

分子置換平均法による 球状ウイルスのX線結晶構造解析

月原 富武, 福山 恵一*

徳島大学工学部 生物工学科

*大阪大学理学部 生物学科

X-ray Crystal Structural Analysis of Spherical Virus by the Molecular Replacement Averaging

Tomitake TSUKIHARA and Keiichi FUKUYAMA*

Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima

*Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University

The molecular replacement averaging was successfully applied to the crystal structural analysis of tobacco necrosis virus. This method consists of two procedures to remove errors in the electron density distribution obtained by experiment; the first step is the solvent flattening (B. Wang, Method in Enzymology, **115**, 90-113 (1985)), the second averaging electron densities at non-crystallographically equivalent positions.

X-ray diffraction intensities of the spherical virus crystal were collected using a Weissenberg camera with a large cassette of 430mm radius. The synchrotron radiation source at the Photon Factory was used. Phase extension was carried out up to 5Å starting from 8Å. Electron density map at 5Å resolution was so clear that main chain folds of the virus subunits were undoubtedly traced in the map.

1. 序

ウイルスは代謝機能を持たないことで生物と区別できる。一方、ウイルスは自分自身では増殖で

きないが、他の生物の細胞内に侵入してその中で増殖することができる。この様に不完全ではあるが自己複製能を持ち生物の特徴も備えている。生

物と無生物の中間に位置するといえる。

ウイルスを構造の面から見ると、核酸とそれを取り囲む60個以上のタンパク質で構成されている粒子である。電子顕微鏡による観察によって多くのウイルスでは外殻を構成するタンパク質サブユニットの配置がそのウイルス特有の幾何学的対称を持っていることが古くから知られている¹⁾。細胞内で合成されたタンパク質サブユニットは幾何学的な対称に従って自律的に核酸を取り囲んでウイルス粒子を形成する。このことをもう少し言い替えると、ウイルス自身の核酸に記録された遺伝情報が翻訳されてタンパク質のアミノ酸配列が出来上がり、そのアミノ酸配列に従ってタンパク質の三次構造が一義的に決まり、この三次構造がタンパク質分子の相対的配置(四次構造)を規定するということである。ここではアミノ酸配列から三次構造が出来あがるのを自律的三次構造形成といい、三次構造から四次構造が出来るのを自律的四次構造形成と呼ぶことにする。ウイルスの立体構造の研究は殻タンパク質の自律的四次構造形成(coating)と増殖に先立つ四次構造の崩壊機構(uncoating)を明らかにする上で不可欠である。いままでに植物ウイルス^{2~5)}のみならず、動物ウイルス^{6~9)}や細菌ウイルス¹⁰⁾の結晶構造解析が高分解能でなされている。ところでウイルスが自律的四次構造形成と同時にどのようにして自らの核酸を殻内に取り込むかはまだ明らかでない。これらのことを明らかにするために植物ウイルスの一種であるタバコネクロシスウイルス(TNV)のX線結晶構造解析を行っている。高分解能の解析はまだ完結していないが8Åの粗い初期位相から出発して5Å分解能までの位相決定に成功して高分解能の解析も見通しが立った段階にある。ここまでの分子置換平均法による構造決定を中心に述べる。

2. TNVの性質と増殖、精製、結晶化

TNVはSmithら¹¹⁾によって初めて単離された植物ウイルスである。アカザ、ナス、マメ、ユリ

科等の植物を宿主とし、これらの植物の葉にえそ病を起こす。本ウイルスは、分子量が 1.3×10^5 Daの一本鎖RNAとそれを取り囲む180個のタンパク質サブユニットからなる球状ウイルスである¹²⁾。タンパク質サブユニットの分子量は 3×10^4 Daで、TNVの総分子量は 7×10^6 Daである。

ウイルスの増殖は宿主にアカザを用いて行なった。ウイルスの精製はHarrisonとNixonの方法¹³⁾に従って行なった。

結晶化は8°Cで容積が約30μlのアクリル製のボタンを用いて透析法で行なった。透析外液を400mMリン酸緩衝液(pH6.0)にしたところ菱形十二面体の結晶を得た。この結晶は立方晶系で空間群は $P4_2 32$ 、格子定数は338Åである。単位格子の中に2粒子含まれるとすると V_m ¹⁴⁾は妥当な値 $2.7 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ となる¹⁵⁾。

3. 巨大分子用ワイセンベルグカメラによる回折強度測定

当初回折強度測定は、理学電機社製の回転陽極X線発生装置で波長1.54ÅのCuK α 線を二枚の互いに垂直な全反射鏡で集光して行なった。通常のX線フィルムを装着した振動写真法で、振動角0.625°、重なり角0.125°として、7時間の露出を必要とした。しかし十分な分解能が得れないのと長時間の露光の間に結晶が放射線障害を受けて劣化することなど、問題が生じたのでこの方法による回折強度測定は中止した。

この度の解析のための回折強度測定は高エネルギー物理学研究所のシンクロトン放射光によって行なった。回折装置は同研究所放射光実験施設のBL6A2で巨大分子用ワイセンベルグカメラ¹⁶⁾を使用した。また、記録媒体として富士フィルム社製のイメージングプレートを用いた。X線はSi結晶で波長を1.488Åに単色化した。カメラ半径は429.8mmと当時では最も大きなものであった。空気によるX線の散乱を抑えるために露光中は円筒形のカセット内部をHeガスを充満させた。

(111) 軸を回転軸にして, 振動巾 1.125° , 隣の写真との重なり 0.125° , 1枚当たりの露出時間 90秒で, 合計 32枚撮影した。

イメージングプレートに記録された光学濃度を, 富士フィルム社製イメージングプレート読み取り装置 BA-100 によって読み取り, 数値化して磁気テープに記録した。これを放射光実験施設の大型計算機で東¹⁷⁾ のプログラム “WEIS” によって処理した。このプログラムは Rossmann の振動写真処理プログラム¹⁸⁾ を基本にして, 作成し直したものである。このプログラムで結晶方位の決定とフィルム上の斑点位置の決定とそれに基づく構造因子の観測値の算出を行なった。この時, 格子定数は 338 \AA , 結晶のモザイク巾は 0.1° に固定し, 部分反射は回折強度の算出から除外した。32枚のフィルムについて相対的な尺度を決定し, 等価な反射で平均をとって, 反射強度の平均値を見積もった。平均値から著しく外れた反射が有るときは, これを除いて平均し直した。その結果, 独立な 1 反射強度を得るのに 6~7 個の等価な反射強度を平均した。等価な反射間の Merging R ($R = \sum_h \sum_i |I_{hi} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i I_{hi}$) は 13.4% であった。100~5 \AA 分解能で $F > 3\sigma(F)$ の反射を 27, 441 個集めることができた。この数は理論反射数の 94% に達している。

4. 自己回転関数による粒子の対称と方位の決定

低分解能側では (hkl) で $h+k+l=2n+1$ が消滅すること及び単位格子中の粒子数が 2 とみなせることから, ウィルス粒子は原点と体心の位置にある。

回転関数法は Rossmann と Blow¹⁹⁾ によって開発された方法で, 次のように定義される任意の回転 S における回転関数 $R(S)$ を計算する。

$$R(S) = \int P_1(X) \cdot P_2(X') dv \quad (1)$$

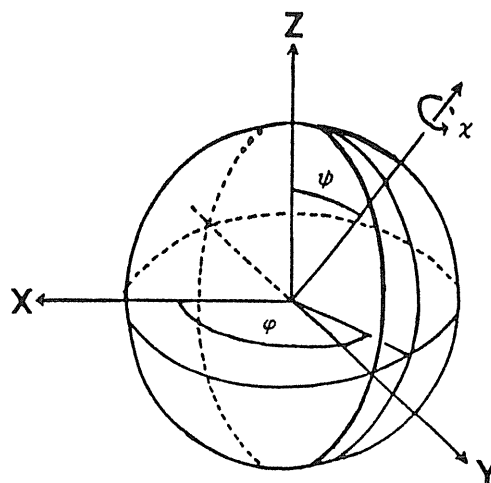


Fig.1 Definition of the polar angles in the orthogonal coordinate system.

ここで P はパターン関数で, X は回転マトリクス Q によって X' と関係付けられる。

$$X' = Q(S) \cdot X \quad (2)$$

この回転関数を計算する方法にはいろいろあるが, ここでは計算速度の速い Crowther の方法¹⁹⁾ を適用した。自己回転関数では (1) 式の P_1 と P_2 は同じパターン関数を用いる。計算には 12 \AA から 10 \AA 分解能の 1281 反射を用いて, 積分領域の半径を 58 \AA で行なった。この計算では回転 S はオイラー角で与えられる。得られた回転関数を図 1 で示す極座標系での値に変換して, その結果の一部をステレオ投影図に等高線で図 2 に示している。この結果ウィルスは確かに正二十面体対称を持ち, 図 3 に示す配置で粒子の 2 回回転軸と 3 回回転軸の一部は結晶学的対称と一致していることが確認できた²⁰⁾。表 1 は回転関数のピーク値を示したものである。最大値を 50 に規格化しており, 理論的には 2 重の重みのものは 50, 1 重の重みのものは 25 になる。計算結果はすべて理論値の 80% 以上の高さであり, 構造因子の観測値の精度が非常に高いことを示している。なお正二十面体対称だけでは解釈できない位置にもピークが数多く有る。

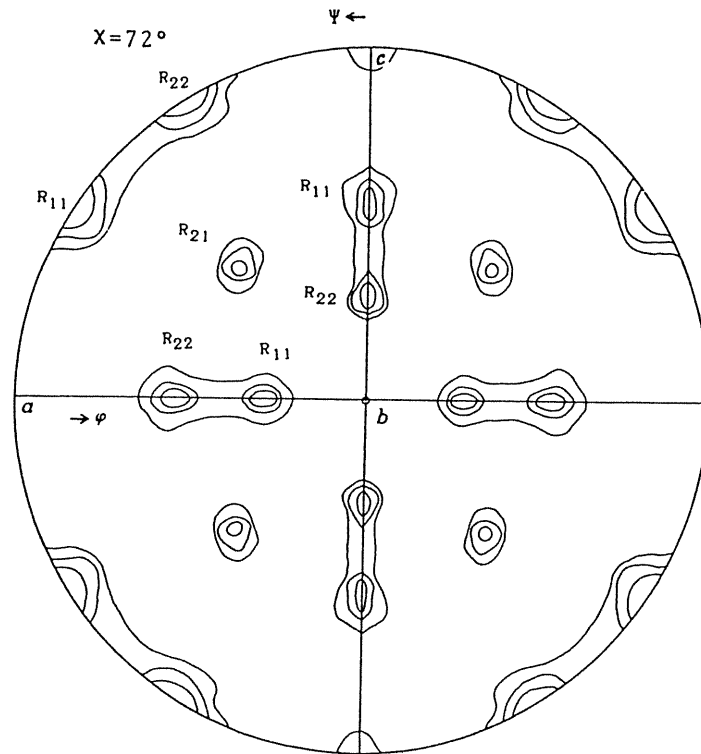


Fig.2 Stereographic projection of the self-rotation function. The section for five-fold axis is given. Contours are drawn at equal intervals of five beginning with five. Rij's indicate types of rotation given in Table 1.

これらは R_{12} あるいは R_{21} で示した回転操作によるもので、原点の粒子と体心の粒子との間のものである。このように粒子間関係によるピークが生じることを考慮しないと解釈できないケースが時々ある。この点は回転関数を解釈する上で気を付けなければならないことである。

5. 球近似でのR値検索法による正二十面体殻表面でのサブユニットの配置の決定²⁰⁾

TNV粒子中のタンパク質サブユニットの位置を決めるために、サブユニットを直径30Åの球に仮定して、正二十面体の非対称単位中の任意の位置において構造因子の計算値 F_c を求め、その観測値 F_o とを比較した。R値 ($R = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$) を F_o と F_c の一致度の指標にした。正二十面体の非対称単位中に3分子のサブユニットを含む $T = 3$ のウイルスであることから、図4に示した擬似の3回対称軸を仮定して計算を行なった。この時に用

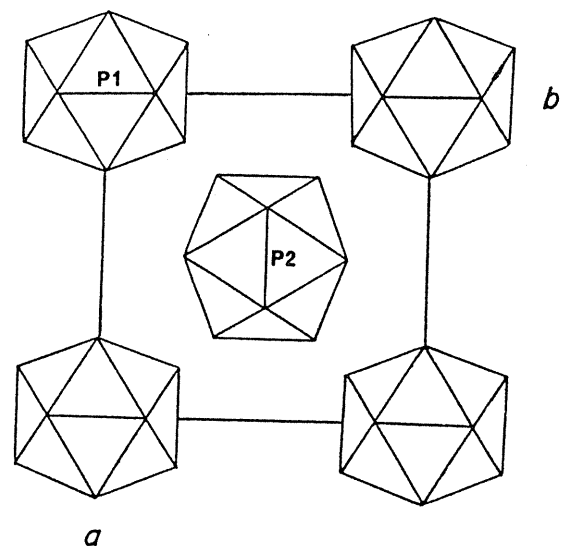


Fig.3 Orientation and packing of TNV particles in the cubic cell of $P4_232$. Particle at the origin (P1) is related to that at the body center (P2) by a 4_2 axis.

Table 1 Peaks of the rotation function

Rotations*	α	φ	ψ	Heights	Weights
R_{21}	44.48	54.74	45.00	21	single
R_{22}	72.00	31.72	0.00	20	single
R_{11}	72.00	31.72	90.00	21	single
R_{11}	72.00	58.28	0.00	21	single
R_{22}	72.00	58.28	90.00	21	single
R_{22}	72.00	90.00	31.72	19	single
R_{11}	72.00	90.00	58.28	20	single
R_{21}	75.52	54.74	45.00	21	single
R_{12}, R_{21}	90.00	0.00	0.00	50	double
R_{12}, R_{21}	90.00	90.00	0.00	46	double
R_{12}, R_{21}	90.00	90.00	90.00	46	double
R_{21}	110.21	45.78	13.28	19	single
R_{21}	110.21	45.78	76.92	20	single
R_{21}	110.21	80.52	45.00	20	single
R_{11}	120.00	20.91	0.00	20	single
R_{22}	120.00	20.91	90.00	21	single
R_{11}, R_{22}	120.00	54.74	45.00	46	double
R_{22}	120.00	69.09	0.00	20	single
R_{11}	120.00	69.09	90.00	20	single
R_{11}	120.00	90.00	20.91	21	single
R_{22}	120.00	90.00	69.09	21	single
R_{21}	138.59	32.31	45.00	21	single
R_{21}	138.59	67.79	24.09	21	single
R_{21}	138.59	67.79	65.91	21	single
R_{22}	144.00	31.72	0.00	21	single
R_{11}	144.00	31.72	90.00	21	single
R_{11}	144.00	58.28	0.00	20	single
R_{22}	144.00	58.28	90.00	20	single
R_{22}	144.00	90.00	31.72	21	single
R_{11}	144.00	90.00	58.28	21	single
R_{21}	154.76	18.46	45.00	21	single
R_{21}	154.76	77.06	13.28	21	single
R_{21}	154.76	77.06	76.72	21	single
R_{21}	164.48	54.74	45.00	20	single
R_{11}, R_{22}	180.00	0.00	0.00	50	double
R_{11}	180.00	36.00	31.72	20	single
R_{22}	180.00	36.00	58.28	20	single
R_{12}, R_{21}	180.00	45.00	0.00	45	double
R_{11}, R_{22}	180.00	45.00	90.00	46	double
R_{22}	180.00	60.00	20.91	21	single
R_{11}	180.00	60.00	69.09	21	single
R_{11}	180.00	72.00	31.72	21	single
R_{22}	180.00	72.00	58.28	21	single
R_{11}, R_{22}	180.00	90.00	0.00	50	double
R_{11}, R_{22}	180.00	90.00	45.00	50	double
R_{11}, R_{22}	180.00	90.00	90.00	50	double

* R_{ii} represents a rotational symmetry element within each individual particle and R_{ij} relates the two individual particles (P_i and P_j) in a similar manner.

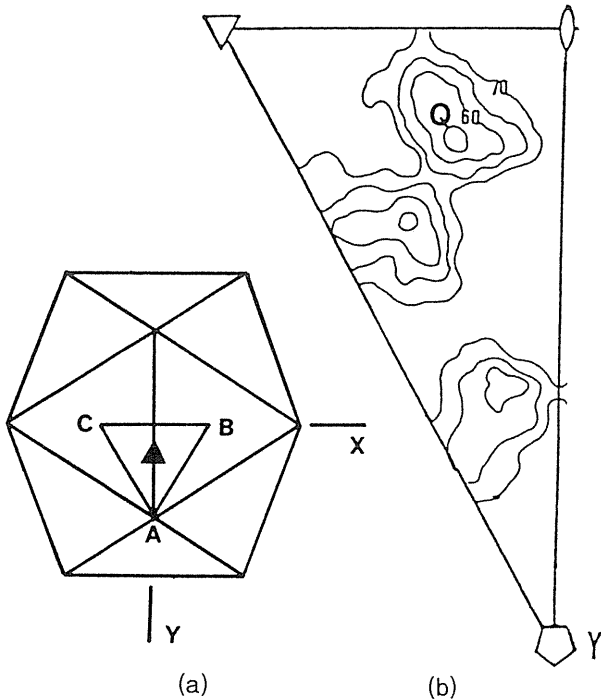


Fig.4 (a) The presumed local three fold axis (▲) is the normal of the equilateral triangle of ABC at its center. (b) R-factor map for the section $Z=129.6\text{\AA}$. Contours are drawn at an equal interval. The values at Q(-15.0, 14.1) is the minimum in this section.

いた反射は 100\AA から 30\AA 分解能のもので、検索した位置は粒子の中心から 100\AA から 169\AA の領域内であった。この結果の R 値の極小値のある断面を図 4 に示している。分子を球で近似したために、この等高線図には鏡面对称が生じたので非対称単位の半分だけを示している。有意に低い R 値を示す位置が見つかり、互いに鏡面对称の関係にある 2 組のサブユニットの位置に限定出来た。どちらの位置の組が TNV のサブユニット位置であるかこの段階では決めることはできない。このうちの一方の構造を図 5 に示している。サブユニットの重心の配置は TNV と同じ $T=3$ のウイルスである Southern Bean Mosaic Virus (SBMV)³ と似ていることが判った。

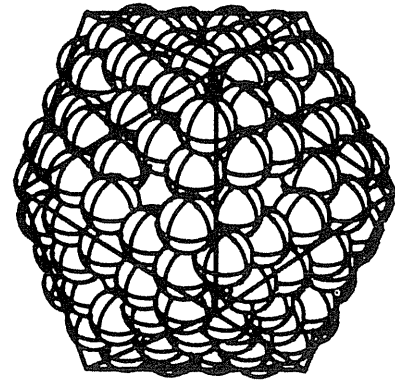


Fig.5 TNV subunit arrangement on the icosahedral surface.

6. ポリアラニンモデル分子を用いた 8\AA 分解能での R 値検索法による初期モデルの決定

TNV のサブユニットの配置が SBMV のそれに似ていることに加え、それぞれのサブユニットのアミノ酸残基数も TNV が 275²¹⁾ で SBMV が 260²²⁾ とほぼ等しいので、SBMV の正 20 面体対称の非対称単位を構成する 3 分子と同じ構造のポリアラニンモデル 3 分子で構成される架空の結晶格子を作った。(1)式において、この結晶のパターン関数を P_1 とし TNV 結晶のそれを P_2 として交差回転関数を 8\AA 分解能で求めた。その結果の一部である $\chi = 120^\circ$ のところを図 6 に示した。ピークの位置は自己回転関数の位置と殆ど同じである。このことは TNV はサブユニットの重心位置のみならず、分子の外形や向きも SBMV に似ていることを示している。

非対称単位を構成するサブユニットの重心をさらに精密に決めるために、SBMV のそれと同じ位置の付近でポリアラニンモデル分子を並進して、R 値検索を行なった。その結果、a, b, c 軸方向にそれぞれ -0.184\AA , -0.245\AA , -0.559\AA 並進した位置で $R = 0.42$ の最小値があった。この位置での構造因子の計算値の位相と F_0 とを組み合わせて 8\AA 分解能の初期構造因子を設定し、これを以後の分子置換平均法による位相の精密化に使用した。

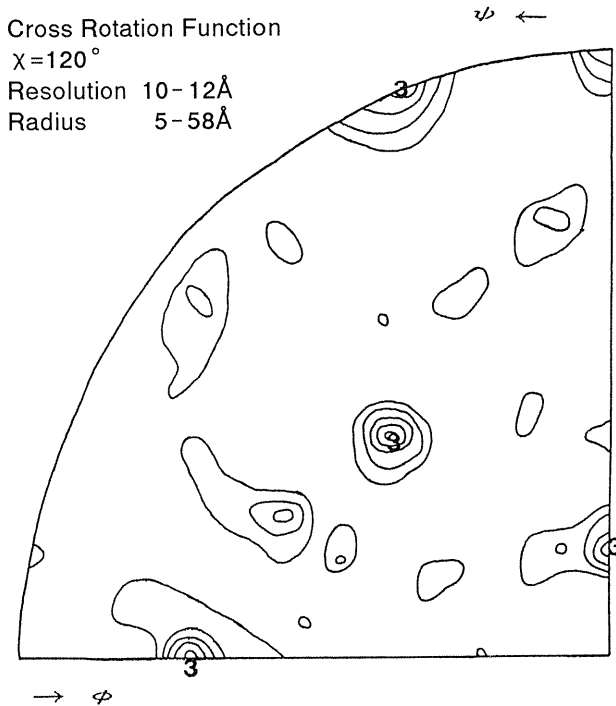


Fig.6 Stereographic projection of the cross-rotation function at the section $\chi=120^\circ$. Significantly high peaks were appeared at almost the same position as those of the self-rotation function.

7. 分子置換平均法

分子置換平均法による位相の精密化法の原理は Bricogne²³⁾ の論文に求めることができる。この方法は、以前有機化合物の結晶構造解析で適用された逐次フーリエ法と対比すると理解しやすい(図7)。逐次フーリエ法では得られた初期電子密度図から原子の位置を決定する。原子間距離や結合角の理論値と各原子の電子密度の理論値に基づいて格子内の電子密度分布を修正する。この電子密度分布から構造因子を計算して、その位相角と F_0 から新たな電子密度を計算する。これらの過程を繰り返して精密化を行なう。一方、分子置換平均法では得られた初期電子密度分布を非結晶学的対称要素に従って平均する。この平均された電子密度分布から構造因子を計算して、その位相角と F_0 から新たな電子密度を求め、次のサイクルに入る。前者では原子の電子密度の理論値と結合距離などの構造による規制を行なって電子密度分布の誤差

を取り除くのに対して、後者では非結晶学的対称による規制によって密度分布の誤差を取り除く。両者は互いに良く似た方法といえる。

TNVの位相の精密化では図8に示すように、上で述べた平均操作に加えて Wang²⁴⁾ の溶媒領域の電子密度の誤差の除去を組み込んで行った。この全ての過程を広い意味での分子置換平均法による位相の精密化という。これらの計算方法について少し詳しく述べる。

Molecular Envelope の決定ではまず Wang²⁴⁾ によって与えられた次式に従って電子密度を滑らかにする。グリッド j の修正された電子密度 ρ'_j は

$$\rho'_j = K \sum w_i \rho_i \quad (3)$$

で与えられる。ここで K は任意の尺度定数で、 ρ_i はグリッド i の元の電子密度である。重み w_i についてはグリッド i と j の距離 r_{ij} がある一定の距離 r_0 より小さく且つ ρ_i が正のときは、

$$w_i = 1 - r_{ij}/r_0 \quad (4)$$

であり、他のときは $w_i = 0$ である。TNVの8Åから5Åの解析では R を15Åに固定した。こうして滑らかにされた電子密度の高い方の50%のグリッドを分子領域とした。結晶によって溶媒の含有率が異なるので何%以上の所で線を引くかは結晶によって異なる。

ρ -Filter も Wang²⁴⁾ の方法によって行った。最初のステップではもとの電子密度を嵩上げするための一定値 ρ_c を次式にしたがって決めた。

$$(\rho_c + \langle \rho_{sol} \rangle) / (\rho_c + \rho_{max}) = S \quad (5)$$

ここで $\langle \rho_{sol} \rangle$ は元の電子密度での溶媒領域の電子密度の平均値、 ρ_{max} は分子領域の電子密度の最大値、 S は経験的なパラメーターで分解能や結晶中の溶媒の密度に依存する²¹⁾。ここでは S は0.3と

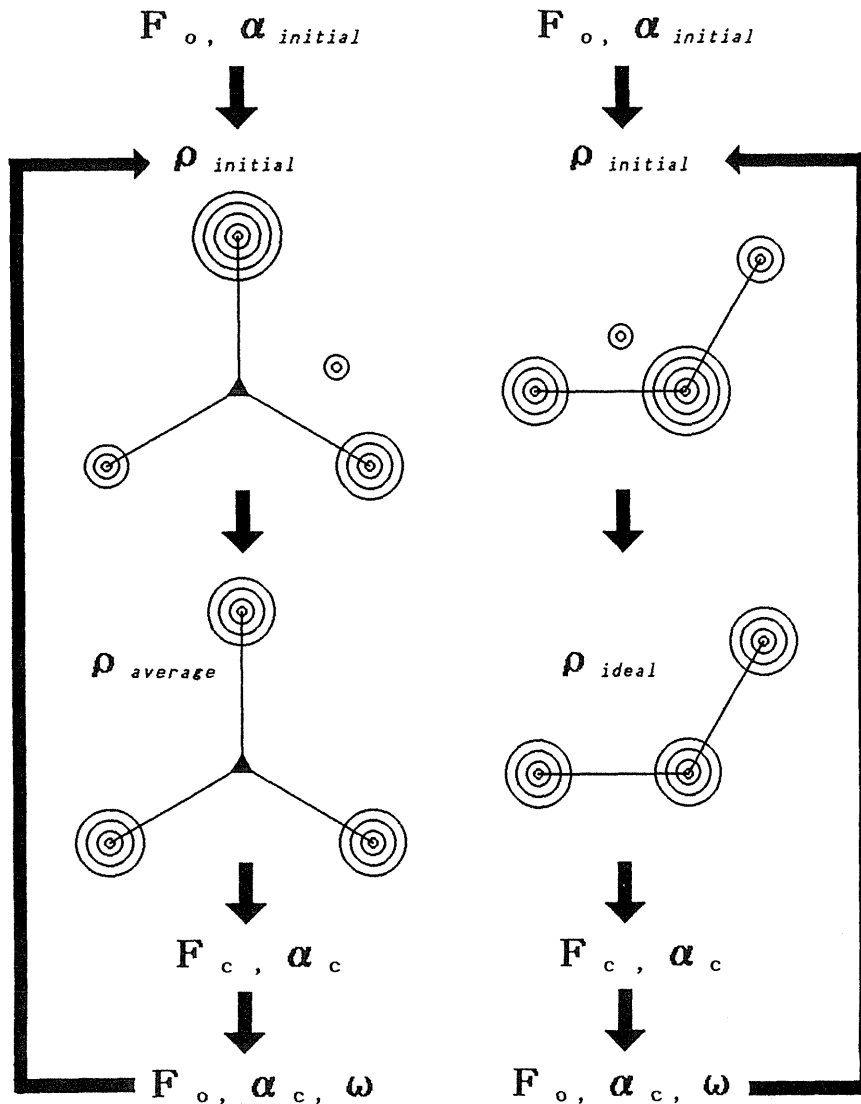


Fig.7 The molecular replacement averaging (left) and the sequential Fourier approximation (right) are schematically shown. In the former errors in initial electron density are removed by averaging with non-crystallographic symmetries. In the latter those are done by structural restraints such as bond distances and angles.

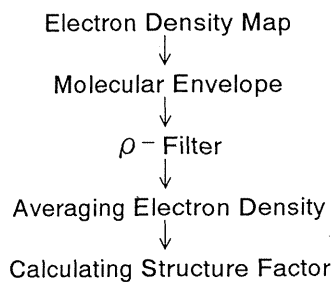


Fig.8 Whole procedures of the molecular replacement averaging. Errors in electron density are reduced by the solvent flattening and the averaging.

した。このようにして決めた ρ_c で結晶格子全体の電子密度を嵩上げた。こうしてできた新しい電子密度を次の平均操作に使った。

非結晶学的対称による平均操作は Bricogne²³⁾ の方法に従って行った。TNVでは5回回転軸で関係付けられる点の電子密度を平均した。平均に用いる電子密度データを入れた格子のグリッド間隔は内挿による誤差を少なくするために分解能の1/6より小さくした。求めるべき電子密度のグリッド間隔は分解能の1/3程度にした。溶媒領域の電子

密度はその領域の平均値に置き換え、分子領域で負の値になるところは0に置き換えた。

構造因子の計算は高速フーリエ変換によって行った。

新しい電子密度計算のための構造因子の大きさはRayment²⁵⁾の方法に従って重みをつけた $F_o \cdot \exp(-|F_c - F_o|/F_o)$ を、位相は計算値をあてはめた。この重みの付けかたは簡単ではあるがSim^{26), 27)}の方法と同等な効果がある。

これらの一連の過程を繰り返して位相の精密化を行った。その時に精密化の進行具合を見るために、繰返しごとに次に示したR値と相関係数Cを計算した。

$$R = \Sigma |F_o - F_c| / \Sigma F_o \quad (6)$$

$$C = \Sigma (F_o - \langle F_o \rangle) \cdot (F_c - \langle F_c \rangle) / \sqrt{\Sigma (F_o - \langle F_o \rangle)^2 \cdot (F_c - \langle F_c \rangle)^2} \quad (7)$$

同じ分解能で収斂するまで数サイクル繰り返して、次に1~2逆格子相当分だけ分解能を上げていった。

8. 構造解析結果

8 Å分解能での初期位相をもとにして5 Å分解能まで分子置換平均法による電子密度の精密化を行った。91サイクル繰り返して、R値0.16及び相関係数0.92という良好な結果を得た。図9はウイル

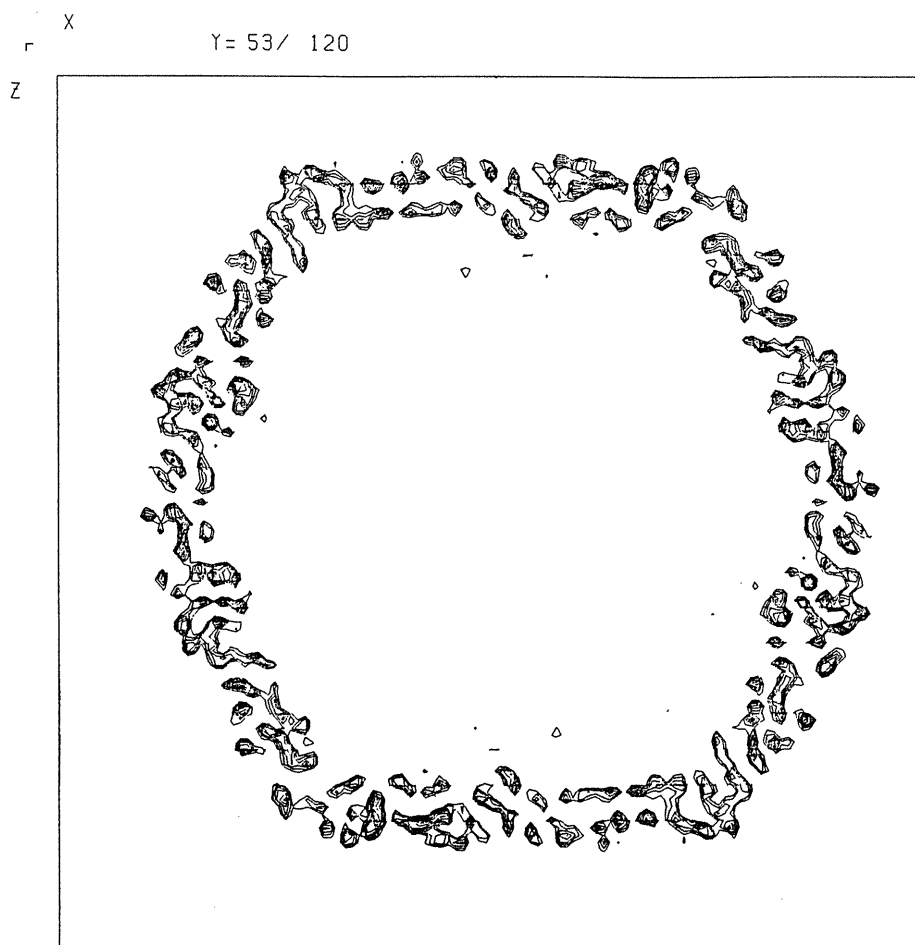


Fig.9 An electron density section at the middle of TNV particle. Coat proteins with high electron density surround RNA with low electron density because of disordered structure inside the particle. The size of square box is 338 Å.

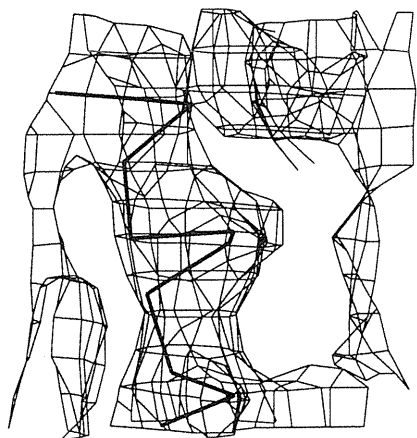


Fig.10 Superposition of electron density cages and an α -helical structure.

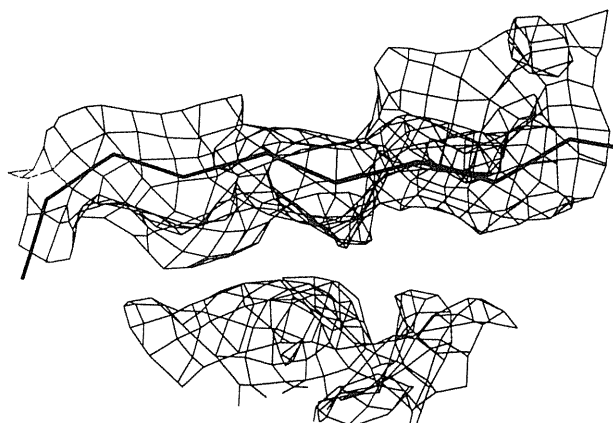


Fig.11 Superposition of electron density cages and a β -structure.

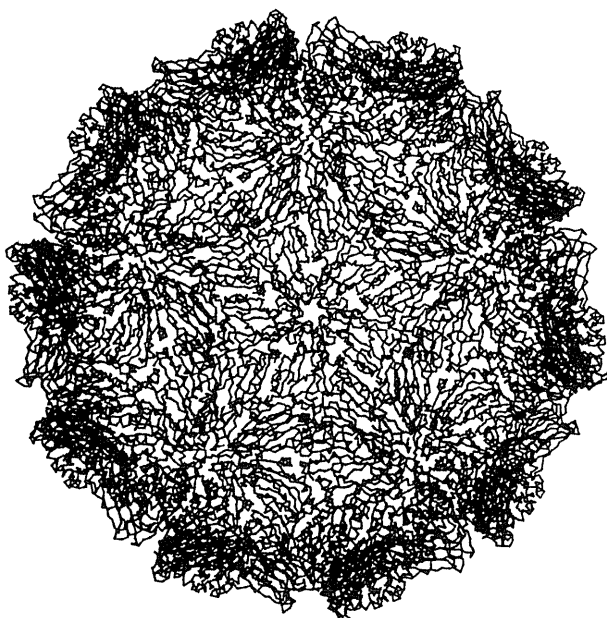


Fig.12 TNV structure viewed along a five-fold axis is drawn with 90 subunits.

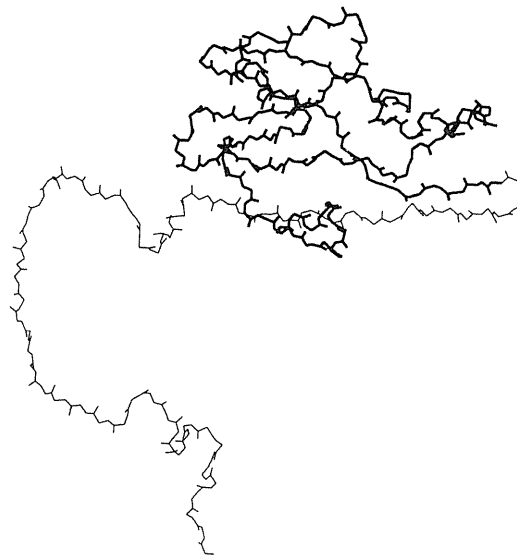


Fig.13 Structure of the subunit C is illustrated with main chain atoms. The ordered part consisting of 210 residues is shown by heavy lines and a hypothetical structure of the disordered part of 65 residues by thin lines.

ス粒子の中央部の 5 \AA 分解能の電子密度図である。図 10 と 11 はそれぞれ α -ヘリックスと β -構造の部分電子密度に重ねたもので、電子密度は主鎖の流れを追える極めて良質のものが得られた。分子モデルを作成した結果、初期位相の決定に使用した SBMV と大きく違った構造の部分も見出された。図 12 は TNV 全体の構造を $C\alpha$ を結んで表わしたものである。図 13 は一つのサブユニッ

トの構造であり、ウイルス粒子の内部で乱れている部分は仮想の構造として細い線で表している。TNV と SBMV を比較するとサブユニットのアミノ酸残基数は 275 と 260 で TNV が 15 残基長い。粒子内部で RNA と相互作用しながら乱れた構造の部分は TNV が 27 残基も長く、ウイルス殻を構成する

部分は12残基短いことが明らかになった。

9. まとめ

8 Å分解能の初期位相から出発して、5 Å分解能の構造を得ることが出来た。このことによって、この方法が位相の拡張に有効であることが確認された。この方法が成功した要因の1つは平均操作を行った対称要素が5回対称軸であったこともあげられる。等価点が2~4の場合どれだけ有効かは検討する必要があるが、大いに希望が持てる。非結晶学的対称要素をどれだけ正確に決めることが出来るかということと、Molecular Envelopeの決め方が精密化の成功の鍵になると思われる。

この解析で用いた回折強度データの精度はMerging Rが13%と一見すると高いようではあるが、6~7個の等価点で平均しているために決して悪くはなく、回転関数の精度の高さからも非常に良質のデータと思われる。これが成功のもう一つの要因である。

強度データは高分解能まで得ているので、この繰り返しを行えば良い。問題は計算機の容量にある。5 Å分解能では300メガバイトの容量を必要とした。現在のシステムのままでは3 Å分解能の解析には1.4ギガバイトの容量が必要である。現在この問題を克服しながら分解能を上げているところである。

TNVは自己のRNAを認識する能力が高い。この構造解析で明らかになったようにTNVはRNA領域で乱れた構造をとっているポリペプチド部分がSBMVに比べて長い。この部分とRNAとの特異的な相互作用や殻タンパク質のRNAに接触できる部分のRNAとの特異的な相互作用が高いタンパク・RNA相互認識能の要因であろう。この点について、高分解能の解析と現在進行しているアミノ酸配列の決定を合わせて今後詳細に明らかにしたい。

文献

- 1) D. L. D. Casper and A. Klug: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **27**, 1 (1962).
- 2) S. C. Harrison, A. J. Olson, C. E. Schutt, F. K. Winkler and G. Bricogne: Nature, **276**, 368 (1978).
- 3) C. Abad-Zapatero, S. S. Abdel-Meguid, J. E. Johnson, A. G. W. Leslie, I. Rayment, M. G. Rossmann, D. Suck and T. Tsukihara: Nature, **286**, 33 (1980).
- 4) L. Liljas, T. Unge, T. A. Jones, K. Fridborg, S. Lovegren, U. Skoglund and B. Strandberg: J. Mol. Biol., **159**, 93 (1982).
- 5) Z. Chen, C. Stauffacher, Y. Li, T. Schmidt, W. Bomu, G. Kamer, M. Shanks, G. Lomonosoff and J. E. Johnson: Science, **245**, 154 (1989).
- 6) T. J. Smith, M. J. Kremer, M. Luo, G. Vriend, E. Arnold, G. Kamer, M. G. Rossmann, M. A. McKinlay, G. D. Diana and M. J. Otto: Science, **233**, 1286 (1986).
- 7) M. Luo, G. Vriend, G. Kamer, I. Minor, E. Arnold, M. G. Rossmann, U. Boege, D. G. Scraba, G. M. Duke and A. C. Palmenberg: Science, **235**, 182 (1987).
- 8) R. Acharya, E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands and F. Brown: Nature, **327**, 709 (1989).
- 9) R. C. Liddington, Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin and S. C. Harrison: Nature, **354**, 278 (1991).
- 10) K. Valegård, L. Liljas, K. Fridborg and T. Unge: Nature, **345**, 36 (1990).
- 11) K. M. Smith and J. G. Bald: Parasitology, **27**, 231 (1935).
- 12) R. E. F. Matthews: Intervirology, **12**, 252 (1979).
- 13) B. D. Harrison and H. L. Nixon: Virology, **12**, 104 (1960).
- 14) B. W. Matthews: J. Mol. Biol., **33**, 491 (1968).
- 15) K. Fukuyama, S. Hirota and T. Tsukihara: J. Mol. Biol., **169**, 961 (1987).
- 16) N. Sakabe: J. Appl. Cryst., **16**, 542 (1983).
- 17) T. Higashi: J. Appl. Cryst., **22**, 9 (1989).
- 18) M. G. Rossmann: J. Appl. Cryst., **12**, 225 (1979).
- 19) M. G. Rossmann and D. M. Blow: Acta Cryst., **15**, 24 (1962).
- 20) T. Tsukihara, Y. Yokota, T. Koyama, K. Fukuyama and H. Matsubara: Acta Cryst., **B46**, 855 (1990).
- 21) K. Saeki, T. Umeoka, Y. Takahashi, N. Kunishima, K. Fukuyama and H. Matsubara: manuscript in preparation.

- 22) M. Hermodson, C. Abad-Zapatero, S. S. Abdel-Meguid, S. Pundak, M. G. Rossmann and J. H. Tremaine: Virology, **119**, 133 (1982).
- 23) G. C. Bricogne: Acta Cryst., **A30**, 395 (1974).
- 24) B. C. Wang: Methods in Enzymology, **115**, 90 (1985).
- 25) I. Rayment: Acta Cryst., **A39**, 102 (1983).
- 26) G. A. Sim: Acta Cryst., **12**, 813 (1959).
- 27) G. A. Sim: Acta Cryst., **13**, 511 (1960).

きいワード

分子置換平均法 (molecular replacement averaging)

この用語は分子置換法と区別されずに使われることが多い。しかし、混乱を避けるために両者を区別して説明する。分子置換法は、結晶を構成する分子と良く似た構造の分子を結晶中に詰め込んで実験事実と整合

性のある結晶構造を見出すことによって結晶構造を決定する方法である。分子置換平均法は、結晶の非対称単位に同一分子が複数個あるときに結晶内の同一分子の等価な位置の電子密度を平均して、より精度の高い構造を求める構造決定法である。