

IIII 宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性 IIIII
(解説)

実用的オリゴ糖合成の可能性を秘めた糖質関連酵素の立体構造

伏信 進矢

Crystal Structures of Carbohydrate-active Enzymes with Potential for Practical Oligosaccharide Synthesis

Shinya FUSHINOBU

Abstract

Some sugars or carbohydrates have been known to possess health-promoting functions and widely used as food additives. Glycoside Hydrolases (GHs) have been widely utilized for preparing those carbohydrate products but they basically catalyze cleavage or transfer of glycosidic bonds. Glycoside phosphorylases (GPs) and glycosynthases can efficiently catalyze elongation of glycosidic bonds and have potential for practical oligosaccharide synthesis. We have been studying structural basis of various carbohydrate-active enzymes, focusing on anomer-inverting GPs and glycosynthases. Here I review significance of the structural studies and discuss demand of high-quality protein crystallization technology in this research field.

Keyword(s): Glycoside Hydrolase, Glycoside Phosphorylase, Glycosynthase
Received 22 November 2016, Accepted 13 December 2016, Published 31 January 2017

1. はじめに

「糖質」という単語は、現在では一般的に悪いイメージが広がりつつあり、糖質制限や糖質カットなどがさかんに言われるようになってしまった。たしかに澱粉を過度に摂取するのは健康のために決して良くはないが、糖質と一口にいても様々な種類があり、その中にはヒトの健康に役立つことが証明されており特定保健用食品（トクホ）の重要な成分として認められているものが多数ある。糖質は多糖とオリゴ糖に大別されるが、トクホの関与成分として、多糖（食物繊維）では難消化デキストリン、ポリデキストロース、グアーガム分解物が、オリゴ糖では大豆オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、乳果オリゴ糖（ラクトスクロース）、ガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などがある。これらのオリゴ糖はビフィズス菌の増殖効果が認められており、善玉菌と呼ばれる腸内細菌を増やすような、いわゆるプレバイオティクスとしての効果が期待されている。食品成分として用いられる糖質は、澱粉、乳糖、蔗糖などの安価な糖質を原料として、主に糖質関連酵素に

より製造されている。妥当なコストで工業的レベルの酵素合成を行なうには、基質が安価であることに加えて、酵素が扱いやすく安定であり、反応収率が高いことが求められる。その点、基質の一つが水であり、水溶液中で反応を行えば事実上収率が100%になるような糖質加水分解酵素（Glycoside Hydrolase, GH）は優秀であり、各種のアミラーゼ様酵素がその用途に用いられてきた（Fig. 1A）。またGHの中には糖鎖を切断した後に水ではなく別の糖を受容体とすることにより、糖転移反応（transglycosylation reaction）を触媒するものもある。例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.19）は加水分解よりも糖転移の活性が高く、分子内の転移反応を行って環状のオリゴ糖（シクロデキストリン）を合成できる。しかし、GHは基本的に糖鎖の切断か付け替えしか行わないため、全体として糖鎖を伸長させることは原理的に難しい。生体内で糖鎖を伸長するために用いられているのが日本語で糖転移酵素あるいは合成酵素と呼ばれるGlycosylTransferase（GT）である（Fig. 1B）。ただしGTは基質として高価な糖核酸（NDP-糖）を用いるだけで

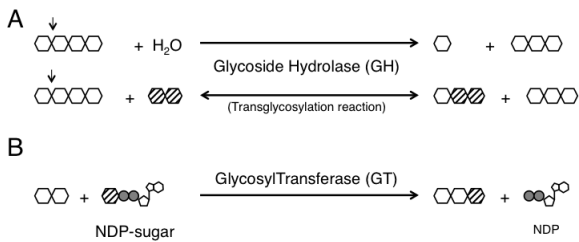


Fig. 1 Reactions of glycoside hydrolase (A) and glycosyltransferase (B).

なく、酵素としても不安定で扱いにくいものが多く、実用的なオリゴ糖合成には基本的に向いていない。なお、日本語の「糖転移」という用語は GH による糖を受容体とした付け替え反応 (transglycosylation) と GT による糖核酸を用いた伸長反応 (glycosyl transfer) の両方に用いられているために誤解が生じやすい。本稿では、オリゴ糖合成に適した性質を持つ、2 つのタイプの糖質関連酵素について、それらの立体構造を基盤とした分類基準、基質認識および反応機構などについて概説する。

2. 糖質ホスホリラーゼ

2.1 糖質合成への応用

糖質ホスホリラーゼ (Glycoside Phosphorylase, GP) は水の代わりに無機リン酸 (Pi) を用いて糖鎖を切断し、産物の片方の還元末端にリン酸が結合した糖 1-リン酸を生成する酵素である (Fig. 2A)。GP は生体内では基本的に分解方向に働く酵素であるが、基質と産物の自由エネルギーの差が小さいために、逆反応も効率よく触媒するという特徴がある。このような性質を利用してオリゴ糖を合成するために鍵となるのが、糖 1-リン酸をどのように供給するか、という点である。先駆的な研究として、大阪府立大学の村尾らにより行われた、マルトース (Glc- α 1,4-Glc) ホスホリラーゼ (EC 2.4.1.8) とトレハロース (Glc- α 1,1-Glc) ホスホリラーゼ (EC 2.4.1.64) を組み合わせて、触媒量の Pi の存在下で、安価な麦芽糖 (マルトース) を原料として、比較的高価なトレハロースを生産した結果がある¹⁾。どちらの GP も、グリコシド結合切断にあたりアノマーが反転する「反転型 GP」であるため、 β -グルコース 1-リン酸を経由して Pi がリサイクルされるかたちで、250 mM のマルトースから、平衡に達した段階で 146 mM のトレハロースと 94 mM のマルトースが得られた (Fig. 2B)。このように二種類の GP を正反応と逆反応の組み合わせで用いて糖 1-リン酸を経由する手法は「ホスホリラーゼカップリン

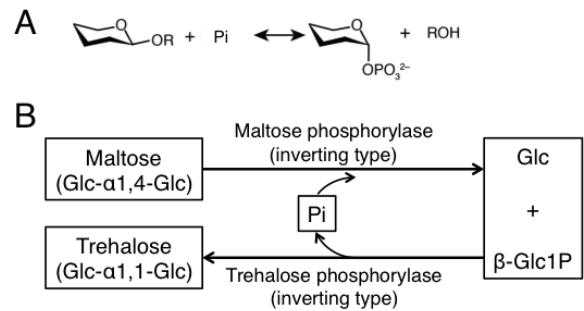


Fig. 2 Schemes of general glycoside phosphorylase reaction (A) and coupling reactions of maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase (B).

グ法」と呼ばれている。この方法は適当な GP の組み合わせにより他の糖質の転換にも適用可能である。例えば、北岡らはスクロースホスホリラーゼ (アノマー保持型 GP, EC 2.4.1.7) とセロビオースホスホリラーゼ (反転型 GP, EC 2.4.1.20) を利用して、安価な蔗糖 (スクロース, Fru- α 2,1-Glc) から、 α -グルコース 1-リン酸を経由して、さらにキシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) を用いてフラクトースをグルコースに異性化することを通じて、セロビオース (Glc- β 1,4-Glc) を合成した²⁾。また、大段らは、セロビオースホスホリラーゼとグリコーゲンホスホリラーゼ (保持型 GP, EC 2.4.1.1) をカップリングさせることにより、セロビオースからアミロース (直鎖状の α 1,4-グルカン) を作ることに成功している³⁾。

2.2 ファミリー分類と近年の隆盛

このようにホスホリラーゼカップリング法は良いことづくめのように見えるが、最も大きな弱点は、現在知られている GP の種類が限られている点である。2002 年の時点で見つかった GP は、EC 番号ベースで 12 種類しかなかった²⁾。この数は、非常に沢山の種類が知られている糖質の加水分解酵素に比べると大きく見劣りする。また、この時点で、糖質関連酵素のデータベース Carbohydrate-Active enZyme (CAZy) で GP が属するファミリーとしては、糖質加水分解酵素 (GH) として 2 ファミリー、糖転移酵素 (GT) として 2 ファミリーの計 4 ファミリーしかなかった⁴⁾。その後、筆者らのグループによる GT36 から GH94 へのファミリーの付け替えなどを経て⁵⁾、2013 年の段階で既知の GP は 20 種まで増えた⁶⁾。2015 年に書かれた GP の総説では、EC 番号ベースで 29 種類 (うち 2 種は EC 番号未設定)、それらが属する CAZy ファミリーは GH で 6, GT で 2 の合計 8 ファミリーと、近年急速に増加しているのが分かる^{7,8)}。現時点で知られている GP をファミリーごとにま

Table 1 Currently known glycoside phosphorylase families.

Family	Anomer type	Fold and CAZy clan	Specificity	Example of enzymes
GT4	Retaining	GT-B	Glc- α -R/ α -Glc1P	Trehalose phosphorylase (retaining type, EC 2.4.1.231)
GT35	Retaining	GT-B	Glc- α -R/ α -Glc1P	Glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1)
GH3	Retaining	(β/α) ₈ barrel	Glc- β -R/ β -Glc1P	β -Glycoside phosphorylase (EC 2.4.1.)
GH13	Retaining	(β/α) ₈ barrel Clan GH-H	Glc- α -R/ α -Glc1P	Sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7)
GH65	Inverting	(α/α) ₆ barrel Clan GH-L	Glc- α -R/ β -Glc1P	Maltose phosphorylase (EC 2.4.1.8) Trehalose phosphorylase (inverting type, EC 2.4.1.64) Kojibiose phosphorylase (EC 2.4.1.230) 2- <i>O</i> -Glucosylglycerol phosphorylase (EC 2.4.1.332)
GH94 (formerly GT36)	Inverting	(α/α) ₆ barrel Clan GH-L-like	Glc- β -R/ α -Glc1P, GlcNAc- β -R/ α -GlcNAc1P	Cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) Chitobiose phosphorylase (EC 2.4.1.280) Cellobionic acid phosphorylase (EC 2.4.1.321)
GH112	Inverting	(β/α) ₈ barrel Clan GH-A-like	Gal- β -R/ α -Gal1P	Galacto- <i>N</i> -biose/lacto- <i>N</i> -biose phosphorylase (EC 2.4.1.211)
GH130	Inverting	Five-bladed β -propeller	Man- β -R/ α -Man1P	4- <i>O</i> - β -D-mannosyl- D-glucose phosphorylase (EC 2.4.1.281)

とめたものを **Table 1** に示す。GP は大きく分けるとアノマー保持 GT 型 (GT4, GT35), アノマー保持 GH 型 (GH3, GH13), アノマー反転 GH 型 (GH65, GH94, GH112, GH130) にわけられる。GT 型の酵素はピリドキサルリン酸依存性で立体構造も糖核酸を基質とする糖転移酵素に似ているが, GH 型の酵素は加水分解酵素とよく似た構造をとっている。GH 型の GP は, 端的に言うと, 加水分解酵素で水が入るサイトに Pi が結合できるように分子進化が起こったために, 加リン酸分解反応を触媒することが可能になっていると解釈できる。また, 長い間, α -または β -グルコシド (もしくは β -GlcNAc) に作用する GP しか知られていなかったが, 2005 年以降, β -ガラクトシドおよび β -マンノシドに作用する酵素が発見されており (それぞれ GH112 および GH130 に分類されている), GP の応用範囲がますます広がっている。

2.3 GP の立体構造と近年の進展

我々のグループでは, 反転 GH 型の GP を中心に立体構造解析と機能解析を行っている。これまで得られた興味深い成果の一つとして, ビフィズス菌由来のガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ (GLNBP, EC 2.4.1.211) の構造解析がある⁹⁾。GLNBP は, 乳幼児の腸管内に棲息するビフィズス菌が共通して持っている酵素

であり^{10,11)}, 母乳に含まれるオリゴ糖 (ヒトミルクオリゴ糖) の主要なコア二糖であるラクト-*N*-ビオース I (LNB, Gal- β 1,3-GlcNAc) および腸管粘膜のムチン糖タンパク質糖鎖のコア二糖ガラクト-*N*-ビオース (Gal- β 1,3-GalNAc) の代謝において鍵となる¹²⁾。ビフィズス菌によるヒトミルクオリゴ糖の分解/代謝システムの研究は, GLNBP の発見を契機として爆発的な進展を見せている。その現状については片山による近年の総説に詳しい¹³⁾。本酵素の応用について特筆すべき成果は, LNB の大量合成法の確立である¹⁴⁾。西本と北岡は, ビフィズス菌のスクロースおよび LNB 代謝酵素と併用して, 4 種の酵素 (GLNBP, スクロースホスホリラーゼ, ガラクトース-1-リン酸ウリジリトランスフェラーゼ, UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ) と触媒量の Pi と UDP-グルコースの存在下で, 安価なスクロースと *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc; 甲殻類キチンの酵素分解により製造できる) を原料として, 1.4 kg もの LNB の大量合成に成功した。さらに, 原料に GlcNAc の代わりに *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を用いれば, ガラクト-*N*-ビオースを合成することも可能である¹⁵⁾。本合成法は一つのボトル中で全て進行するワンポット法であり, 生成する LNB は結晶化により系外に取り出すことができるため, カラム精製などを必要とせずに高い純度 (99%) の結晶が得られる点も, 応用上メリットがある。

また、GLNBP は既知の酵素およびタンパク質と全く配列相同性を示さないために、新たな GH ファミリーである GH112 が設置されており、構造生物学的にも新規性の高い酵素であった。我々は GLNBP の立体構造を GlcNAc (または GalNAc) および Pi アナログとしての陰イオン (硝酸イオンまたは硫酸イオン) などのリガンドの存在下で、最大分解能 1.85 Å で決定した (Fig. 3A)⁹⁾。また、LNB および α -ガラクトース 1-リン酸との複合体構造をドッキング法により推定し、その基質認識および反応機構について知見をもたらした。3 つのアルギニン残基が存在する部位に Pi が結合すると、おそらく電荷の相互作用が引き金となり、GLNBP の分子全体に大きな構造変化が起こり、触媒ドメインの (8/α)₈ バレルが歪んだ状態で LNB の結合部位が形成される。このようなフォールド自体の動きを伴った誘導適合 (induced-fit) は、一般的に強固であると考えられている (8/α)₈ バレルの酵素としては非常に珍しい例である。また本酵素の立体構造を類似性検索サーバーである DALI により解析すると、GH42 に属する β -ガラクトシダーゼに類似していたことから、GH112 は乳糖の分解酵素から派生したことが示唆された。ピフィズ菌はヒトとの共生を通じてヒトミルクオリゴ糖分解酵素を分子進化させていると考えられており、このような比較的「新しい」酵素の構造には興味深い特徴があることが分かる。

一方、 α -グルコシドや β -グルコシドに作用する反転型 GP ファミリーの GH65 や GH94 に関しても、近年の新たな特異性を持つ酵素の発見にともない、構造生物学的にも興味深い研究対象となっている。GH65 に属する酵素としては前述のマルトースホスホリラーゼが古くから知られており、その立体構造も 2001 年に報告されていたものの¹⁶⁾、得られていたのは Pi との複合体のみであり、糖基質との相互作用は全く分かっていなかった。我々は、コージビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.230) の立体構造についてグルコース、コージビオース (Glc- α 1,2-Glc)、硫酸イオン (Pi のアナログ) との複合体として最大分解能 2.05 Å で

決定し、GH65 の糖の結合様式について初めて明らかにした (Fig. 3B)¹⁷⁾。コージビオースは蜂蜜やビールなどから発見された希少な二糖であり、腸内の善玉菌を増殖させるプレバイオティクス効果も認められている。また、GH65 には 2001 年以降マルトースやコージビオース以外にもトレハロース、トレハロース 6-リン酸、ニゲロース、グルコシル- α 1,3-L-ラムノースなど新たな特異性をもつ GP が発見されており、これらの基質特異性の違いを推察する上での構造基盤が与えられた。

今世紀に入って新しい酵素が次々と発見されている背景として¹⁸⁾、微生物のゲノム配列からの網羅的な遺伝子探索 (ゲノムマイニング) が可能になったということが挙げられる。GP においては、逆反応を利用して、ドナーである糖 1-リン酸に対して種々のアクセプター分子をスクリーニングすることにより新規酵素を探索することができる。そのような手法により発見された新規 GP として、GH65 の 2-O-グルコシルグリセロールホスホリラーゼ (EC 2.4.1.332)¹⁹⁾ と GH94 セロビオン酸ホスホリラーゼ (EC 2.4.1.321)²⁰⁾ がある。2-O-グルコシルグリセロールホスホリラーゼの立体構造はグルコース、グルコースのアナログであるイソファゴミン、そしてアクセプター分子であるグリセロールとの複合体構造として、最大分解能 1.9 Å で決定した (Fig. 3C)²¹⁾。一方、セロビオン酸ホスホリラーゼの立体構造はセロビオン酸、グルコン酸などとの複合体構造として、最大分解能 1.6 Å で決定した (Fig. 3D)²²⁾。いずれの酵素においても逆反応のアクセプター分子の結合部位であるサブサイト+1 に特徴的な構造が見られ、これらのファミリーの基質特異性の拡張およびさらなる新規酵素の探索について、重要な示唆を与えた。さらに、前者においては副反応の加水分解反応の機構 (実際は水分子をアクセプターとする反応)、後者においては糸状菌酵素によるセルロースの酸化分解から酵母によるバイオエタノールの発酵生産を橋渡しする「クラッチ」酵素としての役割としての重要性からも注目すべき成果が得られている。



Fig. 3 Crystal structures of galacto-N-biose/lacto-N-biose phosphorylase (A), kojibiose phosphorylase (B), 2-O-glucosylglycerol phosphorylase (C), and cellobionic acid phosphorylase (D).

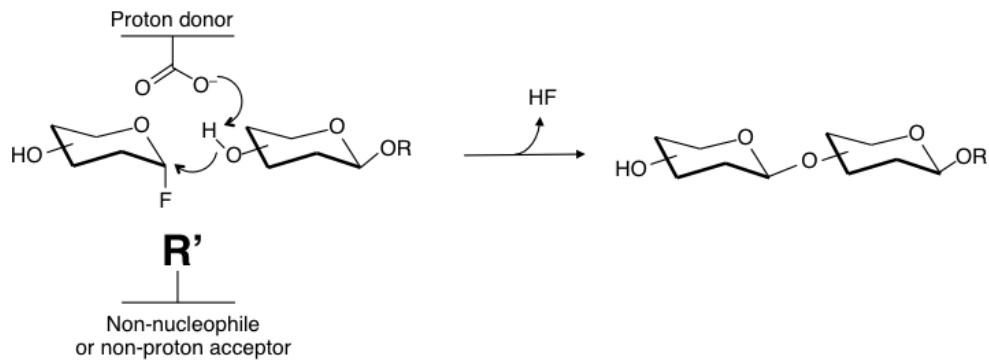


Fig. 4 Scheme of glycosynthase reaction.

3. グライコシターゼ

グライコシターゼ法は、活性中心部位の変異により加水分解活性を消失させた酵素と、通常の基質とは逆のアノマー位にフッ素が結合したフッ化糖の組み合わせにより、効率的に糖鎖伸長を触媒する方法である (Fig. 4). この手法は 1998 年にカナダの MacKenzie らにより開発された²³⁾. 当初は保持型 GH のみ適用可能であり、活性中心のうち求核性触媒残基を Gly, Ala, Ser などの小さな側鎖のアミノ酸に置換することにより効率のよいグライコシターゼが得られることが分かっていた. 一方、130 近くある GH ファミリーのうち約 3 分の 1 を占める反転型 GH については長らく成功例がなかったが、2006 年に本多らが GH8 に属する還元末端オリゴキシラーゼ (Rex, EC 3.2.1.156) を用いて反転型グライコシターゼを作出することに初めて成功した²⁴⁾. 最初の報告では、一般塩基触媒 (プロトン受容体) 残基である Asp263 (Fig. 5) を Cys, Asn などに変異したものが最も効率の良いグライコシターゼであったが、その後の探索により、求核性の水分子を一般塩基触媒とともにつなぎとめている残基 (Tyr198) を Phe に置換した変異体がさらに高効率のグライコシターゼであることが見出された²⁵⁾. 我々のグループでは反転型グライコシターゼ (Rex の Asp263 や Tyr198 における変異体) の結晶構造から、その構造基盤に関する情報を得ている²⁶⁾. その後の研究からも GH19 キチナーゼや GH95 の 1,2- α -L-フコシダーゼといった反転型 GH をもとにして、同様の手法でグライコシターゼが得られている^{27,28)}.

4. おわりに

GH8 Rex による反転型グライコシターゼの構造解析からは、合成反応の活性が高い酵素を得るためには、求核性の水分子の位置と、それを結合している水素結合のパターンが重要であることが示唆されている²⁶⁾. また、近年

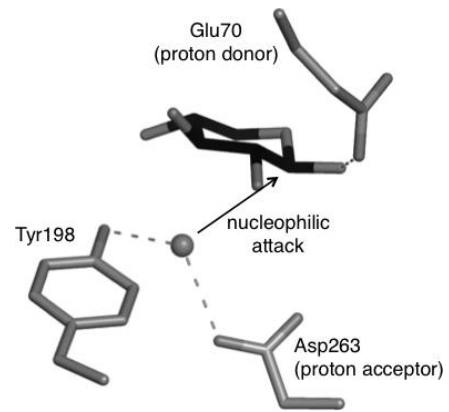


Fig. 5 Active site structure of GH8 Rex.

続々と発見されている GP の利用に関しては、まだ立体構造が解かれていないものが数多くあり、それらの基質特異性や反応機構を明らかにすることが重要である. 中には GH130 の β -マンノシドホスホリラーゼのように、基質のヒドロキシル基がプロトン供与を仲立ちするなど、通常の GP とは異なる反応機構を持つものが見つかっている^{29,30)}. このように、オリゴ糖合成に利用可能な酵素にしっかりとした構造基盤を与えるためには、今後、超高分解能の構造解析や中性子回折を利用した構造解析などの手法を用いて、水素原子の位置同定や水素結合の観測などを進めていくことが必要となる. そのためにも、高品質のタンパク質結晶化技術の開発が強く望まれている.

参考文献

- 1) S. Murao, H. Nagano, S. Ogura and T. Nishino: *Agric. Biol. Chem.*, **49** (1985) 2113.
- 2) M. Kitaoka and K. Hayashi: *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14** (2002) 35.
- 3) K. Ohdan, K. Fujii, M. Yanase, T. Takaha and T. Kuriki: *Biocatal. Biotransform.*, **26** (2006) 77.
- 4) P.M. Coutinho and B. Henrissat: *Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach in Recent*

- Advances in Carbohydrate Bioengineering (eds. Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, B. & Svensson, B.) 3 (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999).
- 5) M. Hidaka, Y. Honda, M. Kitaoka, S. Nirasawa, K. Hayashi, T. Wakagi, H. Shoun and S. Fushinobu: *Structure*, **12** (2004) 937.
 - 6) H. Nakai, M. Kitaoka, B. Svensson and K. Ohtsubo: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17** (2013) 301.
 - 7) V. Puchart: *Biotechnol. Adv.*, **33** (2015) 261.
 - 8) M. Kitaoka: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99** (2015) 8377.
 - 9) M. Hidaka, M. Nishimoto, M. Kitaoka, T. Wakagi, H. Shoun and S. Fushinobu: *J. Biol. Chem.*, **284** (2009) 7273.
 - 10) M. Kitaoka, J. Tian and M. Nishimoto: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (2005) 3158.
 - 11) J.Z. Xiao, S. Takahashi, M. Nishimoto, T. Odamaki, T. Yaeshima, K. Iwatsuki and M. Kitaoka: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76** (2010) 54.
 - 12) M. Nishimoto and M. Kitaoka: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73** (2007) 6444.
 - 13) T. Katayama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80** (2016) 621.
 - 14) M. Nishimoto and M. Kitaoka: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71** (2007) 2101.
 - 15) M. Nishimoto and M. Kitaoka: *Carbohydr Res*, **344** (2009) 2573.
 - 16) M.P. Eglhoff, J. Uppenberg, L. Haalck and H. van Tilbeurgh: *Structure*, **9** (2001) 689.
 - 17) S. Okada, T. Yamamoto, H. Watanabe, T. Nishimoto, H. Chaen, S. Fukuda, T. Wakagi and S. Fushinobu: *FEBS J.*, **281** (2014) 778.
 - 18) A.G. McDonald and K.F. Tipton: *FEBS J.*, **281** (2014) 583.
 - 19) T. Nihira, Y. Saito, K. Ohtsubo, H. Nakai and M. Kitaoka: *PLoS One*, **9** (2014) e86548.
 - 20) T. Nihira, Y. Saito, M. Nishimoto, M. Kitaoka, K. Igarashi, K. Ohtsubo and H. Nakai: *FEBS Lett.*, **587** (2013) 3556.
 - 21) K.K. Touhara, T. Nihira, M. Kitaoka, H. Nakai and S. Fushinobu: *J. Biol. Chem.*, **289** (2014) 18067.
 - 22) Y.W. Nam, T. Nihira, T. Arakawa, Y. Saito, M. Kitaoka, H. Nakai and S. Fushinobu: *J. Biol. Chem.*, **290** (2015) 18281.
 - 23) L.F. MacKenzie, Q. Wang, R.A.J. Warren and S.G. Withers: *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 5583.
 - 24) Y. Honda and M. Kitaoka: *J. Biol. Chem.*, **281** (2006) 1426.
 - 25) Y. Honda, S. Fushinobu, M. Hidaka, T. Wakagi, H. Shoun, H. Taniguchi and M. Kitaoka: *Glycobiology*, **18** (2008) 325.
 - 26) M. Hidaka, S. Fushinobu, Y. Honda, T. Wakagi, H. Shoun and M. Kitaoka: *J. Biochem.*, **147** (2010) 237.
 - 27) J. Wada, Y. Honda, M. Nagae, R. Kato, S. Wakatsuki, T. Katayama, H. Taniguchi, H. Kumagai, M. Kitaoka and K. Yamamoto: *FEBS Lett.*, **582** (2008) 3739.
 - 28) T. Ohnuma, T. Fukuda, S. Dozen, Y. Honda, M. Kitaoka and T. Fukamizo: *Biochem. J.*, **444** (2012) 437.
 - 29) S. Nakae, S. Ito, M. Higa, T. Senoura, J. Wasaki, A. Hijikata, M. Shionyu, S. Ito and T. Shirai: *J. Mol. Biol.*, **425** (2013) 4468.
 - 30) T. Tsuda, T. Nihira, K. Chiku, E. Suzuki, T. Arakawa, M. Nishimoto, M. Kitaoka, H. Nakai and S. Fushinobu: *FEBS Lett.*, **589** (2015) 3816.