

ヒト由来自己分泌型がん細胞運動刺激因子の活性阻害機構

田中信忠¹、羽賀新世²、上村洋史¹、秋山浩子¹、船坂龍善²、永瀬久光²、Avraham Raz³、中村和郎¹

¹昭和大学薬学部、²岐阜薬科大学、³Wayne State University School of Medicine

Inhibition Mechanism of Human Autocrine Motility Factor

Nobutada TANAKA¹, Arayo HAGA², Hiroshi UEMURA¹, Hiroko AKIYAMA¹, Tatsuyoshi FUNASAKA²,
Hisamitsu NAGASE², Avraham RAZ³, Kazuo T. NAKAMURA¹

¹School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, ²Gifu Pharmaceutical University,

³Wayne State University School of Medicine, Detroit, USA

1. はじめに

日本人の主要な死因が感染症から成人病、いわゆる生活習慣関連病へと移行する中で、がんは、1981年以来日本人の死亡原因第一位の座を守り続け、疾病対策上の最重要課題として対策が進められてきた。平成12年の統計では、日本人の死因の30%もが、がんによるものであり、死因の第二位、三位（各々15%程度）を占める心疾患や脳血管疾患の二倍もの割合に相当している。科学技術の進歩による、がんの診断・治療法のめざましい発展にも関わらず、依然としてがんが致死の疾病として恐れられている原因の一つは、がんが「転移」・「再発」することである。がん転移に注目する研究者達は、「転移を制するものは、がんを制する。」即ち、「転移を制圧できなければ、がんを制圧できない！」をスローガンに、日夜研究に励んでいる。がん転移成立の過程（血行性転移の場合）は、おおまかに、次のようなステップに分けて考えられている。原発巣からの腫瘍細胞の遊離、血管内への侵入、血管内を血流に乗って移動、標的臓器の血管内皮に接着、血管外に脱出、そして標的臓器内での増殖というステップである。腫瘍細胞の転移の達成には、原発巣より転移巣への移動が不可欠であるため、細胞レベルでの移動には細胞自体の固有運動能が関与すると考えられている。

近年、自己分泌（autocrine）または傍分泌（paracrine）、ないしはその両方によって、腫瘍細胞の運動を刺激するサイトカイン類が報告されている。これらの中で、腫瘍細胞のchemotaxis（走化性）及びchemokinesis（方向性を無視した運動能）を刺激する能力を持っているものが、自己分泌型がん細胞運動刺激因子（autocrine motility factor, 以下AMF）である。1986年にNIHのLiottaらが、ヒト黒色腫細胞より、細胞運動刺激活性を有する55kDaの蛋白質の分離・精製に成功し、これをヒトAMF（human AMF, 以下hAMF）として報告した[1]。1996年には、共同研究者であるWayne State大のRazらによってhAMFの1次構造が決定され[2]、1998年にcDNAクローニングがなされた[3]。興味深いことに、AMFは細胞内糖代謝酵素であるphosphoglucose isomerase（以下PGI）と同一のアミノ酸配

列を示し、実際にPGI活性を有している。逆にウサギPGI（rabbit PGI, 以下rPGI）は、マウス線維芽細胞の運動を刺激するAMF活性を持つ。また、AMFは、細胞外サイトカインであるneuroleukin（以下,NLK）や成熟因子（maturation factor, 以下MF）とも同一蛋白質である。

一方、ヒトAMF受容体（human autocrine motility factor receptor, 以下hAMFR）は、1990年にRazらによって単離され[4]、1999年にヒト及びマウスAMFRの全長cDNAクローニングがなされ[5]、hAMFRが、RING-H2 motifやleucine zipperを用いて2量体を形成すると推定される、新規の7回膜貫通型G蛋白質共役受容体であることが明らかにされた。

2001年には、hAMFと遺伝子配列上同一であるヒトPGI（以下hPGI）の結晶構造が報告された[6]。細胞内酵素であるPGIの3次構造や4次構造に基づき、異性化酵素としての触媒メカニズムや溶血性貧血に関連するhPGIの変異は詳細に記述されるようになったが、細胞外サイトカインとしてのAMF/NLK/MFの構造活性相関、4次構造情報は殆ど報告されていなかった。従って、AMFの立体構造に関する研究および細胞外サイトカインとしてのAMFの立体構造に基づいた生化学的研究は、その知見を腫瘍細胞の運動能の制御等に役だてる上で重要である。

我々は、阻害剤非結合型のオープン型hAMFの結晶構造とAMFに対する強力な阻害剤の一種であるerythrose 4-phosphate（以下、E4P）結合型のクローズド型hAMFの結晶構造を、それぞれ分解能1.9 Åと2.4 Åにて決定した[7,8]。両者の結晶構造の比較から、阻害剤結合部位周辺にコンフォメーション変化が起こることが明らかとなった。E4PはAMF活性阻害能を持つ最小の化合物の一つであるが、高濃度においては細胞毒性を示し、薬物とは成り得ない。結晶構造の解明は、より効果的かつ細胞毒性の少ないAMF阻害剤のリード化合物のデザインに繋がると期待できる。本稿では、PFのタンパクビームライン（BL-6A, BL-18B）を用いることにより成し遂げられた実験結果及び得られた知見について簡単に紹介する。なお、この研究成果は、幸運にも*J. Mol. Biol.* 誌の表紙に採用された[8]。

2. 実験

2.1 蛋白質の発現・精製と結晶化

hAMF (558 アミノ酸残基) とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質 (GST-hAMF) を、大腸菌内で発現させ、精製した。発現ベクターとしては、pGEX-6P (アマシャムバイオサイエンス社) を用いた。このベクターを用いて発現させた融合蛋白質には、GST 融合プロテアーゼである PreScission Protease (アマシャムバイオサイエンス社) による切断配列が含まれている。従って、(1) グルタチオンセファロースカラムに GST-hAMF を結合させ、(2) カラム内で上記プロテアーゼによる切断を行い (プロテアーゼは、カラムに結合する)、(3) 切断された hAMF のみを溶出して回収するという手順により、一段階のカラム操作だけで、純度 90% 以上の hAMF 標品を得ることができた。

結晶化条件のスクリーニングの結果、バッファー: 0.1M カコジル酸ナトリウム、塩: 0.2M 酢酸ナトリウム、沈殿剤: 28(w/v)% ポリエチレングリコール 8000 (PEG8000)、添加剤 (抗凍結剤): 20(v/v)% グリセロール、pH6.5、温度 20 °C、hAMF 濃度: 8.0mg/mL という条件において、空間群 $P2_12_12_1$ 、格子定数 $a = 80.77 \text{ \AA}$, $b = 107.4 \text{ \AA}$, $c = 270.8 \text{ \AA}$ 、結晶のサイズが最大で $0.05 \times 0.05 \times 0.8 \text{ mm}^3$ 程度の細い柱状結晶を得ることができた (Fig. 1)。

また、共結晶化法により、種々の阻害剤 (リン酸化 4~6 炭糖) との複合体結晶の調製を試みた。いずれも阻害剤を含まない場合と同様の条件で、同様の外見の細い柱状結晶は得られたものの、X 線回折実験に使用できる大きさに成長しなかった。そこで、AMF 活性阻害能を持つ最小の化合物の一つである E4P を 5 mM の濃度となるように阻害剤を含まない結晶が析出しているドロップレットに添加するという手法により、複合体結晶を調製した。得られた hAMF / E4P 複合体結晶の結晶学的パラメータは、空間群

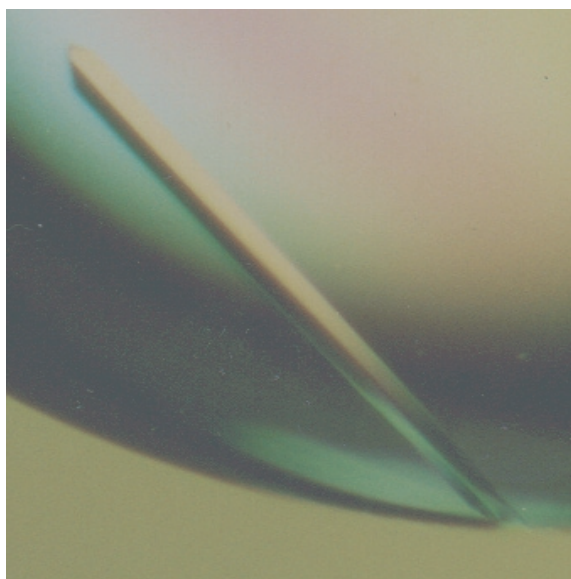


Figure 1
Crystal of human AMF.

$P2_12_12_1$ 、格子定数 $a = 80.65 \text{ \AA}$, $b = 107.8 \text{ \AA}$, $c = 270.3 \text{ \AA}$ であった。

2.2 結晶構造解析

阻害剤非結合型 hAMF に関しては、PF の BL-18B において、低温 (100K) 下で、1.9 Å 分解能までの回折強度データを収集した。低温回折実験に都合が良いように、沈殿剤および蛋白質溶液共に 20% グリセロール存在下で結晶化を行っていたため、低温実験時の抗凍結剤の添加は不要であった。rPGI (PDB code: 1DQR) をモデルとした分子置換法により位相を決定した。位相決定の後、XtalView を用いた分子モデルの構築及び REFMAC による構造精密化を行った結果、結晶学的信頼度因子は、 $R = 0.167$, $R_{\text{free}} = 0.198$ (1.9 Å 分解能) となった。hAMF / E4P 複合体結晶に関しては、PF の BL6A において、低温 (100K) 下で、2.4 Å 分解能までの回折強度データ収集を行った。阻害剤非結合型 hAMF の精密化後のモデルを用いた差フーリエ法により位相を決定し、構造精密化を行った結果、結晶学的信頼度因子は、 $R = 0.193$, $R_{\text{free}} = 0.241$ (2.4 Å 分解能) となった (Table 1 - Appendix)。

Fig. 2 からも明らかのように、阻害剤非結合型 hAMF 結晶の回折能は、非対称単位中に 2200 アミノ酸残基以上 (約 250 kDa) を含むにも関わらず、1.7 Å 分解能以上であると見積られる。しかし、hAMF の結晶は c 軸が長く (約 270 Å)、回折斑点を分離するためには、結晶と検出器との間をある程度以上離さなければならなかった。機会があれば、より面積の大きい検出器を用いて、hAMF の高分解能の回折強度データを収集したいと考えている。

2.3 変異蛋白質の調製とその機能解析

既報の種々の知見や今回の立体構造解析の結果から導かれた、E4P による AMF のサイトカイン活性阻害機構の仮説 (後述) を検証するため、hAMF の阻害剤結合部位に位置するアミノ酸残基の置換体を 2 種類調製した。野生型 hAMF およびそれら置換体 hAMF の細胞運動刺激活性を、金コロイド法により評価した。金コロイド法とは、コロイド状の金を付着させたカバーガラス上に細胞を蒔き、その運動軌跡上に形成された金の欠損部の面積を計算することにより、細胞の運動能を測定する方法である。

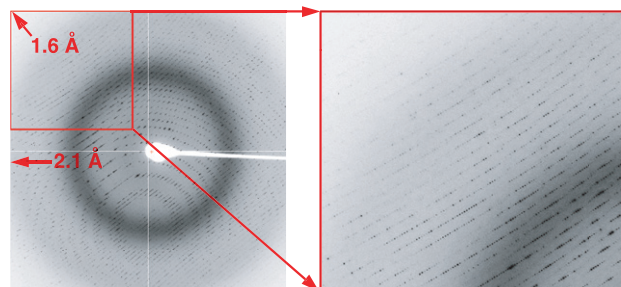


Figure 2
Diffraction pattern of human AMF crystal. Crystal-to-detector distance was 200 mm ($\lambda = 1.00 \text{ \AA}$).

3. 結果と考察

3.1 hAMF の立体構造

結晶構造解析の結果、AMF は単量体蛋白質であるとの既報 [1] とは異なり、hAMF は 2 量体として存在することが明らかとなった (Fig. 3)。各々のサブユニットは、3 つのドメイン (large, small, C-terminal) から構成されていた。サブユニット間の接触は、主として各々のサブユニットの large ドメインと C-terminal ドメインとの間に見られ、hook 領域が右手 (Fig. 3a)、C-terminal ドメインが左手 (Fig. 3b) とみなすと、2 つのサブユニットが抱き合うような形で会合していると表現できる。この入り組んだ会合様式から、hAMF の 2 量体は、生理的条件下でも存在することが強く示唆された。

我々は、AMF の 2 量体が結晶格子中だけでなく、生理的条件下でも存在することを証明するため、腫瘍細胞の培養上清に分泌される hAMF の架橋実験を行った。この場合、培養上清を濃縮してから架橋すると、高濃度になったため会合し易くなったのではないかという疑念が生じるという点を注意せねばならなかった。そこで、第一に腫瘍細胞の培養上清に架橋剤 (dithiobis succinimidyl propionate, 以下 DSP) を加え架橋反応を行い、次いで濃縮を行った後に SDS-PAGE を行い、抗 hAMF 抗体を用いたウエスタンブ

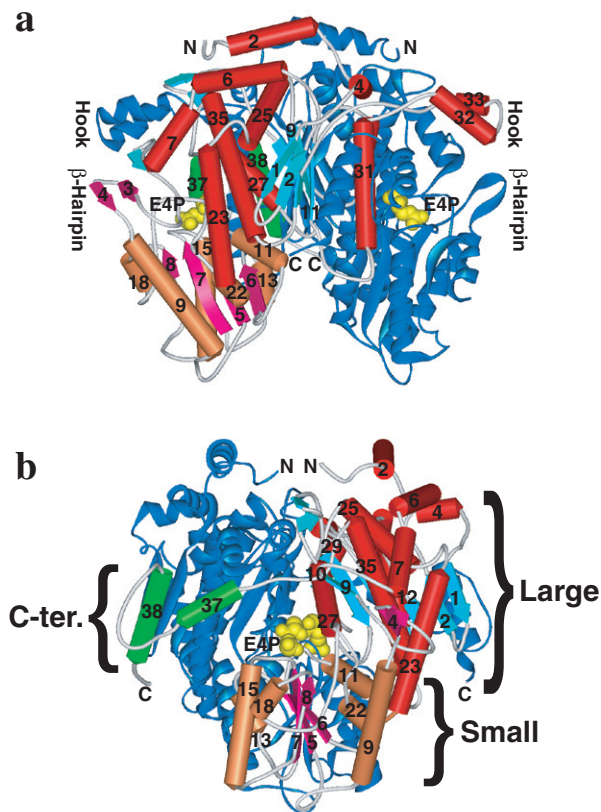


Figure 3
Dimeric structure of human AMF / E4P complex. One subunit is colored blue; the other is colored red and cyan for the large domain, orange and magenta for the small domain, and green for the C-terminal domain. The molecules of bound E4P (yellow) are shown as space-filling models for each of the two subunits. (a) Front view of the molecule. (b) Side view of the molecule. The view in (b) was obtained by rotating the view in (a) by 90°.

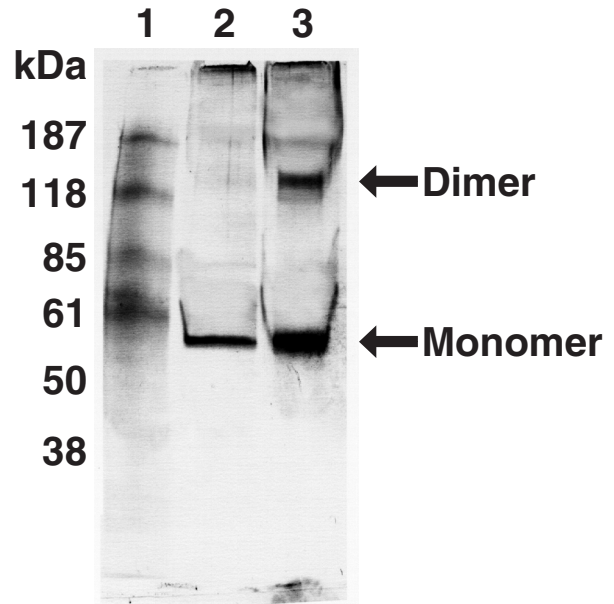


Figure 4
Western blot analysis of tumor-secreted human AMF. A cross-linked sample was subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, control (without cross-linker); and lane 3, DSP-treated sample.

ロットリング法により、hAMF を検出した (Fig. 4)。Fig. 4 から明らかなように、DSP 非存在下では単量体のバンドしか検出されない (Fig. 4, lane 2) が、DSP を用いて架橋したサンプルでは、2 量体に相当するバンドがクリアに検出されている (Fig. 4, lane 3)。この結果から、AMF は、生理的条件下においても 2 量体として存在することは明らかであり、我々が決定した結晶構造 (Fig. 3) と一致している。従って、我々は、結晶構造に基づいて、hAMF の機能に関して考察することができる。なお、AMF の 2 量体形成は、AMFR との相互作用に重要であると我々は考えている (後述)。

3.2 阻害剤結合部位および結合による構造変化

AMF と阻害剤との複合体の結晶構造解析の結果、阻害剤である E4P は、2 量体の各サブユニットのドメイン間クレフトに結合していた (Fig. 3)。Fig. 5a に示すように、阻害剤である E4P の電子密度は非常にクリアであった。E4P 分子の配向は、差フーリエマップの等高線のレベルを調整することにより、容易に判別可能であった。等高線のレベルを 10 σ まで上げると、E4P のリン酸基のリン原子の部分のみがピークとして現れた (Fig. 5a, red)。等高線のレベルを 4 σ 程度とすると、E4P 分子の全ての酸素原子の位置が明確になった (Fig. 5a, violet)。非対称単位中の 4 つのサブユニットの全てのドメイン間クレフトに、同様のクリアな電子密度が見られた。E4P と hAMF との間の相互作用は、主として水素結合によるものであった (Fig. 5b)。負電荷を持ったリン酸基と正電荷を持った蛋白質表面の Arg, Lys 等の側鎖との間の静電的相互作用は、今回の hAMF / E4P 複合体中では見られなかった。E4P のリン酸基は、Ser160, Ser210, Thr212, Thr215 の側鎖の水酸基なら

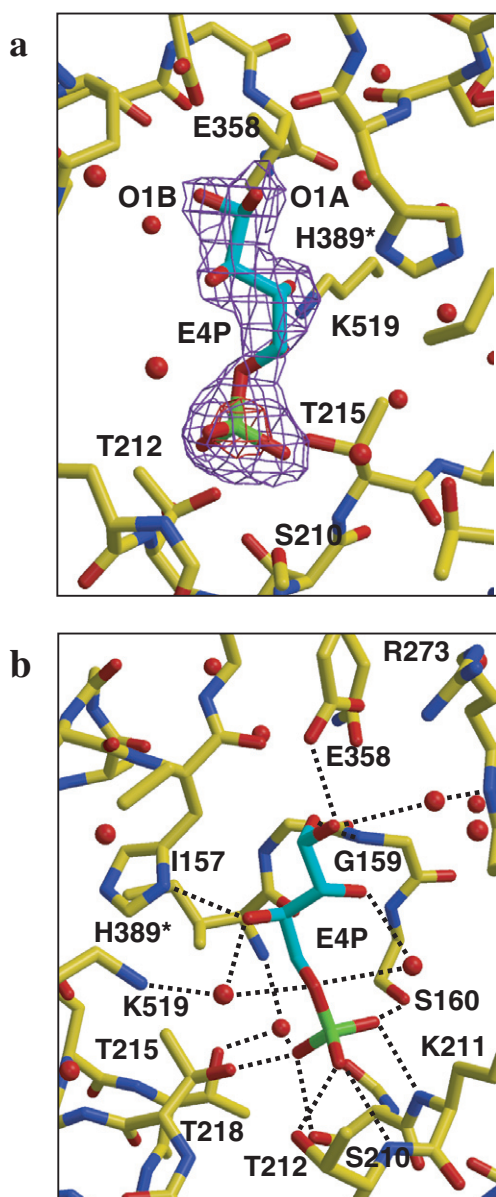


Figure 5
 Inhibitor (E4P)-binding site of human AMF / E4P complex. The carbon and phosphorus atoms of the bound E4P molecule are shown in cyan and green, respectively. The bound water molecules are shown as ball models. (a) The Fo-Fc omit electron density map (calculated at 2.4 Å resolution and contoured at 10.0σ (red) and 4.0σ (violet)) showing the E4P molecule. (b) The model of E4P binding to the inhibitor-binding site of human AMF. Possible hydrogen bonds are indicated by broken lines.

びに Lys211, Thr212 の主鎖の窒素原子と強固に相互作用していた。2 量体を形成するもう一方のサブユニットに属する His389 (His389*) と E4P の 3 位の水酸基との間に水素結合が見られた。E4P 分子のリン酸基と蛋白質表面との間の相互作用および糖部分と蛋白質表面との間の相互作用を比較すると、明らかに前者の方がより強固である。

阻害剤非結合型 hAMF と阻害剤結合型 hAMF の立体構造を比較してみると、E4P 結合部位周辺において、阻害剤の結合によるローカルな構造変化（オープン型からクローズド型）が見られた (Fig. 6)。両者の構造は同型の結晶を用いて決定されたものなので、Fig. 6 に見られる構造の

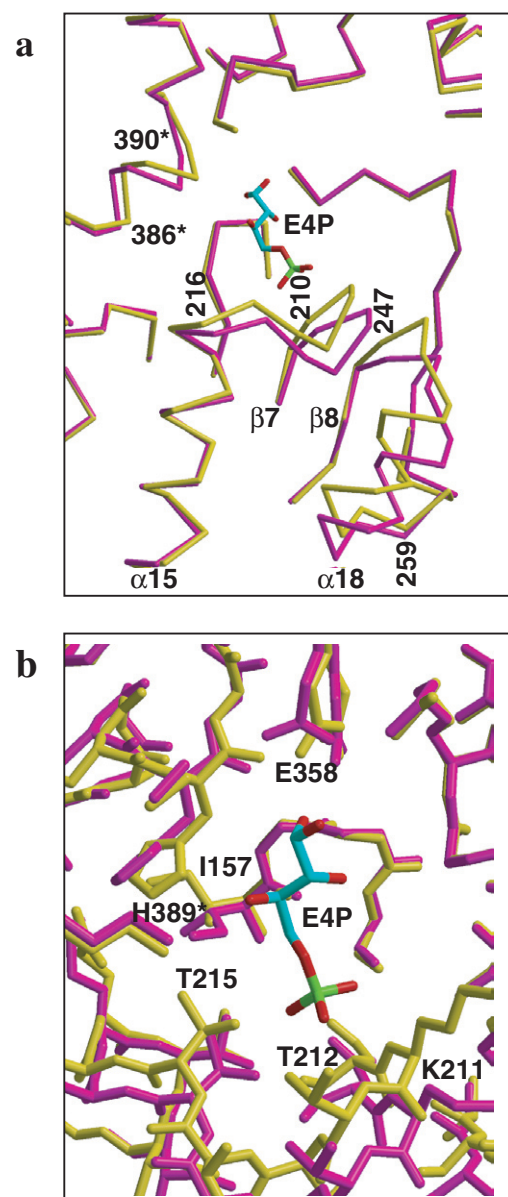


Figure 6
 Comparison of the crystal structure of inhibitor-free human AMF (magenta) and that of inhibitor (E4P)-bound human AMF (yellow) showing the conformation changes upon inhibitor binding. The bound E4P molecule is colored as in Fig. 5. (a) A wide view of the inhibitor-binding site. (b) Close view of the inhibitor-binding site.

違いは、結晶格子内の分子のパッキングの違いによって生じたものではない。また、阻害剤非結合型 hAMF の結晶の結晶学的に独立な非対称単位中の 4 サブユニット全てがオープン型構造であり、hAMF / E4P 複合体結晶中の結晶学的に独立な非対称単位中の 4 サブユニット全てがクローズド構造をとっていることから、Fig. 6a に示した構造変化が、E4P の結合によって生じたものと考えられる。最も顕著な構造変化は、E4P のリン酸基と相互作用するアミノ酸残基が密集している残基番号 210-216 のループ部分に見られた。E4P 結合部位を拡大表示してみると、Ser160, Ser210, Thr212, Thr215 の側鎖が E4P のリン酸基と相互作用できるように、これらの側鎖を含むループ自体に構造変化が生じていることが分かる。また、His389* の

側鎖に、E4Pの3位の水酸基との水素結合を可能とするような構造変化（主として側鎖の2面角 χ_2 の変化）が生じている。

3.3 リン酸化糖による活性阻害機構の作業仮説と機能解析による仮説の検証

既報の種々のデータ及び今回の立体構造解析の結果から、E4P等のリン酸化単糖によるAMFのサイトカイン活性阻害機構として、2つの仮説を立てることができる。一つの仮説は、「AMFによる糖蛋白質AMFRの糖鎖の認識を、E4Pが競合阻害する。」というものであり、もう一つの仮説は、「E4Pの結合によって生じた構造変化（Fig. 6）が、AMFとAMFRとの間の蛋白質間相互作用に影響を与える（AMFの構造変化により、相互作用が弱くなる）。」というものである。

前者の仮説を検証するため、hAMFの阻害剤結合部位に位置するアミノ酸残基の置換体を2種類調製し、それらの細胞運動刺激活性を評価した。置換体の一つは、E4Pの水酸基と水素結合するHis389をPheに置換（H389F置換体）することにより、水素結合能を失わせ、hAMFによる糖の水酸基認識の重要性を評価するというものであった。もう一つは、E4Pのリン酸基と水素結合するThr215をAspに置換（T215D置換体）することにより、互いの負電荷による静電的反発を生じさせ、hAMFとリン酸基との結合の重要性を評価するというものであった。その結果をTable 2に示す。いずれの置換体（T215D, H389F）においても、AMF刺激を与えない場合（Control）と同等の細胞運動能しか観察されないことから、これらの置換体においては、サイトカイン活性が劇的に低下していることは明らかである。この実験結果は、AMFがサイトカインとしての機能を果たすために、これらの残基が重要であることを示している。そして、これらの残基がE4Pの認識に直接関与しているという結晶構造解析の結果と合わせて考えると、これらの残基が、AMFRの糖鎖の認識に関与しているのではないかと推測され、E4PによるAMFのサイトカイン活性の阻害機構として、AMFによるAMFRの糖鎖認識を競合するのではないかとこの仮説の妥当性が示唆される。

後者の仮説を検証することは難しいが、後者の仮説を否定するような、2つのデータが他のグループから報告されている。やや難解な話になるので、ここでは触れない。今

Table 2 Cell motility-stimulating activities of wild-type and mutant human AMFs

| | Cell motility [$\mu\text{m}^2/\text{h}$] | Relative motility |
|-----------|--|-------------------|
| Control* | 10.98 \pm 3.340 (n = 28) | 1.00 |
| Wild type | 19.00 \pm 3.399 [§] (n = 27) | 1.73 |
| T215D | 10.86 \pm 2.539 (n = 28) | 0.99 |
| H389F | 12.36 \pm 2.243 (n = 24) | 1.13 |

*Without AMF. [§]Mean \pm standard deviation.

[§]P < 0.001 by Student's *t* test.

後、後者の仮説を検証するための実験手段をなんとか考えたいと思っている。

3.4 AMF / AMFR 複合体の結合様式

現状では、「AMFによる糖蛋白質AMFRの糖鎖の認識を、E4P等のリン酸化単糖が競合阻害する。」という説を支持する実験データが得られていることから、AMFとAMFRとの結合様式として、我々は、Fig. 7に示すようなモデルを「推定」している。つまり、AMF / AMFR複合体において、蛋白質間相互作用だけではなく、図中の星印で示したAMFRの糖鎖部分とAMFとの相互作用も重要だろうというモデルである。我々は、今回解明したhAMF / E4P複合体の結晶構造は、AMFによるAMFRの糖鎖認識を模倣している（Fig. 7中、星印で示したAMFRの糖鎖先端の大きな星印がE4Pに相当する）のではないかと考えている。また、AMFが結晶中のみならず生理的条件下でも2量体として存在すること（Fig. 4）ならびにAMFRが、RING-H2 motifやleucine zipperを用いて2量体を形成すると推定されていることから、AMFとAMFRの結合比は、2:2であると考えられる。しかし、AMFRおよびAMF / AMFR複合体の立体構造情報が無い以上、AMFとAMFRの結合様式に関する議論は、仮説の域を脱することはできない。

4. まとめ

以上のように、hAMFの阻害剤非結合型およびE4Pとの複合体の結晶構造解析、結晶構造解析によって得られた立体構造情報に基づく置換体の調製およびその機能解析の結果から、E4P等のリン酸化単糖によるAMFのサイトカイン活性阻害機構として、「AMFによる糖蛋白質であるAMFRの糖鎖の認識を、E4Pが競合阻害する。」という仮説が有力となった。今回の結晶構造解析により、hAMFの立体構造および糖鎖認識部位は明らかになったが、7回膜貫通型G蛋白質共役受容体であるAMFRに関しては、未

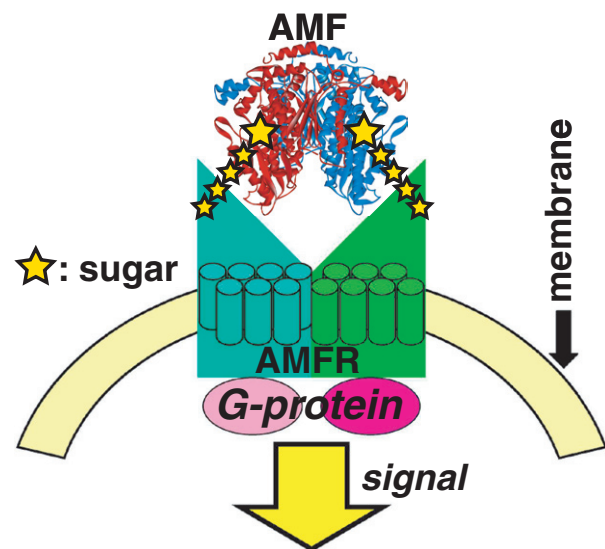


Figure 7 A hypothetical model of AMF / AMFR complex (2:2 complex).

知の点があまりにも多い。AMF-AMFR の相互作用を分子レベルで解明し、その知見をがん転移抑制剤の開発へ役立てるためには、AMFR に関する種々の生化学的解析や立体構造解析が必要である。膜蛋白質である AMFR の結晶化には多大なる困難が予想されるが、一歩ずつ研究を進めて行きたい。

引用文献

- [1] Liotta, L.A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D.A., Gordon, R.K., Chiang, P.K., and Schiffmann, E., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 3302-3306 (1986).
- [2] Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T., and Raz, A., *Cancer Res.* **56**, 2960-2963 (1986).
- [3] Niinaka, Y., Paku, S., Haga, A., Watanabe, H., and Raz, A., *Cancer Res.* **58**, 2667-2674 (1998).
- [4] Nabi, I.R., Watanabe, H., and Raz, A., *Cancer Res.* **50**, 409-414 (1990).
- [5] Shimizu, K., Tani, M., Watanabe, H., Nagamachi, Y., Niinaka, Y., Shiroishi, T., Ohwada, S., Raz, A., and Yokota, J., *FEBS Lett.* **456**, 295-300 (1999).
- [6] Read, J., Pearce, J., Li, X., Muirhead, H., Chirgwin, J., and Davies, C., *J. Mol. Biol.* **309**, 447-463 (2001).
- [7] Uemura, H., Tanaka, N., Funasaka, T., Haga, A., Nagase, H., Raz, A., and Nakamura, K.T., *Protein Peptide Lett.* **8**, 317-322 (2001).
- [8] Tanaka, N., Haga, A., Uemura, H., Akiyama, H., Funasaka, T., Nagase, H., Raz, A., and Nakamura, K.T., *J. Mol. Biol.* **318**, 985-997 (2002). [cover illustration of the issue]

著者紹介

田中信忠 Nobutada TANAKA



昭和大学・薬学部・講師

〒142-8555

東京都品川区旗の台 1-5-8

TEL: 03-3784-8200

FAX: 03-3782-5635

e-mail: ntanaka@pharm.showa-u.ac.jp

略歴：1996年3月長岡技術科学大学大学院工学研究科博士後期課程中退（1994年4月から1996年3月まで（財）日本学術振興会特別研究員）、1996年4月昭和大学薬学部助手、2000年11月昭和大学薬学部講師、現在に至る。博士（工学）。

最近の研究：薬物の標的と成り得る蛋白質のX線結晶構造解析。

趣味：スキー（関越道や中央道の渋滞が嫌いなので、空路で北海道へ行きます）。飲酒（日本酒なら厚焼き卵、ワインならチーズ、ビールならソーセージ、洋酒ならレーズンバター等、一応、酒と肴の組み合わせにはこだわります）。

羽賀新世 Arayo HAGA

岐阜薬科大学・助手、博士（薬学）。

上村洋史 Hiroshi UEMURA

昭和大学・薬学部・大学院生（現・CTC ラボラトリーシステムズ勤務）、修士（薬学）。

秋山浩子 Hiroko AKIYAMA

昭和大学・薬学部・大学院生（現・CTC ラボラトリーシステムズ勤務）、修士（薬学）。

船坂龍善 Tatsuyoshi FUNASAKA

岐阜薬科大学・研究生、博士（薬学）。

永瀬久光 Hisamitsu NAGASE

岐阜薬科大学・教授、博士（薬学）。

Avraham RAZ

Professor of Wayne State University School of Medicine, Ph.D.

中村和郎 Kazuo T. NAKAMURA

昭和大学・薬学部・教授、博士（薬学）。

*(Appendix)***Table 1.** Data collection and refinement statistics for human AMF

| Data set (PDB code) | Free (1JIQ) | E4P complex (1IRI) |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Crystallographic parameters | | |
| Space group | $P2_12_12_1$ | $P2_12_12_1$ |
| Cell dimensions (Å) | $a = 80.77, b = 107.4, c = 270.8$ | $a = 80.65, b = 107.8, c = 270.3$ |
| Data collection statistics | | |
| Resolution (outer shell) (Å) | 1.9 (2.0 - 1.9) | 2.4 (2.53 - 2.40) |
| No. of observed reflections | 1,350,454 | 550,782 |
| No. of unique reflections | 183,392 | 92,870 |
| Multiplicity | 7.4 (4.4) | 5.9 (6.0) |
| Mean $\langle I/\sigma(I) \rangle$ | 4.6 (2.4) | 7.3 (2.1) |
| R_{sym} (%) | 10.8 (30.5) | 9.0 (35.7) |
| Completeness (%) | 98.7 (92.1) | 100 (99.9) |
| Refinement statistics | | |
| Resolution range (outer shell) (Å) | 36 - 1.9 (1.95 - 1.90) | 25 - 2.4 (2.46 - 2.40) |
| No. of reflections | | |
| Working set | 174,100 | 88,274 |
| Test set | 9,195 | 4,595 |
| R -factor | 0.167 (0.206) | 0.193 (0.214) |
| Free R -factor | 0.198 (0.244) | 0.241 (0.306) |
| No. of protein atoms* | 17,784 (4,446 x 4) [#] | 17,784 (4,446 x 4) |
| No. of water molecules | 1,475 | 432 |
| RMSD | | |
| Bond distances (Å) | 0.010 | 0.013 |
| Bond angles (°) | 1.321 | 1.528 |

*C-terminal residue (Gln558) is not included in each of the four subunits in an asymmetric unit (ASU).

[#]There are four crystallographically independent subunits (two homo dimers) per ASU ($2 \times 2 \times 558$ a.a.).