

応用講座1 タンパク質結晶構造解析

理研/兵庫県立大学連携 山本 雅貴

1. はじめに

タンパク質は、生体における機能分子であり、遺伝情報によって直接作られる唯一かつ最終の産物である。ヒトゲノムの解読完了をうけたポストゲノム研究の主役として、タンパク質立体構造の重要性に注目した構造ゲノム科学プロジェクトがタンパク質結晶構造解析をその中心的な手法として日本をはじめ世界各国で推進されている。タンパク質はその機能を発現するため複雑な、しかし合理的な固有の3次元立体構造を持つ。この立体構造を解明するには結晶構造解析が最も有力な方法である。

タンパク質結晶構造解析でも、実験室のX線発生機にくらべ数桁X線強度が強いSPring-8をはじめとする波長可変の放射光 (Synchrotron Radiation) が広く一般的に利用されるようになった¹⁾。この放射光利用は、タンパク質X線結晶構造解析に飛躍的な進歩をもたらした。放射光利用に伴い、金属などの異常散乱原子を含んだ結晶の構造解析に、多波長異常分散法 (Multi-wavelength Anomalous Diffraction method、MAD法) と呼ばれる構造決定法が適用されるようになった²⁻⁴⁾。MAD法では、1つの結晶から得られる回折強度データで位相問題を克服することが出来る。このため、以前から使われている多重同形置換 (Multiple Isomorphous Replacement; MIR) 法の問題を解決することができ、現在ではタンパク質の新規構造解析において主要な位相決定法として利用されている。

本講義では放射光によるタンパク質結晶構造解析の典型的な実験手法について解析に必要な基礎知識と具体的な手順について解説する。

2. X線の回折と位相問題

タンパク質結晶構造解析法は、三次元の周期構造を持つタンパク質分子結晶にX線 (電磁波) が入射した時に起る回折現象を利用してその分子構造を決定する方法である。

そもそも原子に電磁波 (X線) が入射すると、電子はX線のもつ電場によって強制振動させられ、これに伴って電子は入射X線と同じ波長の電磁波 (X線) を球面波として放射する。点電荷から放射 (散乱) されるX線は散乱方向によって強度は変化しないが、実際の原子では電子は原子核近傍で広がって分布するため、それぞれの位置からの散乱X線で位相差が生じ、このため原子の種類によって散乱X線の角度依存性は変化する。原子や分子が規則正しく三次元的に周期的に並んだ結晶に波長 λ のX線が入射すると、それぞれの原子によって散乱されたX線は互いに干渉する。散乱X線の振幅は散乱波の足し合わせのとして原子散乱因子 f を使って表される。つまり、原子 j の原子散乱因子 f_j からの結晶構造因子への寄与は反射の指数 $h k l$ と原子 j の原子座標 $x_j y_j z_j$ を用いて記すことができる。ここで、 T_j は原子 j の温度因子を表わす。

$$F(hkl) = \sum_j f_j T_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (1)$$

ところで、構造因子を表わす(1)式は、電子密度のフーリエ変換と同じであり、したがって単位格子

内の電子密度分布は構造因子の逆フーリエ変換(2)として表わされる。

$$\rho(x,y,z)=1/V \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \exp[-2\pi i(hx_j+ky_j+lz_j)] \quad (2)$$

また、構造因子 $F(hkl)$ は複素数として表わされており、(3)式のように振幅と位相で表される。

$$F(hkl) = |F(hkl)|e^{i\alpha} \quad (3)$$

しかし、我々がX線回折実験から得られる反射強度 $I(hkl)$ は、構造因子の絶対値の2乗 $|F(hkl)|^2$ に対応しており位相の情報は得られない。したがって、全反射強度を測定したからと言って直接電子密度分布は計算できない。タンパク質の結晶構造解析の場合も有機低分子結晶と同様に構造因子 $F(hkl)$ の失われた位相を求めることが構造決定における最大の課題である。

3. MAD法による位相の決定

MAD法は、異常散乱原子に見られるX線散乱強度の波長依存性（異常分散効果）を利用して、その波長依存性の極大が生じる吸収端近傍を含む複数波長での回折強度データ間での回折強度変化から立体構造を決定する方法である²⁻⁵⁾。

MAD法が一般的に利用されるまでは、通常タンパク質の新規構造解析は重原子同型置換法（IR法；Isomorphous Replacement method）が利用されていた。タンパク質の結晶を重原子の溶液に浸けると、重原子は結晶内の溶媒の空間を通過して結晶中に浸透し、タンパク質分子の特定の場所に結合することがある。重原子同型置換結晶はこの浸透を利用した浸潤（soaking）法により調製される。同型とはもとのネーティブ（native）結晶と格子定数、分子の構造と相対的な配列がほぼ変わらないことである。ネーティブ結晶の構造因子を F_P 、重原子同型置換結晶の構造因子を F_{PH} 、 F_{PH} への重原子の寄与を F_H とすると

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad (4)$$

である。重原子を導入してもネーティブ結晶の F_P 自体が変化しないときには重原子同型置換結晶が調製できたことになる。このとき、 F_P と重原子の F_H の和が重原子同型置換結晶の F_{PH} となる。 F_H を負にとれば、 F_{PH} との和 $F_{PH} - F_H$ が F_P である。

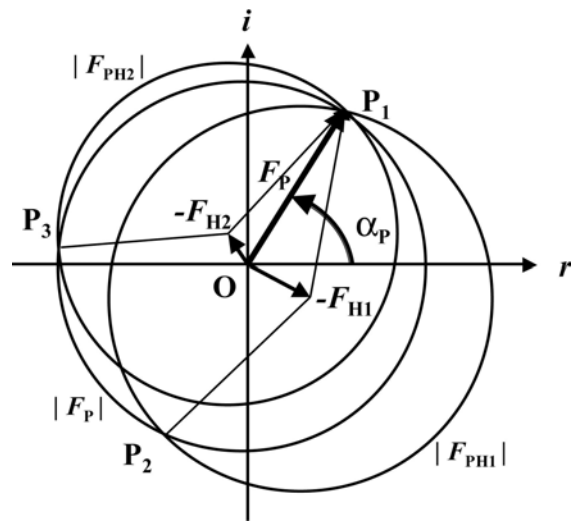


図1. 複素平面で位相決定の手順

複素平面で第1の重原子の F_H が求まると、構造振幅 F_H の円と $-F_H$ を中心とする半径 $|F_{PH1}|$ の円の交点として二通りの位相の解 $P1$ と $P2$ が求まる。第2の置換結晶の F_{H2} と $|F_{PH2}|$ によって位相の解が $P1$ に一義的に決まる。これが多重重原子同型置換法の原理である。

異常分散効果は、固有振動を持つ特定の軌道電子が入射 X 線によって誘起される振動の共鳴現象であるが、入射 X 線の波長変化に伴ってその回折強度と位相を変化させる。波長 λ の X 線での原子散乱因子 f_λ は

$$f_\lambda = f_0 + f_\lambda' + i f_\lambda'' \quad (5)$$

のように非異常分散項 f_0 と異常分散項の f_λ' と f_λ'' からなる。異常分散項の実数 f_λ' と虚数項 f_λ'' の値は小さく、波長への依存性を示す。一般的なタンパク質結晶の回折実験に使われる 1.0 Å から $\text{CuK}\alpha$ 線前後の波長領域では、タンパク質を含む生体高分子の主要構成原子である炭素、窒素、酸素、硫黄では異常分散項は極めて小さいが、鉄・銅・亜鉛・水銀・白金などの吸収端近傍では異常分散項は大きなものとなる。また、非異常分散項 f_0 は X 線の散乱角が大きくなると小さくなるが異常分散項は内殻の電子の共鳴効果に由来するため、散乱角にはほとんど依存しない。その異常分散効果を利用した位相決定の原理は Karle⁵⁾によって定式化された。一種類の異常散乱子を含む結晶について、波長 λ における反射 \mathbf{h} とその Friedel 対 $-\mathbf{h}$ に対する構造振幅 $|F_\lambda(\pm\mathbf{h})|$ は、次式で与えられる。

$$|F_\lambda(\pm\mathbf{h})|^2 = |F_N|^2 + a(\lambda)|F_A|^2 + b(\lambda)|F_N||F_A|\cos(\alpha_N - \alpha_A) \pm c(\lambda)|F_N||F_A|\sin(\alpha_N - \alpha_A) \quad (6)$$

ただし、 $|F_A|$ と α_A は異常散乱成分の構造振幅と位相、 $|F_N|$ と α_N はそれ以外の成分の構造振幅と位相であり、通常散乱因子 f_0 、異常散乱の実数項 f_λ' 、虚数項 f_λ'' としたとき、

$$a(\lambda) = (f_\lambda'^2 + f_\lambda''^2) / f_0^2, \quad b(\lambda) = 2f_\lambda' / f_0, \\ c(\lambda) = 2f_\lambda'' / f_0 \text{ となる。}$$

f_λ'' は位相の情報に直結しており、単一波長で手系の問題を解決することが出来る。この効果は Bijvoet によって絶対構造や位相の決定に利用された⁶⁾。その後 Okaya と Pepinski によって、MAD 法が位相決定に利用できることが示された⁷⁾。

しかし、タンパク質への応用は直ちには行われなかった。これには、異常分散効果の大きさが影響している。重原子の導入によって得られる強度変化は、そのイオンの電子数に比例する。たとえば重原子誘導体として、水銀原子では 1 原子あたり最大 80 電子分の寄与があるが、異常分散効果では波長を最適化してようやく 20 電子相当程度であり、

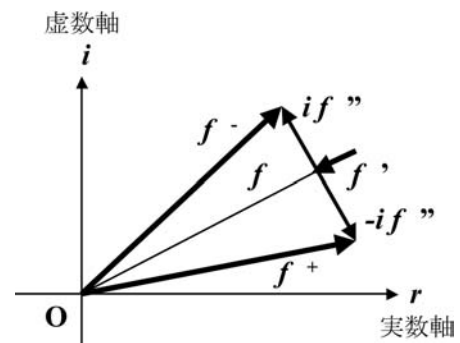


図2. 異常分散項の寄与

原子散乱因子 f_λ の非異常分散項 f_0 と異常分散項 f_λ' と f_λ'' の寄与を示す。

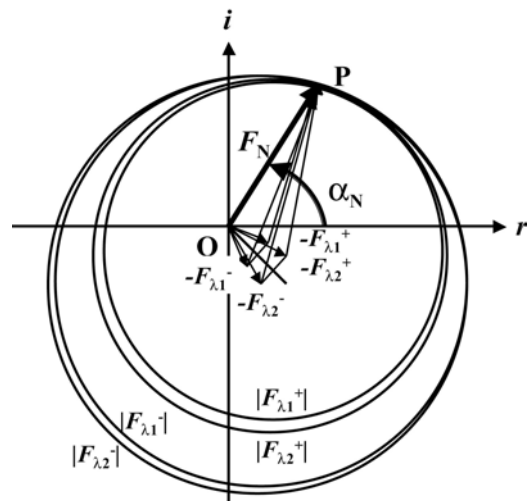


図3. 多波長異常分散法による位相決定

異常分散原子が含まれていると複数波長での構造振幅 $|F_\lambda(\pm\mathbf{h})|$ の測定によって非異常分散原子からの結晶構造因子への寄与 F_N の位相 α_N は一義的に決まる。異常分散原子の異常分散項は、重原子同型置換結晶の重原子が寄与する結晶構造因子と同じ役割を果たしている。

実験室で一般的に使われる $\text{CuK}\alpha$ 線では 8 電子弱相当と小さくなる。結果として、タンパク質のような分子量の大きな分子からなる結晶の回折強度変化としては、核種にもよるが数%程度となり、微弱な異常分散の信号を抽出して計算を進める必要がある。

このため、波長の最適化が可能な放射光施設が利用できるようになって、はじめて実現可能になった。Hendrickson らは 1985 年に Lamprey Hemoglobin の鉄原子の異常分散効果を使って、位相決定に成功した⁸⁾。その後、第三世代放射光施設の利用、タンパク質発現精製技術の展開、計算機の高速度化とソフトウェアの充実などがあいまって、現在に至っている。

4. 実験をはじめの前に

3.1 MAD 実験サンプルの準備

MAD 法による結晶構造解析をめざすには、まず異常散乱原子の導入を考慮したサンプル精製・結晶化がまず第一歩である。対象サンプルが亜鉛・銅・鉄などを補欠因子として含む金属タンパク質の場合、天然型サンプルを結晶化するだけで MAD 法が適応可能である。また、予備実験において金・白金・水銀などの重原子誘導体結晶が得られているサンプル結晶もそのまま MAD 法の対象となる。

残念ながら金属タンパク質でなく、また重原子誘導体結晶も得られていないサンプルでは、セレン置換アミノ酸（セレノメチオニンやセレノシステイン）を導入した非天然型タンパク質の作成が、確実な異常散乱子導入への近道である⁹⁾。これはタンパク質の大量発現時点で特定アミノ酸の生合成系を阻止し、これらの誘導体をタンパク質合成系に取り込ませる方法である¹⁰⁾。溶解度が落ち、発現がうまく行かないことや結晶化条件が変わってしまうこともあるが、確実に異常散乱子を導入できる方法である。また、異常分散差フーリエ図によってセレンを含むアミノ酸の位置が特定でき、モデル構築においても大変有効である。

3.2 サンプル結晶凍結条件の検索

MAD 法による構造解析は、放射光ビームラインでの回折強度測定が前提となるので、高輝度放射光下での放射線損傷を防ぐためにサンプル結晶の凍結が必要である。タンパク質結晶中で体積の半分を占める水が結晶性の氷に成長すると、タンパク質結晶の破壊に繋がるため、多くの場合そのまま凍結することは出来ない。このため、結晶中に表 1 に示した抗凍結剤を加えたのちアモルファス状の氷を生成する 100K で瞬間的に凍結させて、低温窒素ガス下で回折強度測定を行う¹¹⁾。サンプル結晶の凍結に成功すると、回折斑点の形状を乱すことなく明瞭な回折イメージを保つことが出来る。回折斑点の劣化や回折像が出なくなった場合には、凍結条件

表 1. 一般的な抗凍結剤の例

有機溶媒・高分子系（母液に 20-40% 添加して使用）
メチルアルコール・エチルアルコール
グリセロール・エチレングリコール
MPD : 2-Methyl-2,4-pentanediol
Polyethylene Glycol 200 400 600
糖類（母液に 20-30% 添加して使用）
トレハロース・グルコース・シュクロース
オイル系（結晶表面の母液と置換して使用）
カーボンオイル (Paratone-N) パラフィンオイル
スクリーニングキット
CryoPro (Hampton Research 抗凍結剤キット)
Crystal Screen Cryo (Hampton Research 抗クライオ結晶化)

の再検討が必要である。また、サンプル結晶は、クライオループと呼ばれる高分子繊維で出来た微小なループで、結晶母液ごとサンプル結晶をすくい取って凍結させる。クライオループには、Hampton Research 社¹²⁾のものが一般的に使用されている。

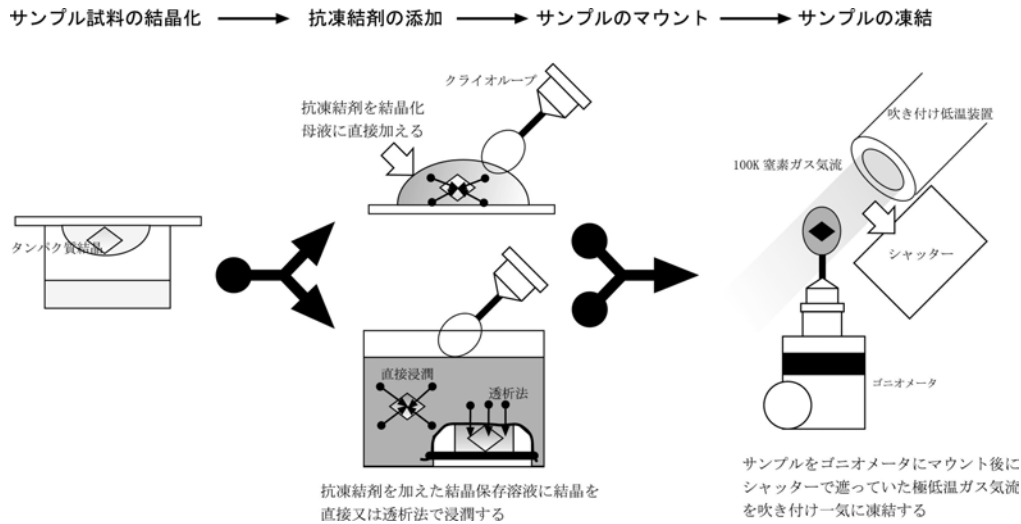


図 4. フラッシュクーリングによるサンプル結晶の凍結手順の例

3.3 異常散乱子の導入・確認

異常散乱子を含まないサンプルの結晶の場合には、異常散乱原子を重原子誘導体として導入する。ただし、MAD 法だけを考える場合、MIR 法のように結晶の同形性を考える必要はない。重原子導入によって結晶の状態（格子定数や分子構造など）が変化したとしても、1つの結晶からデータが得られるので、位相決定には問題がない。したがって、これまで避けられていた高濃度の重原子試薬溶液への浸漬や共結晶化も MAD 法には有効である。

最近では、臭素などハロゲン塩の溶液への浸漬¹³⁾も試みられている。高濃度臭化物塩溶液に結晶を短時間曝し、直ちに凍結固定化する。これらのタンパク質への結合は他の方法に比べあまり強くないので、圧力・濃度の設定や、曝露後の凍結操作によっては、良い結果が得られないこともある。また、キセノンなどの希ガス¹⁴⁾も例は多くないが異常分散を利用した位相決定に使われている。

異常散乱原子導入の確認は、図 5 に示した手順

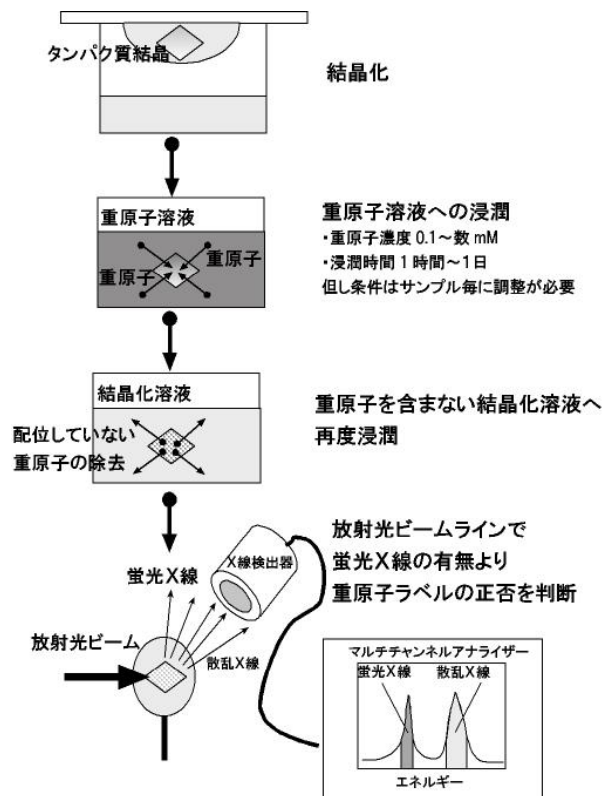


図 5. 放射光ビームラインでの異常散乱子スクリーニングの手順

での放射光ビームラインでの蛍光X線測定が最も簡便である。確認作業には重原子溶液に浸潤したサンプル結晶を、蛍光X線測定前に重原子を含まない結晶保存溶液に再度浸潤して、特異的に配位していない重原子を充分に取り除くことが重要である。これにより、結晶水中に含まれる構造決定に寄与しない異常散乱原子からの蛍光X線を取り除き、確度の高いスクリーニングを行うことが出来る。

4. 実際の実験手順

4.1 波長の選択

MAD 実験では、十分な異常分散差のデータを収集するためには、 $\Delta f'$ と $\Delta f''$ の値を最大化するように複数の波長を選択する必要がある。この項の見積もりは、吸収端の化学シフトや放射光ビームラインの装置の設定によって理論値¹⁵⁾とは若干異なる値をとることがあるため、実験的に決定すべきである。測定波長の決定は、モノクロメータ (X線分光器) の波長スキャンによりサンプル結晶からの蛍光X線スペクトルを測定して、吸収端近傍の異常分散効果を見積もって決定する。図2にはセレン化タンパク質結晶から得られた蛍光X線スペクトルと解析に使用した測定波長を例示した。こうして得られた実測したスペクトルから異常分散項を見積もるためには、Kramers-Kronig 変換を行う Chooch¹⁶⁾などのソフトウェアが利用できる。

MAD 法では、一般的に異常散乱原子の吸収端 (エッジ)・吸収極大 (ピーク) と遠隔点 (リモート) の3波長を選択する。微小な異常分散効果を精度良く測定するには、波長選択の要であるモノクロメータの波長分解能・波長再現性・安定性に関する十分な注意が必要である。もし、MAD 実験中に放射光ビームに不安定性が見られた場合には、再度モノクロメータの調整を行う必要がある。

4.2 回折強度測定

MAD 法での回折強度測定では、同一波長内及び多波長間での異常分散効果による微小な回折強度変化をいかに正確に測定できるかが成功の鍵を握っている。微小な回折強度変化を正確に測定するには、S/N 比の高い回折イメージの収集が重要である。そのため、サンプル結晶凍結時には、サンプル周りの過剰な結晶化母液や母液中の重原子等、不要な異常散乱原子の除去が重要である。

一般的な MAD 法の実験では、放射光ビームからモノクロメータを使って3波長を1つ1つ切

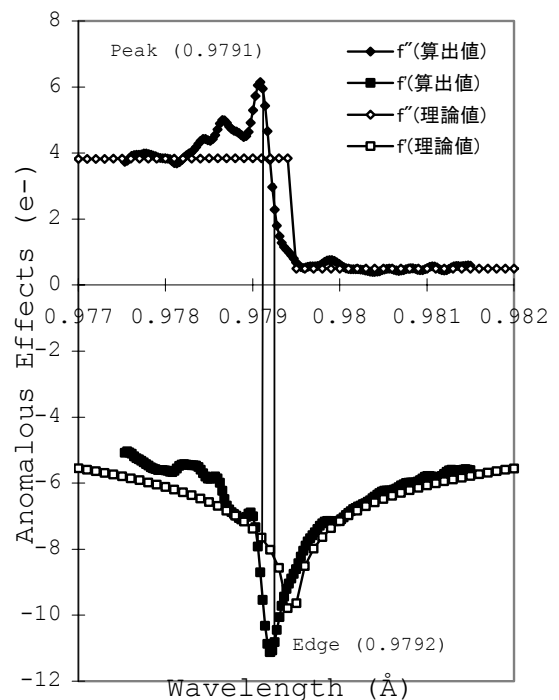


図6. セレンの異常分散効果

実測データからの算出値と理論値を示した。 f'' が極大になる Peak と、 f' が極小になる Edge に、対照点としての Remote を加え3波長ないし4波長の収集が一般的であるが、2波長でのデータ収集も行われている。

り替えることで、複数の波長での回折強度測定を行っている。この方法では、複数波長（3波長）での回折強度測定中に引き起こされるサンプル結晶の放射線損傷が測定データに大きな系統誤差をもたらす可能性があるため、不必要な長時間のX線露出時間を避けるとともに、同一振動範囲を出来るだけ近い条件下で測定する必要がある。また、測定中は回折イメージの状態をチェックして、放射線損傷の影響を最小化した測定条件を心がける。

また、異常分散効果の最適化では、 f' と f'' の項それぞれで異なった配慮を必要とする。Hendricksonらは吸収の異方性を減らし、 f'' を精度よく収集する目的で Inverse Beam Geometry Setting を提案した⁹⁾。この方法は、振動写真法によるデータ収集において、Friedel 対が 180 度異なる角度で収集できることに着目し、 a 度の回折像と $(180+a)$ 度の回折像を交互に取り進める。これにより、吸収の効果をほぼ等しく、また、関連する Friedel 対を近接した時間内に収集することで、放射線損傷による経時的な系統誤差を減らそうとするものである。 f'' の最適化については後述する。

4.3 位相の決定とモデル構築

複数（3）波長の回折強度データの測定後、異常分散効果から結晶中での部分構造（異常散乱原子位置）を決定して、サンプルの全体構造を示す電子密度図を求める。

位相計算は、MAD 法が適用された当初には、前出の Karle の式に基づいて処理されていた。2波長以上のデータ収集によって得られる Karle の式についての連立方程式を解くことで、 $|\mathbf{F}_N|$ 、 $|\mathbf{F}_A|$ 、 $(\alpha_N - \alpha_A)$ の3変数を得ることができる。異常散乱子のみからの寄与である $|\mathbf{F}_A|$ から、パターンソン法や直接法などを適用し、異常散乱原子の部分構造が決定できる。その結果より α_A が得られれば、全体の位相が求められるという算段である。この手順で計算するソフトウェアとして MADSYS パッケージ¹⁾がある。しかし、データの精度が高まるに伴い、このような特別な扱いをせず、従来の MIR 法用のソフトウェアで位相決定を行う試みもされてきた。つまり、差パターンソン図から拾ったサイトを精密化するという考え方である。SOLVE¹⁷⁾や autoSHARP¹⁸⁾は異常散乱子の部分構造決定から位相精密化まで自動的に行える。明瞭な電子密度が実験的に得られれば、後は一般的なタンパク質X線結晶構造解析の手順に従い、分子モデルの構築・構造精密化を進めて解析を完了させるだけである。

5. 実験例一回折データの同形性

MIR 法では、重原子誘導体のデータとタンパク質結晶のデータで結晶がそもそも異なるため、高分解能までの位相決定は一般に難しい。しかし MAD 法では、一つの結晶から全データが得られれば、結晶の同形性については問題がない。このため、高分解能での位相決定も可能になる。しかし、MAD 法においては結晶格子としての同形性ではなく、吸収の異方性や放射線による損傷¹⁹⁾などの系統誤差により発生するデータセット内及びデータセット間の同形性が大きな問題となる。

これは、結晶外形や結晶をマウントするループの形状などで、吸収の効果が結晶方位によって大きく変化したり、データの収集中に放射線損傷によって結晶が劣化していくことで、各データの一致度が悪化する。MIR 法でも問題になるデータセット間の一致度は、強度差が小さい MAD 法においては特に考慮してかかる必要がある。MAD 法において f'' を精度よく収集する目的で前出の Inverse Beam Geometry Setting が提案されている。しかし一方の f' については、決定打が提唱されていなかった。そ

ここで、我々は3つの波長を迅速に切り替えられる分光器として Trichromator を開発した²⁰⁾。

MAD 法では、振動範囲と測定波長の時系列での組み合わせが最終的な位相決定にも影響を与える。このことについて、行った実験を紹介する²¹⁾。Trichromator を使うことで、振動角と測定波長の順序を任意に組み合わせることができ、波長 λ_1 での α 度の回折像に続いて波長 λ_2 での α 度の回折像を迅速に収集できるようになった。その実際の効用について、波長固定で振動角を変えながら各波長データを収集する従来の方法と、同一振動角で波長を変更しながら全データをとり進める

方法 (Trichromatic mode; 以下、迅速波長切り替え法) で、そのデータの統計を求め、位相計算を行った。試料として、六角柱状結晶が得られるセレノメチオニル化 Chitosanase (ChoA)²²⁾を用いた。これは最高で 1.7\AA の反射を与え、比較的放射線損傷を受けにくい良好な結晶である。また、結晶形状が棒状のため結晶の異なる位置に X 線を当てることのできるため、比較実験に都合がよい。図7に示すように、回折イメージ毎の温度因子は、経時変化は従来法の方が若干高いものの、トータルではさほど変わらない。しかし、新しい手法では等価なイメージ間で温度因子が一致しているのに対し、従来法では、その差がある値を持っている。この結果、新しい手法では、波長間の一致度である R_{iso} ($=7.8\% \rightarrow 4.8\%$) がよい値を示した。しかし、 f^2 については考慮されていないため、Friedel 対間の一致度を示す R_{ano} ($=7.6\% \rightarrow 8.4\%$) は却って悪化している。

しかしながら、最終的に得られた位相についてみると、精密化したモデルから得られる位相との差 $\langle \Delta\phi \rangle$ では、全体で3度強、高分解能では最大で7度程度、モデルに近いことが示された。その結果、電子密度図においても有意な差が出ている (図8)。この事より、波長の再現性・高速性が確保できれば、特殊な光学系を使わなくとも、放射線損傷を考慮して適当な範囲ごとに波長を変えながら行うことで、よい結果が得られるものと理解できる。

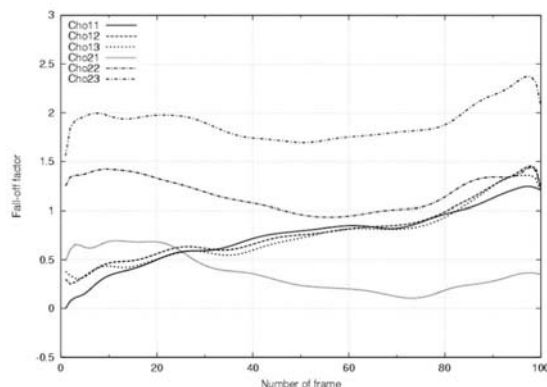


図7. 異なるデータ収集法による温度因子の変化
Cho11-3 は迅速波長切り替え、Cho21-3 は従来法による Remote, Peak, Edge のデータに対応する。

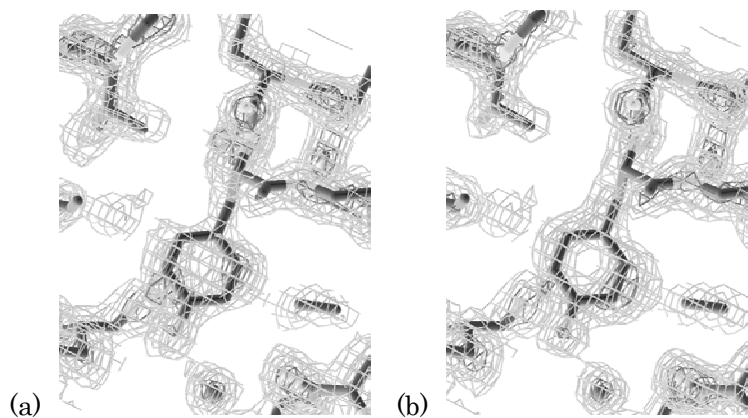


図8. 異なるデータ収集法による電子密度の違い (a) 従来法。(b) 迅速波長切り替え。後者では、チロシン側鎖の六員環の穴が開いて見えている。

6. おわりに

現在、MAD 法は放射光のタンパク質結晶構造解析で一般的な手法として利用され、新規構造解析の多くは MAD 法によって解析され解析の迅速化・ルーチン化に大きく寄与している。

異常分散効果利用による位相決定という観点から迅速に位相決定に必要なデータを集めるデータ収集法についても研究が進められている。ここでは述べなかったが、SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction)法がそのひとつである。単一波長データの f'' 項を利用するこの方法は、原理的に Bimodal な位相確率分布から逃れられず、位相改良法との組み合わせが重要であり、データの冗長度を上げて位相が決定できた事例²³⁾も報告されている。また、長波長 X線による硫黄などの比較的軽い原子の異常分散効果の利用²³⁾は今後の課題のひとつである。今後ともこれらを視野に入れて、構造解析のルーチン化・迅速化を行っていく必要があるだろう。

文献

- 1) T.Ueki, T. and M.Yamamoto: *Structure* **7**, R183-R187. (1999)
- 2) W. A. Hendrickson: *Science* **254**, 51-58 (1991).
- 3) W. A. Hendrickson and C. M. Ogata: *Methods Enzymol.* **276**, 494-523, Academic Press Inc., New York. (1997).
- 4) M. A. Walsh, G. Evans, R. Sanishvili, I. Dementieva and A. Joachimiak: *Acta Cryst.* **D55**, 1726-1732 (1999).
- 5) J. Karle: *Int. J. Quant. Chem.* **7**, 357-367 (1980).
- 6) J. M. Bijvoet: *Proc. Acad. Sci. Amst.* **B52**, 313 (1949).
- 7) Y. Okaya, R. Pepinsky: *Phys. Rev.* **103**, 1645 (1956).
- 8) W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerley and E. A. Merrit: *Proteins* **4**, 77 (1988).
- 9) W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. LeMaster: *EMBO J.* **9**, 1665 (1990)
- 10) J.O.Oles, et al. & R.B. Dunlap: *Biochemistry* **30**, 11073-11080(1991)
- 11) D.W.Rodgers: *Methods in Enzymology* **276**, 183-203, Academic Press Inc., New York. (1997)
- 12) <http://www.hamptonresearch.com/> を参照
- 13) Z. Dauter and M. Dauter: *Structure* **9**, R21-R26 (2001).
- 14) O. Sauer, A. Schmidt, C. Kratky: *J. Appl. Cryst.* **30**, 476-486 (1997).
- 15) S.Sasaki: *KEK Report* **88-14**, 1-136 (1989).
- 16) G. Evans and R. F. Pettifer: *J. Appl. Cryst.* **34**, 82-86 (2001).
- 17) T. Terwilliger and J. Brendzen: *Acta Cryst. D* **55**, 849-861 (1999).
- 18) E. de La Fortelle, G. Bricogne: *Methods Enzymol.* **276**, 472-494 (1997).
- 19) C. Nave: *Rad. Phys. Chem.* **45**, 483-490 (1995).
- 20) M. Yamamoto, T. Kumasaka, T. Fujisawa and T. Ueki: *J. Synchr. Rad.* **5**, 414-416 (1998).
- 21) T. Kumasaka, M. Yamamoto, E. Yamashita, H. Moriyama and T. Ueki: *Structure* **10**, 1205-1210 (2002).
- 22) J. K. Park, K. Shimono, N. Ochiai, K. Shigeru, M. Kurita, Y. Ohta, K. Tanaka, H. Matsuda, M. Kawamukai: *J. Bacteriol.* **181**, 6642-6649 (1999).
- 23) M. S. Weiss, T. Sicker, R. Hilgenfeld: *Structure* **9**, 771-777 (2001).