

回転対陰極回折計による高分子 X 線データ収集

H. HOPE*, F. FROLOW, J. L. SUSSMAN

Department of Structural Chemistry, Weizmann Institute of
Science, Rehovot, 76100 ISRAEL

1. はじめに

蛋白質や核酸のような生物学的高分子の多くは、大きな単位胞と弱い回折強度のため、X線データを収集する上で、従来の密封管式回折計が希望の装置ではない場合がしばしばである。代わりとして回転対陰極、さらにはシンクロトロン線源による写真法がひんばんに用いられる。しかしながら写真法は、一般に、従来のシンチレーション検出器で得られる精度には及ばない。また、その方法は取扱いや処理の上で、さらにずっと大きな困難を抱えている。シンクロトロン放射線⁽¹⁾は、極端に小さい結晶及び/又は短命の結晶についての実験を可能にするが、シンクロトロンはまだ施設が少なく、このような線源を利用する時間を得るためにはしばしば長い期間待たされる。実験が実行可能であるかどうかを決めるための予備的テストについてすらもそうである。難しい結晶について、正確で迅速なデータ収集をさせてくれる手頃な自前の装置があれば、それは実に望ましい。

装置の面における最近の発達により、例えば高速で使いやすい回折計と連結した、強力で信頼のおける回転対陰極で構成される一体化した装置は、高分子結晶学者の多くのニーズを満たすことを約束してくれる。

我々はこのような装置を、非常に魅力あるものだと考えていたが、生物学的高分子に対するその使用経験についての刊行物はこれまでほとんど無かった。その効用を確認するには、若干のしばしば問われる質問に答えることが必要であると考えた。

- (1) 線束強度には変動が予想されるわけだが、収集データには十分な品質があるのか。
- (2) このような装置は、従来の密封管型回折計に比べてアライメントや操作がはるかに難しいのではないのか。
- (3) 回転対陰極は保守に金がかかり、そのサポートには基本的に、フルタイムのテクニシャンを一人必

要とするといわれている。

潜在的な利点は人的資源の損失を補って余りあるのか。

- (4) このような装置の複雑性と故障の可能性があるとして、どれくらいの時間の割合が生産操業に利用できるか。
- (5) 当方のラボは比較的遠隔地にあるが、サービスの手配や予備部品の手配にはどの程度の困難があるか。

これらの問題に答えるために行なわれた一連の実験について本論文で説明することにする。

2. 装置説明

2.1 AFC-5R

理学の AFC-5R 回折計で、回転対陰極形 RU-300 をこれらの実験に使用した。この装置は 190 mm 径のサークルと、400 mm の真空になった回折ビームトンネルを有している。X線源は Cu ターゲット、0.5×10 mm の焦点、グラファイト・モノクロメータを備えた RU-300 回転対陰極形を用意した。通常は、回転対陰極を 15 kW (50 kV, 300 mA) で使用した。10 mm 厚さの透明な (鉛入りポリ塩化ビニール) 放射線シールドを地元で作製、散乱線に対する保護をした。回折計は micro VAX-II [Digital Equipment Corp. (DEC), Maynard, MA] で制御され、これは 9M バイトのメモリと、71M バイトのウインチェスター・ディスクを備えた、現行のバージョン 4.3. である。コンピュータは、micro VAX-II に搭載されている標準の DRV 11-J パラレル・インタフェース・ボード (DEC) によって AFC-5R に接続された。回折計を動作させるソフトウェア制御プログラムは、理学電機/Molecular Structure Corp. (MSC), から供給された。このシステムを Fig. 1 と 2 に示す。

2.2 低温付属装置

回折計を注文した時点では、高分子データ収集はすべて、室温付近の温度で実行する予定であった。ところが

* Permanent Address: Department of Chemistry, University of California, Davis, CA 95616 USA.

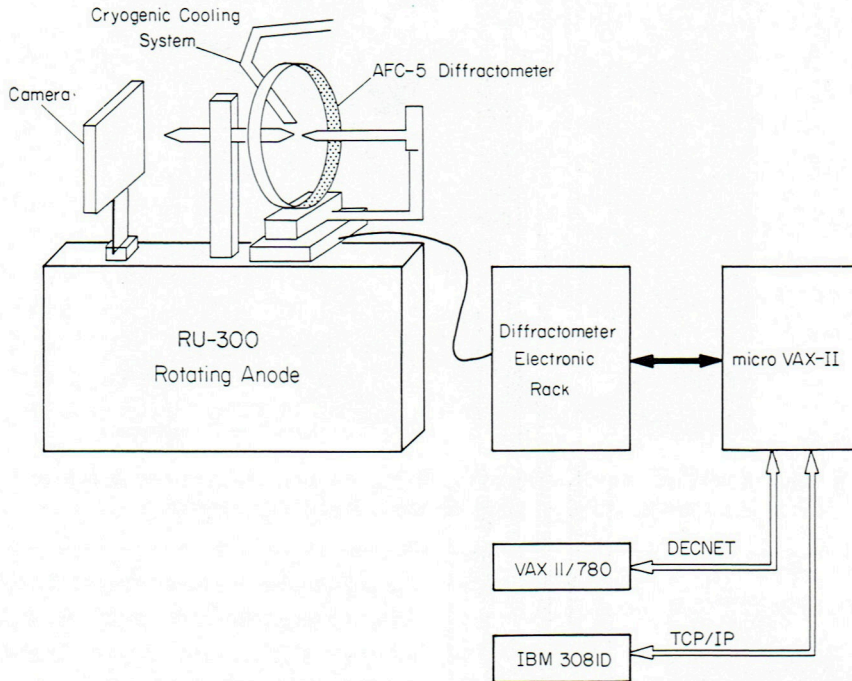


Fig. 1 System block diagram of the Rigaku AFC-5R rotating anode diffractometer and micro VAX-II control computer.

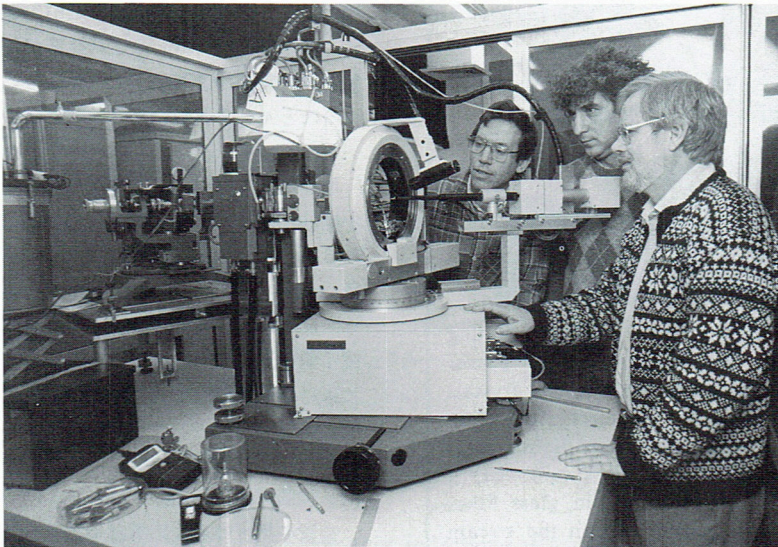


Fig. 2 The AFC-5R rotating anode diffractometer as set up in the X-ray laboratory at the Weizmann Institute of Science.

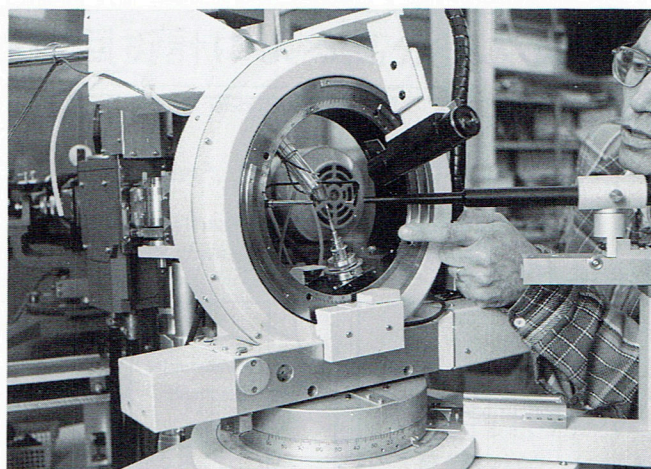


Fig. 3 The provisional fixed position liquid N_2 low temperature cooling system nozzle, at approximately 11:00, in place on the AFC-5R diffractometer.



Fig. 4 The low temperature crystal mounting technique is shown using a low power stereo microscope coating the crystals with a viscous oil in the crystallization droplet. After all mother liquor solution covering a crystal is removed, it is picked up with a thin glass fiber, and then placed directly in the stream of cold N_2 to shock freeze it^{(2),(3)}. It should be emphasized, that the crystal is mounted *without putting it in a capillary*.

装置が納入される頃には、生物学的高分子の多くの結晶は、その結晶学的完全性を保持したまま低温に冷却できることが判明した^{(2),(3)}。そこで事態の進展に応じた低温装置をとりあえず製作する必要性が生じた。Enraf-Noniusの基本的な低温装置が本目的に利用可能であった。この装置は、新しく沸騰させた冷 N_2 を調節したガス流として供給可能である。排気したガラス管とスチロフォームを結合したものを用いて、X サークル (Fig. 3 参照) の比較的自由的な動作ができるような、固定位置冷ガスを供給するための出口管を製作した。使用した装置は当初 115K 近くの温度で使用できたが、現在のモデルでは、結晶の箇所約 90K の定常温度で使用でき、その際の窒素の消費は 0.7 lit/時間である。この装置は、研究室でのほとんどすべての高分子のデータ収集に使用されている。

低温結晶設置法は、まず結晶化液の小滴の中で粘性油を結晶に塗り、結晶をおおっている母液 (Fig. 4) を全部除去することから成り立っている。それから単結晶を薄いガラス・ファイバーでつまみ上げ、直接、冷 N_2 のガス流の中へ置く^{(2),(3)}。当方のラボでは、この低温設置手順は通常半時間ほどかかるが、それは従来のやり方で蛋白結晶を母液と共に細管内に設置するのに要する時間と同等である。

3. 性能テスト

装置の据付け後、回折計のアライメントを行った。これは予想よりもはるかに簡単で、わずか 2, 3 時間を要したに過ぎない。これは主要には、固定 X 線源に対して、AFC-5 回折計を移動させる場合の便利な方法が、システム設計の中に用意されていたからである。

アライメント後、上記の質問の幾つかに答えるため、多くのテストを行った。本章ではやや詳細にこれらのテストを説明する。

3.1 システムの全体的安定性

球形に研磨したルビーの単結晶を、回折計上で方位合わせをした。100,000 カウント/秒近くのピーク強度を持つ反射を、ランダムな間隔で2日間にわたって(63の個々の測定により)測定した。走査速度は、1走査当たり約100,000 カウント出るように選んだ。入射ビーム・モニターは使用しなかった。測定強度から走査強度についての推定標準偏差 $\sigma(I)$ を、次の式から得た。

$$\sigma^2(I) = \sum (I_i - \bar{I})^2 / (n-1)$$

ここで I_i は、走査番号 i におけるカウント数、 \bar{I} は平均値、 n は測定数である。結晶学の実際には、次式から安定性を評価するのが普通である。

$$\sigma^2(I) = \bar{I} + (p\bar{I})^2$$

ここで、 p は時々不確定性因子と呼ばれる調整因子(「ファッジ因子」)である。理想的ポアソン統計では p は 0 である。 p については通常 0.005 という値は優れた値であるとみなされている。ルビーについての今回の諸測定では p 値は 0.001 であり、本質的に完全な安定性を示している。この意味合いで、入射ビーム・モニターを時間基準として使用することは、タイミングを少なくとも100,000 カウントに基くものにしないう限り、皮相安定性を目立って落とすものであると述べるのは妥当であ

る。装置が非常に安定していれば実際上入射ビーム・モニターは必要としないと考えられる。

テストの当初の期間しばしば電源の故障に見舞われた。従って休止のあと回転対陰極の運転を再開してからのビーム強度の再現性を確かめた。後は統計的テストではなんの強度変化も見られなかった。

強度測定から得たデータもまた上述のような安定性を支持している。死海の塩性バクテリアからの蛋白質フェレドキソンのデータセット(下図参照)を、結晶を 115K に冷却して測定した。データの収集中2個のモニター反射を、3日間のデータ収集中繰り返し約 100 回測定した(Fig. 5 を参照)。走査強度は約 10,000 と 7,000 カウントであった。それらの反射の p 値はそれぞれ 0.004 と 0.006 であった。これは蛋白質データとしては並はずれた値であり、小さい分子についての高精度データ収集の場合であったとしても優れている。この安定性は、低温の技術なしでは達成不能であったことをここで強調しておく必要がある。

3.2 密閉管球強度との比較

一つの結晶の強度測定を、密閉管球線源と回転対陰極線源の両方で行った。グラファイト・モノクロメータ $\text{CuK}\alpha$ 線を双方の場合に使用した。密閉管球は 50 kV, 30 mA で、回転対陰極は 50 kV, 300 mA で作動させた。記録された強度比は約 1:10 で電流比と一致している。この 10 倍の強度の増加は、比較的弱い反射を多数

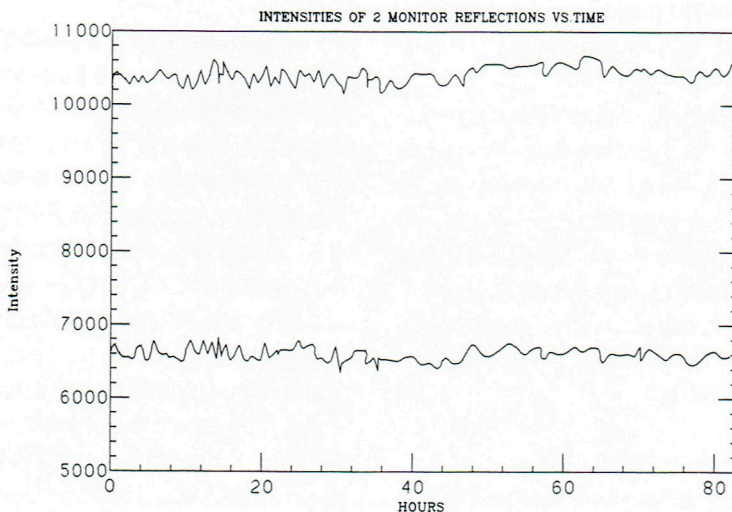


Fig. 5 Stability of the intensity of monitor reflections as a function of time for a protein molecule. Measurements of two monitor reflections (413 top, and 0016 bottom) were repeated approximately 100 times over three days of data collection for the 2Fe-2S ferredoxin from *Halobacteria* of the Dead Sea.

記録しなければならない高分子の測定にとっては極めて重要である。より高い強度のものについては測定速度が増やせるし、より低い強度のものについては向上が見られるので、合理的な時間範囲内に達成しうる分解能の限度が上がるからである。

装置の当初のアライメントに続いて、X線発生装置を、1日24時間、15kW 約3カ月間、休止時間なしに(電源の故障時を除いて)運転し、データ収集を行った。その後、回転対陰極の高圧系の故障のため装置が数か月間動いたり、動かなかったりした期間が続いた。両者で問題を調べたところ(FAX 通信により)、回転対陰極アセンブリ内のセラミック絶縁体の不良が原因であることがわかった。したがって変更を加えた絶縁体と交換した後、今日まで長い期間稼動している。

3.3 減衰率

高計数率での重大な数え落しを防ぐため、回折計は3個の異なるフィルターをビームの中に挿入できるようになっている。さらに電子式数え落し補正回路も付属しており、この回路は手動で起動も停止もできる。使用前に減衰率の測定をMSC/理学のソフトに提供されている自動手順を使用して行った。対陰極の電流値を減少させながら数個の反射について見掛けの減衰率を測定。一連の測定を2組行ったが、一つは電子式数え落し補正なし、他の一つは補正付きである。見掛けの減衰率は強度の関数としてプロットした。電子式数え落し補正なしで測定した各点に、最小二乗法直線を合致させることができた。ゼロ強度の箇所を減衰率の真の値として取り上げることができる。傾斜は不感時間に対応する。このようにして、計数の自然不感時間は仕様通り $\tau = 1.4 \mu\text{s}$ であると決定した。(τ は方程式 $I_{\text{true}} = I_{\text{obs}}(1 + \tau I_{\text{true}})$ により決定される)。

数え落し補正を起動すれば、 τ 値は理想的にはすべての計数率についてゼロであるはずであるが、得られた減衰率は直線には合致しなかった。見かけの不感時間は計数率と共に、15,000 カウント/秒での $\tau = -0.4 \mu\text{s}$ (つまり過剰補正) から、30,000 カウント/秒以上の計数率での有効な正の値(補正不足)に変化することが分かった。従って、最も正確な測定のためには、補正回路は起動させずに、走査プロファイルに基いて数値補正を行った方が最良のように思われる。

3.4 データ収集性能

予備テストの結果は非常に満足なものであったので、生物学的高分子の多くの結晶について本格的なデータ収集に進むことにした。

反射の探索、結晶パラメータと方位マトリックスの決定及び精密化、さらにはデータ収集手順そのものの諸段階を制御するMSC/理学のソフトは、非常にユーザー・フレンドリーであることを強調しておく必要がある。す

なわち、ほとんどのコマンドは、メニュー形式のフォーマットで与えられ、端末画面に示されるデフォルト・パラメータ(容易に無効化可能)付きである。VAX/VMSオペレーティングシステムを学ばなくても、回折計制御プログラムの使用が可能である。我々がこれまで調査した生物学的高分子については、結晶を搭載してデータ収集開始前の設定時間は通常1時間から3時間であった。

次章でこれらの測定で得た経験の最も重要な面を述べる。

4. 生物学的高分子

死海の極塩性バクテリアからのフェレドキシン^{(4),(5)}、DNA トリデカマー d(CGCAGAATTCGCG)⁽⁶⁾ 及びオクタマー d(GGGCGCCC)⁽⁷⁾、人間のカルボモノクシンヘモグロビン⁽⁸⁾、コリン免疫蛋白質⁽⁹⁾、大豆アグルチニン(SBA)⁽¹⁰⁾を含む一連の異なる蛋白質や核酸について、上述の AFC-5R 装置で、3次元の X 線回折データを収集した。一般的に言って空間群は不変であり、AFC-5R 上で、低温で確定した蛋白質と核酸の単位胞のパラメータは、室温又は 4°C で測定したパラメータの 3% 以内であった。

テストした高分子のほとんどは、衝撃冷却が可能で X 線データ収集ができるが、SBA はいったん冷却されると、まったく回折しない蛋白質の一例である。我々はこうした問題の場合は、結晶を MPD 乃至エチレンジリコールの 20~30% 溶液に浸すことで対応できることが分かった。低温装置と共に、回転対陰極から莫大な利益を得た2つのデータセットの例を、以下で更に詳しく述べる。

4.1 死海の塩性バクテリアからのフェレドキシン

地球上に見出される、最も塩分を含んだ水液体である死海の塩分環境から生き延びるために、死海の極塩性バクテリアは、それぞれ 0.7M と 4M もある 1 価陽イオンの内部濃度を維持している。極端に好塩性の有機体からの蛋白質は、塩の高モル濃度の中でその機能を遂行できるだけでなく、これらの蛋白質の中には、自分の安定のために塩を要求するものすらいる。蛋白質を可溶にし、実際に飽和した塩の溶液に対して活性にさせる構造的要件は何であろうか。

極端に塩分を含む環境に対する蛋白質の適応過程のモデルとして、我々は死海の塩性バクテリアからの 2Fe-2S フェレドキシンの結晶構造を調査中である。それを選んだのは、1部には、スピリリナプラテンシス⁽¹¹⁾及びアフノテカサクラム⁽¹²⁾からの、同じ 2Fe-2S 配合団を持つ関連非好塩性フェレドキシンの3次元構造が分かっているからである。フェレドキシンの単結晶から 115K で X 線データの完全な領域を 1.9Å の分解能にまで及んで収集した。強調すべきことは、低温技術が実際上限

りなく結晶の回折能力を保存したように見えることである。従って一個の単結晶からの約 20,000 の反射の全セットを、大体 3 日間以内に収集することが可能であった (約 6,000 反射/日)。以前は、従来の密封管型回折計の場合、室温でそれを行うには、約一カ月と、放射線で損傷を受けるため多くの結晶を必要とした。これらの低温データは、並はずれて高品質で、Fobs の 89% 以上は推定標準偏差の 6 倍以上であり、全体の Rsym は 2.5% であった。

低温データに基づいて電子密度マップを計算したが、以前に決定しておいた相⁽¹³⁾を用い、当初 3.3Å の分解能まで達した。この新しいマップは、以前室温データを用いて計算したものよりずっと明瞭であった。この改良マップによって、蛋白質のバックボーンをたどって行き、CORELS⁽¹⁴⁾、と PROFFT^{(15),(16)} による予備的最小二乗法の後、目下の R 因子は、データを 2.5Å 分解能データにするものについては、27.3% である (Fig. 7 を参照)⁽¹⁷⁾。

4.2 挿入塩基を含む DNA 分子

DNA 合成法の最近の進歩⁽¹⁸⁾は、4-12 スクレオチド長さの DNA 単結晶を、あらかじめ定めたシーケンスで、X 線結晶学により研究することを可能にした⁽¹⁹⁾。これまで、1 例⁽²⁰⁾のほかには、自己補足的 DNA シーケンス乃至不釣り合いな塩基対⁽²¹⁾を含むものを調べてきた。これらの研究から見て、DNA は適合する上で途方もない柔軟性を示すように思われる。

核酸二重型における螺旋形外塩基の適合と 言う 問題

は、フレームシフト突然変異に関連があるので、長い間関心をそそる問題であった^{(22),(23)}。我々はトリデカマーシーケンス、d(CGCAGAATTCGCG)、を X 線結晶学で研究中である⁽²⁴⁾。4 の位置における挿入アデノシンを除いて、それは以前に確定した B-DNA ドデカマー、d(CGCGAATTCGCG)⁽²⁵⁾ と同じシーケンスを有している。この構造解析を行ったのは、核磁気共鳴データ⁽²⁶⁾ から予知されるように、余計な残基が螺旋内に積み重なっているか、又はループ外に置かれているかを決定するためであった。

当初、結晶の X 線データを室温及び 4°C で収集した⁽²⁷⁾。しかしながら結晶は、X 線ビームの中で 2, 3 時間のうちに分解し、単位胞寸法の一つに著しい収縮を示した。上述の極低温 X 線データ収集の技法を用いたところ、結晶の寿命を X 線の中で事実上無制限に伸ばすことが可能となった。

理学的 AFC-5R を用い、115K で、1 個の単結晶から X 線データの完全なセットをその回折限度、すなわち 2.5Å の分解能に及ぶまで収集した。上述のフェレドキシンの場合のように、モニター反射は、データ収集を通じてなんの強度ロスも示さなかった。結晶の損傷が無いことを示す。

プログラム ULTIMA⁽²⁸⁾ を用いてその構造を解明し結果は、溶液中⁽²⁹⁾で観察されるものとは対照的に、結晶内では挿入アデノシンはループ外にあることを明瞭に示している。

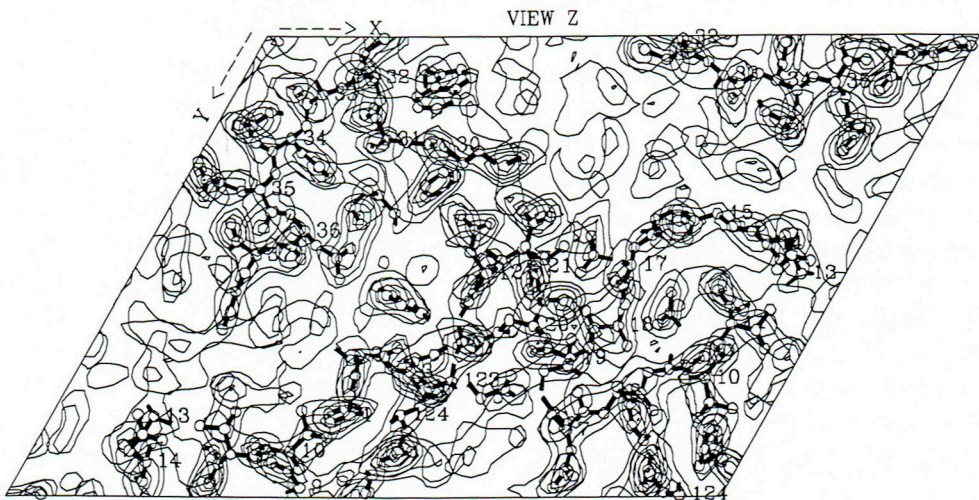


Fig. 6 Five Angstrom thick slice through the 2.5Å resolution 2Fo-Fc map of ferredoxin from *Halobacterium* of the Dead Sea as determined from data obtained on the AFC-5R system at 115K. C_α atoms, for each amino acid, appearing in this portion of the map are labeled.

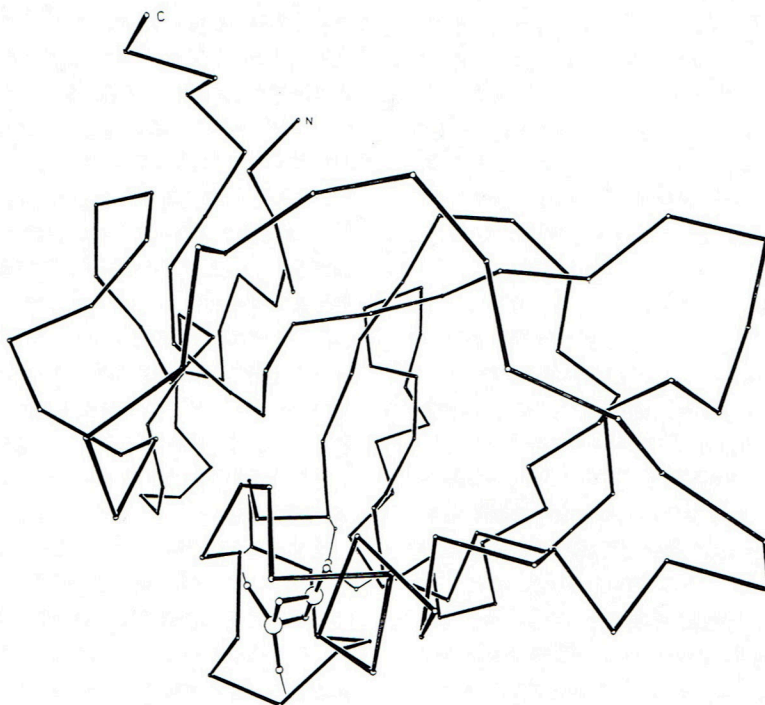


Fig. 7 ORTEP⁽³⁰⁾ drawing of the three-dimensional backbone structure of ferredoxin from *Halobacterium* of the Dead Sea as determined from data obtained on the AFC-5R system at 115K. The 2Fe-2S prosthetic group liganded to the protein appears in the lower left portion of the illustration.

5. おわりに

主要な結論としては、序論で投げかけられた問題はすべて、一切の懸念を晴らすような具合に答えられたと云うことである。

据付けと保守は、我々の要員と技術的資産で容易に扱えるし、必要な際の理学電機からのサポートは満足の行くものであった。回転対陰極に関する当初の若干の問題、それは現在は解決済みであるが、その後は装置全体は従来の密閉管式回折計と同様に信頼できる。

低温付属装置との共用で、本装置は多くの生物学的高分子について、異例の高い品質を持つデータを生み出した。データ収集速度は満足の行くものであった。ただし、各軸に最高駆動速度を与えたとしても期待されるほど早いものではない。多分これは、装置のバルスモータ用の、多少用心深い作りになったランプ・テーブルに関連があり、各反射間の移動に相対的に長い時間をかけているからであろう。駆動システムを丹念に調整したら速度は目立って増加できた。加えて、望ましくない遅れがデータ収集設定時に減衰フィルタの使用を選択した際に見受けられる。後者の場合、どういう減衰を用いるべきかを決定する上で、各反射について相当な時間が消費される。高過ぎる計数率が検出器で記録された場合にのみ

減衰の必要に応じるようにしたほうが、より生産的であろう。

実際のデータ品質、すなわち正確度を評価するのは難しいが、我々側の証拠は（モニター反射の安定性、Rsym、電子密度マップの品質）、この装置で得たデータは、同様な試料について以前に入手したどんなデータよりも遙かに高い品質のものであることを示唆している（Fig. 5, 6 を参照）。高品質のデータを取得するには回折計/回転対陰極線源及び低温技術は、必要な因子であると信じるわけである。

適度なサイズのデータセット（50,000 までの反射）についてのアプローチは、技術的単純性とデータ品質の両面で、伝統的なフィルムに基づく方法に比べて、劇的な有利性を与えるものであると我々は確信している。また、多くの場合、この装置を使用すればシンクロトロン線源を不要にするという強い表示も幾つか持っている。

興味をそそる問題として従来の4軸回折計対エリア・デテクタの相対的メリットがある。操作の単純性の点で言えば、4軸回折計は現在明白な利点を有している。しかしこれらの利点は、エリア・デテクタ装置の改良が続くにつれて重要性が減少するかもしれない。非常に大きいデータセットについては、エリア・デテクタは利点を

持つように思われる。エリア・デテクタのデータセットで、4 軸回折計でも合理的に扱えるような大きさのものについて、データ品質の比較ができるような充分な情報を我々はまだ持っていない。

小さいものから適度な大きさまでのデータセットについては、本論文で説明した線に沿って構築したシステムが全体的性能の点で現在では最良である。このような装置は、巨大高分子を除く生物学的高分子に関して、高い品質のデータ収集と全般的に行う最良の研究手段を今後多年にわたって提供し続けるものと我々は期待する。

謝 辞

本研究を通じて有用で激励的な議論をして頂いた Ada Yonath, Wolfie Traub, Fred Hirshfeld, Henryk Eisenberg, Dov Rabinovich, Menachem Shoham, Michal Harel, Boaz Shaanan, Mark Saper, Leemor Joshuaor, 及び、すばらしいテクニカル・サポートをしていただいた Y. Halfon, Y. Shabtai に感謝します。本研究は、米国陸軍研究所（その欧州研究所を通じて）、ミネルパ財団、及びイスラエル、エルサレムの米国-イスラエル両国科学財団 (BSF) の補助金にサポートされました。

参 考 文 献

- (1) R. Helliwell, *The Rigaku Journal*, **3** (1986), 3-12.
- (2) H. Hope, *Amer. Cryst. Assoc., Abstract Ser.* **2**, **13** (1985), abstract No. PA3.
- (3) H. Hope, *Acta Cryst.*, **B44** (1988) 22-26.
- (4) J. L. Sussman, M. Shoham, M. Harel, F. Frolow and H. Hope, *International Meeting on Biochemistry, Beijing*, abstract (1987), B-A1-0453, p. 386.
- (5) M. Shoham, J. L. Sussman and M. Harel, *IXth International Congress of Biophysics, Jerusalem*, abstract (1987), p. 26.
- (6) J. L. Sussman, L. Joshua-Tor, M. Hirshberg, M. A. Saper, F. Frolow, H. Hope and E. Appella, *Transactions of the Beijing Meeting on "Molecular Structure: Chemical Reactivity and Biological Activity"*, (1987), in press.
- (7) D. Rabinovich, M. Eisenstein, T. E. Haran and Z. Shakked, *IXth International Congress of Biophysics, Jerusalem*, abstract (1987), p. 113.
- (8) B. Shaanan, (1987), unpublished results.
- (9) M. Shoham, *IXth International Congress of Biophysics, Jerusalem*, abstract (1987), p. 115.
- (10) B. Shaanan, (1987), unpublished results.
- (11) T. Tsukihara, K. Fukuyama, M. Nakamura, Y. Katsube, N. Tanaka, M. Kakudo, K. Wada, T. Hase and H. Matsubara, *J. Biochem. (Tokyo)*, **90** (1981), 176-1773.
- (12) T. Tsukihara, M. Mizushima, K. Fukuyama and Y. Katsube, *International Summer School on Crystallographic Computing II, Kyoto*, (1983), pp. 63-64.
- (13) J. L. Sussman, J. H. Brown and M. Shoham, *Iron-Sulfur Protein Research* (eds. H. Matsubara, Y. Katsube and K. Wada), Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, (1986), 69-82.
- (14) J. L. Sussman, S. R. Holbrook, G. M. Church and S.-H. Kim, *Acta Cryst.*, **A33** (1977), 800-804.
- (15) W. A. Hendrickson and J. H. Konnert, *Biomolecular Structure, Function, Conformation and Evolution* (eds. R. Diamond, S. Ramaseshan and K. Venkatesan), 13.01-13.25, Indian Academy of Sciences, Bangalore. (1980).
- (16) B. C. J. Finzel, *Appl. Cryst.*, **20** (1987), 53-55.
- (17) M. Shoham, M. Harel and J. L. Sussman, submitted to *Science*. (1987).
- (18) K. Itakura, N. Katagiri, C. P. Bahl, R. H. Wightman and S. A. Narang, *J. Amer. Chem. Soc.*, **97** (1975), 7327-7332.
- (19) R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini and M. L. Kopka, *Science*, **216** (1982), 475-485.
- (20) M. McCall, T. Brown, W. N. Hunter and O. Kennard, *Nature (London)*, **322** (1986), 661-664.
- (21) T. Brown, O. Kennard, G. Kneale and D. Rabinovich, *Nature (London)*, **315** (1985), 604-606.
- (22) G. Streisinger, Y. Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi and M. Inouye, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31** (1966), 77-84.
- (23) J. W. Drake, B. W. Glickman and L. S. Ripley, *American Scientist*, **71** (1983), 621-630.
- (24) L. Joshua-Tor, J. Hope, E. Appella and J. L. Sussman, *Fifth Conversation in Biomolecular Stereodynamics*, Albany, NY, abstract (1987), pp. 42-43.
- (25) R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura and R. E. Dickerson, *Nature (London)*, **287** (1980), 755-758.
- (26) D. J. Patel, S. A. Kozlowski, L. A. Marky, J. A. Rice, C. Broka, K. Itakura and K. Breslauer, *J. Biochemistry*, **21** (1982), 445-451.
- (27) M. A. Saper, H. Eldar, K. Mizuuchi, J. Nickol, E. Appella and J. L. Sussman, *J. Mol. Biol.*, **188** (1986), 111-113.
- (28) L. Joshua-Tor, D. Rabinovich, H. Hope, F. Frolow, E. Appella and J. L. Sussman, *Nature*, **334** (1988), 82-84.
- (29) D. Rabinovich and Z. Shakked, *Acta Cryst.*, **A40** (1984), 195-200.
- (30) C. K. Johnson, *A FORTRAN Thermal-Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations*, ORNL-3794 (Second Revision), Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN., (1965).