NMRによりタンパク質の表面環境を探る

神 藤 平 三 郎*

Environment of Protein Surface Studied by NMR Spectroscopy

Heisaburo SHINDO*

Key Words : Protein Surface, Hydrated Water, NMR, Nuclear Overhauser Effect

生物物質、特にタンパク質表面は水和層で被われている。この水和層の状態を研究できる手段は限られているが、その一つにNMR分光法がある。タンパク質の表面環境に関するNMRによる最近の研究の一端を紹介し、タンパク質表面で起こる水和水のダイナミックスについて概説する。

1. はじめに

タンパク質の表面は、言うまでもなく、酵素と基質、抗体と抗原のように分子認識の場であり、反応の場でもある。これらは構造に係わる問題であり、タンパク質全体の詳細な構造が決まれば、その形状、電荷の分布や疎水性および親水性表面の評価、さらには酵素活性または分子認識機構の推測も可能であろう。それゆえ、タンパク質の研究が、その表面よりも、その構造の解明に注がれるのもしごく当然のことと思われる。過去十数年間にわたるNMR技術の進歩によって、NMRは、X線解析法のように原子レベルで溶存タンパク質の立体構造を決定できるようになった^{1), 2)}。現在、NMRによるタンパク質の研究の主力はこの方面に向けられている。

では、構造が決まればすべてが解決されたことになるか。もちろんそうではない。ほとんどのタンパク質が水溶液中でその機能を発揮できること、そしてその構造が無機物質のそれとは異なり、きわめて柔らかいという事実を考えるなら、水との

相互作用抜きにはタンパク質の真の理解は望めない。事実、タンパク質の単結晶内にはタンパク質自身の重さと同程度に、水分子が結晶水として含まれており、タンパク質の構造保持に欠かせない構成要素になっている。

通常、媒体である水分子とタンパク質との相互作用はその表面または表面近傍で起こる。図1から分かる通り、水溶液中のタンパク質の表面は何層かの、いわゆる水和水の層で被われている。この水和水は、タンパク質の特定の場所に強く結合した結合水と、回りの束縛水とに分けられる。

図1 タンパク質表面における水分子の状態

*東京薬科大学 (〒192-03 東京都八王子市堀内1432-1)

Tokyo Pharmaceutical Univ.(1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

束縛水は自由水と速い速度で交換されるが、結合水との交換は遅い。一方、水和水とタンパク質中の交換性プロトンを有する原子団との間でプロトンの交換が起こっている。この原子団として、水酸基—OH、アミノ基—NH₂およびアミド基—NH などが含まれる。

現在のNMR技術は、ナノ秒以上から数10時間にも及ぶ範囲の水分子あるいはプロトン交換速度の測定を可能にし、タンパク質に強く結合した水分子の位置を同定することも可能にした。本稿において、NMRによる水和水の研究を通してタンパク質表面のダイナミクスに迫ってみたい。

2. NMR分光法

NMRから得られるデータには、化学シフト、スピン結合、緩和時間や磁化移動など数多くあり、これらは物質の構造や状態などについてさまざまな情報を含んでいる。NMRになじみのない読者に第3章で述べることを理解していただくためには、以下に述べるNMR測定法とそのデータの解釈についての説明を省略する訳にはいかない。

2. 1 水溶液試料のNMR測定

生理条件に比べてきわめて高い濃度であるが、数mMのタンパク質が溶けている水溶液からプロトンNMRを観測するには、一つの深刻な問題がある。それは、タンパク質の約10万倍の濃度で存在する水分子からの信号がタンパク質からの信号の観測を不可能にすることである。その簡単な解決法は軽水H₂Oの代わりに重水D₂Oを使用することである。しかしながら、タンパク質を重水に溶かすと、前述したように、タンパク質中の交換性プロトンが重水素に置き代わり、プロトンNMRスペクトルから多くの情報が失われることになる。それゆえ、H₂Oからの大きな信号を消去するためにさまざまな方法が考案された。その一つは、NMR信号を観測する前に水のピークの共鳴点で強いラジオ波の照射を行うことによって水の信号を消去する方法である。もう一つの方法は、水のプロトンは励起しないが、タンパク質の信号のみを励起する特殊なラジオ波のパルスを与える方法、例えば、jump-and-return法³⁾である。

図2 プロトンNMRスペクトルに及ぼすプロトン交換速度の影響

これらの方法の詳細はさておき、水分子とのプロトン交換によってタンパク質の交換性プロトンの信号がどのような影響を受けるか考えてみよう。例えば、アミド基—NHのプロトンと水分子のプロトンとの交換を仮定し、アミドプロトンと水の信号の化学シフトの差を $\Delta\nu$ とする。反応は次のように表せる。

アミドプロトンの交換速度 k_m は寿命 ($\tau = 1/k_m$) によっても表現できる。図2に示すように、この寿命 τ が $1/\Delta\nu$ より十分に長いときには、プロトンの信号はそれぞれの位置に現れる。 $\tau \sim 1/\Delta\nu$ になるにつれて、イミドプロトンの信号は水のピークに向かってシフトしていき、同時に幅広くなる。寿命が短い場合、 $\tau \ll 1/\Delta\nu$ の場合には、この信号は水の信号との強度平均、すなわち大量に存在する水のために水の信号に吸収されてしまう。

2. 2 多次元相関NMR

現在、NMRによるタンパク質の研究のほとんどは二次元あるいは多次元NMRの測定によって行われている^{1), 2)}。

まず、二次元NMRを直感的に理解していただくために、DNA結合タンパク質の一つであるH—NSの重水で測定されたNOE相関二次元スペクトルを図3に示す (NOEについては後述する)。

図3 a) は、いわばそのちょう観図である。ここで、横軸も縦軸もプロトンの化学シフトで表され、左

図3 H-NSタンパク質の二次元 NOESY スペクトルのスタッキング・プロットおよび NOESY の等高線表示

上から右下に向かう対角線上のピークが通常的一次元スペクトルに相当する。中央の高いピークはラジオ波照射によっても消去できない水の信号に由来する。非対角線上に多くの、小さいピークが見られる。

図3 a) のスペクトルを等高線表示で表したのが、図3 b) である。水のピークに由来するノイズを除いて非対角線上に多数の小さい点はクロスピークと呼ばれる。例えば、点線で示したクロスピークは、垂直および水平に延ばした対角線との交点にある二つのピークの間で NOE 相関があると言う。このことはすなわち、それぞれのピークに帰属する二つのプロトンが空間的に互いに接近していることを意味する。すべてのクロスピークが帰属できれば、非常に多くのプロトン間の距離情報が得られ、この情報に基づいてタンパク質の立体構造が決定される^{1), 2), 4)}。

三次元 NMR では、二次元相関に加えて、もう一つの軸として、例えば、 ^{15}N 核、 ^{13}C 核などの化学シフトの軸が選ばれる。今日、タンパク質の NMR による構造研究は多次元化の傾向を強めているが、これはスペクトルの分解能の向上とその帰属の容易さのためである⁴⁾。

2. 3 核オーバーハウザー効果

Nuclear Overhauser Effect (NOE と略される)⁵⁾ は NMR から得られる情報の中でも特別の地位を

図4 ラジオ波照射による NOE の符号と NOE 差スペクトル

占める。それは、NOE が核間の距離の情報を含んでおり、NMR による構造解析において決定的な役割を果たしているからである。

NOE は隣接する二つの核スピンの熱平衡への緩和機構に関係する。このことを模式的な実験によって説明しよう。隣接する 2 つのスピンの 1 と 2 があり、そのプロトン NMR スペクトルが図 4 a) に示すようになるとする。ここで、 ν_1 と ν_2 はそれぞれの共鳴周波数である。

周波数 ν_2 でピーク 2 をある時間照射する、すなわち核スピン 2 を励起または飽和したあとで、

スペクトルを観測すると、図 4 b または c が得られる。照射の直後にスペクトルを観測すると、照射の強度に伴ってスピン 2 の遷移が飽和するため、ピーク 2 の信号は弱くなり、照射が強いと観測されなくなる。もし 2 つのスピン間になんの相互作用もなければ、ピーク 1 には変化は見られない。これらのスピンが隣接し、その間に双極子相互作用が働いている場合には、ピーク 1 の強度は条件によって弱くなるか、または強くなる。この変化は、スペクトル *b* あるいは *c* から *a* を引いた差スペクトル *d* および *e* で示すように、正または負のピークとして示される。NOE の値は普通スペクトルの強度に対する差スペクトルの比で与えられる。

理論的には、NOE は核スピン間の平均距離 $\langle r \rangle$ の 6 乗に反比例し、2 つの核スピン間を結ぶベクトルの回転の相関時間 τ_c (簡単に言えば、このベクトルが一回転に要する時間) と観測周波数 ω_0 との関数 $f(\tau_c, \omega_0)$ に比例する (文献 1 を参照)。

$$\text{NOE} \propto 1 / \langle r \rangle^6 \cdot f(\tau_c, \omega_0)$$

NOE は核間距離 r とともに急速に減衰するので、その距離が 3 ~ 4 Å 以下の場合に観測される。プロトンに対して、関数 f は τ_c が短い場合には正の符号をとるが、長い場合には負の符号をとる。その符号の反転は $\tau_c \sim 1/2\pi\omega_0$ のとき起こる。分子ががっちりした構造を持てば、核の相関時間は分子全体のそれに等しくなる。分子量が 1 万か、それ以上になるタンパク質の相関時間は 10 ns オーダーになるから、タンパク質に対しては通常、負の NOE が観測される。

NOE を常に正の値で観測する特殊な方法がある。それは回転系での NOE を観測する方法である⁶⁾。ここで、回転系は実験系に対応する概念で、磁場に置かれた核スピンの首振り運動をその運動に沿って回転する座標系のことである。従って、この座標系から見れば、スピンは事実上静止して見える。この回転系の導入は、スピン運動を扱う場合便利であるが、詳しいことは一般参考書に譲る。この回転系での NOE 二次元 NMR は、通常の NOESY に対して ROESY と命名された。ROESY スペクトルでは、NOE がスピン双極子相

互作用に基づく限り、常に正の値をとる。

これまでの議論では、2 つのプロトン間で双極子相互作用のみを仮定した。しかしながら、もしプロトン 1 と 2 の間で交換がある場合にはその事情は異なる。プロトン交換が優勢になると、ROESY スペクトルにおいてもその NOE は負の符号をとる。したがって、タンパク質で観測される NOE について、a) 通常の NOESY スペクトルにおいては NOE は負の符号をもつ、b) ROESY スペクトルにおいては、NOE は、プロトン交換が優勢になれば負の値をとるが、正であれば、スピン間に働く相互作用はプロトン交換ではなく、双極子相互作用であると結論できる。

3. タンパク質と水との相互作用

前にも述べたように、タンパク質の表面は水和層で被われており、この水和水はタンパク質の構造保持に必須の要素である。媒体である水が果たすこのような役割は、タンパク質に限らず生体物質すべてについて言えることである。

3. 1 水和水とプロトン交換反応

まず、タンパク質の水和水がどれほどの量であるかを示そう。田村と赤坂⁷⁾は、メチオニンのメチル基を重水素で標識した SSI (Streptomyces Subtilicin Inhibitor) を用いて、²H-NMR により SSI 中の結合水および水和水の含量を見積った。8 時間の凍結乾燥によっても取り除けない水を結合水とすれば、この結合水の含量は 9.2% であった。これは SSI の二量体あたり 130 個の水分子に相当し、これが単分子層を形成したとすれば、SSI 表面の 40% を被うことになる。一方、乾燥した SSI の個体試料を、10°C で飽和水蒸気に露したとき、25 時間後に SSI によって吸収された水の含量はタンパク質自身の重量の 50% 以上、25°C では 60% にも達することが示された。この量は SSI が約 2 層の水分子で被われることに相当する。この結果からも明らかのように、水溶液中のタンパク質も 2 層か、それ以上の水和層で被われているものと推察される。

序論でも述べたように、水和層の水分子はタンパク質の交換性プロトンとプロトン交換を受ける

図5 重水で希釈した後のチトクローム c 2 の HMQC スペクトルの経時変化 (文献 8 より引用)

図6 チトクローム c 2 において残基番号に対応するアミドプロトンのプロトン交換速度 (文献 9 より引用)
ここで, (○) はオキシ型, (●) はデオキシ型に対するプロットである。

(文献 1 を参照)。以下, アミドプロトンに注目してみよう。

現在, NMR 測定に供されるタンパク質のほとんどは, 遺伝子工学を利用した大腸菌などの大量発現系を用いて調製される。大腸菌を窒素原子の同位体である ^{15}N を含んだ培地で培養すれば, ^{15}N で標識されたタンパク質が得られる。 ^{15}N で標識する理由は天然に存在する ^{14}N が NMR の測定に適さないからである。アミド基の ^1H と ^{15}N とはスピン結合しているから, ^1H - ^{15}N 化学シフト相関スペクトル (HMQC) が得られる。

^{15}N で均一に標識したタンパク質の濃い軽水溶液を重水で希釈したとき, もしプロトン交換が起こればイミドプロトンは重水素で置換されるから, 対応するピークは HMQC スペクトルから消失する。この消失速度はイミドプロトンの寿命を与え

る。図 5 は, ^{15}N で標識したチトクローム c 2 を重水で希釈した後の HMQC スペクトルの経時変化を示す⁸⁾。ここで, ピークの番号はチトクローム c 2 の残基番号である。軽水中で測定した HMQC スペクトルには図の領域内に 92 個のピークが観測されたが, 重水で希釈した後 50 分後には 43 個のピークに減少している (図 5 a)。このことは 50 分以内に半分以上のアミドプロトンが重水素で完全に置換されたことを意味する。25 時間後には, 相関ピークはさらに 30 個に減少した (図 5 b)。このようにして得られたアミドプロトンの交換速度を残基番号に対してプロットしたものを図 6 に示した⁹⁾。ここで, 上向きの矢印は交換が速くてこの方法では測定不可能な残基を示し, 下向きの矢印はほとんどプロトン交換しないものを示している。荒い議論であるが, 図 6 は次のこ

とを示している。交換速度の遅い領域は、タイプ II の turn 領域、中央の helix I, II の領域および C-helix 領域である。これらの領域のアミドプロトンは水素結合に関与しているために、その交換が遅いものと考えられる。また、これらの領域の間に交換速度の速い領域がある。このような交換速度の違いは、アミド基が水の接近しやすい表面上にあるというよりも、二次構造のゆらぎ（たとえば、構造中の水素結合の部分的、一時的な開裂の程度）が重要な因子であると考えられている。

上で述べた測定法では、数 0.1min^{-1} 以上の速い交換に対してその速度の測定は不可能である。その交換が中程度 $1 \sim \text{数} 100\text{s}^{-1}$ の範囲である速度を測定する方法が Spera ら¹⁰⁾ によって提案された。この方法では、 ^{15}N で標識されたタンパク質試料の HMQC スペクトルを、水の信号を照射して測定した場合と照射しない場合の 2 つのスペクトルのピーク強度を比較することによって交換速度を見積る方法である。

図 7 は Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリンの ^1H - ^{15}N の HMQC スペクトル (a) とその差スペクトル (b) を示す¹⁰⁾。スペクトル (a) は水の信号を照射しないで測定したもので、スペクトル (b) はスペクトル (a) から照射したスペクトルを引いた差スペクトルである。したがって、差スペクトル (b) において、強度の高いものほど交換が速

く、低いものほど遅いことになる。このスペクトルの強度変化はアミド基 NH の ^1H と ^{15}N 核との間の交差緩和速度とアミドプロトンの交換速度との競合関係で決まる。この緩和速度の平均が約 10s^{-1} であるから、この $1/10$ から 100 倍の範囲、すなわち $1 \sim 100\text{s}^{-1}$ の交換速度をこの方法で精度よく測定することができる。

Spera ら¹⁰⁾ は、こうして得られたイミドプロトンの交換速度をその固有の速度と比較して、プロトン交換からの保護される程度を考察した結果、プロトン交換速度を決定する要因として、二次構造の局所的なゆらぎと同時に、プロトンの表面露出度、すなわち、水分子の接近し易さ (accessibility) もまた重要であるとの知見を得た。

今後、いろいろの条件下でのプロトン交換、とくに速い交換に関するデータの蓄積によって溶液中のタンパク質表面で起こるプロトン交換の機構が、構造のゆらぎと関連して解明される日もそう遠くないと思われる。

3. 2 水和水分子の観測

タンパク質の構造に関心のある者なら誰でも、多くの水分子とともに描かれた高分解能の結晶構造を見たことがあるにちがいない。これらの水和水または結合水の位置を同定する手段は、X 線またはニュートロン回折法以外にはなかった。Otting らによって最近報告された NMR による

図 7 カルモジュリンの ^1H - ^{15}N HMQC スペクトルおよび水を照射した場合と照射しない場合との差スペクトル (文献 10 より引用)

図8 4°Cおよび68°Cで測定されたBPTIのNOESYの一部(文献11より引用)

一連の研究^{11)~15)}, 溶液中のタンパク質に結合した水分子の同定, は画期的な研究であった。その原理はタンパク質表面に存在するアミノ酸残基のプロトンと結合水との間のNOEの観測であった。以下, Otting らの仕事^{11), 12)}を中心に, NMRによって結合水の位置がどのように決められ, 単結晶中の構造水がどのように解釈されるか, を簡単に述べる。

タンパク質に強く結合した水分子の信号が, 大量に存在するバルクの自由水の信号から離れて現れるなら, この水分子を同定することは難しくない。しかし実際には, 結合によって誘起される化学シフトの変化は小さく, かつ, その信号はバルク水との速い交換のために平均化されて自由水の信号と重なる。後者の平均化は交換性プロトン, とりわけカルボン酸および水酸基のプロトンにおいても起こるので, これらの信号のほとんどはバルク水の信号と同じ位置に現れる。したがって, 用いられるNMRの手法は, 結合水からの信号を大量のバルク水およびこれら交換性プロトンの信号から区別できるものでなくてはならない。この手法の特徴は, 結合水の信号を直接に観測するのではなく, 水の信号の位置にあるプロトンからタンパク質プロトンへのNOEを観測し, 結合水からのNOEを他のものから区別することにある。

図8はトリプシン阻害タンパク質(BPTI)の2つのNOESYスペクトルの横軸, ω_2 軸におい

てアミノ, アミドプロトン領域およびメチレン, メチルプロトン領域を示す¹¹⁾。

このNOESYスペクトルは, 通常のやり方とは異なり, 水の信号の消去法として水信号を照射しない方法(jump-and-return法)が用いられた。この図の上段のスペクトルにおいて, 矢印は ω_1 軸における水の化学シフトの位置を示し, タンパク質からの信号の重なりがないことが分かっている。したがって, 矢印で示した化学シフトの線上にあるNOEピークはすべて水の信号のプロトンからタンパク質プロトンへのNOEと言うことになる。これらのピークの帰属は図に示した通りであるが, 太い線はプロトン交換に基づいたNOEピークを, 細い線は双極子相互作用によるものを示す。NOEの符号がすぐ分かるように, 水の化学シフトの位置(矢印)における二次元のNOESYおよびROESYの断面図を図9に示した¹¹⁾。

図9ではNOEの符号が逆に記録されているので, 上向きのものが負の符号を, 下向きのものが正の符号になる。NOESYではNOEの符号はすべて負になっているが, ROESYでは, 温度の低下につれて, いくつかのNOEは負の符号から正への変化を示している。これは, このNOEピークの原因が水の信号の位置にあるプロトンからタンパク質プロトンへの分子間双極子相互作用に基づいていることの証拠を与える。例えば, 図9において矢印で示したピークはCys-14のアミドプ

図9 水の化学シフト (ω_2 軸) における NOESY および ROESY の断面図 (文献11より引用)

矢印は Cyt-14 アミドプロトン, $\times$ は Lys のアミノプロトン, $\circ$, $\square$ はそれぞれ Arg のアミノおよびイミノプロトンを示す。

ロトンに帰属される。この NOE は 36°C 以下で正の符号をとる事実は、この NOE が双極子相互作用に基づいていること、したがって H_2O がこのイミドプロトンの近傍に局在していることを示唆する。このタンパク質の構造から Cys-14 の近傍には $-OH$ 基は存在しないことが分かっているので、この NOE がアミドプロトンと $-OH$ プロトン間の分子内 NOE である可能性は除外される。したがって、水分子が Cys-14 のアミドプロトンの近傍 ($<3.5\text{\AA}$) に局在していると結論できる。同様の議論から、溶液中の BPTI に結合した 4 個の水分子が同定された。

BPTI について X 線解析から 3 つの結晶形の構

造が明らかにされ¹⁷⁾、60~73 個の水分子が同定されている。3 つの結晶形において同定された結晶水うち 16 個は同じ位置を占め、そのうち 10 個は同じ水素結合をとり、そのうち 4 個はタンパク質内部に局在していた。最後の 4 個の水分子は NMR で同定されたものと一致した。

ところで、NMR で同定されなかった残りの 60 個弱の結晶水は溶液中ではどのような状態にあるのであろうか。X 線構造解析によれば、58 個の水分子のプロトンがタンパク質プロトンから $3\text{\AA}$ 以内に存在するから、もしそれらが局在しているなら、水のプロトンとタンパク質プロトンの間に約 240 個の NOE ピークが観測されるはずである。しかし、ROESY スペクトルで見られる正の符号を持つ水からの NOE ピークの数があまりに少ない。この事実は、小数の結合水を除いて、水溶液中の第一層の水和水が速度論的にいかに壊れやすいものかを示している。NMR 的な解釈によれば、大部分の水和水がバルク水との極めて速い交換を受けている (すなわち、局在化の寿命が短い) ものと考えられる。

一方、NMR で同定された 4 つの水分子に加えて、限られた数の水和水の寿命を具体的に見積ってみよう。図 9 左の NOESY スペクトルの断面図から明らかのように、観察された NOE が負の値を持つ事実から水和水の寿命の下限は 0.3ns と見積られる。一方、常磁性のシフト試薬を用いた他の実験によって水和水の寿命の上限が 20ms であると見積られた¹²⁾。それゆえ、BPTI において、これらの水和水の寿命 τ は $20\text{ms} > \tau > 0.3\text{ns}$ の範囲に分布しているだろう。

以上概説した同様の研究は、インターロイキン¹⁸⁾、チオドキシン¹⁹⁾、さらにペプチドであるオキシトシン^{13), 14)} の水和水の同定にも応用されている。この方法は、今後多くの系に応用され、それらのデータの蓄積によってタンパク質の表面、とくに水和水の状態について詳細な知見が得られるだろう。

4. 結 言

タンパク質の立体構造が NMR によって決定で

きるようになったと述べたが、その測定には、タンパク質が小さいこと（分子量で～2万）、水によく溶けること（～1 mM）、会合性がないことなど、まだ多くの制約がある。しかし、NMRとX線による構造との決定的な違いは、前者が溶液の構造であるのに対して、後者は結晶状態の構造であることである。二つの方法で得られた構造は総じて一致しているが、これまでの議論から分かるように、NMRは動的な情報を豊富に含んでいる。その意味でNMRは、X線によるような精密な構造を得るには至らないが、より生きたタンパク質像を捕らえていると言えるかも知れない。本論で述べた、水和水に関するNMRの情報はその典型例である。

筆者の知る限り、NMR法は溶存タンパク質表面の個々の水分子を観測できる唯一の方法かと思われる。この水和水の研究は今始まったばかりであり、将来、水分子によるタンパク質構造の安定化機構、酵素反応における水分子の触媒作用などの解明に向けて展開されるものと期待される。

本稿の執筆に当たって、貴重なご意見、ご忠告をいただいた神戸大学の赤坂一之教授に感謝の意を表します。また、図3のNOESYスペクトルを提供していただいた、中外製薬㈱の久保庭均博士に感謝致します。

(1993-10-7 受理)

文 献

- 1) K. Wuthrich ; NMR of Proteins and Nucleic Acids (John Wiley & Son, 1986)
- 2) 稲垣冬彦 ; 新生物化学実験講座, タンパク質Ⅲ, pp.105-150 (日本生化学会編, 1990)
- 3) S. Roy, Z. Papastavros, V. Sanchez, A. G.

- Redfield ; *Biochemistry*, **23**, 4395 (1984)
- 4) 山崎俊夫, 永山国昭 ; ぶんせき, **1993**, (7), 504 (1993)
- 5) K. Wuthrich ; NMR of Proteins and Nucleic Acids, pp.93-113 (John Wiley & Son, 1986)
- 6) A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee ; *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 881 (1984)
- 7) A. Tamura, A. Akasaka ; *Biochim. Biophys. Acta*, **119**, 178 (1992)
- 8) P. R. Gooley, M. S. Caffrey, M. A. Cusanovich, N. E. Mackenzie ; *Biochemistry*, **29**, 2278 (1990)
- 9) P. R. Gooley, D. Zhao, N. E. Mackenzie ; *J. Biomolec. NMR*, **1**, 145 (1991)
- 10) S. Spera, M. Ikura, A. Bax ; *J. Biomolec. NMR*, **1**, 155 (1991)
- 11) G. Otting, K. Wuthrich ; *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1871 (1989)
- 12) G. Otting, E. Liepinsh, K. Wuthrich ; *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4363 (1991)
- 13) G. Otting, E. Liepinsh, K. Wuthrich ; *Science*, **254**, 974 (1991)
- 14) G. Otting, E. Liepinsh, K. Wuthrich ; *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7093 (1992)
- 15) G. Otting, E. Liepinsh, B. T. Farmer III, K. Wuthrich ; *J. Biomolec. NMR*, **1**, 209 (1991)
- 16) R. M. Brunne, E. Liepinsh, G. Otting, K. Wuthrich, W. F. an Gunsteren ; *J. Mol. Biol.*, **231**, 1040 (1993)
- 17) A. Wlodawer, J. Nachman, G. L. Gilliland, W. Gallagher, C. Woodward ; *J. Mol. Biol.*, **198**, 469 (1987)
- 18) G. M. Clore, A. Bax, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn ; *Biochemistry*, **29**, 5671 (1990)
- 19) J. D. Forman-Kay, A. M. Gronenborn, P. T. Wingfield, G. M. Clore ; *J. Mol. Biol.*, **220**, 209 (1991)