

中性子と放射光の相補的な利用による創薬標的タンパク質の立体構造解析

黒木良太,* 玉田太郎, 栗原和男, 大原高志, 安達基泰

Collaborative Use of Neutron and X-ray for Determination of Drug Target Proteins

Ryota KUROKI,* Taro TAMADA, Kazuo KURIHARA, Takashi OHHARA, and Motoyasu ADACHI
Japan Atomic Energy Agency, 2-4 Shirakata-shirane, Tokai-mura, Ibaraki 319-1195, Japan

(Received October 16, 2009)

Crystallography enables us to obtain accurate atomic positions within proteins. High resolution X-ray crystallography provides information for most of the atoms comprising a protein, with the exception of hydrogens. Neutron diffraction data can provide information of the location of hydrogen atoms, and is complementary to the structural information determined by X-ray crystallography. Here, we show the recent result of the structural determination of drug-target proteins, porcine pancreatic elastase and human immuno-deficiency virus type-1 protease by both X-ray and neutron diffraction. The structure of porcine pancreatic elastase with its potent inhibitor was determined to 0.94 Å resolution by X-ray diffraction and 1.65 Å resolution by neutron diffraction. The structure of HIV-PR with its potent inhibitor was also determined to 0.93 Å resolution by X-ray diffraction and 1.9 Å resolution by neutron diffraction. The ionization state and the location of hydrogen atoms of the catalytic residue in these enzymes were determined by neutron diffraction. Furthermore, collaborative use of both X-ray and neutron to identify the location of ambiguous hydrogen atoms will be shown.

Key words—neutron crystallography; x-ray crystallography; drug-target protein; inhibitor; drug design

1. はじめに

生体内で働く様々なタンパク質は、相手の分子を正確に見分け、様々な反応を触媒することができる。その複雑な機能には、タンパク質分子を構成する水素原子が深く関わっている。水素原子は、タンパク質を構成するアミノ酸の一部であり、またタンパク質を取り巻く水分子の一部でもある。これらの水素原子は、ある時は分子間で受け渡され、ある時は分極することによってタンパク質の分子認識や反応の触媒に深く関わっている。これまでタンパク質の水素原子の観測（位置の決定）は大変難しかったが、様々な技術の革新によってタンパク質の構成原子の半数を占める水素原子の観測が可能になってきた。水素原子を観測する手法には2通りある。その1つは高い分解能でのX線結晶解析法である。X線結晶構造解析法では、水素原子が持つ電子密度の

分布を観測し、その位置を求める。しかし、各水素原子は共有結合する相手の原子の特徴（電気陰性度の違い）によって水素原子の電子密度の大きさや位置は一定ではない。もう1つの手法は、中性子を用いた結晶回折法である。中性子は水素原子のような軽い原子であっても、炭素や酸素などの原子と同じような強さで相互作用するため、水素原子の原子核の位置を正確に決定することができる。このような興味深い特徴を有する中性子をタンパク質の立体構造の観測に用いる手法と、観測によって得られた知見を用いた創薬研究の可能性を紹介したい。

2. 中性子の特徴とタンパク質構造解析への利用—中性子とX線を同時に用いたときのメリット—

タンパク質の結晶構造解析の手段として、現在最も広く用いられているのは、X線結晶回折法である。しかし、中性子による結晶回折（中性子結晶回折法）を用いても立体構造解析を行うことができる。X線と中性子は異なった特性を有する。X線が原子番号（電子の数）に対し散乱強度を増すのに対して、中性子は原子核による散乱（核散乱）の大きさ（散乱振幅）が原子番号とは無関係に決まっている。

日本原子力研究開発機構（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4）

*e-mail: kuroki.ryota@jaea.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである。

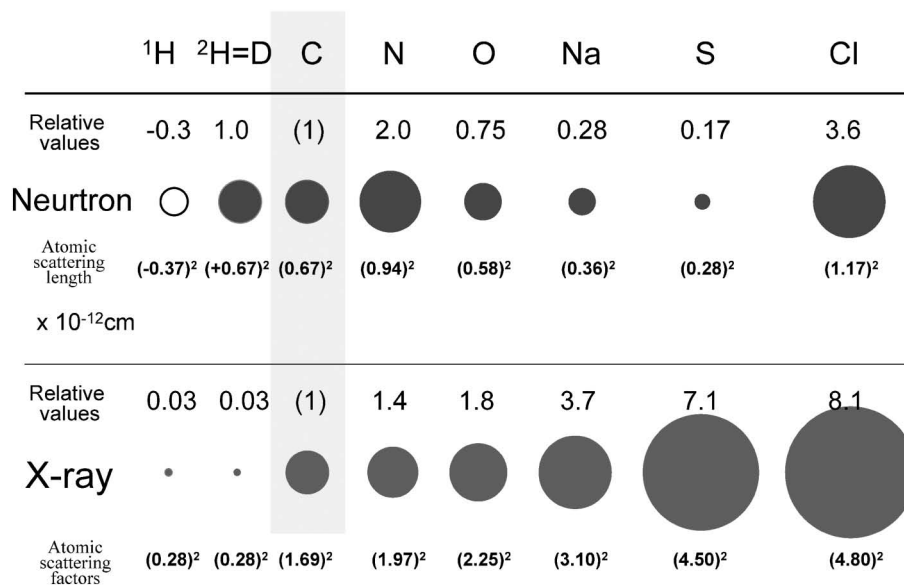


Fig. 1. Neutron Scattering Lengths and X-ray Scattering Factors for the Atoms Comprising Protein Molecules
The size of the circle represents how the density for each atom can be observed.

重い原子と同様に、水素などの軽い原子に対しても同程度の散乱振幅を持つ (Fig. 1)。同じ原子でも同位体により値が異なり、振幅の符号が異なる場合もある。このような特徴を結晶構造解析に応用して、物質中の水素などの軽原子の識別、存在の有無や位置の決定が容易にできる。さらに、このような水素化合物などの立体構造解析は、有機化合物だけでなく、生命活動を担う生体高分子にも広がっている。中性子を利用した構造解析の原理¹⁾や研究成果^{2,3)}については総説を参照されたい。

中性子をタンパク質などの生体高分子の立体構造解析に用いる手法は古くから考案されていた。⁴⁾ その手法が現実的なものになったのは、日本原子力研究所の新村ら (現、茨城大学) によって、中性子の検出を効果的に行うことができる中性子イメージングプレート⁵⁾の開発によるところが大きい。⁵⁾ この検出器は富士フィルムが開発したイメージングプレートにガドリニウム (Gd) を塗布し、中性子を二次放射線 (主に内部転換電子) に変換して検出するものである。この検出器を利用した中性子回折計 2 台 (BIX-3⁶⁾ 及び BIX-4⁷⁾) が、日本原子力研究開発機構の研究用原子炉 (JRR-3) に設置された。この装置の稼動によって日本の中性子構造生物学研究は世界最先端をリードすることになった。現在までに中性子を用いて立体構造解析されたタンパク質は 40 例に満たない。しかしその多くは、フランスのラウ

エ・ランジュバン研究所 (ILL) と日本原子力研究開発機構 (JAEA) (以下、原子力機構と略す) の装置によるものである。JRR-3 に設置された中性子回折計で立体構造解析されたタンパク質を Fig. 2 に示す。

原子力機構の研究用原子炉に設置された 2 台の中性子回折計は、原子炉で発生する中性子線を単色化して結晶試料に照射し、回折イメージを取得する (Fig. 3)。得られたイメージから回折スポットの強度を読み取る手法は X 線回折法と同じである。ただし、中性子ビームの強度が弱いことから、1 フレームのイメージの取得に数時間かかり、全回折点の強度測定には 1 ヶ月以上かかっている。回折データの測定において使われる結晶試料の体積も大きい必要がある。現在の例では格子体積の小さいもの (各軸 50 Å 以下) では 1 mm³ 程度、格子の 1 辺が 100 Å を超える試料では、10 mm³ 近い体積の試料が用いられる。このように中性子ビームの強度が弱いことと、使用する結晶試料の体積が大きい必要があることから、中性子を利用したタンパク質の立体構造解析は一般的な手法とはなっていない。

2008 年、茨城県東海村に大強度陽子加速器施設 (J-PARC) (Fig. 4) が稼動を開始し、⁸⁾ その施設内には新しいパルス中性子源を利用する物質・生命科学実験施設 (MLF) (Fig. 4) が完成した。MLF には茨城県・茨城大学・原子力機構の 3 者が共同開発

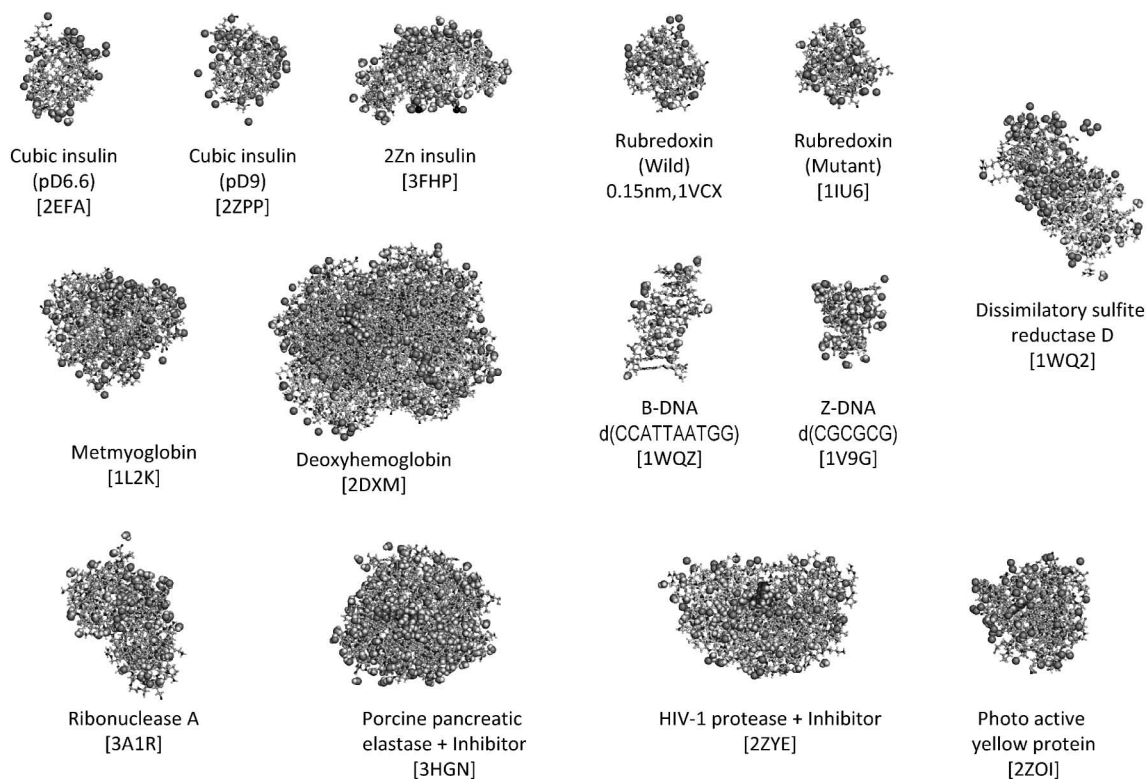


Fig. 2. Protein Structures Determined Using Neutron Diffractometer for Biomolecules (BIX-3 and 4) Installed at Research Reactor (JRR-3) in Japan Atomic Energy Agency

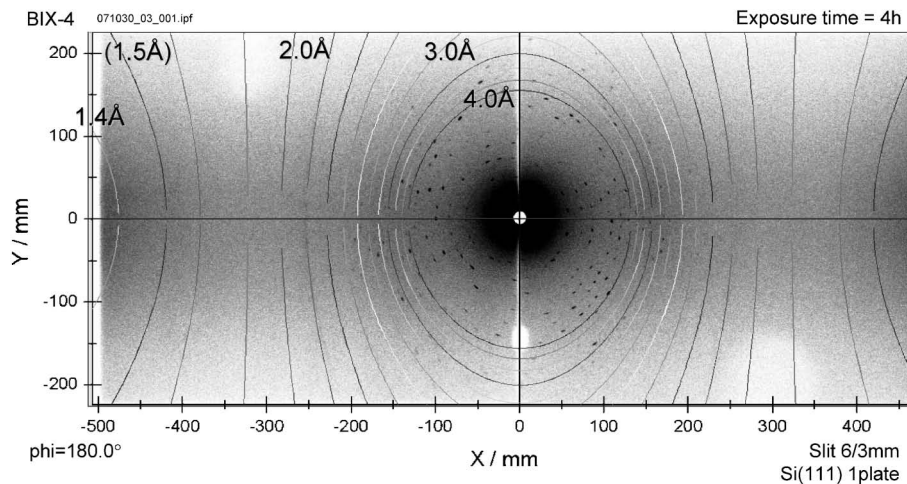


Fig. 3. Example of Neutron Diffraction Image Obtained Using BIX-4

した茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) が設置された。⁹⁾ この装置は産業利用のために建設されたもので、一般のアカデミックユーザが利用できる。現在 (2009 年度) のところ、J-PARC は 20 kW の出力で運転されているため、中性子ビームのタンパク質構造解析への本格利用に至っていないが、最終的 (約 5 年後) に

1 MW での運転が始まると、現在よりも 50 倍の輝度に到達する。J-PARC で作られるのはパルス中性子であるので、中性子の積分強度は原子炉中性子よりも小さいが、様々な波長を含む (白色) 中性子による回折データを時間変化で検出することによって効果的に収集することができ、その収集効率は単色化された中性子の 50-100 倍と試算されている。し

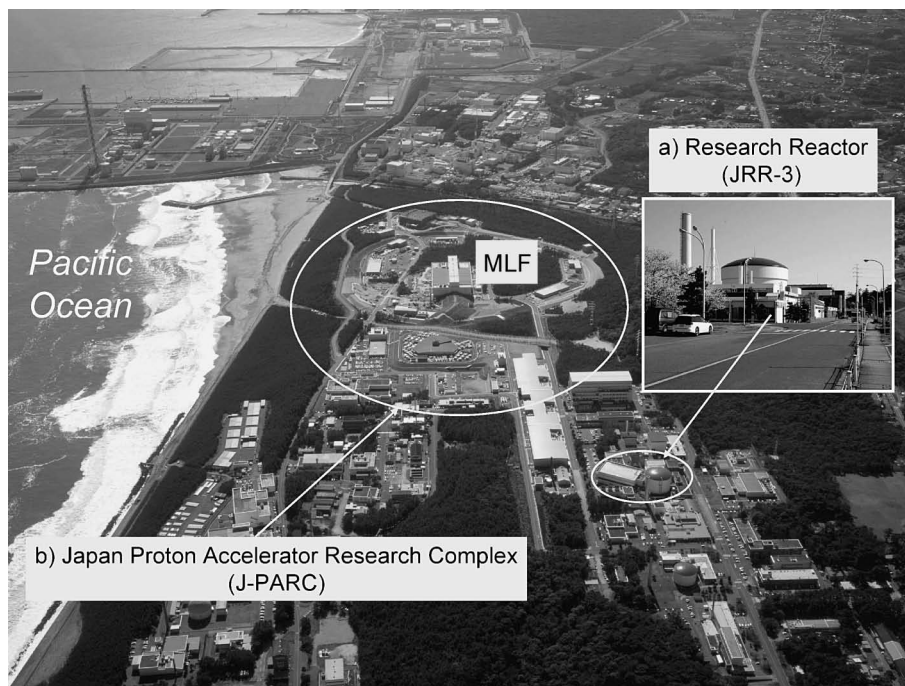


Fig. 4. Two Representative Facilities for Neutron Sciences Established by the Japan Atomic Energy Agency (JAEA) in Tokai, Japan
a) Research reactor (JRR-3) and b) Japan proton accelerator research complex (J-PARC).

たがって、同じ試料であれば、単色中性子で 50 日かかるデータ収集は 1 日で収集可能となるはずである。また、体積の小さな結晶試料の場合には照射時間を延長することによって、回折データの収集が可能となる。例えば、体積で 1/50 の試料 (0.02 mm^3) は、50 倍の測定時間をかけることで構造解析が可能なデータを得ることができる。結晶体積の大型化と現実的なビームタイムの割り当て、さらには産業用のビームラインで一般ユーザーの利用推進をいかに進めるのかが今後の大きな課題である。J-PARC への共用ビームラインの建設も急務である。

3. 創薬研究と中性子構造解析

現代の医薬品が直接相互作用する分子のほとんどはタンパク質である。このような創薬標的タンパク質の立体構造情報を得ることができれば、薬物設計において具体的なアイデアの創出と化合物合成の展開における重要な情報となる。中性子解析によって得られた立体構造情報は、X 線解析で得られた立体構造情報に主として水素原子の情報を加えることができる。創薬標的タンパク質と位置付けられる代表的な対象は膜タンパク質と酵素である。水素原子は、タンパク質を構成する原子の約半数を占めるので、水素原子を観測できるようになると、中性子を

用いて酵素の立体構造解析を行えば、その触媒残基が解離している（電荷を有する）のか、あるいは水素が結合して電荷を持っていないのかを知ることができる。また触媒基が水素原子を持っていれば、基質に対して酸として働くこと、水素原子を持っていなければ塩基として働く可能性が考えられる。このように水素原子に関する構造的な知見から、酵素の作用メカニズムを理解できる。

また、水中で機能を発揮するタンパク質の周りには、水和水が存在する。水和水のあるものは、タンパク質の一部として挙動する。創薬標的タンパク質である酵素もその周りを水和水が取り巻いている。医薬品分子がタンパク質と結合する場合には、水和水が脱水和し医薬品分子と交換する。したがって、水和水の動的な挙動は医薬品分子の親和性に影響を及ぼす可能性がある。中性子を用いることができれば、水和水の水素原子を観測することができる。中性子を用いて水和水を観測した結果、その見え方に特徴的な違いがあることがわかった。中性子解析によって水素原子を含む水和水の原子核密度分布を観測することができるが、原子密度分布の形状が三角形のもの、棒状のもの、球状のものなどに分類できた (Fig. 5).¹⁰⁾ これらの形状の違いは水和水の動的

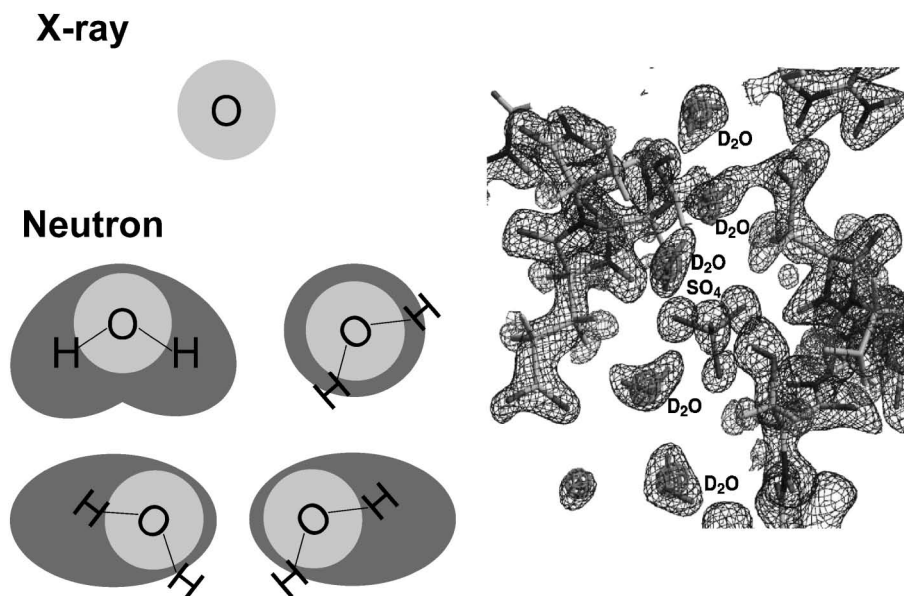


Fig. 5. Shape of Water Molecules Bound to Proteins Observed Using Neutron Diffraction

Light gray circle represents oxygen position determined by x-ray diffraction. Since the neutron diffraction experiments are usually performed using D_2O instead of H_2O , we can observe D_2O (colored in dark gray) by neutron diffraction. Right side figure represents the nuclear densities for water molecules bound to myoglobin.

な特徴の違いを示していると考えられる。このような知見から、医薬品分子が結合する部位の水和水の挙動を観測することによって、医薬品分子の親和性をより正確に見積もることができる可能性がある。

さらに、近年では、中性子回折データとX線回折データの両方を使ってタンパク質の立体構造を解析する手法が実現された。¹¹⁾ これは高い原子分解能のデータを得ることができるX線と軽元素の検出が得意な中性子を組み合わせて、タンパク質の全原子位置を観測する手法である。従来の中性子構造解析では、中性子による回折データのみ用いられていたが、X線結晶回折のデータを組み入れることにより、それぞれの手法が得意とする原子の検出を相補的に行うことができるようになった。

4. 中性子を用いた立体構造解析の手順

中性子を用いたタンパク質の立体構造解析の手法は、X線結晶回折法の手順と基本的に同じである。まず立体構造を知りたいタンパク質の結晶を作製して、その試料に中性子ビームを照射し、中性子回折計を用いて結晶からの回折イメージを記録する。このとき測定に必要な結晶試料の大きさ(体積)は、大きければ大きいほど(1-10 mm³)高い分解能のデータを得ることができる。ビーム照射実験に先立ち、バックグラウンド・ノイズの低減を目的として、試料結晶を重水(D_2O)で調製した結晶保存溶

液に10日から1ヵ月程度浸漬するのが一般的である。原子力機構の生体高分子用中性子回折計(BIX-3及び4)では、1フレームの回折イメージの記録に3時間照射、これを0.3度おきに600枚測定すると、読み取り時間も含めて23.5日程度かかることになる。そのため、タンパク質1分子の構造決定に必要な中性子回折データの測定には、1サイクル(25日)単位でビームタイムが割り当てられている。こうして記録されたイメージには、結晶試料によって生じた中性子回折スポットが記録されている。これらのスポット強度を読み取って、さらにスケールリングし、中性子回折データとする。ここで使用されるデータ処理ソフトウェアは、X線回折データの処理でも用いられるDENZO及びSCALEPACK¹²⁾である。中性子回折データの測定後、同一の結晶からX線回折データも収集しておく。測定は中性子回折データを収集した条件に揃えて行う。結晶が充分大きいのでX線によるダメージを気にすることなく、室温での測定が可能である。原子力機構で行った解析例(後述)では、放射光施設(高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory, BL6A)を利用して、同一結晶から可能な限り高い分解能のX線回折データを収集している。

こうして得られた中性子回折データとX線回折データの両方を用いて、目的のタンパク質の立体構

造解析を行う。立体構造の精密化には、精密化プログラム (PHENIX)¹¹⁾ を用いる。このプログラムは中性子回折データと X 線回折データの両方を入力し、立体構造を精密化する。最初に水素原子を除く原子の立体構造モデルを精密化し、さらに余剰の原子核密度に水素原子をおいてモデル構造を精密化し、タンパク質の全原子構造を決定する。

さらに余力があれば別途高い分解能を得ることができる高品質の結晶を作製し、サブオングストローム分解能の精密な X 線回折データも収集するとよい。高い分解能の回折データは、原子間距離情報や電子密度の分布を中性子構造解析の結果と注意深く比較することにより、観測したい部位の水素原子についてより正確な知見を得ることができる。

5. 解析例(1)~ブタ膵臓エラスターゼ

エラスターゼは、立体構造情報を基盤とした創薬手法である Structure-Based Drug Design (SBDD) 研究の代表的な題材として用いられてきたセリンプロテアーゼである。種々の原因により膵臓自体の防御機構が破壊された時に、膵臓エラスターゼが膵臓の自己消化を起し、その結果、急性膵炎、ひいては腎不全、呼吸不全をも発症させることが知られている。また、好中球由来のエラスターゼに対する阻害剤は、全身性炎症反応症候群に対する急性肺障害の治療薬として実際に上市されている。

このような特徴を有するエラスターゼの中性子構造解析は、エラスターゼの加水分解機構の解明に寄与するだけでなく、阻害剤認識における分子機構の解明にも大きく寄与すると考えられる。そこで大量の試料入手が可能なブタ膵臓エラスターゼの中性子構造解析を試みた例を紹介する。

ブタ膵臓エラスターゼ試料をその阻害剤とともに結晶化させ、さらに中性子解析可能な大きさに結晶を成長させた。¹³⁾ この結晶をさらに大型化し (3.3 mm³)、中性子回折データ (1.65 Å 分解能) と X 線回折データ (1.2 Å 分解能) の両方を収集し、その全原子構造を決定することができた。ブタ膵臓エラスターゼの構造解析においては、別途 0.94 Å 分解能の X 線結晶回折データから立体構造を決定し、原子間距離や活性部位の解離基の状態等を比較した。

エラスターゼは代表的なセリンプロテアーゼの 1 つである。セリンプロテアーゼの加水分解メカニズムにおいては、2 つの未解決問題が存在する。その

一つは、活性部位に存在する触媒基 (His57 と Asp102) の間に形成される水素結合が低エネルギー障壁水素結合 (LBHB) であるかどうか、もう 1 つは基質のカルボニル基を分極させるオキシアニオンホールの作用メカニズムである。これらの未解決の問題を解決するためにブタ膵臓エラスターゼの中性子構造解析を行い、活性部位に存在する水素原子の観測を行った。その結果、His57 と Asp102 の間の水素結合距離は大変短いものの、水素原子は His57 に結合しており、LBHB の特徴である水素原子が、ドナーとアクセプターの間付近に存在するという特徴は満たされていなかった。一方、オキシアニオンホールには、阻害剤由来の水酸基が結合するが、水酸基に結合しているはずの水素原子は観測されず、酵素のオキシアニオンホールには水酸基が解離したオキシアニオンが観測された [Fig. 6(a)].¹⁴⁾ 超高分解能の X 線結晶構造解析も併せて行い、該当する箇所の原子間距離を評価したところ、中性子で観測した結果を支持した。¹⁴⁾

6. 解析例(2)~HIV-1 プロテアーゼ

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する抗ウイルス薬の標的分子の 1 つである HIV-1 プロテアーゼは、立体構造情報に基づいて医薬品設計がなされた代表的なタンパク質である。現在も HIV に対する薬剤耐性ウイルスの出現によって、抗ウイルス薬の開発が重要な研究テーマになっている。HIV-1 プロテアーゼは、全く同一のポリペプチド鎖からなる二量体酵素であり、基質の加水分解が生ずる活性部位には 2 つのカルボン酸 (同一のアミノ酸残基であるため、Asp25 及び Asp125 として区別する) が存在する。この 2 つのカルボン酸の役割については、いずれか片方のカルボン酸が“酸”として働く一方、もう片方のカルボン酸が“塩基”として加水分解に関与する水分子からプロトンを引き抜くというメカニズムが提唱されていた。しかしながら、どちらの残基が“酸”あるいは“塩基”として作用するのか、そして、どの原子からプロトンが渡されるのかということが同定されていなかった。そこで HIV-1 プロテアーゼと、その遷移状態アナログとして設計された KNI272 の複合体の中性子構造解析を実施した。

中性子解析に用いた HIV-1 プロテアーゼと KNI272 複合体の結晶を作製し、¹⁵⁾ 原子力機構・研究用原子炉 (JRR3) の中性子回折計 (BIX-4) を

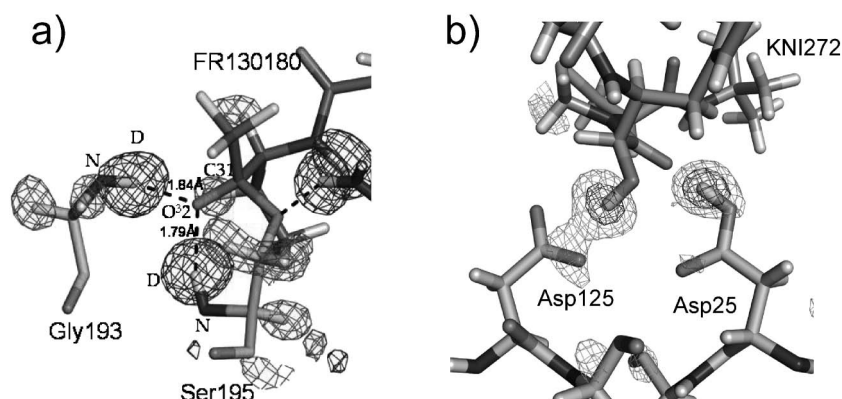


Fig. 6. Active Site Structures of Drug Target Proteins with Bound Inhibitors Observed Using Neutron Diffraction

a) Oxyanion ($O\gamma 2$) derived from a bound inhibitor FR130180 to the oxyanion hole of porcine pancreatic elastase. b) Ionization state of the catalytic residues (Asp25 and Asp125) of HIV-1 protease and the structure of bound inhibitor KNI272.

用いた回折実験により、 1.9 \AA 分解能の回折データの収集に成功した。この時用いた結晶の体積は約 3.7 mm^3 である。さらに同一結晶から 1.4 \AA 分解能の X 線回折データの収集を行い、中性子と X 線を同時利用した立体構造解析を行い、HIV-1 プロテアーゼの全原子座標の決定に成功した。得られた結果から、Asp25 はプロトン化しており、“酸”として働くこと、Asp125 は解離型で水分子からプロトンを引き抜く“塩基”の役割を有することがわかった [Fig. 6(b)]。これらの観測結果から HIV-1 プロテアーゼの触媒メカニズムが明らかになるとともに、阻害剤である KNI272 による HIV-1 プロテアーゼとの詳細な相互作用の様子が明らかになった。¹⁶⁾

以上、紹介した 2 つの例のように、中性子を用いたタンパク質の立体構造解析は、水素原子の観測によって未解決の酵素反応のメカニズムの解明に大きく貢献することが期待できる。また、同時にタンパク質と医薬品間の相互作用に関与している水素原子を直接観測することにより、より親和性の高い医薬品の設計に貢献できるものと期待できる。

7. 様々な解析対象への適用

これまで述べてきたように、国内には中性子を利用できる施設が 2 ヶ所—JRR-3 と J-PARC—整備され、タンパク質の立体構造解析に利用され始めた。しかしながら、現実的には今でも中性子構造解析には、かなり大きな体積の結晶が必要である。したがって、当面は大型の結晶が得られるタンパク質が解析の中心となっていくであろうと思われる。こ

のような背景から、タンパク質の大型の結晶を作製する技術の高度化が必要である。

タンパク質の結晶を大型化するには、結晶核形成が少なく、結晶化母液に含まれるタンパク質が少ない結晶に集まって成長する条件を探索する必要がある。このような条件は、タンパク質の結晶化相図において溶解度曲線に近い条件であることが知られている。そこで大型結晶の作製を試みる場合には、まず結晶化相図の作成が推奨されている。

一方、大型の結晶を得やすいタンパク質にもいくつかの特長がある。すなわち、1) タンパク質の溶解度が高いタンパク質、2) 分子内に対称性を有する二量体タンパク質、3) 立体構造が安定で均一な試料を調製できるタンパク質などである。現在の構造生物学で用いられるタンパク質試料は多くの場合、遺伝子組換え技術によって調製される。この手法は生体内に微量しか存在しない貴重なタンパク質の研究に光を当てることができたが、解析された立体構造が実際に機能している状態をどれだけ反映しているのかを注意深く検証する必要がある。とは言うもののタンパク質自身の立体構造がアミノ酸の置換によってどの程度変化するかという観点から見れば、その構造の特徴はほとんどの場合保持されていることがわかっている。したがって、中性子構造解析を行いたいタンパク質に、先に述べたような結晶の大型化に適した分子的な性質を導入することができれば、より多くのタンパク質を中性子解析の対象として取り上げることができるようになるかもしれない。筆者らはそのようなアプローチでの結晶の大型

化研究を遂行している。近い将来にその成果を紹介できればと思う。

8. おわりに

以上、述べてきたように中性子を用いたタンパク質の構造研究では、現在の X 線結晶解析のような網羅的なアプローチではなく、X 線との相補性を利用して観測が難しい水素原子の観測を通じて、未解明の問題を 1 つ 1 つ解決していきたいと考えている。本稿で紹介した中性子構造解析が、より多くの研究者に利用され、タンパク質を対象とする未解決の問題を解決することにより科学技術の発展と、その応用研究である創薬研究を加速できることを願っている。

謝辞 本稿の執筆にあたり、共同研究者である原子力機構・量子ビーム応用研究部門生体分子構造機能研究グループのメンバーの方々に感謝申し上げます。

REFERENCES

- Niimura N., "Encyclopedia of Experimental Chemistry, Vol. 10, Diffraction," ed. by The Chemical Society of Japan, Maruzen Co., Ltd., Tokyo, 1992, pp. 481–548.
- Myles D. A., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 630–637 (2006).
- Niimura N., Arai S., Kurihara K., Chatake T., Tanaka I., Bau R., *Cell. Mol. Life. Sci.*, **63**, 285–300 (2006).
- Schoenborn B. P., *Nature (London)*, **224**, 143–146 (1969).
- Niimura N., Karasawa Y., Tanaka I., Miyajima J., Takahashi K., Saito H., Koizumi S., Hidaka M., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, **349**, 521–525 (1994).
- Tanaka I., Kurihara K., Chatake T., Niimura N., *J. Appl. Crystallogr.*, **35**, 34–40 (2002).
- Kurihara K., Tanaka I., Niimura N., Refai Muslih M., Ostermann A., *J. Synchrotron Rad.*, **11**, 68–71 (2004).
- Japan Proton Accelerator Research Complex (J-PARC) : <http://j-parc.jp/>, cited 28 February, 2010.
- Ibaraki Biological Crystal Diffractometer (iBIX) : <http://www.sf21-ibaraki.jp/gaiyo/index.html>, cited 28 February, 2010.
- Chatake T., Ostermann A., Kurihara K., Parak F. G., Niimura N., *Proteins*, **50**, 516–523 (2003).
- Adams P. D., Grosse-Kunstleve R. W., Hung L. W., Ioerger T. R., McCoy A. J., Moriarty N. W., Read R. J., Sacchettini J. C., Sauter N. K., Terwillinger T. C., *Acta Crystallogr., Sect. D*, **58**, 1948–1954 (2002).
- Otwinowski Z., Minor W., *Meth. Enzymol.*, **276**, 307–326 (1997).
- Kinoshita T., Tamada T., Imai K., Kurihara K., Ohhara T., Tada T., Kuroki R., *Acta Crystallogr., Sect. F*, **63**, 315–317 (2007).
- Tamada T., Kinoshita T., Kurihara K., Adachi M., Ohhara T., Imai K., Kuroki R., Tada T., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 11033–11040 (2009).
- Matsumura H., Adachi M., Sugiyama S., Okada S., Yamakami M., Tamada T., Hidaka K., Hayashi Y., Kimura T., Kiso Y., Kitatani T., Maki S., Yoshikawa H. Y., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Kuroki R., Mori Y., *Acta Crystallogr., Sect. F*, **64**, 1003–1006 (2008).
- Adachi M., Ohhara T., Kurihara K., Tamada T., Honjo E., Okazaki N., Arai S., Shoyama Y., Kimura K., Matsumura H., Sugiyama S., Adachi H., Takano K., Mori Y., Hidaka K., Kimura T., Hayashi Y., Kiso Y., Kuroki R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 4641–4646 (2009).