

## X線結晶構造解析によるマウス由来ガレクチン9 N末端糖鎖認識ドメインの糖鎖結合様式の研究

長江雅倫<sup>1</sup>, 西望<sup>2</sup>, 村田健臣<sup>3</sup>, 碓氷泰市<sup>3</sup>, 中村隆範<sup>2</sup>, 若槻壮市<sup>1</sup>, 加藤龍一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>KEK・物質構造科学研究所・PF・構造生物学研究センター, <sup>2</sup>香川大学医学部, <sup>3</sup>静岡大学農学部

### Crystal structure of the mouse galectin-9 N-terminal Carbohydrate Recognition Domain reveals the basic mechanism of carbohydrate recognition

Masamichi Nagae<sup>1</sup>, Nozomu Nishi<sup>2</sup>, Takeomi Murata<sup>3</sup>, Taichi Usui<sup>3</sup>, Takanori Nakamura<sup>2</sup>, Soichi Wakatsuki<sup>1</sup>,  
 Ryuichi Kato<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Structural Biology Research Center, PF, IMSS, KEK

<sup>2</sup>Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, Kagawa University

<sup>3</sup>Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University

#### 1. はじめに

“糖鎖”は一般には馴染みが薄いかもしれないが、生物の体を構成する重要な成分の一つである。現に私達の細胞に含まれる蛋白質の多くは糖鎖による修飾を受けており、また細胞膜表面は糖鎖で覆われている。身近な例としては血液型なども糖鎖構造により分類される。糖鎖の機能の解明については現在進行形の部分もあるが、蛋白質の品質管理や免疫応答など生命活動の根幹に関わる現象で重要な働きをしていることが既に明らかになっている。

“糖鎖”という呼び方は“核酸”や“蛋白質”という言葉と同じで総称に過ぎない。実際には10種類程度の単糖がグリコシド結合を介して複数の糖残基が重合したもので、その長さや組み合わせによって多くのバリエーションが存在する。こうした“糖鎖”を認識して結合する蛋白質の一群が“レクチン”である。レクチンは原始的な生物から高等生物に至るまであらゆる生物に存在し、結合する糖鎖(リガンド)やアミノ酸配列の違いから多くのファミリーが同定されている。このうち本稿の主役であるガレクチンファミリーは、βガレクトシドに特異的に結合するレクチンの総称で、菌類から哺乳類まで広く分布している。ファミリー内のアミノ酸配列相同性は高く、糖鎖結合ドメイン(Carbohydrate Recognition Domain; CRD)という約130アミノ酸残基からなりβサンドイッチ構造を形成する共通のドメインを介して糖鎖と結合する。現在哺乳類では14種類のアイソフォームが存在し、CRDの配向からプロトタイプ、キメラタイプ、タンデムリピートタイプの3つのサブタイプに分類されている[1]。プロトタイプはポリペプチド鎖中にCRDを1つもつもので、ガレクチン1, 2, 5, 7, 10, 11, 14がこのタイプに属する。このうちガレクチン1及び2は溶液中ではホモ二量体で存在し糖鎖に結合するのに対して、ガレクチン7は溶液中では単量体で糖鎖と結合すると考えられている。キメラタイプにはガレクチン3が属し、CRD以外にN末端側に多量体形成ドメインをもつガレクチンファミリーの中で異色の存在である。ガレクチン3のCRDは単量体で糖鎖と結合し、N末端の多量体形

成ドメインを介して溶液中で分子同士が会合していると考えられている。タンデムリピートタイプは読んで字の如く、ポリペプチド鎖中にCRDを2つタンデムに持つタイプでガレクチン4, 6, 8, 9, 12がこのタイプに属している。

ガレクチン9は全長が353アミノ酸残基からなる分子量約40 kDaの蛋白質で、タンデムリピートタイプに属する。一つの分子内に2つのCRDがあり、リンカーによって繋がれている。2つあるCRDのアミノ酸配列の一致度は35%で、N末端CRDがガレクチン3のCRDと30%の配列相同性を示し、C末端CRDはガレクチン5のCRDと70%という高い配列一致度を示す。ガレクチン9は、ヒトではHodgkin病患者の腫瘍細胞から[2]、またマウスではembryonic kidney cellからほぼ同時期に単離された[3]。配列解析の結果、好酸球の遊走活性を示す“ealectin”と呼ばれる既知の蛋白質と同一であることがわかり、現在は呼び方がガレクチン9で統一されている。変異体を用いた実験からこの好酸球の遊走活性にはN末端及びC末端CRD双方の糖結合活性が重要であることが明らかになっている[4]。またガレクチン9はマウスの胸腺細胞やヒトのメラノーマ細胞などにアポトーシスを誘導することもわかっており、この誘導には細胞内のCalcium-Calpain-Caspase1経路を介しているとの報告がある[5]。

ガレクチン9の生理活性は多岐に渡っているが、その作用機構は不明な点が多く残っている。しかし最近になり、ガレクチン9と直接相互作用している糖蛋白質が二種類相次いで発見され注目を集めている。一つがTim-3で[6]、もう一つがGLUT-2である[7]。Tim-3は免疫細胞であるT<sub>H</sub>1細胞特異的に発現している一回貫通型膜蛋白質で細胞外にイムノグロブリン様ドメインとムチンドメインを持つ。ガレクチン9はTim-3のイムノグロブリン様ドメインに糖鎖依存的に結合し、T<sub>H</sub>1細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。またGLUT-2は膵臓β細胞に発現しているグルコースを輸送する膜蛋白質で、血中のグルコース濃度を調節する役割を担っている。ガレクチン9はこのGLUT-2に糖鎖依存的に結合しGLUT-2が細胞

膜上に長時間留まることを助けている。

ガレクチンファミリーには $\beta$ ガラクトシドに結合するという共通の特徴を持ち、 $\beta$ ガラクトシド結合領域の配列相同性は極めて高いが、その近傍に位置するアミノ酸の相同性はやや低く、それぞれのメンバーに特異的なリガンド構造があるのではないかと考えられている。これまでの生化学的なスクリーニング実験から、ガレクチン9の2つのCRDの糖鎖結合プロファイルがそれぞれ明らかになっている[8,9]。それによるとN末端側のCRDはフォルスマン抗原及びA-hexasaccharideといった糖セラミド等に見られる糖鎖構造に極めて高い親和性を示すのに対して、C末端側のCRDではこれらの糖鎖に対しては中程度の親和性しか示さない。こうした認識特異性の違いは機能に重要であると推測される。本研究はガレクチン9の機能の核心である糖鎖認識機構を明らかにすることを目的として、ガレクチン9 N末端CRDのX線結晶構造解析に取り組んだものである[10]。

## 2. 実験

マウス由来ガレクチン9 N末端CRDの遺伝子をpGEX4T-1ベクターに組み込み、大腸菌BL21(DE3)株を形質転換した。大量培養した菌体を破碎し、遠心分離により可溶性画分を回収した。GSTアフィニティークラム、トロンビン処理、ベンザミジンセファロースカラム、ゲルろ過カラムを経てガレクチン9 N末端CRDタンパク質を精製した。

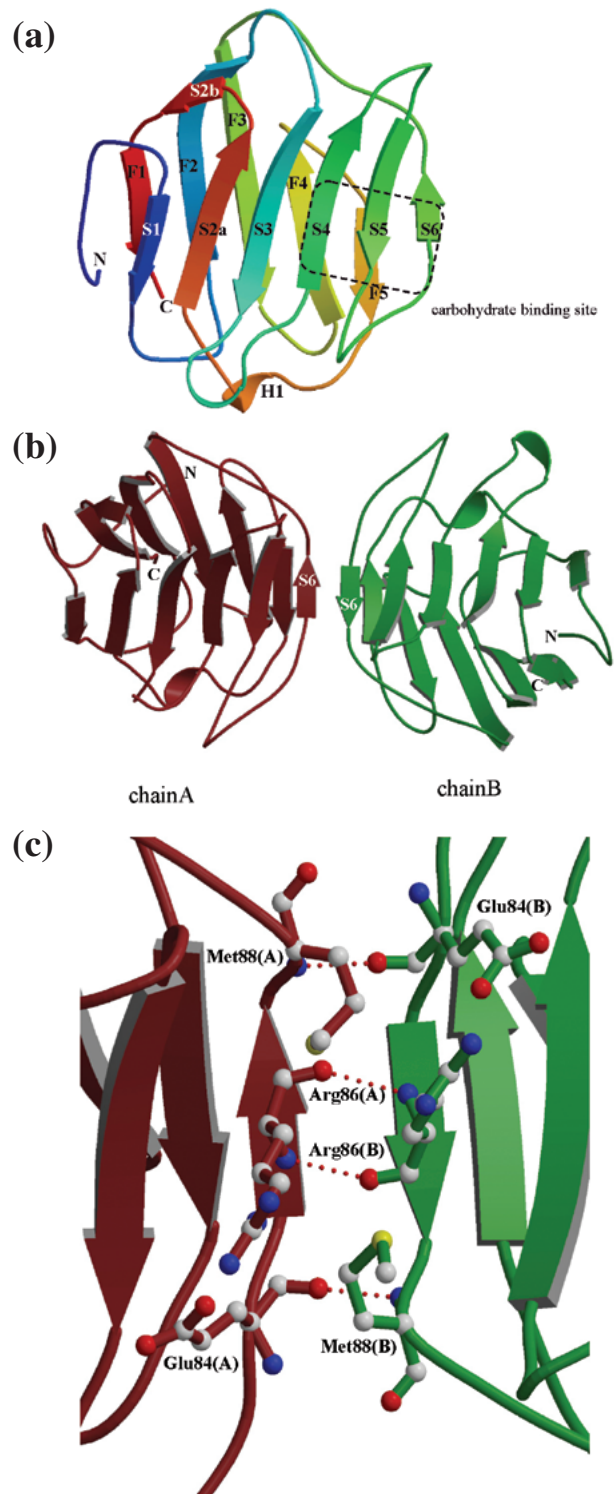
結晶化は6 mg/mlの精製した蛋白質に対してハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。糖鎖との複合体結晶は、ラクトースについては共結晶化法、T抗原についてはアポ体結晶への浸漬法、それ以外についてはガラクトース結晶への浸漬法を用いて行った。アポ体結晶については正方晶系及び単斜晶系の二つの晶系に属する結晶をそれぞれ得ることができた。

回折強度データ収集はPhoton Factory BL-5A, 6A, AR-NW12A及びSPring-8 BL41XUビームラインを用いて行った。位相決定はヒト由来ガレクチン3の立体構造(PDB code: 1A3K)をモデル分子として行った。モデル構築及び構造精密化はプログラムXtalView及びREFMACを使用した。データ収集及び構造解析に関する統計値をTable 1(Appendix)に示す。また本稿に使用した図はプログラムMolscript, GRASP及びPyMOLを用いて作成した。

## 3. 結果と考察

### 3-1. 全体構造と二量体形成について

今回我々は、マウス由来ガレクチン9 N末端CRDについて結晶系の異なる二種類のアポ体及び四種類(ラクトース, Nアセチルラクトサミン, T抗原, Nアセチルラクトサミン二量体)の糖鎖複合体の合計六種類の構造解析を行った。ガレクチン9は、ラットの膜蛋白質である尿酸トランスポーターUAT1という蛋白質とアミノ酸配列が85%一致することからガレクチン9も膜蛋白質としての立体構

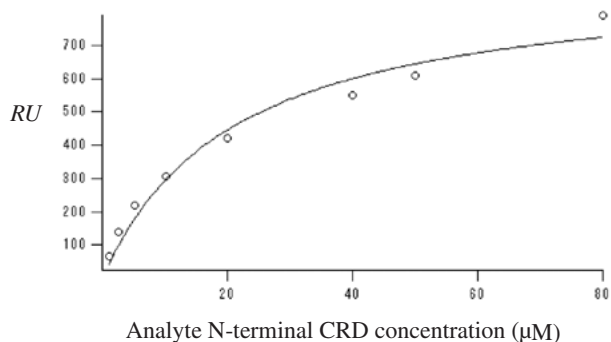


**Figure 1**

Crystal structure of the mouse galectin-9 N-terminal CRD. (a) Ribbon model of the monomeric structure of the apo form1 of the galectin-9 N-terminal CRD is shown. The five-stranded (F1-F5) and six-stranded (S1-S6)  $\beta$ -sheets and one short helix (H1) are indicated by the letter-number code. The carbohydrate binding site is shown by a dotted box. (b) The dimeric structure of the galectin-9 N-terminal CRD is shown. Two monomers in an asymmetric unit in the apo form1 crystal are shown in red (chain A) and green (chain B), respectively. (c) Close up view of the dimer interface. The amino acid residues involved in the dimer formation are shown in ball-and-stick model. The carbon, oxygen, nitrogen and sulfur atoms are shown in white, red, blue and yellow spheres, respectively. Hydrogen bonds are depicted by red dotted lines.

造をとっているのではないかという推察もなされていたが [11], 我々が得たガレクチン9 N末端 CRD の構造はこれまで報告された他のガレクチンと同じ $\beta$ サンドイッチ構造をとっていた (Fig. 1a)。ガレクチンの $\beta$ サンドイッチ構造は凹面にある6枚のストランド (S1 – S6) と凸面にある5枚のストランド (F1 – F5) が向かい合った構造をしており、糖鎖はS4からS6までの3枚のストランドによって形成される窪みに結合する。これらの基本的な特徴は今回のガレクチン9 N末端 CRD の構造でも保存されていたが、予期せぬことに今回得られたすべての構造でガレクチン9 N末端 CRD は二量体を形成していた (Fig. 1b)。この二量体はS6ストランド同士を向かい合わせるようにして分子間にまたがった $\beta$ シートを形成しており (Fig. 1c), あたかも12枚のシートが連続しているような印象を与えるものであった。このような相互作用は果たして溶液中でも起こっているのだろうか? このことを確かめるために表面プラズモン共鳴を用いてガレクチン9 N末端 CRD の分子間相互作用を調べた。実験方法としてはセンサーチップ上にガレクチン9 N末端 CRD を固定化し、濃度を変えたガレクチン9 N末端 CRD を溶液として注入しセンサーグラムの変化を見るという方法で行った。その結果、分子間相互作用は濃度依存的に上昇し、二量体形成を示す近似式とよく一致した (Fig. 2)。このことから溶液中でもガレクチン9 N末端 CRD は二量体を形成していると考えられる。

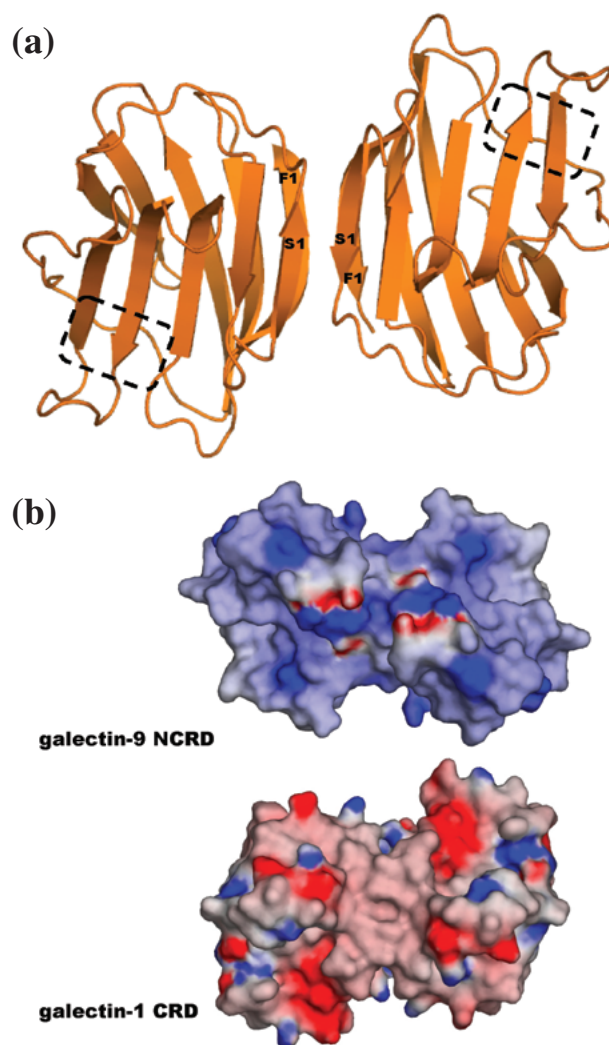
ガレクチンの最も大切な機能は細胞表面にある糖鎖との結合である。ガレクチンは哺乳類だけで14種類ものアイソフォームをもち、それぞれが独自の機能を担っていると考えられているが、この多様性はどこからくるのだろうか? 勿論、ガレクチンの種類によって特異的に結合する糖鎖 (リガンド) の種類が異なるということも解答の一つだが、これまでの研究から例え同じリガンドであってもガレクチンの集合状態の差異が生理機能に違いをもたらすという知見が多数報告されている。例えばガレクチン1は二量体を形成するが、ガレクチン7は単量体で存在する。ガレクチン3についてはCRD単独では単量体で存在



**Figure 2**  
Protein-protein interaction of the galectin-9 N-terminal CRD in solution. The galectin-9 N-terminal CRD was immobilized on the surface of the sensor chip and steady state surface plasmon resonance levels (RU) were measured by BIACORE at flows of analyte solution with varied concentrations of the galectin-9 N-terminal CRD. The continuous curve is a theoretical curve fitted by a 1:1 binding model.

するが、N末端側にある多量体形成ドメインを介して全体では五量体で存在するといわれている。こうした溶液状態の違いが、ガレクチンの結合箇所を複数持つような多価 (multivalent) なリガンドに対する相互作用様式に影響を与え、ひいては細胞表面などで形成されるガレクチンと糖鎖が織り成す格子構造 (cross-linking lattice) に違いを生じさせると考えられている [12]。

これまでのところ溶液中で二量体を形成すると言われているのが、ガレクチン1及び2である。これらのタンパク質は既に構造が決定されており、どちらもS1及びF1の2つのストランドを介して分子間にまたがった $\beta$ シートを形成し安定な二量体をとっていることが明らかになっている (Fig. 3a)。今回我々の構造解析したガレクチン9 N末端 CRD が、S6ストランドを介して二量体となって



**Figure 3**  
(a) The dimeric structure of the human galectin-1 CRD (PDB code: 1GZW) is shown. Protein molecules are shown in ribbon models. The carbohydrate binding sites are depicted by dotted boxes. (b) Electrostatic potential maps of the dimer surfaces of the galectin-9 N-terminal CRD (upper) and galectin-1 CRD (lower). Positive (blue) and negative (red) potentials are mapped on the van der Waals surfaces in the range  $-10 k_B T$  (red) to  $+10 k_B T$  (blue), where  $k_B$  is Boltzmann's constant and  $T$  is the absolute temperature. The orientation of the galectin-9 N-terminal CRD dimer is same as Fig. 1b.

いることと比較すると、ちょうど分子の配置が逆になっているのがわかる。つまりガレクチン1のようなケースを“head-to-head”型と言うならば、今回のガレクチン9 N末端 CRD は“tail-to-tail”型ということになる。この tail-to-tail 型の特徴としては、糖結合領域同士が近接しているという点が挙げられる。これは複雑なリガンドに対して二量体が共同して結合する可能性を示唆している。またガレクチン1の二量体と比べると、ガレクチン9 N末端 CRD 二量体は大きく正に帯電しているのがわかる (Fig. 3b)。ガレクチン9は細胞膜上の糖脂質などに対して強い親和性を示すことから、こうした電荷分布は負に帯電した細胞膜との相互作用を補助しているのかもしれない。

### 3-2. 糖鎖認識機構について

今回構造解析に使用した糖鎖はラクトース (Gal $\beta$ 1-4Glc), *N*アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc), T抗原 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc) 及び *N*アセチルラクトサミン二量体 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) の四種類である。ちなみに括弧の中の記号は糖鎖構造を表し、例えば Gal $\beta$ 1-4Glc というのはガラクトース (Gal) とグルコース (Glc) が $\beta$ 1-4結合を介して結合していることを示す。これらの四種類の糖鎖複合体構造を重ね合わせると $\beta$ ガラクトシド残基の位置で一致しているのがわかる (Fig. 4a)。ガラクトースの認識の中心は水酸基の O4 と O6 の二つの酸素原子であり、これらの原子と保存された His60, Asn62, Asn74, Trp81 といった残基が相互作用している。ガレクチンはガラクトース単糖を認識するのではなくその還元末端側 (糖鎖構造の右側) の残基も含めて認識する。ラクトース複合体の構造を見ると (Fig. 4b), Arg64, Glu84,

Arg86の三つのアミノ酸側鎖が還元末端側の残基の水酸基を認識しているのがわかる。同様の認識機構が、*N*アセチルラクトサミンおよびT抗原複合体においても見られた。*N*アセチルラクトサミンとは*N*結合型糖鎖のうち複合型と呼ばれる糖鎖の一部に見られる構造であり、T抗原 (別名 Core1) という糖鎖は*O*結合型糖鎖に共通して見られる構造である。ガレクチンは一般に*N*アセチルラクトサミンを含む複合型糖鎖が共通のリガンドとして持つと言われているが、今回私たちの構造解析から*O*結合型糖鎖の一部であるT抗原にも同様に結合できることがわかった (Fig. 4c)。

ある種の膜受容体に含まれる糖鎖に*N*アセチルラクトサミンが重合したポリ*N*アセチルラクトサミン構造という特徴的な糖鎖構造が存在する。これは*N*アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) が $\beta$ 1-3結合を介して複数重合したものである。ガレクチンは一般にこのポリ*N*アセチルラクトサミン構造に強く結合することから、生体内での真のリガンドの有力な候補である。このポリ*N*アセチルラクトサミン構造の合成に重要な糖転移酵素を欠失した細胞では細胞膜上の受容体が速やかにエンドサイトーシスによって取り込まれてしまうことから、この糖鎖構造が膜受容体のダウンレギュレーションに重要だという報告がなされた [13,14]。受容体上のポリ*N*アセチルラクトサミン構造はガレクチンと相互作用し、ガレクチンと糖鎖との複合体を形成することで細胞膜表面に安定に存在すると考えられている。そこで我々は*N*アセチルラクトサミン二量体 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) とガレクチン9 N末端 CRD との複合体の構造解析を行った。その結果ガレクチン9 N末端 CRD 二量体にまたがるようにして糖鎖が結合していた (Fig. 5)。こうした二対二の結合様

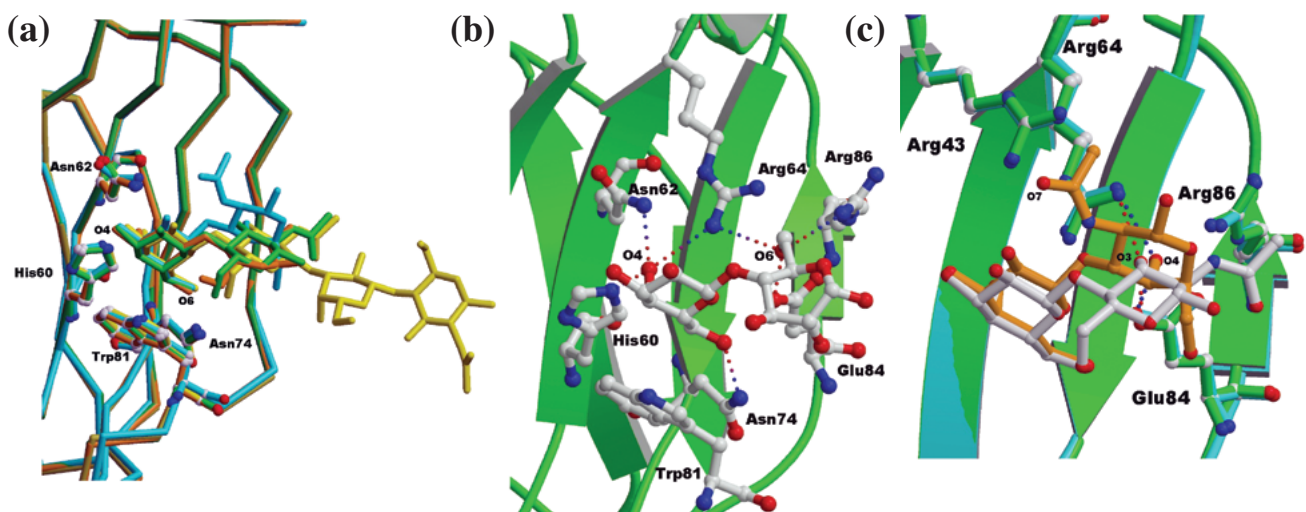
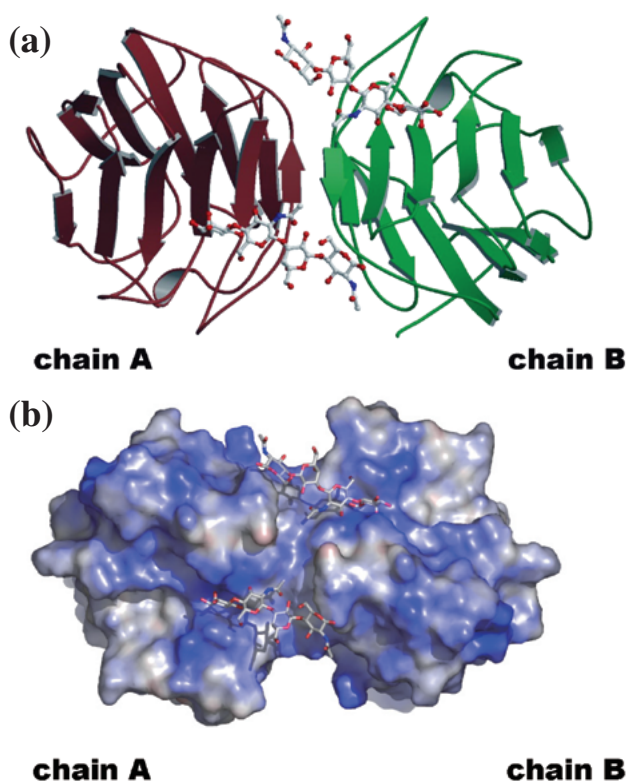


Figure 4

Structures of the galectin-9 N-terminal CRD-ligand complexes at the carbohydrate binding site. (a) Superposition of four carbohydrate complex structures. The main chains of the N-terminal CRDs and the carbohydrates are depicted by rod model. The amino acid residues that interact with  $\beta$ -galactoside at the non-reducing end are shown by ball-and-stick model. The complexes with lactose, T-antigen, *N*-acetyllactosamine and *N*-acetyllactosamine dimer are colored by orange, cyan, green and yellow, respectively. (b) Structure of the carbohydrate binding site of the lactose complex. The lactose molecule and the amino acid residues that interact with the lactose are shown in ball-and-stick model. The atoms of carbon, oxygen and nitrogen are shown in white, red and blue spheres, respectively. Hydrogen bonds are depicted by dotted lines. (c) Superposition of *N*-acetyllactosamine complex (protein: cyan, ligand: white) and T-antigen complex (protein: green, ligand: orange). The amino acid residues involved in GlcNAc and GalNAc recognition are shown in ball-and-stick models. Hydrogen bonds in *N*-acetyllactosamine and T-antigen complexes are shown in red and blue dotted lines, respectively.

**Figure 5**

Crystal structure of the galectin-9 N-terminal CRD-N-acetyllactosamine dimer complex. (a) The galectin-9 N-terminal CRD dimer and N-acetyllactosamine dimer molecule are represented by ribbon model and rod model, respectively. (b) The electrostatic potential of the protein dimer in the complex is mapped to the molecular surface of the protein as in Fig. 3b.

式は膜蛋白質を細胞膜表面に留めておくには有利に働くと考えられる。

#### 4. まとめ

今回我々はガレクチン9のN末端CRDの構造解析を行い、二量体形成機構および糖鎖認識機構に関する新しい知見を得ることができた。しかしこれはガレクチン9蛋白質の一部についてであり、全体像は依然としてわかっていない。今後は全長蛋白質とより特異性の高い糖鎖、ひいては標的とされる糖蛋白質との複合体構造を通してガレクチン9の機能に迫りたいと考えている。

#### 5. 謝辞

本研究は香川大学医学部中村隆範教授らのグループとの共同研究である。研究を進めるにあたり貴重なご助言をいただいたことをここに感謝いたします。

また本研究の一部はタンパク 3000 プロジェクトの研究助成により進められた。

#### 引用文献

- [1] Hirabayashi, J., Kasai, K., *Glycobiology* **3**, 297-304 (1993).  
 [2] Tureci, O., Schmit, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M., Sahin, U., *J.Biol.Chem.* **272**, 6416-6422 (1997).

- [3] Wada, J., Kanwar, Y.S., *J.Biol.Chem.* **272**, 6078-6086 (1997).  
 [4] Matsushita, N., Nishi, N., Seki, M., Matsumoto, R., Kuwabara, I., Liu, F-T., Hata, Y., Nakamura, T., Hirashima, M., *J.Biol.Chem.* **275**, 8355-8360 (2000).  
 [5] Kashio, Y., Nakamura, K., Abedin, M.J., Seki, M., Nishi, N., Yoshida, N., Nakamura, T., Hirashima, M., *J.Immunol.* **170**, 3131-3136 (2003).  
 [6] Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., Kuchroo, V.K., *Nature Immunol.* **6**, 1245-1252 (2005).  
 [7] Ohtsubo, K., Takamatsu, S., Minowa, M.T., Yoshida, A., Takeuchi, M., Marth, J.D., *Cell* **123**, 1307-1321 (2005).  
 [8] Sato, M., Nishi, N., Shoji, H., Seki, M., Hashidate, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Hata, Y., Suzuki, S., Hirashima, M., Nakamura, T., *Glycobiology* **12**, 191-197 (2002).  
 [9] Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E.G., Yagi, F., Kasai, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 232-254 (2002).  
 [10] Nagae, M., Nishi, N., Murata, T., Usui, T., Nakamura, T., Wakatsuki, S., Kato, R., *J.Biol.Chem.* **281**, 35884-35893 (2006).  
 [11] Leal-Pinto, E., Tao, W., Rappaport, J., Richardson, J., Knorr, B.A., Abramson, R.G., *J.Biol.Chem.* **272**, 617-625 (1997).  
 [12] Brewer, C.F., *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 255-262 (2002).  
 [13] Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., Dennis, J.W., *Nature* **409**, 733-739 (2001).  
 [14] Partridge, E.A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Pauling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I.R., Wrana, J.L., Dennis, J.W., *Science* **306**, 120-124 (2004).

(原稿受付日：2007年1月12日)

#### 著者紹介

長江雅倫 (Masamichi NAGAE)

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-864-5200 (内線) 3240

FAX: 029-879-6179

e-mail: mnagae@post.kek.jp

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・博士研究員 (産学連携), 博士 (理学)

若槻壮市 (Soichi WAKATSUKI)

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-864-5631

FAX: 029-879-6179

e-mail: soichi.wakatsuki@kek.jp

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・教授, Ph.D.

加藤龍一 (Ryuichi KATO)

〒 305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-879-6177

FAX: 029-879-6179

e-mail: ryuichi.kato@kek.jp

高エネ研・物構研・構造生物学研究センター・助教授, 理学博士

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

Crystal	apo form1	apo form2	lactose	LacNAc*	T-antigen	LN2**
Space group	$P4_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P4_12_12$	$C222_1$
Unit cell (Å)	$a=b=58.1,$ $c=221.7$	$a=48.4,$ $b=56.4$ $c=58.6$	$a=56.6,$ $b=58.5,$ $c=92.0$	$a=56.7,$ $b=58.6,$ $c=92.3$	$a=b=58.1,$ $c=222.7$	$a=57.8,$ $b=94.4,$ $c=56.5$
Beam Line	BL-6A PF	NW12A PF-AR	BL-5A PF	BL41XU SPring-8	BL-6A PF	BL-5A PF
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	0.9780	1.0000	1.0000	1.0000
Resolution (Å) <sup>a</sup>	50 - 2.50 (2.59 - 2.50)	50-2.50 (2.59-2.50)	50-1.60 (1.66-1.60)	100-2.00 (2.07-2.00)	50-2.7 (2.80-2.70)	50-1.78 (1.84-1.78)
Total reflections	149,680	39,448	267,553	142,939	155,963	105,531
Unique reflections	14,051	5,937	38,497	20,106	11,336	15,123
Completeness (%) <sup>a</sup>	99.9 (100)	99.8(98.2)	93.7(98.0)	93.6(100)	100(100)	99.8(99.3)
$R_{\text{merge}}$ (%) <sup>a</sup>	7.2 (35.2)	10.7(31.5)	8.8(34.5)	11.8(25.6)	8.6(30.7)	5.8(30.2)
$I/\sigma I$ <sup>a</sup>	35.0(7.3)	15.9(3.9)	22.2(4.4)	18.4(7.5)	41.3(11.4)	28.5(6.0)

**Refinement statistics**

Resolution range (Å)	35.3 - 2.50	48.4-2.50	19.6-1.60	92.5-2.00	56.2-2.70	56.5-1.78
No. of reflections	13,283	5,646	36,396	19,081	10,721	14,364
No. of non-hydrogen atoms						
Protein	2,355	1,243	2,425	2,513	2,351	1,212
Water	102	95	699	305	58	132
Carbohydrate	-	-	46	52	52	51
Glycerol	-	-	-	-	-	6
$R_{\text{work}}$ (%)	20.8	18.2	18.5	17.4	24.0	18.2
$R_{\text{free}}$ (%)	28.3	24.7	23.2	23.1	29.6	21.2
R.m.s. deviations						
Bond length (Å)	0.015	0.013	0.011	0.014	0.007	0.012
Bond angle (°)	1.595	1.388	1.438	1.545	1.103	1.459
Average $B$ - factors (Å <sup>2</sup> )						
Protein	28.6	11.4	11.6	12.0	28.5	22.7
Water	27.6	13.6	32.1	21.1	23.5	36.3
Carbohydrate	-	-	10.4	15.7	52.9	30.4
Glycerol	-	-	-	-	-	43.6

<sup>a</sup>Values in parentheses are for the highest resolution shell.\* *N*-acetylglucosamine\*\* *N*-acetylglucosamine dimer