

特集：無細胞生命科学の創成

## 無細胞翻訳系における非天然アミノ酸の導入技術の開発とその応用

芳坂 貴弘

リボソームを初めとする翻訳系は、基本的にわずか20種類のアミノ酸を用いてタンパク質合成を行っている。しかし無細胞翻訳系においては、外部成分を自由に添加することが容易であることから、翻訳系の機能を拡張することも可能である。筆者らは、4塩基に拡張したコドンと人工的に合成したアミノアシル tRNA を用いることで、天然には存在しないアミノ酸「非天然アミノ酸」をタンパク質に部位特異的に導入する手法を開発してきた。この手法を用いることで、様々な非天然アミノ酸の導入が可能になり、タンパク質の部位特異的かつ定量的な蛍光標識や、構造機能相関研究、人工機能タンパク質の合成などに応用されている。本稿では、そのような非天然アミノ酸の導入技術の原理とその応用展開について、筆者らの研究成果を交えて紹介したい。

### はじめに

タンパク質は基本的に20種類のアミノ酸から合成されている。このアミノ酸配列を改変することは、部位特異的変異導入技術などにより、容易に行うことができる。しかしここで利用できるのは、あくまで天然の20種類のアミノ酸に限られている。一方、化学合成により天然には存在しないアミノ酸「非天然アミノ酸」を自由に作り出すことができ、ペプチド化学合成などに広く利用されている。このような非天然アミノ酸をタンパク質に自由に組み込むことが可能になれば、タンパク質改変の幅が広がるとともに、全く新しい人工タンパク質のデザインも可能になると期待される。

しかし、タンパク質合成を行っているリボソームを初めとする翻訳系は、全ての生物が共通して持つ極めて基本的なシステムであり、その改変は容易ではない。その一方で、ナンセンスサプレッションやフレームシフトサプレ

ション、セレノシステインの導入など、翻訳系は通常の遺伝暗号の翻訳には従わない過程を行う柔軟性を持っていることも知られている。また、生細胞中の翻訳系の改変はその細胞が発現する全てのタンパク質に影響を与えうることから容易に行うことはできないが、無細胞翻訳系では外来分子を加えるなどの改変は比較的容易である。

このような背景のもと、無細胞翻訳系を利用して翻訳系を改変することで、非天然アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入するための手法が、これまでにいくつか開発されてきている。本稿では、そのような非天然アミノ酸導入のための手法の原理、およびその応用展開について、筆者らの成果を交えて紹介したい。

### 1. 遺伝暗号の拡張

生物はほぼ共通した遺伝暗号表を持ち、それに基づいて20種類のアミノ酸からタンパク質を合成している。したがって、非天然アミノ酸をタンパク質に組み込むためには、非天然アミノ酸用のコドンを遺伝暗号表に新たに割り当てる必要がある。しかし、A, C, G, Uの4種類の核酸塩基を三つ並べたコドンは64種類しか存在せず、それらは天然の20種類のアミノ酸用のコドン、あるいは終止コドンとして使用されており、新たに非天然アミノ酸を割り当てることはできない。

ただし、終止コドンの一つであるアンバーコドン UAG

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科 (〒923-1292 石川県能美市旭台 1-1)

Incorporation of nonnatural amino acids into proteins in cell-free translation systems

Takahiro Hohsaka (School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan)

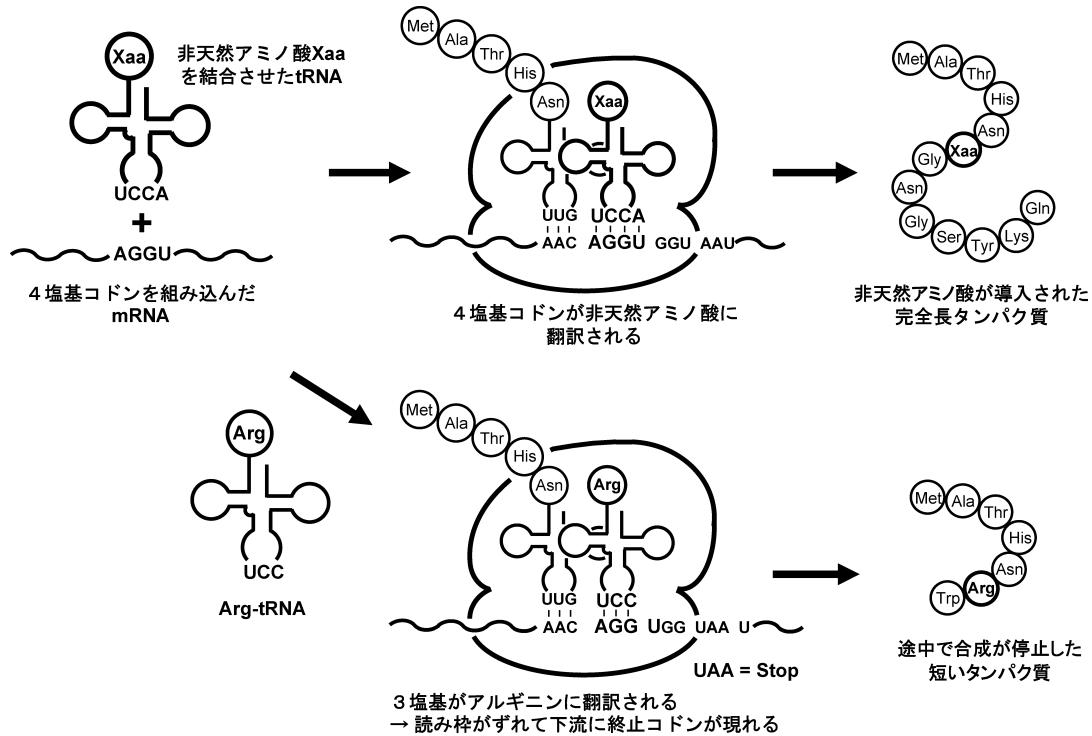


図1 4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への導入法の原理

4塩基コドンを組み込んだ mRNA と、4塩基アンチコドンを持ち非天然アミノ酸を結合させた tRNA を無細胞翻訳系へ加えると、リボソームにおいて4塩基コドンが非天然アミノ酸へ翻訳され、完全長タンパク質が合成される（上図）。一方、最初の3塩基のみが天然の tRNA によって翻訳された場合は、読み枠のずれが生じて、その下流に現れる終止コドンによってタンパク質合成は途中で停止する（下図）。

は非天然アミノ酸の導入に利用することも可能である<sup>1,2)</sup>。これは実際には、UAG コドンに相補的なアンチコドン CUA を持ち非天然アミノ酸を結合させた tRNA を用いることによって、UAG を非天然アミノ酸へ翻訳させることができる。ただし、UAG の翻訳は終結因子によるタンパク質の翻訳停止と競争して起こるために、非天然アミノ酸の導入効率は必ずしも高くない。また、終止コドンは遺伝暗号表に三つしか無いために、そのうちの一つを本来の翻訳停止用として使用すると、残り二つの終止コドンしか使用できない、すなわち最大でも2種類の非天然アミノ酸しか同時に導入することはできない。しかし実際には、終結因子との競争が少ない UAG しか使用できないため、終止コドンを用いる場合には実質的には1種類の非天然アミノ酸の導入にとどまっている。

また、A-U や G-C 以外の塩基対を利用することで、新しいコドンを創り出す試みもなされている。これまでに isoC-isoG 塩基対<sup>3)</sup>や s-y と名付けられた人工塩基対<sup>4)</sup>を用いて、非天然アミノ酸の導入が行われている。ただしこれらの塩基対は、DNA 複製や RNA への転写が特異的に行われないう問題があり、それを解決するような新たな人工塩基対の開発も進められている。

その一方で筆者らは独自に、通常の3塩基からなるコド

ンを4塩基に拡張した「4塩基コドン」に対して非天然アミノ酸を割り当てる、という新しい手法の開発を行ってきた<sup>5-7)</sup>。その原理を4塩基コドン AGGU を例として図1に示している。まず、遺伝子上で非天然アミノ酸を導入したい部位のコドンを4塩基コドン AGGU に置換しておく。一方、アンチコドン部位にそれに相補的な4塩基アンチコドン ACCU (図1中の tRNA のアンチコドンは3'→5'方向に描写されているため UCCA となっている) を持つ tRNA を合成し、その3'末端に導入したい非天然アミノ酸を結合させておく。これら無細胞翻訳系へ加えてタンパク質合成を行うと、リボソームの中で4塩基コドンが4塩基のアンチコドンを持つ tRNA によって認識され、その結果、tRNA に結合させた非天然アミノ酸を伸長中のポリペプチド鎖に組み込むことができる。一方、その他のコドンは通常通り3塩基ずつ翻訳されるため、最終的に得られるタンパク質には4塩基コドンで指定した部分にのみ非天然アミノ酸が導入されることになる。ただし、4塩基コドンの最初の3塩基のみが通常のコドンとして読み取られる場合もある(図1下段)。しかしその場合は、下流の読み枠がずれることになり、多くの場合はその読み枠に現れる終止コドンによって翻訳は途中で停止する。したがって、非天然アミノ酸が導入されたもののみが完全長タンパク質として

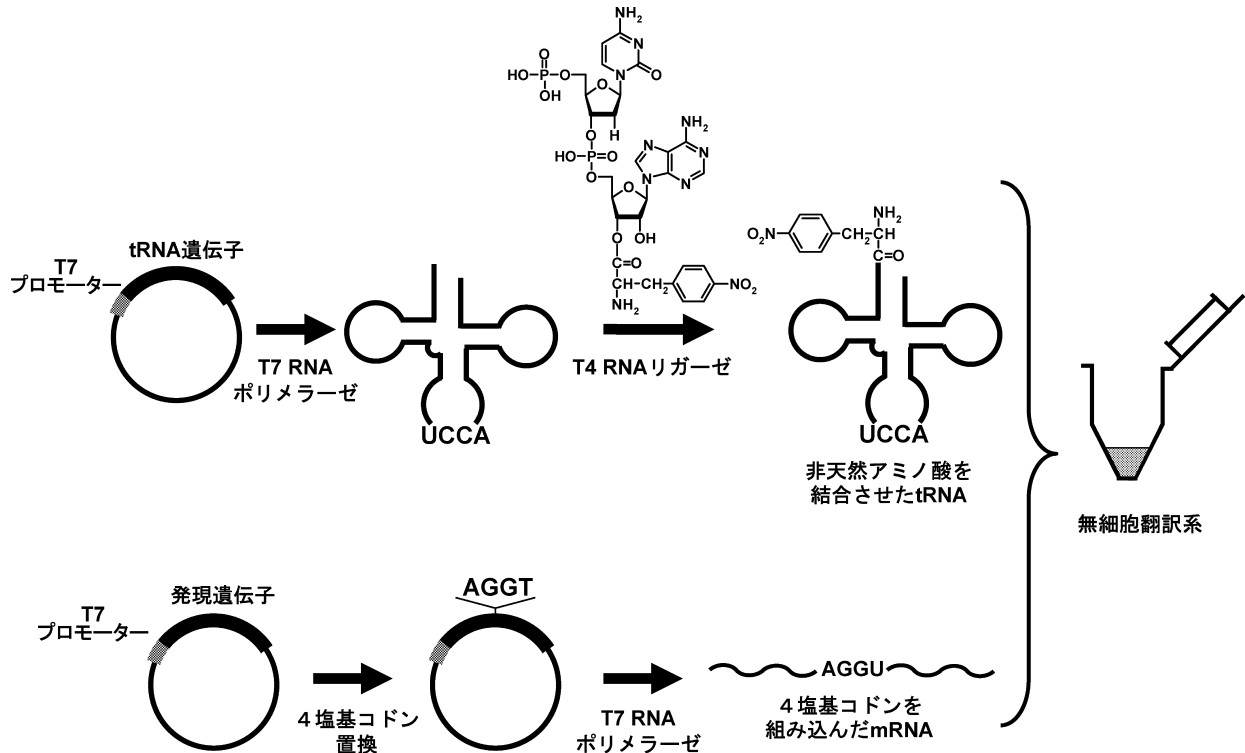


図2 4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への導入方法

得られることになる。ここで、もしずれた読み枠に終止コドンが現れない場合は、同義コドンによる置換を行って終止コドンが現れるようにすることもできる。また、C末端にヒスチジンタグなどを付加しておくことで、非天然アミノ酸の導入された完全長タンパク質のみを容易に分離することもできる。

図1では4塩基コドンとしてAGGUを例示したが、その配列の設計には、コドン使用頻度の偏りが利用できる。例えば、アルギニン(CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG)という6種類のコドンによって指定されているが、大腸菌ではそのうちの前半の三つのコドンが主に使用されており、後半の三つの使用頻度は低い。これに対応して、前半の三つのコドンを読み取るための、アンチコドンにICG (Iは修飾塩基であるイノシンを示す)を持つtRNAは大量に存在するが、後半三つを読み取るtRNAはそれぞれ微量にしか存在しない。したがって、大腸菌の翻訳系において使用頻度の低いAGGなどのコドンに1塩基付加した4塩基コドンでは、3塩基による天然アミノ酸への翻訳はあまり起こらず、4塩基による非天然アミノ酸の導入が効率良く起こることが期待されるのである。

## 2. 無細胞翻訳系における非天然アミノ酸の導入

実際に上記の実験を行う際には、tRNAに非天然アミノ酸を付加する必要がある。生体内でアミノ酸をtRNAの3'末端に結合させる反応は、20種類のアミノ酸それぞれに

対応して存在するアミノアシル tRNA 合成酵素が行っている。この酵素は特定の天然アミノ酸のみを厳密に認識しているため、非天然アミノ酸をtRNAに結合させることは通常は不可能である。そこで、これを回避する方法として「化学的アミノアシル化」と呼ばれる手法が開発されている<sup>8)</sup>。これは、tRNAの3'末端のCCA配列のうちCとAを欠失させておき、その一方で非天然アミノ酸を結合させたCとAからなるジヌクレオチドを化学合成して、それらをRNAリガーゼによって連結させるというものである。この手法を用いると、基本的にはどのような非天然アミノ酸であってもtRNAに結合させることが可能である。

図2にはこの化学的アミノアシル化法も含めて、無細胞翻訳系における非天然アミノ酸の導入方法をまとめてある。まず4塩基アンチコドンACCUを持ち3'末端が2個分短いtRNA遺伝子を化学合成しておき、T7 RNAポリメラーゼにより2塩基欠損tRNAを合成する。一方、非天然アミノ酸を結合させた2個分のヌクレオチドを化学合成し、これらをT4 RNAリガーゼにより連結させることで、4塩基のアンチコドンを持ち非天然アミノ酸を付加したtRNAを合成する。非天然アミノ酸を導入するタンパク質の遺伝子については、導入したい部位のコドンを部位特異的変異導入技術を用いて4塩基コドンAGGTに置換しておく。次にこれを鋳型としてmRNAを合成し、非天然アミノ酸を結合させたtRNAとともに大腸菌由来の無細胞翻訳系へ加え、タンパク質の合成を行う。ここで、無細胞翻

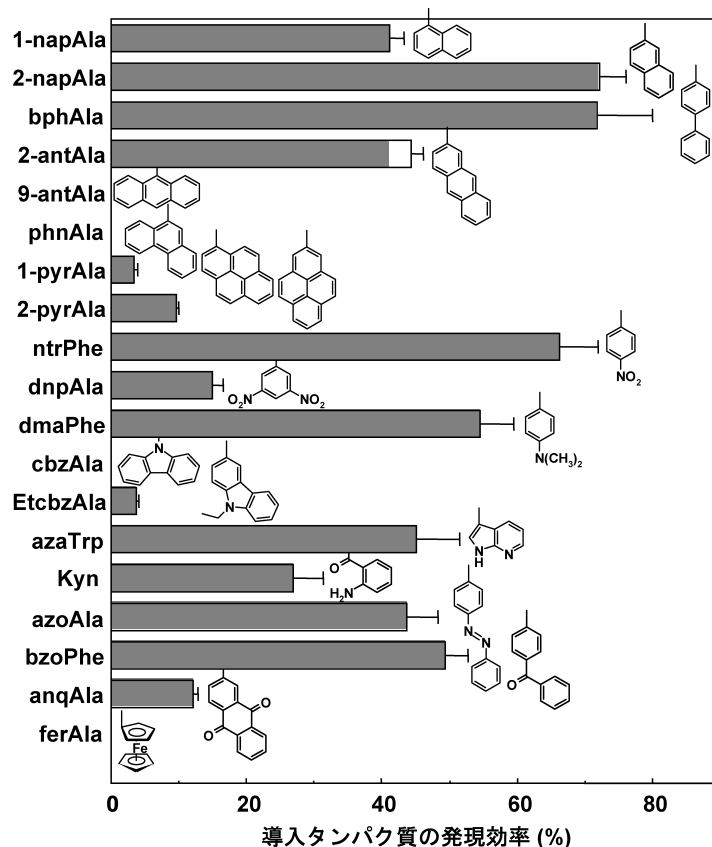


図3 種々の芳香族非天然アミノ酸 ( $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-R})\text{-COOH}$ ; Rは図中の芳香環) のタンパク質への導入効率

横軸は野生型タンパク質の発現量に対する非天然アミノ酸導入タンパク質の相対発現量で表している。

訳系を用いるのは、非天然アミノ酸を付加した tRNA を細胞内へ取り込ませることが困難であることと、アミノ酸と tRNA 間のエステル結合が加水分解されやすく、細胞内で長時間に渡って安定に存在させることが困難なためである。

この方法に従い、非天然アミノ酸としてニトロフェニルアラニンを用いた。ニトロフェニルアラニンを結合させ 4 塩基アンチコドンを持った tRNA を無細胞翻訳系に加えた場合は、野生型と同じ長さのストレプトアビジンが合成されること、翻訳生成物のウエスタンブロット分析により確認された<sup>5)</sup>。一方、4 塩基アンチコドンの tRNA を加えない場合や、アミノ酸を結合させていない tRNA を加えた場合には、途中で停止した短いタンパク質のみが合成された。これらの結果は、4 塩基コドン AGGU が 4 塩基アンチコドン ACCU を持った tRNA により非天然アミノ酸へ翻訳されたことを示している。

同様に様々なコドンを 4 塩基コドンへ拡張することを試みた結果、CGGU, GGGU, CUCU など少なくとも 7 種類のコドンが 4 塩基コドンへ拡張できることが見いださ

れた<sup>7)</sup>。また、4 文字目に付加する塩基は U 以外に代えることもできた。その際の効率は、CGGG や GGGU ではニトロフェニルアラニンを導入したタンパク質の合成量が野生型の場合に比べて 70~80% に達し、終止コドンを用いた場合の約 10% よりもはるかに効率良く非天然アミノ酸を導入できることが示された。これらはいずれも大腸菌において使用頻度の低いコドンを拡張したものであり、3 塩基による読み取りがあまり起こらなかったため、4 塩基コドンとして効率的に機能したと考えられる。その一方で、同様に使用頻度の低い AGA などは 4 塩基コドンへの拡張はできなかった。これらの結果から、4 塩基コドンの翻訳効率は、天然の tRNA による 3 塩基の読み取りによる競合だけでなく、4 塩基コドンの塩基組成の影響、おそらくは CG 含量に大きく影響されていることが示唆される。また、真核生物由来であるウサギ網状赤血球由来の無細胞翻訳系における 4 塩基コドンの翻訳も検討し、CUCU や CGGU などが非天然アミノ酸へ翻訳可能であることが示されている<sup>9)</sup>。

また、このように複数の 4 塩基コドンが得られたことにより、従来は不可能であった複数種類の非天然アミノ酸を

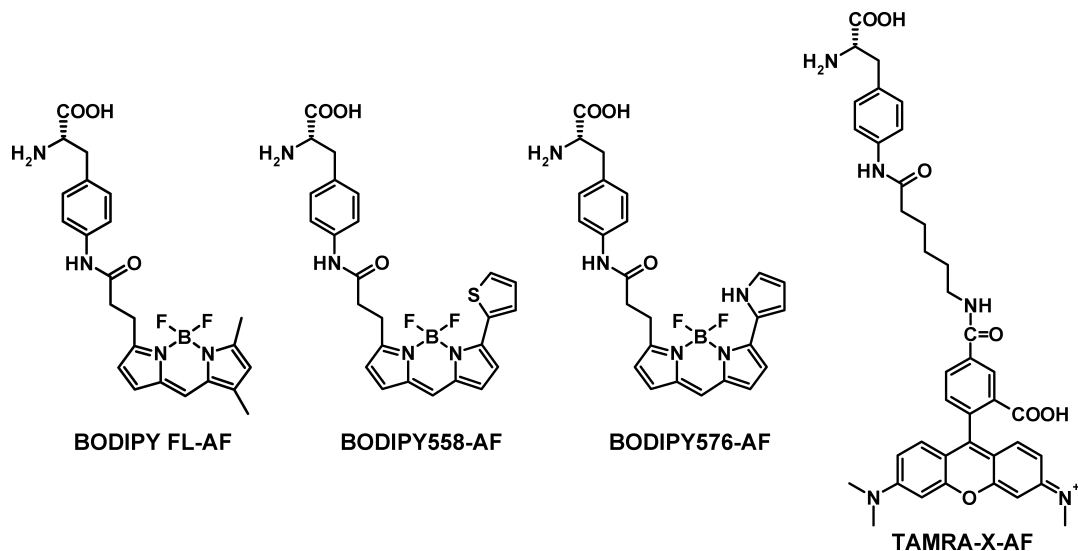


図4 蛍光標識アミノ酸の化学構造

単一のタンパク質へ同時に導入することも可能になる。これは後述するようにエネルギー移動などの複数の分子間で起こる反応をタンパク質に組み込む際に利用することができる。

さらに遺伝暗号の拡張の可能性を検証するために、4塩基コドンだけでなく5塩基コドンについても検討している<sup>10)</sup>。CGGの後ろに2塩基付加した5塩基について調べたところ、相補的な5塩基のアンチコドンを持つtRNAによって、5塩基コドンとして翻訳されることが確認された。ただしその効率は4塩基コドンを用いた場合のほうが高く、実用上は4塩基コドンを用いるほうが良いと言える。また、5塩基のアンチコドンを持つtRNAは4塩基コドンも翻訳できたことから、その翻訳機構としては、アンチコドンが一度に5塩基で対合するのではなく、一旦最初の4塩基が対合し、トランスロケーションの後で1塩基分フレームシフトするメカニズムが考えられる。

### 3. 非天然アミノ酸に対する翻訳系の基質特異性

遺伝暗号を拡張した結果、非天然アミノ酸を効率良くタンパク質へ導入することが可能になった。しかしリボソームを初めとする翻訳系は、どのような非天然アミノ酸でも基質として許容してくれるわけではないことが予想された。そこで、種々の芳香族非天然アミノ酸についてストレプトアビジンのTyr83部位への導入効率を系統的に比較してみた(図3)<sup>6)</sup>。その結果、非天然アミノ酸の側鎖の構造によって導入効率は大きく異なり、場合によっては全く導入されない場合もあることがわかった。興味深いことに、同じナフタレンを持つ非天然アミノ酸であっても、縦型(2-napAla)のものは横型(1-napAla)のものよりも効率良く導入された。さらに、アントラセンでは縦型のもの(2-

antAla)は比較的効率良く導入されるが、横型(9-antAla)では全く導入されなかった。これらの結果は、非天然アミノ酸の導入効率は側鎖の大きさだけでなくその形状によっても大きく異なり、主鎖に対し縦に延びた側鎖は効率が高く、横に広がったものでは効率が低いことを示している。このような知見は、新たな非天然アミノ酸を設計する上で、非常に有用なものとなっている。

### 4. タンパク質の部位特異的蛍光標識への応用

実際にこの知見に基づいて、筆者らは比較的大きな蛍光標識分子を側鎖に持つ非天然アミノ酸を設計し、タンパク質へ導入することに成功している<sup>11)</sup>。タンパク質の蛍光標識は、タンパク質の活性評価や検出などにおいて非常に有用な手法である。通常は、蛍光標識分子を化学修飾法によってタンパク質中のリシン残基やシステイン残基の側鎖に結合させるが、蛍光標識分子を結合させる位置や量を正確に制御することは困難である。そのため、蛍光標識分子をタンパク質に十分に結合させることができなったり、逆に過剰に結合してしまいタンパク質の活性を低下あるいは消失させたりすることがある。また、緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合発現することでタンパク質を蛍光標識することもできるが、GFPの大きな分子サイズはタンパク質の構造や活性に大きな影響を与えてしまうと懸念されるとともに、結合位置はN末端またはC末端に限定されてしまう。

そこで、あらかじめ蛍光標識分子を側鎖に持った非天然アミノ酸を合成し、それを4塩基コドンなどを用いてタンパク質へ導入することにより、蛍光標識分子を指定した位置へほぼ100%の効率で導入することが可能になると期待される。実際には、前述の翻訳系に許容される非天然アミ

ノ酸の構造に倣って、フェニルアラニンのパラ位に蛍光標識分子を結合させたアミノ酸を設計、合成した。この際、蛍光標識分子としても比較的にコンパクトで、かつ、縦に伸びた構造となりうる BODIPY 誘導体を用いることにした。その結果、図4に示す緑色蛍光を示す BODIPY FL、赤色蛍光を示す BODIPY558 および BODIPY576 を結合させた蛍光標識アミノ酸は、4塩基コドンによってタンパク質へ比較的効率良く導入されることが確認できた<sup>11)</sup>。一方、リシンの側鎖アミノ基に BODIPY 蛍光基を結合させた場合は、タンパク質への導入効率は非常に低かった。これらの結果は、パラ置換フェニルアラニン誘導体が翻訳系に適した基質であることを実証するものでもある。

さらに、種々の蛍光標識分子について検討を行ったところ、BODIPY に比べて大きな分子構造となる TAMRA などについても、タンパク質の N 末端近傍の位置に限って導入できることが見いだされている。これは大きな蛍光標識分子は立体障害となるために、長いペプチド鎖とのペプチド転移反応が阻害されているためではないかと考えられる。

このような手法による蛍光標識では、N 末端などの活性に影響しにくい位置へ比較的小さな蛍光標識分子を導入できるため、構造や活性に与える影響を最小限にすることができ、タンパク質の構造や機能の解析に特に有用である。なかでも TAMRA による標識は、一分子蛍光相関分光法によるタンパク質間相互作用の解析に適しており、ピンポイント蛍光標識タンパク質合成用の試薬キットとして製品化もなされている。

### 5. タンパク質の立体構造変化の FRET による計測

上記の蛍光標識法は、4塩基コドンによる2種類の非天然アミノ酸の導入法と組み合わせることで、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づくタンパク質の立体構造変化の計測を可能にする。FRET とは、ある蛍光分子 (ドナー) の蛍光スペクトルと、別の分子 (アクセプター) の吸収スペクトルに重なりがあり、かつドナーとアクセプターが空間的に近接して存在する場合に、ドナーの励起エネルギーがアクセプターへ移動する現象である。FRET の効率はドナーとアクセプターの距離及び配向に依存することから、この原理を利用すると、2種類の蛍光標識アミノ酸をドナー・アクセプターとしてタンパク質の特定部位へ導入しておくことで、タンパク質の立体構造変化を FRET の変化として計測することが可能になる。

そこでまずモデルタンパク質としてカルモジュリンを使用して、4塩基コドン GGGU と CGGG を用いて二重蛍光標識を行った<sup>11)</sup>。まず、N 末端部分と C 末端部分に BODIPY558 および BODIPY FL 標識アミノ酸をそれぞれ導入したところ、ネイティブ状態では、ドナーとなる

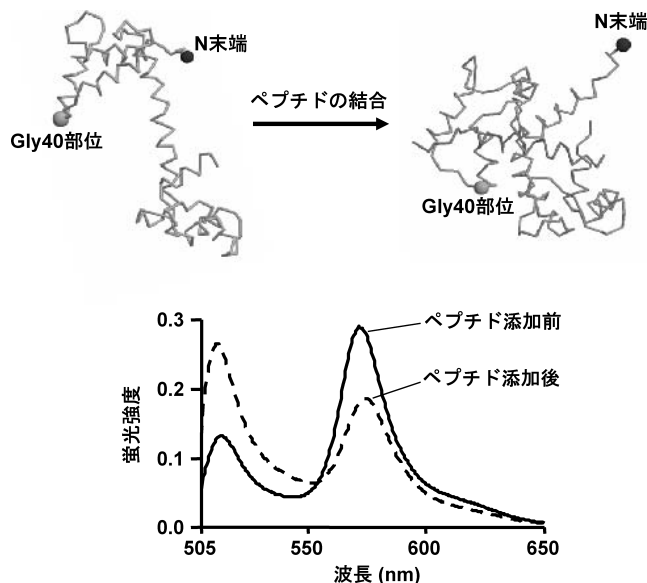


図5 2種類の蛍光標識アミノ酸の導入によるカルモジュリンの立体構造変化の FRET による計測

カルモジュリン結合ペプチドの結合による立体構造変化 (上図) に伴って、ドナーの蛍光が増加しアクセプターの蛍光が増加することが、蛍光スペクトル変化 (下図) として観測された。

BODIPY FL を励起した場合にアクセプターとなる BODIPY558 の蛍光が観察され、FRET が起きていることが確認された。一方、この二重蛍光標識タンパク質を尿素によって変性させて N 末端と C 末端を引き離したところ、FRET は起こらなくなったことから、FRET はタンパク質の立体構造を反映して起きていることが確認できた。

続いて、カルモジュリン結合ペプチドの結合によるカルモジュリンの構造変化を FRET により計測することを試みた。カルモジュリンはカルシウムイオン存在下でカルモジュリン結合タンパク質と結合する際に、大きな構造変化が起こることが知られている。そこでその立体構造変化を FRET により検出するために、まず蛍光標識アミノ酸の導入部位の検討を行った。その際、BODIPY558 の導入部位を N 末端部分に固定しておき、BODIPY FL を様々な部位へ導入して FRET の変化を評価することにした。その結果、BODIPY FL の導入部位を Gly40 とした場合に、カルモジュリン結合ペプチドの添加に伴って FRET 効率が大きく低下することが観察された (図5)。BODIPY558 を直接励起した場合の蛍光偏光度測定からカルモジュリンとペプチドとの結合が起きていることが確認されたことから、FRET 変化はカルモジュリンのペプチドへの結合に伴う立体構造変化を反映していると言える。

ただしこの一連の実験では、X 線結晶構造から大きな残基間距離変化が予想される部位へドナーとアクセプターを導入しても、明確な FRET 変化が観測されない場合もあった。この原因としては、蛍光基がアミノ酸主鎖の位置から

離れて存在しうることや、タンパク質に導入された蛍光基の配向状態がFRETに影響を与えていることなどが考えられる。したがって、FRETに適した蛍光基の導入部位は、立体構造に基づく予測だけでなく、現時点ではある程度試行錯誤的に探索する必要がある。4塩基コドンによる部位特異的な蛍光基の導入は、そのためにも非常に有効な手法である。

### おわりに

非天然アミノ酸の導入技術は、タンパク質の研究を行う上で強力なツールとなりうる、極めて応用範囲の広い技術である。本稿では主にタンパク質の蛍光標識についての応用例を紹介したが、それ以外にも構造機能相関のための天然アミノ酸の類似体やヒドロキシ酸の導入<sup>12)</sup>、翻訳後修飾アミノ酸の導入による修飾タンパク質の合成<sup>13)</sup>、光応答性などの人工機能アミノ酸の導入<sup>14)</sup>、などが行われている。また、基本的に無細胞翻訳系を使用することから、ハイスループットに多種類のタンパク質を得ることが容易である。その反面、無細胞翻訳系の合成収率の低さのために、非天然アミノ酸を導入したタンパク質を大量に合成することは難しく、収量は数十 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度にとどまっている。

一方で、近年アミノアシル tRNA 合成酵素の変異体により、細胞内における非天然アミノ酸の導入も可能になってきている<sup>15)</sup>。ただしこの方法により導入できる非天然アミノ酸の種類はまだ限られていることや、ハイスループット化が困難である点を考慮すると、無細胞翻訳系を使用するメリットも大きい。将来的には、無細胞翻訳系により非天然アミノ酸の種類や導入位置を最適化した後、細胞内発現により非天然アミノ酸導入タンパク質を大量に生産する、

といった使い分けが可能になるのではないかと期待される。

### 参考文献

- 1) Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C., & Schultz, P. G. (1989) *Science*, **244**, 182-188.
- 2) Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., & Diala, E.S. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8013-8014.
- 3) Bain, J.D., Switzer, C., Chamberlin, A.R., & Benner, S.A. (1992) *Nature*, **356**, 537-539.
- 4) Hirao, I. *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.*, **20**, 177-182.
- 5) Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Murakami, H., & Sisido, M. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9778-9779.
- 6) Hohsaka, T., Kajihara, D., Ashizuka, Y., Murakami, H., & Sisido, M. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 34-40.
- 7) Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Taira, H., Murakami, H., & Sisido, M. (2001) *Biochemistry*, **40**, 11060-11064.
- 8) Heckler, T.G., Zama, Y., Naka, T., & Hecht, S.M. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 4492-4495.
- 9) Taira, H., Fukushima, M., Hohsaka, T., & Sisido, M. (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 473-477.
- 10) Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Murakami, H., & Sisido, M. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3646-3651.
- 11) Kajihara, D., Abe, R., Iijima, I., Komiyama, C., Sisido, M., & Hohsaka, T. (2006) *Nature Methods*, **3**, 923-929.
- 12) Cornish, V.W., Mendel, D., & Schultz, P.G. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **34**, 621-633.
- 13) Arslan, T., Mamaev, S.V., Mamaeva, N.V., & Hecht, S.M. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10877-10887.
- 14) Muranaka, N., Hohsaka, T., & Sisido, M. (2002) *FEBS Lett.*, **510**, 10-13.
- 15) Wang, L. & Schultz, P.G. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 34-66.