カルモデュリンについて

—機能発現の分子メカニズム—

カルモデュリンは、真核細胞に広く分布する Ca^{2+} 結合蛋白質である。1分子中に4分子の Ca^{2+} が結合すると構造変化を生じる。この構造変化によって、さまざまな酵素活性を調節する。 Ca^{2+} が結合したカルモデュリンは、不活性な酵素に結合して活性化を引き起こす。 Ca^{2+} が離れるとカルモデュリンは酵素から解離し、もとの不活性状態にもどる。近頃、コウジカビからもカルモデュリンの遺伝子がクローニングされ、その機能も他のカルモデュリンと同様であることがわかった。本稿ではカルモデュリンの機能発現のメカニズムについて概説していただいた。

岡野浩行・大矢 禎一

1. はじめに

カルモデュリン (CaM) は細胞質に存在する主要な Ca^{2+} 結合蛋白質であり、細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を認識して、 Ca^{2+} の情報をターゲットとなる蛋白質に伝達するという働きを持っている。ターゲットとなる蛋白質の種類は少なくとも 30 は知られており、その生理的作用も多岐にわたっている。特に、免疫系におけるT細胞の活性化の調節や神経系における長期記憶の増強といった現代生物学の主要テーマへの関与が明らかになるにつれて、最近ますますその機能発現のメカニズムに関心が寄せられるようになってきた。カルモデュリンはこれまでに調べられたすべての真核生物に存在することが知られている。最近になってコウジカビからもカルモデュリンの遺伝子がクローニングされ、機能的にも他のカルモデュリンと同様の機能を持つことが明らかになった¹⁾。真核生物におけるその機能の普遍性を示す証拠がまた一つ付け加えられただけでなく、コウジカビは日本の伝統的な食生活を支える微生物であることから、実用的な見地からもカルモデュリンの機能に興味を持たれ始めた。カルモデュリンの細胞内における必須機能の解析については、パン酵母を用いた分子遺伝学的研究が特に進んでいる²⁻⁴⁾。これらの研究については他に総説があるのでそちらを参照されたい^{5,6)}。本稿ではこれまでの生化学的、物理化学的研究結果をもとにして、なるべく平易にカルモデュリンの機能発現のメカニズムについて概説することにする。

2. カルモデュリンの構造

カルモデュリンは非常に保存された蛋白質であり、特に、脊椎動物間ではアミノ酸の一次配列は完全に同一である。脊椎動物のカルモデュリンは 148 個のアミノ酸からなる分子量約 16.7 kDa の酸性蛋白質であり、その Ca^{2+} 結合型の立体構造は X線結晶構造解析により決定されている^{7,8)}。また、脊椎動物のカルモデュリンと一次配列上 3 アミノ酸残基だけ異なるショウジョウバエの Ca^{2+} 結合型カルモデュリンの立体構造も決定されており、両者の X線結晶構造はほぼ同じである⁹⁾。

Ca^{2+} 結合型のカルモデュリンは、N末端側とC末端側の球状ドメインが一本の α ヘリックスによってつながった亜鈴型の構造をしている(第1図)。それぞれの球状ドメインには二つの Ca^{2+} 結合ドメインが含まれ、それぞれの Ca^{2+} 結合ドメインは EF ハンドと呼ばれる α ヘリックススループ— α ヘリックスという構造をとっている。カルモデュリンの構造全体を二次構造の観点から見たときには、まず7本の α ヘリックスを持つことが特徴として挙げられる。二番目の Ca^{2+} 結合ドメインのC末端側の α ヘリックス、二つの球状ドメインを結ぶ中央の α ヘリックス、さらには三番目の Ca^{2+} 結合ドメインのN末端側の α ヘリックスは連続して一本の長い α ヘリックスになっている。X線結晶構造解析で観察される中央の α ヘリックスは、溶液中ではヘリックスの真ん中の部分が非常に柔軟性に富んでいるということが報告されており^{10,11)}、この部分は溶液中ではほどけてランダムコ

Calmodulin : a Ca^{2+} -signal Transducer

Hiroyuki OKANO and Yoshikazu OHYA (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo)

第1図 Ca^{2+} 結合型カルモデュリンのX線結晶構造
黒丸は Ca^{2+} を表わす。

イル状のリンカーになっていると考えられている。

ではこのような構造上の特徴は Ca^{2+} シグナルのターゲット蛋白質への伝達という機能とどのように結び付けられるのであろうか。以下では、カルモデュリンが Ca^{2+} のシグナルを受け取ってからターゲット蛋白質に特異的に結合するまでの過程を、(1) Ca^{2+} 結合ドメインへの Ca^{2+} の結合、(2) Ca^{2+} の結合によるカルモデュリンの構造の変化、(3) カルモデュリンとターゲット蛋白質の結合、の三つの素過程に分けて紹介する。

3. Ca^{2+} 結合ドメインへの Ca^{2+} の結合

カルモデュリンは、トロポニンC、バルブアルブミン、オンコモデュリン等の Ca^{2+} 結合蛋白質と同じくEFハンドと呼ばれる α -ヘリックス-ループ- α -ヘリックスから形成される Ca^{2+} 結合ドメインで Ca^{2+} と結合している¹²⁾。 Ca^{2+} と直接的あるいは間接的に結合するのは12残基からなるループ部分の1, 3, 5, 7, 9, 12番の位置の残基である。ループの1番の残基は常にアスパラギン酸、3, 5番は主にアスパラギン酸もしくはアスパラギンで占められており、その側鎖の酸素原子が Ca^{2+} と配位している。7番の残基は様々なアミノ酸残基で占められ、主鎖のカルボニル基の酸素原子が Ca^{2+} との配位に関与している。9番の残基の種類はいくつかあるが、それらは水分子を介して Ca^{2+} と相互作用している。12番は常にグルタミン酸で、二つのカルボキシル基の酸素原子が Ca^{2+} と配位している。3, 5, 7, 12番の5つの酸素原子はほぼ同一平面上に存在して五角形の配置をとっており、その五角形の中心に Ca^{2+} が位置している(第2図)。五角形の上下には1, 9番の酸素原子

第2図 Ca^{2+} と配位するEFハンドのループ部分の酸素原子の配置

が Ca^{2+} を挟むように配置しており、これらの酸素原子を結ぶベクトルは五角形に垂直になっている。また、 Ca^{2+} と酸素原子の平均距離は約 $2.4 \text{ \AA}$ ほどである⁷⁻⁹⁾。

EFハンドを持つ蛋白質は Ca^{2+} 以外のカチオンとも結合することが知られている。大腸菌のD-ガラクトース受容体は、EFハンドに非常によく似た Ca^{2+} 結合部位を一つ持っている¹³⁾。このEFハンドのループ部分の9番のグルタミンをそれより小さいアスパラギン、またはアスパラギン酸に変えてやると、大きなイオン(例えば、 Ba^{2+})との結合の強さは野生型に比べて大きくなった¹⁴⁾。これは側鎖が小さくなったことで立体障害の効果が減少し、ループの径の広がりや妨げる力が減少したためだと説明されている。このように結合するイオンの選択性は、部分的にはループ部分のキレート残基の側鎖の大きさに起因すると考えられている。

カルモデュリンもまた Ca^{2+} 以外のカチオンと結合するが、その親和性はカチオンの種類によって様々である。 Mg^{2+} は Ca^{2+} の 10^{-3} ~ 10^{-4} 倍の強さでしか結合しない¹²⁾。 Mg^{2+} が生理的条件下で比較的高濃度(1 mM)に存在することを考えれば、カルモデュリンの Mg^{2+} に対する親和性の低さはカルモデュリンが Ca^{2+} シグナルの伝達という機能を果たすために必要であろう。一方、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} は Ca^{2+} とほぼ同じ強さで結合する¹²⁾。しかしながら、これらの重金属の生体内における濃度は非常に低いため、これらの重金属のカルモデュリンへの結合が何らかの生理的な役割を担っているとは考えにくい。むしろ Cd^{2+} 、 Pb^{2+} の結合はこれらの重金属の生体内での毒性の関与で議論されるべきであろう。

EFハンドの Ca^{2+} に対する親和性は、EFハンド内の配列上の微妙な差異、付近の立体構造から大きな影響を受ける。親和性の違いはカルモデュリンの4つの Ca^{2+} 結合ドメイン間でも見られ、C末端側の二つの Ca^{2+} 結合ドメインはN末端側の二つの Ca^{2+} 結合ドメインより

も Ca^{2+} に対する親和性が高いことが知られている¹⁵⁾。先に述べた大腸菌の Ca^{2+} 結合ガラクトース受容体についてそのループ部分の9番のグルタミンをグルタミン酸またはアスパラギン酸に変えると、二価カチオンへの親和性はほとんどなくなり、三価カチオンへの親和性は野生型より大きくなった。これは負電荷の増加により酸素原子間の斥力が増大し、それを打ち消すためにより大きな陽電荷が必要になったためと考えられる。このようにリガンドの負電荷と Ca^{2+} に対する親和性の関係が示唆されたが、負電荷の効果はその数だけではなく位置によっても大きく異なっている。カルモデュリンの3番目のEFハンドの合成ペプチドを用いた研究では、3つのリガンドが酸性アミノ酸である場合、ループの1番と9番の位置のリガンドがともに酸性アミノ酸である場合よりも、5番と12番の位置のリガンドがともに酸性アミノ酸である場合のほうが Ca^{2+} に対する親和性が高い¹⁶⁾。しかしこの研究も含めて、一次構造から得られるパラメータを用いたモデルでEFハンドの Ca^{2+} に対する親和性を統一的に説明しようという試みは、カルモデュリンの4つのEFハンドについても今までのところうまくいっていない。その主な理由としては、(1)カルモデュリンへの Ca^{2+} の結合が協同的であること¹⁵⁾、(2)ターゲットの存在下では Ca^{2+} の親和性が増すこと¹⁷⁾、の2点が挙げられる。カルモデュリンでは Ca^{2+} の結合の協同性はそれぞれの球状ドメインの二つのEFハンドの間で見られるが、この協同性は一つ目の Ca^{2+} の結合が隣接するEFハンドの構造変化を引き起こした結果、二つ目の Ca^{2+} の親和性を増大させるために生じると考えられている。ターゲットの存在下で Ca^{2+} の親和性が増すことも、ターゲットとの結合によりEFハンドの構造が変化するためであろう。これら(1)、(2)の2点については次節以降で詳しく述べる。以上の理由から Ca^{2+} の親和性についての厳密な議論をするためには、その立体構造の影響についても詳細に検討しなければならないことがわかる。

4. Ca^{2+} の結合によるカルモデュリンの構造の変化

Ca^{2+} の結合によってカルモデュリンの構造が変化することは Ca^{2+} の結合の協同性やSAXS, NMRを用いた研究^{18,19)}から大まかにはわかっていたが、実際にどのような構造変化が起こっているかに関しては、間接的な情報しか得られていなかった。ところが最近 Ca^{2+} 非結合型カルモデュリンの立体構造がNMRによって決定され²⁰⁻²²⁾、 Ca^{2+} の結合によるカルモデュリンの構造の変化について興味深い多くの知見が明らかになってき

第3図 N末端側ドメインの α ヘリックスの3次元的配置
(a) Ca^{2+} 非結合型, (b) Ca^{2+} 結合型

た。

Ca^{2+} 非結合型カルモデュリンの球状ドメインの二次構造は Ca^{2+} 結合型カルモデュリンのそれとほとんど同じで(第3図)、それぞれの球状ドメインは二つのEFハンドからなっている。EFハンドのループ部分は構造に大きな揺らぎが見られ、この領域が Ca^{2+} 結合型よりも不安定になっていることを示している。 Ca^{2+} 非結合型では二つの球状ドメインをつないでいる中央の部分は非常に柔軟性に富んでいる。この点は Ca^{2+} 結合型のX線結晶構造⁷⁻⁹⁾とは異なっているが、溶液中では Ca^{2+} 結合型のX線結晶構造で見られる中央の α ヘリックスは真ん中部分でほどけているため^{10,11)}、この領域の構造は Ca^{2+} 結合型、非結合型ともに柔軟性に富んだリンカーになっていると解釈される。

Ca^{2+} の結合によって最も大きく変化するのはヘリックスの三次元的な位置関係である(第3図)。 Ca^{2+} 非結合型ではN末端側、C末端側ドメインそれぞれにおいて隣接する二つのヘリックス(A/B, B/C, C/D, A/DおよびE/F, F/G, G/H, E/H)の間の角度は約130度であり、ねじれた4本の逆平行の α ヘリックスからなる筒状の構造をとっている。 Ca^{2+} が結合すると、各EFハンドの二つのヘリックス(A/B, C/DおよびE/F, G/H)の間の角度は約40~50度減少し、ほぼ直角に近い配置をとる。もう一方の隣接する二つのヘリックス(B/C, A/DおよびF/G, E/H)の間の角度はほとんど変わらない。したがって、N末端側ではヘリックスの組A/Dに対してB/Cが、C末端側ではE/Hに対してF/Gが動くことになり、各末端ドメインの筒状の「閉じた」構造は「開いた」構造へと変化する。リカバリン、トロポニンC、 α スペクトリンでも Ca^{2+} の結合に伴う閉じた構造から開いた構造への変化が示されている²³⁻²⁵⁾。一方、 Ca^{2+} に対して緩衝作用を持つカルビンディン

D_{9k} では Ca^{2+} によるこのような構造変化は生じない²⁶⁾。したがって、 Ca^{2+} の結合による三次元的な構造変換は Ca^{2+} シグナルの伝達の機能を担う EF ハンド蛋白質に共通のものであることが推測される。

Ca^{2+} の結合による構造変化の原動力は何であろうか。 Ca^{2+} 非結合型の EF ハンドのループ部分はアスパラギン酸、グルタミン酸の負電荷どうしによる斥力のために不安定で揺らぎの大きい構造をとっている。ここに Ca^{2+} が近づくと負電荷が中和されて斥力が消失する。その結果ループ部分は Ca^{2+} をその中心に置く安定な五角双錐を形成し、このループ部分の構造変化がその両隣に位置するヘリックスの相対的な配置を変えるのである。

先に述べた Ca^{2+} の結合の協同性については次のように説明できる。 Ca^{2+} の結合によって、N末端側ではヘリックスの組 A/D に対して B/C が、C末端側では E/H に対して F/G が約 40~50 度回転する。A と B、C と D の間の相対的な角度は約 40~50 度変化するが、A と D、B と C の間の相対的な角度は変化しない。一方の EF ハンドへの Ca^{2+} の結合によるヘリックスの回転は隣接するヘリックスの回転も引き起こし、その結果まだ Ca^{2+} の結合していないループが五角双錐に近い構造をとるようになり、 Ca^{2+} に対する親和性が増すのであろう。

Ca^{2+} の結合による「閉じた」構造から「開いた」構造への変化によって Ca^{2+} 非結合型では筒状構造の中に埋もれていた疎水性残基に富む領域が表面に露出する。この疎水性領域は次節で述べるようにターゲットとの結合に重要な役割を果たすのであろうと想像されている。自由エネルギーの立場から考えると、 Ca^{2+} の結合によってループ部分の安定性は増大するが、一方で疎水性領域の露出は蛋白質の安定性が減少する方向に働く。 Ca^{2+} の結合によって疎水性領域が露出することから考える

と、前者の寄与は、後者の寄与よりも大きいのであろう。前節で述べたように Ca^{2+} の親和性はターゲットの存在によって増大する。これはターゲットの結合によって、疎水性領域の露出による自由エネルギーの増加を打ち消すためであろうと説明することができる。また、変異の導入によって Ca^{2+} と結合しなくなった EF ハンドがターゲットの存在下では Ca^{2+} への親和性を回復するという例も報告されているが、これも疎水性領域が露出しやすくなった結果、EF ハンドのループ部分が五角双錐の構造をとりやすくなったためであると想像される。

5. カルモデュリンとターゲットとの結合

カルモデュリンの最も特徴的な性質は非常に多くの蛋白質と結合することである。ターゲットとなる蛋白質の CaM 結合部位は 14-26 残基からなる短い領域で、カルモデュリンとナノMオーダーの高い親和性を持つ。多くの CaM 結合部位は二次構造の予測から両親媒性の α ヘリックスを形成すると考えられているが、これらの領域に配列上の高い相同性は見られない。ではカルモデュリンはどうやって様々なターゲットを認識するのだろうか。

カルモデュリンとターゲットの CaM 結合部位を含むペプチドとの複合体の三次元構造は、骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCK) のペプチドとの複合体については NMR によって²⁷⁾、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK)²⁸⁾、および CaM キナーゼ II (CaMK II)²⁹⁾ のそれぞれペプチドとの複合体については X線結晶構造解析によって、それぞれ決定されている。これらはどれも次のような似たような構造をとっている (第4図)。まず Ca^{2+} 非結合型カルモデュリンの構造から予想されるように中央の α ヘリックスは真ん中の部分で折れ曲がっている。その結果球状ドメインは互いに接近し、球状

第4図 Ca^{2+} 結合型カルモデュリンと skMLCK ペプチドの複合体の3次元構造

ドメインの疎水性残基に富んだ二つの面を内側にして包み込むような構造を形成している。ターゲットのペプチドは α ヘリックスとなって、この二つの疎水性面に囲まれるような形で結合している。ペプチドの疎水性残基とカルモデュリンの疎水性残基の間には多くの接触が見られるが、これはカルモデュリンとターゲットとの結合に疎水的相互作用が重要であることを意味している。特に、ペプチドのN末端側、C末端側に一つずつ存在する特定の疎水性残基はそれぞれカルモデュリンのC末端側、N末端側ドメインの多くの疎水性残基と接触しており、疎水的相互作用はペプチドに対するカルモデュリンの結合の方向性も決定していることがわかる。

この結合の方向性を決定している疎水性残基は skMLCK や smMLCK では 12 残基離れているが、CaMK II では 8 残基しか離れていず、これはヘリックスの 1 ターン分短いことになる。それにも関わらずカルモデュリンとの結合の様式が両者でよく似ているのは、中央のリンカーが微妙に折れ曲がる角度を変えて、球状ドメインのターゲットペプチドに対する位置を調節するためであろう。また、この事実からカルモデュリンのターゲットとの結合の特異性に関してある程度の柔軟性が保証されていることが理解できる。D-アミノ酸だけでできた smMLCK のペプチドにカルモデュリンが結合できるという報告も最近あり³⁰⁾、これもカルモデュリンの疎水性領域表面の柔軟性を表わしている。

smMLCK および CaMK II のペプチドとの複合体の X 線結晶構造では疎水的相互作用以外にペプチドの塩基性残基とカルモデュリンのグルタミン酸の間の静電的相互作用も見られる。現在のところターゲットとの結合における静電的相互作用の重要性については次のようなモデルが考えられている³¹⁾。カルモデュリンはその表面でターゲットの CaM 結合部位とまず疎水の相互作用で結合するが、この時点ではまだ CaM 結合部位は α ヘリックスを形成しておらず、最終的なコンパクトな構造をとってはいないのであろう。次にこのカルモデュリンとの結合によってターゲットの CaM 結合部位が α ヘリックスを形成し、その結果として疎水的相互作用以外に静電的相互作用による残基間の特異的な結合が生じ、最終的なコンパクトな構造ができ上がるものと考えられる。

6. お わ り に

Ca²⁺ 結合型、非結合型、およびターゲットペプチドとの複合体の立体構造が決定され、カルモデュリンの機能発現のメカニズムについての理解はごく最近急速に深まってきた。本総説では、そのメカニズムについて最新の、かつ一般的な考え方を紹介した。詳しい欧文の論文

については個々の参考文献を参照されたい。カルモデュリンが Ca²⁺ シグナルを受け取ってからターゲット蛋白質に特異的に結合するまでの過程のうちで、Ca²⁺ への親和性の問題についてはまだまだ解明されたとは言い難く、またターゲットとの結合についてもターゲット全体との複合体の三次元構造は決定されていない。いくつかのターゲットについてはカルモデュリンとの結合が Ca²⁺ 非依存的であるとも報告されており、その結合の分子メカニズムについても興味を持たれるところである。

＜東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻＞

文 献

- 1) K. YASUI, K. KITAMOTO, K. GOMI, C. KUMAGAI, Y. OHYA, G. TAMURA : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1444-1449 (1995)
- 2) G. SUN, A. HIRATA, Y. OHYA, Y. ANRAKU : *J. Cell Biol.*, 119, 1625-1639 (1992)
- 3) Y. OHYA, D. BOTSTEIN : *Genetics*, 138, 1041-1054 (1994)
- 4) Y. OHYA, D. BOTSTEIN : *Science*, 263, 963-966 (1994)
- 5) Y. OHYA, Y. ANRAKU : *Cell Calcium*, 13, 445-455 (1992)
- 6) 大矢慎一：蛋白質 核酸 酵素, 1994 年 3 月号増刊 Vol. 39, 355-364 (1994)
- 7) Y. S. BABU, C. E. BUGG, W. J. COOK : *J. Mol. Biol.*, 204, 191-204 (1988)
- 8) R. CHATTOPADHYAYA, W. E. MEADOR, A. R. MEANS, F. A. QUIOCHO : *J. Mol. Biol.*, 228, 1177-1192 (1992)
- 9) D. A. TAYLOR, J. S. SACK, J. F. MAUNE, K. BECKINGHAM, F. A. QUIOCHO : *J. Biol. Chem.*, 266, 21375-21380 (1991)
- 10) M. IKURA, S. SPERA, G. BARBATO, L. E. KAY, M. KRINKS, A. BAX : *Biochemistry*, 30, 9216-9228 (1991)
- 11) G. BARBATO, M. IKURA, L. E. KAY, R. W. PASTOR, A. BAX : *Biochemistry*, 31, 5269-5278 (1992)
- 12) P. COHEN, C. B. KLEE : in *Calmodulin* Vol. 5, Molecular Aspects of Cellular Regulation, Elsevier, Amsterdam (1988)
- 13) N. K. VYAS, M. N. VYAS, F. A. QUIOCHO : *Nature*, 327, 635-638 (1987)
- 14) J. J. FALKE, E. E. SNYDER, K. C. THATCHER, C. S. VOERTLER : *Biochemistry*, 30, 8690-8697 (1991)
- 15) S. LINSE, A. HELMERSSON, S. FORSEN : *J. Biol. Chem.*, 266, 8050-8054 (1991)
- 16) R. M. PROCYSHYN, R. E. REID : *J. Biol. Chem.*, 269, 1641-1647 (1994)
- 17) J. HAIECH, M. C. KILHOFFER, T. J. LUKAS,

- T. A. CRAIG, D. M. ROBERTS, D. M. WATTERSON : *J. Biol. Chem.*, 266, 3427-3431 (1991)
- 18) D. B. HEIDORN, J. TREWHELLA : *Biochemistry*, 27, 909-915 (1988)
 - 19) K. TOROK, A. N. LANE, S. R. MARTIN, J. M. JANOT, P. M. BAYLEY : *Biochemistry*, 31, 3452-3462 (1992)
 - 20) M. ZHANG, T. TANAKA, M. IKURA : *Nature Struct. Biol.*, 2, 758-767 (1995)
 - 21) H. KUBONIWA, N. TJANDRA, S. GRZESIEK, H. REN, C. B. KLEE, A. BAX : *Nature Strucs. Biol.*, 2, 768-776 (1995)
 - 22) B. E. FINN, J. EVENÅS, T. DRACKENBERG, J. P. WALTHO, E. THULIN, S. FORSEN : *Nature Struct. Biol.*, 2, 777-783 (1995)
 - 23) T. TANAKA, J. B. AMES, T. S. HARVEY, L. STRYER, M. IKURA : *Nature*, 376, 444-447 (1995)
 - 24) S. M. GAGNE, S. TSUDA, M. X. LI, L. B. SMILLIE, B. D. SYKES : *Nature Struct. Biol.*, 2, 784-789 (1995)
 - 25) G. TRAVE, P. J. LACOMBE, M. PFUHL, M. SARASTE, A. PASTORE : *EMBO J.*, 14, 4922-4931 (1995)
 - 26) N. J. SKELTON, J. KORDEL, M. AKKE, S. FORSEN, W. J. CHAZIN : *Nature Struct. Biol.*, 1, 239-245 (1994)
 - 27) M. IKURA, G. M. CLORE, A. M. GRONENBORN, G. ZHU, C. B. KLEE, A. BAX : *Science*, 256, 632-638 (1992)
 - 28) W. E. MEADOR, A. R. MEANS, F. A. QUIOCHO : *Science*, 262, 1251-1255 (1992)
 - 29) W. E. MEADOR, A. R. MEANS, F. A. QUIOCHO : *Science*, 262, 1718-1721 (1993)
 - 30) P. J. FISHER, F. G. PRENDERGAST, M. R. EHRHARDT, J. L. URBAUER, A. J. WAND, S. S. SEDAROUS, D. J. MCCORMICK, P. J. BUCKLEY : *Nature*, 368, 651-653 (1994)
 - 31) M. R. EHRHARDT, J. L. URBAUER, A. J. WAND : *Biochemistry*, 34, 2731-2738 (1995)
-