



蛋白質研究奨励会

量子構造生物学会

第1回 研究会（講演会）資料

2025年9月29日（月）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）

蛋白質研究奨励会・量子構造生物学委員会
第1回研究会（講演会）プログラム

2025年9月29日（月）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F

13:30 – 13:40

はじめに

中川敦史・代表（JASRI／大阪大学）

講 演

13:40 – 14:40 （講演 1）

司会：加藤貴之・会員（大阪大学）

柔らかなウイルス構造の解明に向けた研究

京都大学・医生物学研究所
杉 田 征 彦（会員）

14:40 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：禾 晃和・会員（横浜市立大学）

PRMT 活性制御と核輸送機構：構造生物学的アプローチによる統合的理解

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科
藤 間 祥 子（会員）

16:00 – 16:05

おわりに

中川敦史・代表（JASRI／大阪大学）

16:05 – 17:00 （研究交流会）

委員・講師間の自由討論

柔らかなウイルス構造の解明に向けた研究

Structural Studies of Dynamic Viral Architectures

京都大学 医生物学研究所／大学院生命科学研究科

杉 田 征 彦

Yukihiko SUGITA

Institute for Life and Medical Sciences; Graduate School of Biostudies,
Kyoto University

1. はじめに

モノネガウイルス目は、フィロウイルス科のエボラウイルス (EBOV)、ラブドウイルス科の狂犬病ウイルス (RABV)、パラミクソウイルス科の麻疹ウイルス (MV)、ニューモウイルス科のヒト RS ウイルス (HRSV)、ボルナウイルス科のボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) など、ヒトや家畜にとって重要な病原体が含まれる (図 1)。

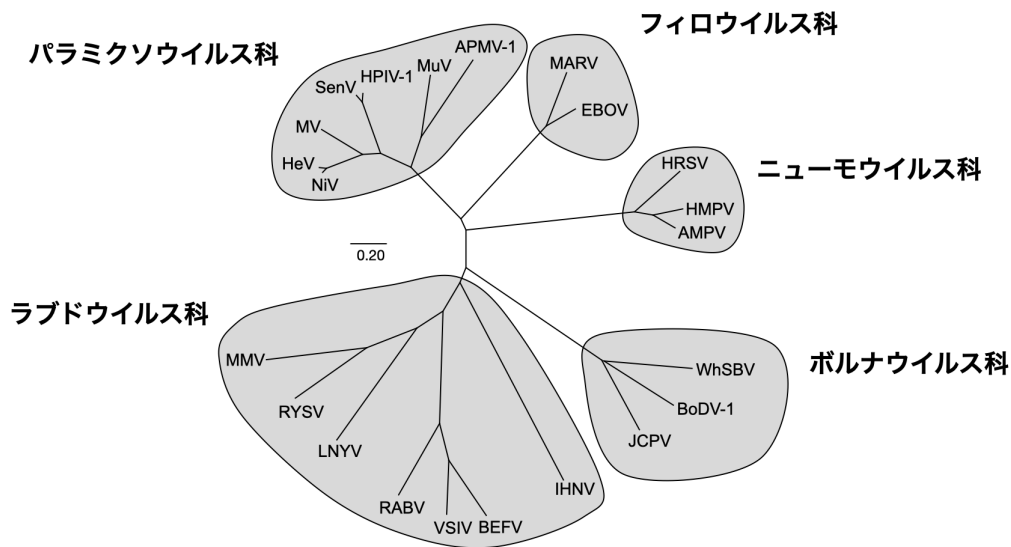


図 1. モノネガウイルス目の分子系統樹

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L タンパク質) アミノ酸配列に基づく。

これらは非分節型マイナス鎖一本鎖 RNA ゲノムをもち、その複製と転写はヌクレオカプシド (NC) と呼ばれるリボヌクレオタンパク質複合体によって行われる。NC のコアは、ヌクレオプロテイン (NP; フィロウイルス以外では N) とゲノム RNA が形成するらせん状の NP-RNA 複合体であり、NC 形成の足場であると同時に RNA 合成の鋳型としても機能する。

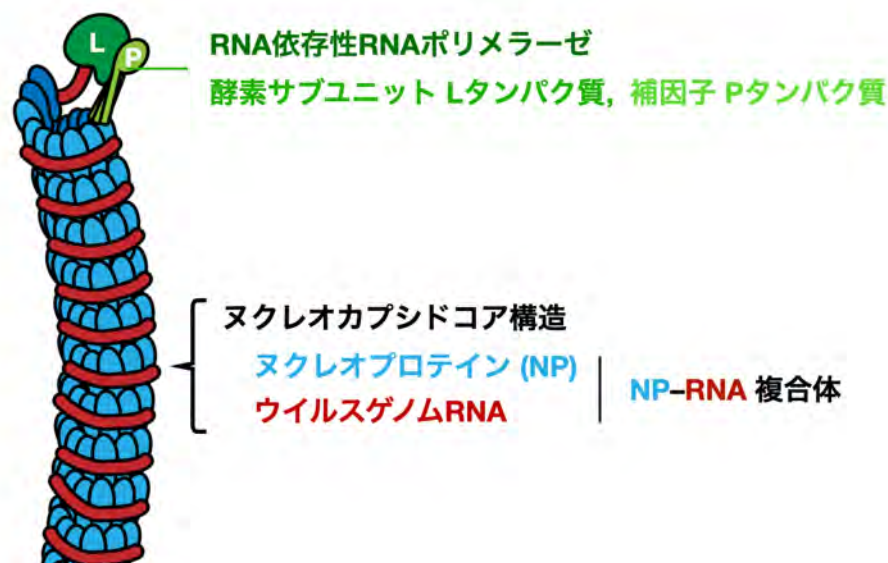


図 2. モノネガウイルスのヌクレオカプシドの模式図

近年、クライオ電子顕微鏡法 (cryo-EM) の技術革新により、NP-RNA 複合体を含むウイルス高次構造体の構造解明が進んでいる。静的な構造情報は NP の RNA 認識や多量体化機構の理解に不可欠だが、実際の複製・転写・アセンブリは複合体構成分子の協調的な構造変化や可塑性に大きく依存する。本講演では、エボラウイルスやマールブルグウイルス (フィロウイルス科) およびボルナ病ウイルス 1 型 (ボルナウイルス科) を対象に、複合体形成機構と NC 構造の多様性について、構造学とウイルス学を融合した観点から紹介する。

2. フィロウイルス NP-RNA 複合体構造

フィロウイルス科の NC コアは NP-RNA 複合体であり、そのらせん構造は基本骨格である。我々は、単粒子クライオ電子顕微鏡法を用いて、エボラウイルス (EBOV, 3.6 Å 分解能) [1]、マールブルグウイルス (MARV, 3.1 Å 分解能)[2]、ヨグヴウイルス (LLOV, 3.0 Å 分解能) [3]の NP-RNA 複合体構造を明らかにした。これらの研究から、らせん構造 (タンパク質四次構造)がウイルス間で異なる一方で、NP の基本的なフォールド (N 末端アーム、N 末端ローブおよび C 末端ローブからなるコアドメイン)や分子間相互作用様式がフィロウイルス間で高度に保存されることが示された (図 3)。

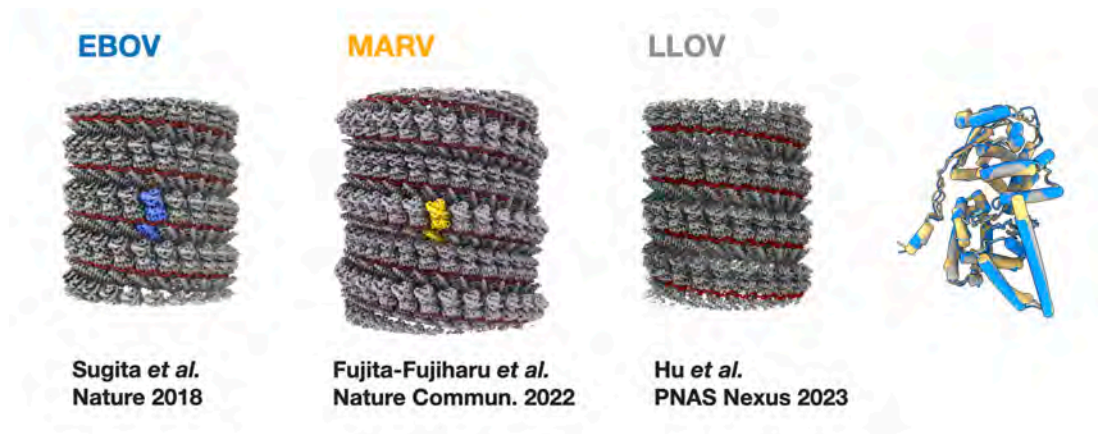


図3. 3種のフィロウイルス NP-RNA らせん複合体のクライオ電子顕微鏡構 (左) と、対応する非対称単位の原子モデルの重ね合わせ (右)

RNA 結合に伴い、NP は開状態 (RNA 非結合型)から閉状態 (RNA 結合型)へ構造変化する。EBOV NP では、 β ヘアピンの約 90° 回転、C 末端側 α ヘリックス (α 16-18)の再配置、 3_{10} ヘリックス (η 5)の形成が協調して、RNA を NP のコアドメイン間に位置する溝状の空間に固定するラッチ様機構を構成する。

さらに、NC 構成因子であるウイルスタンパク質 VP24 が結合したヌクレオカプシド様構造 (NCLS)をエボラウイルス様粒子内で 4.6 Å 分解能で解析し、NP 二量体あたり 2 分子の VP24 (VP24-1/VP24-2)が NP-RNA らせん構造の外側に異なる配向で結合する非対称配置を明らかにした [4]。機能解析により、VP24-

1はAsn171を介したNPとの相互作用でウイルスRNAの転写・複製を抑制し、VP24-2は完全なNCLS形成、細胞内輸送、感染性ウイルス粒子産生に不可欠であることが明らかになった。さらに、NCLS外層には高い可動性を示す構造 (VP35分子や遊離NPなどに相当しうる)も観察され、外層の動的柔軟性が機能制御に関与することが示唆される。これらの結果は、NCの「RNA合成モード」から「輸送・パッケージングモード」への機能転換が、VP24の結合と立体配置により精密に制御されうること示唆している。

3. ボルナウイルス N-RNA 複合体の多様なアセンブリ

BoDV-1は、既知のヒトモノネガウイルスの中で唯一、宿主細胞核内で複製するユニークなウイルスである。我々は、モノネガウイルス目の中でこれまで唯一構造が未解明であった BoDV-1 N-RNA 複合体について、単粒子クライオ電子顕微鏡法で解析した。その結果、RNA結合型 (六量体、七量体、八量体) および RNA非結合型 (四量体、五量体)を含む多様なオリゴマー構造を同定し、その構造を明らかにした [5]。

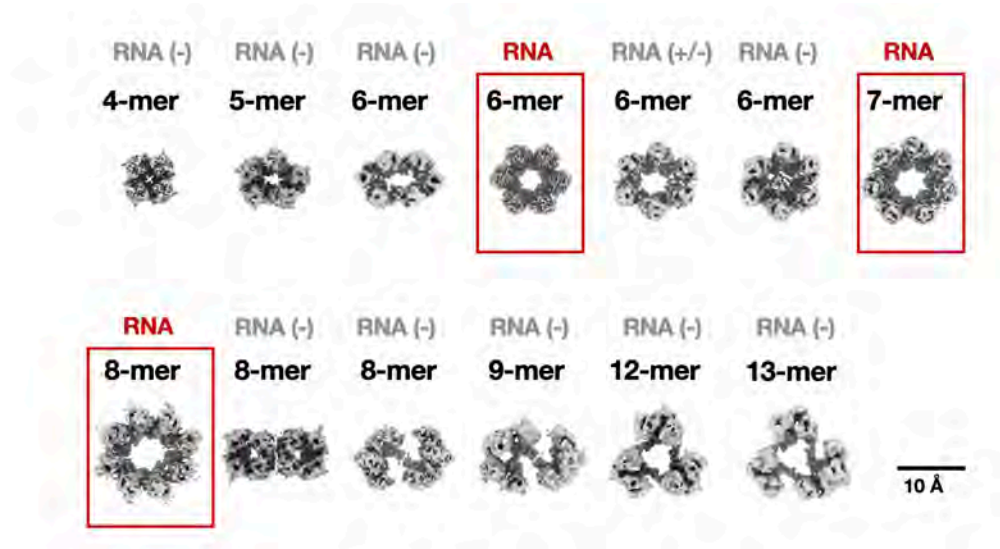


図 4. 単粒子解析法における三次元分類によって同定された多様な N 分子複合体構造. 赤枠は RNA 結合型の複合体を示す。

N-RNA 複合体は NP コアドメイン間に存在する溝状の空間に RNA を抱え込む点で他のモノネガウイルスと類似するが、1 サブユニットあたりに 8 ヌクレオチドの RNA が結合する点でモノネガウイルス目でもユニークであった。RNA 結合に際し、NP コアのヒンジ運動は見られず、C 末端ドメインのループ (314-322 残基) が短いヘリックスへ局所転移し、RNA の安定的な保持に寄与する。

RNA 非存在下でも N は四量体・五量体に加え、S 字型や三角形状といった非典型オリゴマーを形成しうる。複合体構造から RNA 結合に重要と考えられた塩基性残基 (Lys164 など) を変異させると細胞内における RNA 合成活性と核内封入体 (inclusion body; IB) 様会合体形成能は失われるが、RNA 非結合型の形成能は保持された。したがって BoDV-1 の NC アセンブリは、まず N が RNA 非依存的に多様なオリゴマーを形成し、その後に RNA が選択的に取り込まれて特定構造が固定化されるという、モジュール型の経路に従う可能性がある。この「柔らかな中間体」は、NC の段階的アセンブリのチェックポイントとして機能する可能性が考えられる。

4. まとめと展望

フィロウイルスおよびボルナウイルスの解析は、NC コアが静的骨格ではなく、局所的構造変化と多様な高次構造の形成によって転写・複製・アセンブリ・輸送を調節していることが明らかになってきた。フィロウイルスや BoDV-1 に共通してみられた RNA 結合ループの二次構造形成、VP24 の非対称な結合、RNA 非結合型オリゴマーの多様性は、その具体例である。これらの詳細な構造学的理解は、NP 重合界面や RNA 合成の調節サイトといった、NC 形成ならびに機能に必要なホットスポットを標的とする構造ベースの広域抗ウイルス薬創出につながることを期待される。さらに、これらの動的構造を解明することは、ウイルスの基本戦略を理解する上で不可欠であり、今後は、分子動態解析、*in situ* 構造解析、計算モデリングの統合により、NC ダイナミクスの可視化と構造機能関連のネットワーク解明を進めたい。

-
1. Sugita Y *et al.* Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex at 3.6 Å resolution. *Nature* 2018; **563**:137–140.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0630-0>
 2. Fujita-Fujiharu Y *et al.* Structural insight into Marburg virus nucleoprotein–RNA complex formation. *Nat Commun* 2022; **13**:1191.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28802-x>
 3. Hu S *et al.* Cryoelectron microscopic structure of the nucleoprotein–RNA complex of the European filovirus, Lloviu virus. *PNAS Nexus* 2023; **2**: pgad120. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad120>
 4. Fujita-Fujiharu Y *et al.* Structural basis for Ebola virus nucleocapsid assembly and function regulated by VP24. *Nat Commun* 2025; **16**:2171.
<https://doi.org/10.1038/s41467-025-57236-4>
 5. Sugita Y *et al.* Structure and assembly of Borna disease virus 1 nucleoprotein–RNA complexes. *bioRxiv*, 2025.
<https://doi.org/10.1101/2025.05.26.654368>

PRMT活性制御と核輸送機構：
構造生物学的アプローチによる統合的理解

Integrative Structural Biology
of PRMT Activity Regulation and Nuclear Transport Systems

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科

藤 間 祥 子

Sachiko TOMA-FUKAI

Graduate School of Science and Technology,
Nara Institute of Science and Technology

1. はじめに

タンパク質の配列情報をコードする遺伝子の変異は、タンパク質の機能を変化させるため疾患に直接関与する。遺伝子に異常が無い場合でもタンパク質合成後に受ける翻訳後修飾や局在などの制御異常も疾患に密接に関与している。タンパク質合成後のタンパク質の機能あるいは局在の変調は環境的要因も大きく関与する。このようなタンパク質の恒常性維持に重要である翻訳後修飾や局在制御機構の構造生物学的理解は、構造生物学的知見に基づいた合理的な創薬戦略を可能にすると同時に画期的な新薬開発のためのブレークスルーとなる。翻訳後修飾酵素は、『鍵と鍵穴』に代表されるような特異性の高い代謝酵素と比べると、一般的に基質の特異性が低いものが多い。また、タンパク質の局在制御に関しても古典的な明確な局在化シグナルコードでは説明できないものも多く存在する。本講演では、多様な基質を認識する翻訳後修飾酵素PRMTの活性ドメインから構成されるユニークな螺旋状の自己集合構造が制御する触媒活性と細胞内局在、DNA結合ドメインの構造を認識して核輸送を行う新しい核輸送コードの発見などの最近の研究成果を紹介する。

2. 蛋白質アルギニンメチル基転移酵素PRMT1, PRMT8の構造研究

2-1 PRMTファミリーの概要と生物学的重要性

タンパク質のアルギニンの側鎖は蛋白質メチル基転移酵素(Protein Arginine Methyltransferase: PRMT)によってメチル化修飾を受ける。アルギニン側鎖のメチル化はリン酸化やユビキチン化と同等の量であるとの報告もあり、そのほぼ全てをPRMTファミリーが担っている。ゆえにPRMTによるメチル化修飾は、転写、スプライシング、RNAの機能調節、DNA損傷応答、細胞の代謝調節など多岐にわたる生命現象に関与する。PRMTはがん、循環器系疾患など社会的にも大きな問題である疾患に関与する重要な創薬標的である [1, 2, 3].

2-2 PRMT1とPRMT8の特徴比較

PRMTファミリータンパク質は、哺乳類に高度に保存されており、9つのメンバーからなる(図1A)。PRMTは、S-アデノシルメチオニン(SAM)のメチル基を基質蛋白質アルギニン側鎖の窒素に転移し、S-アデノシルホモシステインを生成する。哺乳類のPRMTはアルギニン側鎖のω位の2つの窒素にのみメチル基を付加する。モノメチルアルギニン、非対称ジメチルアルギニン、対称ジメチル

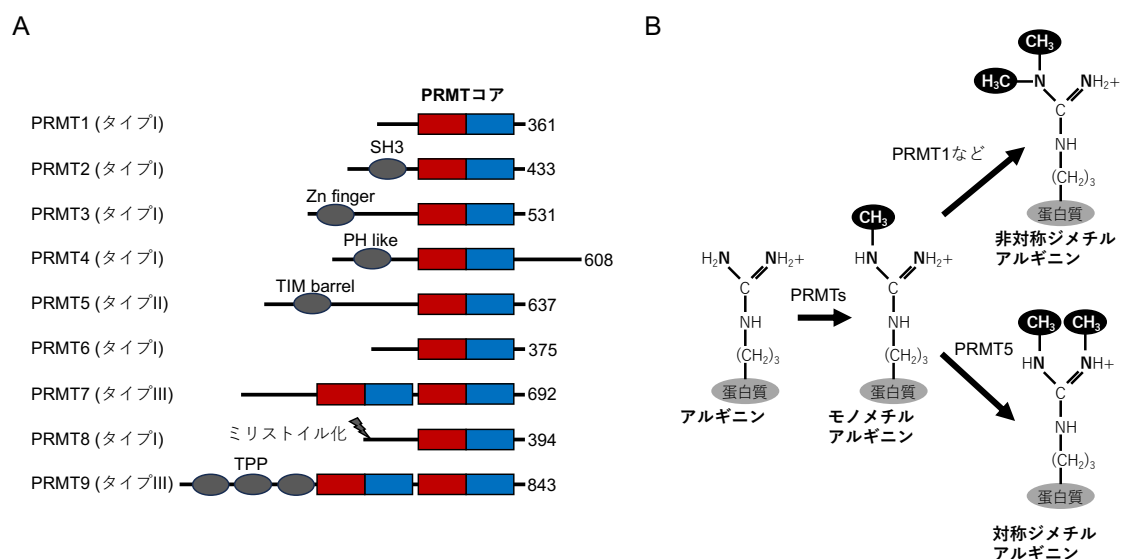


図 1. PRMT ファミリーのドメイン構成とメチル化のタイプ分類. ヒト由来の各 PRMT の機能ドメイン構成と、生成するメチルアルギニンの種類による酵素の分類を示す.

アルギニンの3種類のメチルアルギニンが生成され、その種類によって酵素は3つのタイプに分類される(図1B) [3]. モノメチル化と非対称ジメチル化反応を触媒する酵素をタイプI, モノメチル化と対称ジメチル化を触媒する酵素をタイプII, モノメチル化のみを触媒するタイプIIIである(図1). PRMTファミリーはメチル化を触媒するロスマンフォールドドメインとb-バレルドメインから成る分子量約37kDaのPRMTコア構造を共通して持つ.

PRMT ファミリーのドメイン構成図を見ると、共通のPRMTコアに加えて、各タンパク質は独自の機能ドメインを有していることがわかる(図1A). PRMT1とPRMT8はPRMTコア以外の機能ドメインを持たない. 加えてアミノ酸の一致度も81%と高い. 構造はほぼ同じであると予測できる. 最も明確な違いは、翻訳後修飾の有無である. PRMT8はN末端から2番目のグリシンが脂質(ミリストイル化)修飾を受け細胞膜上に局在する. PRMT1はこの修飾を受けないため、細胞質あるいは核に局在している. 発現細胞も異なり、PRMT1はほぼ全ての細胞に発現するのに対して、PRMT8は脳に特異的に発現する. hPRMT1は細胞内の85%にのぼるアルギニンメチル化反応を触媒することからPRMTファミリーの中で最も重要な酵素である. 細胞内での局在や発現細胞、組織の違いに加えてアミノ酸相同性の高さから、PRMT8はPRMT1の双子のような分子であり、相補的に機能するものであると考えられている.

2-3 PRMT8の螺旋構造の発見

そのような中、筑波大学の深水昭吉研究室においてPRMT8はアルギニンメチル化修飾酵素としての機能に加えて細胞膜上で脂質を切断するホスホリパーゼD (PLD) 活性を持つことが明らかとなり[4], PLD活性機構の解明に向けてhPRMT8の構造研究を開始した. 結晶構造解析を行うためにhPRMT8の高純度精製を行いゲル濾過クロマトグラフィー(SEC)で分子量を評価したところ幅広い分子量分布を持つhPRMT1とは異なり約280kDaの(8量体と見積られる)均一な複合体構造を形成していた. hPRMT8の結晶構造を決定したところ、活性の最小単位とされるダイマー構造をビルディングユニットとして螺旋状の自己集

合構造を形成していた [5]. 結晶内でみられた螺旋状の集合構造は既に決定されていた酵母のリング状 6 量体構造と全く異なっており, 結晶化で生じたアーティファクト構造の可能性も十分に考えられた. そこで, 螺旋状の構造形成に必要な相互作用面上にあるアミノ酸のAla変異体を作成し, フィラメント構造形成の最小ユニットであるダイマー構造のみになるかを検証した. 高純度精製した変異体試料を用いてSECで集合状態を評価した. 結果, 明確な分子量の低下を確認した. また, 正確な分子量を超遠心速度法(AUC-SV)で決定し, 溶液中の概形をX線小角散乱で確認した. 今後この変異体をダイマー型変異体と呼ぶ. 変異体の結果から結晶構造中にみられた螺旋状の集合構造が溶液中でも形成されることが強く示唆されたが, 大きな疑問も残った. 結晶中では途切れることない螺旋状の構造を形成していたが, SEC解析の結果はそれを支持しない. 溶液中の hPRMT8 の約280kDaの安定な複合体のみ存在する. 溶液中での分子量を正確に決定するために, SEC-Multi-Angle Light Scattering(MALS)/ Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)解析を行った. 結果, hPRMT8は溶液中でちょうど螺旋の 1

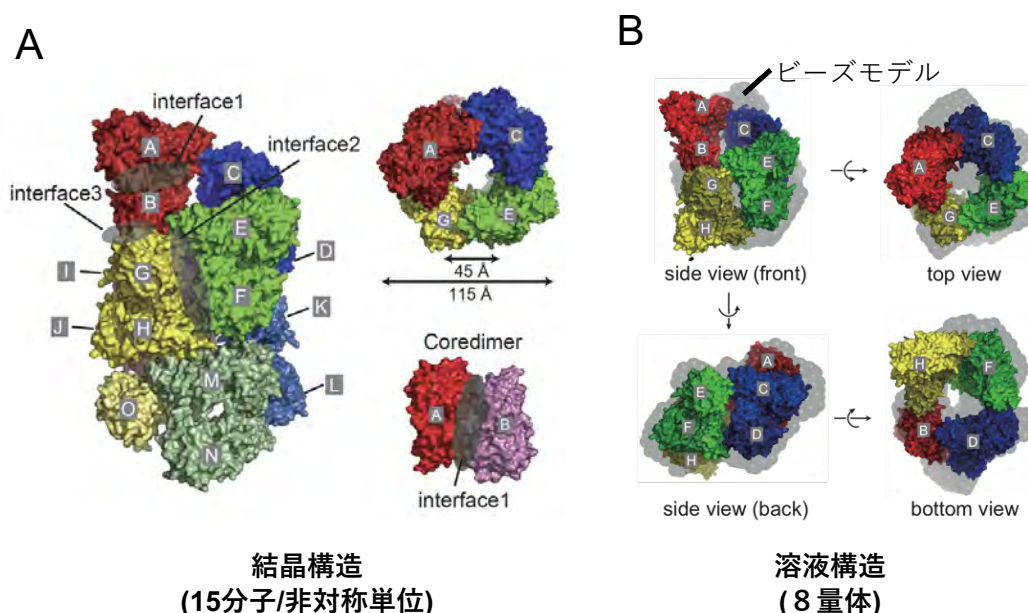


図 2. PRMT8 の螺旋状自己集合構造 A: 結晶構造中の PRMT8 螺旋構造. ダイマー (Coredimer) をビルディングユニットとして形成される. 相互作用面 (interface1-3) を示す. B: 溶液中での PRMT8 8 量体構造のビーズモデル. 異なる方向からの表示.

巻にあたる 8 量体で溶液中に存在すると結論づけた。SEC-SAXSの結果得られた溶液構造は結晶構造から切り出した真ん中に空洞のある 8 量体構造と非常によく一致しており、この結果を得て螺旋状の集合状態の存在に確信を持った。

2-4 構造機能相関解析

2種類（2色）の蛍光蛋白質を用いてBi-Fc assayを行い、細胞膜上でPRMT8がダイマー以上の（おそらく8量体）の高次構造を持つことを確認した。またダイマー型変異体では、細胞質へのhPRMT8の局在変化がはっきりと確認できた。この結果は、ミリストイル化という脂質修飾に加えてhPRMT8の螺旋状高次構形成が膜局在に必要であることが明らかとなった。hPRMT8の4量体以上の集合構造に効率的に細胞膜上に局在するためのしかけがあるのだろうが、今の構造からではその機構を説明することはできない。また、当初の目的である脂質分解機構も未解明である。脂質複合体の結晶化を継続的に取り組んできたが、未だ脂質由来の明確な電子密度を得ることができていない。脂質膜上のhPRMT8の構造解析は今後も継続して取り組んでいく。

2-5 PRMT1への展開と新しい触媒モデル

本研究を開始した時には、ファミリー内の半分のメンバーしか構造が決まっていなかったが、今では全ての構造が決定された。全フォールドが決定された後も重要な創薬標的であるPRMTの構造研究は継続的に盛んに行われ、現在100を超える構造がProtein Data Bankに登録されている。しかしながら低分子阻害剤との複合体構造解析が主となり、基質タンパク質との複合体構造解析例は未だにない。PRMTファミリーの基質認識機構、触媒機構に関しては大きな謎が残されている。細胞内のアルギニン側鎖のメチル化の85%に関与するhPRMT1の構造研究の停滞が大きな理由の1つと考え、現在精力的に構造解析を進めている。hPRMT1は濃度依存的にダイナミックに会合数を変化させる。hPRMT8の構造研究を進める中でhPRMT1の構造こそが結晶構造に近い連続的な螺旋構造であろうことは予測できていた。クライオ電子顕微鏡による構造決定に成功し、予想

通りhPRMT1も螺旋状の集合構造をとることを明らかにした。hPRMT1のダイマー型変異体を用いてメチル化活性を評価したところ、基質の種類や高次構造に依存して触媒活性が変化することを明らかにした。また、この高次構造が基質あるいはメチル化のコファクターであるSAMやSAHとの結合により大きく抑制されることも見出している。これらの結果はhPRMT1がSAM代謝サイクルあるいは基質の有無によってダイナミックに構造を変化することを示しており、細胞内環境の変化に伴い自己集合構造を変化させ機能調節をするという新しい触媒モデルを提唱するものである。本講演では、最近得られたhPRMT1の構造研究を中心に新しい触媒モデルについて紹介する。

3. Transportin-1による積荷蛋白質の認識多様性の構造生物学的解明

3-1 核輸送機構の背景とPRMT1研究との関連

真核生物では、核と細胞質は核膜で隔てられ、核内で働くタンパク質は膜孔複合体を介して細胞質から核内に輸送される。分子量約30kDa以上のタンパク質は単独では核-細胞質間を通過できず、核内輸送受容体蛋白質により輸送される。輸送されるタンパク質は、天然変性構造を有する塩基性配列に富んだ核局在化シグナル(NLS)配列を持ち、対応する輸送受容体により核内へ輸送される。しかし、典型的なNLSを持たないが核内に輸送されるタンパク質も少なからず存在する。その輸送機構は未解明のままである。核輸送の適切な制御は疾患の発症にも密接に関わっており、これら分子が持つ未解明の核輸送機構の構造基盤の確立は、核内輸送機構の全容の解明という理学的意義のみならず創薬研究においても重要である。

実は、上述したPRMT1の最もよく知られた機能はヒストン蛋白質への修飾である。しかしPRMT1は明確なNLSを持たないために輸送機構が未解明であった。PRMT1の基質と核輸送受容体の1つであるTransportin-1(Trn1)の積荷が共通していることに着目し、Trn1を介した未知の核輸送機構の存在を仮説し、研究を開始した。残念ながら、PRMT1とTrn1が直接結合するという結果が得られず、

PRMT1の核輸送メカニズムは未解明のままである。

これがきっかけとなり、我々はTrn1に着目し、典型的なNLSを持たない積荷蛋白質(PPARgとZFTA-RELA)との複合体構造解析研究を開始した。

3-2 PPARg -Trn1複合体：DNA結合ドメイン認識機構

PPARgは核内受容体の1つで、高脂血症 高血糖治療薬の標的分子である。核内に局在するPPARgはリガンド結合依存的に活性化され標的遺伝子の発現を誘導する。PPARgはN末端側からDNA結合ドメイン (DBD) , Hinge領域, リガンド結合ドメイン(LBD)の3つの機能ドメインを持つ。これら全てのドメインを持つほぼ全長体のPPARg (DHL) 試料を調製し、Trn1との結合をSECで確認した。次に、SEC-MALS/SAXS解析を行い、PPARg (DHL)とTrn1が1:1で結合することを確認した。このほぼ全長体のPPARg (DHL)とTrn1の複合体構造をCryo-EM単粒子解析法を用いて3.7Å分解能で決定した。非常に面白いことに、Trn1 はRanGTP結合部位を介してPPARgのDNA結合ドメインを、既知の積荷結合部位を介してHinge領域を認識していた。

構造で同定された相互作用面上のアミノ酸残基のAla変異体を作成し、GSTプルダウン法および培養細胞を用いた核局在率評価により、PPARgのDNA-Hinge領域がNLS構造として機能するという新規の輸送機構を提唱した [6]。

3-3 ZFTA-RELA・Trn1複合体：フォールド依存的制御機構

ZFTA-RELAは脳上衣腫発症の原因となる融合蛋白質である。恒常的に核内に輸送され、上衣腫関連遺伝子の発現を誘導する。ZFTA-RELA複合体では、ZFTA上のZn finger領域に重なる形でNLS様の配列が存在することを実験的に明らかにし、NLSとして機能するペプチド複合体構造を階層的クラスタリング解析(HCA)による構造多型解析を用いたX線結晶構造解析法により3.8Å分解能で決定した [7]。ZFTAはTrn1の積荷結合部位を介して結合していた。こちらはPPARgとは異なり、DNA結合を担うZinc finger構造が変性して亜鉛が配位できない状態でTrn1と結合していた。亜鉛の添加によりZinc finger構造形成を誘導

することでTrn1との結合が減弱したことから、Trn1は亜鉛非結合型のZFTAを好んで結合すると結論づけた。NLSを含むZinc fingerの蛋白質フォールドの形成状態がNLSとしての機能を調節する例は過去に無い。

3-4 創薬応用への展開

相互作用面上のアミノ酸残基のAla変異体を作成し核局在率を評価したところ、Trn1との結合が顕著に減弱した。これら変異は上皮細胞でのZFTA-RELAの核輸送をも顕著に抑制した。モデルマウスを用いた実験においても上皮腫瘍発症を完全に抑制し、致死率0%であった。一連の構造研究結果は、ZFTAのNLSが有望な創薬標的部位であることを示している。

以上のように、我々は、Trn1はPPAR γ やZFTAを既報とは全く異なる独自の結合様式あるいは制御機構で積荷蛋白質を認識することを明らかにしてきた。本発表では、ZFTA-RELAの研究を中心にTrn-1による多様な分子認識機構の一端を紹介する。

1. Guccione, E., Richard, S.: *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 642-657 (2019).
2. Bedford, M. T., Clarke, S. G.: *Mol Cell* **33**, 1-13 (2009).
3. Wu, Q., Schapira, M., Arrowsmith, C. H., Barsyte-Lovejoy, D.: *Nat Rev Drug Discov* **20**, 509-530 (2021).
4. Kim, J.D., Park, K.E., Ishida, J., Kako, K., Hamada, J., Kani, S., Takeuchi, M., Namiki, K., Fukui, H., Fukuhara, S., Hibi, M., Kobayashi, M., Kanaho, Y., Kasuya, Y., Mochizuki, N., Fukamizu, A.: *Sci Adv* **1**, e1500615 (2015).
5. Toma-Fukai, S., Kim, J. D., Park, K. E., Kuwabara, N., Shimizu, N., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Fukamizu, A., Shimizu, T.: *J Mol Biol* **428**, 1197-1208 (2016).
6. Toma-Fukai, S., Nakamura, Y., Kawamoto, A., Shimizu, H., Hayama, K., Kojima, R., Yoshimura, K., Ishii, M., Hirose, M., Teratani, T., *et al.*: *BioRxiv* (2024).
7. Matsuura, H., Sakai, N., Toma-Fukai, S., Muraki, N., Hayama, K., Kamikubo, H., Aono, S., Kawano, Y., Yamamoto, M., Hirata, K.: *Acta Crystallogr* **D79**, 909-924 (2023).