

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)

## 水素原子の可視化を目指したセルラーゼの大型結晶作製

立岡 美夏子<sup>1</sup>・中村 彰彦<sup>1,2</sup>・石田 卓也<sup>1</sup>・高橋 幸子<sup>3</sup>・巖 斌<sup>3</sup>  
田仲 広明<sup>3</sup>・古林 直樹<sup>4</sup>・伊中 浩治<sup>4</sup>・五十嵐 圭日子<sup>1,5</sup>・鮫島 正浩<sup>1</sup>

### Production of Large-volume Cellulase Crystals for Visualization of Hydrogen Atoms

Mikako TACHIOKA<sup>1</sup>, Akihiko NAKAMURA<sup>1,2</sup>, Takuya ISHIDA<sup>1</sup>, Sachiko TAKAHASHI<sup>3</sup>,  
Bin YAN<sup>3</sup>, Hiroaki TANAKA<sup>3</sup>, Naoki FURUBAYASHI<sup>4</sup>, Koji INAKA<sup>4</sup>,  
Kiyohiko IGARASHI<sup>1,5</sup> and Masahiro SAMEJIMA<sup>1</sup>

#### Abstract

Water molecules play important roles in enzymatic reaction especially for hydrolases, which use water as a substrate. Neutron crystallography is a powerful tool for visualizing hydrogen atoms to understand protonation states of protein and orientation of water molecules, while it requires a large-volume crystal (>1 mm<sup>3</sup>) compared with X-ray crystallography. To overcome the hurdle of crystal volume, a counter diffusion device equipped with 2 mm diameter can be used at the microgravity experiments. We report here the crystallization of two cellulases which hydrolyse glycosidic linkages in cellulose.

**Keyword(s):** Large-volume crystal growth, Microgravity, Neutron crystallography, Cellulase

Received 15 November 2016, Accepted 14 December 2016, Published 31 January 2017

#### 1. はじめに

水分子は生命現象の反応場に常に存在し、溶媒として機能するだけでなく、直接的に化学反応に関与している。特に、酵素によって触媒される生体反応において、水分子は重要な役割を有しており、酵素の機能や性質を理解するために排除して考えることのできない分子であると言える。

加水分解酵素は水分子を第2の基質とし、これを使って様々な化学結合を分解する酵素群である。あらゆる生物に分布し、糖や脂質、タンパク質などの分解（もしくは合成）に関わる酵素であり、古くからその機能や触媒機構について様々な角度から研究が行われてきた。さらに、触媒反応に水分子が直接関与するという点で、水との関係がより重要な酵素群であるとも言える。

X線結晶構造解析は、一般的な顕微鏡などでは見ることができない原子レベルの構造情報を得ることができ、酵素を含むタンパク質の構造を知るための手法としても最も広く用いられている。X線結晶構造解析では、酵素を構成するアミノ酸の構造情報が得られるだけでなく、基質類似体（アナログ）などが活性部位に結合する様子を明らかにすることができるため、これまでも本手法によって数多くの加水分解酵素の構造が解析されてきた。しかしながら、X線の回折は電子によって起こるため、炭素や酸素と比較して電子の数が少ない水素原子に関する情報を得ることは難しく、さらに電子を持たない水素イオン（プロトン）を可視化することは、原理上不可能である。つまりX線結晶構造解析では、加水分解酵素において触媒に関与するアミノ酸のプロトン化状態や、触媒機構を理解する上で重要

1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

2 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

Institute for Molecular Science, National Institute of Natural Science, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan.

3 (株) コンフォーカルサイエンス 〒101-0032 東京都千代田区岩本町 2-12-2 第2 早川ビル 7F

Confocal Science Inc., 7F 2nd Hayakawa Building, 2-12-2, Iwamoto-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032, Japan.

4 (株) 丸和栄養食品 〒639-1123 奈良県大和郡山形町 170-1

Maruwa Foods and Biosciences Inc., 170-1, Tsutsui-cho, Yamatokoriyama, Nara 639-1123, Japan.

5 VTT Technical Research Centre of Finland, P.O.Box 1000, Tietotie 2, Espoo FI-02044 VTT, Finland.

(E-mail: aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

な水分子の配向などの情報を得ることは難しい。

その一方で水素原子やプロトンを観測することが可能な手法として中性子結晶構造解析が知られている。本手法では、X線の代わりに中性子をタンパク質の結晶に照射し、原子核の状態に依存した回折現象から構造情報を得られるため、水素原子やプロトンの位置決定に適しており、中性子結晶構造解析とX線構造解析を組み合わせることで加水分解酵素の触媒機構について重要な知見が得られることが期待される。

結晶構造解析においては、いかに良質な単結晶を得るかがボトルネックとなる。特に中性子結晶構造解析においては、X線結晶構造解析と比較してはるかに大きな結晶（通常1 mm<sup>3</sup>以上）が必要で、さらに結晶サイズだけでなく十分な分解能とデータの質を保證できる高品質な結晶を作成することが求められる。微小重力環境下で結晶化を行うと、結晶のクラスター化の原因となる過剰な核形成や対流が抑えられ、不純物の結晶への取り込みが起りにくくなるため、宇宙実験はタンパク質結晶の高品質化や大型化に有利と考えられる。しかしながら、中性子結晶構造解析のために必要となる結晶サイズを実現するには、X線構造解析を前提に発展してきた既存の結晶化手法とは異なる結晶化方法やノウハウが必要となる。

本稿では、多糖の一種でありバイオマスとしての有効活用が求められているセルロースを加水分解する酵素であるセルラーゼに関して、微小重力下における大型結晶作成のためにこれまで筆者らが行ってきた取り組みについて紹介したい。

## 2. 立体反転型セルラーゼの特殊な反応機構

セルラーゼは、グルコースが $\beta$ -1,4-グルコシド結合した多糖であるセルロースを加水分解する酵素の総称である。繊維・製紙産業にも広く利用され、家庭用洗剤にも含まれる酵素である。セルロース等の多糖やオリゴ糖における $\beta$ -グリコシド結合は非常に安定性が高い結合であるため<sup>1)</sup>、このような強固な結合を加水分解するためにセルラーゼがどのような分子機構を持っているのかは非常に興味深い。

本稿で取り上げるセルラーゼ *PcCel45A* および *PcCel6A* は、どちらも担子菌(きのこ)の一種である *Phanerochaete chrysosporium* が、木材を分解して資化する際に生産する糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase: GH) である。GH は一般的に反応の前後で糖の立体異性 (アノマー) 構造が保たれる「立体保持型」と反転する「立体反転型」に分類されるが、*PcCel45A*、*PcCel6A* 共に立体反転型酵素である。立体反転型酵素における反応機構では、グリコシド結合にプロトンを供与する一般酸触媒 (General acid)

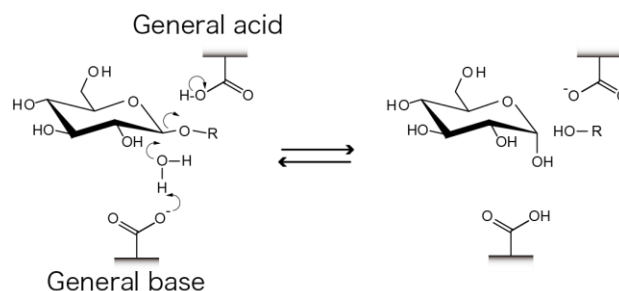


Fig. 1 Typical hydrolytic mechanism of inverting glycosidase.

と、水分子からプロトンを引き抜いて求核性を付与する一般塩基触媒 (General base) の働きによって反応が進行すると考えられている<sup>2)</sup> (Fig. 1)。通常、一般酸触媒・塩基触媒ともに酸性アミノ酸 (アスパラギン酸もしくはグルタミン酸) が用いられるが、立体反転型酵素の中には、一般塩基触媒となるはずの酸性アミノ酸が、活性中心の適切な場所に存在しない酵素が多く報告されてきており、*PcCel45A* および *PcCel6A* はこのような性質をもつ酵素である。

筆者らのグループでは、最近 *PcCel45A* の中性子結晶構造解析を行い、*PcCel45A* が特殊なプロトン化状態 (イミド酸型) のアスパラギン酸を利用した触媒機構を有することを明らかにした<sup>3)</sup>。これは、中性子結晶構造解析によって水素原子を可視化し、加水分解酵素の新たな反応メカニズムを明らかにした例であり、加水分解酵素の反応機構を明らかにする上で本解析手法の有用性を裏付けるものとなった。一方で、*PcCel6A* は特殊な水のネットワークを使った反応機構<sup>4)</sup>がこれまで提唱されてきたが、この酵素においても水分子を活性化する一般塩基触媒となるはずの酸性アミノ酸が存在せず、水の活性化のメカニズムを知るために中性子結晶構造解析が望まれている。

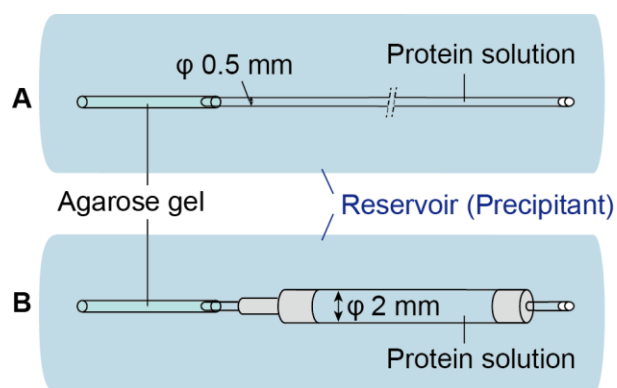
## 3. 中性子結晶構造解析と必要な結晶サイズ

冒頭でも述べたように、中性子結晶構造解析では水素原子やプロトンの位置情報を得ることができる。これは、X線の回折が電子との相互作用によって起こるのに対して、中性子の場合は原子核との相互作用によって回折が起こるため、水素原子や重水素原子でも炭素原子や酸素原子と同等の回折強度が得られることが理由である<sup>5,6)</sup>。また、回折実験に用いられる原子間距離程度の波長が持つエネルギーを比較すると、X線では数 keV であるのに対して中性子では数十ミリ eV であるため、常温でも結晶に損傷を与えずにデータ収集できることも特徴の一つである。

このような利点を有しているにも関わらず、Protein Data Bank (PDB) データベースに登録されている X 線による構造解析結果が 10 万を越え、さらに爆発的な勢いで増え続ける中で、中性子結晶構造解析データは 100 程度であり、タンパク質の種類にすると 50 にも満たないことを考えると、中性子を用いたタンパク質の構造解析が未だ本格化しているとは言い難い。これは、X 線結晶構造解析ではシンクロトロン放射光施設において高輝度 X 線が利用できるため、数  $\mu\text{m}$  角の結晶を用いれば数十分間で完全なデータセットが得られるのに対して、中性子構造解析の場合は大規模な施設であっても強度が数桁低く、その弱いビーム強度を補うために数  $\text{mm}^3$  程度の巨大結晶と数週間の測定時間が必要となるためである。最新の装置を使用することで中性子結晶構造解析においても 1  $\text{mm}^3$  程度の結晶を用いて数日間照射すればデータ収集することが可能になっているが、この結晶サイズは依然として X 線で必要な結晶サイズの 1,000 倍もの大きさであることから、どのようにして結晶の大型化を達成するかが課題として残されるのである。

#### 4. 微小重力下での大型結晶作製ツール SLC

他の文献で紹介されているように<sup>7,8)</sup>、JAXA の微小重力実験で主に用いられているカウンターディフュージョン (CD) 法では、タンパク質溶液の入ったキャピラリーに寒天ゲルを充填したシリコンチューブを接続し、これを介して外部のリザーバー溶液とキャピラリー内のタンパク質溶液が液液拡散によってゆっくりと混合される仕組みとなっている (Fig. 2A)。現在、宇宙実験には 0.5 mm 径のキャピラリーが使用されるが、中性子結晶構造解析用の結晶サイズを得るためにはキャピラリー径が足りないため、より径の大きいキャピラリーを使う必要がある。以下



**Fig. 2** Counter diffusion system for usual JAXA experiment (A) and Large-volume crystal growth (SLC) (B).

に、微小重力実験で大型結晶を得るために開発された大型結晶作製ツール SLC (Sealbag Large Cell) の概要を紹介する。

SLC では宇宙実験に通常用いられるより細い 0.3 mm 径のキャピラリーを短くし、その先に 2 mm 径の大型キャピラリーが接続された形となっている (Fig. 2B)。寒天ゲルを接続しない反対側は 0.3 mm 径のキャピラリーが接続され、通常系と同様に拡散が起こらないようシーリングコンパウンドで密封され、キャピラリー内の液量は約 35  $\mu\text{l}$  となる。2 mm 径キャピラリーはガラス製のものと同様に石英製のものが 2 種類あり、石英製のキャピラリーは直接中性子回折実験に利用できるように開発されたものである。中性子実験では通常バックグラウンドの低い石英キャピラリーセルに結晶を封入して回折実験を行うため、石英製のキャピラリー内で結晶が得られた場合には溶液を取り除くなどの操作の後、そのまま回折実験を行うことも可能である。

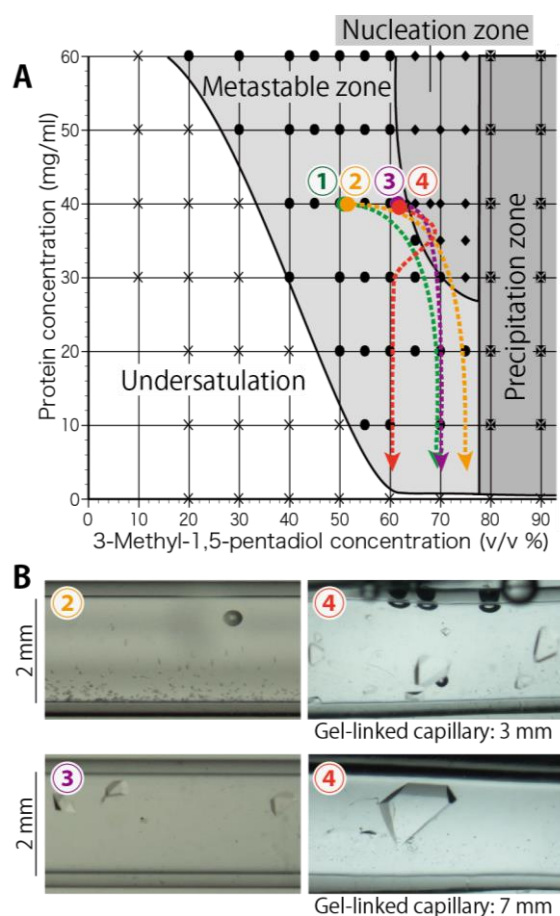
### 5. SLC を用いた結晶化の実際

#### 5.1 相図に基づく *PcCel45A* 結晶の大型化

我々は、*PcCel45A* の結晶成長相図を作製し、最適な条件を検討することで、シッティングドロップ (SD) -蒸気拡散 (Vapor diffusion: VD) 法によって 6  $\text{mm}^3$  の巨大結晶を得ることに成功した<sup>9,10)</sup>。ここでは、相図を用いたタンパク質結晶の大型化が、CD 法にも有効であることを、VD 法との違いにも触れながら紹介する。

VD 法により 3-methyl-1,5-pentandiol (MPD) を沈殿剤として作製した上述の相図を Fig. 3 に示した。タンパク質濃度や沈殿剤濃度を網羅的に検討して結晶成長相図を作製することによって、核形成 (Nucleation) が起こる領域と結晶成長が可能な準安定 (Metastable) 領域を決定することができる。VD 法の場合、はじめに未飽和 (Undersaturation) 領域にあった結晶化溶液が相図上の右上 (高タンパク質濃度-高沈殿剤濃度側) に向かって濃縮され、Nucleation 領域に達したところで核形成が起こり、結晶ができる。一方 CD 法では、寒天ゲルを介した液液拡散によってキャピラリー内の沈殿剤濃度が上昇し、キャピラリー内部が部分的に Nucleation 領域に達する。最終的にはキャピラリー内もリザーバーと同じ沈殿剤濃度に達するが、同時にタンパク質もリザーバーに向かって拡散するため、タンパク質溶液の濃縮が起こらず、むしろ希釈がおこることが VD 法と大きく異なる点である。

SLC で結晶化実験を行った際の、キャピラリー内部の推定濃度変化 (点線) と、各条件で得られた結晶を Fig. 3 に示した。上述のように結晶化が進むと沈殿剤濃度が上昇しタンパク質濃度は低下すると考えられる。キャピラリー内の初期 MPD 濃度が 50 % の場合、ゲル及びリザーバーの



**Fig. 3** (A) Phase diagram of *PcCel45A* (B) Crystals in each condition of panel A.

MPD 濃度が 70 % では結晶が得られなかった (Fig. 3①) が、リザーバーの MPD 濃度が 75 % では多数の微結晶が得られた (Fig. 3②)。また、初期 MPD 濃度を 60 % に高めた条件では、リザーバーの MPD 濃度が 70 % でも結晶が得られた (Fig. 3③)。CD 法では、VD 法にくらべて高い MPD 濃度を用い、さらにキャピラリー内部にあらかじめ沈殿剤を混合することが、確実な核形成に有効であることが明らかとなった。

このように SLC において *PcCel45A* の結晶を再現性よく安定に得る条件を見出したが、その一方で小さな結晶が多数得られる結果となり (Fig. 3②③)、2 mm 径のキャピラリーが用いられる SLC の利点を生かした大型結晶の生成には至らなかった。この結果は過剰な核形成が起こっていることが原因と考えられたため、キャピラリー内の溶液が一旦 Nucleation 領域に入った後、結晶成長が可能な Metastable 領域へと移行するような系を設計することにした。キャピラリー内部のタンパク質溶液とリザーバーと

を隔てている寒天ゲルは、通常は事前にリザーバー溶液に浸漬して使用する。この浸漬溶液をリザーバーと異なる沈殿剤濃度とすることで、液液拡散におけるキャピラリー内の沈殿剤濃度を二段階に変化させることができると考えられた。そこで、寒天ゲルの浸漬溶液には Nucleation 領域の MPD 濃度、リザーバーには Metastable 領域の MPD 濃度を用いて検討した。キャピラリー内部とリザーバーを MPD 濃度 60 %、寒天ゲル浸漬液を MPD 濃度 70 % としたところ、過剰な核形成が抑制され、大きな内径を生かした大型の結晶取得に成功した (Fig. 3④)。さらに、寒天ゲルと 2 mm 径キャピラリーを接続している 0.3 mm 径キャピラリーの長さについても検討したところ、3 mm の場合に比べ、7 mm のキャピラリーを使用した際により再現良く大型の結晶が得られた。

上記の実験は、全て地上で行われ、さらにキャピラリーを横に置いて検討した。しかしながら、キャピラリーを縦に置いた場合には、結晶がキャピラリーの下部方向に沈んでしまっただけで分散しないため、大きく成長することがなかった。微小重力下での結晶化を行う場合、打ち上げの都合上キャピラリーが縦向きとなる時間ができてしまうため、いかに SLC を横向きにしたままで微小重力下に持ち込むかが大型結晶を取得するための鍵となることが分かった。

## 5.2 *PcCel6A* の結晶化条件の検討

*PcCel6A* についても初期の結晶化条件は SD-VD 法を用いて検討を行い、さらなる分解能の向上と大型化を目指すために微小重力実験を行うこととなった。*PcCel6A* の中性子構造解析にはまだ成功しておらず、現在も結晶化条件の検討を進めている段階であるが、前述の *PcCel45A* との違いも含めて紹介したい。

*PcCel45A* の結果から寒天ゲル内とリザーバーの沈殿剤濃度を検討することが非常に効果的であったため、*PcCel6A* の結晶化においても同様な検討を試みた。Figure 4 に得られた結晶と結晶化条件を示す。沈殿剤としてはポリエチレングリコール (PEG) 3350 を用いた。寒天ゲル内は PEG 濃度を高く、リザーバーで低く設定することで *PcCel45A* と同程度の大きな結晶が得られることが分かった。

一方で、*PcCel6A* 結晶は Fig. 4 のように多くの結晶が固まって成長し、クラスター状の結晶に成長することが問題であった。このようなクラスター化しやすい傾向は、SLC を用いた結晶化に限らず、VD 法や 0.5 mm 径のキャピラリーを用いた CD 法でも同様であった。また、同じ条件でセットアップしても、微小な結晶が数多く生成する場合、全く結晶が得られない場合があり、核形成をコントロールすることが非常に難しいことが明らかとなったため、核形成を安定に起こすための工夫が必要となった。

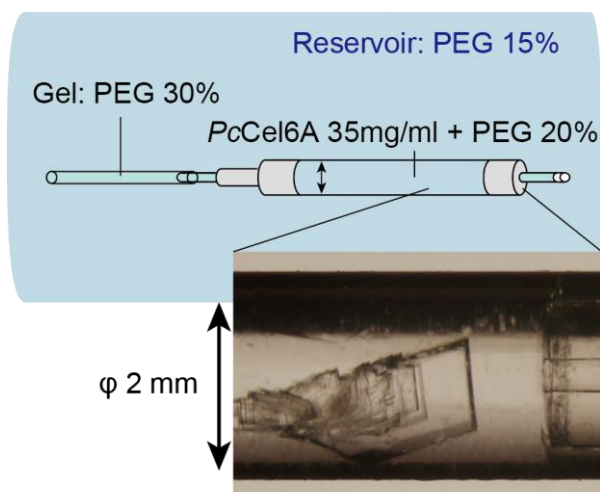


Fig. 4 *PcCel6A* crystals grown in SLC

マイクロシーディング (MS) 法は、あらかじめ他で作った結晶をあえて壊し、非常に小さな「かけら」を結晶核として利用する手法であり、結晶生成の再現性が悪い場合や核形成領域から結晶成長領域への移行が難しい場合に有効な手法である。そこで 0.5 mm 径キャピラリーを用いて *PcCel6A* を微小重力下で結晶化するにあたり、MS 法を検討した (JAXA-PCG#2-2, #2-4)。事前に作製した結晶を砕いて希釈した種結晶液を、0.5 mm 径キャピラリー内のタンパク質溶液中に少量加えて結晶化を行った。宇宙実験および地上実験の結果をそれぞれ Fig. 5A, B に示した。アポ酵素の場合、宇宙実験では地上実験にくらべて結晶の数が少なく、また運良く結晶の成長方向が軸方向であったため 1 mm の長さを越える結晶が得られた (Fig. 5A)。また、基質との共結晶においては、地上実験では良質な結晶が非常に少ないのに対して、宇宙実験では良質な結晶が適度な数生成し、結晶サイズも地上実験に比べて大きかった (Fig. 5B)。0.5 mm 径キャピラリーの実験は中性子構造解析に用いるような大型結晶の作製を試みたものではなかったが、これら微小重力実験で得られた結晶を用いて低損傷かつ高分解能 (0.8–0.85 Å) の X 線回折データセットを取得することができた。また、マイクロシーディングによって *PcCel6A* の結晶化の再現性が大きく改善されたため、SLC を用いた微小重力下での結晶化にも同手法を適用した (JAXA-PCG#2-5)。Figure. 5C に微小重力下および地上で SLC を使って生成した結晶の写真を示す。中性子回折実験が可能なほどの大型結晶を得ることはできなかったが、長さ方向が 600 μm ほどの結晶を得ることができ、基質との共結晶化ではこれまでで最大の結果となった。同じ条件で結晶化を行った地上実験 (Fig. 5C 右) では微結晶

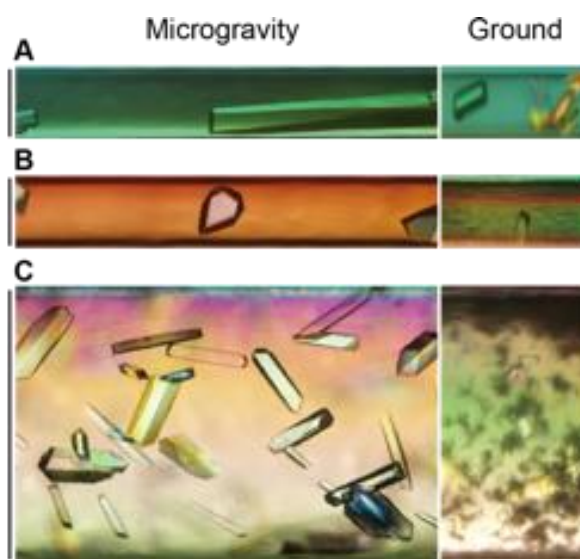


Fig. 5 Crystallization of *PcCel6A* in microgravity and ground experiments (A) *PcCel6A* (Capillary diameter: 0.5 mm, JAXA-PCG#2-2) (B) *PcCel6A* cocrystallized with ligand (Capillary diameter: 0.5 mm, JAXA-PCG#2-4) (C) *PcCel6A* cocrystallized with ligand (Capillary diameter: 2 mm, JAXA-PCG#2-5).

しか得られていないことからわかるように、微小重力下では明らかな結晶の大型化が期待できることがわかった。今後さらに条件を検討し、微小重力下で 2 mm 径のキャピラリーを用いる SLC 利点を生かした大型結晶を取得し、高品質結晶を用いた中性子回折実験を目指したい。

## 6. おわりに

タンパク質の中性子回折実験を行うことができる施設は、まだ世界中に数えるほどしか無いが、我が国には 2008 年から一般利用を開始した世界トップクラスの性能を持つ J-PARC がある。また、数年後にはヨーロッパで新たな施設が稼働する予定であり、より多くの研究者にとって中性子結晶構造解析が身近な解析手法となるであろう。このように最新の設備を利用できる環境が整いつつある一方で、上述の通り大型結晶の作製には多大な労力と試行錯誤が必要とされる。*PcCel45A* では相図を用いた核形成のコントロールを試み、数%の沈殿剤濃度の違いや寒天ゲル接続部の長さなど、小さな点まで気を配って条件を最適化することが大型結晶を得るために重要であることが明らかになった。一方、*PcCel6A* の結晶化では、核形成のコントロールが難しいサンプルであっても、MS 法を用いることで結晶の品質だけでなく大型化も宇宙実験において優位性があることを示すことができた。

中性子ビームによる結晶へのダメージは X 線の場合と比べて小さいため、常温での回折実験が一般的である。その場合、微小重力下で得られたモザイク性 (mosaicity) の低い結晶が、回折データの品質向上により大きく貢献すると考えられる。微小重力下で生成した結晶を用いた中性子構造解析は未だ例が少なく<sup>11)</sup>、さらなる検討が必要であるが、SLC のようなツールや結晶化手法の改善により、これまでになく高品質な中性子構造解析を実現したい。

## 謝辞

本研究は、JAXA JEM 利用高品質タンパク質結晶生成実験 (研究代表者：五十嵐圭日子)、JAXA オープンラボ公募共同研究 (研究代表者：五十嵐圭日子)、文部科学省地球観測技術等調査研究委託事業「高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成」(研究代表者：筑波大学 裏出良博教授)、JSPS 科研費 15J10657 (立岡美夏子) の助成をいただきました。本研究にご協力いただいたすべての方々にお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) R. Wolfenden, X. Lu and G. Young: *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 6814.
- 2) J.D. McCarter and S.G. Withers: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4** (1994) 885.
- 3) A. Nakamura, T. Ishida, K. Kusaka, T. Yamada, S. Fushinobu, I. Tanaka, S. Kaneko, K. Ohta, H. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, N. Niimura, M. Samejima and K. Igarashi: *Sci. Adv.*, **1** (2015) e1500263.
- 4) A. Koivula, L. Ruohonen, G. Wohlfahrt, T. Reinikainen, T. T. Teeri, K. Piens, M. Claeysens, M. Weber, A. Vasella, D. Becker, M. L. Sinnott, J. Zou, G. J. Kleywegt, M. Szardenings, J. Ståhlberg and T. A. Jones: *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 10015.
- 5) 黒木良太: *日本結晶学会誌*, **52** (2010) 48.
- 6) 栗原和男, 田仲伊知朗, 新村信雄: *日本結晶学会誌*, **46** (2004) 193.
- 7) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *J. Synchrotron Radiat.*, **11** (2004) 45.
- 8) S. Takahashi, T. Tsurumura, K. Aritake, N. Furubayashi, M. Sato, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sano, T. Kobayashi, T. Tanaka, K. Inaka, H. Tanaka and Y. Urade: *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **66** (2010) 846.
- 9) A. Nakamura, T. Ishida, S. Fushinobu, K. Kusaka, I. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, M. Masaki, K. Ohta, S. Kaneko, N. Niimura, K. Igarashi and M. Samejima: *J. Synchrotron Rad.*, **20** (2013) 859.
- 10) 中村彰彦, 石田卓也, 鮫島正浩, 五十嵐圭日子: *日本結晶学会誌*, **57** (2015) 59.
- 11) J. D. Ng, J. K. Baird, L. Coates, J. M. Garcia-Ruiz, T. A. Hodge and S. Huang: *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.*, **71** (2015) 358.