

耐熱性カルボニル還元酵素の結晶構造解析と基質認識機構の解明

5 米田一成*・福田雄大**・荒木朋洋*

* 東海大学農学部バイオサイエンス学科

** 東海大学大学院生物科学研究科

10

短縮表題：耐熱性カルボニル還元酵素の結晶構造解析

15 Crystal structure analysis of extremely thermostable carbonyl reductase and
structural basis for substrate recognition

20 Kazunari YONEDA, Yudai FUKUDA and Tomohiro ARAKI

(Received 13 July 2016; accepted 28 July 2016)

脚注：連絡先 米田一成 e-mail: kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp

25

ABSTRACT

The highly thermostable NAD(P)H-dependent carbonyl reductase (CR; EC 1.1.1.184) from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1 was
30 crystallized using the sitting-drop vapor diffusion method with L-(+)-tartaric acid (tartrate) as the precipitant. The crystals were found to belong to hexagonal space group $P6_122$, with unit-cell parameters $a = b = 109.8 \text{ \AA}$, $c = 243.7 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, and $\gamma = 120^\circ$, and diffracted to 1.80 \AA resolution on beamline AR-NW12A at the Photon Factory. The crystal structure of *A. pernix* CR was determined in the presence of
35 NADPH and the substrate analog, tartrate. The ternary complex structure of *A. pernix* CR was determined using the molecular replacement method, and was refined at a resolution of 1.80 \AA with a crystallographic R -factor of 22.5% (R_{free} 23.4%). The asymmetric unit consisted of one homodimer. The final structure showed good geometry with no Ramachandran outliers, and consisted of 494 amino acid residues,
40 two NADPH molecules, two tartrate molecules, and 490 water molecules. In the present model, a portion of the surface loop in the C-terminal domain (M192-L197 in subunit A) was disordered and not visible on the electron-density map. Based on the orientation of the tartrate, we modeled the ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate [(*S*)-CHBE] as a product into the active site cavity of the *A. pernix* CR. Within this
45 structure, the hydroxyl group of (*S*)-CHBE forms a hydrogen bond with the side chain of Ser141 and Tyr155. Therefore, in this paper, we describe the structural determination and structure of CR based on the (*S*)-CHBE recognition mechanism and *S*-specific reduction reaction mechanism.

結 言

50 カルボニル還元酵素(CR, EC: 1.1.1.184)はアルデヒド, ケトンあるいはキノン
などの様々なカルボニル化合物の酸化還元反応を触媒する NAD(P)H 依存性の
酸化還元酵素である. CR はあまりに基質特異性が広い酵素であるため, 生体内
において毒物などの生体異物を分解あるいは排泄するための代謝反応に広く関
55 与する酵素であることが推測されているが, 本来の生理的意義はほとんど明ら
かにされていない. これまでに分子量や酵素化学的諸性質が異なる多様な CR
が様々な生物種から発見されているにも関わらず (1-4), 全ての CR は短鎖型
脱水素酵素/還元酵素ファミリー (SDR ファミリー) に属す. この SDR ファミ
リーに属す酵素のアミノ酸配列には, 触媒において重要な役割を担うチロシン
残基が保存されているアミノ酸モチーフ (S-Y~~xxx~~K)および酸化還元酵素活性に
60 必須な補酵素 NAD(P)H の結合アミノ酸モチーフ (G~~xxx~~G~~xx~~G), の 2 つの共通す
る配列が厳密に保存されていることが既に知られている (5).

我々はこれまでにニワトリの脂肪肝特異的に発現する機能未知タンパク質が
CR 活性を有する酵素であることや, 基質特異性の解析から ethyl
4-chloro-3-oxobutanoate (COBE)を良好な基質として, NAD(P)H 依存的に還元し,
65 (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate [(S)-CHBE]を生産する酵素であるという知見を
見出している (6, 7). この反応は産業応用上重要な知見であり, 基質 COBE を
不斉還元することで, 高コレステロール血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素
阻害剤の原料として有用な(S)-CHBE を合成することが可能である (8, 9). ま
た, 本酵素の結晶構造解析にも成功しており, 他の生物種の CR では見られな
70 いユニークな基質結合に関わるアミノ酸残基の特定にも成功している (7). し
かしながら, ニワトリ脂肪肝由来 CR は 3 日で酵素活性が半減してしまうほど
非常に不安定な酵素であり, 酵素の応用展開には大きな問題があることも判明
していた.

そこで、我々はゲノムデータベースを利用し、ニワトリ脂肪肝由来 CR と相
75 同性を有する好熱菌由来の CR ホモログ遺伝子を検索した結果、超好熱菌
Aeropyrum pernix K1（最適生育温度 95°C）に 28%とわずかではあるものの、CR
をコードしていると予測される遺伝子(ORF ID: APE_2503.1)を見出すことに成
功した。本酵素はもともと脂肪酸生合成経路に関わる酵素として知られている
3-オキソアシル-アシルキャリアプロテイン還元酵素とアノテーションされて
80 おり、CR 活性を有するのか、また、(S)-CHBE を合成することが可能な酵素であ
るか全く不明であったが、酵素のクローニングおよび機能解析を行った結果、
本酵素が高度耐熱性を有す CR であり、また COBE を良好な基質とすることを
明らかにしている (10)。超好熱菌由来の CR の報告例はこれまでに無く、安定
性の高い CR は有用なキラル化合物合成などへの有効利用が期待できると考え
85 られる。本酵素はすでに NADPH との 2 者複合体の X 線結晶構造解析を行い、
NADPH の認識機構や安定化のメカニズムを明らかにしているが、基質複合体
結晶の作成や立体構造解析には至っておらず、基質認識に関わる詳細な分子メ
カニズムの情報は不明のままである (10)。そこで、本研究ではこれまでとは
異なった晶系の結晶を作成し、立体構造解析を行うことで *A. pernix*
90 CR-NADPH-酒石酸(基質アナログ)の 3 者複合体の構造決定を行うとともに、基
質結合部位に結合していた酒石酸の構造に基づいて CR の反応産物である
(S)-CHBE をモデリングすることにより CR の基質認識機構および反応機構を考
察した。

95

材料および方法

100

試薬

タンパク質結晶化キットである Crystal Screen および Crystal Screen 2 は Hampton Research (米国) から購入した. 96 穴結晶化プレートは Rigaku (東京) から購入した. L-(+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物, 及び
105 [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)] HEPES はナカライテスク (京都) より入手した. その他の試薬は市販の特級または生化学用試薬を用いた.

耐熱性 CR の発現, 精製および結晶化

110 超好熱菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来 CR の大腸菌を用いた発現, 精製は Fukuda らの方法に従って行った (10). MICROCON YM-30 (Millipore, 米国) を使用し精製酵素を 5.1 mg/ml まで濃縮後, 還元型補酵素である NADPH および酵素反応のプロダクトである (S)-CHBE をそれぞれ終濃度 0.2 mM になるように加え, シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化スクリーニングを行った. す
115 なわち, 96 穴結晶化プレートを使用し, 精製酵素 1 μ l とリザーバー溶液 1 μ l を混合した後, リザーバー溶液 100 μ l と共に密閉し, 暗所 (20°C) で約 1 ヶ月静置した.

120 X 線回折データ測定

得られた結晶を用い, 筑波の高エネルギー加速器研究機構 (KEK AR-NW12A ビームライン) において X 線回折実験を行った. データ測定には気体窒素を吹きかけ, -180°C の極低温条件下で測定を行うクライオ測定の技術を用いた. ク

ライオプロテクタント（抗凍結剤）にはエチレングリコールを選択し、結晶化
125 条件に終濃度 30%（V/V）になるようにエチレングリコール溶液を加え実験に
用いた。

X線の波長は 1.00 Å, 振動角度は 1 イメージにつき 1°, 結晶から X 線二次元
検出器（ADSC Quantum 270）までの距離は 213.91 mm に設定にした。データの
処理には HKL2000 (11) を用いた。

130

位相決定および構築した構造の精密化

得られた X 線回折データを元に分子置換法を用いて, A. pernix 由来 CR の
NADPH-基質アナログ 3 者複合体の位相決定を行った。分子置換のプログラム
には MOLREP (12) を用いた。サーチモデルには A. pernix 由来 CR-NADPH の
135 2 者複合体の立体構造データ（PDB code = 5B1Y）を用いた。

プログラム COOT (13) を用いて 1-250 アミノ酸残基をアミノ酸配列通りに
電子密度にフィッティングを行った。その後、プログラム REFMAC5 (14) およ
び CNS (15) により構造の精密化を行った。A. pernix CR の立体構造の妥当性（ペ
プチド結合の 2 面角の妥当性； Φ, Ψ 角）の評価は MOLPROBITY (16) を用い、
140 ラマチャンドラランプロットで解析を行った。(S)-CHBE の座標ファイルは
ChemDraw (HULINKS Inc.) および PRODRG サーバー
(<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg/>)を用いて作成した。水素結合の
検出にはプログラム CCP4mg (17) を用い、分子構造の描画にはプログラム
PyMOL (DeLano Scientific LLC.) を用いた。

145

結果および考察

150

結晶化およびデータ測定

結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、Crystal Screen No. 29 (0.1 M HEPES バッファー pH 7.5, 0.8 M L-(+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物) の条件での単結晶の析出が確認できた。更に、沈殿剤である酒石酸の濃度を
155 0.4-1.0 M の範囲で条件展開することで約 0.3 mm のバイピラミッド型の単結晶を作成することに成功した (Fig. 1A)。本結晶を用いて X 線回折実験を行ったところ、最高分解能 1.80 Å であり、空間群は六方晶系である ~~P6₁22~~ であった (Fig. 1B)。すでに報告している A. pernix 由来 CR-NADPH の 2 者複合体 (PDB code = 5B1Y) の解析に用いた結晶は 2.0 M NaCl を沈殿剤として得られた結晶で
160 あり、最高分解能が 2.09 Å、空間群 ~~P4₃2₁2~~ であったことから、本研究ではこれまでとは異なった晶系の結晶作成および、より高分解能なデータ収集を行うことができた。

“Fig. 1 を挿入”

165

立体構造解析および全体構造

解析の結果、活性中心には水以外の分子と予測される明瞭な電子密度が観察されたため、クライオの測定溶媒に用いたエチレングリコール分子と予測して、電子密度にアサインしたものの、エチレングリコールが 2 分子分以上入る大きさの電子密度であり、カルボキシル基と予測される形状の電子密度も観察された。
170 そこで、結晶化試薬として高濃度使用した酒石酸の存在が予測されたため、電子密度にアサインしたところ、ぴったり当てはまり、活性中心に観測された電子密度を酒石酸として解釈することができた。また、NADPH は電子密度へ容

易にフィッティングすることが可能であった。最終的に *A. pernix* 由来
175 CR-NADPH-酒石酸の 3 者複合体を R 値= 0.225, free R 値= 0.234 で構造決定する
ことに成功した(Table 1). 非対称単位中にはホモダイマーが 1 分子存在してお
り, 494 アミノ酸残基, 2 分子の NADPH, 2 分子の酒石酸, 490 の水分子で構成さ
れていた (Fig. 2) . また, マッシュューズ係数は $3.49 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, 結晶中の溶媒含有量
は 64.5%であった. MOLPROBITY を用いたラマチャンドランプロットの解析の
180 結果, 全てのアミノ酸残基が許容範囲内であった. モノマー構造はロスマンフ
ォールドドメイン (N 末ドメイン) と触媒ドメイン (C 末ドメイン) の 2 つで
構成されていた.

B サブユニットは Met1-Thr250 の 250 アミノ酸残基全てモデル構築すること
ができたが, A サブユニットの分子表面のループ領域である Met192-Leu197 の 6
185 アミノ酸残基は明瞭な電子密度が観察できず, アミノ酸をアサインすることが
できなかった. また, 本酵素は pET-15b (Novagen, 米国) をタンパク質発現用
プラスミドとして使用しているため, His-tag 配列 (20 アミノ酸) が CR の N 末
端に付加されているが, 構造解析の結果, His-tag 配列の電子密度は観察されな
かった. 結晶化の際に CR の酵素反応プロダクトである (*S*)-CHBE と共結晶化し
190 たものの, 結晶化の沈殿剤として使用した高濃度の酒石酸(0.8 M)が基質結合部
位を占有し, (*S*)-CHBE は基質結合部位に結合しなかったと考えられる.

“Fig. 2 を挿入”

“Table 1 を挿入”

195 酒石酸複合体構造および(*S*)-CHBE のモデリング

活性中心に結合している酒石酸の C1 カルボキシル基は触媒残基である
Ser141, Tyr155 の側鎖と水素結合しており, 酒石酸の C4 カルボキシル基は
Arg248 の側鎖および, Val150, Ala151 の主鎖の NH と水素結合していた (Fig. 3A).

また、酒石酸のカルボニル基は Arg248 の側鎖と相互作用することを明らかに
200 した。触媒残基である Lys159 は NADPH のニコチンアミドリボースのヒドロキ
シル基との水素結合していた (Fig. 3A) 。得られた酒石酸複合体の構造から C1
カルボキシル基の部分が CR の基質のカルボニル基の位置に相当するのではな
いかと予測されたため、活性中心に結合した酒石酸 (基質アナログ) の配向か
ら CR の酵素反応産物である (S)-CHBE の結合モデルを構築し、これまで不明で
205 あった基質結合に関与するアミノ酸残基を同定した。モデリングの結果、
(S)-CHBE のヒドロキシル基は触媒残基である Ser141, Tyr155 の側鎖と水素結合
しており、(S)-CHBE のカルボニル基は Arg248 の側鎖と水素結合していた (Fig.
3B) 。また Val150 が (S)-CHBE の酸素原子および疎水性のエチル基と相互作用
することが予測され、S体選択的に反応が可能な配向で (S)-CHBE が A. pernix 由
210 来 CR の触媒部位に結合することが示唆された (Fig. 3B) 。補酵素 NADPH のニ
コチンアミド-リボース間の結合が syn 型の構造であることから NADPH のピリ
ジン環の C4 位からの水素転移は si 面 (pro-S; B-type) 特異的に起こると考えら
れることも S体選択的に COBE の還元反応が可能な理由と言える。

215 “Fig. 3 を挿入”

A. pernix CR とニワトリ脂肪肝 CR の構造比較

これまでの我々の研究により A. pernix 由来 CR およびニワトリ脂肪肝由来
CR の両酵素において COBE が良好な基質となることをすでに明らかにしてい
220 る (7, 10) 。COBE に対する親和性はニワトリ脂肪肝由来 CR の方がはるかに高
い事をすでに報告している (A. pernix CR; $K_m = 0.7 \mu\text{M}$, ニワトリ脂肪肝由来 CR;
 $K_m = 0.008 \mu\text{M}$) が、その分子認識機構は未だに不明であった。そこで、(S)-CHBE
のモデリングを行った A. pernix CR の構造とニワトリ脂肪肝由来 CR (PDB code

= 3WXB)の重ね合わせを行い、活性中心に結合した(S)-CHBEの周辺構造を比較
225 することで、基質に対する親和性の違いについて考察した。 A. pernix CR では
(S)-CHBEのエチル基とクロル基の周辺に存在するアミノ酸は Val150, Phe187,
Arg248であるが、ニワトリ脂肪肝由来 CR では(S)-CHBEの疎水性のエチル基を
疎水性アミノ酸である Tyr168, Tyr172 が認識するとともに、マイナスにチャー
230 ージしているクロル基と Trp210のNHがインタラクションし、(S)-CHBEの酸素原
子は構造上、Arg179がインタラクトすることが推定された (Fig. 3B)。ニワト
リ脂肪肝 CRの Tyr168, Tyr172は基質結合部位にフタをする役割の”Active site
lid” (Ile164-Gln174)内に存在するアミノ酸残基であり、他の生物種の CRではア
ミノ酸残基の保存性が全くないユニークな配列である。特に、Y172に関しては
アラニン置換変異体の解析により、基質である 9,10-phenanthrenequinone に対す
235 る K_m 値が 12.5 倍上昇することをすでに明らかにしている (7)。モデリングの
結果では Y172が活性中心で(S)-CHBEを抑え込むような形でインタラクション
することが予測されることから、モデリングした構造と酵素化学的データの結
果が良く一致していると言える。これらの結果より、ニワトリ脂肪肝由来 CR
では A. pernix CRと比較して(S)-CHBEとのインタラクションがより強固にな
240 っていることを立体構造に基づき説明することが可能となった。これらの結果
は、高脂血症治療薬の合成中間体として有用なキラル化合物である(S)-CHBE
に対するハイアフィニティーな酵素の創製などへの応用利用に役立つ情報とな
りうる。

245

謝 辞

250 本研究を実施するにあたり，貴重なご意見や様々な支援を頂きました大阪工業大学工学部生命工学科 大島敏久教授，香川大学農学部応用生物科学科 櫻庭春彦教授に感謝いたします．また，X 線回折実験を行った機関である高エネルギー加速器研究機構のスタッフの皆様に感謝します．本研究課題に関する放射光実験は，放射光共同利用実験採択課題番号 2014G502 で実施されたものです．

255

260

265

270

要 約

275 カルボニル還元酵素(CR, EC: 1.1.1.184)は NAD(P)H を補酵素として様々なカルボニル化合物の還元反応を触媒する酵素である。安定性の高い CR は有用なキラル化合物合成などへの有効利用が期待できる。本研究では超好熱菌である *Aeropyrum pernix* K1 由来の耐熱性 CR の NADPH-酒石酸 (基質アナログ) との 3 者複合体の結晶構造解析を行うとともに, CR の酵素反応産物である(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル[(S)-CHBE]の構造を活性中心にモデリングした。 280 0.8 M L-(+)-酒石酸を沈殿剤として NADPH-酒石酸との複合体結晶を取得し, X線回折実験を行った結果, 最高分解能 1.80 Å のデータを取得し, 最終的に分子置換法により *A. pernix* CR-NADPH-酒石酸の 3 者複合体の構造を決定することに成功した。触媒部位では Ser141, Tyr155 が酒石酸の C1 カルボキシル基との水素結合に 285 関与し, Lys159 は NADPH のニコチンアミドリボースのヒドロキシル基との水素結合に関与していた。酒石酸の構造に基づいて(S)-CHBE のモデリングを行ったところ, S 体選択的に反応可能な配向で(S)-CHBE が基質結合部位に結合することが示唆された。これら構造情報は, 高脂血症治療薬の合成中間体として有用なキラル化合物である(S)-CHBE 生産のための人工 CR 創製への 290 応用利用に役立つ情報となりうる。

295

引用文献

300

1) Wermuth, B. 1985, *Enzymology of Carbonyl Metabolism 2* (T.G. Flynn, H. Weiner, eds.) Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 209-230.

2) 石倉周平, 2005, *生物工学会誌*, **83**, 181-184.

3) Sgraja, T., Ulschmid, J., Becker, K., Schneuwly, S., Klebe, G., Reuter, K. and
305 Heine, A. 2004, *J. Mol. Biol.* **342**, 1613-1624.

4) Zaccai, N.R., Carter, L.G., Berrow, N.S., Sainsbury, S., Nettleship, J.E., Walter, T.S., Harlos, K., Owens, R.J., Wilson, K.S., Stuart, D.I. and Esnouf, R.M. 2008, *Proteins* **70**, 562-567.

5) 田中信忠, 2005, *生物工学会誌*, **83**, 185-187.

6) Yoneda, K., Fukuda, Y., Shibata, T., Araki, T., Nikki, T., Sakuraba, H. and Ohshima,
310 T., 2012, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **68**, 1568-1570.

7) Fukuda, Y., Sone, T., Sakuraba, H., Araki, T., Ohshima, T., Shibata, T. and Yoneda, K., 2015, *FEBS J.* **282**, 3918-3928.

8) Patel, R.N., McNamee, C.G., Banerjee, A., Howell, J.M., Robinson, R.S. and
315 Szarka, L.J. 1992, *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**, 731-738.

9) 清水昌, 山田秀明, 1991, *有機合成化学協会誌*, **49**, 52-62.

10) Fukuda, Y., Sakuraba, H., Araki, T., Ohshima, T. and Yoneda, K., 2016, *Enzyme Microb. Technol.* **91**, 17-25.

11) Otwinowski, Z. and Minor, W. 1997, *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.

12) C.C. Project. 1994, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763.

13) Emsley, P. and Cowtan, K. 2004, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132.

14) Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. 1997, *Acta Crystallogr. D Biol.*

Crystallogr. **53**, 240-255.

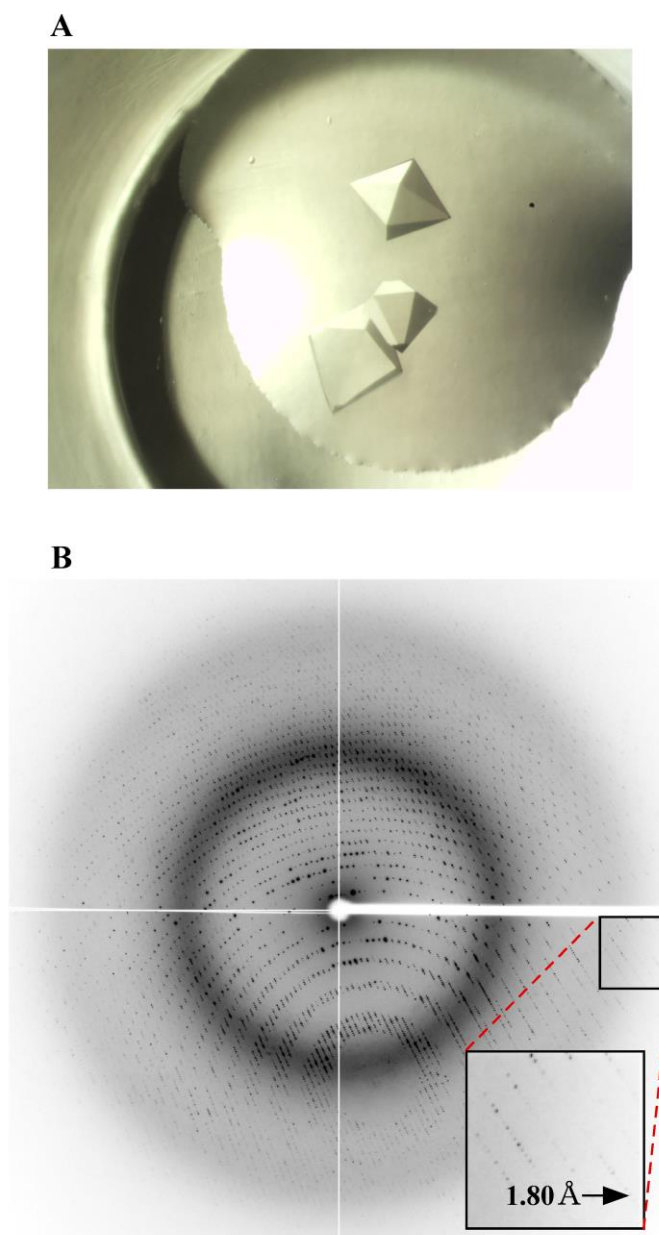
- 325 15) Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P.,
Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read,
R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. 1998, Acta Crystallogr. D Biol.
Crystallogr. **54**, 905-921.
- 16) Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall W.B. 3rd, de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant,
330 M.G., Richardson, J.S. and Richardson, D.C. 2003, Proteins **50**, 437-450.
- 17) Potterton, E., McNicholas, S., Krissinel, E., Cowtan, K. and Noble, M. 2002, Acta
Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **58**, 1955-1957.

335

340

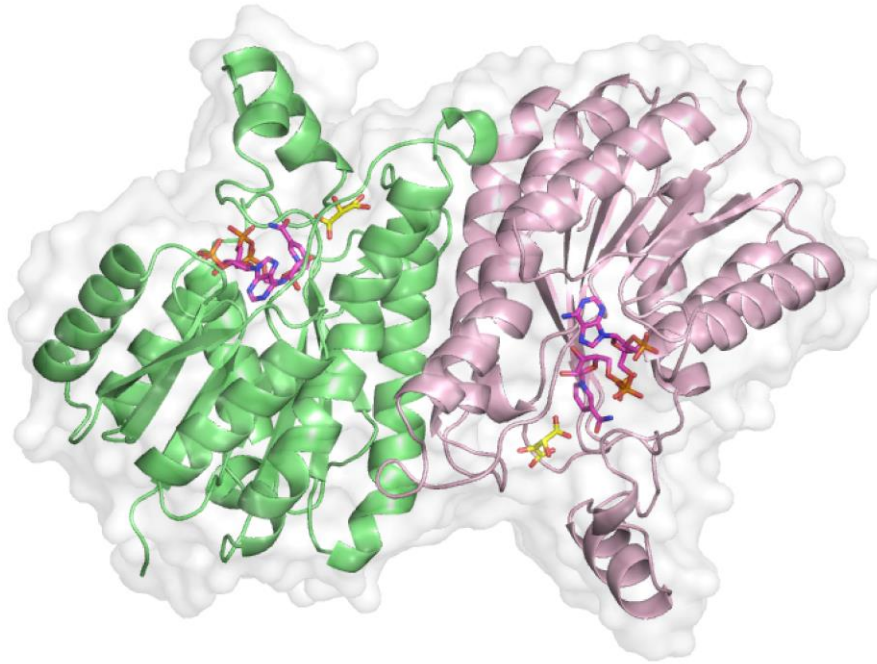
345

350 Fig. 1



355 **Fig. 1.** Hexagonal crystals and X-ray diffraction pattern of *A. pernix* CR. (A) *A. pernix* CR/NADPH/tartrate ternary complex at 1 month in the crystallization step using the sitting-drop vapor-diffusion method at 20°C. The maximum dimensions of the crystal were 0.3 × 0.3 × 0.1 mm. (B) The X-ray diffraction pattern of a native *A. pernix* CR crystal. The resolution is approximately 1.80 Å at the edge. The high-resolution area is enlarged (inset).

Fig. 2



360 **Fig. 2.** The dimeric structure of *A. pernix* CR. The subunit A and B are shown in
green and pink, respectively. NADPH (magenta) and tartrate (yellow) molecules are
shown as a stick model. Oxygen and nitrogen atoms are shown in red and blue,
respectively.

365

CR and the proposed binding model of the (S)-CHBE. The C4 atom of the pyridine
375 ring (a hydride acceptor site), and si- and re-faces are labeled. NADPH (magenta)
and (S)-CHBE (cyan) molecules are shown as a stick model. The structures of A.
pernix and chicken fatty liver CR are shown in pink and blue, respectively. Oxygen,
nitrogen and chloride atoms are shown in red, blue and green, respectively.

380

385

390

395

400 **Table 1.** Data-collection, processing, phase determination, and refinement statistics for *A. pernix* CR.

Data collection	
Wavelength (Å)	1.00
Temperature (K)	100
Space group	$P6_122$
Unit cell parameters (Å, °)	$a = b = 109.8, c = 243.7$ $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Resolution range (Å) ^a	50.00-1.80 (1.83-1.80)
No. measured reflections	2307616
No. unique reflections	80994
Redundancy ^a	28.5 (29.6)
R_{merge} ^a	0.080 (0.307)
$R_{\text{p.i.m.}}$ ^a	0.016 (0.061)
Completeness (%) ^a	99.9 (100)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13.1
Refinement	
Resolution range (Å)	35.5-1.80
R/R_{free} ^b	0.225/0.234
No. of protein atoms	3735
No. of water molecules	490
No. of ligands	NADPH, 2 Tartaric acid, 2
RMSD	
Bond lengths (Å)	0.025
Bond angles (°) ^c	2.3
Average B-factors (Å ²)	
Protein atoms	21.0
Water molecules	36.9
NADPH molecules	44.1
Tartaric acid molecules	41.3
Ramachandran quality ^c	
Favored regions (%)	96.5
Outliers (%)	0.0

405 ^aValues in parentheses are for the last resolution shell.
^b R_{free} was calculated with randomly selected reflections (5%).
^cMOLPROBITY (16) was used to monitor and validate the structural model.

410