放射光利用によるタンパク質の結晶構造解析 — 多波長異常分散法の利用 —

高エネルギー物理学研究所放射光実験施設 中川敦史

Atsushi NAKAGAWA: Protein Crystallography using Synchrotron Radiation

— An Application of Multiwavelength Anomalous Diffraction Method —

Synchrotron radiation (SR) is an extremely useful X-ray source for protein crystallography. It is high brilliance, high intensity and small divergence white X-ray source, which enables us to collect high resolution diffraction data of biological macromolecular crystals with large cell dimensions. Furthermore, wavelength tunability of SR is essential for the phase determination by multiwavelength anomalous diffraction (MAD) method, which has a possibility of the direct phase determination of metal proteins, selenomethionyl proteins and proteins with single isomorphous derivative of poor isomorphism.

MAD method is applied for the structure determination of cytochrome *c*-553 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F strain.

1. 放射光とタンパク質結晶学

タンパク質などの生体高分子の機能を原子レベルで理解するためにはその3次元構造を知る必要がある。そのための手法としては、現時点では分子量の制限や精度の点などにおいてX線回折法がもっとも有効であることは間違いない。しかし、いくつかの要因によりタンパク質の結晶構造解析は困難であると言われている。

第一に、構造解析に適した良好な結晶を作製しなければならないという点である。生体高分子結晶は、通常は炭素や窒素、酸素といった軽原子のみからなり、しかも溶媒含量が多く、原子のゆらぎが大きいため、有機低分子化合物や無機化合物の結晶に比べて原理的に回折強度が弱く、結晶自身もあまり大きく成長しない場合が多い。更に、一般的には温度上昇やラジカルの発生などによりX線照射により損傷を受けやすいため、X線照射に対して安定でしかも高分解能まで十分な回折強度が得られる結晶を作製することは、(このような結晶が得られることが構造解析を成功させる第一条件であるにもかかわらず)しばしば非常に困難な問

題となる。

もうひとつは、結晶学という位相問題である。直接法の進歩により低分子化合物では全自動解析も進んでいるが、原子数が多く、しかも、高分解能のデータが得られにくい生体高分子の場合には、多くの研究者の努力にもかかわらずまだ直接法をルーチン的に適用できる段階には到っていない。構造の類似したものが既に解析されている場合には、分子置換法により全自動で解析を行うようなシステムも構築されているが、新規の構造の場合には多くの試行錯誤を繰り返さなければならない。新規な構造が予想されるタンパク質の結晶構造解析では、通常、重原子同型置換法が位相決定に利用される。この方法は非常に有効であるが、良好な重原子同型置換体が得られないために構造解析が進まないことがしばしばある。

この他にも構造解析がルーチンワークにならないいくつかの要因があるが、上記の2点はトライアルアンドエラーを繰り返さないと解決されない場合が多いという意味で最も困難な要因であると言えよう。

シンクロトロン放射光 (Synchrotron Radiation:

SR)は、回転対陰極式X線発生装置などの他のX線源と比較して、いくつかの特長を持った光源である。このうちの高輝度性と低発散角により、これまで回折強度収集には適さないとされてきた 300 μm 程度以下の結晶でも十分な回折強度が得られるようになり、100 μm 以下の大きさの結晶しか得られなくても構造解析を進められるようになった。また、同じ結晶でも、より高分解能のデータが得られるため、これまで構造解析に適した結晶を得るために要し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。このような理由により、世界中の放射光施設においてタンパク質結晶学用のビームラインが数多く建設され、多くのタンパク質結晶学者により利用されている。これまでは構造解析に利用できる様な良好な結晶が得られるまでに長い期間を要したり、また、生化学的に興味深い分子であっても構造解析に適した結晶が得られないためにその構造を明らかにできなかったものが数多くあったが、放射光の登場は生体高分子の構造解析を質・量の2つの面で大きく進展させた。

放射光は、この他に非常に幅広い波長領域にわたった白色光源であるという特長を持っている。この白色性を利用した、ラウエ法によるタンパク質結晶の動的構造解析がこの数年非常に注目されており(これまでX線結晶構造解析では静的な構造しか見ることができないと考えられてきたのであるが、この手法を用いることによりミリ秒オーダー以下の動的な構造変化を追うことができる！)、放射光実験施設(Photon Factory: PF)の他、世界中の放射光施設で精力的に研究が進められている。一方、通常の回折強度収集にはモノクロメータを用いて単色化したX線を利用しているので、モノクロメータの回折角を変えることにより任意の波長のX線を選ぶことができる。この点が、ターゲットの特性X線を利用した通常のX線発生装置と大きく違っている。この波長選択性により異常分散効果を最大限利用することができるため、これまで重原子同型置換体の作製に費やしてき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。

2. 多波長異常分散法

原子散乱因子(f)は、一般には第1図に示すよう

第1図 鉄の吸収端近傍での異常分散項($\Delta f'$, $\Delta f''$: 文献5の値を用いている)
矢印はチトクロムc-553の構造決定に利用した波長を示す

に波長に依存しない項 f^0 と、波長に依存する、 f^0 と同じ位相角をもった項 $\Delta f'$ と、これと90°位相のずれた項 $\Delta f''$ の3つの項で表すことができる。吸収端近傍では、 $\Delta f'$ は急激に変化し、非常に小さな負の値をとり、一方、 $\Delta f''$ は吸収端より低エネルギー側ではほぼ0の値を、高エネルギー側では数エレクトロン程度の値をとり吸収端から離れるにしたがって徐々に小さな値となる。この原子散乱因子の大きさの波長依存性を利用して、いくつかの波長で回折強度データの測定を行い、その強度差から位相決定を行うのが多波長異常分散法(Multiwavelength Anomalous Diffraction Method: MAD)である。

通常の重原子同型置換法では、タンパク質の特異的な部位に重原子を結合させて得られる重原子置換体からの回折強度と、ネイティブ結晶からの回折強度との差を利用して位相決定を行うが、タンパク質自身が金属等の重原子を持っていれば、波長を変えて回折強度測定を行うことにより、その強度差から異常分散による寄与を見積ることができる。

1つの波長のX線を用いて測定した回折強度データからは、異常分散効果を考慮しても一般的な方法では得られる位相に任意性がでてしまい、正しい解は得られない。この例外としては、Teeter & Hendricksonが行ったCrambinの構造解析¹⁾や、福山恵一氏(現大阪大学)らが行ったFerredoxinの構造解

第2図 (a)重原子同型置換法(MIR)と多波長異常分散法(MAD)の概念図

いずれも、ネイティブタンパクの寄与(F_P)と同型置換体(F_{PH}) (あるいは波長を変えて測定したデータ($F_P(\lambda)$)の差からそれ以外(MIRでは f_H , MADでは F_A に相当する)の寄与を見積り、それを手がかりにしてタンパク部分の位相決定を行う

(b)多波長異常分散法でのハーカードイアグラム

これは異常分散を考慮した単一同型置換法と全く同じ様に表すことができる

析²⁾が挙げられる。これらはネイティブの異常分散効果と部分構造を利用して位相決定に成功している。

より一般的には、吸収端近傍を含むいくつかの波長でデータを測定し、それぞれが独立の誘導体からのデータとして取り扱うことにより、異常分散を考慮した多重同型置換法と全く同じ取り扱いをすることができる。

一方、Karle³⁾, Hendrickson⁴⁾らは、多波長異常分散法における異常分散効果の解析的な取り扱いを行い、分子内に1種類の異常散乱原子が存在しているとき、特定の波長(λ)における指数 h の回折強度 $^{\lambda}F(h)$ は、異常散乱原子のみからの寄与($^0F_A = ^0F_A \cdot \exp(i \cdot ^0\phi_A)$) および全原子からの寄与($^0F_T = ^0F_T \cdot \exp(i \cdot ^0\phi_T)$)を用いて、次式に展開できることを示した。

$$\begin{aligned} |^{\lambda}F(\pm)|^2 &= |^0F_T|^2 + a(\lambda) \cdot |^0F_A|^2 \\ &\quad + b(\lambda) \cdot |^0F_T| \cdot |^0F_A| \cdot \cos\Delta\phi \\ &\quad \pm c(\lambda) \cdot |^0F_T| \cdot |^0F_A| \cdot \sin\Delta\phi \end{aligned}$$

$$a(\lambda) = (f'^2 + f''^2) / f_0^2$$

$$b(\lambda) = 2 \cdot (f' / f_0)$$

$$c(\lambda) = 2 \cdot (f'' / f_0)$$

$$\Delta\phi = ^0\phi_T - ^0\phi_A$$

いずれの取り扱いを行うにせよ、異常分散の差は重原子同型置換の効果に比べて非常に小さく、通常の重原子同型置換法での重原子の寄与が、(占有率が1として)水銀や白金などで80電子くらいであるのに対し、異常分散の寄与は(原子種や波長分解能に依存するが) $\Delta f'$ がK吸収端で4電子程度、L吸収端でも10電子程度であり、 $\Delta f''$ も10電子程度の寄与しか得られない。従って、異常分散効果を積極的に利用するためには、より小さな強度差を精度良く測定する必要がある。(この他に、異常分散項は、一般的には波長分解能を上げることにより見かけの値を大きくすることが出来るので、波長分解能の高い光学系を組むことも必要である)

1985年以降、放射光の利用により任意の波長のX線が利用できるようになると、多波長異常分散法による構造解析が試みられるようになった。構造未知のタンパクの構造決定は1988年、1989年にBasic Blue-copper Protein⁶⁾ および Selenobiotinyl streptavidin⁷⁾について報告されているが、それまでもいくつかの先駆的な試みがなされており、日本でも放射光の利用としては佐藤能雅氏(現東京大学)がPFのBL14Aを使って多くの仕事を進めてきている。Streptavidinの構造解析⁷⁾などにもBL14Aで

の測定データが使われているし、それ以前にも原田繁春氏(現東京大学)らによりチトクロム c の位相決定の試み⁸⁾が報告されている。

今回解析を行ったチトクロム c -553の構造決定では、ヘムタンパクであるチトクロム c -553のヘム鉄の異常分散効果を利用して、鉄の吸収端近傍を含む4つの波長の回折強度データを用い、異常分散を考慮した重原子同型置換法と同様の方法を適用している。

3. 硫酸還元菌チトクロム c -553

チトクロム c -553は79残基のアミノ酸残基からなる1本のポリペプチド鎖と1個の c 型ヘムからなるチトクロム c の一種である。このチトクロム c -553は硫酸還元菌の代謝系において、lactate dehydrogenaseやformate dehydrogenaseから電子を受取り、最終的にヒドロゲナーゼへの電子伝達体であるチトクロム c_3 へと電子を渡す電子伝達タンパク質として知られている^{9),10)}。

本タンパク質は、分子量9,000でこれまでに知られている c 型チトクロムとしては最も分子量の小さなものであり、その構造を知ることは c 型チトクロムの電子伝達機構に有用な情報が得られることが期待され、また、これまでに立体構造が解明されたチトクロム c スーパーファミリーとの比較を行うことにより、硫酸還元菌の進化の系統樹の上での位置付けを知ることができると考えられた。

4. チトクロム c -553の構造解析

精製したチトクロム c -553は、蒸気拡散法と微量透析法を組み合わせ、硫酸アンモニウム飽和、pH8.0の条件下で正方両錘型の赤色結晶を得ることができる¹¹⁾。結晶は、大きなものでは長辺方向で1.2mm以上に成長し、分解能も1.6Å以上の高分解

能のデータが得られるのであるが、良好な重原子誘導体が得られず構造解析が難航していた。この結晶は空間群 $P4_32_12$ に属し、格子定数は、 $a=b=42.7\text{\AA}$ 、 $c=103.4\text{\AA}$ で、非対称単位中に1個の分子を含んでいる。

データ測定は、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設において、巨大分子用ワイセンベルグカメラ¹²⁾とイメージングプレート¹³⁾を用いて行った。このビームラインは偏向電磁石からの放射光を利用するビームラインで、光学系としては垂直方向の集光と高調波のカットを行うための熔融石英製のミラー、および、単色化と水平方向の集光を行うための非対称カットの3角モノクロメータを利用している¹⁴⁾(第3図)。

構造解析に用いた回折強度データは、4種類の波長を用いて測定した。吸収端近傍の波長は、鉄のフォイルを用いて波長較正を行った後、モノクロメータを動かして必要な波長選択を行った。

第1表にデータ収集の条件を示す。1.380Åを除いた残りの3つのデータは、いずれも結晶の回転軸を a 軸として1個の結晶からのデータを集めている。1.380Åのデータに関しては、回転軸を変えた5つのデータセットを平均化して利用した。

IP上に記録された2次元データは、プログラムシステムWEIS¹⁵⁾を用いて指数付けおよびプロファイルフィッティング法による回折強度計算を行い、同システムを用いてスケーリングおよびマーキングを行った。各データのスケーリングは、始め、4軸回折計で収集したネイティブデータ(Northらによる吸収補正¹⁶⁾を適用したもの)をレファレンスとして1.380Åのデータのスケーリングを行い、その他のデータに関してはこの1.380Åのデータをレファレンスとしてスケーリングを行っている。

これらのデータを用いてバターソン図を描いて

第3図 PFのビームラインBL-6Aの光学系の概念図

第1表 チトクロムc-553のデータ収集条件

Crystal number	Wavelength (Å)	Rotation axis	ϕ -range (°)	Exposure time	Irradiated power ¹⁾ (mA·min.)
1	1.380	c	103.9	54'27"	9796
2	1.380	a	118.25	63'42"	12421
3	1.380	c	57.75	18'15"	3921
4	1.380	a	129.0	34'00"	9537
5	1.380	c	60.75	21'21"	4792
6	1.743	a	220.6	18'50"	4765
7	1.040	a	200.5	13'52"	2665
8	1.746	a	198.6	20'24"	3765

¹⁾Irradiated power = (Ring Current) × (Exposure Time)

みたところ、1.743Åでは、Bijvoet差パターン図上では鉄の自己ベクトルが明瞭に現われてきたのに対して、1.743Åと1.040Åの波長間差パターン図では、よりS/N比の悪い結果しか得られなかった。これは、結晶間の吸収効果の差などによる誤差によると考えられた。波長の異なるデータ間の誤差が吸収効果などによるものであるとすれば、その影響は結晶の方位によって違ってくるはずで、それを補正するために、次のようなローカスケーリング¹⁷⁾を適用した。まず、スケーリングを行いたいデータに関して、各反射を逆空間上の極座標(ϕ, ψ)で表し、次に適当な反射数が含まれるように逆空間を(ϕ, ψ)に関していくつかのブロックに分け、参照データに基づいてスケールファクターを計算した。これにより、より精度の高い異常分散差を得ることができた(第4図)。

解析で利用した、波長間およびBijvoet差パターン図を第5図に示すが、いずれも鉄の自己ベクトルに相当する位置に明瞭なピークが得られている。

データを絶対スケールに合わせるために1.380Åのデータを用いてWilson's Plot¹⁸⁾によりスケール因子を求め、さらにこのデータを基準として他の波長のデータのスケーリングを行った。

鉄の重原子パラメータの精密化および位相決定は、それぞれの波長のデータを独立な同型置換体として取り扱い、通常の異常分散を考慮した多重同型置換法と同様の計算方法に従って行った。重

原子パラメータは、1.743Åおよび1.746Åのデータに関してはセントリック反射を用いた精密化を行い、1.380Åのデータに関しては、Bijvoet差を用いた方法で精密化¹⁾を行った。

位相計算は、Blow & CrickによるBest phaseの方法¹⁹⁾に従って行った。最終的に得られた位相は、2.2Å分解能の4995反射(これは分解能2.2Åで予想される反射の93%に相当する)について、figure of meritが0.597となった。得られた電子密度図を第6図に示す。溶媒部分に露出しているループの一部の電子密度が弱く、主鎖を追うことが難しかった他は、全体としては立体構造を決めるのに十分良好なものであった。

5. チトクロムc-553の立体構造

構造は、プログラム PROLSQ²⁰⁾を使って精密化を行った。現在、10-1.8Å分解能で、R値が19.4%の構造が得られている。

得られたチトクロムc-553の構造は、分子中心のヘムを α ヘリックスのみからなるポリペプチド鎖が取り囲んでおり、いわゆるチトクロムcフォールディングをとっている。

Dickersonの分類²¹⁾によれば、チトクロムcは、大きく3つに分類される。すなわち、アミノ酸残基数が120程度のL型と呼ばれるもの。アミノ酸残基数が105程度のM型と呼ばれるもの(ミトコンドリアのチトクロムcはこれに相当する)、そして、細菌に見られるアミノ酸残基数が80近辺のS型と呼ば

第4図 波長間差パターン図(1.743Åと1.380Åの差)

ローカスケーリングを適用することにより (a) 適用しない場合, (b) 適用した場合, 鉄の自己ベクトルに相当するピークが明瞭に現れてきた

第5図 位相計算に用いた異常分散差を示すパターン図

いずれも鉄の自己ベクトルに相当するピークがハーカー面上に明瞭に現れている

(a)

(b)

第6図 多波長異常分散法で得られた電子密度図(2.2Å分解能)

(a)スタッキングマップ(7セクション分を重ねて表示している)

(b)C末端ヘリックス付近の電子密度図(精密化後のモデルをball-and-stickで表して、重ねて表示している)

第7図 チトクロムc-553の模式図²⁹⁾

れるものである。このうち、L型およびM型チトクロムcでは一部分のインサクションが違うだけで、後の部分はほぼ同様な構造をとっているのに対し、チトクロムc-553は基本構造は似ているが、細部で独特な構造をとっている。また、同じS型に分類されている、*Pseudomonas aeruginosa*のチトクロムc-551²²⁾や*Azotobacter vinelandii*²³⁾のチトクロムc₅の構造と比較してみても、構造の違った部分がいくつか見られる²⁴⁾。

これまでに知られていたチトクロムcでは、M型では種を問わずほとんど同じ構造をとっており、またL型ともインサクションを除いては非常に良く似た構造をとっているのに対し、S型チトクロムcは種によって変化に富んだ構造を持っている²⁴⁾。これは、他の物理化学的研究の結果からも支持されており、S型チトクロムはさらに細かく分類しなければならないという Mathews の意見を支持する結果となった²⁵⁾。

チトクロムc-553は他のチトクロムcに比べて、異常に低い酸化還元電位を持つ。ヘム蛋白ではヘムの露出度と酸化還元電位の間に相関があるといわれており²⁶⁾、チトクロムc-553の場合、かなりヘムの露出度が大きいのではないかと考えられた。しかし、得られた構造を基に露出度を計算し、これまでに構造解析されたタンパク質から得られている相関図に照らし合わせてみると、チトクロムc-553はこの直線から大きくはずれる(第9

第8図 S型チトクロム*c*の構造の比較

a. チトクロム*c*-553(太線)とチトクロム*c*-551(細線)

b. チトクロム*c*-553(太線)とチトクロム*c*₅(細線)

いずれも、主鎖が合うようにグラフィックス上で重ね合わせた

図)。このことから、酸化還元電位がヘムの露出度以外に影響されることは明らかであるが、現在のところ、酸化還元電位の低さを説明できるデータは得られていない。

6. 最近の状況

チトクロム*c*-553の解析では、波長の較正は鉄のフォイルを用いて行ったが、この方法では $\Delta\epsilon$ の大きく変化する波長を選ぶことは難しく、あるい

は、サンプル固有のX線吸収微細構造による $\Delta\epsilon$ の大きな波長を選ぼうとするならば、サンプル自身の蛍光スペクトルを測定する必要がある。BL-6Aでは、横振り1枚のモノクロメータ結晶を使っているため、出射位置固定の2結晶モノクロメータに比べて波長選択が難しいが、モノクロメータを含む光学台を十分に調整することにより、ある程度の範囲であれば波長を振ってもコリメータ後のビーム強度がほとんど変わらないため十分にきれいな

第9図 ヘムタンパクにおけるヘムの露出度(○●)およびヘムポケットの非極性領域の割合(□■)と酸化還元電位 E_o' の相関を示したグラフ(文献24の値を利用した)
○, □はチトクロム c -553での値を示しているが, その他のヘムタンパクでの値に比べて著しく低い酸化還元電位を示している。

蛍光スペクトルを得ることができる。第10図は, 実際にチトクロム c -553を用いて測定した蛍光スペクトルであるが, 吸収端の選択には十分なデータが得られている。また, モノクロメータ上流のスリットを狭くすることにより, より波長分解能を上げることでもある。

一方, Smithによれば, 単一種の異常分散原子を持つ場合, 期待される最大のシグナルの大きさは, 次の式で表される²⁷⁾。

$$\sqrt{\frac{N_{ano}}{2}} \cdot \frac{|f_{\lambda_i} - f_{\lambda_j}|_{max}}{\langle |F_p| \rangle} \quad \text{異なる波長間の異常分散差}$$

$$\sqrt{\frac{N_{ano}}{2}} \cdot \frac{2f''_{max}}{\langle |F_n| \rangle} \quad \text{Bijvoet対の異常分散差}$$

ここで, $\langle |F_p| \rangle = \sqrt{\sum f_o^2}$ で, 全原子からの寄与の平均値に相当する

この値は, おおよそ, $\sqrt{3.14 \times (\text{Molecular weight})}$ で計算できる

第11図に波長1.04Åで測定したチトクロム c -553

第10図 BL-6Aで測定した, チトクロム c -553結晶からの蛍光スペクトル

第11図 1.04Å ($\Delta f'' = 1.67e$)の波長で測定したチトクロム c -553のBijvoet差パターン図
ハーカー面上に明瞭な鉄の自己ベクトルピークが得られている

のデータを用いたBijvoet差パターン図を示す。この波長での鉄の異常分散項 f'' は, 1.6電子と小さな値であるにもかかわらず, 鉄の自己ベクトルに相当する明瞭なピークが現れてきており, 上記の式から計算して, システム全体の精度としては2%以下であると考えている。

7. 異常分散法の展望

生体高分子結晶の構造解析を行う場合に重原子同型置換法は非常に有効な方法であることは間違いなく, 今後も構造解析法の主流であり続けるであろう。しかし, 今後, 迅速な構造解析が要求されるようになっていくので, 重原子誘導体の調整に要する時間と労力を必要としない多波長異常分散法は, 金属タンパク質の構造解析に日常的に利用されていくことは容易に予想される。

さらに, すでに, Hendricksonらをはじめとして

いくつかの解析例が報告されているように、遺伝子操作によりメチオニンをセレノメチオニンで置き換えて作り出したセレノメチオニルタンパク質のセレンの異常分散を用いた多波長異常分散法による構造解析²⁷⁾は、金属タンパク質以外でも利用できるため、タンパクの大量発現と合わせ、今後広く利用されていくであろう。セレノメチオニルタンパク質を利用する利点としては、分子量が大きなタンパクではメチオニンの含有量も多い場合が多いので、分子量の大きなタンパクにも適用できることがある。

また、通常の重原子同型置換法においても、同型置換と異常分散の両方の寄与が効果的に利用できるため、1個の重原子同型置換体が得られれば重原子の異常分散効果をフルに利用して位相決定を行うことができるし、同型性が悪い重原子誘導体が1種類しか得られない場合でも構造決定が可能となるため、構造解析に必要な労力と時間を大幅に減らすことができる。

異常分散を用いた位相決定の、適用可能な分子量の制限はデータの精度に依存しており、高精度なデータを測定できれば、より良質の電子密度が得られ、より分子量の大きなタンパク質の解析も可能となる。

先の式に基づく見積りによれば、非対称単位中に1個のタンパク質分子が含まれておりその中にK吸収端を持つ金属(Fe, Ni, Cu, Zn, Se等)が含まれているとすると、データの精度が5%の場合には4,000程度の分子量のタンパク質しか異常分散効果が観測できないのに対して、精度が2%になると分子量20,000くらいまでが適用範囲に入ってくる。さらに、データの精度が1%程度になると分子量90,000程度の大きさまで適用できるはずである。

より精度の高いデータ測定システムを構築することは、得られる結果の質を上げて行くのみならず、構造解析の分野を広げていくことにつながっていくため、今後、さらに高精度なデータ測定ができるシステムを開発していく必要があると考えられる。

謝 辞

チトクロムc-553の結晶構造解析は、姫路工業大学・安岡則武教授、樋口芳樹博士、大阪大学・勝部幸輝教授、静岡大学・八木達彦先生との共同研

究であり、諸先生方に深く感謝致します、また本研究を進めるに当たり、数々のご助言・ご指導を頂きました、大阪大学名誉教授・千原秀昭先生に深く感謝致します。

放射光・巨大分子用ワイセンベルグカメラ・イメージングプレートを用いたデータ収集システムは、坂部知平教授(現・筑波大学)を始め、坂部貴和子博士(名古屋大学)、東常行博士(現・理学電機)、渡邊信久博士(高エネ研)、神谷信夫博士(現・理研)ら多くの方々のご努力により、現在のようなシステムが構築されていることを記し、深く感謝致します。

文 献

- 1) M. Teeter and W. A. Hendrickson: *Nature* **290**, 107-113 (1981).
- 2) K. Fukuyama, Y. Nagahara, T. Tsukihara, Y. Katsube, T. Hase and H. Matsubara: *J. Mol. Biol.* **199**, 183-193 (1988).
- 3) J. Karle: *Int. J. Quantum Chem.* **7**, 357-367 (1980).
- 4) W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerly and E. A. Merritt: *Proteins* **4**, 77-88 (1988).
- 5) S. Sasaki: *KEK Report* **88-14**, 1-136 (1989).
- 6) J. M. Guss, E. A. merriitt, R. P. Phizackerley, B. Hedman, M. Murata, K. O. Hodgson and H. C. Freeman: *Science* **241**, 806-811 (1988).
- 7) W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt and R. P. Phizackerley: *Proc. Natl. Acad. Sci* **86**, 2190-2194 (1989).
- 8) S. Harada, M. Yasui, K. Murakawa, N. Kasai and Y. Satow: *J. Appl. Crystallogr.* **19**, 448-452 (1986).
- 9) T. Yagi: *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 96-105 (1979).
- 10) M. Ogata, K. Arihara and T. Yagi: *Biochem.* **89**, 1423-1431 (1981).
- 11) A. Nakagawa, E. Nagashima, Y. Higuchi, M. Kusunoki, Y. Matsuura, N. Yasuoka, Y. Katsube, H. Chihara and T. Yagi: *J. Biochem.* **99**, 605-606 (1986).
- 12) N. Sakabe: *Nucl. Inst. Meth.* **A303**, 448-463 (1991).

- 13) J. Miyahara, K. Takahashi, Y. Amemiya, N. Kamiya and Y. Satow: Nucl. Instrum. Meth. **A246**, 572-578 (1986).
- 14) Y. Satow, A. Mikuni, N. Kamiya and M. Ando: Rev. Sci. Instrum. **60**(7), 2394-2397 (1989).
- 15) T. Higashi, J. Appl. Cryst. **22**, 9-18 (1989).
- 16) A. C. T. North, D. C. Phillips and F. S. Mathews: Acta Crystallogr. **A24**, 351-359 (1968).
- 17) B. W. Matthews and E. W. Czerwinski: Acta Crystallogr. **A31**, 480-487 (1975).
- 18) A. J. C. Wilson: Acta Crystallogr. **2**, 318-321 (1949).
- 19) D. Blow and F. H. C. Crick: Acta Crystallogr. **12**, 794-802 (1959).
- 20) W. A. Hendrickson and J. H. Konnert: *Biomolecular Structure, Function, Conformation and Evolution vol.1*, pp.43-57, Pergamon press (1980).
- 21) R. E. Dickerson: *The Evolution of Protein Structure and Function*, pp.173-202, Academic Press (1980).
- 22) Y. Matsuura, T. Takano and R. E. Dickerson: J. Mol. Biol. **156**, 389-410 (1982).
- 23) D. C. Carter, K. A. Melis, S. E. O'Donnell, B. K. Burgess, W. F. Furey Jr., B. C. Wang and C. D. Stout: J. Mol. Biol. **184**, 279-295 (1985).
- 24) A. Nakagawa, Y. Higuchi, N. Yasuoka, Y. Katsube and T. Yagi: J. Biochem. **108**, 701-703 (1990).
- 25) F. S. Mathews: Prog. Biophys. Molec. Biol. **45**, 1-56 (1985).
- 26) E. Sellwagen: Nature, **275**, 73-74 (1978).
- 27) J. L. Smith: Current Biology **1**, 1002-1011 (1991).
- 28) W. Yang, W. A. Hendrickson, R. J. Crouch, Y. Satow: Science **249**, 1398-1405 (1990).
- 29) P. J. Kraulis: J. Appl. Crystallogr. **24**, 946-950 (1991).