

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550201

研究課題名(和文)ヘム生合成経路におけるテトラピロールの構築および環状化のメカニズム

研究課題名(英文)The mechanism of construction and cyclization of tetrapyrrole in the heme biosynthetic pathway

研究代表者

佐藤 秀明(Sato, Hideaki)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60271996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物におけるヘム生合成経路の第3、第4段階を担うヒドロキシメチルピランシンターゼ(HMBS)およびウロポルフィリンノーゲンIIIシンターゼについて、酵素反応速度論解析や結晶構造解析に取り組み、詳細な反応機構の解明を目指した。特にHMBSについては、基質類似体による酵素反応の非競合阻害が認められた。さらにHMBS-基質類似体複合体の立体構造から、基質類似体が活性部位の補因子近傍に結合して、少なくとも補因子と1つ目の基質分子との間での縮合反応を妨げることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hydroxymethylbilane synthase (HMBS) and uroporphyrinogen III synthase, respectively, is the third and fourth enzyme in the heme biosynthetic pathway in animals. HMBS has a dipyrromethane cofactor at its active site and catalyzes the sequential condensation of four porphobilinogen (PBG) molecules to form a linear tetrapyrrole, hydroxymethylbilane. To elucidate the catalytic mechanism of HMBS in detail, the enzyme kinetic study of HMBS was carried out with a certain substrate analog (X-PBG). The X-PBG inhibited the HMBS reaction in a noncompetitive manner with K_i of 5 micro-M. Further, we determined the crystal structure of HMBS in complex with X-PBG, which revealed that X-PBG sits in the vicinity of the dipyrromethane cofactor. Especially, the aminomethyl group of X-PBG was found near the distal pyrrole ring of the cofactor. These results imply at least that X-PBG can prevent the condensation of the first PBG molecule with the distal pyrrole ring of the cofactor in HMBS.

研究分野：ヘム関連酵素の生化学

 キーワード：ヘム生合成 結晶構造解析 酵素反応速度論解析 酵素-阻害剤複合体 テトラピロール ポルフィリン
 生合成 生化学

1. 研究開始当初の背景

動物のヘム生合成経路は8種類の酵素が関与する代替の利かない重要な代謝経路であり、どの酵素が先天的に欠損してもヘム前駆体が体内に蓄積して難治性疾患のポルフィリン症を発症する。ヘム生合成の第3段階においては、ヒドロキシメチルピランシンターゼ (HMBS) がモノピロールのポルホビリノーゲン (PBG) 4分子を順次縮合して、線形テトラピロールであるヒドロキシメチルピラン (HMB) を合成する。これまでに大腸菌とヒトの HMBS について、ジピロメタン補因子がシステイン残基にチオエーテル結合しているホロ型酵素のみの結晶構造が決定されている。それに基づいて一応の HMB 合成機構が提案されてきたが、HMBS-基質複合体の立体構造などは未知であるため、補因子や基質の結合様式を含めた反応機構の詳細は不明である。

一方、ヘム生合成の第4段階では、ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (UROS) が D 環ピロールを反転しながら HMB を環状化して、ウロポルフィリノーゲン III (Uro'gen III) を生成する。UROS に関しては、ヒトと高度好熱性細菌 *T. thermophilus* で酵素単体の結晶構造が報告されており、溶液中では2つのドメイン間で比較的柔軟に動く可能性が示唆されている。そして、競合阻害剤を用いた NMR による活性部位のマッピング解析は、2つのドメイン間の溝に活性部位が存在する可能性を示唆している。また、英国のグループは基質類似体および想定される中間体の類似体を化学合成し、阻害実験などからスピロ型中間体を経る反応機構を提案している。しかし、これまでに基質やその類似体と UROS との複合体の結晶は得られておらず、反応機構を議論できるような詳しい構造解析は進んでいない。さらに、自発的に環状化してしまう HMB を、UROS が HMBS から安定に受け取るメカニズムについても分かっていない。

2. 研究の目的

ヘム生合成経路の全容の解明が研究全体の目標であるが、本研究課題では (1) HMBS による PBG 4分子から HMB 1分子への縮合過程と (2) UROS による HMB の D 環ピロールの反転を伴う環状化過程についての詳細なメカニズムを、構造生物学的、酵素化学的、および分光学的手法により明らかにすることを目的とする。

(1) HMBS による PBG 4分子から HMB 1分子への縮合過程の解明：PBG 類似体を阻害剤として用いて、反応中間体である ES1~ES4 の各酵素-基質 (類似体) 複合体を調製し、それらの立体構造解析から一連の縮合反応によって進行するとされる HMBS 反応の各中間体の構造をとらえ、より詳細な反応機構を検討する。

(2) UROS による HMB の D 環反転を伴う環状化過程の解明：生合成されたヘムでは、4つのピロール環の側鎖が非対称に配置している。その理由としては、UROS が線形テトラピロールである HMB から環状の Uro'gen III を生成する際に、D 環のピロールを反転させることによって酢酸側鎖とプロピオン酸側鎖の位置を入れ替えるためと考えられている。この D 環反転の機構と役割を構造生物学的および酵素化学的手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト HMBS の調製：HMBS は大腸菌によって大量発現し、硫酸分画と各種のカラムクロマトグラフィー法を組み合わせることで精製した。結晶構造解析に用いるために、高純度で充分量の精製酵素を調製する必要があった。

(2) HMBS の阻害実験：従来、基質類似体の 6-メチルポルホビリノーゲンや 9-フルオロポルホビリノーゲン、生成物類似体のビリルビンなどが、HMBS 反応に対する阻害剤として報告されていたことから、今回は新しい阻害剤を探索した。結晶構造解析に用いることができるように、比較的安定な基質類似体を検討した。

(3) HMBS の結晶構造解析：反応を進行させない PBG 類似体を結合した酵素-基質類似体複合体について結晶化をおこない、大型放射光施設 SPring-8 で X 線結晶構造解析を実施した。得られた立体構造と変異体の活性解析から HMBS の基質結合部位を明らかにし、4分子の PBG がどのように活性部位に結合していくのか、どのアミノ酸残基がどのように縮合反応を進めていくのかについて検討した。

(4) ヒト UROS の調製：UROS は大腸菌によって大量発現し、硫酸分画と各種のカラムクロマトグラフィー法を組み合わせることで精製した。結晶構造解析に用いるために、高純度で充分量の精製酵素が必要であった。

(5) UROS の結晶構造解析：ヒト UROS の構造は1対の逆平行な β ストランドで結ばれた2つのドメインからなっており、基質結合部位はドメイン間に挟まれた溝にそって存在すると推定されている。UROS の基質結合様式を解明するため、反応の進行しない酵素-基質類似体複合体の結晶構造解析を目指した。

4. 研究成果

(1) ヒト HMBS は、大腸菌で大量発現させ、ゲルろ過、陰イオン交換、疎水性相互作用の3種類のカラムクロマトグラフィーにより精製した。培地 3L から 15-20 mg の精製 HMBS を得た。得られた HMBS をさらに陰イオン交換カラム (mono Q) で分離し、複数のピークとして分取した。それぞれの画分について質

量分析をおこなったところ、各ピーク画分はホロ型もしくは基質が 1~3 個結合した ES1~ES3 型 HMBS に対応していることが分かった。この mono Q カラムを用いたカラムクロマトグラフィーによって、PBG の結合数に応じて HMBS を分取できることが確認できた。

(2) ホロ型 HMBS を用いて、基質類似体による阻害実験をおこなった。PBG のピロール環上にヨウ素を導入した 2-ヨードポルホビリノーゲン(2-I-PBG)を用いて酵素反応速度論解析をしたところ、2-I-PBG は非競合阻害の様式で HMBS 反応を阻害した。阻害定数 K_i は $5 \mu\text{M}$ であった (図 1)。

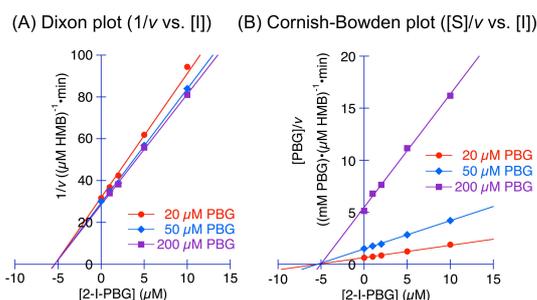


図 1 : 2-I-PBG による HMBS 反応の阻害

(3) ホロ型 HMBS を 20°C で結晶化し、SPring-8 のビームライン BL44XU を用いて構造解析をしたところ、文献ではディスオーダーしていた領域の主鎖の構造を決定できた。また、還元剤のジチオトレイトール (DTT) を沈殿剤に添加しておくことで、結晶化途中での結晶の着色を防止でき、良好な回折像が得られた。これは、DTT がジピロメタン補因子の酸化を抑え、活性部位の構造変化を抑制したためと考えられる。

一方、ホロ型 HMBS の単結晶への 2-I-PBG のソーキングによって酵素-阻害剤複合体の結晶を調製し、分解能 2.4 \AA までの X 線回折データを収集した。ホロ型 HMBS の立体構造をモデルとした分子置換法による構造解析の結果、酵素-阻害剤複合体の全体構造は、ホロ型のものと同様であった (図 2)。また、2-I-PBG がジピロメタン補因子の遠位側ピロールの近傍に結合することが明らかとなった (図 3)。これらの結果は、基質類似体の 2-I-PBG が HMBS の補因子周辺に結合し、活性部位において少なくとも補因子と 1 つ目の基質 PBG との間での縮合反応を妨げうることを示唆している。さらに、活性部位への 2-I-PBG の保持に関与している Arg26 や Asp99, Arg173 などは、急性間欠性ポルフィリン症の患者で見出されている HMBS 変異体の変異残基に対応することから、これらのアミノ酸残基の酵素活性、特に基質結合に対する重要性も示唆された (図 3)。

今後、PBG が複数連結した ES2~ES4 型に対応する HMBS-基質(類似体)複合体の立体構造の解明に取り組み、HMBS に対する PBG の結合

機構について詳細を明らかにする予定である。

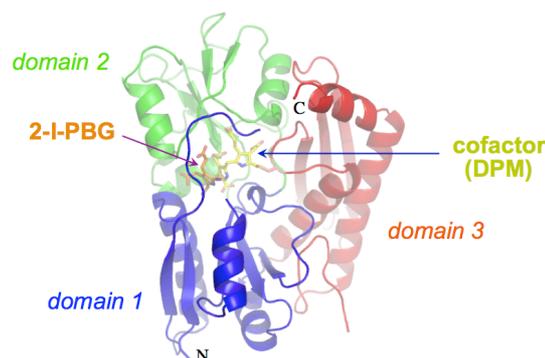


図 2 : ヒト HMBS-阻害剤複合体の全体構造

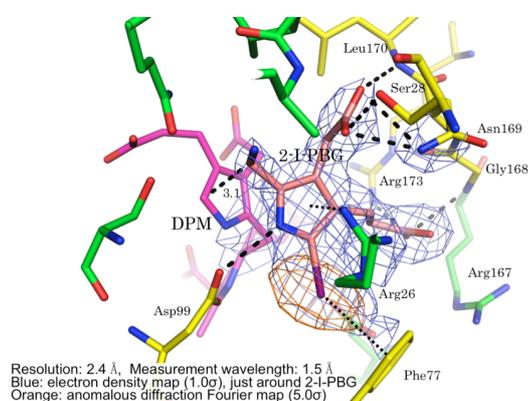


図 3 : HMBS-阻害剤複合体の活性部位周辺構造

(4) ヒト UROS について、大腸菌で大量発現し、硫酸分画と陰イオン交換、疎水性相互作用、ヒドロキシアパタイトの 3 種類のカラムクロマトグラフィーによって精製をおこなった。10 L の培養液から 10-15 mg の精製 UROS を得ることができた。

(5) 精製 UROS を用いて結晶化条件を変えながら結晶調製を試み、得られた結晶について SPring-8 のビームライン BL44XU を用いて回折データ測定を行った。これまでに一定の回折パターンは得られてきているものの、分解能は 4 \AA 程度と低く、構造解析までは達成できていない。今後、さらに結晶化条件の最適化を進めて良質な単結晶を作成し、酵素-基質類似体複合体の結晶構造を明らかにして、UROS の反応機構の解明に活かしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 3 件)

- ① Erisa Harada, Masakazu Sugishima, Jiro Harada, Masato Noguchi, Keiichi Fukuyama, Kenji Sugase, Backbone assignments of the apo and Zn(II)

protoporphyrin IX-bound states of the soluble form of rat heme oxygenase-1, Biomolecular NMR assignments, 査読有, 9(1), 2015, 197-200
DOI:10.1007/s12104-014-9573-z

- ② Masakazu Sugishima, Hideaki Sato, Yuichiro Higashimoto, Jiro Harada, Kei Wada, Keiichi Fukuyama, Masato Noguchi, Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 111(7), 2014, 2524-2529
DOI:10.1073/pnas.1322034111
- ③ Jiro Harada, Tadashi Mizoguchi, Souichirou Satoh, Yusuke Tsukatani, Makio Yokono, Masato Noguchi, Ayumi Tanaka, Hitoshi Tamiaki, Specific gene *bciD* for C7-methyl oxidation in bacteriochlorophyll *e* biosynthesis of brown-colored green sulfur bacteria, PLoS ONE, 査読有, 8(4), 2013, e60026
DOI:10.1371/journal.pone.0060026
- ④ Shinya Koga, Shun Yoshihara, Hiroki Bando, Kazuki Yamasaki, Yuichiro Higashimoto, Masato Noguchi, Shinji Sueda, Hideyuki Komatsu, Hiroshi Sakamoto, Development of a heme sensor using fluorescently labeled heme oxygenase-1, Analytical Biochemistry, 査読有, 433, 2013, 2-9
DOI:10.1016/j.ab.2012.10.002
- ⑤ Jiro Harada, Tadashi Mizoguchi, Yusuke Tsukatani, Masato Noguchi, Hitoshi Tamiaki, A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna, Scientific Reports, 査読有, 2, 2012, 671
DOI:10.1038/srep00671

[学会発表] (計109件)

- ① Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Mai Tsukaguchi, Takahiro Masuko, Yoshiaki Omata, Kei Wada, Yoshio Hisaeda, Ken Yamamoto, Masato Noguchi, An Inhibitory Effect of a Porphobilinogen Derivative on Hydroxymethylbilane Synthase and the Crystal Structure of the Enzyme-Inhibitor Complex, RIKEN Symposium series: "Metals in Biology" in Wako, 2015年6月16-17日, 理化学研究所和光キャンパス (埼玉県和光市)
- ② Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Mai Tsukaguchi, Takahiro Masuko, Yoshiaki Omata, Kei Wada, Yoshio Hisaeda, Masato Noguchi, Ken Yamamoto, Inhibitory Effect of a Novel Porphobilinogen Analog on the Synthesis of a Heme Precursor by Hydroxymethylbilane Synthase, 19th International Conference on Cytochrome P450 (ICCP450 Tokyo 2015), 2015年6月12-15日, 国立オリンピック記念青少年総合センター (東京都渋谷区)
- ③ 佐藤 秀明, 塚口 舞, 杉島 正一, 増子 隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 山本 健, 野口 正人, ヒドロキシメチルピランシンターゼに対する 2-ヨードポルホビリノーゲンの阻害効果と複合体の立体構造の解析, 平成 27 年度日本生化学会九州支部例会, 2015 年 5 月 16-17 日, 九州大学箱崎キャンパス (福岡県福岡市)
- ④ 佐藤 秀明, 塚口 舞, 杉島 正一, 増子 隆博, 小俣 義明, 和田 啓, 久枝 良雄, 野口 正人, 山本 健, 新規ポルホビリノーゲン誘導体のヒドロキシメチルピランシンターゼに対する阻害剤としての効果, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 26-29 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部 (千葉県船橋市)
- ⑤ 杉島 正一, 佐藤 秀明, 東元 祐一郎, 原田 二郎, 平 順一, 坂本 寛, 安永 卓生, 和田 啓, 福山 恵一, 山本 健, 野口 正人, X線結晶構造解析によるヘム代謝酵素複合体の立体構造解明, 立体視プロジェクションシステムを使った分子科学研究講演会, 2014 年 12 月 5-6 日, 九州工業大学飯塚キャンパス (福岡県飯塚市)
- ⑥ 杉島 正一, 小松 将大, 坂本 寛, 安永 卓夫, 佐藤 秀明, 東元 祐一郎, 原田 二郎, 和田 啓, 福山 恵一, 山本 健, 野口 正人, NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体との相互作用および電子伝達機構, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15-18 日, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府京都市)
- ⑦ Masakazu Sugishima, Hideaki Sato, Yuichiro Higashimoto, Jiro Harada, Kei Wada, Keiichi Fukuyama, Masato Noguchi, Complex structure of NADPH-cytochrome P450 reductase and heme oxygenase-1, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), 2014 年 8 月 5-12 日, Montreal, Quebec (Canada)
- ⑧ 杉島 正一, 佐藤 秀明, 東元 祐一郎, 原田 二郎, 和田 啓, 福山 恵一, 野口 正人

- 人, NADPH-シトクロム P450 還元酵素からヘムオキシゲナーゼへの電子移動に関する構造基盤, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 25-27 日, ワークピア横浜/横浜産貿易ホール マリネリア (神奈川県横浜市)
- ⑨ 杉島 正一, 佐藤 秀明, 東元 祐一郎, 原田 二郎, 坂本 寛, 安永 卓夫, 和田 啓, 福山 恵一, 野口 正人, NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘムオキシゲナーゼの複合体構造, 第 41 回生体分子科学討論会, 2014 年 6 月 6-7 日, 九州大学西新プラザ (福岡県福岡市)
- ⑩ 杉島 正一, 佐藤 秀明, 東元 祐一郎, 原田 二郎, 坂本 寛, 安永 卓夫, 和田 啓, 福山 恵一, 野口 正人, NADPH-シトクロム P450 還元酵素からヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体への電子伝達に関する構造基盤, 平成 26 年度日本生化学会九州支部例会, 2014 年 5 月 17-18 日, 九州大学病院キャンパス コラボステーション I (福岡県福岡市)
- ⑪ 原田 二郎, 佐藤 秀明, 杉島 正一, 原田 英里砂, 東元 祐一郎, 菅瀬 謙治, 野口 正人, ヘムオキシゲナーゼの基質ポケットから離れた分子表面の Leu77 は, ビリベルジンとの親和性に関与する, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27-30 日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)
- ⑫ 杉島 正一, 東元 祐一郎, 佐藤 秀明, 原田 二郎, 野口 正人, NADPH-シトクロム P450 還元酵素-ヘム-ヘムオキシゲナーゼ複合体の結晶構造解析に向けて, 平成 25 年度日本結晶学会年会, 2013 年 10 月 12-13 日, 熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市)
- ⑬ 原田 二郎, 佐藤 秀明, 原田 英里砂, 東元 祐一郎, 杉島 正一, 菅瀬 謙治, 野口 正人, Ala 置換変異によってヘムオキシゲナーゼ活性が上昇する Leu77 の機能解析, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑭ 杉島 正一, 東元 祐一郎, 佐藤 秀明, 原田 二郎, 下川 千寿, 城田 沙織, 野口 正人, Hinge 欠損型 NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘムオキシゲナーゼ間の相互作用, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑮ 原田 二郎, 佐藤 秀明, 原田 英里砂, 東元 祐一郎, 杉島 正一, 菅瀬 謙治, 野口 正人, ヘムオキシゲナーゼ分子表面で揺らぐ Leu77 の Ala 置換変異体は何故酵素活性を上昇させるのか?, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22-25 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)
- ⑯ 原田 二郎, 原田 英里砂, 東元 祐一郎, 佐藤 秀明, 杉島 正一, 平 順一, 福山 恵一, 菅瀬 謙治, 野口 正人, ヘムオキシゲナーゼ分子表面に存在する F79 の変異導入解析から見出された電子伝達機構, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
- ⑰ 杉島 正一, 原田 二郎, 東元 祐一郎, Keith Moffat, 野口 正人, ヘムオキシゲナーゼの温度依存的構造変化と酵素反応に与える影響, 平成 24 年度日本結晶学会年会及び総会, 2012 年 10 月 25-26 日, 東北大学片平キャンパス (宮城県仙台市)
- ⑱ 原田 二郎, 原田 英里砂, 東元 祐一郎, 佐藤 秀明, 杉島 正一, 平 順一, 福山 恵一, 菅瀬 謙治, 野口 正人, ヘム結合時にヘムオキシゲナーゼの分子表面で揺らぐアミノ酸残基 F79 の変異体から見出される知見, 第 6 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2012 年 9 月 6-8 日, 北海道大学高等教育推進機構 (北海道札幌市)
- ⑲ Erisa Harada, Masakazu Sugishima, Jiro Harada, Masato Noguchi, Keiichi Fukuyama, Kenji Sugase, Role of structural fluctuation in enzyme catalysis of heme oxygenase 1, 25th International conference on Magnetic resonance in biological systems, 2012 年 8 月 20-24 日, リヨン(フランス)
- ⑳ Jiro Harada, Erisa Harada, Yuichiro Higashimoto, Hideaki Sato, Masakazu Sugishima, Junichi Taira, Keiichi Fukuyama, Kenji Sugase, Masato Noguchi, The role of amino acids on the surface of heme oxygenase in its catalysis: An analysis of F79A mutant, 7th International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes, 2012 年 5 月 28 日~6 月 1 日, Edinburgh, Scotland (UK)
- ㉑ Hideaki Sato, Yuichiro Higashimoto, Hiroshi Sakamoto, Masakazu Sugishima, Jiro Harada, Masato Noguchi, Reduction of CO-bound α -verdoheme-heme oxygenase-1 complex by NADPH-cytochrome P450 reductase, 7th International Congress on Heme

Oxygenases and Related Enzymes, 2012
年 5 月 28 日～6 月 1 日, Edinburgh,
Scotland (UK)

- ② 原田 二郎, 原田 英里砂, 東元 祐一郎,
杉島 正一, 佐藤 秀明, 平 順一, 福山 恵
一, 菅瀬 謙治, 野口 正人, NMR 解析で見
出されたヘムオキシゲナーゼ表面に局在
する F79 の機能的役割, 平成 24 年度日本
生化学会九州支部例会, 2012 年 5 月 26-27
日, 福岡大学七隈キャンパス (福岡県福
岡市)

[図書] (計 1 件)

- ① 東元祐一郎, 山岸昌一, メディカルレ
ビュー社, 老化物質 AGEs ワールドに迫
る! アンチエイジングのための 100 の質
問: 「AGEs アプタマーとは何ですか」, 2014,
227(118-119)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: バクテリオクロロフィル b の大量産生
方法及び産生菌

発明者: 塚谷 祐介, 民秋 均, 原田 二郎,
藤田 祐一, 野亦 次郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-30085

出願年月日: 2014 年 2 月 19 日

国内外の別: 国内

名称: 緑色硫黄細菌変異株及びそれを用いた
バクテリオクロロフィル c 同族体の製造方
法

発明者: 原田 二郎, 野口 正人, 民秋 均

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-260321

出願年月日: 2012 年 11 月 28 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

「久留米大学研究者紹介: 佐藤秀明」

[http://research.kurume-u.ac.jp/data.php
?scode=66775632885110](http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=66775632885110)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 秀明 (SATO, Hideaki)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 6 0 2 7 1 9 9 6

(2) 研究分担者

野口 正人 (NOGUCHI, Masato)

帝京大学・福岡医療技術学部・教授

研究者番号: 1 0 1 2 4 6 1 1

東元 祐一郎 (HIGASHIMOTO, Yuichiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 4 0 3 5 2 1 2 4

原田 二郎 (HARADA, Jiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 1 0 3 7 3 0 9 4

塚口 舞 (TSUKAGUCHI, Mai)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 4 0 6 2 4 0 9 4