

修飾酵素と基質タンパク質の反応前後における複合体結晶の作製と構造に基づく反応機構—ウェルシュ菌イオタ毒素 Ia によるアクチンの修飾機構—

鶴村俊治

京都産業大学総合生命科学部 〒603-8555 京都府京都市北区上賀茂本山

津下英明

京都産業大学総合生命科学部 〒603-8555 京都府京都市北区上賀茂本山

要旨

ウェルシュ菌から分泌されるモノ ADP リボシル化毒素である Ia は、アクチンの Arg177 を特異的に ADP リボシル化する。ADP リボシル化の反応機構を知るには、Ia とアクチンの複合体構造の解明が重要であるが、本来の基質である NAD⁺ 結合型および Ia-ADP リボシル化アクチンの複合体構造は明らかではなかった。それらの複合体の構造を得るべく結晶化条件や X 線回折実験の条件など試行錯誤を繰り返し、NAD⁺ が結合していないアポ型 Ia-アクチン複合体結晶を得た。このアポ型 Ia-アクチン複合体結晶を基質溶液、抗凍結剤溶液に異なった条件で浸漬することで NAD⁺ 結合型 Ia-アクチンと Ia-ADP リボシル化アクチンの複合体結晶を作り分けることに成功し、高分解能の構造を明らかにした。ADP リボシル化反応の前後の構造から、ADP リボシル化の反応機構として“strain-alleviation (緊張と緩和) モデル”を提唱した (PNAS2008, PNAS2013)。オキソカルベニウムイオンの 2 つの中間体を経てアクチン Arg177 への ADP リボシル化の修飾反応が起きると考えられる。

この解説ではアポ型複合体からの NAD⁺ 結合型複合体および Ia-ADP リボシル化アクチン複合体結晶の作製と、それらの構造に基づく ADP リボシル化の反応機構を紹介する。

1. ADP リボシル化毒素

ADP リボシル化とは、ADP リボシル基転移酵素 (ART) によって引き起こされる反応で、NAD⁺ から ADP リボース部分が切り取られ標的タンパク質に加えられ翻訳後修飾の一つである (Fig. 1)。モノ ADP リボシル化はある特定の細菌毒素の病原性メカニズムに関係することが明らかにされ、それらの ART はそれぞれの標的タンパク質に基づき、いくつかのタイプに分類することができる。Fig. 2A に示すようにタイプ I としてコレラ毒素¹⁻³⁾、百日咳毒素⁴⁾と大腸菌易熱性エンテロトキシン⁵⁾などがあり、それらはヘテロマーの GTP 結合タンパク質のシステインまたはアルギニンを標的としている。タイプ II に分類されるジフテリア毒素と緑膿菌毒素が elongation factor 2 のジフタミドを修飾する⁶⁾。タイプ III として、ボツリヌス菌の C3 毒素は、GTP 結合タンパク質のアスパラギンを標的とし⁷⁾、タイプ IV では、ボツリヌス菌の C2 毒素^{8,9)}とウェルシュ菌のイオタ毒素¹⁰⁾が、アクチンのアルギニンを ADP リボシル化する。近年、他のタイプ IV とは異なりアクチンを標的とするがアルギニンではな

くスレオニンを修飾する toxin complex component C3 (TccC3) や、他のタイプ III とは異なり GTP 結合タンパク質を標的としながらもアスパラギンではなくグルタミンを修飾する TccC5 など新しいタイプの ART も報告されている¹¹⁾。

ART は細胞に感染するために ADP リボシル化酵素部分に加え膜輸送部分を持ち、一つの酵素の中に両方の要素を持つものもあれば、酵素部分と輸送部分を別々のサブユニットとして持つものもある (Fig. 2A)。ART は、宿主のエンドサイトーシスの機構を利用しエンドソームを乗り物として細胞内に入り込む。自身が乗ったエンドソームがリソソームに到達し分解処理を受ける前に膜輸送サブユニットによりエンドソームから細胞質に移行すると考えられる¹²⁻¹⁶⁾。

我々は、タイプ III とタイプ IV の毒素を研究対象としている。前者は、細胞内でのシグナル伝達系に重要な低分子量 G タンパク質である Rho を特異的に修飾し様々な影響を及ぼし、その影響の一つとして間接的に細胞骨格系にも影響し細胞の形態が維持できなくなる (Fig. 2B)。後者のタイプ IV 毒素はアクチンを特異的に修飾することで直

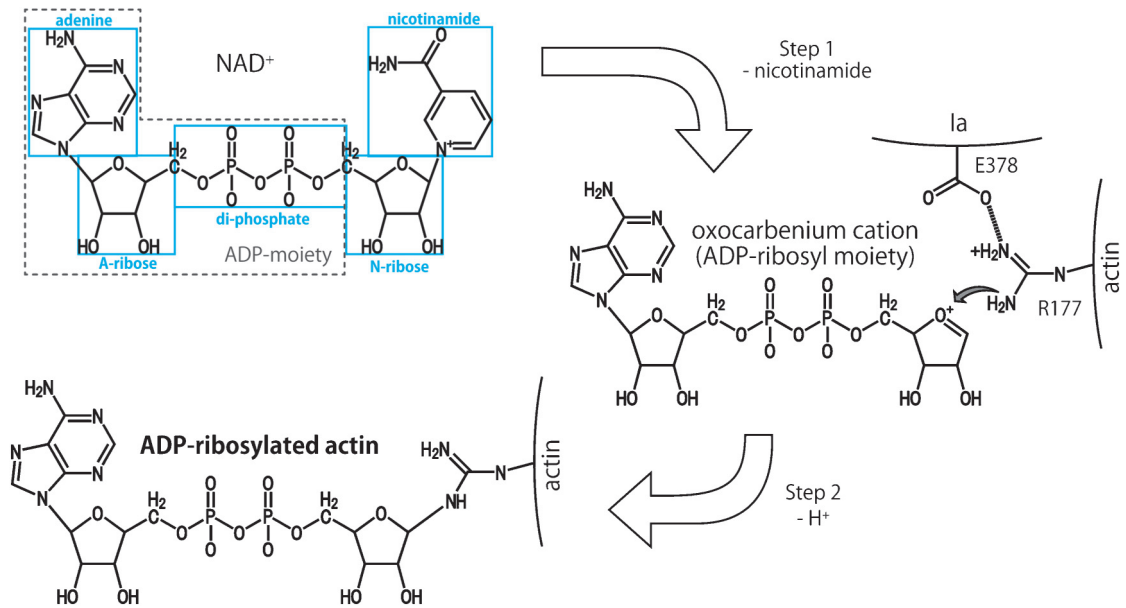


Fig. 1 Catalytic mechanism of ADP-ribosylation reaction. Step 1: Cleavage of nicotinamide moiety and production of oxocarbenium cation. Step 2: deprotonation of Arg177 of actin and making bond between N1 of N-ribose and guanidyl nitrogen of Arg177.

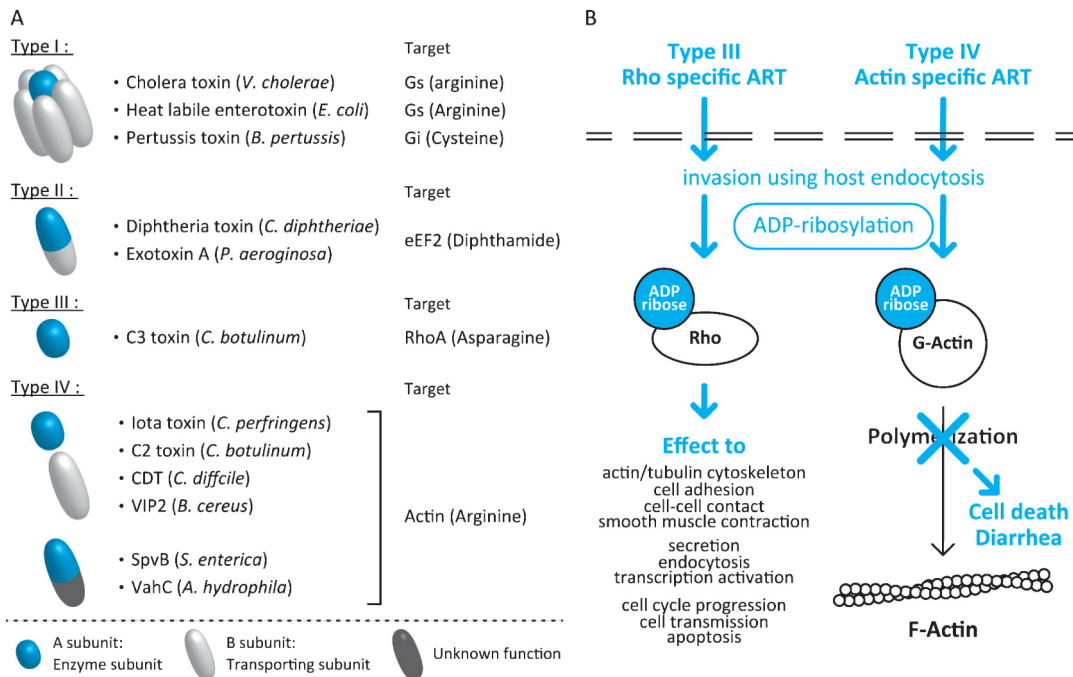


Fig. 2 A) Classification of ARTs based on their target specificity. B) Effect of ADP-ribosylation by Type III and Type IV ARTs.

接細胞骨格系に作用し、細胞が丸く形態変化を起こす。細菌が体内に入り込み腸管内で増殖し、結果として細胞死がおき微絨毛の剥離など腸の機能が失われ下痢などの症状が引き起こされる (Fig. 2B)^{17,18)}。

ウェルシュ菌は様々な毒素を産生するが、その一つであるイオタ毒素は酵素サブユニットである Ia と膜輸送サブユニットである Ib で構成される。イオタ毒素は、タイプ

IV に分類されアクチンの Arg177 を特異的に ADP リボシル化する。Ia には ART によく保存された 3 つの領域があり、その一つに ADP-ribosylating Turn Turn (ARTT) ループと呼ばれる ADP リボシル化に大きく関与している領域がある¹⁹⁾。その領域の中にさらに ³⁷⁸Glu-X-Glu³⁸⁰ (EXE) モチーフがあり、この Glu378 と Glu380 の二つのグルタミン酸は ADP リボシル化活性に不可欠である。

我々は、2003年に Ia 単体²⁰⁾、2008年には NAD⁺ のアナログである β TAD を用いた Ia-アクチンの複合体構造²¹⁾を明らかにし、構造に基づく ADP リボシル化の反応機構に関する知見を得た。しかし、本来の基質である NAD⁺ が結合した複合体や ADP リボシル化されたアクチンなど反応機構の解明に必要な、得られていない構造情報も多く残っていた。

2. 修飾反応前後における複合体結晶の作製

これまでにおよそ90,000件を超える数のタンパク質の X 線結晶構造が Protein Data Bank に登録されている (2014年9月)。そもそも結晶とは均一な物質が整然と並んだものであり、タンパク質も同様に結晶となる。このタンパク質の結晶を得るために研究者は多くのスクリーニングを行う。特に相互作用するタンパク質同士の複合体の結晶などはその相互作用の強さへの考慮など、さらなる工夫が必要である。

イオタ毒素 Ia において、NADH または NADPH が結合した Ia 単体と Ia, β TAD, アクチンの三者複合体を明らかにしてきた^{20,21)}。この構造はアルギニン特異的 ART のなかで初の複合体構造であった。しかし、本来の基質である NAD⁺ との複合体や、ADP リボシル化を捕らえておらず、その反応機構の詳細は不明であった。

これらの複合体構造を解明し、ADP リボシル化を捕捉するために Ia, アクチン, NAD⁺ の結晶化を行ってきた。しかし、Ia, アクチン, NAD⁺ の三者を混合し結晶化を試みても結晶を得ることができなかった。これは、三者が結合し ADP リボシル基がアクチンに付加されると Ia と ADP リボシル化されたアクチンが解離するためであると考えられた。その試行錯誤の中で、我々は Ia とアクチンのみ、つまり NAD⁺ の結合していないアポ型の Ia-アクチン複合体の結晶を得ることに成功した (Fig. 3A)。また、X 線回折実験の際の氷晶が X 線の反射の邪魔となるため、氷晶の生成を防止するための抗凍結剤としてオイル、グリセロール等を用いて最適条件の検討を行った結果、エチレングリコールにおいて最も良い反射が得られた。エチレングリコールの ADP リボシル化への影響を見たところ、弱いながらもエチレングリコールが ADP リボシル化を阻害することが確認された。これらの事象を踏まえて、アポ型複合体結晶に対し以下の操作を行った (Fig. 3B)。

- ①アポ型複合体結晶を NAD⁺ とエチレングリコールを含む結晶化溶液に浸漬
- ②アポ型複合体結晶を NAD⁺ を含む結晶化溶液に浸漬後、エチレングリコールを含む結晶化溶液に移し浸漬

その結果、操作①では、NAD⁺ は結合していたが ADP リボシル化は起きていない結晶を得ることができた (Fig.

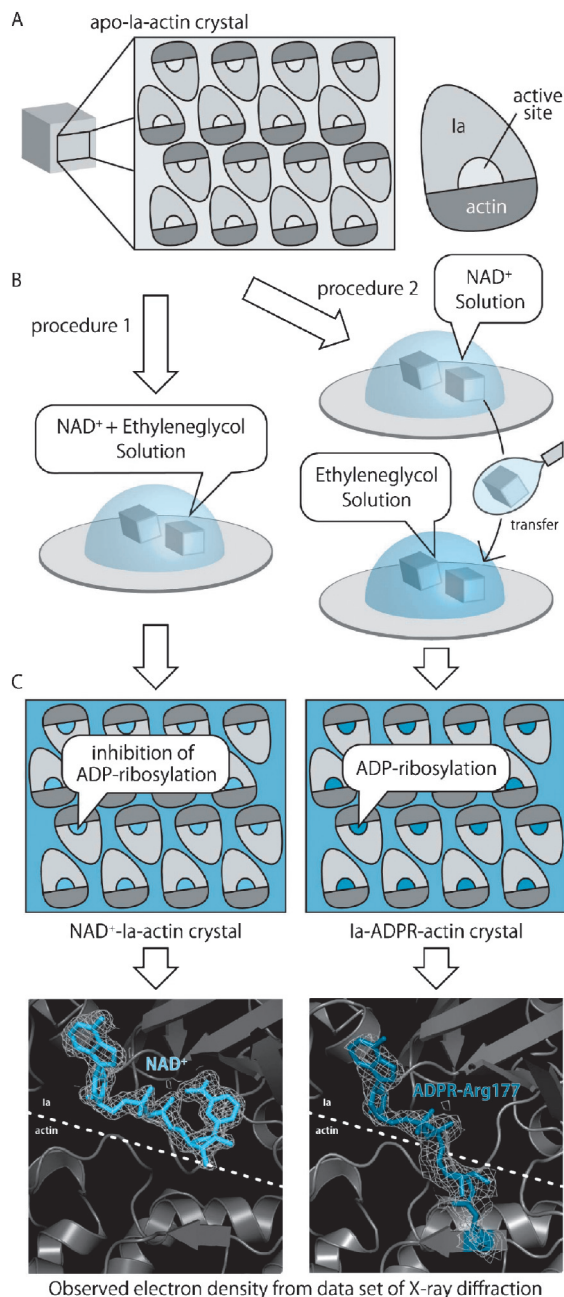


Fig. 3 Soaking method to create NAD⁺ binding Ia-actin complex and Ia-ADP-ribosylated actin from common apo-Ia-actin crystal.

3C)。一方、操作②の場合、ADP リボシル化が反応後の結晶を得ることができた。(Fig. 3C)。

3. 複合体構造からの情報

このように異なる状況の下で NAD⁺ 溶液にアポ型 Ia-アクチンの複合体結晶を浸すことによって、NAD⁺-Ia-アクチンと Ia-ADP リボシル化アクチンのデータセットをそれぞれ 1.75 Å と 2.2 Å の分解能で得た。構造解析の結果、複合体の全体構造はアポ型 (Fig. 4A)、NAD⁺ 結合型

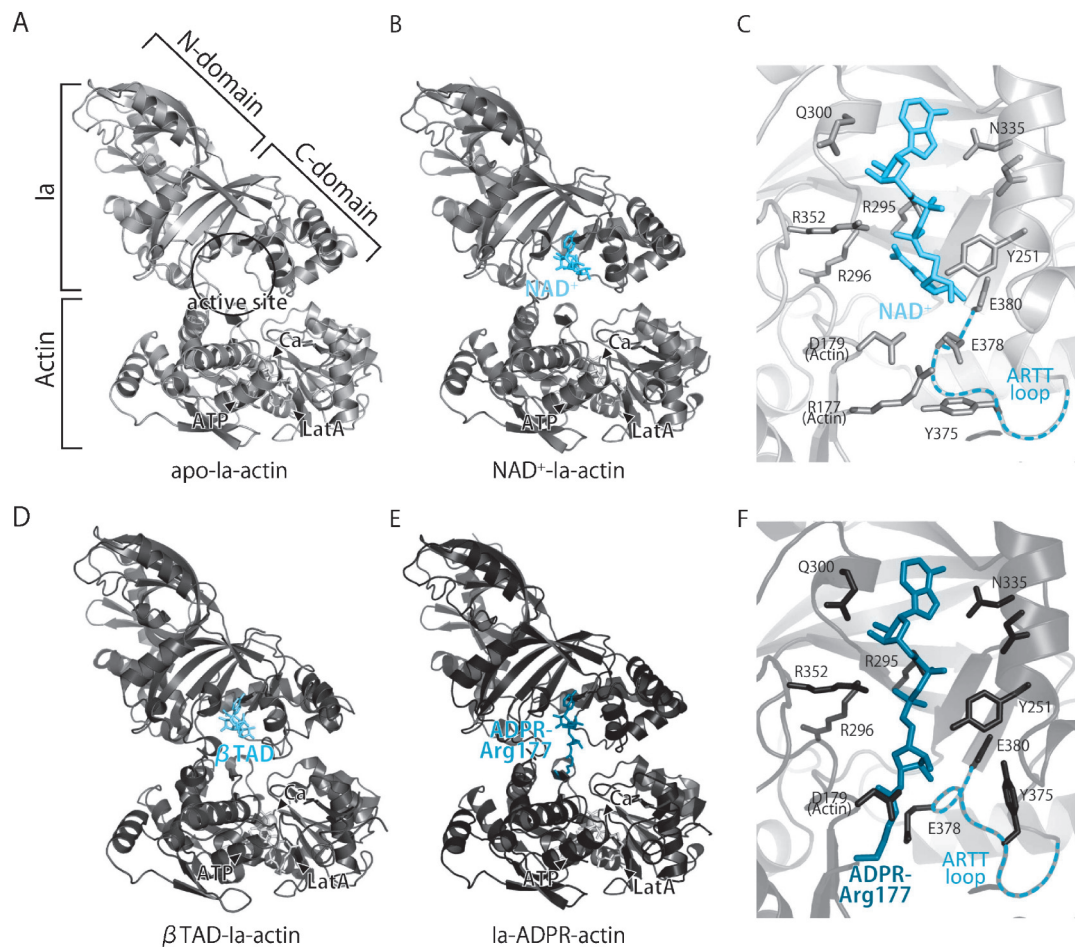


Fig. 4 Overall structures of Ia-actin complex during the reaction. A) Apo-Ia-actin, B) NAD⁺-Ia-actin, C) Close-up view of NAD⁺-Ia-actin, D) β TAD-Ia-actin, E) Ia-ADP-ribosylated actin, and F) Close-up view of Ia-ADP-ribosylated actin. ARTT loops are shown with dotted line in C and F.

(Fig. 4B), Ia-ADP リボシル化アクチン (Fig. 4E) とほぼ同じ形であったが、基質結合部に明らかな違いが見られた。

NAD⁺-Ia-アクチンにおいて基質結合部位にははっきりとした NAD⁺ の電子密度が見られた (Fig. 3C)。ADP 部分は Ia の Asn335, Gln300, Arg295, Arg352 により握られるようにしっかりと固定され、N リボース部分とニコチンアミド部分はそれぞれ Glu380 と Arg296 主鎖により固定され、ニコチンアミド部分が屈曲した構造をとる (Fig. 4C)。ART における NAD⁺ の屈曲した構造は他の ART でも見出されており共通している特異的な構造である。

Ia-ADP リボシル化アクチンでは、ADP リボース部分は NAD⁺ 結合型と同様に Ia の 4 つのアミノ酸にしっかりと固定されていた。しかし、NAD⁺ 結合型に見られた極端に折れ曲がっていた N リボース部分とニコチンアミド部分では、ニコチンアミド部分の電子密度が消失し、N リボースの電子密度は新たに Arg177 近傍に見出された。このとき、ADP リボシル化アクチンの Arg177 は Ia の方へ引き出され、ADP リボースと結合していた (Fig. 4F)。

ADP リボシル化された G-アクチンの構造は、SpvB により修飾されたものが Margarit らにより報告された (PDB: 2GWJ, 2GWK)²² が、アクチン本体の構造は明らかにされていたものの ADP リボシル基は、その揺らぎにより見ることはできていなかった。しかし、我々は、複合体結晶の中で ADP リボシル化反応を行ったため、反応後の Ia と ADP リボシル化アクチンの解離が妨げられ、その結果、ADP リボシル基が Ia に固定されることで揺らぐことなく、この可視化に成功したと考えている²³。

4. 反応機構

アポ型、NAD⁺ 結合型、Ia-ADP リボシル化アクチン、 β TAD 結合型、それぞれの複合体構造から得られた先述の構造的特徴を基に我々は以下のように“Strain-Alleviation model (緊張と緩和モデル)”を提唱した (Fig. 5A)^{21,23}。

NAD⁺-Ia-アクチン構造から、求核原子であるアクチン Arg177 側鎖の N 原子と N リボースの NC1 との間の距離

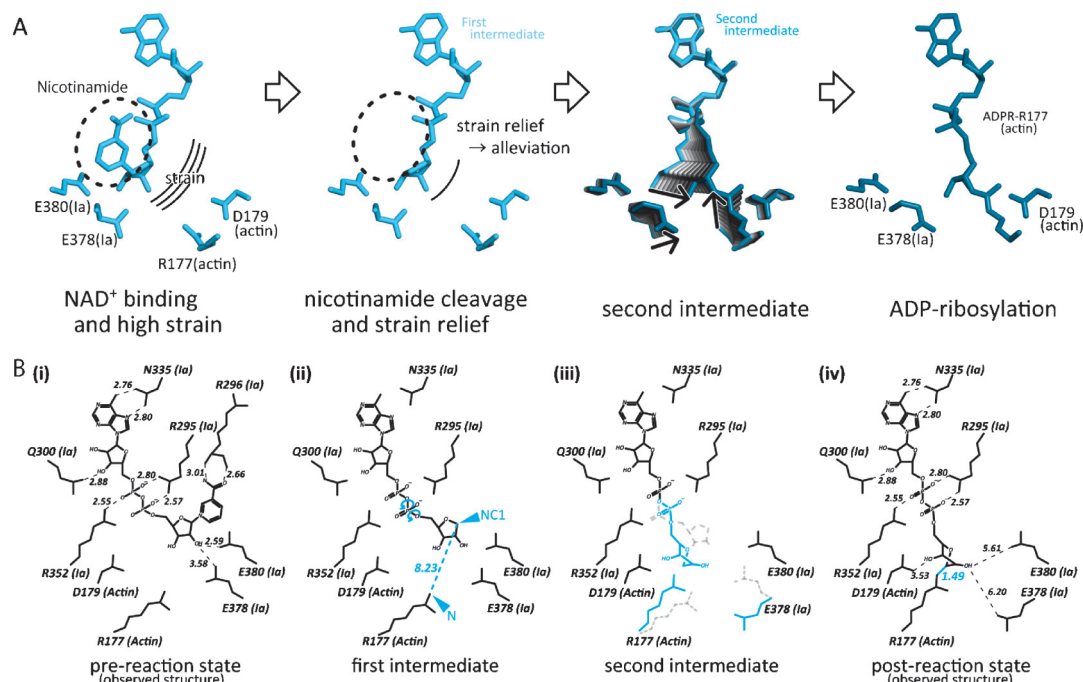


Fig. 5 Schematic illustrated mechanism of ADP-ribosylation. A) Cartoon representation of “Strain-Alleviation model”, B) Schematic mechanism of ADP-ribosylation. Arrowheads indicate the nitrogen atoms of N-ribose (NC1) and side chain of Arg177 (N).

は8.2 Åであった。この距離では直接反応することはできず、結合するには何らかの方法でこの8.2 Åを縮める必要がある。しかし、Arg177が近づくだけでは到底その距離が縮まることはなくNAD⁺を含むIa側で何かしらのアクションが起こる必要があると考えた。

NAD⁺が結合する際にADP部分はIaのAsn335, Gln300, Arg295, Arg352により固定される。特にAsn335はアデニン、Gln300はAリボースを、そしてArg295とArg352は、2つのリン酸と相互作用して、NAD⁺を極度に折り曲げ高い緊張状態（不安定な状態）にしており、このような特異的なNAD⁺の構造が、NAD⁺⇌ADPリボース（オキソカルベニウムカチオン）+ニコチンアミドの平衡をもたらすと推測する（Fig. 5A, 5B(i)）。そこにアクチンが結合することでIa、特にARTTループが構造変化し（Fig. 4C, 4F）、ニコチンアミドが切断され第一中間体であるオキソカルベニウムカチオンが生成される。ニコチンアミド切断後、オキソカルベニウムカチオンはTyr251とカチオン-π相互作用により安定化されているが、ニコチンアミドが切れただけでは8.2 Åの距離は縮まらない（Fig. 5A, 5B(ii)）。

ADPリボシル化後の構造においてADP部分は依然しっかりと固定されていたことから、NAD⁺はニコチンアミドが切れたことでArg296によるニコチンアミドの固定が解け、Nリボースが緊張状態から脱する。その後、ARTTループのアミノ酸の働きによりNリボース側リン酸を含む2本のP-O結合で回転しオキソカルベニウムカ

チオンが構造変化して第二中間体が生成される。（Fig. 5A, 5B(iii)）これによりNリボースのNC1とArg177のグアニジル窒素の接近を可能にした。さらにARTTループのアミノ酸が働きかけることで、ややArg177が引き出され、最終的にNリボースとArg177の距離は8.2 Åから1.49 Åにまで縮められADPリボシル基がArg177と結合できるようになる（Fig. 5A, 5B(iv)）。

5. ADPリボシル化されたアクチンの線維化への影響

アクチンは細胞内に大量に存在し、よく保存されたタンパク質であり、細胞運動性、収縮性、細胞内輸送、細胞の形と極性の制御など重要な細胞機能に関与している。また、細胞骨格の主要な構成要素として、G-アクチン（単量体）とフィラメント状であるF-アクチン（多量体）の二状態の間で変化している。線維化したアクチンは2本が燃られるようにしてアクチンフィラメントを形成している（Fig. 6A）。通常はG-アクチンとF-アクチンの二状態の間で平衡を保ちながら細胞の構造や形態を維持しているが、細胞の運動性や細胞分裂など必要に応じアクチンフィラメントの伸縮が起こり、様々な場所で重要な役割を果たしている^{24,25}）。

では、このADPリボシル化されたアクチンはどのように線維化を阻害するのだろうか。F-アクチンは、単量体であるG-アクチンとは異なり多量体であり、フィラメン

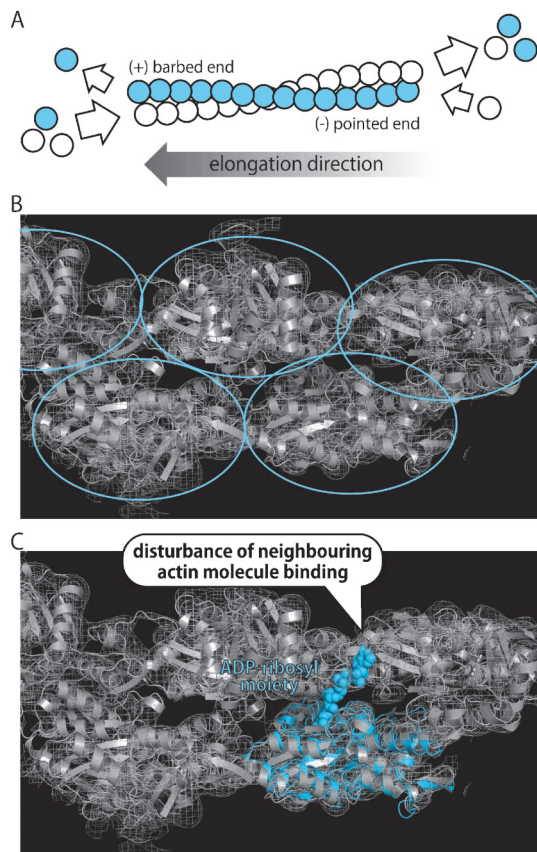


Fig. 6 Fitting an ADP-ribosylated actin into the filamentous actin structure. A) Actin filaments undergo treadmilling. Actin monomers add at the (+) barbed end and dissociate from the (-) pointed end. B) The structure of intact actin molecules are fitted into the cryo-microscopy electron density map (EMD-5168). C) Superposed structure of ADP-ribosylated actin on (B).

トを構成する G-アクチンの個数が一定ではない。フィラメントを均一な長さに調整することが困難であったため様々な手法を用いられてきたが、F-アクチンの構造研究はあまり進んでいなかった。1990年、G-アクチンの原子レベルの構造が DNase I との複合体として Holmes らにより明らかにされた²⁶⁾。さらに彼らは X 線繊維回折実験で F-アクチン中の G-アクチンの配向を観察し、それを元にフィラメントアクチンのモデル構造を提案した²⁷⁾。さらに最近では、クライオ電子顕微鏡を用いた手法により 6.6 Å²⁷⁾ および 6.0 Å^{28,29)} 分解能の電子密度が得られた (Fig. 6B)。この電子密度に X 線結晶構造解析により明らかにされた G-アクチンを当てはめることで実測に基づくより詳細なアクチンフィラメントの構造が明らかにされた。この正確なアクチンフィラメントの構造に ADP リボシル化したアクチンを重ねることにより、ADP リボシル基が隣のアクチン分子と立体障害を起こしており、結合できないことが明らかになった (Fig. 6C)。これによりアクチンフィラメントはそれ以上伸張することができず機能不全とな

り、細胞自体も形態を維持できなくなり特に細菌の感染した腸内において組織の崩壊が起こり下痢などの症状をおこすと考えられる。

6. まとめ

以上のようにアポ Ia-アクチン複合体の結晶を ADP リボシル化の反応場として利用し、さらに NAD⁺ と抗凍結剤の浸漬条件として NAD⁺ とエチレングリコールの同時ソーキングもしくは段階ソーキングを用い、これらの結晶から NAD⁺-Ia-アクチンと Ia-ADP リボシル化アクチンの高分解能の構造を明らかにした。このアクチンのアルギニンに付与された ADP リボシル基の可視化、さらに NAD⁺ と Ia-アクチン複合体、ADP リボシル化アクチンと Ia の複合体は初めての報告であり、これらの構造からアクチンのアルギニンの ADP リボシル化の反応機構として “Strain-Alleviation model-緊張と緩和モデル” を提示した。

すべての修飾酵素-基質タンパク質について今回のようにアポ型複合体結晶が得られるとは限らないが、この複合体結晶が得ることができれば基質の浸漬の仕方次第で Ia-アクチンと同様に反応前後の結晶を得ることができ、反応機構を明らかにする場として使うことができると考えている。

本研究は新学術領域研究「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」(研究課題番号: 23121529, 25121733) および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) D. Cassel and T. Pfeuffer: Proc Natl Acad Sci U S A **75**, 2669 (1978).
- 2) D. M. Gill and R. Meren: Proc Natl Acad Sci U S A **75**, 3050 (1978).
- 3) J. Moss and M. Vaughan: J Biol Chem **252**, 2455 (1977).
- 4) T. Katada and M. Ui: Proc Natl Acad Sci U S A **79**, 3129 (1982).
- 5) J. Moss, S. Garrison, N. J. Oppenheimer and S. H. Richardson: J Biol Chem **254**, 6270 (1979).
- 6) B. G. Van Ness, J. B. Howard and J. W. Bodley: J Biol Chem **255**, 10717 (1980).
- 7) K. Aktories, U. Weller and G. S. Chhatwal: FEBS Lett **212**, 109 (1987).
- 8) K. Aktories, M. Barmann, I. Ohishi, S. Tsuyama, K. H. Jakobs and E. Habermann: Nature **322**, 390 (1986).
- 9) J. Vandekerckhove, B. Schering, M. Barmann and K. Aktories: J Biol Chem **263**, 696 (1988).
- 10) J. Vandekerckhove, B. Schering, M. Barmann and K. Aktories: FEBS Lett **225**, 48 (1987).
- 11) A. E. Lang, G. Schmidt, A. Schlosser, T. D. Hey, I. M. Larriñua, J. J. Sheets, H. G. Mannherz and K. Aktories: Science

- 327, 1139 (2010).
- 12) J. Fahrner, J. Kuban, K. Heine, G. Rupps, E. Kaiser, E. Felder, R. Benz and H. Barth: *Cell Microbiol* **12**, 233 (2010).
 - 13) G. Haug, K. Aktories and H. Barth: *Infect Immun* **72**, 3066 (2004).
 - 14) G. Haug, J. Leemhuis, D. Tiemann, D. K. Meyer, K. Aktories and H. Barth: *J Biol Chem* **278**, 32266 (2003).
 - 15) E. Kaiser, C. Kroll, K. Ernst, C. Schwan, M. Popoff, G. Fischer, J. Buchner, K. Aktories and H. Barth: *Infect Immun* **79**, 3913 (2011).
 - 16) S. Pust, H. Hochmann, E. Kaiser, G. von Figura, K. Heine, K. Aktories and H. Barth: *J Biol Chem* **282**, 10272 (2007).
 - 17) K. Aktories, A. E. Lang, C. Schwan and H. G. Mannherz: *FEBS J* **278**, 4526 (2011).
 - 18) K. Aktories and A. Wegner: *Mol Microbiol* **6**, 2905 (1992).
 - 19) S. Han, A. S. Arvai, S. B. Clancy and J. A. Tainer: *J Mol Biol* **305**, 95 (2001).
 - 20) H. Tsuge, M. Nagahama, H. Nishimura, J. Hisatsune, Y. Sakaguchi, Y. Itogawa, N. Katunuma and J. Sakurai: *J Mol Biol* **325**, 471 (2003).
 - 21) H. Tsuge, M. Nagahama, M. Oda, S. Iwamoto, H. Utsumomiya, V. E. Marquez, N. Katunuma, M. Nishizawa and J. Sakurai: *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7399 (2008).
 - 22) S. M. Margarit, W. Davidson, L. Frego and C. E. Stebbins: *Structure* **14**, 1219 (2006).
 - 23) T. Tsurumura, Y. Tsumori, H. Qiu, M. Oda, J. Sakurai, M. Nagahama and H. Tsuge: *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4267 (2013).
 - 24) T. D. Pollard: *Nature* **422**, 741 (2003).
 - 25) T. D. Pollard and G. G. Borisy: *Cell* **112**, 453 (2003).
 - 26) W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes: *Nature* **347**, 37 (1990).
 - 27) K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch: *Nature* **347**, 44 (1990).
 - 28) T. Fujii, A. H. Iwane, T. Yanagida and K. Namba: *Nature* **467**, 724 (2010).
 - 29) K. Murakami, T. Yasunaga, T. Q. Noguchi, Y. Gomibuchi, K. X. Ngo, T. Q. Uyeda and T. Wakabayashi: *Cell* **143**, 275 (2010).

著者紹介



鶴村俊治

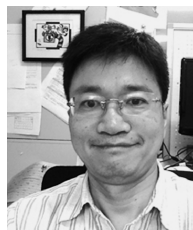
京都産業大学総合生命科学部 助教

E-mail: ttsuru@cc.kyoto-su.ac.jp

専門：構造生物学

【略歴】

2005年徳島文理大学大学院家政学研究科食物学専攻博士前期課程修了，修士（食物学）。同年（独）理化学研究所播磨研究所宮野構造生物物理研究室・研修員，2006年（独）大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物学部門・研究員を経て2010年より現職。



津下英明

京都産業大学総合生命科学部 教授

E-mail: tsuge@cc.kyoto-su.ac.jp

専門：構造生物学

【略歴】

1989年日本たばこ産業生命科学研究所・研究員。1993年北海道大学 博士（理学）。1994年 Agouron Pharmaceuticals Inc.・Researcher，1997年徳島文理大学健康科学研究科兼家政学部・助教授，2002年徳島文理大学健康科学研究科生体分子構造学部門長・教授を経て2010年より現職。

Modification reaction mechanism based on the complex structure of enzyme-substrate protein at pre- and post-reaction states

—The reaction mechanism of iota toxin from *Clostridium perfringens*—

Toshiharu TSURUMURA Kyoto Sangyo University, Kamigamo Motoyama Kita-ku, Kyoto, 603-8555 Japan

Hideaki TSUGE Kyoto Sangyo University, Kamigamo Motoyama Kita-ku, Kyoto, 603-8555 Japan

Abstract I α is mono-ADP-ribosylating toxin secreted by *Clostridium perfringens*, which ADP-ribosylates to arginine 177 of actin specifically. To understand the mechanism of ADP-ribosylation, it is necessary to reveal the complex structure of I α -actin, which is enzyme-substrate protein. However, the complex structure of NAD⁺-I α -actin and I α -ADP-ribosylated actin are open question. To obtain these structures, we refined the conditions of crystallization and X-ray diffraction experiment. Through trial and error, we succeeded to obtain the I α -actin complex crystal without NAD⁺.

Using two different conditions of crystal soaking, we obtained the I α -actin complex crystal holding NAD⁺ and I α -ADP-ribosylated actin complex crystal, and then we revealed high-resolution structures of them. These structures are correspond to pre- and post-states of ADP-ribosylation, respectively. According to these results, we suggested "strain-alleviation model" as an ADP-ribosylation mechanism in two articles (PNAS2008, PNAS2013). In this model, I α ADP-ribosylates actin arginine 177 via two oxocarbenium ion intermediates.

We introduce ADP-ribosylation mechanism based on these structures using complex crystals of modification enzyme and substrate protein; NAD⁺-I α -actin and I α -ADP-ribosylated actin.