

特集：タンパク質構造機能相関再考

マルチドメインタンパク質コラゲナーゼの
分子内コンホメーション変化の解析大 林 尚 美¹, 村 山 和 隆²

これまでに知られている多くのタンパク質は、複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質である。これまで、個々のドメインの構造や機能は詳細に研究されてきたが、全長構造の解析は様々な問題から困難であることが多かった。しかしながら、マルチドメインタンパク質の機能を明らかにするには分子内のドメイン相互の関係を詳細に調べる必要があり、全長構造の解析は不可欠である。本稿ではマルチドメインタンパク質としてコラゲナーゼを例にとりその全長構造解析に対するアプローチについて概説する。コラゲナーゼはコラーゲンを特異的に加水分解する酵素であり、それぞれのドメインの立体構造はこれまでに報告されている。それらの情報も含め、全長コラゲナーゼの構造とその変化についてさまざまな物理化学的手法による取り組みを解説する。

1. は じ め に

現在、タンパク質の立体構造解析データは論文などへの投稿に際して、ほとんどの場合プロテインデータバンク (PDB) に登録することが義務化されている。この PDB に登録されたタンパク質・核酸の立体構造の数はこれまでのところ約 9 万件に上り、今後も増え続けると思われる。このような立体構造解析の成果の中には近年ノーベル賞を獲得した G タンパク質共役受容体などの膜タンパク質の構造¹⁾やリボソームのような巨大複合体の解析^{2,3)}も含まれている。しかしながら、立体構造解析の主要な手段である X 線結晶構造解析や核磁気共鳴分光法 (NMR) といった方

法には、結晶化の困難さや分子量の制限などいくつかの問題があり、実際にはタンパク質をドメイン単位に分割してサンプルを調製し、構造解析を進めている場合が多い。

タンパク質の配列の解析では単一ドメイン構造のタンパク質よりも、複数のドメイン構造を持つマルチドメインタンパク質の数のほうが数倍多く存在することが知られている^{4,5)}。このようなマルチドメインタンパク質の機能の発現は、それぞれのドメインの組み合わせと相対的な配置に大きく関係すると考えられる⁶⁾。よって、本来、マルチドメインタンパク質の立体構造解析はすべての構成ドメインを含んだ全長構造での解析が重要である。しかしながら現状では先に述べた通り、マルチドメインタンパク質全長の解析は困難な場合が多い。そこで我々はクロストリジウム属 (*Clostridium*) 由来の酵素であるコラゲナーゼ H (ColH) を例にとり、マルチドメインタンパク質全長のコンホメーションとその変化の解析をいくつかの測定手法を組み合わせることで試みた。

2. クロストリジウム属由来コラゲナーゼ

クロストリジウム属細菌は、偏性嫌気性芽胞形成グラム陽性桿菌であり、動物の組織を破壊して食中毒、ガス壊疽などを引き起こす破傷風菌、ボツリヌス菌、ウエルシュ菌

¹ いわき明星大学薬学部 (〒970-8551 いわき市中央台飯野 5-5-1)

² 東北大学大学院医工学研究科 (〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 2-1)

Structure and conformational change of collagenase as multi-domain protein

¹Naomi Ohbayashi and ²Kazutaka Murayama (¹Faculty of Pharmacy, Iwaki Meisei University, 5-5-1 Chuodai-iino, Iwaki 970-8551, Japan; ²Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, 2-1 Seiryō, Aoba, Sendai 980-8575, Japan)

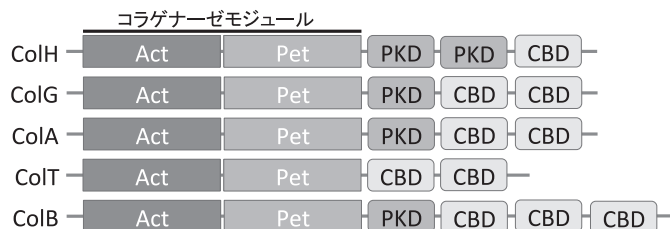


図1 各コラゲナーゼのドメイン構成

コラゲナーゼモジュールは活性化ドメイン (Act) とペプチダーゼドメイン (Pet) からなる。PKD: 多発性嚢胞腎様ドメイン。CBD: コラーゲン結合ドメイン。

などが属している^{7~10)}。これらの細菌が産生するコラゲナーゼは、自らの増殖、伝播、宿主への定着に関与し、これらの菌が病気を引き起こす要因の一つであると考えられている¹¹⁾。このことから、クロストリジウム属コラゲナーゼは、クロストリジウム感染症の高感度の診断法または効率的な治療薬のターゲットになり得ると考えられている。

現在、クロストリジウム属由来コラゲナーゼは、*Clostridium histriticum* 由来のコラゲナーゼ ColG 及び H, *C. perfringens* 由来 ColA, *C. botulinum* 由来 ColB, *C. tetani* 由来 ColT の 5 種類が知られており、いずれも複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質である⁷⁾。活性領域であるコラゲナーゼモジュール [活性化ドメイン (activator domain) とペプチダーゼドメイン (peptidase domain)] はいずれのコラゲナーゼにも共通して存在しているが、他の二つのドメイン [多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease: PKD) 様ドメイン及びコラーゲン結合ドメイン (collagen binding domain: CBD)] の数は、0 から三つと異なっている (図 1)。この PKD 様ドメインと CBD の数の違いが、機能の相違に関与すると考えられるが、その点についてはいまだ明らかになっていない。またコラゲナーゼの活性として、カルシウムイオンが必要であることが報告されているが¹²⁾、ゼラチンなどはカルシウムの有無にかかわらず分解されることから、カルシウムは基質コラーゲンへの結合に重要であると考えられる^{13,14)}。

これらコラゲナーゼのうち ColG と ColH は細胞・組織分散用酵素として使用されており、医療現場においても膵島移植における膵島分離用酵素として用いられている (図 2)¹⁵⁾。

3. クロストリジウム属由来コラゲナーゼの結晶構造

コラゲナーゼの結晶構造解析としてはこれまでに *C. histriticum* 由来のコラゲナーゼについてそれぞれのドメインの構造が報告されている。これまでの報告は主に ColG 由来のドメイン構造であるが、ColG と ColH との間ではドメイン単位で 30% 以上の配列の相同性があり非常に類似した立体構造をとっているものと予想される。以下

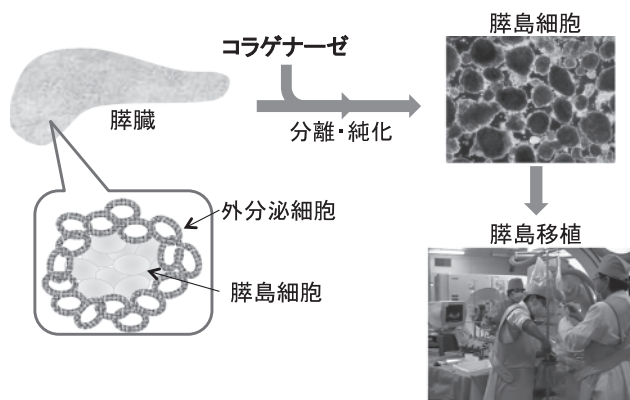


図2 膵島移植までの流れ

ドナーより提供された膵臓はコラゲナーゼ及び中性プロテアーゼで外分泌組織が消化される。その後遠心操作により膵島細胞を分離・純化し、肝臓の門脈より注入される。移植の成功率はこの膵島分離のプロセスが大きなカギを握っており、消化酵素の適切な使用は成功率向上の重要な因子である。

にこれまで解析された結晶構造についてそれぞれ述べる。

1) CBD の構造

CBD は 120 アミノ酸程度の大きさであり、コラゲナーゼのドメイン構造の中で最初に構造解析されたものである。ColG の二つある CBD のうち C 末端側のドメインと ColH のドメインについて構造解析されている^{16,17)}。CBD は 10 本のストランドからなる β サンドイッチ構造を構成している (図 3a)。また N 末端側にはカルシウムが結合することが知られており、ColG の CBD についてはカルシウムの有無で構造解析がなされている。これらの構造の比較から、カルシウムが外れることでドメインの N 末端部は α ヘリックスに構造変化することが観測されている (図 3a)。

2) PKD 様ドメインの構造

PKD 様ドメインは ColG 由来のドメインについて解析されている¹⁸⁾。ドメインの大きさは 90 残基程度とコラゲナーゼを構成するドメインの中では最も小さい。構造はおよそ 7 本のストランドからなる β バレル構造をとっている (図 3b)。N 末端部分においてカルシウムの結合が予想されているものの、結晶化条件にカルシウムを含んでおら

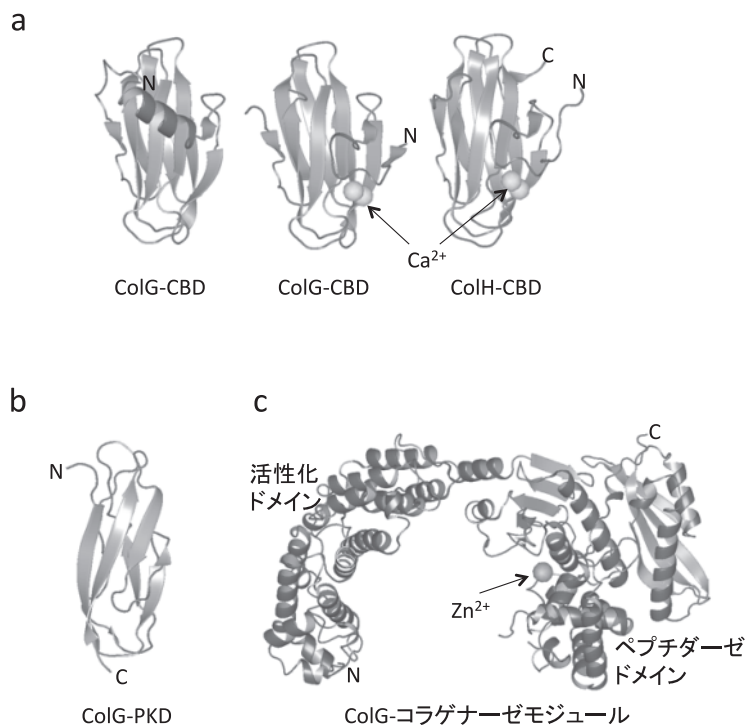


図3 コラゲナーゼの各ドメインの結晶構造

(a) コラーゲン結合ドメインの構造. コラーゲン結合ドメインにはカルシウムが2分子結合する (球で表示). ColGのコラーゲン結合ドメインはカルシウムの結合した構造 (PDB-ID: 1NQJ, 真ん中) と結合していない構造 (PDB-ID: 1NQD, 左) が解析されている. カルシウムがないときはN末端部分の領域がヘリックス構造であることがわかる. ColHの結晶構造としては唯一コラーゲン結合ドメインの構造が報告されている (PDB-ID: 3JQW, 右). (b) 多発性囊胞腎様ドメインの構造 (ColG) (PDB-ID: 2Y72). (c) コラゲナーゼモジュールの構造 (ColG) (PDB-ID: 2Y50). コラゲナーゼモジュールは亜鉛 (球で表示) を活性中心とした活性部位を含んでいる.

ず結晶構造中ではカルシウムの結合は確認されていない. またコラゲナーゼにおける PKD 様ドメインの役割はこれまでのところ明らかとはなっていない.

3) コラゲナーゼモジュールの構造

コラゲナーゼモジュールは ColG 由来のものについて解析された¹⁹⁾. 解析ではコラゲナーゼモジュールと隣の PKD 様ドメインも含んだコンストラクト (Tyr119-Asn880) で結晶化されたが, PKD 様ドメイン (Asp791-Asn880) については結晶中でドメイン配置が乱れていると思われ, 明瞭な電子密度が得られていない. コラゲナーゼモジュールはサドル型の構造をしており (図 3c), 活性化ドメインとペプチダーゼドメインの二つのドメインにさらに分けられる. 亜鉛を活性中心とした活性部位はペプチダーゼドメインに含まれ, サドル型構造の中央部にコラーゲン線維を抱え込んで切断することを予想させる構造となっている.

4. ColH のコンホメーション変化

これまでのコラゲナーゼの結晶構造解析はすべてがドメ

イン単位であり, 主に ColG について解析が進められてきた. そこで我々はマルチドメインタンパク質として全長コラゲナーゼの解析を目指し, これまで ColG に比べ注目されていなかった ColH をターゲットとし, 大腸菌発現系によりタンパク質の調製を進め, 種々の方法を用いて構造変化について解析を行った^{20, 21)}.

1) ゲルろ過, 動的光散乱

ゲルろ過クロマトグラフィーは溶出位置から分子量を見積もることが可能なため, 多くの実験で分子量の見積もりや多量体化の確認に用いられてきた. ColH を 1 mM カルシウムを含む条件と EGTA [エチレンジアミン四酢酸] を加えカルシウムをキレートした条件でゲルろ過を行ったところ, 1 mM カルシウムを含む条件では推定分子量が 80,000 程度と計算値 (114,000) に比べ小さく見積もられた. EGTA を加えた条件では EGTA > 1 mM で溶出ピークがシフトし (図 4), 推定分子量がほぼ計算値に近い値となった. ゲルろ過に影響を及ぼす因子としては, 分子量の他に形状, ゲル担体や分

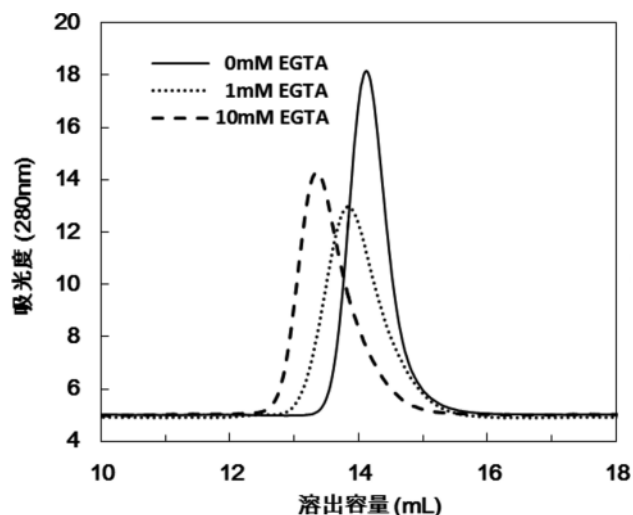


図4 カルシウムのキレートによるゲルろ過ピークのシフト
ColH はカルシウムを含む条件では理論的な分子量よりも小さいところで溶出されるが、EGTA によりカルシウムがキレートされるとほぼ理論的な溶出位置となる。

子間の相互作用が挙げられる。1 mM カルシウムの条件では分子量がかなり小さく見積もられていることから、EGTA の添加によりカルシウムがキレートされ、コンホメーションが変化し、ゲル担体との相互作用が変化したのではないかと予想された。

動的光散乱の測定では、1 mM カルシウムの条件に比べ EGTA を添加した条件では見積もられた分子量としては大きな差は見られないものの (108,000 と 116,000) 多分散度が大きくなり、溶液中でのコンホメーションの変化が示唆された。

2) 示差走査蛍光測定 (difference scanning fluorimetry : DSF)

示差走査蛍光測定はタンパク質が温度の上昇にともない構造が変化 (変性) し、疎水性領域の露出とともに蛍光色素の結合が増え、その際の蛍光強度を解析することで変性温度 T_m を測定する手法である^{22,23)} (図5)。この手法により ColH の T_m を評価したところ、1 mM カルシウムを含む条件では $T_m=54^{\circ}\text{C}$ となった。変性温度は EGTA を加えることで低下し、EGTA>1 mM では 49°C まで下がった。さらに、一度 EGTA を加えてカルシウムをキレートした溶液に対しカルシウムを添加していくと、最終的には元の T_m まで回復した。よって、カルシウムは ColH の安定化に寄与していること、さらにカルシウムの影響が可逆的であることを示す結果となった。

3) 限定分解実験

タンパク質のプロテアーゼによる限定分解は、タンパク質の揺らいだ構造に対し敏感であり、ドメイン部分の推定やコンホメーションの変化などを検出する手法として有用である^{24,25)}。コラゲナーゼのドメインリンカー部分の構造

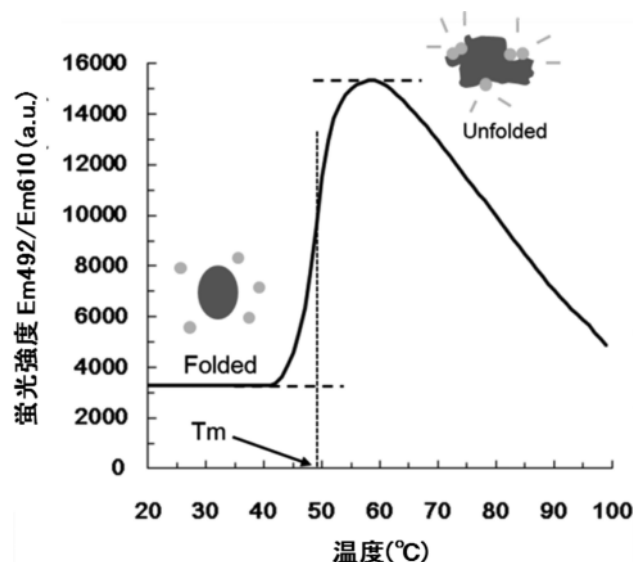


図5 示差走査蛍光測定による T_m の測定原理

SYPRO Orange のような蛍光色素の共存下で温度を変化させつつ蛍光強度の測定をすると、温度上昇にともない構造が変化し疎水性部分が露出して蛍光色素が結合するようになる。その際の蛍光強度を記録し、その変化の中点を T_m とする。

変化については、ColG-CBD についてカルシウムの有無で構造解析がなされている。CBD は結晶構造の項でも述べた通り、カルシウムの有無によってドメインそのものの構造に大きな変化はないものの、N 末端部分のリンカー構造が変化しドメインの相対配置が大きく動く可能性が示唆されている。我々は全長 ColH について、リシンの C 末端側を切断する酵素 Lys-C を用い、1 mM カルシウムを含む条件と EGTA を含む条件で限定分解実験を行った。限定分解産物を SDS-PAGE で分析したところ 1 mM カルシウムを含む条件ではほとんど分解は確認できなかったものの、EGTA を含む条件では 3 本のバンドが確認された。それぞれのバンドを質量分析で確認したところ、それぞれ、ドメインのリンカー部分付近であることがわかり (図6)、特に CBD は素早い分解を受けることが見いだされた。コラゲナーゼモジュールのみのバンドも明瞭に確認できることから、EGTA によるカルシウムのキレートでコラゲナーゼモジュールと PKD 様ドメインとのリンカー部分でも構造変化があり、プロテアーゼによる感受性が大きく変化することが示唆された。

5. X 線小角散乱測定 (small-angle x-ray scattering : SAXS) による ColH の溶液構造

SAXS 測定は近年タンパク質の立体構造やダイナミクスを研究する手段として盛んに用いられている手法である^{26~29)}。特にコラゲナーゼのように部分構造 (ドメイン構造) の蓄積があるものの、全体構造が不明であるような場合、溶液中でそのドメイン配置を解析する方法として非常

に有用である。ColH のドメイン構造は CBD 以外はこれまでのところ報告されていない。しかし、個々のドメイン構造としては ColG で解析されており、このドメイン構造を参考に ColH の全長構造／コンホメーションの解析が可能であると考えられた。そこで、我々は ColH の全長の構造ならびにそのカルシウムによる変化をとらえる目的で SAXS 実験を行った²¹⁾。

1) SAXS 測定によるビーズモデルの構築

SAXS 測定においては X 線結晶構造解析や NMR などのような高分解能の構造情報は得られないが、分子のグローバルな構造やその変化を解析することが可能である。SAXS 測定からは分子の大きさに関するパラメータ（慣性半径： R_g 、分子長： D_{max} ）や Kratky プロットによるフォールディングの有無などの情報とともに、ダミーアトムモデルの構築によるタンパク質分子の全体構造の解析が可能で

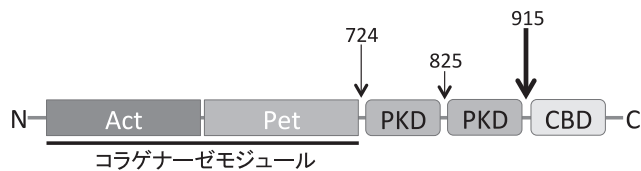


図6 限定分解における主な分解部位

Lys-C による限定分解では分解産物として3本のバンドが確認された。質量分析を用いた解析でこれら分解部位を同定したところいずれもドメインのリンカー部分であった（矢印）。特にコラーゲン結合ドメインの分解は早く、多発性囊胞腎様ドメインのリンカー部分では分解が少なかった。矢印の大きさで分解の程度を示す。

ある。ダミーアトムモデルは、タンパク質分子全体をビーズ（アミノ酸程度の大きさの玉）の集合で表現するもので、これらのアルゴリズムの開発により、現在では実測した散乱データから *ab initio* モデリングが可能となっている（図7）。このような計算の実行には DAMMIN³⁰⁾ や GASBOR³¹⁾ といったプログラムがある。

2) ColH の全長構造

ColH の SAXS 測定は 1 mM カルシウムを含む条件と EGTA を含む条件でそれぞれ行われた。各条件でのダミーアトムモデル構造は $q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ の領域において GASBOR を用いて計算された。1 mM カルシウムを含む条件における ColH の全長構造は片側が膨らんだ細長い構造となっており（図8a）、長さは約 140 Å で幅は 90 Å である。一方、EGTA を含む条件では全体的にさらに細長い構造となった（図8a）。ColG のコラゲナーゼモジュールの構造解析では、予想全長構造として 150 Å 程度の長さのモデルが提唱されていたが、今回のカルシウムを含む条件における ColH の全長構造もそれに近いものとなった。このビーズモデルに対し既知構造ドメインを当てはめることで立体構造モデルを構築したところ、膨らんだ部分にコラゲナーゼモジュールが当てはまり、PKD ドメイン二つと CBD が続くモデルが構成された（図8b）。ColG のコラゲナーゼモジュール構造は活性化ドメインとペプチダーゼドメインが開いた、いわゆるオープンコンホメーションであったが、このコンホメーションはビーズモデルと一致せず、ColH のコラゲナーゼモジュールは溶液中ではクローズコンホ

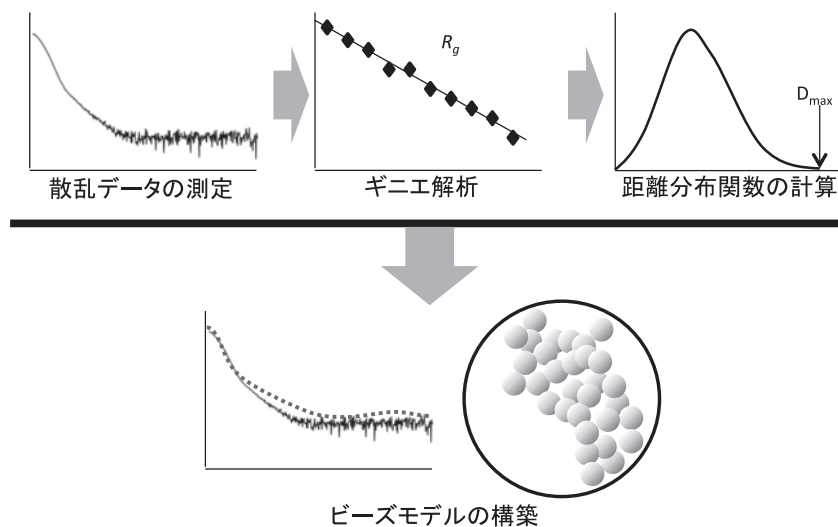


図7 SAXS 解析の流れ

SAXS 解析はまずタンパク質溶液の散乱データの測定から始まる。散乱データは一次元の強度データに変換後（上段左）、ギニエ解析で慣性半径 R_g が求められる（上段中）。引き続き距離分布関数 $P(r)$ が計算され、分子の最大長 D_{max} が求められる（上段右）。ビーズモデルは DAMMIN や GASBOR といったソフトウェアを用い計算され、構築されたビーズモデルから計算される散乱曲線が実測の散乱曲線と十分な一致に到達するまでモデルを修正しながら繰り返し計算される（下段）。

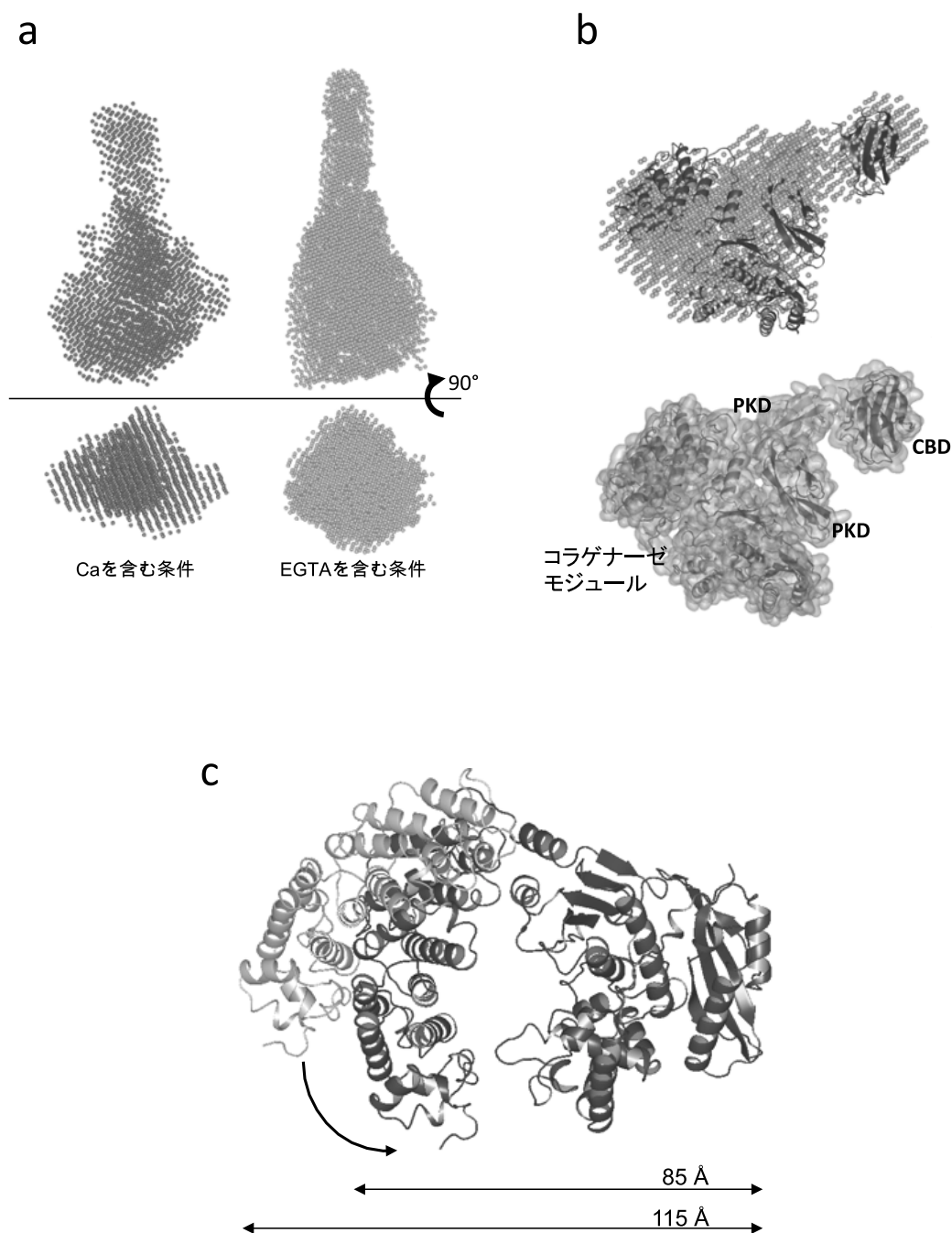


図8 ColH のモデル

(a) GASBOR によって計算されたカルシウムを含む条件でのビーズモデル (左) と EGTA を含む条件でのビーズモデル (右). (b) 個々のドメイン構造を実験データにフィットさせることによって構築された, カルシウムを含む条件での分子モデル. リボンモデルに対しビーズモデルを重ね合わせている (上段). 下段の表面モデルと比較すると全体構造がよく一致していることがわかる. (c) コラゲナーゼモジュールのオープン構造とクローズ構造の比較.

メーションであることが示唆された (図 8c). EGTA の添加による構造の変化は主にドメインリンカー部の構造変化であると予想されたが, コラゲナーゼモジュールに相当する部分でもいくつかの変化が確認され, この部分での構造変化も示唆されている.

3) コラゲナーゼモジュールのコンホメーション変化

コラゲナーゼモジュールのコンホメーションは ColG の結晶構造ではオープン型で報告されており, 一方, ColH の溶液構造ではクローズ型が示唆されている. ColG の結晶構造はカルシウムを含まない条件で実施されており, そ

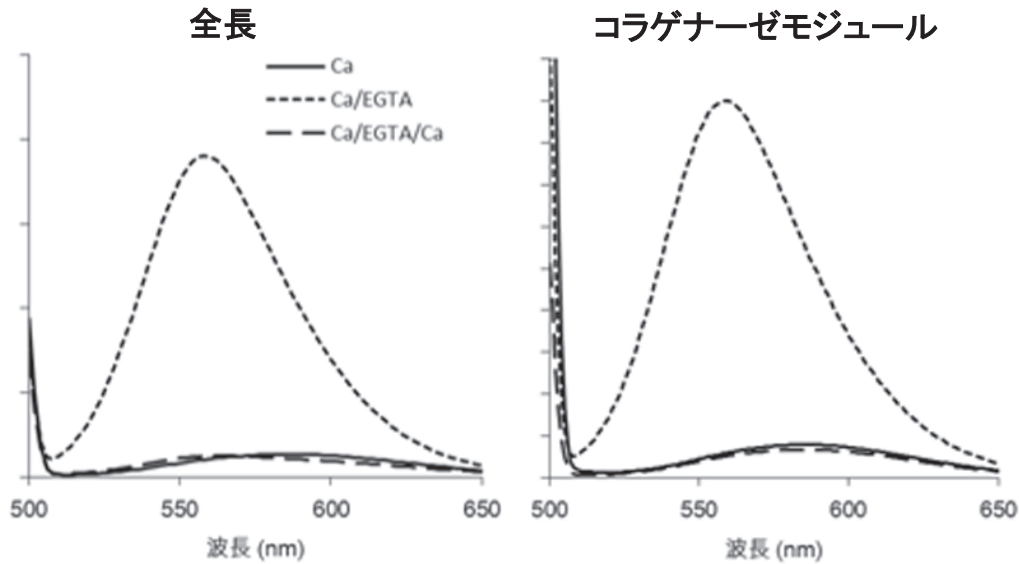


図9 全長ColHとコラゲナーゼモジュール部分の蛍光測定

測定はカルシウムを含む条件、EGTAを含む条件、いったんEGTAでキレートしたものに再度カルシウムを添加した条件の三つで測定している。コラゲナーゼモジュール部分のみ(右)でも全長と同じ蛍光(左)を示し、カルシウムの有無に対し可逆的である。

の点ではオープン/クローズの変化はカルシウムの有無によってコントロールされているという考えも成り立つ。しかしながら、これまでの検討では既知構造のオープン型コラゲナーゼ(モジュール)は、EGTAを含んだ条件でのピーズモデルに一致する合理的なモデルの構成も困難である。この点について我々はコラゲナーゼモジュール(少なくともColH)にはオープン/クローズとは異なるカルシウム依存性の構造変化があると考えている。実際、ColHをSYPRO Orangeのような蛍光色素共存下で蛍光測定すると1 mMカルシウムを含む条件ではほとんど蛍光は観察されないが、EGTAを含む条件では明らかな蛍光強度の増強が起きる。この測定を限定分解の条件を応用して調製・精製したColHのコラゲナーゼモジュール部分に対し実施したところ、全長と同様の蛍光強度の増強が確認された(図9)。よってカルシウム依存性の構造変化はコラゲナーゼモジュール部分にも存在することが示唆された。オープン/クローズ間の構造変化では蛍光色素の結合をとまなうような(疎水性部分露出)構造変化は考えられず、これまでの知見とは異なるコンホメーション変化が予想される。今後この点はさらに研究を進め、どのようなコンホメーション変化が起こっているのか明らかにしていきたい。

6. お わ り に

ヒトゲノム計画でヒトの遺伝子情報が明らかになった後、ゲノム情報に基づいたタンパク質の網羅的解析プロジェクトである構造ゲノムプロジェクトがアメリカ、ヨーロッパ、日本などを中心に実施された^{32,33)}。これらのプロ

ジェクトの中では解析の自動化または迅速な解析のための技術なども開発され、構造解析はより身近な手法になりつつあると感じている。しかしながら、プロジェクト中に解析されたものは単一ドメインタンパク質やドメイン単位で調製されたものがメインであり、膜タンパク質、高分子複合体、マルチドメインタンパク質といったものの結晶化については技術的に困難をとまなうものであることは依然変わりが無い。コラゲナーゼは脾臓細胞分離などの医療分野でも用いられている重要な酵素であるが、これまではやはりドメイン単位での構造解析であり、ターゲットドメインに限られた範囲での分子メカニズムの議論がなされていた。今回紹介したX線小角散乱による低分解能モデルの構築とドメイン構造の組み合わせは、これまで困難であったマルチドメインタンパク質などの解析に有用であり、相補的に用いることができるものであろう³⁴⁾。今後、医療用酵素として性質をさらに最適化する目的などにおいて今回の分子構造が十分活用できると考えている。ゲノムプロジェクトにおいて蓄積された構造情報はかなりのものであり、世の中のドメイン構造の大部分を網羅していると思われる。これらの情報を合わせて解析すればこれまで結晶化等が進展せず解析がなされていなかったタンパク質でも構造-機能の解析が可能になると思われる。

文 献

- 1) Carpenter, E.P., Beis, K., Cameron, A.D., & Iwata, S. (2008) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18, 581-586.

- 2) Rodnina, M.V. & Wintermeyer, W. (2010) *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 1–5.
- 3) Steitz, T.A. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 4381–4398.
- 4) Levitt, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 11079–11084.
- 5) Ekman, D., Bjorklund, A.K., Frey-Skott, J., & Elofsson, A. (2005) *J. Mol. Biol.*, **348**, 231–243.
- 6) Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N.D., Chothia, C., & Teichmann, S.A. (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 208–216.
- 7) Bruggemann, H., Baumer, S., Fricke, W.F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A., & Gottschalk, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1316–1321.
- 8) Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Norimatsu, M., & Tamura, Y. (2000) *Res. Vet. Sci.*, **69**, 289–294.
- 9) Burke, M.P. & Opeskin, K. (1999) *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, **20**, 158–162.
- 10) Hatheway, C.L. (1990) *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**, 66–98.
- 11) Smith, L.D. (1979) *Rev. Infect. Dis.*, **1**, 254–262.
- 12) Bond, M.D. & Van Wart, H.E. (1984) *Biochemistry*, **23**, 3085–3091.
- 13) Matsushita, O., Jung, C.M., Minami, J., Katayama, S., Nishi, N., & Okabe, A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3643–3648.
- 14) Matsushita, O., Koide, T., Kobayashi, R., Nagata, K., & Okabe, A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 8761–8770.
- 15) Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., & Rajotte, R.V. (2000) *New Engl. J. Med.*, **343**, 230–238.
- 16) Bauer, R., Wilson, J.J., Philominathan, S.T., Davis, D., Matsushita, O., & Sakon, J. (2013) *J. Bacteriol.*, **195**, 318–327.
- 17) Wilson, J.J., Matsushita, O., Okabe, A., & Sakon, J. (2003) *EMBO J.*, **22**, 1743–1752.
- 18) Eckhard, U. & Brandstetter, H. (2011) *Biol. Chem.*, **392**, 1039–1045.
- 19) Eckhard, U., Schonauer, E., Nuss, D., & Brandstetter, H. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 1109–1114.
- 20) Ohbayashi, N., Yamagata, N., Goto, M., Watanabe, K., Yamagata, Y., & Murayama, K. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 5839–5844.
- 21) Ohbayashi, N., Matsumoto, T., Shima, H., Goto, M., Watanabe, K., Yamano, A., Kato, Y., Igarashi, K., Yamagata, Y., & Murayama, K. (2013) *Biophys. J.*, **104**, 1538–1545.
- 22) Niesen, F.H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007) *Nat. Protoc.*, **2**, 2212–2221.
- 23) Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., & Nordlund, P. (2006) *Anal. Biochem.*, **357**, 289–298.
- 24) Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., & Zamboni, M. (2004) *Acta Biochim. Pol.*, **51**, 299–321.
- 25) Dokudovskaya, S., Williams, R., Devos, D., Sali, A., Chait, B. T., & Rout, M.P. (2006) *Structure*, **14**, 653–660.
- 26) Jacques, D.A. & Trewhella, J. (2010) *Protein Sci.*, **19**, 642–657.
- 27) Mertens, H.D. & Svergun, D.I. (2010) *J. Struct. Biol.*, **172**, 128–141.
- 28) Svergun, D.I. (2010) *Biol. Chem.*, **391**, 737–743.
- 29) Schneidman-Duhovny, D., Kim, S.J., & Sali, A. (2012) *BMC Struct. Biol.*, **12**, 17.
- 30) Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, **76**, 2879–2886.
- 31) Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., & Koch, M.H.J. (2001) *Biophys. J.*, **80**, 2946–2953.
- 32) Terwilliger, T.C., Stuart, D., & Yokoyama, S. (2009) *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 371–383.
- 33) Brenner, S.E. (2001) *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 801–809.
- 34) 秋山修志 (2007) 生物物理, **47**, 133–138.