タンパク質結晶構造解析入門—ブラックボックスの中身— (1) 回折実験法の裏側をのぞいてみよう

高輝度ビームラインにおける回折実験の実際

Paul Scherrer Institut / Swiss Light Source 富崎孝司

Takashi TOMIZAKI: Data Acquisition on Highly Brilliant Beamlines

The ultimate goal of diffraction experiments is to collect complete datasets as rapid as possible with good statistics. It is of utmost important that we should make the priority and objective of experiments clear to complete necessary data acquisition in a fixed, short beamtime. Needless to say, we should select best beamlines for our objective in order to minimise time loss and to maximise the efficiency of the beamlines. Strategies of data acquisition on beamline X06SA at the Swiss Light Source is discussed.

1. はじめに

理想的な回折実験は、できるだけ短い時間で精度の良いデータセットを収集することである。このためには、適切な道具の選択とその最適な使用方法、目的を明確にした事前の実験計画が最も重要である。本稿で述べる実験手法の対象サンプルとしては、工夫すべき点の多い先駆的なプロジェクトは考慮していない。データ収集の自動化、迅速化を推し進めるべきプロジェクトである、2 Å程度の高い分解能と平均的なX線照射による損傷が予想されるプロジェクトを念頭に置き、実験室系の実験装置と比べて1000倍近い輝度をもつビームラインを効率良く使ううえでの注意点を述べたい。

2. タンパク質結晶構造解析用ビームラインの位置付け

タンパク質の立体構造解析において、迅速に構造解析を行うためには、高輝度のビームラインを使うことはもはや必要不可欠になっている。最初期の第3世代放射光施設であるAPSやESRFで初めて構造解析に成功した96年では、登録されたPDBの数は80%以上がインハウスの実験装置を用いて構造解析されていた。ところが、すでに3年後の99年には、放射光施設全体で構造解析されたPDBの数がインハウスのそれを上回っている。2004年には75%以上の立体構造が放射光施設で解析され、そのうち3分の2以上が第3世代の放射光施設で占められている。第3世代放射光施設で高輝度ビームラインが多く建設されたことにより、迅速に高精度なデータが収集できるようになったことが要因であることは容易に推測される。表1に高輝度ビームラインを一般共用中、もしくは建設予定のシンクロトロンをまとめた。一方、第2世代の放

射光施設においても、シンクロトロン改良に伴う挿入光源の導入により、小さなビームサイズと輝度を達成するビームラインも建設されはじめた。PFのBL17はその良い例であろう。効率的に回折実験を進めるためには、その有力な道具である放射光施設のビームラインそれぞれの特徴を知り、使い分けことが重要である。スクリーニングをサンプル交換ロボットのあるビームラインで行い、位相決定用のSAD/MADデータセットをビームサイズの小さい、高輝度のビームラインで行うのは、よくあることであるし効果的であろう。

3. 回折実験の前に……

実験者当たりの実験時間は短い。われわれのビームラインでは、ビームタイムのプロポーザルと実験者の人数から計算すると2～3時間と推測される。今後はさらに短くなるであろう。この短い時間内に、目的を満たすために効率良く実験を進めるためには、ビームラインの自動化よりも、実験者の用意周到な実験計画と、回折実験に対する明確な達成目標の設定が重要である。例えば、実験に際して必要なパラメータのリストを用意せずに実験を始めたり、異常散乱効果を利用した位相決定のためのデータセットで、高分解能Nativeデータセットがあるのにもかかわらずむやみに高分解能を目指したりするのは効率の良い回折実験とは思えない。

3.1 実験計画

放射光施設のビームラインを使う場合、少なくともわれわれのビームラインやヨーロッパ内では、ほとんどのユーザの方々が凍結させた状態のサンプルを準備する。ビームラインでサンプルのスクリーニングが容易で実験室系の装置よりも高速にできる現在、超分子複合体のようなプロジェクトでなくともビームラインでスクリーニングする

表1 一般共用中もしくはは建設計画中の第3世代放射光施設。(Third generation Synchrotrons in operation, in commissioning or planed in the world.)

①Facility ②Location ③Year commissioned ④Status ⑤Notes

① ESRF		① Diamond
② Grenoble, France		② Oxfordshire, UK	
③ 1992		③ 2006	
④ In operation		④ In commissioning	
⑤ 13 Endstations for PX		⑤ First beam in storage ring in May, 2006	
① APS		① AS
② Chicago, USA		② Melbourne, Australia	
③ 1995		③ 2006	
④ In operation		④ In commissioning	
⑤ 16 Endstations for PX		⑤ First beam in storage ring in June, 2006	
① SPring-8		① SSRF
② Hyogo, Japan		② Shanghai, China	
③ 1997		③ 2008	
④ In operation		④ Under construction	
⑤ 10 Endstations for PX		⑤	
① SLS		① ALBA
② Villigen, Switzerland		② Barcelona, Spain	
③ 2001		③ 2009	
④ In operation		④ Under construction	
⑤ 2 Endstations for PX		⑤	
① CLS		① TPS
② Saskatoon, Canada		② Hsinchu, Taiwan	
③ 2003		③ 2013	
④ In commissioning		④ Under planning	
⑤ First beam in storage ring in Dec, 2003		⑤	
① Soleil
② Orsay, France			
③ 2006			
④ In commissioning			
⑤ First beam in storage ring in May, 2006			

実験者が大多数である。

実際撮影されるデータセットの数を見ていると、実験者が用意しているサンプルリストの情報量と撮影できるデータセットの数が比例しているように感じる。ドライシッパー内のサンプルの位置、結晶のループ内での状態、凍結させたときのスナップショット、サンプルの結晶化条件、既知の結晶学的パラメータ、目標の分解能、目標

(完全性, SN 比, 分解能, R 値など) の優先順位が回折実験に有用な情報である。同僚のサンプルの測定を依頼されたという話もよくあると思うが、ここに挙げたような情報が欠けている場合、情報交換に時間がかかって、しかも、誤解が生じている場合が多い。実験を補助するビームラインのサポートスタッフから見ても、このような情報にアクセスできれば、より細かな助言、ビームラインのセットア

ップが可能である。

ビームラインのブラックボックス化の目標は、ビームラインとその制御ソフトウェアの設計者が決定できない部分—実験者の望んでいる目的とその優先順位—を満足する実験条件の提案を自動化することであろう。前の段落で挙げた用意すべきサンプルリストの例は、ブラックボックス化しきれていない部分を補うために重要な情報である。さらなる自動化を推し進めるためにも、ユーザの方々には例のような情報をビームラインのLIMS (Laboratory Information Management System) に転送しやすいような形で準備していただきたい。SPRING-8でのD-CHA, ESRFのISpyB, SLSのDUOなど、オンラインでこのような情報を入力、閲覧できる環境が整いつつある。

3.2 ビームラインの評価とベンチマーク

良いビームラインとはどのようなものだろうか？これについてはユーザの方々それぞれのサンプルによって変わってくるので、1つの回答を用意することは不可能である。酵素に結合する基質や阻害剤を大量に探索しているユーザと、リボソームやウイルスのようなサンプルでは、要求の方向性がまったく異なる。

われわれはこれに対する答えとして、“基準サンプル”を用意し、ユーザの方々の目的や実験に合わせた方法で、それぞれのビームラインのベンチマークを実行することを推奨している。EUの結晶構造学者のための装置とソフトウェアの共用化と標準化を進めるプロジェクト、BIOXHIT²⁾の一環として、G. Sheldrickを中心にこのベンチマークの標準化が進んでいる。このベンチマーク手法はプロジェクトの終了後一般に公開される予定である。

ベンチマークの主な内容は、Zinc freeのインスリン結晶を用いて、検出器の位置依存の感度異常、入射X線と結晶のセンタリングやX線損傷、インスリンに含まれる硫黄由来の異常分散差を使ったデータセットの評価、ビームラインのハードウェアの精度やビームの安定性を評価するものである。その他の利用方法として、シャットダウン後のビームラインの立ち上げの際にベンチマークを実行することで、問題の早期発見のためにも利用している。

われわれは、それぞれのユーザの方々のビームラインを選択する指標の1つとして、自分なりの標準サンプルを決めて、ビームラインごとに同じ条件で結晶化、サンプル調整、回折実験を行い、評価することを勧めたい。同じ条件で実験することによって、ビームラインに固有の現象、例えば、空気散乱によるバックグラウンドの高さや検出器の‘ムラ’の状態を客観的に見ることができる。実験者の目的や実験手法によって、使うビームラインの選択をすることがより容易になるはずである。例えば、位相問題を解決するためのSAD/MADデータセットが必要な場合、検出器のサイズよりも、より低い検出器のノイズレベルや感度の‘ムラ’が重要であろう。

4. ビームラインの自動化

ビームラインの自動化／ブラックボックス化は、ビームラインの建設において、現在最も重要視されているプロジェクトの1つである。回折実験における自動化のポイントは以下の5つである。

1. 結晶のFishing, 凍結, データベースへの登録
2. サンプルの自動マウント
3. サンプルのアライメント
4. 回折実験の条件の最適化
5. データ処理の自動化

などが挙げられる。これら自動化の実現に伴い、宅配サービスと遠隔操作を使ったMail-inサービスが多くのビームラインで実現あるいは予定されている。ただし、上に挙げた項目の中で、実現が容易なものと困難なものがある。困難なものに関しては、実験者がそれを理解し、実行することによって補完する必要がある。

4.1 結晶のFishing, 凍結, データベースへの登録

実験室レベルでのアイデアのテストが行われているが、実用に近いデバイスはまだできていない。唯一、データベースへの登録の部分は二次元バーコードやRFIDによって標準化の策定が進んでいる段階である。その他の部分は依然として、良いサンプル（である可能性が高い）結晶の選別、適切なループサイズの選択、ループ中の母液の最小化、結晶方位などを実験者自身が最適化する必要がある。

4.2 結晶の自動マウント

サンプルの自動交換ロボットは、SPRING-8,³⁾ ALS,⁴⁾ SSRL⁵⁾ で実際に使用され、実験の迅速化に貢献している。Maresearch,⁶⁾ RigakuMSC,⁷⁾ Brucker⁸⁾ からすでに市販されている。現時点でそれぞれのビームラインにおいて、サンプルの自動交換を行うことは、問題なく行うことができる段階になった。

ただし、実際に一般共用を開始するに当たって、クライオピンの長さの違いや、マグネットの形状、Tray (Puck, Basketとも呼ばれる)の形状、2Dバーコード、RFIDのフォーマットなどの違いによって、細かな問題が発生している。実験者のためにも、早急にピンの形状とサンプルピンのラベルを統一する必要がある。EU内では、SPINE (Structural Proteomics In Europe)⁹⁾ でサンプルピンの標準化を行った。また、SPRING-8とSLSの間で、SPACEのサンプルピンとSPINE標準ピンの互換性をとる方向で話を進めている。現在では、SPACE用のピンをアダプタに装着することにより、ACTORでの取り扱いが、限定的ではあるが可能になった。SPACE以外のサンプルの自動交換ロボットを使用する場合には、ピンの長さが18 mmの金属製のマグネットベースを使用すれば、今後互換性の問題を気にしなくてもよいので便利であろう。

4.3 サンプルのアライメント

サンプルのアライメントに関して、ループの形状を画像から認識してアライメントをする方法は、SPRING-8をはじめ、いくつかのシンクロトロンですでに実装されている。今後は、ループ内の結晶を画像解析によって認識し、アライメントをする技術の開発が求められている。BIOXHITのプロジェクトとして、EMBL/HamburgやEMBL/Grenobleなどで、それぞれXREC^[10]、C3D^[11]としてループ内の結晶の自動アライメントプログラムが開発されている。どちらもベンチマークによって、70～80%近い成功率を達成している。100～200ミクロンのビームサイズを使用する場合、精度がそれほど要求されないのでは自動化が達成可能である。

それぞれプログラムによって前提条件が設定されているので、より良い自動化のためには、実験者がある程度前提条件を考慮してサンプルの調整を行う必要がある。具体的には、ループ内には結晶を2個以上置かない、結晶がループの外にはみ出さないようにする、ゴミや沈殿をなるべくループ内に残さない、ループがボール状に見えるほど母液を残さないなどに留意すれば高い確率でアライメントに成功している。また、これらの留意点は良いデータを収集するためにも大切なので、実験者の方々はすでに実践されているであろう。

ビームサイズがさらに小さなビームラインでは、まだサンプルのアライメントは実用段階ではない。紫外線領域でのタンパク質の蛍光を利用して、ループの中の結晶を能動的に検出する方法が開発されているが、まだ実用化されていない^[12]。研究室レベルでは、紫外線を利用してループ内の結晶の外形を認識して、最適なX線の照射位置を求めるテストが行われている。

4.4 回折実験の条件の最適化

北米で広く使用されているBLU-ICE^[13]と、EUで標準化が進められているDNA^[14]がこの分野で代表的なプロジェクトであろう。どちらもMOSFLM/LABELITをコアプログラムとして使用している。DNAはMOSFLMの開発者であるA. G. W. LeslieとSRS, ESRFが中心となって開発を進めている、スクリーニング、SAD/MADを含めた回折実験を自動化するためのプログラム群の総称である。バージョン1.1が近日中に公開予定で、実験条件の最適化と、データ処理を自動化することを目指している。カップーゴニオの方位の最適化、セルフシャドウ、ほかの装置との衝突問題、A. Popovが作製したBEST^[15]をベースとした露出時間の最適化と、X線照射による損傷のモデル化も進んでいる。

これらのシステムは完全に自動で回折実験を行うものではない。実験者がこれらのシステムを使用する際、それぞれのサンプルに対して実験目的を設定する必要がある。SN比を優先するのか、分解能よりも完全性を重視するの

かなど、データからは推測できない、実験者のみが判断し得る情報がそれにあたる。

4.5 データ処理の自動化

データ処理の自動化は、XDSによる複数のプロセッサを使用した並列処理と、DNA, APRV^[16]による自動処理/自動解析が最も進んでいる。前者はEU内での標準パッケージとして公開されており、後者はヨーロッパの産業ユーザの間で広く利用されている。またそのほかにも、HKL2000, MOSFLM, XDS, D*Trekなど、現在使用されている主なデータ処理プログラムでは、回折実験中に撮影済みの回折像を積分する“追いかけて積分”をサポートしている。

現在われわれのグループでは、いろいろな実験条件の下で処理の結果や処理速度を比較したうえで、最終的なデータ処理はXDSを使用している。実験者の方々にもXDS以外は勧めていない。XDSは唯一マルチプロセッサに対応したデータ処理ソフトウェアであり、プロセッサごとに1枚の回折像の積分処理を割り振るので、並列化の効率が非常に高く、プロセッサの数に対して処理時間がほぼ線形に短縮される。処理後の統計結果もほかのプログラムと比べて有為に良い結果を示すことが多く、XDSで処理したデータセットのみ、異常分散差を使って位相問題が解決されることもしばしばである。古いバージョンでは結晶方位の決定に問題があったが、現在のバージョンではダイレクトビームの位置が精密に決定されていれば問題はない。非常に少ない回折点からでも方位の決定が行える点は、ほかの処理ソフトウェアと比べても大きなアドバンテージである。専用のスケーリングプログラム、XSCALEはSAD/MADデータセットに対してオーバースケーリングを起こすことがごく希にある。この場合はスケーリングのみ、CCP4パッケージ内のSCALAを使うと回避できる。

XDSの製作者であるW. Kabschにより、現在も精力的に機能の拡張、改良が進められている。特に、X線の損傷を補正するZero-dose extrapolationや、プロファイルフィッティングアルゴリズムの改良、ピクセルアレイ検出器のサポートはXDSのウェブサイト^[17]で公開されており、更新も頻繁に行われている。

APRVはXDS, CCP4, CNXを統合して、主に既知の構造をもとに基質や阻害剤の結合状態を迅速に可視化するためのツールである。サンプルごとの結晶学的パラメータを登録しておけば、自動的にデータ処理、構造の精密化、可視化を実行することができる。グラフィカルフロントエンドはウェブアプリケーションとして記述されており、遠隔操作にも対応している(図1)。もちろん、新規の構造解析を行うための統合インタフェースとしても使用可能である。

SLS/X06SAでは多くの産業ユーザの方々がこのAPRVを使用しており、基質や阻害剤の結合状態の判定のため

図1 APRVのグラフィカルユーザインタフェース(GUI). (A snapshot of APRV graphical user interface.) APRVのGUIはすべてウェブブラウザ上に記述されており、遠隔操作も可能である。(The graphical user interface (GUI) is written in HTML as a web application. This is a page to select options for XDS, XSCALE and CNX processes and submit processes on selected servers.)

に、回折実験と平行して2つ前の実験結果を次の実験にフィードバックするといった使い方がされている。

5. 回折実験の実際

われわれのビームラインでの回折実験の定石は、露出時間を極力少なくして、完全性に重点を置く点である。露出時間をいくら延ばしても、分解能やデータセットの質の向上はほとんど見られない。高輝度のX線と最新の世代のCCD検出器との組み合わせで回折像を収集する場合、回折像1枚当たり2～3秒で連続して実験を続けることができる。この高速なデータ収集の恩恵により、X線による損傷を抑えるため、露出時間をできるだけ短くして回折像を多めに撮影しても、実験全体に要する時間はさほど変わらない。また、異常分散を測定する場合には、高速回転(180 deg/sec以上)が可能なゴニオを使用しているビームラインでのInverse settingの使用を積極的に勧めている。

5.1 結晶のアライメント

ビームが高輝度になり、ビームサイズが小さくなるに

つれて、結晶のアライメントの重要性がますます高くなっている。長波長を使って軽原子の異常散乱効果を利用して位相決定する場合、結晶自体の吸収や空気散乱は更に大きな問題になる。この点においても、結晶のアライメントが重要である。しかし前述のとおり、この過程は結晶のFishingと並んで回折実験において自動化が困難な部分である。

5.2 検出器の選択と露出

現在ほとんどのビームラインではCCD検出器が用意されており、ほとんどの場合にはそのCCD検出器を利用することになるであろう。CCD検出器とそれ以前によく利用されていたImaging plateを使い分けるポイントはどこにあるのだろうか？ 一番重要な点はCCDのダイナミックレンジがImaging plateに比べると極端に狭く、強度が高い部分で線形性が崩れる点である。このため、記録される回折点の強度が飽和しないような露出時間の選択が重要になってくる。一方、CCD検出器は低強度部分でのノイズがImaging plateに比べて少なく、線形性も良い。そのため、CCDを使用して回折実験を行う場合、露出時間をなるべく短くし、低強度部分での低ノイズ、良好な線形性といった長所を利用するべきである。

5.3 実験条件の最適化

最も迅速で効果的な実験条件の最適化方法として、われわれは次の手順を推奨している。

5.3.1 実験の概要

異常分散差を利用する必要がない場合、180度もしくは360度、回折点の重なりが発生しない振動角でデータ収集をする。最初は結晶のX線による損傷を見るため、フィルターは少なめに設定する。このデータセットの処理を行い、ダメージの発生に必要なPhotonの量を見積もる。この予備実験を行わずにHenderson limit⁽⁸⁾を使用する方法もあるが、サンプルによるバラつきがかなり大きいので、われわれはこの方法を推奨しない。われわれのビームラインで定期的に行う実験するユーザの方々は、通常この実験を本実験の前に行い、本実験の計画や時間の割り振りを考える参考にしてている。

5.3.2 フォトン総量と実験条件の見積もり

見積もられたPhotonの量の中で、最大の回折像が得られるようにアテニュエータを設定し、なるべく多くの回折像を収集する。アテニュエータを決定する基準として、目安となる回折像の平均強度は分解能が必要なNativeデータセットで200、異常分散差を測定する場合は40～50程度を目安にする。軽分子の位置決定や、S-SADでの位相決定の場合には、さらに低い20～30程度の平均強度を目安にする。

例えば、 2.0×10^{12} photons/secのflux、1秒露出でテストしたとき、50枚回折像を収集した時点で求める分解能の領域のSN比の低下が見られた場合、そのサンプルに対し

図2 X06SA のゴニオ周りのクローズアップ。(A close view of high resolution diffractometer on beamline X06SA at the Swiss Light Source (SLS).) 回折実験時のX06SAでのコリメータ、ビームストップ、クライオノズルの最適な位置。図の右からコリメータがサンプルの直前まで伸びている。左端にはビームストッパーがわずかに見えている。クライオノズルは入射X線の下流側に設置できれば、より効果が得られるが、ほかの装置との干渉のため、この場所に設置されている。

て使用できるフォトン総量は 1.0×10^{14} であると見積もることができる。また、1枚の回折像当たりの適切な露出時間でのフォトン総量が 2.0×10^{11} であるとすれば、この場合500枚の回折像が収集できることが予想される。

5.3.3 露出時間と損傷の関係

アテニュエータを使用せずに、露出時間を調節することによってフォトンの量を調節する場合、露出時間が短くなると(0.1秒程度)損傷が早く進行する傾向がある。われわれは露出時間を1秒もしくは0.5秒にして、アテニュエータによって露出時間を最適化する方法を推奨している。これは、検出器の読み取り時間の間に結晶内の廃熱が行われているが、入射X線の密度が高すぎる場合、廃熱が追いつかないことによると考えている。

5.3.4 Inverse setting

観測される異常分散差をなるべく大きくするため、Inverse settingを推奨する。軸立てを行わずにInverse settingを使うことによって、バイフット対が同じ回折像上に現れることを回避し、Scalingで起こり得るSystematic errorやOver scalingを抑えることができる。また、バイフット対が最近の回折像上に発生するため、X線の損傷によるSystematic errorやアーティファクトも低減できる。

5.3.5 クライオストリームの設定

クライオストリームの流速を設定できる範囲で最大にする。われわれの使用するOxford cryosystems社の装置ではsample flow, shield flowともに10 L/min以外では使用しない。複数のビームラインで流速とデータの質が比例

して良くなる現象が観察されている。低分解能側でR値の高さが気になる場合は、回折計の精度に問題がない場合ほとんど流速の増加で解消される。サンプルの下流に乱気流が起きにくいようなクライオノズルの角度を発見できれば、さらにバックグラウンドの低減が期待できる。

5.3.6 空気散乱の改善

コリメータとサンプル間の距離、サンプルとビームストップの距離をできるだけ短くする。ただし、近づけすぎるとクライオストリームの乱流が発生することから、われわれの環境では最適なコリメータの距離は3 mmである(図2)。ビームストッパーの場合は低分解能側の反射の必要性によって試行錯誤する必要がある。われわれは検出器の距離に応じて、20 mmと30 mmのどちらかを使用している。ヘリウムチェンバーや真空チェンバーが、サンプルと検出器の間に設置できれば、空気散乱の低減には非常に有効である。

6. Post Growth Optimisation (PGO)

アニーリングや脱水などの、結晶化後に分解能やモザイシティの向上を試みるテクニックの総称である。非常に薄い板状の結晶で実験をされている実験者の方々の多くはアニーリングを試みていると思う。分解能の向上はいつも見られるわけではないが、モザイシティに関してはかなりの高確率で改善される。

脱水に関してはドイツの構造解析請け負いのベンチャー企業であるProterosやRichmond研のD. Sargentが行っているような、回折計のゴニオにサンプルを乗せた状態で能動的に湿度をコントロールすることによって短時間で分解能やモザイシティの向上を図る方法と、結晶をパラフィンオイルや通常の抗凍結剤でループ上にマウントした後、室温やクライオ温度下で受動的に分解能やモザイシティの向上を期待する方法がある。また、アニーリングと併せて、結晶化条件よりも高目の沈殿剤濃度の母液に結晶を戻し、脱水を起こす方法も使われる。

どの方法も分解能の向上が見られる場合はパッキングの変化に伴う分解能の低下や回折点の不鮮明化が観測される。この劣化が観測された時点であきらめて実験を中止せず、しばらく様子を見ることが肝心である。また、アニーリングの再現性を上げるためにも、結晶の成長軸の方向とクライオストリームの位置関係を把握していることが重要である。一通り回折実験を終えてからPGOを試みるユーザの方々がいるが、筆者は長時間X線を照射した結晶でPGOを成功させた経験がない。

7. 終わりに

計画が明確になっている約5年後までのビームラインは、自動化のためにスペックを追求せず、ビームライン全体での実用性と自動化を求めるものと、硫黄や軽原子での

位相決定専用ビームラインやサブミクロンビームラインのような、ビームライン全体のスペックを追求した先駆的な研究のためのビームラインに明確に分化しつつある。後者のビームラインは自動化が困難であろうため、専属のビームラインオペレータを養成して、そのオペレータを通して実験を進めるような究極のブラックボックス化が考えられている。

ブラックボックスの中身に少しでも興味が出てきた方は、ビームラインで実験する際、ソフトウェアの中で進んでいる処理や装置の動きから、ブラックボックス化のための機構や工夫を見てほしい。そして、改善のためのアイデアが出れば、実験の際にでもわれわれにぶつけていただければ幸いである。

文 献

- 1) asdp.bnl.gov/asda/libraries/pdb_statist
- 2) www.bioxhit.org
- 3) G. Ueno, *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **37**, 867 (2004).
- 4) B. Rupp, *et al.*: *Acta Cryst.* **D58**, 1514 (2002).
- 5) A. E. Cohen, *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **35**, 720 (2002).
- 6) www.marresearch.com/dtb.htm
- 7) www.rigakumsc.com/protein/actor.html
- 8) www.bruker-axs.de
- 9) www.spineurope.org
- 10) www.embl-hamburg.de/XREC
- 11) www.embl-grenoble.fr
- 12) X. Vernede, *et al.*: *Acta. Cryst.* **D62**, 253 (2006).
- 13) T. M. McPhillips, *et al.*: *J. Synchrotron Rad.* **9** (2002).
- 14) www.dna.ac.uk
- 15) G. P. Bourenkov, *et al.*: *Acta. Cryst.* **D62**, 58 (2006).
- 16) M. Kroemer, *et al.*: *Acta Cryst.* **D60**, 1679 (2004).
- 17) W. Kabsch: *J. Appl. Cryst.* **21**, 916 (1988).
- 18) R. Henderson: *Proc. R. Soc. London*, **B241**, 6 (1990).

プロフィール

富崎孝司 Takashi TOMIZAKI

Paul Scherer Institut

Address : WSLA/219 PSI, CH-5234, Villigen, Switzerland

TEL. + 41-56-310-51-29

FAX. + 41-56-310-31-51

E-mail: takashi.tomizaki@psi.ch