

IIII 宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性 IIIII
(解説)

宇宙結晶からの高分解能 X 線結晶構造解析のための技術開発

東浦 彰史・中川 敦史

Technical Improvements for High-resolution X-ray Crystallography from Space Grown Crystals

Akifumi HIGASHIURA and Atsushi NAKAGAWA

Abstract

Protein X-ray crystallography is one of the most powerful methods to obtain the structural information at atomic resolution. However the crystallization is still most difficult process. And the diffraction resolution depends on the quality of crystals. Crystallization in microgravity environment is one of the most possible techniques for obtaining well-diffracted crystals. We have joined several space experiments of JAXA High-quality Protein Crystal Growth projects. These projects contain the crystallization in microgravity environment and improvements of techniques for high-resolution X-ray crystallography. Developments and improvements of the techniques are important to utilize the rare chance of experiments in microgravity environment. We report the modification of crystallization condition for microgravity environment and technical improvements for high-resolution X-ray crystallography from space grown crystals.

Keyword(s): High-resolution X-ray crystallography, Crystallization in microgravity environment

Received 11 January 2017, Accepted 12 January 2017, Published 31 January 2017

1. タンパク質の高分解能 X 線結晶構造解析

近年のタンパク質の構造学的研究の進歩は目覚ましく、タンパク質構造のデータベースである Protein Data Bank への登録数は指数関数的に増えており、2016 年末の時点で 12 万を超える構造が登録されている。タンパク質結晶学の分野では放射光施設の充実や解析手法の高度化など様々な技術開発がなされ、タンパク質の結晶が得られた後の回折データ収集から構造解析に至る過程の大部分は自動化が実現されており、ハイスループット化と共により一般的な手法へと発展してきた。一方、この数年間における電子顕微鏡の単粒子解析の分解能の向上は目覚ましく、二次構造だけではなく、側鎖までをも可視化したとの報告が多数なされており、X 線結晶構造解析を中心とした原子分解能での構造解析に大きく分け入って来た印象である。こういった昨今の状況から、タンパク質の X 線結晶構造解析においては“超”高分解能 X 線結晶構造解析の技術開発が必要不可欠ではなからうか。我が国では 2016 年に鉄硫黄

タンパク質の 0.48 Å という超高分解能での電荷密度の解析¹⁾がなされるなど、超高分解能の X 線結晶構造解析の分野において世界的に重要な位置を占めている。

1.1 高分解能 X 線結晶構造解析のこれまでの取り組み

蛋白質の立体構造を超高分解能で明らかにすることができれば、生命現象の原子分解能での理解につながる。これを達成するためには、高品質な結晶を得ることが最も重要なステップである。そこで、我々は宇宙航空研究開発機構 (Japan Aerospace Exploration Agency; JAXA) の「宇宙ステーション応用研究拠点推進制度 (蛋白質結晶生成分野)」および「JEM 利用高品質タンパク質結晶生成実験」に参加し、微小重力環境下での結晶化を実施し、高品質な蛋白質結晶の生成を目指してきた。さらに、高品質な蛋白質結晶を得た後の結晶の取り扱い方法、放射光施設での技術開発、X 線回折実験の手法論からデータ解析法に至るまでの一連の技術開発を継続的に行っている。開発した手

大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
Institute for Protein Research, Osaka university, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
(E-mail: hgsur-a@protein.osaka-u.ac.jp)

法の汎用化を考慮し、小さな蛋白質から大きな蛋白質複合体であるウイルスをターゲットとしてきた²⁾。本稿では、微小重力環境下で結晶化を行い、高分解能 X 線結晶構造解析を達成するための技術開発を Bovine 由来 H-protein をモデルに実施した結果とその周辺技術開発を紹介する。

1.2 Bovine 由来 H-protein の高分解能 X 線結晶構造解析

H-protein はグリシン開裂系で働く蛋白質の1つである。グリシン開裂系はミトコンドリア内で 4 種類の蛋白質 (P-,H-,T-, L-protein) から成り立っており、これら 4 種類の蛋白質がグリシンの酸化開裂反応を引き起こす。グリシン開裂系は人を始めとして動植物やバクテリアなど非常に広範に分布している。このグリシン開裂系の構成蛋白質の 1 つである H-protein は分子量約 14 kDa であり、グリシン開裂において中心的な役割を果たす。我々は、JAXA の高品質蛋白質結晶生成プロジェクトに参加するにあたって、Bovine H-protein をモデル蛋白質のひとつとして高分解能 X 線結晶構造解析の技術開発を進めてきた。地上での予備研究において、H-protein の結晶はクラスター化し易い傾向であった。結晶がクラスター化してしまうと、回折点のオーバーラップが起こり、正確な回折強度の見積もりが困難となる。そこで、得られたクラスター結晶を破碎し、それを種として結晶化を行うマイクロシーディング法を適用し、最高 0.80 Å 分解能の回折点を与える単結晶を得ることに成功した。最終的に 0.88 Å 分解能での回折強度データ収集と構造解析を達成した³⁾。この構造解析では X 線結晶構造解析では観測が困難である水素原子の電子密度の可視化率を基準に回折強度データの質の評価を実施した。さらに、高分解能 X 線結晶構造解析においても水素原子を可視化するためには低分解能の回折強度データが必要であることを実データから示すことに成功している。この詳細は 5 章で述べる。

2. 微小重力環境下での結晶化のために

2.1 これまでの Bovine 由来 H-protein の微小重力環境下での結晶化と構造解析

我々は 2007 年より、JAXA との微小重力環境下での結晶化実験を実施してきた。これらの結晶化はカウンターディフュージョン法を用いて実施された。タンパク質試料をキャピラリー中に充填し、試料が結晶化溶液などで平衡化されたアガロースゲルを介して結晶化溶液と接することにより、タンパク質濃度と結晶化試薬の濃度勾配が形成され、結晶が生じるという手法であり、JAXA の微小重力環境化での結晶化実験では最も用いられている手法である。

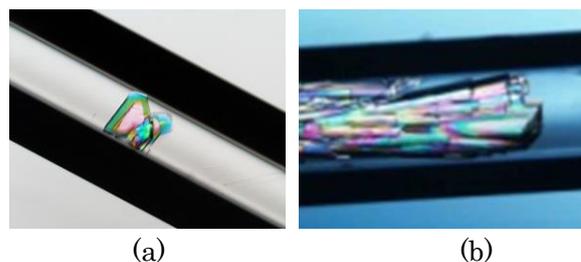


Fig. 1 Crystals of Bovine H-protein grown in microgravity environment (a) Crystal diffracted up to 0.7 Å resolution (b) Cluster like crystals.

Bovine 由来 H-protein の微小重力環境下で得られた結晶はカウンターディフュージョン法でマイクロシーディング法を用いることなく高品質な単結晶が得られ、最高で 0.70 Å 分解能の回折点を観測することに成功しており、0.79 Å 分解能の回折強度データの収集が完了している (Fig. 1(a))。しかし、この良質な結晶は再現が難しく、カウンターディフュージョン法においても大部分がクラスター化 (Fig. 1(b)) してしまう点などが問題となっている。そこで、微小重力環境下での結晶化に適した条件検討を実施した。

2.2 結晶化条件の最適化

Bovine H-protein のカウンターディフュージョン法での結晶化条件は pH3.2 のクエン酸バッファーに 2.0~3.0 M の Ammonium sulfate を加えたもので実施し、結晶のクラスター化が問題となっていた。pH や Ammonium sulfate 濃度の最適化や添加剤のスクリーニングなどを実施したが、空間群の異なる低分解能の結晶が得られるなど、クラスター化の解決には至らなかった。

クラスター化は、結晶表面での 2 次核形成によるものであることから、自発核形成の起こり易い条件を探索することで、クラスター化を抑制できるのではないかと考えた。そこで、結晶化条件の Ammonium sulfate 濃度を下げて界面張力を下げることで 2 次核形成を抑え、Sodium chloride をタンパク質分子の電荷を中和するために添加し、結晶が生成する条件を検討した。まず、バッチ法で条件を最適化し、カウンターディフュージョン法へ移行することとした。バッチ法での条件検討により、0.7 M Ammonium sulfate に 0.5~1.0 M Sodium chloride を加えた条件でサイコロ状の単結晶が得られた。また、Sodium chloride 濃度の異なる結晶では Sodium chloride 濃度が低い条件の方が分解能の高い傾向にあった。さらに、バッチ法で結晶が得られた条件では必ず沈殿が生じていたため、Ammonium sulfate

を加えずに Sodium chloride のみで結晶化を実施したところ、0.75~2.6 M の範囲で全て沈殿が生じた。これらの沈殿は pH を上げ溶解度を上げて溶解しない不可逆な沈殿であった。逆に、高濃度の Ammonium sulfate 条件下で沈殿の中から生成したクラスター結晶は、周りの沈殿を溶かしながら成長することが経時的に観察された。この事実より Ammonium sulfate による沈殿は可逆的なものであった。これらの実験結果より、カウンターディフュージョン法による結晶化条件は、Ammonium sulfate 濃度が高く、Sodium chloride 濃度の低い条件で自発核形成を促し、結晶成長は低濃度の Ammonium sulfate で起こるように設定した。具体的にはカウンターディフュージョン法においてタンパク質溶液と直接接するアガロースゲルを 3.3 M Ammonium sulfate を含む溶液に浸漬させ、結晶化溶液には 1.4 M の Ammonium sulfate を含んだものを用いた。実際の微小重力下での結晶化では同程度の Ammonium sulfate を含んだ溶液を基本とし、タンパク質溶液に含まれる Sodium chloride の濃度の異なる 2 条件 (0.2 M or 0.075 M) で実施した。クラスター化を完全に抑えることはできなかったが、複数個の単結晶を得ることに成功した (Fig. 2)。また、低濃度の Sodium chloride の条件の方が分解能の高

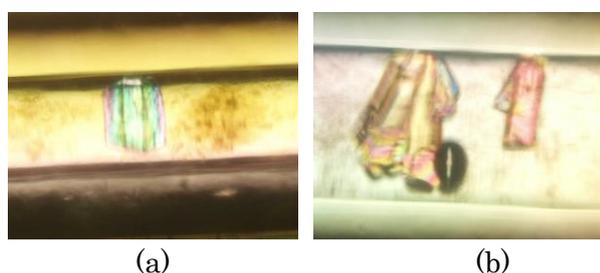


Fig. 2 Crystals of Bovine H-protein (a) grown in microgravity environment (b) grown in ground.

い傾向にあり、平均して 1.0 Å より高分解能の回折点が観測された。より高分解能の回折強度データ取得のために、Ammonium sulfate と Sodium chloride 濃度の組み合わせの最適化と過渡的な Ammonium sulfate 濃度変化の最適化を進めていく予定である。

3. 放射光施設での X 線回折実験

高分解能 X 線結晶構造解析を実現するためには放射光施設での X 線回折実験が必須である。我が国には現在、つくばの高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所と播磨の大型放射光施設 SPring-8 を中心にタンパク質の X 線結晶構造解析のためのビームラインが数多く整備されている。各ビームラインに特徴があり、自身のサンプルや実験条件に適したビームラインの選択が重要である。本稿では大阪大学蛋白質研究所が SPring-8 において運営している生体超分子構造解析学ビームライン BL44XU⁴⁾を例にビームラインの概要と回折実験の実際を紹介する。

3.1 ビームラインの概要

BL44XU は光学ハッチと実験ハッチの 2 つのハッチから構成されている (Fig. 3)。SPring-8 から供される放射光は、2 つのシリコン単結晶から構成されるモノクロメータで Bragg の法則を利用し、X 線回折実験の目的に適した波長の X 線へと単色化される。モノクロメータの結晶は放射光の照射による熱ゆがみが生じないように液体窒素で冷却されており、また温度変化によるビーム揺れが軽減される様にモノクロメータ中の温度は常に一定となるように制御されている⁵⁾。モノクロメータにより単色化された X 線は実験ハッチへと導かれ、実験ハッチ内に水平方向と鉛直方向に設置された 2 枚のミラーにより集光と高周波成分の除去が行われる。ミラーに導入された X 線はサンプル位置において約 0.05×0.05 mm のサイズに集光される。サ

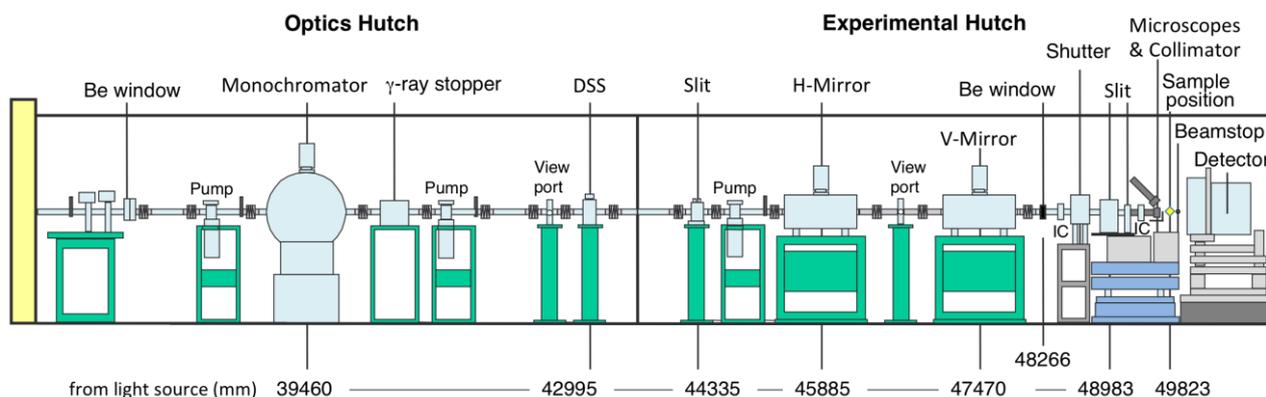


Fig. 3 Schematic of the beamline layout of the optics hutch and the experimental hutch. Reproduced from⁴⁾, with the permission of AIP Publishing.

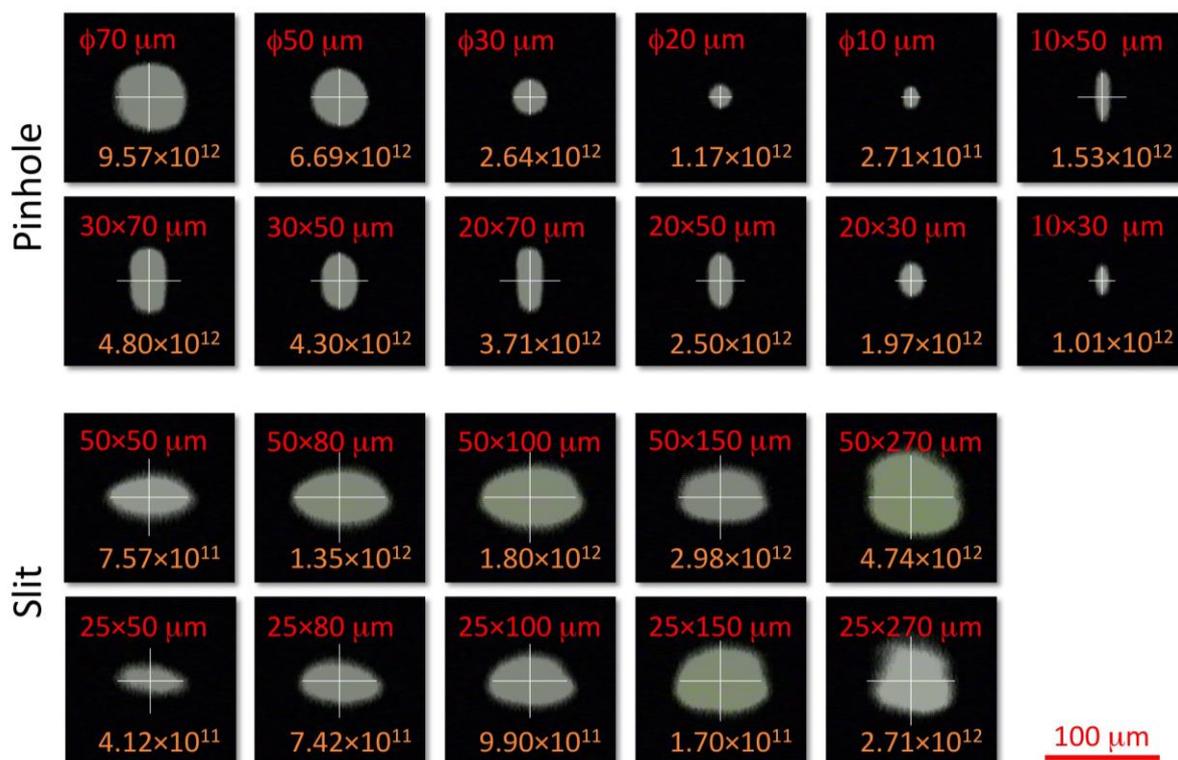


Fig. 4 Shape and photon flux (photons/sec., in orange) of each beam at sample position with each aperture size (in red).

サンプル位置でのビームサイズと形状は目的とするタンパク質結晶のサイズと形状，多様なデータ測定法に対応するために，ミラー下流の 4 象限スリットとサンプル直前のピンホールにより整形される (Fig. 4)。

3.2 ビームラインでの回折実験

放射光施設での X 線回折実験は，高輝度な X 線によるタンパク質結晶への放射線損傷を軽減させるため，タンパク質結晶を凍結し，窒素やヘリウム気流下の極低温 (<100 K) で実施するのが一般的である。タンパク質結晶の凍結に関しては 4 章で後述する。凍結されたタンパク質結晶は高精度ゴニオメータにマウントされ，回転写真法により回折データ収集が行われる。タンパク質結晶からの回折強度を測定するためには高精度な検出器が必要となる。BL44XU では検出面が 300 mm 角の大面積高感度 CCD 検出器が設置されている。X 線波長，検出器検出面の面積とサンプル-検出器間の距離により測定可能な分解能が決まる。5 章で後述するが，高分解能の X 線結晶構造解析においても低分解能の回折強度は重要である。通常，ダイレクトビームが検出器に照射されることを防ぐためにビームストッパーがサンプルと検出器の間に設置されており，低分解能の回折点がビームストッパーの陰に隠れて観測できないことがある。BL44XU ではサンプルとビームストッパー間の距離

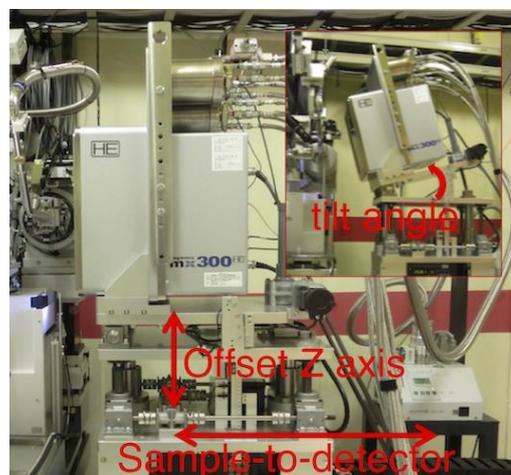


Fig. 5 CCD detector and bench. Reproduced from ⁴⁾, with the permission of AIP Publishing.

が 16~99 mm の間で可変であり 400 Å 分解能の低分解能の回折点の観測を実現している。さらに，サンプルと検出器間の距離は 80~1200 mm の間で可変であり，0.68 Å 分解能までの回折強度の測定が標準的な設定で可能である。また，検出器のオフセット軸（水平，鉛直方向にそれぞれ最大+150 mm）や 2θ 軸（0~15 度）も用意されており，より高分解能の回折強度測定にも対応している (Fig. 5)。

Table 1 Experimental conditions at BL44XU.

Beamline	SPring-8 BL44XU
Beamsize / mm	FWHM (H)0.025×(W)0.050
Wavelength / Å	0.9
Photon flux / photons/sec.	7.5×10^{11}
Exposuretime / sec.	1.0
Oscillation angle / deg.	1.0
Oscillation range / deg.	180
Al attenuator / mm	0.2

高分解能の回折強度測定のためには高品質な結晶探索のためのスクリーニングが必要であるため、結晶交換を効率的に行うための結晶交換ロボット SPACE (SPring-8 precise automatic cryo-sample exchanger)⁶⁾と回折実験のオペレーションのためのソフトウェアである BSS (Beamline Scheduling Software)⁷⁾が実装されている。これらは SPring-8 で開発されたものであるため、SPring-8 の他のビームラインで実験経験のあるユーザーは他のビームラインと同様に回折実験を実施することが可能である。

Table 1 に BL44XU での回折実験の一般的な測定条件を記載した。この例ではタンパク質結晶の一方所に X 線を照射し、放射線損傷が許容されるであろう条件を示している。注意していただきたいのはタンパク質の結晶によって放射線損傷の影響が異なるため、実際にはこの条件を目安に実験的に測定条件を決める必要があるということである。もし、一様に良質な大型結晶を得ることができれば照射点を増やすことができ、より放射線損傷の少ない回折強度データを取得することが可能となる。

4. タンパク質結晶の高圧凍結法

4.1 高圧凍結法の概要

放射光施設や検出器などの技術開発により、タンパク質 X 線結晶構造解析における分解能は向上する傾向にある。しかし、それに反して高輝度な X 線によるタンパク質結晶の放射線損傷は避けることができないため、前述した様に極低温の窒素やヘリウムガス気流下での X 線回折実験が一般的となっている。タンパク質結晶を液体窒素温度で凍結すると多くの場合、分解能の低下や氷晶由来の回折パターンが生じてしまい、正確な回折強度測定を妨げてしまう。これは、タンパク質結晶中の溶媒に含まれる水が結晶性の氷を形成し、溶媒領域の体積が増加し、結晶性を乱してしまうことに起因する。そこで、タンパク質結晶凍結の際には、結晶性の氷の形成を阻害し非晶性の氷とするために抗凍結剤を結晶に導入するのが一般的である。抗凍結剤とし

てはグリセロールなどの低分子、ポリエチレングリコールなどの高分子、糖類などが良く利用される。これらを 30% 程度含む溶液にタンパク質結晶を浸し、液体窒素温度の窒素気流下や液体窒素中で急速凍結する。しかし、抗凍結剤に浸すことで結晶が壊れたり、結晶性を悪くすることがないよう、最適な抗凍結剤の選択には試行錯誤が必要であり多くの時間と結晶を費やしてしまうことが多々ある。コーネル大学の Kim⁸⁾らはタンパク質結晶をヘリウムガスで 200 MPa まで加圧し、急速凍結する方法を開発した⁸⁾。高圧条件下で凍結すると体積変化の小さな非晶性の氷ができ、タンパク質結晶の結晶性を乱さずに凍結することが可能となる。高圧凍結後は液体窒素温度であれば大気圧に戻しても体積の小さな非晶性の氷は維持され続けるため、通常の X 線回折実験と同様の手順で操作が可能である。

4.2 Bovine 由来 H-protein への適用例

高分解能での X 線結晶構造解析を実現するためには放射光施設での回折実験が必須であることは既に述べた。より高分解能の回折強度を測定するためには体積の大きな結晶が必要である。また、高精度に高分解能の回折強度を測定するためには放射線損傷を可能な限り軽減させるべきである。そのためには結晶の複数の位置に X 線を照射し、常に放射線損傷の無い (少ない) データ収集を実施することがひとつの有効な方法である。複数の位置での回折実験を実施するためには、サイズの大きな結晶が有利である。しかし、結晶の体積の増加に伴い、結晶を急速凍結する際の熱伝導は悪くなり、結晶性の氷が生じ易い条件となる。また、抗凍結剤の添加が結晶性を乱してしまうこともよくある。そこで、Bovine 由来 H-protein をモデルタンパク質とし、高圧凍結実験を実施した。先にも述べたが H-protein はクラスター結晶に成り易いことから、単結晶を得るためにマイクロシーディング法を適用し、単結晶を得ることに成功していた。更なる結晶の大型化を目的に、マイクロシーディング法で得られた単結晶を種結晶としたマクロシーディング法を適用し、1 mm 近い結晶を得ることに成功した。マクロシーディングの際に、結晶成長後のクライオプロテクトANT添加による結晶損傷を避けるため、グリセロールをあらかじめ添加した。しかし、抗凍結剤となり得る 30% 程度のグリセロールを加えると結晶の大型化だけではなく核形成も促され、微結晶が多数析出したり、クラスター化が起こってしまった。結晶を大型化するためには 15% 程度のグリセロール添加が限界であった。しかし、このグリセロール濃度では抗凍結剤としての役割を十分に果たせない。そこで、大型化した H-protein の結晶に高圧凍結法を適用した。H-protein の高圧凍結は JAXA との共同研究で作製、改良した装置を使用した。ベースは Kim⁸⁾

が開発したものと同様であるが、加圧時の結晶の保持方法や凍結後の結晶回収方法に改良を加えた。15%グリセロール下でマクロシーディング法により大型化したH-proteinの結晶を170 MPaの高圧下で急速凍結した。高圧凍結を施した結晶のX線回折実験はSPring-8のBL44XUで実施した。分解能0.86 Åの回折強度データを収集することができ、常圧下の結晶と同程度の強度データ取得と構造解析に成功した⁹⁾。構造解析の結果、X線結晶構造解析では原理的に観測が困難である水素原子を約50%観測することができた(Fig. 6(a))ことから、タンパク質結晶の高圧凍結は高分解能のX線結晶構造解析にも十分適用可能な手法であることが明らかになった。常圧の構造と高圧の構造を比較したところ、全原子の比較でも各原子間の座標位置が平均二乗偏差で0.61 Å程度の違いしかなかった(Fig. 6(b))。これらの事実より、H-proteinのケースでは凍結時の加圧による構造変化はほとんど起こらないということを高分解能で確認することができた。

近年、新たに高圧凍結装置(High Pressure Cryo-Cooler for X-Ray Crystallography (HPC-201) ADC社製)を蛋白質研究所に導入し、200 MPaでの高圧凍結が可能となっている。微小重力環境下で良質な大型結晶が得られた際は、15%よりもさらに抗凍結剤濃度を減少させた凍結が可能となっている。

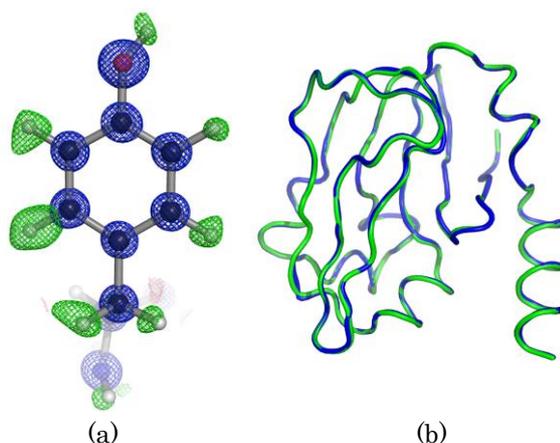


Fig. 6 (a) The electron density map around Tyrosine 116 of high-pressure cryo-cooling structure of bovine H-protein (Green blobs show the electron density of hydrogen atom.) (b) Overall structure comparison between high- and atmospheric-pressure cryocooling structures of bovine H-protein.⁹⁾ Reproduced with permission of the International Union of Crystallography.
Reproduced with permission of the International Union of Crystallography.

5. 回折強度データ測定と解析

Bovine H-proteinをモデルタンパク質とした高分解能X線結晶構造解析では、高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所 Photon Factoryのビームライン BL-5AでX線回折実験を実施し、0.88 Å分解能のX線回折強度データを収集し、bovine由来H-proteinの構造決定に成功した³⁾。構造解析の結果約40%の水素原子の電子密度が観測された。構造決定した高分解能の構造と測定データを元に、回折強度データの取り扱い方法の最適化を行った。高分解能の回折強度データ収集においては一度の回折実験で全ての強度データを収集することが不可能である。例えば、弱い高分解能の回折強度測定のための長時間露光により低分解能回折強度が検出器の検出限界を超えたり、低分解能の回折点がビームストッパーに遮られ検出できなかったりといった理由による。そのため、異なる測定条件での回折実験が必要となる。測定条件の異なる回折強度データは取り扱い方法により処理結果が異なってくるが、従来の回折強度データの評価方法ではデータの優位性を判断することが困難であった。そこで、水素原子の可視化率を基準にしたデータの評価方法を提唱し、従来の方法では判別できなかったデータの優位性を明らかにすることが可能となった(Fig. 7)。

X線結晶構造解析においては、低分解能から高分解能まで完全性の高いデータ収集することが理想である。しかし、多くの場合、装置の制限上20 Å以下の低分解能データが無視される場合も多い。しかし、高分解能のX線結晶構造解析においても、低分解能領域の回折強度データが水素原子の可視化に重要であることを実データより定量的に示した(Fig. 8)。Figure 8では(1)高分解能の回折強度から、(2)低分解能の回折強度から、(3)ランダムにデータを取り除き、得られたテストデータから電子密度を計算し、水素原子の可視化数をカウントしている。低分解能から順にデータを取り除いた場合は4%で水素原子の可視化率が半減

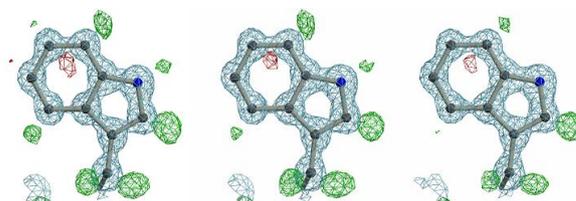


Fig. 7 Electron density maps from data treated with different method. (Green blobs show the electron density of hydrogen atom.)³⁾ Reproduced with permission of the International Union of Crystallography.

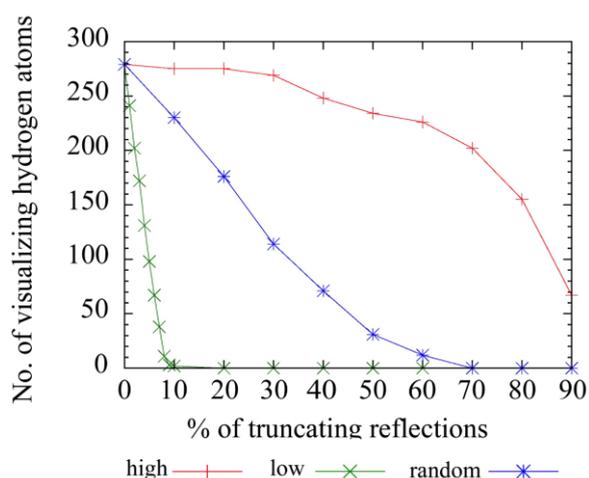


Fig. 8 Number of visualizing hydrogen atoms against truncation of reflections.³⁾ Reproduced with permission of the International Union of Crystallography.

してしまい、10%で水素原子の電子密度はまったく観測されなくなってしまう。水素原子の電子密度を可視化するという点において、高分解能のデータが必須であるのに違いはないが、低分解能のデータの寄与がそのデータ数に反して大きいことが実データを用いて定量的に示された。

6. 終わりに

今後、構造生物学においてはX線結晶構造解析のみならず、中性子結晶構造解析や電子顕微鏡単粒子解析などの技術革新が進み、原子レベルでの構造解析がより一般的になるであろう。タンパク質のX線結晶構造解析も様々な技術開発の積み重ねにより、さらに誰でも容易かつ迅速に実施されるようになるであろう。しかし、良質な結晶を得る過程において万能な方法はタンパク質分子の多様性から難しい様思う。また、超高分解能でのX線結晶構造解析を目指すには、微小重力環境などで得られた良質な結晶の分解能を最大限引き出すための技術開発がこれからも必要で

あろう。今後も、微小重力環境での結晶化と、そこで得た高品質な結晶を用いた高分解能X線結晶構造解析とその周辺技術の開発を引き続き行う予定である。

謝辞

本研究は宇宙航空研究開発機構（JAXA）の高品質蛋白質結晶生成プロジェクトで行われたものでありJAXAの佐藤勝氏、コンフォーカルサイエンスの田仲広明氏、高橋幸子氏、山中麻里氏、厳斌氏、丸和栄養食品の伊中浩治博士、古林直樹氏には実験全般に渡るサポートをしていただきました。また、JEM 利用高品質タンパク質結晶生成実験においては、佐藤勝氏、太田和敬氏、山田貢博士、正木美佳氏はじめ、数多くのJAXAの方々にお世話になりました。回折強度データ収集に当たっては、蛋白質研究所の山下栄樹博士、高エネルギー加速器研究機構およびSPring-8のスタッフの方々実際の現場でのご助力をいただきました。本研究は多くの方々の協力によってなされたものであります。この場をお借りしてお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Y. Hirano, K. Takeda and K. Miki: *Nature*, **534** (2016) 281.
- 2) A. Higashiura and A. Nakagawa: *J. Jpn. Microgravity Appl.*, **29** (2012) 132.
- 3) A. Higashiura, T. Kurakane, M. Matsuda, M. Suzuki, K. Inaka, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka, H. Tanaka, K. Fujiwara and A. Nakagawa: *Acta. Cryst.*, **D66** (2010) 698.
- 4) A. Higashiura, E. Yamashita, M. Yoshimura, K. Hasegawa, Y. Furukawa, K. Takashi, G. Ueno, M. Yamamoto, T. Tsukihara and A. Nakagawa: *AIP Conf. Proc.*, **1741** (2016) 0300281.
- 5) H. Yamazaki, H. Ohashi, Y. Senba, T. Takeuchi, Y. Shimizu, M. Tanaka, Y. Matsuzaki, H. Kishimoto, T. Miura and Y. Terada: *J. Physics Conference Series*, **425** (2013) 052001.
- 6) H. Murakami, G. Ueno, N. Shimizu, T. Kumasaka and M. Yamamoto: *J. Appl. Cryst.*, **45** (2012) 234.
- 7) G. Ueno, H. Kanda, T. Kumasaka and M. Yamamoto: *J. Synchrotron Radiat.*, **12**(Pt 3) (2005) 380.
- 8) C.U. Kim, R. Kapfer and S.M. Gruner: *Acta Cryst.*, **D61** (2005) 881.
- 9) A. Higashiura, K. Ohta, M. Masaki, M. Sato, K. Inaka, H. Tanaka and A. Nakagawa: *J. Synchrotron Radiat.*, **20** (2013) 989.