

人工変異タンパク質調製による多波長異常分散法の利用 —迅速な立体構造決定—

中川 敦史

大阪大学・蛋白質研究所*

Multipewavelength Anomalous Diffraction method with Genetic Engineered Proteins —Rapid Structure Determination of Biological Macromolecules—

Atsushi NAKAGAWA

Institute for Protein Research, Osaka University

Macromolecular crystallography is a powerful tool used to study complex biological systems. Recent progress of structural biology reveals many biological activities from atomic structures of biological macromolecules. However, by comparison with molecular genetics, progress in research on protein structure has been painfully slow, not only because of the great diversity that protein structures have proven to have, but also because of the technical problem of obtaining protein crystals and solving the crystallographic phase problem. Multipewavelength anomalous diffraction (MAD) method is a powerful technique to solve the crystallographic phases. In principle, MAD method requires heavy atom(s) in a sample, however, most biological macromolecules, such as proteins, do not contain heavy atoms in a native molecule. Genetic engineering technique enable us to produce a selenomethionyl proteins, of which methionine residues are replaced by selenomethionine, and anomalous scattering effect of selenium atom can be used for phase determination by MAD method. When an expression system of protein is constructed, it is straightforward to make a selenomethionyl protein, and it is almost true that the structure determination can be done successfully when a MAD diffraction data of selenomethionyl protein crystal is collected, and no other crystals are required. Combination of MAD method and genetic engineering technique enable us rapid and almost direct structure determination of biological macromolecules.

1. はじめに

複雑な生命現象も、究極的には生体を構成する分子同士の相互作用、すなわち化学反応によって説明することができる。その中でもタンパク質は、生体内での様々な化学反応(酵素反応)に関与しているほか、運動、生体防御機構、構造保持など、生命活動を維持していく上での重要な機能の多くを担っている。DNA分子が、遺伝情報を単純な一次元の塩基配列として記録しておくのに対して、タンパク質分子は3次元的な折れ畳み構造を取ることによって、初めてその機能を発現することができる。すなわち、タンパク質分子の機能—ひいては生命現象—を分子としてのレベルで理解するためには、その原子レベルでの立体構造を

知ることが不可欠である。こういった基礎科学の分野での要求の他に、応用面でも、例えば新薬の開発のためにターゲットとなる生体高分子の立体構造からその分子認識機構を明らかにしたいといった要求など、生体高分子の立体構造に関する情報は近年非常に求められてきている。

この数年の間に、DNAの塩基配列の決定法は飛躍的に進歩した。これまでに、大腸菌や酵母など原核および真核生物ともに数種類の生物に関してその全遺伝子配列が決定されており、ヒトの全遺伝子も数年以内に解読が完了する予定である(予定では2003年と言われているが、もっと早く終わる可能性も十分にある)。これに対して、Protein Data Bank¹⁾に登録されているタンパク質の立体構造は、

* 大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2
TEL 06-6879-8635 FAX 06-6879-4313 e-mail atsushi@protein.osaka-u.ac.jp

1999年3月の時点で、(結晶系の異なる物, 変異体, 基質とのコンプレックスなどを含めても) たかだか, 9500を越えた程度でしかない。ヒトの遺伝子は約 3×10^9 bp からできており, そこにコードされているタンパク質が少なくとも数10万種類以上あると考えると, 現時点でいかにタンパク質の立体構造に関する情報が不足しているかということは容易に推測できるであろう。

現在, タンパク質を始めとする生体高分子の立体構造を原子レベルで決定する手段としては, 核磁気共鳴吸収法(NMR)とX線結晶解析法が広く使われている。いずれの手法もお互いの短所を補いながらこの数年飛躍的に進歩してきているが, 自然界に存在するすべての生体高分子の立体構造を決定することは, 現状では不可能であると言える。しかし, その一方で, 先に書いたように, タンパク質の立体構造に関する情報の必要性はますます増しており, より迅速な構造解析を行うことが要求されてきている。

2. 結晶学と位相問題

結晶内座標 (x, y, z) での電子密度分布 $\rho(x, y, z)$ とミラー指数 hkl で表される構造因子 $F(hkl)$ は, 次式のようにフーリエ変換で関係付けられる。

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \cdot \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (1)$$

上式から明らかなように, 構造因子 $F(hkl)$ がわかれば, 結晶内での電子密度分布 $\rho(x, y, z)$ を簡単に計算することができる。

(1)式の逆フーリエ変換は, 次式のように表される。

$$F(hkl) = \sum_{n=1}^N f_n \cdot \exp[2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)] \quad (2)$$

上式から, 結晶内での n 番目の原子の位置 (x_n, y_n, z_n) およびその原子散乱因子 f_n がわかれば, その結晶の構造因子 $F(hkl)$ を計算することができる。(2)式から明らかなように構造因子 $F(hkl)$ は複素量である。すなわち, 構造因子 $F(hkl)$ はその大きさ $|F(hkl)|$ と位相角 $\alpha(hkl)$ を用いて, 次式のように書き表すことができる。

$$F(hkl) = |F(hkl)| \cdot \exp[i\alpha(hkl)] \quad (3)$$

一方, 構造因子 $F(hkl)$ と回折強度 $I(hkl)$ の間には, 次のような関係がある。

$$k \cdot I(hkl) = F(hkl) \cdot F^*(hkl) = |F(hkl)|^2 \quad (4)$$

X線結晶解析では結晶からの回折強度 $I(hkl)$ を測定す

るが, (4)式からわかるように回折データの測定において位相情報が失われてしまう。言い換えると, 構造因子 $F(hkl)$ が得られれば(1)式より結晶内の電子密度分布 $\rho(x, y, z)$ を求められるが, 回折強度測定において構造因子の位相情報 $\alpha(hkl)$ が失われてしまっているため, 直接電子密度 $\rho(x, y, z)$ を求めることができない。そこで, 何らかの方法で, 失われた位相角 $\alpha(hkl)$ を実験的に求めなければいけないということになる。

回折実験で失われた位相情報を求めるために, 類似のタンパク質の構造が知られていない場合, 従来から広く重原子同形置換法が利用されてきた。タンパク質結晶はその50%近く(一般的には27-65%程度)を溶媒分子で占められているため²⁾, 結晶内部の溶媒分子と結晶外の溶媒分子がタンパク質分子間のチャンネルを通して交換できる。このことを利用して, 結晶を重原子試薬を溶解した溶液に浸すことにより, 結晶内に浸透した重原子イオン(あるいは錯体)がタンパク質分子の特定の部位に結合した重原子誘導体を作製する。この重原子誘導体とネイティブ結晶の回折強度の差を利用する方法が重原子同形置換法である。重原子同形置換法は非常に強力な位相決定法であり, 初めてのタンパク質の構造解析に適用されて以来³⁾, 分子量数10万の巨大分子複合体の構造解析⁴⁻⁶⁾に到るまで最も広く利用されてきた方法である。重原子同形置換法では, ネイティブ結晶と同形の(すなわち, タンパク質分子に重原子が結合した以外に格子定数や分子の配向などがネイティブと変わらない)重原子同形置換体を2種類以上(異常分散効果を利用した場合は1種類以上)作製する必要がある。ネイティブ結晶と同形でしかも高分解能の回折データが得られる重原子同形置換体を作製するためには, 数10種類以上の重原子試薬を用いて, 濃度やソーキング時間を変えて数多くの試行錯誤を繰り返さなければいけない場合が多い。時には良好な重原子誘導体が得られないために, せっかく結晶ができているにも関わらず構造解析がストップしてしまうことすらある。

3. 多波長異常分散法 (Multiplewavelength anomalous diffraction method: MAD)

従来のX線発生装置では, 強度の関係で決まった波長のX線(特性X線)しか使えなかったのに対して, 白色光源である放射光を利用することにより, 任意の波長のX線を用いて回折強度測定を行うことが可能となった。重原子の吸収端近傍で回折強度データ収集を行うことによって, 重原子の異常分散効果(特にその虚部に相当する $\Delta f''$)を最大限に利用することができ, 重原子同形置換法においては解析に必要な重原子同形置換体の種類を減らすことができるようになった。

一方, 吸収端近傍で大きく変化する異常分散項を利用することによって, 複数の波長での回折強度データを使って位相決定を行うことができることは, 1950年代の半ばに

既に岡谷・Pepinskyによって示されているが⁷⁾, この方法がタンパク質の構造解析に適用されたのは, 放射光が一般的に利用できるようになった1980年代に入ってからである。

1980年に Karle により MAD データの関係式が導かれ⁸⁾, この後, さらに Hendrickson によって MAD 法を使って解析的に位相決定を求める方法が提案され, MADSYS というプログラムシステムとしてまとめられた⁹⁾。この方法は次のようにして位相決定を行う。異常分散を示す原子種を1種類だけ含む結晶からの波長 λ での回折強度 $|^0F(\pm\mathbf{h})|^2$ は, 異常分散を示さない原子からの寄与 $|^0F_T| \cdot \exp(i^0\varphi_T)$, 異常分散を示す原子からの寄与のうち異常分散項を含まない部分 $|^0F_A| \cdot \exp(i^0\varphi_A)$ および異常分散項 f', f'' を用いて, 次式のように表すことができる。

$$\begin{aligned} |^0F(\pm\mathbf{h})|^2 = & |^0F_T|^2 + a(\lambda) \cdot |^0F_A|^2 \\ & + b(\lambda) \cdot |^0F_T| \cdot |^0F_A| \cdot \cos(^0\varphi_T - ^0\varphi_A) \\ & \pm c(\lambda) \cdot |^0F_T| \cdot |^0F_A| \cdot \sin(^0\varphi_T - ^0\varphi_A) \quad (5) \end{aligned}$$

ここで

$$\begin{aligned} a(\lambda) &= (f'^2 + f''^2) / f^0{}^2 \\ b(\lambda) &= 2(f' / f^0) \\ c(\lambda) &= 2(f'' / f^0) \end{aligned}$$

(5)式で, f', f'' が既知であれば, 未知の変数は $|^0F_T|$, $|^0F_A|$, $\Delta\varphi (= ^0\varphi_T - ^0\varphi_A)$ の3つとなる。従って3つ以上のデータがあればこれらの未知の変数を決めることができるので, その後, $|^0F_A|$ を用いて異常散乱原子の原子パラメータを精密化することにより $^0\varphi_A$ を求め, 最終的に $^0\varphi_T$ を得ることができることになる。

この方法の他に, MAD データのうちの1つの波長をネイティブとして取り扱うことにより従来の重原子同形置換法のプログラムを利用して位相決定を行う方法による解析例も数多く報告されている¹⁰⁾。また, 別のアプローチで MAD データを取り扱えるようにしたプログラムも開発されている^{11,12)}。

こういった方法論的な進歩と同じ時期に, 多波長異常分散法に不可欠な放射光がタンパク質結晶学に汎用的に使えるようになってきたことは, 非常に幸運であったといえるであろう。このような背景の下に, 1980年代の中頃から1990年代の始めにかけて Hendrickson らのグループを中心として, 多波長異常分散法がタンパク質の構造解析に利用され始めた。当初は, ヘモグロビン^{9,13)}, シトクロム c ¹⁴⁾, 塩基性青色銅タンパク¹⁵⁾といったもともと鉄や銅などの金属を補欠分子として持っているタンパク質の他, 重原子置換したタンパク質結晶¹⁶⁾あるいは重原子を導入した補酵素との複合体結晶¹⁷⁾等の構造解析に多波長異常分散法が適用された。しかし, この方法では, 金属タンパク

質以外の一般的なタンパク質の構造解析にルーチ的に多波長異常分散法を適用することは難しい。しかし1980年代に入ってから急速に進歩した遺伝子操作の手法を用いて作製した人工変異体タンパク質を利用することにより, 多波長異常分散法の適用範囲を飛躍的に広げることができるようになった。

4. セレノメチオニン置換タンパク質を利用した多波長異常分散法

遺伝子工学の手法を用いたタンパク質の大量発現系の確立は, 結晶化に必要な大量のサンプルを容易に得ることが可能となり, タンパク質結晶学の対象となるサンプルの種類を飛躍的に増大させていった。**Fig. 1**に Protein Data Bank¹⁾への登録数を示す。1990年代に入って, 加速度的に登録数が増えていっているのがわかるが, このもっとも大きな理由の1つが, タンパク質の大量発現系の確立によるサンプルの大量供給が可能になったことである。

一方, 遺伝子工学の手法を用いてサンプルの大量発現を行うことが可能になったことにより, タンパク質結晶学にとって, もう1つ重要な革新があった。それは, 多波長異常分散法を, 重原子を持たない一般のタンパク質に適用することが可能になったことである。

一部の大腸菌は, タンパク質を構成するアミノ酸の1つであるメチオニンを自分自身で合成できないため, 外部から直接メチオニンを取り込んでタンパク質合成に利用している(このような性質を持つ物をメチオニン要求株と呼ぶ。余談であるが, 人間も同じようにメチオニンを体内で合成することができない)。メチオニンは側鎖にイオウ原子を持っているが, このイオウをセレンに変えたセレノメチオニンを入れた培地中でメチオニン要求株を培養すると, タンパク質合成の際にメチオニンの代わりに(間違っても)セレノメチオニンを取り込んでしまうので, この方法を用いれば, タンパク質中のメチオニンがセレノメチオニンに置換されたもの(セレノメチオニン置換タンパク質)

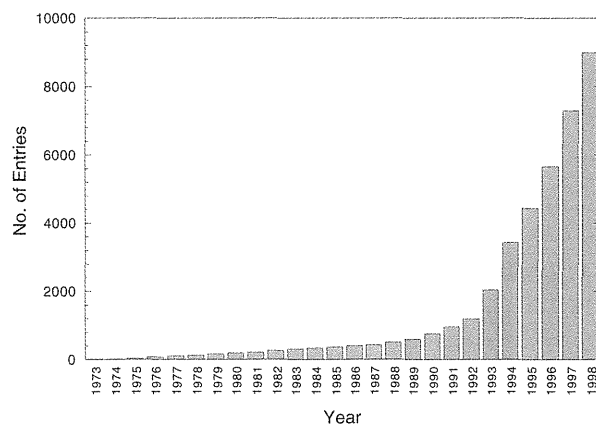


Figure 1. Number of structure entries in the Protein Data Bank¹⁾.

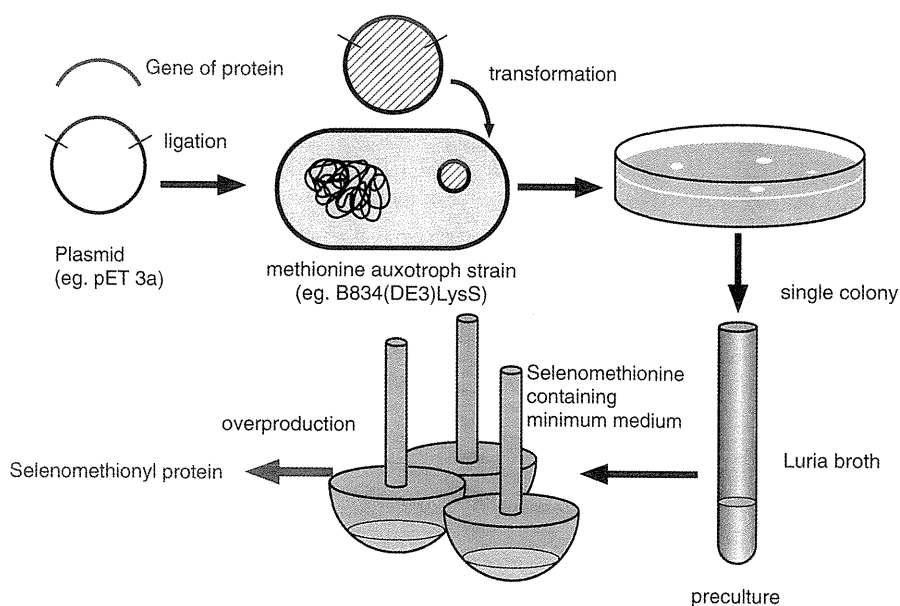


Figure 2. Flow chart of overproduction system of selenomethionyl protein.

を作り出すことができる (Fig. 2)。セレンのK吸収端は通常タンパク質結晶学で利用している波長領域の0.97974 Å (12.6540 KeV) にあるため、セレノメチオニン置換タンパク質を用いて多波長異常分散法により位相決定を行うことができる。言い換えると、大量発現系のできているタンパク質であれば、すべて従来のように重原子同形置換体を試行錯誤で探す必要なく、ストレートに構造解析を行うことができるようになるということである¹⁸⁾。セレノメチオニンを用いた多波長異常分散法による構造解析は、1990年に Hendrickson らによるインターロイキン 1 α ¹⁹⁾ およびリボヌクレアーゼ H²⁰⁾ の解析を始めとして、この数年急速にその解析数が増えてきている (Fig. 3)。

セレノメチオニン置換タンパク質を利用することにより、重原子同形置換体の探索に要していた時間と労力を大幅に減らすことができるようになった。ネイティブタンパク質の発現・精製系が確立され結晶化がスムーズに進めば、セレノメチオニン置換体を発現させて構造解析のためのデータを集めるまでを1ヵ月程度の期間でルーチン的に進めることができる。しかも、セレノメチオニン置換タンパク質が発現された時点で位相決定に必要な重原子が入っていることになるので、良好な回折強度データが得られた時点でほとんどルーチン的に構造解析を進めることができることになる。

このように、多波長異常分散法は非常に優れた位相決定法であるが、異常分散効果はK吸収端の場合、 $\Delta f'$ 、 $\Delta f''$ のいずれも数電子程度の寄与しかなく、いわゆる重原子同形置換体における重原子の寄与が数10電子程度あることに比べると非常に小さいという弱点を持っている。このことが、多波長異常分散法による構造解析を (特に分子量の

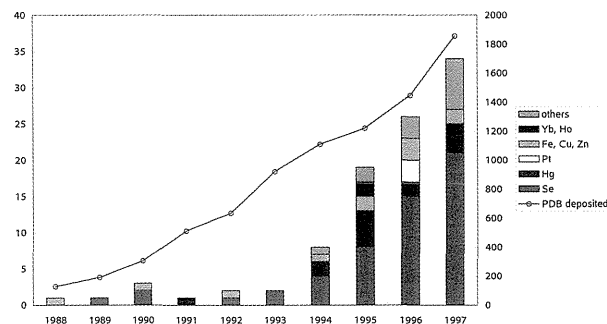


Figure 3. Number of protein structures solved by the MAD method.

大きなタンパク質に対して) 難しくしている一番の理由である。

異常分散効果の位相決定への寄与はおおよそ次のように見積もることができる。ある波長での異常分散項を f' 、 f'' 、1分子中の原子数 (水素原子を除く) および異常分散効果に寄与する原子数をそれぞれ N_T 、 N_A 、回折角 0° での有効原子散乱因子を Z_{eff} (タンパク質の場合、約6.7電子である) とした時の異常分散シグナルの大きさの目安として、Bijvoet 差シグナル ($\text{rms}(\Delta F_{\pm})/\text{rms}(|F|)$)、波長間差シグナル ($\text{rms}(\Delta F_{\Delta\lambda})/\text{rms}(|F|)$) をそれぞれ次式のように見積もることができる。

$$\begin{aligned} \text{rms}(\Delta F_{\pm})/\text{rms}(|F|) &\cong (N_A/2N_T)^{1/2} (2f'_A/Z_{\text{eff}}) \\ \text{rms}(\Delta F_{\Delta\lambda})/\text{rms}(|F|) &\cong \\ &(N_A/2N_T)^{1/2} (|f'_A(\lambda_i) - f'_A(\lambda_j)|/Z_{\text{eff}}) \end{aligned}$$

上式に基づいて計算した、アミノ酸残基数に対する異常分散シグナルの大きさを **Fig. 4** に示す。図から明らかのようにタンパク質の大きさ（アミノ酸残基数）が大きくなると異常分散シグナルの大きさは急激に減少する。例えば K 吸収端による異常分散効果を示す原子がアミノ酸残基数100のタンパク質中に1個だけ存在するとき、Bijvoet 差シグナルは約3%、波長間差シグナルは約2%となる。これが、異常分散効果を示す原子がアミノ酸残基数300のタンパク質中に1個だけ存在すると、Bijvoet シグナルは約1.7%、波長間差シグナルは約1.3%となる。現在のデータ収集システムの測定精度は2%弱程度であると考えられるが、このことから、タンパク質1分子あたり1個の異常分散原子を導入した場合、アミノ酸残基数100–300程度までのものが、セレンなどの K 吸収端を利用した多波長異常分散法を構造解析に適用できると考えられる。

セレンメチオニンを目的タンパク質に導入する場合、タンパク質1分子あたり複数個のセレン原子を導入することができる。実際、自然界に存在するタンパク質の場合、平均すると59残基あたりに1残基のメチオニンが存在するので¹⁸⁾、セレンメチオニンを利用した多波長異常分散法の適用範囲は非常に広い。

セレンメチオニン置換タンパク質を利用する上で、問題となるのは、ネイティブタンパク質と同じ条件でセレンメチオニン置換タンパク質が結晶化するかどうかということである。これまでの経験では、基本的にすべてネイティブタンパク質と同じ条件下でセレンメチオニン置換体の結晶化に成功している。セレンメチオニン置換体ではわずかに溶解度が変化する場合が多く（通常溶解度は減少する）、

結晶化条件を少し振ってみることが必要であった。また、セレンメチオニン置換タンパク質とネイティブタンパク質結晶はほとんどの場合同形であった。リボソームタンパク質 S7^{21,22)} と L2^{23,24)} のセレンメチオニン置換体の結晶は、ネイティブと同形ではなかったが、多波長異常分散法による構造解析ではネイティブ結晶との同形性は必要ではないので、その意味においてまったく問題はないといえる。

5. 人工変異体タンパク質の利用

非対称単位中に多数の異常散乱原子が存在する場合、実際の解析においては、それらの位置を決定することが問題となってくることは容易に予想される。例えば非対称単位中に数10個の異常散乱原子が存在する場合（分子量の大きなタンパク質や非対称単位中に複数個の分子が含まれている場合など）、パターン図の解釈は非常に複雑になり、場合によっては解釈不能となることも予想される（タンパク質結晶は分解能が低いため、低分子化合物の結晶解析で使われている直接法を適用することが難しい）。一方、現在のデータ収集システムで得られる回折強度データの精度でも分子量20,000くらいのタンパク質に対して1個の（温度因子の小さな）セレン原子で十分な位相決定を行うことができると考えられる。これは実際のタンパク質で平均的に見られるメチオニンの数の1/3に相当する。我々はラット由来のマクロフェージ遊走阻止因子（MIF）の構造解析において、メチオニンをアラニンに置換した変異体タンパク質を作製し、単量体あたり3個あったメチオニンを1個に減らした変異体を用いて構造解析に成功している²⁵⁾。

Fig. 5 に、セレンの数の異なる Se-Met MIF 変異体の

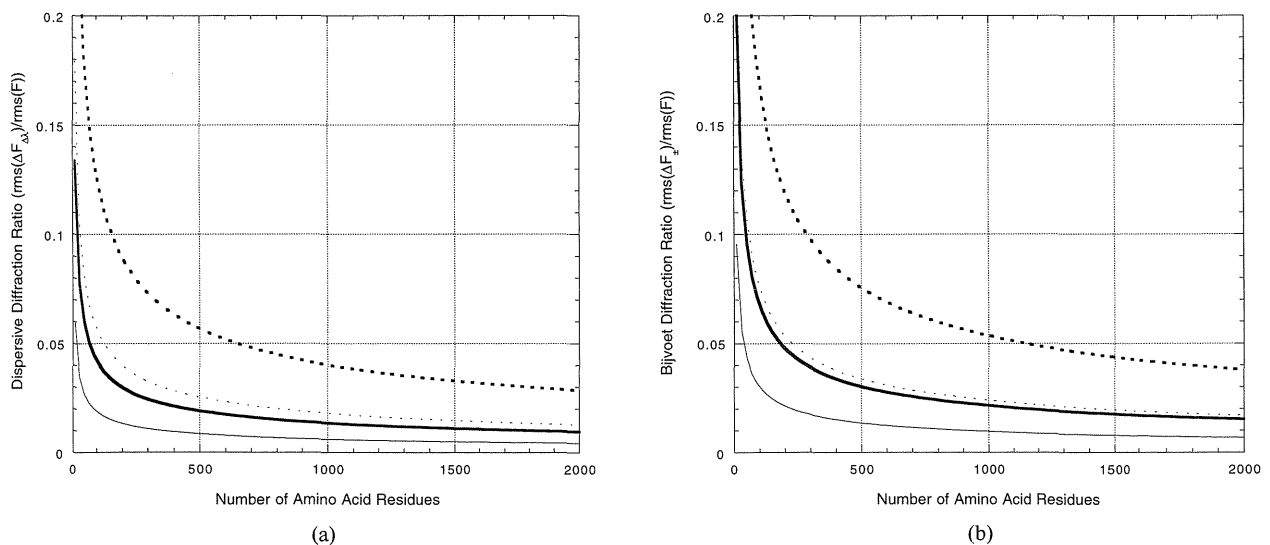


Figure 4. Expected anomalous signal size versus number of amino acid residues (a) Maximum Bijvoet diffraction ratio. (b) Maximal dispersive diffraction ratio. Expected values for K-edge experiments are shown by the thinner solid lines for the case of 1 site per molecule and by the dashed lines for 5 sites per molecule. Expected L_{III}-edge experiments are shown by the thicker solid lines for 1 site per molecule and by the shorter dashed lines for 5 sites per molecules. This figure is produced using the same formula as shown in the Ref. 28.

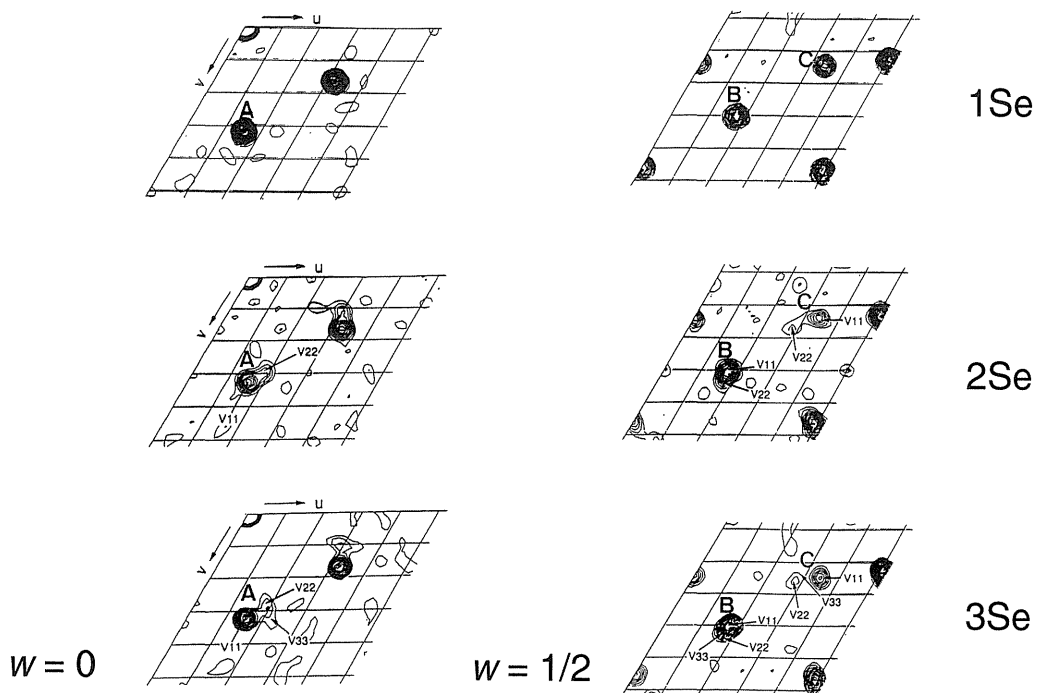


Figure 5. Anomalous difference Patterson maps of mutant Se-Met MIFs.

異常分散差パターン図を示す。ネイティブに3個あるセレンのうちの1個はパターン図上に非常に明瞭に、もう1つも比較的明瞭に現れているが、3つめはパターン図上ではほとんど確認できない。この違いは、温度因子の大きさに由来している。

逆に、分子量が非常に大きいにもかかわらずメチオニンの数が極端に少ない場合には、phasing powerを大きくするために、分子内部のアミノ酸残基をメチオニンに置換することにより必要なだけのセレンを導入することも可能である。

メチオニンを別のアミノ酸に置換する、あるいは、その逆を行うとすれば、側鎖の大きさおよびhydrophobicityから考えて、ロイシン(あるいはアラニン)などが有力候補であるが、生理活性を持った状態で立体構造を取っていることを確認するために、活性測定を行うことは必須である。

先にも書いたように、セレンの数が増えることは、パターン関数の解釈を難しくすることになるが、直接法などを使ったプログラムも改良されてきており、今後はより分子量の大きなタンパク質に対して多波長異常分散法が利用されていくであろう。

6. MAD から SAD へ

一般的な教科書を読むと、重原子同形置換法の場合、少なくとも2つの重原子誘導体か、または、十分な異常分散シグナルを示す1つの重原子誘導体が必要であると書いてある。一方、Wangによって、ネイティブと1つの重

原子誘導体あるいは異常分散を示す1つの重原子誘導体のみがあれば溶媒領域平均化と組み合わせることによって位相決定が行えるということが示されている²⁶⁾。この方法は、実際の解析に適用するためには、高分解能・高精度の回折強度データが必要であり、しかも、より精度の高い位相確率分布が得られることが重要である。筆者が所属していた研究室では、イッテルビウム(Yb)置換したMRP8の構造解析に1つの波長の異常分散効果のみを利用した位相決定(single anomalous scattering: SASあるいはsingle anomalous diffraction: SAD)を試みた²⁷⁾。イッテルビウムのL_{III}吸収端は1.3862 Åにある。Fig. 6にL_{III}吸収端近傍での蛍光スペクトルから計算した異常分散項を示すが、イッテルビウムは、この波長において非常に強いwhite peakを示す。これは、20電子以上の寄与に相当する大きさで、位相決定には十分なシグナルとなることが予想された。

このwhite peak上での回折強度データのみ(すなわちBijvoet差のみ)を使って、SHARP¹¹⁾により位相決定を行った。Fig. 7に得られた電子密度図を示すが、モデル作製に十分な質の電子密度図を得ることができた。SAD法(あるいはSIR法)による位相決定には精度の高い位相確率分布を得る必要があるが、maximum likelihoodを用いたSHARP¹¹⁾を利用することにより、より正しい位相確率分布を得ることができる。このことは、未知の構造解析に(MAD法よりもデータの少なく済む)SAD法が利用できる可能性を示すことができただけでなく、より異常分散シグナルの弱い、あるいは、分子量の大きなタンパ

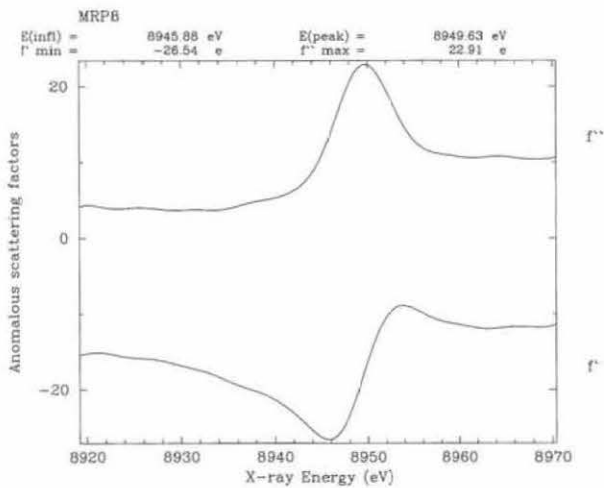


Figure 6. Anomalous term of ytterbium atom of Yb-substituted MRP8 evaluated from fluorescence spectrum using CHOOCH^{29} .

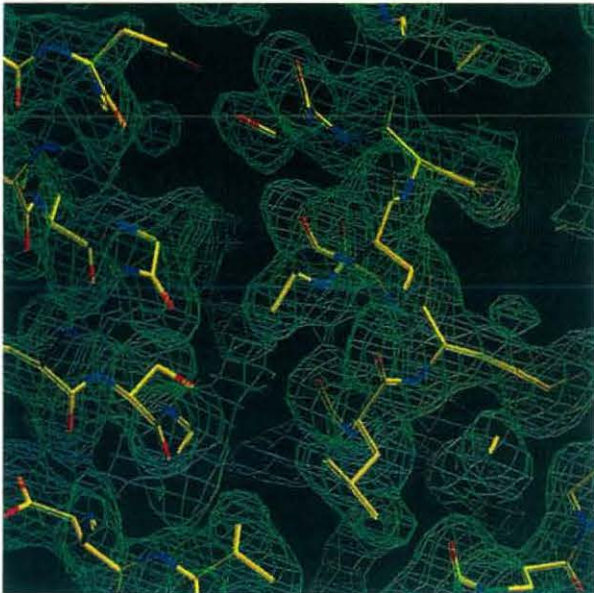


Figure 7. Experimental map of Yb-MRP8 calculated by SAD method superimposed with refined model.

ク質に対して多波長異常分散法が適用できる可能性を示している。

7. 終わりに

多波長異常分散法が新規の金属タンパク質の構造解析に適用されてから10年が経過し、その間に遺伝子操作の手法が広く普及してきた。これらの2つの技術を組み合わせることによって、生体高分子の結晶構造解析をほぼルーチン的に行うことができるまでに到っている。今後、さらにデータ収集システムや構造解析のソフトウェアが改良され、より迅速な構造解析が行われるようになるだけでなく、より分子量の大きなタンパク質に多波長異常分散法が

広く使われていることは間違いないであろう。

謝辞

多波長異常分散法に関する研究は、筆者が所属していた高エネルギー物理学研究所・放射光実験施設（現：高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所）および北海道大学・大学院理学研究科・生物科学専攻・生体高分子解析学講座2において行われた物をまとめています。特にセレノメチオニン置換体を利用した多波長異常分散法による構造解析は、北海道大学において田中勲教授や多くの学生の人達との共同研究によって進められました。また、本研究において使用した回折強度データは、物質構造科学研究所、Spring-8, ESRFにおいて測定されました。この場を借りてお礼を申し上げます。

参考文献

- 1) F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, *et al.*: *J. Mol. Biol.* **112**, 535 (1977).
- 2) B. W. Matthews; *J. Mol. Biol.* **33**, 491 (1968).
- 3) D. Green, V. Ingram and M. F. Perutz: *Proc. Royal Soc. A* **225**, 287 (1954).
- 4) J. P. Abrahams, A. G. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker: *Nature* **370**, 621 (1994).
- 5) J. M. Grimes, J. N. Burroughs, P. Gouet, *et al.*: *Nature*, **395**, 470 (1998).
- 6) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, *et al.*: *Science* **269**, 1069 (1995).
- 7) Y. Okaya and R. Pepinsky: *Physical Review* **103**, 1645 (1956).
- 8) J. Karle: *Int. J. Quant. Chem.* **7**, 357 (1980).
- 9) W. A. Hendrickson: *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.* **21**, 11 (1985).
- 10) V. Ramakrishnan and V. Biou: *Method Enzymol.* **276**, 538 (1997).
- 11) de La E. Fortelle and G. Bricogne: in *Methods in Enzymology*, Vol. 276 (eds. C. W. Carter, Jr. and R. M. Sweet) 472-494 (Academic Press, New York, 1997).
- 12) T. C. Terwilliger and J. Berendzen: *Acta Crystallogr.* **D53**, 571 (1997).
- 13) W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerley and E. A. Merritt: *Proteins* **4**, 77 (1988).
- 14) S. Harada, M. Yasui, K. Murakawa, N. Kasai and Y. Satow: *J. Appl. Crystallogr.* **19**, 448 (1986).
- 15) J. M. Guss, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley, *et al.*: *Science* **241**, 806 (1988).
- 16) R. Kahn, R. Fourme, R. Bosshard, *et al.*: *FEBS Lett.* **179**, 133 (1985).
- 17) W. A. Hendrickson, A. Pahler, J. L. Smith, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2190 (1989).
- 18) W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. LeMaster: *EMBO J.* **9**, 1665 (1990).
- 19) B. J. Graves, M. H. Hatada, W. A. Hendrickson, *et al.*: *Biochem.* **29**, 2679 (1990).
- 20) W. Yang, W. A. Hendrickson, R. J. Crouch and Y. Satow: *Science*, **249**, 1398 (1990).
- 21) N. Harada, K. Sano, M. Kimura, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **120**, 112 (1997).
- 22) H. Hosaka, A. Nakagawa, I. Tanaka, *et al.*: *Structure* **5**, 1199 (1997).

- 23) T. Nakashima, M. Kimura, A. Nakagawa and I. Tanaka: *J. Struct. Biol.* **124**, 99 (1999).
- 24) A. Nakagawa, T. Nakashima, M. Taniguchi, *et al.*: *Embo J* **18**, 1459 (1999).
- 25) M. Suzuki, H. Sugimoto, A. Nakagawa, *et al.*: *Nature Struct. Biol.* **3**, 259 (1996).
- 26) B. C. Wang: in *Method Enzymology*, Vol. 115 (eds. H. W. Wyckoff, C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff) 90-112 (Academic Press, New York, 1985).
- 27) K. Ishikawa: Thesis of the Degree of Master of Science, Hokkaido University (1999).
- 28) W. A. Hendrickson and C. M. Ogata: in *Methods in Enzymology*, Vol. 276 (eds. C. W. Carter, Jr. and R. M. Sweet) 494-523 (Academic Press, New York, 1997).
- 29) G. Evans: <http://Lagrange.mrc-lmb.cam.ac.uk/doc/gwyn-daf/Chooch.html>