

## 4. 周辺科学との協調とその将来

## NMR とタンパク質結晶学

北海道工業技術研究所低温生物化学部 津田 栄

Sakae TSUDA: Modern NMR Spectroscopy and X-ray Crystallography: a Different Approach to Study the Structure and its Function of a Protein.

The NMR spectroscopy has been utilized widely for a elucidation of the structural change of a protein caused by the change of pH, ionic strength, temperature, and ligand concentration in solution. The X-ray was less utilized for these study excutable easily in solution, but is utilized much for the structural determination of a protein. Such difference has ever lead to the situation that the NMR relied on the structure solved by X-ray and the X-ray argued its struture in reference to the conformational change elucidated by NMR. However, recent developments of NMR spectroscopy made it possible to determine the three-dimensional structure, and the X-ray techniques has also been developped to clarify the structural change of a protein. This review compares the recent development of these two techniques, and will discuss about the future collaborating interaction between NMR and X-ray.

## 1. はじめに

1980年代中期, スイス連邦工科大学(ETH)のWüthrich教授はそれまで構造が未知であったアミノ酸74残基からなる $\alpha$ -アミラーゼインヒビターテンダミスタット( $\alpha$ -amylase inhibitor Tendamistat)の全立体構造をNMRのデータだけを用いて決定した。一方, このタンパク質の単結晶X線構造もまたまったく同時期に別のグループにより解かれていた。これらNMR構造とX線構造は1986年の同じ号のJ.Mol.Biol.に掲載され, 両者の構造はほとんど同じであることが分かった。<sup>1), 2)</sup> このことは, タンパク質の三次元立体構造を, X線結晶構造解析法(以下, X線法と略)と同様にNMR法でもきめられることを証明したと同時に, 古くからX線結晶学者により唱えられていた通りタンパク質の水溶液中での構造と結晶中での構造がほぼ同じである事を示す結果になった。

もともとNMR法は, リガンド濃度, 温度, 塩濃度, pH等の変化に伴うタンパク質の状態変化の解析を得意とする。このために旧来のNMR研究では, すでにX線法でその立体構造が決定されたタンパク質分子を研究対象とし, そのリガンド濃度等の変化に伴う状態変化を調べるといった内容のものが多かった。テンダミスタットの構造決定は, このような”NMR研究のX線依存”という関係に一石を投じる大きなでき事だったと言える。

1995年現在で, NMR法により立体構造が決定されたタンパク質でPDB(Protein Data Bank: <http://www.pdb>.)

bnl.gov/)に登録されているものの数は約270個である(mutantも独立な1個として数えた場合。複数の計算構造座標とその平均構造座標が別のファイルとしてある場合はこれらをまとめて1個と数えた)。これに対し, X線法により決定されたタンパク質の数は約3,000個もある(mutantも独立な1個として数えた場合)。つまり, 現時点でNMR法により決定されたタンパク質の数はX線によるものの数の1/10以下でしかない。しかし, 今から7年前の時点でNMRにより決定されたタンパク質個数はたったの30個であり,<sup>3)</sup> その数はわずか数年間で10倍近くにも達していることになる。こうした現状は, 現在のNMR法とX線法の関係が過去のものとは異なった内容に変化していることを伺わせるが, 果たして実際はどうなのだろうか?

本稿では, 最新のNMR法を用いた新しいタンパク質構造研究法がどのようなものかを示すと同時に, 同法のかかえる問題点をX線法との比較において説明する。また, 両法に関する新しい構造変化研究と分子運動研究の現状を検討する。そうして最後に, NMR法の長所とX線法の長所を互いに生かせるような両者の共同研究関係を提案してみたい。

## 2. 最新NMR法によるタンパク質構造決定法

最新NMR法によるタンパク質構造の決定は以下の手順で進められる。

1) 遺伝子工学を用いて目的のタンパク質の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベ

ル体を大量に発現する。

- 2) 得られたラベル体の高分解能多次元NMR スペクトルを得る。
- 3) スペクトルを解析し、二面体角情報および何百もの原子間距離情報を得る。
- 4) 得られた情報を満たす構造を計算により得る。

このように、NMR 法では「結晶化」の過程を必要としない。このことはNMR 法の最大の強みであると言える。同法においてカギとなるステップは、1) にあるところの $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体を得ることである。天然のタンパク質を構成する主な原子は $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  の4種類であるが、このうち $^{12}\text{C}$  と $^{16}\text{O}$  はNMR を示さず $^{14}\text{N}$  はNMR を示すものの感度が低い。結局、この中でNMR 観測にかかるのは $^1\text{H}$  だけである。この情報量不足問題を解決する一つの方法が、観測にかからない $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  を観測にかかる $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  に置き換える、すなわち $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体を得ることというわけである。共有結合でむすばれた（あるいは空間的に近接した）関係にある $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  のNMR 信号は磁氣的相互作用を起こしお互いに混ざり合う。2) のステップにある多次元NMR スペクトルとは、この混ざり合い信号をフーリエ変換することで得られる「相関ピーク」を、3 軸に $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  のNMR 周波数をとった3次元空間上に観測するものである。この相関ピークはタンパク質分子内のすべてのアミノ酸残基について観測され、各々の残基がいかなる磁氣的環境にあるかの情報（近距離情報）を与えることになる。この情報は、3) にある二面体角情報および原子間距離情報ということに焼き直され、そのタンパク質の構造を計算する上での構造束縛条件として用いられる。構造計算には、多次元メトリックマトリクス (Embedding) 法<sup>4)</sup>・<sup>5)</sup> 可変目的関数極小化法<sup>6)</sup> シミュレーテッド・アニーリング法<sup>7)</sup> などが考案されている。いずれの方法も、いかにローカルミニマムに陥らずに全空間をサーチした上で束縛条件を満たす立体構造を算出するかを目的としている。現在はこれらの手法の併用が一般的である。ここで注意が必要なことは、NMR 法では上述のような近距離情報の積み重ねだけで全体構造を計算するために、構造にはタンパク質の形状に依存した“構造のズレ”が存在することである<sup>8)</sup> (粗い三角測量の積み重ねから地図を作っていた時代に、地図にゆがみが生じたことと同じ)。この問題は、より正確な距離情報をより大量に得るということでは解決できない。このために、NMR 法では複数の構造を算出して間違いの程度を検討することが一般的である。

### 3. タンパク質構造決定に関するNMR 法の問題点

タンパク質の構造決定において旧来の $^1\text{H}$ -NMR 法 (1次元法) がかかえた問題の一つは、決定できるタンパク質の大きさが分子量1万程度に限定されていることであ

った。それは、“NMR 信号の観測される周波数範囲は観測核の種類により決まっている”という事実に起因する。例えば600MHzの超伝導磁場を用いた場合、タンパク質を構成する $^1\text{H}$ -NMR 信号が現われるのは通常6,000Hzの範囲内である。このため分子量が大きくなり $^1\text{H}$ の数が多くなると、それらのNMR 信号は6,000Hzの幅の中でどんどん混み合ってしまう。こうなると $^1\text{H}$  同士の相関信号を選択的に取り出すことができない。しかし多次元NMR 法では、 $^1\text{H}$  信号が重畳しても $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  の間の相関信号が重畳しない限り解析が進められる。こうして現在多次元NMR 法により決定されるタンパク質の分子量の限界は3万前後にまでなった。しかし、これ以上の分子量になると相関信号も重畳してくる。理屈の上では更に相関の次元を増やすことや、重水素置換法<sup>9)</sup> により線幅を狭くすることでさらに重畳信号は分離できるといえるが、技術的な問題があるので、多次元NMR 法にもやはり構造決定できる分子量の限界があると言わなければならない。それらの事情を考慮すると、今後全体構造の決定ができるタンパク質分子量の限界は4～5万程度であると予想される。

NMR 法におけるもう一つの問題は研究に要する費用である。タンパク質の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体の発現に必要な $^{13}\text{C}$ -enrich グルコースおよび $^{15}\text{N}$ -enrich 塩化アンモニウム の値段は1 g 当たり各々約13万円および2万円である (1995年現在)。NMR 実験に必要な量 (通常10～30 mg) の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体を得るために仮に2 L の培養液を用いたとすると、 $^{13}\text{C}$ -enrich グルコースが約40～60 g,  $^{15}\text{N}$ -enrich 塩化アンモニウムが約4 g 必要になる。そうすると前者の試薬代は520～780万円、後者は8万円になる。培養実験が一回で成功するとは限らず総費用はかなりの額になる。研究費の捻出ということをここで問題にするべきではないのかも知れないが、このことが多くのNMR タンパク質構造解析屋の足枷であることには違いない。

X線法では電子密度図をフーリエ変換することによりX線回折パターンを算出することができるが、NMR 法では立体構造からNMR スペクトルを算出することができない。このことは、NMR 法ではX線法でいう“分子置換法”が本質的に使えないことを意味する。もちろん、スペクトルの極く一部にしか変化を与えないような少数のアミノ酸残基の置換の場合に、置換前のNMR 帰属ファイルを参照できる場合もある。しかし、例えば筋肉タンパク質トロポニンCの場合をみると、カルシウム非結合 (アポ) 状態とカルシウム結合状態のNMR スペクトルは大きく異なっており (立体構造上では30%程度の違いしかない)<sup>10)</sup> 各々独立に一からNMR 解析をする必要がある。このことは分子置換法のできるX線法とこれの使えないNMR 法との共同研究関係を考える上で、一つのヒントになると思われる。

#### 4. NMR 法の問題点に関する X 線法の状況

分子量 84 万の巨大タンパク質シャペロニンの全体構造が X 線法により解かれたのは 1994 年のことである (ただし 7 量体についての分子量).<sup>11)</sup> この大きさのタンパク質構造を決定することは現在の NMR 法には到底不可能である. X 線法においても, 回折強度は分子量にはほぼ反比例して減少するためにこの大きさのタンパク質の構造決定は極めて困難なはずだが, その問題をどう解決したのであろうか? 大きなタンパク質結晶を得るということも回折強度増大の要因として挙げられるが, やはり決定的なことは超強力 X 線源の利用ということに違いない. 「高エネルギー物理学研究所・放射光実験施設」も, また現在建設中の「SPring-8」も, 普通の研究室の中に収まる NMR 研究施設に比べるとその規模はまさに化け物である. 一方, 残念ながら NMR 分野には共同利用のウルトラ超伝導磁石は存在しない. ウルトラ超伝導磁石の開発自体は以前から試みられているが, これには多くの技術的な困難 (重量, 発熱, 緩和時間の増大, 等々) が伴うとされる. したがって, 現状の磁石を使って分子量限界を克服する手法開発 (固体 NMR 法の応用等) を考える方が現実的だと言える. ちなみに X 線に習う共同研究体制作りとして, 例えば何十台もの NMR 装置を貸し出す共同体を作るとか, 共同大量購入により  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体にかかる費用を下げる等の研究者同士の協力があるべきだという声も高まってきている.

NMR 法で必須の実験ステップとなる遺伝子発現は, X 線法においても目的タンパク質の量的確保という点において重要課題となってきた. また位相問題を解くためにラベル化タンパク質を積極的に利用する方法が考案されている.<sup>12)</sup> この方法では, まずメチオニン残基の側鎖のイオウ原子 (S) を重原子のセレン (Se) に置換したセレノメチオニン (Se-Met) 導入タンパク質を遺伝子工学により得る.<sup>13)</sup> ちなみに 10mg の Se-Met 導入タンパク質を得るのに必要なラベル試薬代は 10 万円以下ですむ. 次にこれを結晶化する. そうしてこの Se-Met 導入タンパク質結晶からの X 線回折を Se 原子の吸収端波長 (0.9797 Å) を含むいくつかの波長で測定する. こうすると, Se の回折強度の波長依存性から Se の位置が求まり, 更にタンパク質結晶からの回折線の位相が求まることになる (多波長異常分散法).<sup>14), 15)</sup> Met を持たないタンパク質に対してはアミノ酸置換を行うことで Se-Met を導入すれば良い. セレノシステイン (Se-Cys) も発現系が確立すれば利用できると思われる. こういった同位体ラベルの手法を用いれば, 旧来の重原子置換に費やしていた時間と手間が不要になるため, 今後 X 線法の主流になっていく可能性がある.

X 線法では分類学上異なる種 (source) から精製され

た同族のタンパク質の構造解析を行うような場合, その位相を解く上ですでに構造の解かれたタンパク質の座標を使うことができる. この方法は上でも述べた分子置換法とよばれ, これに用いるタンパク質の構造骨格は部分的にかなり異なっているにもかかわらず正しい結果が得られることが知られている (例: Thermos Thermophiles Elongation Factor Tu (Nature (1993) 365, 9-10) の解析).<sup>16)</sup> この方法を用いると目的のタンパク質の重原子置換体などを得る必要がない. そのために, 極めて迅速に目的タンパク質の構造決定に至ることができる. 分子置換法は, タンパク質のアミノ酸置換体 (mutant) の構造解析などにも多用され, その優れた迅速性を発揮している.

#### 5. 構造変化の研究に対する NMR 法と X 線法の状況

タンパク質の構造のリガンド濃度, 温度, 塩濃度, pH 依存性に関する知見は, そのタンパク質の物理化学的性質や機能を論じる上で欠くことができない. これらの依存性解析実験の NMR 法によるやり方は, 以下の通りである.

- 1) わずかずつの濃度あるいは温度の変化に伴うスペクトルの位置 (化学シフト) や線幅の変化を観測し, リガンド濃度依存性曲線や温度依存性曲線を得る.
- 2) 得られた曲線に対し仮定に基づく理論曲線の最小二乗フィットを試みる.
- 3) 2) の結果から, 求めたいリガンド結合定数 ( $10^5\text{M}^{-1}$  以下の弱い定数のみ可) や pKa 値, 活性化エネルギー, 熱力学的変数を誤差とともに見積もる.
- 4) 見積もった値を基に, そのタンパク質の性質を議論する.

無論このようなやり方は NMR 法に限らず, Fluorescence や CD など水溶液状態のタンパク質を扱う一般的な分光学的手法についても当てはまる. ちなみに現在の  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体を用いた NMR 法では, タンパク質を構成する一つ一つのアミノ酸残基について上記の依存性解析が行えるようになっている.<sup>17)</sup> 一方, X 線法の場合にはそういった依存性解析実験の内容は大きく異なる. すなわち, タンパク質単結晶を少しずつ温度などを変えた状態 (水溶液) にさらして, そのときの立体構造決定 (精密化) を行うというものになる. したがって X 線法という依存性実験では, 例えばコマ送りのビデオ画像のように視覚的に追える詳細な立体構造変化として結果を示そうという方針になる. 例としては, Frauenfelder らが 1979 年の Nature 誌に発表した温度変化に伴うミオグロビンの立体構造変化の解明等が挙げられる.<sup>18)</sup> ただし, これはタンパク質構造の天然状態から熱変性状態へのダイナミックな構造変化を調べたのではなく, 結晶格子を壊すような構造変化の起きない液体窒素温度から室温の間での変化を解析したものである. リガンド濃度依存性に関しては, X 線法ではタンパク質結晶をリガンド水溶液に浸すことでタンパク質-リガンド複合

体を得てその構造を解析するのが一つのやり方である。しかしこれは依存性の解析ではないので結合定数を与えることにはならない。しかし、結合定数が立体構造（リガンド-基質間の距離など）からきちんと説明されるようになればもちろん話は違ってくる。

結晶中におけるリガンド結合等に伴うタンパク質構造変化の解析を目指したもう一つの新しいX線の手法は「時間分割ラウエ法<sup>19) - 22)</sup>」と呼ばれるものである。普通のX線法では単色光をX線源に用いるが、ラウエ法では多色光を用いる。そうすると、逆格子点は厚みのある反射球表面と交差するため、結晶を連続的に回転させなくても沢山の数の回折が得られることになる。このラウエ法にシンクロトロン放射光の強いX線源を用いた場合、実験に要する時間はミリ秒オーダーですむ。これにより、結晶中で起こるタンパク質の構造変化をミリ秒オーダーで時間分割して解析できるというわけである。しかしこの場合、結晶中のタンパク質が位相をそろえて全部一度に構造変化を起こすことが大前提となる。またラウエ法で得た回折点の強度には波長依存性があるために、通常はこれを単色X線の強度データに補正する必要がある。また、ラウエ法では多数の重畳回折点（低角の反射データ）の強度読みが困難であることも問題となる。<sup>18)</sup>

いずれにしても、いま調べようとしているタンパク質の構造変化が結晶を壊さないことが、これらX線法による実験の前提にある。しかし、特に温度、塩濃度、pH 依存性の実験は結晶の格子定数を変化させ結晶にひび割れを生むとされる。<sup>23)</sup> つまり、単結晶の生成条件に外部から影響を与えるような依存性解析実験は、やはりX線法には極めて難しい。一方、NMR 法では、pH や室温以上での温度を自由に細かく変えてのタンパク質立体構造の決定が十分に可能である。今後はこういったX線法では困難な研究をNMR 法が積極的に行っていくものと思われる。現時点では、異なる2, 3点のpH 条件下でのNMR 立体構造決定がPDB に報告されているだけであり、例えば立体構造の温度依存性の解明などはまったくなされていない。

## 6. タンパク質の分子運動研究に関する NMR 法と X 線法の比較

ラジオ波磁場の照射により非平衡状態にされた核スピンの、その後再び元の平衡状態に戻るまでの時間を緩和時間と呼ぶ。緩和時間は核の分子内回転運動（運動の相関時間）の項を直接含むため、NMR 法では主鎖と側鎖の1つ1つの原子の運動の速さや、これらを取りまく局所構造の束縛の大きさを見積もることができる。<sup>24)</sup>

一方、X線法においては、タンパク質の分子運動に関する情報は温度因子（B-factor, Debye-factor とも言う）で与えられる。温度因子は、分子運動（dynamic fluctuation）

の項の他に結晶格子の乱れ（static disorder）の項（実際にはそれらの長時間平均）を含むため、これから分子運動だけを議論するには注意を必要とする。しかし、先にも紹介したFlaenfelderら（1979）<sup>18)</sup> による結晶構造の温度依存性実験および Artymiuk ら（1979）<sup>25)</sup> らの異なるリゾチーム結晶構造に対する温度因子比較実験の結果は、温度因子からでも積極的に分子運動を議論できることを示している。また、木寺ら（1992）は、運動のモデルを立て、基準振動的因子法（normal mode refinement）という手法によりX線結晶構造データを調べることで、タンパク質分子内のさまざまな運動を解析できると報告している。<sup>26)</sup> この点に関連して、NMR 実験から算出された構造の間のRMSD（root mean square deviation）が、X線から得られる温度因子と似た傾向を持つ例が見いだされている。図1に示すのが、NMR から算出された30個のニワトリ骨格筋トロポニンC（TnC）のN末端側ドメイン（1-90；Ca<sup>2+</sup>非結合状態）の立体構造の間のRMSD プロファイル（主鎖炭素、窒素、酸素原子について）（上）と、同タンパク質のアミド基の<sup>15</sup>N核の横緩和時間（下）である。まず図1の上を見ると、N末端とC末端の各々数残基のRMSDが大きいほか、32番目（Ca<sup>2+</sup>結合ループI）、50番目、および69番目（Ca<sup>2+</sup>結合ループII）付近に大きなRMSDが見いだされる。この傾向はX線解析から明らかにされた同タンパク質のN末端側ドメインの

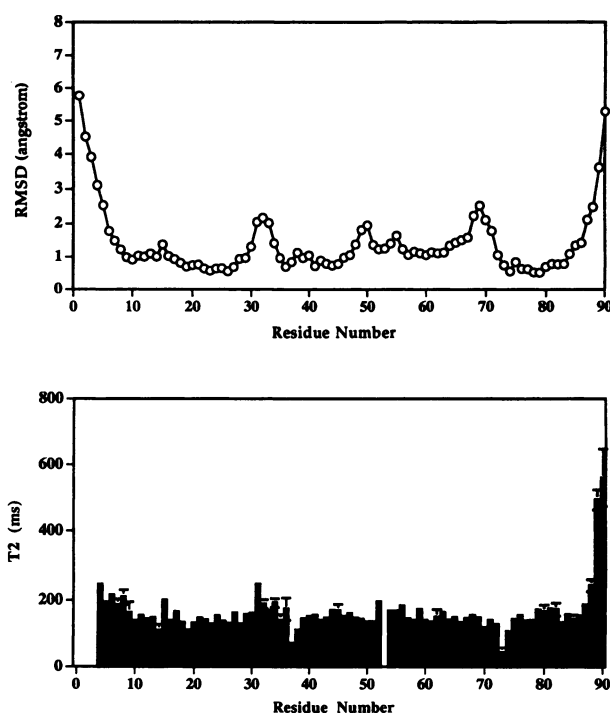


図1 NMR 実験から算出されたニワトリ骨格筋トロポニンC（TnC）のN末端側ドメイン（1-90）の構造の間のRMSD プロファイル（上）と、同タンパク質の主鎖アミド基<sup>15</sup>N核の横緩和時間（下）。



温度因子プロファイル (Herzberg, O and James, M.N.G. (1988))<sup>27)</sup> とまったく同じである。したがって、温度因子が分子運動を反映しているならば、RMSDはCa<sup>2+</sup>結合ループIとIIの部分の運動が他よりも速いことを示すことになる。ところが緩和時間プロファイル(下)には2つのループ部分に相当するピークが現れていない。緩和時間がこのタンパク質の真の分子運動を反映しているならば、RMSDおよび温度因子は分子運動ではなく格子の乱れを反映することになってしまう。この問題は現在検討中でありまた機会を改めて検討したい。いずれにしろ、温度因子とNMR緩和時間の関係解明も興味深い研究課題であることに違いない。

## 7. NMR法とX線法の関係

本稿をまとめると次の事柄に要約される。

- 1) NMR法ではタンパク質の分子運動や構造変化の解析の他に、全体構造決定ができるように研究を進めている。
  - 2) X線法ではタンパク質全体構造決定の他に、分子運動や構造変化の解析ができるように研究を進めている。
- つまり、現在のNMR法とX線法は、タンパク質構造の研究に関して基本的に同じ内容の情報提供を目的に独立に発展し続けていると言える。ただ、"構造決定のX線、構造変化(運動)のNMR"という各々の特徴に事実上の変化はない。

NMR法とX線法の共同研究の一つとして、あるタンパク質のアポ状態とリガンド結合状態を各々が分担して解くというプロジェクトが考えられる。例えば、ある種のCa<sup>2+</sup>結合タンパク質の場合、Ca<sup>2+</sup>結合状態については結晶が得られるがアポ状態については得られない。このような場合、まずアポ状態のタンパク質構造をNMR法を用いて解く。次に、この構造を分子置換法に用いてX線法によりCa<sup>2+</sup>結合状態の構造を解くというわけである。こうすると、NMR法では分子置換法が使えないことによるタイムロスが解消でき、X線法ではCa<sup>2+</sup>結合状態の重原子置換を行わなくて済むことになる。

本稿を書くにあたり、北海道大学大学院理学研究科の田中 勲教授、中川敦史助教授、そして引地邦男教授から御助言を頂きました。またPDBの検索に関して北工研研究生の三浦和紀君に御協力を頂きました。ここに深く感謝致します。

## 文 献

- 1) A.D. Kline, W. Braun and K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.* **189**, 377-382 (1986) .
- 2) J.W. Pfulgrath, G. Wiegand R. Huber L. Vertesy: *J. Mol. Biol.* **189**, 383-386 (1986) .
- 3) 伊倉光彦: "蛋白質のNMR" (荒田洋治・京極好正編) 蛋白質・核酸・酵素 別冊 No.32, pp.7-27 (1987) .
- 4) T.F. Havel and K. Wüthrich: *Bull. Math. Biol.* **46**, 673-694 (1984) .

- 5) T.F. Havel: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **56**, 43-78 (1991) .
- 6) W. Braun and N. Go: *J. Mol. Biol.* **186**, 611-626 (1985) .
- 7) G.M. Clore and A.M. Gronenborn: *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**, 479-564 (1989) .
- 8) T. Nakai, A. Kidera and H. Nakamura: *J. Biomol. NMR* **3**, 19-40 (1993) .
- 9) A.D. Kline and K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.* **192**, 869-890 (1986) .
- 10) S.M. Gagné, S. Tsuda, M.X. Li, L.B. Smillie and B.D. Sykes: *Nature Struct. Biology* **2**, 784-789 (1995) .
- 11) K. Braig, Z. Otwinowski, R. Hegde, D.C. Boisver, A. Joachimiak, A.L. Horwich and P.B. Sigler: *Nature* **371**, 578-587 (1994) .
- 12) W. Yang, W.A. Hendrickson, R.J. Crouch and Y. Satow: *Science* **249**, 1398-1405 (1990) .
- 13) A. Ducruix and R. Giege: "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins", Oxford University Press (1992) .
- 14) K. Moffat: *Nature* **336**, 422 (1988) .
- 15) 中川敦史, 鈴木 守, 田中 勲: 化学 50巻 (8月号) pp.56-57 (1995) .
- 16) H. Berchtold, L. Reshetnikova, C.O.A. Reiser, N.K. Scirmer, M. Sprinzl and R. Hilgenfeld: *Nature* **365**, 126-132 (1993) .
- 17) M.X. Li, S.M. Gagné, S. Tsuda, C.M. Kay, L.B. Smillie and B.D. Sykes: *Biochemistry* **34**, 8330-8340 (1995) .
- 18) H. Frauenfelder, G.A. Petsko and D. Tsernoglou: *Nature* **318**, 375-376 (1979) .
- 19) J.R. Helliwell, J. Habash and D.W.J. Cruickshank: *J. Appl. Cryst.* **22**, 483-497 (1989) .
- 20) I. Schlichting, S.C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E.F. Pai, G.A. Petsko and R.S. Goody: *Nature* **345**, 309-315 (1990) .
- 21) P.T. Singer, A. Smalas, R.P. Carty, W.F. Mangel and R.M. Sweet: *Science* **259**, 669-673 (1993) .
- 22) J.M. Bolduc, D.H. Dyer, W.G. Scott, P. Singer, R.M. Sweet, D.E. Koshland Jr. and B.L. Stoddard: *Science* **268**, 1312-1318 (1995) .
- 23) 三井幸雄: "蛋白質のNMR" (荒田洋治・京極好正編) 蛋白質・核酸・酵素 別冊 No.32, pp.35-39 (1987) .
- 24) アブラガム著: "核の磁性(上)" (富田和久・田中基之訳) 吉岡書店, 第三章 (1961) .
- 25) P.J. Artymiuk, C.C.F. Blake, D.E.P. Grace, S.J. Oatley, D.C. Phillips and M.J.E. Sternberg: *Nature* **280**, 563-568 (1979) .
- 26) 木寺詔紀: 日本生物物理学会誌 **32**, pp.12-17 (1992) .
- 27) O. Herzberg and M.N.G. James: *J. Mol. Biol.* **203**, 761-779 (1988) .

## プロフィール



津田 栄 Sakae TSUDA

北海道工業技術研究所 低温生物化学部, 〒062  
札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1  
321 Bioscience and Chemistry Division, Hokkaido  
National Industrial Research Institute (HNIRI)  
Tsukisamu-Higashi 2-17, Toyohira, Sapporo Japan  
062  
e-mail. tsuda@hniri.go.jp

最終学歴: 北海道大学大学院理学研究科 博士課程中退 理学博士  
専門分野: 生物物理学  
現在の研究テーマ: NMR法による不凍/氷核タンパク質の構造解析