

グロビンタンパク質の多様性-立体構造と機能

五十嵐 城太郎

福島県立医科大学医学部自然科学講座 (分子細胞生物学分野)

脊椎動物のヘモグロビンやミオグロビンは、赤血球、筋肉において酸素の運搬・貯蔵を担う重要なタンパク質である。その一方で、単細胞生物においても「グロビンタンパク質」が発見されているが、構造と機能は大きく異なっている。その中でも、短縮型グロビン、フラボヘモグロビン、グロビン結合型センサーの3種類のタンパク質について、以下の機能がわかった。1) 短縮型グロビンは結合酸素の安定性が非常に高く、一酸化窒素を硝酸イオンへと解毒する可能性がある。2) フラボヘモグロビンは、アゾール系抗菌剤の一部と高い親和性で結合する。3) グロビン結合型センサータンパク質はグロビンドメインに酸素などのリガンドが結合することで酵素活性を上昇させる。また、短縮型グロビンとグロビン結合型センサーのX線結晶構造解析を行い、立体構造を解明した。いずれも主に α ヘリックスから構成される2/2グロビンフォールド(短縮型グロビン)と3/3グロビンフォールド(グロビン結合型センサー)をとるものの、構成する α ヘリックスの長短などに違いが見られる。また、ヘムの周辺環境には結合した酸素や一酸化炭素を認識・保持する特徴的な水素結合によるネットワークが見られた。

Received 14 September 2018, Accepted 16 September 2018

1. はじめに

脊椎動物のヘモグロビン(Hb)やミオグロビン(Mb)は酸素の運搬・貯蔵を担うタンパク質である。酸素分子はHb・Mbに含まれるヘムb(プロトポルフィリンIX鉄錯体)の鉄原子に配位結合し、可逆的に酸素を脱着できる。Hbは α 鎖2本, β 鎖2本の4量体を形成している。一方、Mbは単量体である。いずれもアミノ酸150残基程度からなり、以下では、これらをまとめて「グロビンタンパク質」と呼び、タンパク質の一部に含まれる場合は、グロビンドメインとする。

ヒトのHbの場合、 α 鎖等(アミノ酸142残基)をコードする遺伝子群(ζ , $\alpha 2$, $\alpha 1$)が第16番染色体に、 β 鎖等(アミノ酸147残基)をコードする遺伝子群(ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β)が第11番染色体にクラスターを形成しており、成人型HbA($\alpha_2\beta_2$)や胎児型HbF($\alpha_2\gamma_2$)などを合成している。Mb(アミノ酸154残基,第22番染色体)に加えて、ニューログロビン(Ngb,アミノ酸151残基,

第14番染色体)とサイトグロビン(Cgb,アミノ酸190残基,第17番染色体)が新たに発見されている。なお、Ngbは単量体で存在するが、Cgbは2量体を形成する。

ところで、ヒト以外の生物に目を向けると、大腸菌のような原核生物から、単細胞の真核生物まで広くグロビンタンパク質が存在することがわかってきた[1-4]。しかし、そのグロビンタンパク質の構造、機能はヒトの場合と大きく異なっている。これらの生物では、グロビンタンパク質は酸素濃度の感知や、酸素分子の除去、ヘム鉄に結合した酸素分子を使って、一酸化窒素を硝酸イオンへの分解など、様々な機能が示唆されている。これらの機能の指標として、Table 1に酸素分子のヘム鉄への結合しやすさ(酸素親和性)および結合した酸素がヘム鉄から電子を奪う、自動酸化速度定数についてまとめた[5]。酸素親和性と自動酸化速度定数について、HbやMbと単細胞生物で見られるグロビンタンパク質を比較すると、結合した酸素を安定

化するもの（短縮型グロビン）もあれば、酸素が結合してもすぐに酸化されてしまうもの（グロビン結合型センサー）もある。

本稿では、単細胞生物にみられるユニークなグロビタンパク質について、その立体構造と機能について、私たちの研究成果をもとに述べる。Figure 1 に、これから述べるグロビタンパク質の模式図を示す。

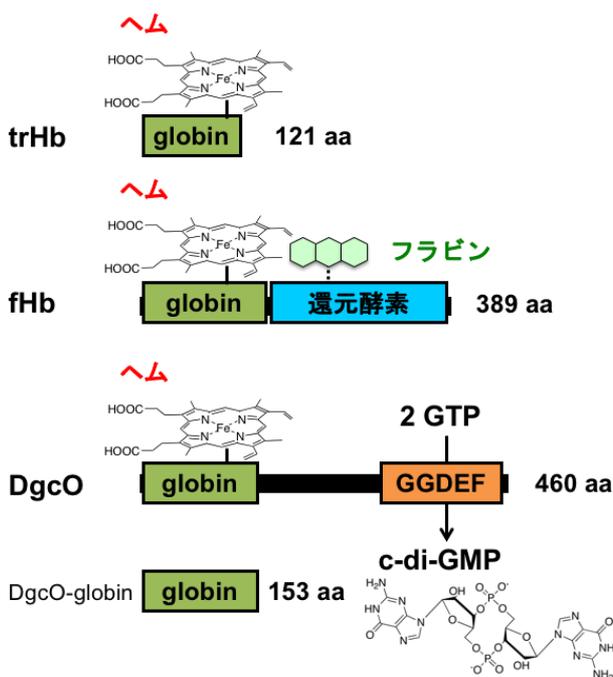


Figure 1: 本論文で取り上げるグロビタンパク質の模式図。globin はグロビドメインを示す。

次の 2 節では原生生物繊毛虫の *Tetrahymena pyriformis* の短縮型グロビン (trHb), 3 節では酵母の一種 *Candida norvegensis* で発見されたフラボヘモグロビン (fHb), 4 節では大腸菌

Escherichia coli の酸素センサータンパク質 DgcO についてそれぞれ述べる。なお、いずれのグロビタンパク質、グロビドメインについても、遺伝子組換え技術を用い、大腸菌内で大量に発現したものを精製して用いた。結晶化には、ナノリッター分注システム Mosquito (TTP Labtech) を使用し、結晶化条件のスクリーニングを行った。また、構造解析に使用した結晶は Figure 2 に示した。最後に 5 節では、今後の展望について述べる。

2. *T. pyriformis* の短縮型グロビン

テトラヒメナ *T. pyriformis* や *T. thermophila*, ゴウリムシ *Paramecium caudatum* などの原生生物繊毛虫にグロビタンパク質が存在することは古くより知られていた。これらの生物はレジオネラの宿主としても知られている。しかし、タンパク質を単離精製し、アミノ酸配列の決定や吸収スペクトルの測定が行われたのは 1990 年であった。その結果、*T. pyriformis* のグロビタンパク質はアミノ酸 121 残基から成る単量体であり、酸素の親和性が高く P_{50} 値が 0.2 Torr 以下であることがわかった[6]。

他のグロビタンパク質が 150 アミノ酸残基程度から成るのに比べて、*T. pyriformis* のグロビタンパク質は 30 アミノ酸残基も短い構造を持つので、短縮型グロビン (trHb) と呼ばれる。

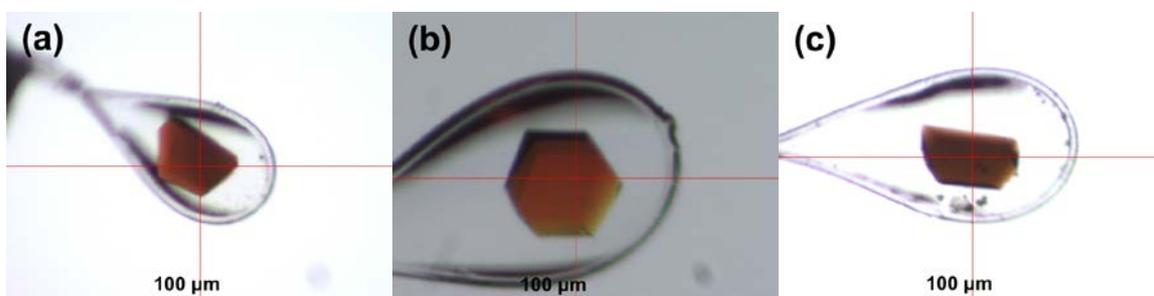


Figure 2: 構造解析に用いた結晶の様子。ナイロンループ内に結晶をすくい取り、X 線（波長は $1.0 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$ ）を照射して、回折データを取得する。位相と回折データより得られた構造因子から逆フーリエ変換を行うことで、電子密度マップが求められる。

(a) *Tetrahymena pyriformis* の短縮型グロビン、酸素結合型 (b) *Candida norvegensis* のフラボヘモグロビン、酸化型 (c) 大腸菌 *Escherichia coli* の DgcO-globin、酸化型

Table 1 : 酸素親和性と自動酸化速度の比較

種名	タンパク質名	酸素親和性 (Torr)	自動酸化速度定数 (h^{-1})	References
<i>Homo sapiens</i>	HbA ($\alpha_2\beta_2$)	9.2	0.0023	[7,8]
	Mb	0.72	0.0083	[9]
	Ngb	8.4	5.4	[10,11]
	Cgb	1.8	— ^a	[10]
短縮型グロビン				
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	trHb	0.018*	0.0038	[12]
<i>Paramecium caudatum</i>	trHb	0.46*	0.031	[13,14]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HbN	0.013	0.0013	[15]
フラボヘモグロビン				
<i>Candida norvegensis</i>	fHb	0.01	0.024	[16,17]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YHB1	0.020*	— ^b	[18]
<i>Cupriavidus necator</i>	FHP	0.0022*	— ^b	[18]
<i>Escherichia coli</i>	Hmp	0.0064*	— ^b	[18]
<i>Bacillus subtilis</i>	HmpBs	0.088*	— ^b	[19]
<i>Salmonella enterica</i>	HmpSe	0.14*	— ^b	[19]
グロビン結合型センサー				
<i>Escherichia coli</i>	DgcO	0.77*	0.55	[20]
<i>Azotobacter vinelandii</i>	AvGReg	0.015	—	[21]
<i>Bordetella pertussis</i>	BpeGReg	0.35*	—	[22]
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	HemDGC	—	1.5	[23]

— : 報告されていない。^a, 1 時間以上安定 ; ^b, 数分以内に酸化される

* : 酸素親和性について, 酸素の結合定数 K (結合速度定数 ÷ 解離速度定数) を元に, $P_{50} = 760 \text{ Torr} \div 1.38 \times 10^{-3} \text{ M}$ (酸素の溶解度) ÷ K で計算した。

T. pyriformis trHb の酸素結合・解離速度定数は, それぞれ $5.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 0.18 s^{-1} であり, 酸素親和性を示す P_{50} 値は 0.018 Torr と計算された。一方, 自動酸化速度定数は $3.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ となった[12]。これらの値は, 結核菌の trHb と同程度であり, 酸素を可逆的に脱着するよりも, 他の機能を果たしている可能性がある[15]。そこで, trHb の立体構造を解析することにした。

精製した 15 mg/mL *T. pyriformis* trHb と 2.0 M クエン酸アンモニウムを等量混合し, 蒸気拡散法 (sitting drop) で結晶が得られた (Figure 2)。得られた結晶は, 空間群 $P6_522$ (単位格子 $a = b = 69.4 \text{ \AA}$, $c = 354 \text{ \AA}$) に属し, 非対称単位に 2 分子の trHb が存在した。酸素結合型の構造は分解能 1.75 \AA で分子置換法によって解いた。

その結果, *T. pyriformis* trHb は 2/2 グロビンフォールドを取ることが明らかになった。trHb の構造は N 末端から主に 4 つのヘリックス (B, E,

G, H) から形成されていた (Figure 3)。6 本のヘリックスから構成される 3/3 グロビンフォールドをとる Hb や Mb とは大きく異なっていた。また, 380 \AA^3 もの空洞がタンパク質内部に存在した。

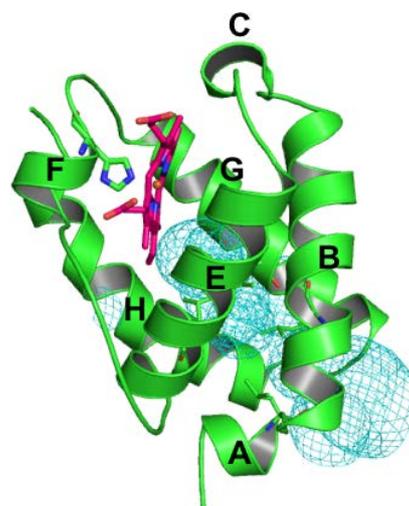


Figure 3: *T. pyriformis* trHb の全体構造と分子内の空洞。1.3-3.0 \AA のプローブを使って小分子の進入可能な部分をメッシュで示した。

Figure 4 に示すように、酸素結合型 *T. pyriformis* trHb のヘム周辺構造では、酸素分子が Tyr25 と Gln46 からの水素結合によって安定化されていた。

酸素親和性が高いことから、trHb は酸素結合型の状態で、空洞を通して進入した一酸化窒素と反応する可能性が示唆された。酸素結合型の結晶を亜硝酸ナトリウムを含む溶液に浸漬すると、結晶化溶液に含まれるクエン酸と反応して一酸化窒素を生成する。この状態の結晶を用いて構造解析を行うと、結合していた酸素が水へと変わる様子が明らかになった (Figure 4)。

3. *Candida norvegensis* のフラボヘモグロビン

Candida norvegensis は病原性 *Candida albicans* と同属の酵母であり、カンジダ症を引き起こす。近年、抗菌薬 fluconazole 耐性の *C. norvegensis* が出現し、医療分野において問題となっている。*C. norvegensis* のフラボヘモグロビン (fHb) は含量が多く、古くから研究が行われてきた [16,17,24]。一方、*C. albicans* では3種類のfHb遺伝子が発見され (*yhb1*, *yhb4*, *yhb5*), *yhb1* が宿主マクロファージから産生される一酸化窒素を硝酸イオンへと無毒化すると考えられている

[25]。また、*yhb5* が抗菌薬耐性に関係していることがわかっている [26]。

fHb はヘムを補欠分子族とするグロビンドメインと FAD を補酵素とする還元酵素ドメインが融合したタンパク質 (アミノ酸 389 残基) であり、単量体として存在する。NADH から供給される電子は FAD を経由してヘムへと伝達され、ヘム鉄の酸化を防いでいる (Figure 1)。

精製した 25 mg/mL の *C. norvegensis* の fHb と 14% PEG3350, 150 mM 塩化ナトリウム, 0.1 M クエン酸バッファー pH 4.0 を 2:1 の容量比で混合し、蒸気拡散法 (sitting drop) で結晶化を行った (Figure 2)。結晶成長には約 2 週間を要し、得られた結晶は、空間群 I432 (単位格子 $a = b = c = 242 \text{ \AA}$) に属した。回折データの分解能は 4.0 \AA に留まり、構造解析には至っていない。

次に、抗菌薬耐性が fHb と関係があるのかを調べる目的で、fHb とアゾール系抗菌薬との相互作用を検討した。6 種類の抗菌薬 (econazole, miconazole, ketoconazole, clotrimazole と fluconazole, itraconazole はそれぞれイミダゾール基とトリアゾール基を持つ) を試したところ、clotrimazole の親和性は高く、fluconazole の親和性は低かった (Figure 5)。

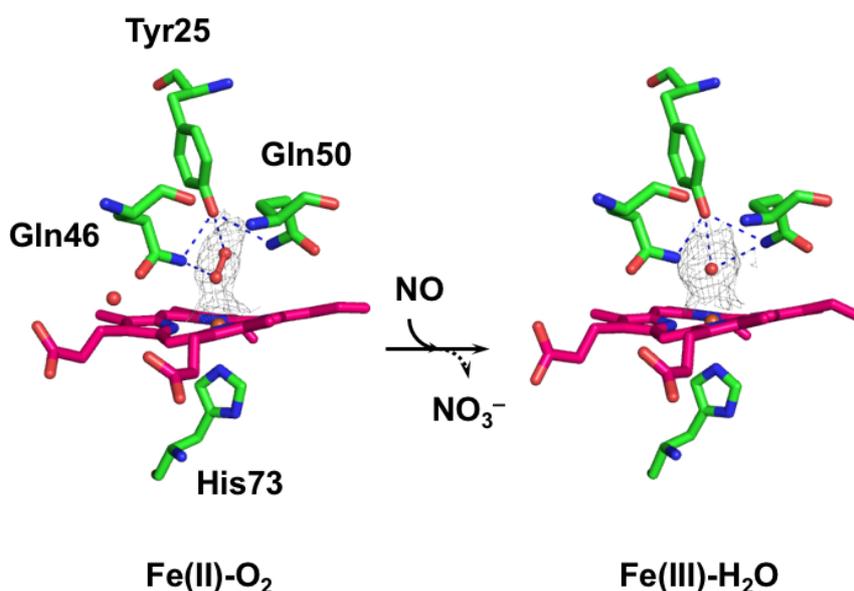


Figure 4: (左) 酸素結合型 *T. pyriformis* trHb のヘム周辺構造 (右) 一酸化窒素と trHb を反応させた後のヘム周辺構造。電子密度マップ (3 σ) はモデルを除いて計算した。酸素は赤、窒素は青、炭素は緑で示している。なお、ヘムの炭素はピンクである。

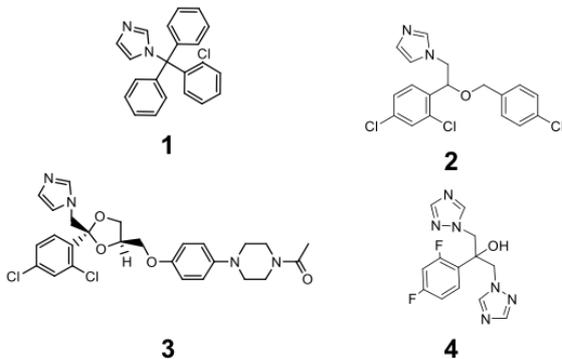
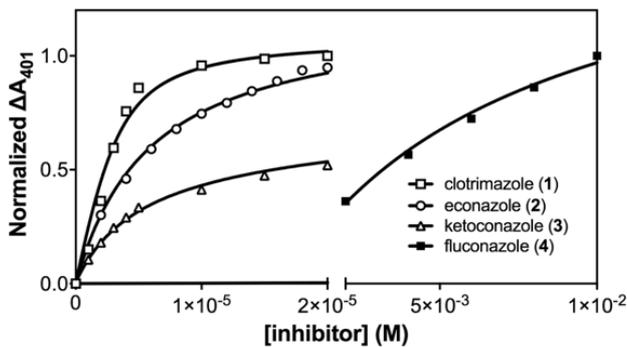


Figure 5: 4 種類の抗菌薬の fHb への結合。5 μ M の fHb に抗菌薬を加え、吸収スペクトルの吸光度変化を測定した。clotrimazole, econazole, ketoconazole, fluconazole の順に親和性が高い。clotrimazole, econazole, ketoconazole はイミダゾール基, fluconazole はトリアゾール基を持つ。

アゾール系抗菌薬の標的は、真菌の細胞膜や細胞膜に必須のエルゴステロール合成に関わるシトクロム P450 (CYP51) である[27]。fHb がアゾール系抗菌薬に結合することで、CYP51 への結合を妨害する可能性がある。したがって薬剤耐性のメカニズムとして、fHb の抗菌薬との親和性が高くなっている可能性がある。

4. 大腸菌 *Escherichia coli* のグロビン結合型センサー, DgcO

DgcO は大腸菌に由来するグロビン結合型センサーの 1 つであり、N 末端のグロビンドメインと C 末端のジグアニル酸シクラーゼ (GGDEF ドメイン) が融合したアミノ酸 460 残基からなるタンパク質である。DgcO は YddV や DosC とも呼ばれている [28]。百日咳菌 *Bordetella pertussis* などからも見つかっている。DgcO はヘム鉄が還元された状態において、酸素や一酸化

炭素が結合すると、2 分子の GTP から c-di-GMP の合成を触媒する[20]。c-di-GMP は、細菌における走化性やバイオフィーム合成など調節する重要なセカンドメッセンジャーである。また、真核細胞においては、細菌感染に応答した自然免疫において注目を集めている[29]。なお、腸管出血大腸菌 O103:H2 では、DgcO を含む遺伝子を欠損している[30]。

そこで、DgcO のグロビンドメインに結合した酸素や一酸化炭素によって活性調節が行われるメカニズムを解明するため構造解析を行った。DgcO 全長での構造解析は困難なため、DgcO のグロビンドメインのみ (DgcO-globin) について結晶構造解析を試みた。精製した 20 mg/mL の DgcO-globin と 20% PEG3350, 250 mM 酢酸アンモニウム, 0.1 M Bis-Tris バッファー pH 5.5 を等量混合し、蒸気拡散法 (hanging drop) によって得られた結晶は、空間群 $P2_12_12_1$ (単位格子 $a = 51.6 \text{ \AA}$, $b = 66.1 \text{ \AA}$, $c = 83.2 \text{ \AA}$) に属し、非対称単位に 2 分子の DgcO-globin が存在した (Figure 2)。酸化型 DgcO-globin の構造は分解能 1.37 \AA でヘム鉄を利用した多波長異常分散法 (MAD) によって解いた。

ヘム鉄が酸化された状態での DgcO-globin の構造は N 末端の Z ヘリックスに加えて 7 つのヘリックス (A~H, D ヘリックスは欠損) から形成されていた (Figure 6)。

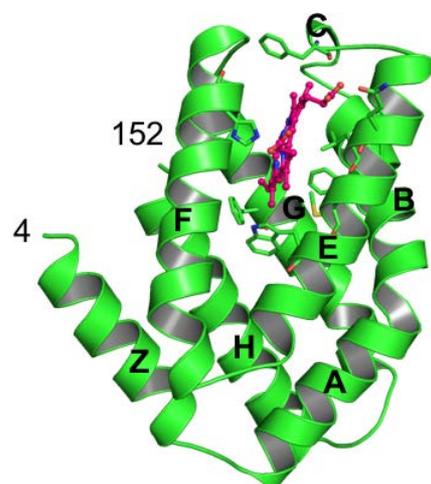


Figure 6: DgcO-globin の全体構造。ヘムは疎水性アミノ酸残基に取り囲まれている。

また、ヘム鉄が還元された状態について、嫌気条件下（酸素濃度 20 ppm 以下）で結晶化を行うことで、還元型および一酸化炭素結合型の結晶が得られた。一方、酸素結合型の結晶は自動酸化速度が速いため、結晶化の最中にヘム鉄が酸化してしまった。一酸化炭素結合型の DgcO-globin の構造は分解能 1.60 Å で決定した。

Figure 7 は還元型と一酸化炭素結合型のヘム周辺構造を示している。還元型ではヘム鉄を Leu65 が覆っている。一酸化炭素結合型では、Leu65 が移動することによって一酸化炭素が結合できる。また、一酸化炭素が結合すると、Tyr43 と Leu56 の間に形成されていた水素結合が弱まるか、切断される構造変化が観察された。しかし、ヘム鉄に結合した一酸化炭素分子はアミノ酸との間に水素結合を形成していなかった。

この構造変化をもとに、酸素結合型による酵素活性の調節を考えてみる。ヘム鉄に結合した酸素分子は Tyr43 との間に水素結合を形成できるので、Tyr43 と Leu56 の間に水素結合がなくなる。この構造変化を引き金にして、C 末端側のジグアニル酸シクラーゼドメインへ情報が伝達されることで、活性が上昇する酸素センサーとして働くと考えられる。

5. おわりに

X 線結晶構造解析によって、タンパク質の立体構造が明らかになったのは、1958 年の Mb がはじめてである[31]。最近では、タンパク質の立体構造解析に結晶を必要としないクライオ電子顕微鏡も加わり、Hb の構造が解かれている[32]。現在までに数多くのグロビタンパク質の立体構造が解明されているが、その機能、調節メカニズムには、解明すべき問題点が残っている。

また、ゲノム配列の決定が容易になったことにより、数多くの微生物から機能未知のグロビンドメインを含む遺伝子が発見され続けている。これらグロビンドメインを持つタンパク質の機能解明と構造決定は続いていくであろう。

私たちは、fHb と抗菌薬の複合体の構造解析から、薬剤耐性メカニズムの解明を目指して研究を進めていきたい。

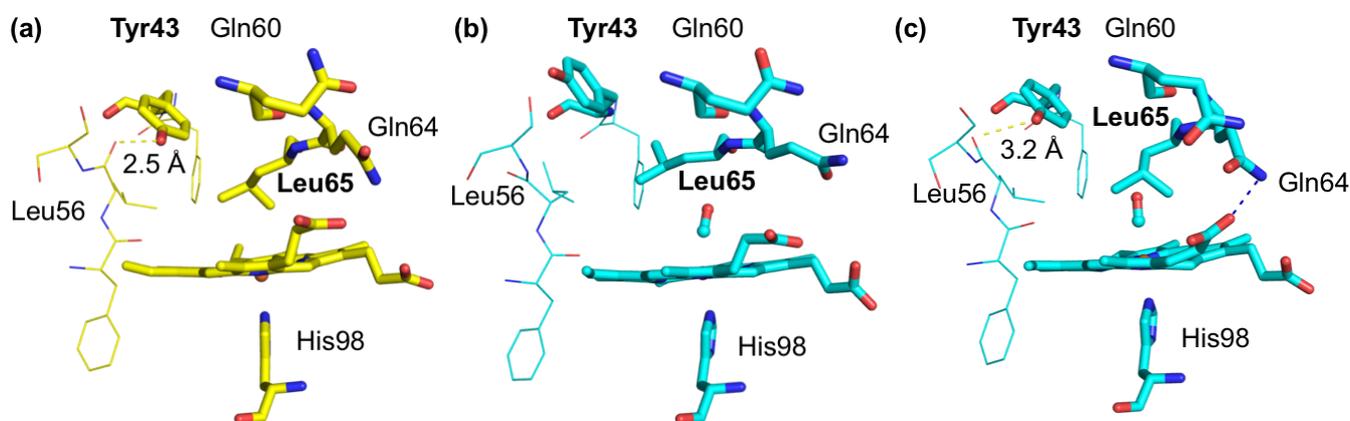


Figure 7: (a) 還元型 DgcO-globin のヘム周辺構造。Tyr53 のヒドロキシ基は Leu56 のカルボニル酸素との間に水素結合 (2.5 Å) を形成している。(b, c) 一酸化炭素結合型の DgcO-globin のヘム周辺構造。単量体の構造が異なるので、2 つ示している。一酸化炭素が結合すると、Leu65 はヘム鉄の近くから離れる。また、Tyr43 と Leu56 の間の水素結合は切断 (b) もしくは弱くなる (c, 3.2 Å)。酸素は赤、窒素は青、炭素は黄もしくはシアンで示している。

謝辞

本研究は、故・四釜慶治名誉教授（東北大学理学部）、清水透名誉教授（東北大学多元物質科学研究所）のもとで開始し、福島県立医科大学の松岡有樹教授のもとで継続・発展してきたものである。特に fHb の研究では小林元博士、DgcO の研究では北西健一博士に心から感謝する。また、医学部 4 年生の基礎上級として、共に研究室で実験を行った菊池亨さん、三吉黎さん、東條華子さん、佐瀬史帆さんにもこの場を借りて御礼申し上げる。

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C) (26340041)、同新学術領域研究 (23117504) による支援を受けた。また、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団による補助も受けた。

X 線結晶構造解析については、高エネルギー加速器研究機構の共同利用実験 (2009G096, 2016G140, 2018G125) を通じてビームラインを使用した。

References

- [1] Vinogradov SN, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Hoogewijs D (2013) *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1789–1800.
- [2] Vinogradov SN, Bailly X, Smith DR, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Hoogewijs D (2013) *Adv. Microb. Physiol.* **63**, 391–446.
- [3] Martinkova M, Kitanishi K, Shimizu T (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 27702–27711.
- [4] Shimizu T, Huang D, Yan F, Stranova M, Bartosova M, Fojtikova V, Martinkova M (2015) *Chem. Rev.* **115**, 6491–6533.
- [5] Shikama K (1998) *Chem. Rev.* **98**, 1357–1374.
- [6] Iwaasa H, Takagi T, Shikama K (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8603–8609.
- [7] Antonini E, Brunori M (1971) *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*, North-Holland Publishing, Amsterdam.
- [8] Sugawara Y, Sakoda M, Shibata N, Sakamoto H (1993) *Jpn. J. Physiol.* **43**, 21–34.
- [9] Suzuki T, Sugawara Y, Satoh Y, Shikama K (1980) *J. Chromatogr.* **195**, 277–280.
- [10] Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, Green BN, Pesce A, Uzan J, Burmester T, Hankeln T, Bolognesi M, Moens L, Marden MC (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 51713–51721.
- [11] Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, Marden MC, Caubergs R, Moens L (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38949–38955.
- [12] Igarashi J, Kobayashi K, Matsuoka A (2011) *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 599–609.
- [13] Tsubamoto Y, Matsuoka A, Yusa K, Shikama K (1990) *Eur. J. Biochem.* **193**, 55–59.
- [14] Das TK, Weber RE, Dewilde S, Wittenberg JB, Wittenberg BA, Yamauchi K, van Hauwaert ML, Moens L, Rousseau DL (2000) *Biochemistry* **39**, 14330–14340.
- [15] Couture M, Yeh S-R, Wittenberg BA, Wittenberg JB, Ouellet YH, Rousseau DL, Guertin M (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11223–11228.
- [16] Oshino R, Asakura T, Takio K, Oshino N, Chance B, Hagihara B (1973) *Eur. J. Biochem.* **39**, 581–590.
- [17] Kobayashi G, Nakamura T, Ohmachi H, Matsuoka A, Ochiai T, Shikama K (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 42540–42548.
- [18] Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Dou Y, Li T, Olson JS, Zhu H, Riggs AF (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31581–31587.
- [19] Farreé J, Rechsteiner MP, Herold S, Frey AD, Kallio PT (2005) *Biochemistry* **44**, 4125–4134.
- [20] Kitanishi K, Kobayashi K, Kawamura Y, Ishigami I, Ogura T, Nakajima K, Igarashi J, Tanaka A, Shimizu T (2010) *Biochemistry* **49**, 10381–10393.
- [21] Thijs L, Vinck E, Bolli A, Trandafir F, Wan X, Hoogewijs D, Coletta M, Fago A, Weber RE, van Doorslaer S, Ascenzi P, Alam M, Moens L, Dewilde S (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 37325–37340.
- [22] Wan X, Tuckerman JR, Saito JA, Freitas TAK, Newhouse JS, Denery JR, Galperin MY, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M-A, Alam M (2009) *J. Mol. Biol.* **388**, 262–270.
- [23] Sawai H, Yoshioka S, Uchida T, Hyodo M, Hayakawa Y, Ishimori K, Aono S (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 166–172.
- [24] Keilin D (1953) *Nature* **172**, 390–393.
- [25] Ullmann BD, Myers H, Chiranand W, Lazzell AL, Zhao Q, Vega LA, Lopez-Ribot JL, Gardner PR, Gustin MC (2004) *Eukaryotic Cell* **3**, 715–723.
- [26] Chen Y, Mallick J, Maqnas A, Sun Y, Choudhury BI, Côte P, Yan L, Ni T-J-H, Li Y, Zhang D, Rodríguez-Ortiz R, Lv Q-Z, Jiang Y-Y, Whiteway M (2018) *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, cie02365–17.
- [27] Hargrove TY, Friggeri L, Wawrzak Z, Qi A, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, York JD, Guengerich FP, Lepesheva GI (2017) *J. Biol. Chem.* **292**, 6728–6743.
- [28] Hengge R, Galperin MY, Ghigo J-M, Gomelsky M, Green J, Hughes KT, Jenal U, Landini P (2016) *J. Bacteriol.* **198**, 7–11.
- [29] Kato K, Omura H, Ishitani R, Nureki O (2017) *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 541–566.
- [30] Povolotsky TL, Hengge R (2016) *J. Bacteriol.* **198**, 111–126.
- [31] Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC (1958) *Nature* **181**, 662–666.
- [32] Khoshouei M, Radjainia M, Baumeister W, Danev R (2017) *Nat. Commun.* **8**, 16099.