から出て行くことは不可能であると考えた。

以上のことから、生成物の排出について、

- (1) PmDAP IV は構造変化（ドメイン間の窪みを閉じた構造から開いた状態にすること）をせずに、 β プロペラドメインのチャンネルから生成物を排出する
 - (2) PmDAP IV は構造変化を起こした後に、ドメイン間にある side opening から生成物を排出する
- の2通りが考えられる。

VI
微生物 DAP IV と
哺乳類 DPP IV

VI-1 微生物 DAP IV と哺乳類 DPP IV

微生物 DAP IV 全体の複合体立体構造が本研究により初めて明らかになったことで、同じく全体の立体構造が既に明らかになっている哺乳類 DPP IV との違いを比較できるようになった。微生物 DAP IV に特異的な阻害剤を設計する上で、これまで明らかになっている哺乳類 DPP IV との違いを明確にしておくことは重要であると考え、PmDAP IV の立体構造とヒト DPP IV の立体構造について比較検討した。

VI-2 ヒト由来ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV (ヒト DPP IV) の役割

ヒト DPP IV は、体内のグルコース恒常性の維持において非常に重要な役割をもつ。ヒト DPP IV は、血糖依存的にインスリン分泌を促進するグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1; glucagon-like peptide 1) やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP; glucose-dependent insulintropic polypeptide) といったインクレチンの活性を制御し、グルコース恒常性を保つ。現在、ヒト DPP IV を選択的に阻害することでインクレチンの分解を抑制する糖尿病薬 (〜グリプチン) が臨床で使用されている。また、ヒト DPP IV は CD26 と同一分子であることが明らかになっており、T 細胞の共刺激分子としての機能も併せ持つことが知られている。

VI-3 哺乳類 DPP IV の構造生物学的な研究背景

ヒト DPP IV と、ヒト DPP IV 阻害剤やペプチドなどとの複合体の立体構造が明らかになっており、多くの構造生物学的な研究や基質認識機構に関する言及がなされている^{35,36,37}。また哺乳類 DPP IV として、ヒト DPP IV の他にブタ由来やラット由来の DPP IV の立体構造も明らかになっている。

VI-4 PmDAP IV とヒト DPP IV の全体構造比較

PmDAP IV とヒト DPP IV はどちらも、触媒ドメインと β プロペラドメインの2つのドメインを同様に保持している。両者の複合体立体構造を比較すると、PmDAP IV では β プロペラドメインと触媒ドメインの間にある *side opening* が閉じている状態であるのに対して、ヒト DPP IV では開いている状態であった (図 22)。図は、複合体立体構造の輪切り図であり、PmDAP IV のドメイン間が閉じていることがわかる。ここで、PmDAP IV の複合体立体構造とアポ体立体構造を比較すると、両者で β プロペラドメインの一部に大きな違いが見られ、基質が結合することで触媒ドメインと β プロペラドメインの間を埋めるような構造変化が起こることが示唆された。一方で、ヒト DPP IV の複合体立体構造とアポ体立体構造には大きな差は見られなかった。これらのことから、微生物 DAP IV は基質結合時に立体構造が変化する可能性があるのに対して、ヒト DPP IV は基質結合時には構造の変化は起こらないことが示唆された。

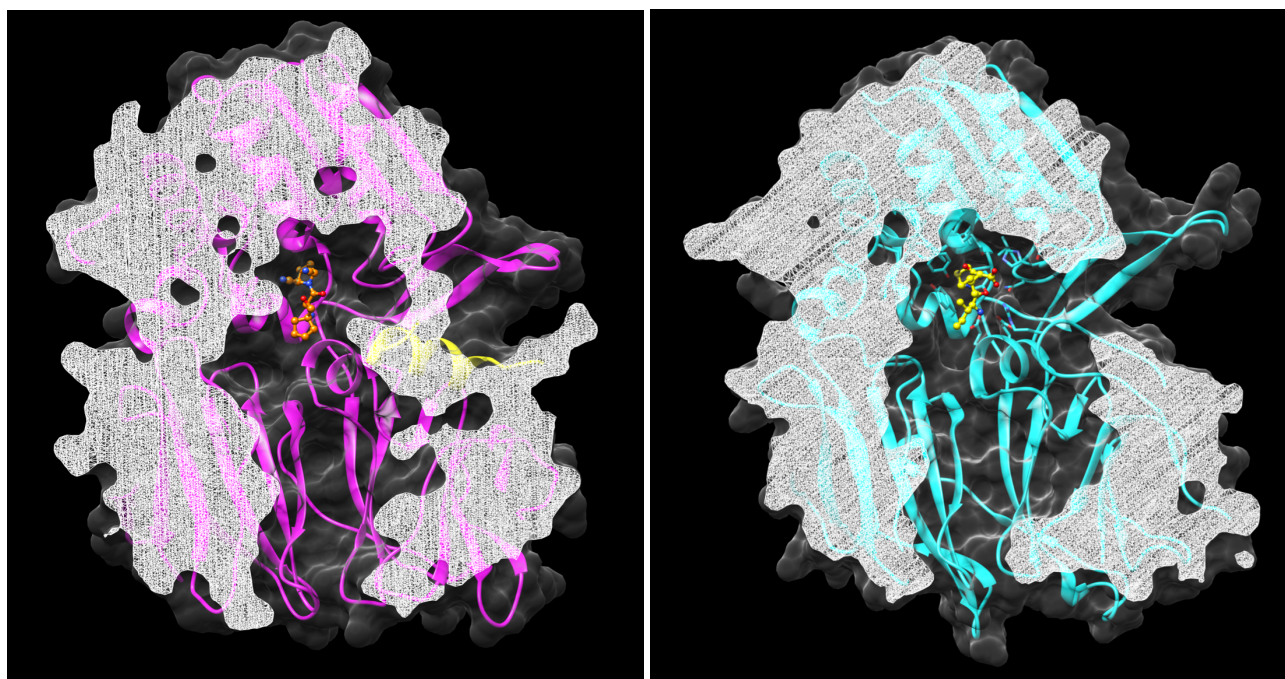


図 22. 複合体立体構造の比較

左 : PmDAP IV 右 : ヒト DPP IV (PDB ID 1WCY)

VI-5 PmDAP IV とヒト DPP IV の活性部位

PmDAP IV とヒト DPP IV の活性部位を比較すると (図 23)、ポケットを構成するアミノ酸残基の一部に違いが見られた。例えば、PmDAP IV において、ヒト DPP IV の Tyr631 と等価な位置には Asn614 が存在していた。そのため、基質 P1 の認識に関与する S1 ポケットの大きさは PmDAP IV の方がヒト DPP IV に比べて大きく、S1 ポケットの疎水性は PmDAP IV の方がヒト DPP IV に比べて低いことがわかる。これらのアミノ酸残基の違いによる S1 ポケットの性質の違いは、ヒト DPP IV が基質ペプチド P1 の Ala や Pro を認識する一方、PmDAP IV は Ala や Pro に加え、Hyp (ヒドロキシプロリン) を認識するという基質 P1 の認識の違いに関与すると考えた。

また、S2 ポケットに関して、ヒト DPP IV では S2 ポケット構成アミノ酸である Phe357 が突き出している構造が特徴的であるが、PmDAP IV ではこのヒト DPP IV の Phe357 と等価な位置にはアミノ酸残基が存在しないため、S2 ポケットはヒト DPP IV に比べて広い。

ダブル Glu モチーフに関しては、ヒト DPP IV は PmDAP IV と同様に基質の N 末端と Glu205・Glu206 とで塩橋を作っている。

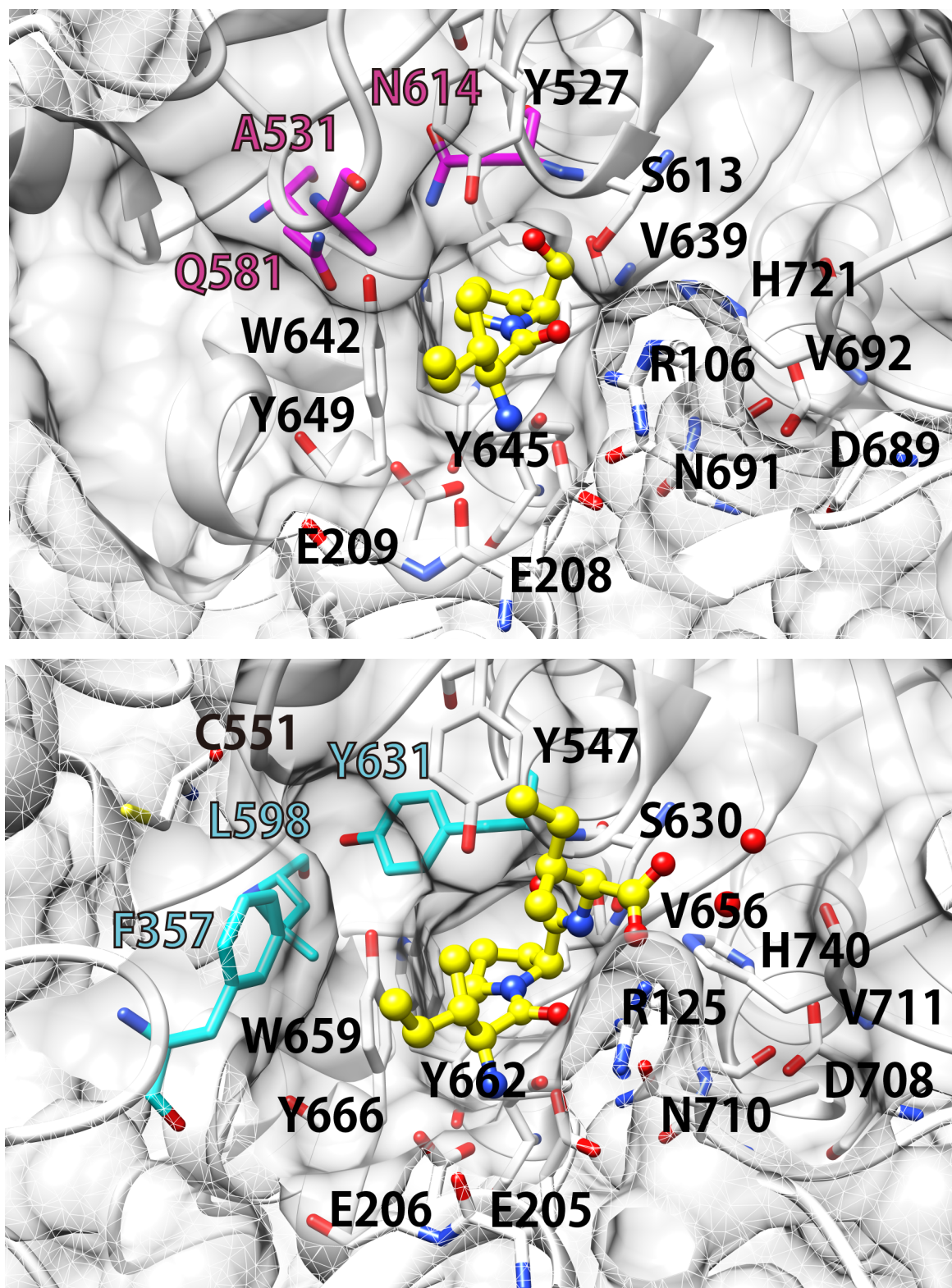


図 23. 活性部位の比較

上 : PmDAP IV 下 : ヒト DPP IV (PDB ID 1WCY)

VI-6 基質ペプチド N 末端認識に関与する二次構造の比較

PmDAP IV と基質・阻害剤との複合体の立体構造解析により初めて明らかになった領域 (Blade 1 と Blade 2 の間の領域) の立体構造は、哺乳類 DPP IV ではどのようになっているのか疑問に思い、PmDAP IV の複合体立体構造とヒト DPP IV の複合体立体構造を比較した。

その結果、ヒト DPP IV において、PmDAP IV の Arg106 を含む短いヘリックス領域と立体構造上で等価な位置に、短いループ構造が存在し、PmDAP IV のようなヘリックス構造は存在しなかった (図 24)。

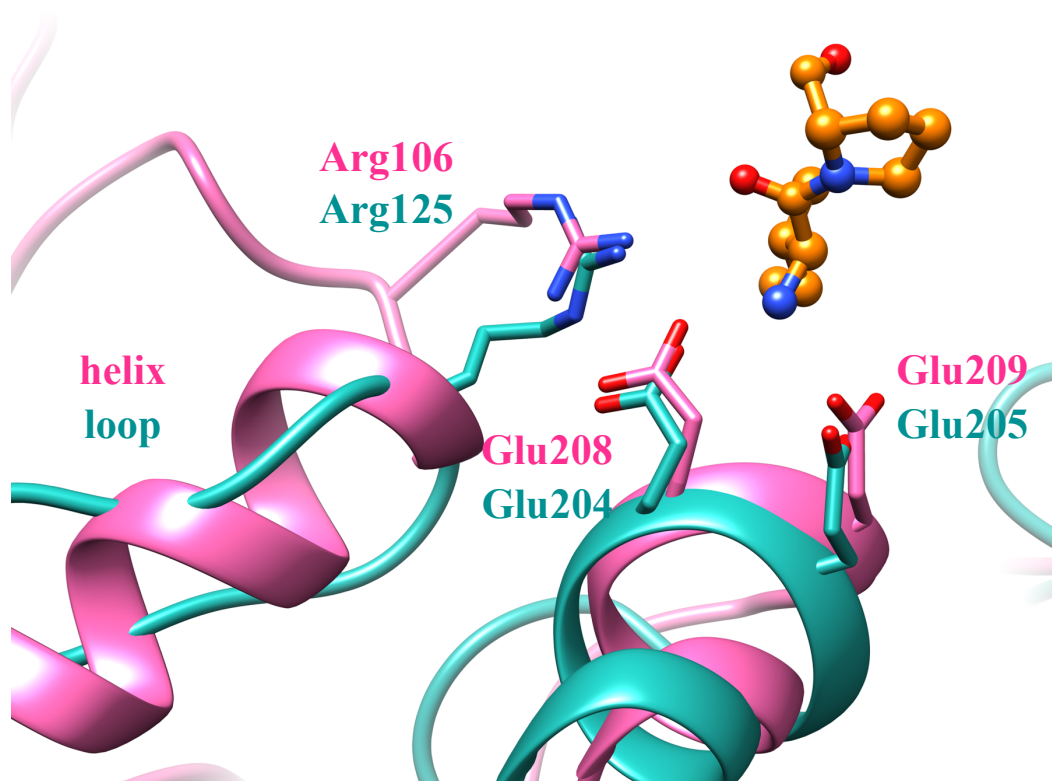


図 24. 基質認識に関与する Arg の比較

PmDAP IV ヒト DPP IV (PDB ID 1WCY)

VI-7 PmDAP IV の Arg106 とヒト DPP IV の Arg125

ヒト DPP IV のループ構造中の Arg125 は、PmDAP IV の Arg106 と等価な位置に存在していた。しかしながら、Arg の側鎖の向きが両者で異なっていた (図 24)。

PmDAP IV の Arg106 の側鎖は、基質 N 末端を認識するダブル Glu モチーフ中の Glu208 の側鎖と向かい合うようにして塩橋を形成していた。

一方、ヒト DPP IV の Arg125 の側鎖は、基質 P1' のカルボニル酸素と塩橋を形成しており、PmDAP IV のようにダブル Glu モチーフ中の Glu の側鎖とは向かい合っていなかった。

つまり、この Arg は、PmDAP IV とヒト DPP IV とで等価な位置に存在しながらも、PmDAP IV では Glu208 を介した基質 N 末端の間接的な認識に関与する一方で、ヒト DPP IV では基質 N 末端の間接的な認識には関与せず、基質 P1' の認識に関与する、という違いが明らかとなった。

さらに、Arg125 を含むヒト DPP IV のループ構造は β プロペラドメインの Blade 2 の 2 目と 3 目の β ストランドの間に存在する一方、Arg106 を含む PmDAP IV のヘリックス構造は β プロペラドメインの Blade 1 と Blade 2 の間に存在していた。

VI-8 結晶構造で見る PmDAP IV とヒト DPP IV の反応中間体

PmDAP IV では、PmDAP IV と Diprotin A (Ile-Pro-Ile) との共結晶化から得られた、PmDAP IV とジペプチド(Ile-Pro)とで形成されるアシル中間体の結晶構造が明らかとなった。また、このようなアシル中間体を形成している例は、Lys-Pro-Tyr と PmDAP IV との共結晶化から得られた Lys-Pro と PmDAP IV の複合体でも見られた。

一方ヒト DPP IV では、PmDAP IV とは異なり、Diprotin A がトリペプチド (Ile-Pro-Ile) としてヒト DPP IV と結合し、四面体型遷移状態中間体を形成している結晶構造が既に明らかになっている^{38,60}。このとき Diprotin A (Ile-Pro-Ile) は、触媒残基 Ser630 と共有結合を形成して存在する例と、共有結合を形成しないで存在する例の 2 通りが報告されている。また、このような四面体型遷移状態中間体を形成している例は、デカペプチドである tNPY (Neuropeptide Y; Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu) とヒト DPP IV の共結晶化から得られた Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp とヒト DPP IV の複合体でも明らかになっている⁶¹。

VI-9 PmDAP IV とヒト DPP IV で異なる中間反応体の結晶構造が見られる理由

上述の Diprotin A の例で述べたように、たとえ基質が同じでも、PmDAP IV ではアシル中間体（反応機構図の (5)）、ヒト DPP IV では四面体型遷移状態中間体（反応機構図の (4)）の結晶構造が見られる。この理由を、両者の Arg による基質認識の違いに着目して考察した。

四面体型遷移状態中間体での基質認識を考えたとき（反応機構図の (4)）、PmDAP IV では Arg106 が基質 P1 の N 末端の認識に間接的に関与する一方で、ヒト DPP IV では、Arg125 は基質 P1' のカルボニル酸素を認識し基質 P1' の安定化に寄与している。

基質 P1' のカルボン酸（カルボニル）がマイナスに帯電しているとする、触媒残基 His のプラスの電荷が安定化する。これにより、基質 P1 と P1' の切断に必要なプロトンは触媒残基 His から基質 P1' の窒素原子に移動しにくくなり、基質の C (P1) -N (P1') の結合は切れにくくなる。ヒト DPP IV では、Arg125 は基質 P1' を認識し基質 P1' を安定化しているため、P1' が触媒残基 His のプラスの電荷を安定化しやすく、四面体型遷移状態中間体を維持しやすいと考えた。

一方の PmDAP IV では、Arg106 は基質 P1' の安定化には寄与しないため、ヒト DPP IV のような四面体型遷移状態中間体の維持が困難であり、アシル中間体の状態に移行しやすいと考えた。

VII

まとめ

VII まとめ

- (1) X線結晶構造解析により、糖非発酵グラム陰性細菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DAP IV (PmDAP IV) のアポ体立体構造、PmDAP IV と Lys-Pro・Ile-Pro・非ペプチド系阻害剤 Inhibitor 1c との複合体立体構造を、それぞれ 2.47Å、1.90Å、2.43Å、2.13Å 分解能で決定した。
- (2) 得られた PmDAP IV の立体構造とヒト DPP IV の立体構造を比較し、立体構造や基質認識の違いを明らかにした。
- ・PmDAP IV は基質結合時に構造変化もしくは Conformational selection (構造選択) を起こすが、ヒト DPP IV では見られない。
 - ・基質 N 末端認識に関与する Arg を含む二次構造が両者で異なる。
 - ・サブサイトを構成するアミノ酸残基の一部が両者で異なり、これが微生物 DAP IV とヒト DPP IV の基質認識の違いに関与している。
 - ・ヒト DPP IV では基質ペプチド P1'位のカルボニル酸素を認識している Arg が、PmDAP IV では立体構造上等価な位置に存在するにもかかわらず、ヒト DPP IV のような P1'の認識はせずに基質 N 末端認識のみに関与していた。
 - ・ヒト DPP IV では四面体型遷移状態中間体を形成している立体構造が得られているが、PmDAP IV とジペプチドとの複合体では、活性部位でアシル中間体を形成しているものが見られた。
- (3) 得られた立体構造情報から、PmDAP IV の基質認識機構を考察した。

以上のように、本研究により微生物 DAP IV に関する新たな知見が得られた。微生物 DAP IV とヒト DPP IV の立体構造上の違いである S1 ポケットの深さや基質認識に関与する二次構造の違いは、微生物 DAP IV を新たな標的分子とした抗菌薬の探索・開発に役立つ可能性がある。

引用文献

1. Neurath, H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350–7 (1984).
2. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Finn, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **44**, D343–D350 (2016).
3. Ogasawara, W., Kobayashi, G., Okada, H. & Morikawa, Y. Two types of novel dipeptidyl aminopeptidases from *Pseudomonas* sp. Strain WO24. *J. Bacteriol.* **178**, 6288–6295 (1996).
4. Sakamoto, Y. *et al.* S46 peptidases are the first exopeptidases to be members of clan PA. *Sci. Rep.* **4**, 4977 (2014).
5. Suzuki, Y. *et al.* Identification of the catalytic triad of family S46 exopeptidases, closely related to clan PA endopeptidases. *Sci. Rep.* **4**, 4292 (2014).
6. Polgár, L. Cellular and Molecular Life Sciences The prolyl oligopeptidase family. **59**, 349–362 (2002).
7. Ogasawara, W., Ogawa, Y., Yano, K., Okada, H. & Morikawa, Y. Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Pseudomonas* sp. WO24. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 2032–7 (1996).
8. Ogasawara, W. *et al.* Isoforms of dipeptidyl aminopeptidase IV from *Pseudomonas* sp. WO24: Role of the signal sequence and overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **41**, 241–251 (2005).
9. Ogasawara, W. *et al.* A novel dipeptidyl aminopeptidase from *Pseudomonas* sp. strain WO24. *J. Bacteriol.* **178**, 1283–1288 (1996).
10. Ogasawara, W., Kobayashi, G., Ishimaru, S., Okada, H. & Morikawa, Y. The gene encoding dipeptidyl aminopeptidase BI from *Pseudomonas* sp. WO24: Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Gene* **206**, 229–236 (1998).
11. Ohara-Nemoto, Y. *et al.* Asp- and Glu-specific Novel Dipeptidyl Peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* Ensures Utilization of Proteinaceous Energy Sources. *J. Biol. Chem.* **286**, 38115–38127 (2011).
12. Mentlein, R., Gallwitz, B. & Schmidt, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem* **214**, 829–835 (1993).
13. Kieffer, T. J., McIntosh, C. H. & Pederson, R. A. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* **136**, 3585–96 (1995).
14. Barnett A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract.* **60**, 1454–70 (2006).
15. L., J.-J. & Juillerat-Jeanneret, L. Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for

- type 2 diabetes and what else? *J. Med. Chem.* **57**, 2197–2212 (2014).
16. Doki, S. *et al.* Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 11343–11348 (2013).
 17. Yoshimoto, T. & Tsuru, D. Proline-Specific Dipeptidyl Aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*1. *J. Biochem* **91**, 1899–1906 (1982).
 18. Cox, S. W. & Eley, B. M. Detection of cathepsin B- and L-, elastase-, trypsin-, and dipeptidyl peptidase IV-like activities in crevicular fluid from gingivitis and periodontitis patients with peptidyl derivatives of 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin. *J. Periodontal Res.* **24**, 353–361 (1989).
 19. Mayo, B. *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus latis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 38–44 (1991).
 20. Kabashima, T., Ito, K. & Yoshimoto, T. Dipeptidyl Peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: Sequencing and Expression of the Enzyme Gene and Characterization of the Expressed Enzyme. *J. Biochem* **120**, 1111–1117 (1996).
 21. Shibata, Y., Miwa, Y., Hirai, K. & Fujimura, S. Purification and partial characterization of a dipeptidyl peptidase from *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**, 196–8 (2003).
 22. Monod, M. *et al.* Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology* **151**, 145–155 (2005).
 23. Tachi, H., Ito, H. & Ichishima, E. An X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Phytochemistry* **31**, 3707–3709 (1992).
 24. Beauvais, A. *et al.* Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infect. Immun.* **65**, 3042–3047 (1997).
 25. Hopsu-Havu, V. K. & Glenner, G. G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl- β -naphthylamide. *Histochemie* **7**, 197–201 (1966).
 26. Oya, H., Nagatsu, I. & Nagatsu, T. Purification and properties of glycylprolyl - naphthylamidase in human submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **258**, 591–9 (1972).
 27. Barth, A., Schulz, H. & Neubert, K. [Studies on the purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase IV]. *Acta Biol. Med. Ger.* **32**, 157–74 (1974).
 28. Yoshimoto, T. & Walter, R. Post-proline dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase IV) from lamb kidney. Purification and some enzymatic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **485**, 391–401 (1977).
 29. Yoshimoto, T., Kita, T., Ichinose, M. & Tsuru, D. Dipeptidyl Aminopeptidase IV from Porcine Pancreas. *Biochem* **92**, 275–282 (1982).
 30. Bostanci, N. & Belibasakis, G. N. *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive

- opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **333**, 1–9 (2012).
31. Brooke, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 2–41 (2012).
 32. Grenier, D., Gauthier, P., Plamondon, P., Nakayama, K. & Mayrand, D. Studies on the aminopeptidase activities of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**, 212–217 (2001).
 33. Nabeno, M. *et al.* A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 191–196 (2013).
 34. Augeri, D. J. *et al.* Discovery and preclinical profile of saxagliptin (BMS-477118): A highly potent, long-acting, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.* **48**, 5025–5037 (2005).
 35. Engel, M. *et al.* The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5063–5068 (2003).
 36. Hiramatsu, H. *et al.* The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed propeller fold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 849–854 (2003).
 37. Rasmussen, H. B., Branner, S., Wiberg, F. C. & Wagtmann, N. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 19–25 (2003).
 38. Thoma, R. *et al.* Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure* **11**, 947–959 (2003).
 39. Abbott, C. A., Mccaughan, G. W. & Gorrell, M. D. Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted L propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Lett.* **458**, 278–284 (1999).
 40. Nakajima, Y. *et al.* Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* exhibits activity against a substrate containing a 4-hydroxyproline residue. *J. Bacteriol.* **190**, 7819–7829 (2008).
 41. Rea, D. *et al.* Crystal structure of *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase 4 and structure-activity relationships based on inhibitor profiling. *Eur. J. Med. Chem.* **139**, 482–491 (2017).
 42. Jancarik, J. & Kim, S.-H. FAST COMMUNICATIONS Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst* **24**, 409–411 (1991).
 43. Winter, G. Xia2: An expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J. Appl. Crystallogr.* **43**, 186–190 (2010).
 44. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).

45. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
46. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25 (2010).
47. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
48. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
49. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* **3**, 1171–9 (2008).
50. Vogt, A. D., Pozzi, N., Chen, Z. & Di Cera, E. Essential role of conformational selection in ligand binding. *Biophys. Chem.* **186**, 13–21 (2014).
51. Weikl, T. R. & Paul, F. Conformational selection in protein binding and function. *Protein Sci.* **23**, 1508–1518 (2014).
52. Umezawa, H. *et al.* Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **37**, 422–425 (1984).
53. Rahfeld, J., Schierborn, M., Hartrodt, B., Neubert, K. & Heins, J. Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1076**, 314–316 (1991).
54. Bjelke, J. R. *et al.* Tyrosine 547 constitutes an essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **279**, 34691–34697 (2004).
55. Henderson, R. Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl-alpha-chyotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **54**, 341–54 (1970).
56. Robertus, J. D., Kraut, J., Alden, R. A. & Birktoft, J. J. Subtilisin; a Stereochemical Mechanism Involving Transition-State Stabilization. *Biochemistry* **11**, 4293–4303 (1972).
57. Wright, S. W. W. *et al.* cis-2,5-dicyanopyrrolidine inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: Synthesis and in vitro, in vivo, and x-ray crystallographic characterization. *J. Med. Chem.* **49**, 3068–3076 (2006).
58. Branden, C. & Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*. (Garland Publishing, Inc., 1991).
59. Kraut, J. Serine Proteases: Structure and Mechanism of Catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331–358 (1977).
60. Engel, M. *et al.* Rigidity and flexibility of dipeptidyl peptidase IV: Crystal structures of and docking experiments with DPIV. *J. Mol. Biol.* **355**, 768–783 (2006).

61. Aertgeerts, K. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci.* **13**, 412–421 (2004).

謝辞

本研究を行うにあたり、多くのご指導を賜りました野中孝昌教授、阪本泰光准教授、西谷直之教授に深く感謝いたします。

館岡千佳さん、藤本真友さん、森澤さおりさん、飯塚一平さんをはじめ本研究と一緒に進めた仲間に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者である長岡技術科学大学の小笠原渉教授、志田洋介助教、鈴木義之博士、伊藤康広さん、中村彰宏さん、本間宜行さん、昭和大学の田中信忠准教授、宇宙航空研究開発機構の太田和敬主任開発員、山田貢主任開発員、木平清人主任開発員、吉崎泉技術領域主幹、コンフォーカルサイエンスの田仲広明博士、丸和栄養食品の伊中浩治博士、大阪大学蛋白質研究所の中川敦史教授、松本愛弥さん、堤研太さんに深く感謝いたします。

PmDAP IV 結晶の回折強度データ収集は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー (2011G090, 2013G138, 2017G162) と SPring-8 (2013A6822, 2013B6822, 2014A6924, 2014B6924, 2015A6521, 2015B6521, 2016B6620, 2017A6721, 2017B6721)で行われました。

本研究は、長井記念薬学研究奨励支援、科学研究費補助金 (17H3790, 16H04902, 16K08322, 25462872), 私立大学戦略的研究基盤形成事業および創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業, 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業、大阪大学蛋白質研究所共同研究員制度 (超分子構造解析学研究室 CR1405, CR1505, CR1605, CR1705)、武田科学振興財団薬学研究奨励の支援により実施しました。

最後に、構造生物薬学講座の皆さま、家族に深く感謝いたします。