

# アスパラギン酸プロテアーゼ前駆体の異宿主発現系の構築とプロ配列の機能\*

井上英史\*\*

## 1. 序

### 1-1. 概要

近年、タンパク質の立体構造が次々と明らかにされており、標的分子の立体構造に基づいた薬物設計が行われている。最近のトピックスとしては、エイズ治療薬としての HIV プロテアーゼ阻害剤開発の成功が挙げられる。このような研究を支える技術として、天然試料からの精製が困難なタンパク質を大腸菌などの異宿主によって大量に発現する方法は重要である。プロテアーゼは様々な生命現象において重要な役割を担っており、医薬品や農薬としての阻害剤開発が求められることが多い。合理的な阻害剤の設計を行うためには立体構造の情報が必要であるが、標的とするプロテアーゼを充分な量で精製することが困難な場合も多い。

この研究ではまず、アスパラギン酸プロテアーゼの異宿主発現に関する基礎的な研究を行った。その目的の一つは、上述のように医薬品の標的となると考えられる酵素の立体構造の解析から阻害剤のデザインへと展開することである。大腸菌および *Bacillus brevis* を用いてアスパラギン酸プロテアーゼの発現系の構築を行った。特に、糸状菌由来のプロテアーゼを *B. brevis* HPD31 を用いて分泌発現させることにより、プロテアーゼの発現系としては非常に高効率の発現を行うことができた。また、プロ配列の構造と発現量に相関が見られ、他のアスパラギン酸プロテアーゼの発現系を構築する上で参考になる結果であると思われる。

異宿主発現系を構築するもう一つの目的は、タンパク質の構造と機能の関連に関して、より精密な解析へと展開することである。タンパク質が様々な機能をど

のように具現しているかについては多くの研究がこれまでになされており、メカニズムの説明がされている酵素も多い。しかし、よく研究されているタンパク質についてさえも、現在の理解はまだ浅いものと言える。タンパク質の構造機能相関の研究の背景には、人為的に新しい機能を持ったタンパク質を設計するという応用的な目標があるが、新機能タンパク質をデザインすることはおろか、天然の酵素をまねることすら現時点では至難の技である。その為には、特定のタンパク質ファミリーに的を絞った実験データの集積が必要であると思われる。この研究では、異宿主発現系により調製したアスパラギン酸プロテアーゼ前駆体およびその部位特異的変異体を用いて、プロ配列の役割、構造機能相関に関する解析を行った。アスパラギン酸プロテアーゼのプロ配列の機能として、フォールディング、細胞内での局在化、活性化の制御などへの関与が挙げられているが、構造に基づいた明確な理解はされていない。アスパラギン酸プロテアーゼは一般に酵素本体に酸性残基が多く、プロ配列には塩基性残基が多い。この酸性残基と塩基性残基との相互作用がプロ配列の機能に重要であると考えられ、プロ配列の塩基性残基を中性残基に置換した変異体を種々作製し解析を行った。

### 1-2. アスパラギン酸プロテアーゼ

プロテアーゼの多くは、触媒中心の構造によりセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼの4つのタイプに分類される。このうち、アスパラギン酸プロテアーゼは2つのアスパラギン酸残基が触媒機構において中

心的な役割を担っており、酸性条件下で最大の活性を示すものが多い。アスパラギン酸プロテアーゼ・ファミリーには胃液中の消化酵素であるペプシン、リソゾームのカテプシンD、血圧の調節に関与するレニン、細胞質に存在し機能が不明なカテプシンEなどがある。また、レトロウィルスの増殖に必要なプロテアーゼもアスパラギン酸プロテアーゼである。

アスパラギン酸プロテアーゼ・ファミリーには、医薬品開発の標的酵素として重要なものが多い。例えば、血圧の調節に関与するレニンの阻害剤や、HIVの増殖に必要なHIVプロテアーゼの阻害剤の開発研究がこれまでに世界的に展開され、既に成果が得られている。最近では、寄生虫病の制圧が世界的なテーマとなっているが、アスパラギン酸プロテアーゼは制圧薬の開発のための標的酵素の一つと考えられている。例えば、マラリア原虫は赤血球中で増殖する際にヘモグロビンを栄養源とするが、ヘモグロビンの消化に関与する酵素の阻害剤は抗マラリア薬となることが期待される。マラリアでヘモグロビンの消化に関与するプラスメプシンI、IIはアスパラギン酸プロテアーゼである。また、フィラリア症などの原因となる住血性の寄生虫に対しても、消化器のアスパラギン酸プロテアーゼを標的とする阻害剤が制圧薬として期待される。寄生虫以外にも、カンジダ菌が皮膚に感染する際に必要なアスパラギン酸プロテアーゼなどが、医薬品の標的となると考えられる。

医薬品のデザインにあたり、これらのアスパラギン酸プロテアーゼやその阻害剤との複合体の立体構造の情報が望まれるが、結晶解析に十分な量のプロテアーゼを精製することが困難な場合も多い。HIVプロテアーゼのX線結晶構造解析や阻害剤のデザインには化学的に合成したプロテアーゼが活用されたが(文献1)、レトロウィルス以外のアスパラギン酸プロテアーゼは300アミノ酸残基以上の大きさを持ち、化学合成を行うことは不可能である。従って、異宿主発現系の構築が必要となる。

### 1-3. タンパク質の異宿主発現系

タンパク質の立体構造に関する情報は、最近急速に増えてきている。いろいろなタンパク質の立体構造が次々と解析できるようになった背景には、タンパク質を異なる宿主中で大量に発現させる方法が進歩したことがある。立体構造の情報は、タンパク質の機能がどのような構造、どのような機構に基づいているのかを明らかにすることにおいて必要不可欠である。また、タンパク質の変異体を種々作製して解析することもタンパク質の機能やメカニズムを理解する上で重要であるが、このような研究にも異宿主発現系は欠かすことができない。

タンパク質の異宿主発現系は種々開発されているが、その成否は個々のタンパク質によって異なる。タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)のように異種細胞中で活性型が発現したときに細胞毒性を起こしやすいタンパク質もあり、そのようなタンパク質は細胞毒性を引き起こさないような方法を用いることが必要である。例えば、細胞内で活性のないインクルージョン・ボディを形成させたり、細胞外へ分泌させることにより細胞毒性を低減することが考えられる。

## 2. アスパラギン酸プロテアーゼの大腸菌による発現 (文献2, 3)

### 2-1. 発現系の構築

ペプシンなどのアスパラギン酸プロテアーゼはプレプロ体として生合成され、シグナルペプチドが切断されてプロ体が生じる。プロ体は中性条件下では不活性である。ペプシンの場合は、プロ体のペプシノーゲンが胃液中に分泌されて酸性条件下にさらされると自己触媒的にプロ配列を切断して、活性型酵素を生じる。他のアスパラギン酸プロテアーゼについても、酸性条件下で自己触媒的に活性化するのが多い。活性化したペプシンは、中性以上のpHでは不可逆的に失活する。従って、プロ配列の役割は、中性条件下で前駆体の活性化を抑えるとともに、立体構造の形成にも必要である可能性が考えられる。このことから、アスパラギン酸プロテアーゼの発現系を構築するにあたり、前

駆体での発現を行う必要があると考えられた。発現系構築のためのモデル酵素として糸状菌 *Aspergillus niger* var. *macrosporus* 由来アスペルギロペプシン I を用いた (文献 4)。アスペルギロペプシン I をはじめ糸状菌由来のアスパラギン酸プロテアーゼは、プロペロ体として生合成されることが cDNA の構造から示唆されるが、菌体からプロ体が検出されてない。従って、異宿主発現系でプロ体を調製することにより、初めてプロ体の性質や活性化機構などの解析を行うことが可能になる。大腸菌細胞内での発現にはシグナルペプチドは必要ないので、von Heijne の方法 (文献 5) を用いて、シグナルペプチダーゼによる切断点を予想した。プロ体 (アスペルギロペプシノーゲン I) をコードすると推定される塩基配列を、cDNA を鋳型にして PCR により増幅し、T7 プロモーターを持つ発現ベクター pAR2113 (文献 6) に組み込んだ (図 1 A)。DNA シークエンスにより正しい塩基配列を持つことを確認した発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、発現の実験に用いた。

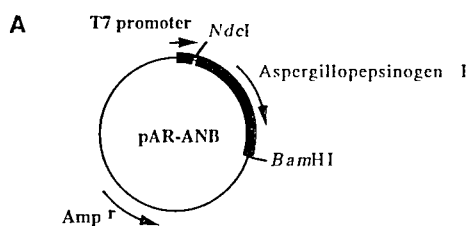


図 1. 発現に用いたプラスミド (詳細は文献 3 参照)

A. pAR2113 より構築した大腸菌の発現プラスミド pAR-ANB.

## 2-2. リフォールディングによるアスペルギロペプシノーゲン I の調製

この発現系により大量のアスペルギロペプシノーゲン I が生成することがウェスタンブロッティングにより確認されたが、そのほとんどは可溶性画分にはなく、インクルージョンボディを形成していた。大腸菌をリゾチーム処理と超音波破碎により溶菌して遠心分離し、沈殿したインクルージョン・ボディを 8 M 尿素と 100 mM 2-メルカプトエタノールを含むバッファー (50

mM Tris/HCl, pH 8.0) により溶解した。遠心分離により不溶物を除き、上清を変性剤と還元剤を含まないバッファーで 10 倍に希釈することにより変性タンパク質のリフォールディングを行った。この操作を行った後の試料は、pH を酸性にすることによりプロテアーゼの活性が見られ、正しい立体構造を持つアスペルギロペプシノーゲン I が生成したと考えられる。リフォールディングしたアスペルギロペプシノーゲン I を DE52 カラム, Superose 6 HR カラム, FPLC Mono Q カラムにより精製した。精製したアスペルギロペプシノーゲン I は SDS-PAGE で単一のバンドを与え、1 リットルの培養液からの収量は約 1 mg であった。アスペルギロペプシノーゲン I は、pH 5 以上では活性化しなかったが、pH 2~4 では二つの中間体を経て成熟型のアスペルギロペプシン I に変換することが SDS-PAGE により観察された (図 2)。この活性化の過程はアスパラギン酸プロテアーゼの特異的阻害剤であるペプスタチン A により阻害されたことから、哺乳類のペプシンなどと同様に、酸性条件下で自己触媒的に活性型酵素を生じることが明らかになった。

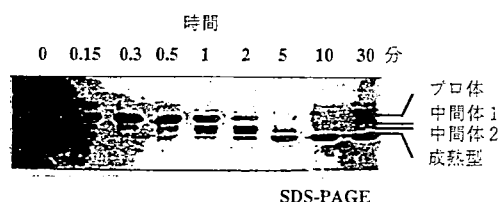


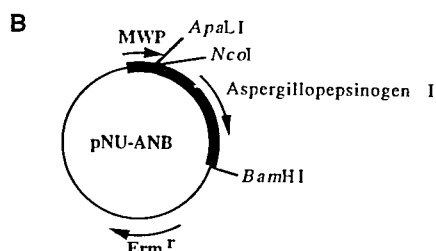
図 2. アスペルギロペプシノーゲン I の活性化 (pH 2).

## 3. アスパラギン酸プロテアーゼの *Bacillus brevis* による分泌発現 (文献 3, 7)

### 3-1. 発現系の構築

*B. brevis* による高効率のタンパク質発現系が、鶴高らによって開発されている (文献 8)。この発現系の特徴は細胞外に大量の発現タンパク質を分泌することである。この系を用いて、酸性プロテアーゼの発現を試みた。上述のアスペルギロペプシン I に加え、ヒ

トの細胞外タンパク質であるペプシン A (文献 9) についても検討を行った。また, *A. niger* var. *macrosporus* が菌体外に分泌するもう一つの酸性プロテアーゼであるアスペルギロペプシン II の発現も試みた。アスペルギロペプシン II は, ペプシンに代表されるアスパラギン酸プロテアーゼとは一次構造的にまったく異なる新しいタイプのプロテアーゼであり, その触媒残基等は不明であり, 高次構造解析や部位特異的変異による解析が待たれているプロテアーゼである (文献 10, 11)。各プロテアーゼはプロ体であるアスペルギロペプシノーゲン I および II, ペプシノーゲン A として発現させる系をデザインした。菌体外に分泌するためのシグナルペプチドは, *B. brevis* の細胞壁を構築するタンパク質である MWP の配列を, さらに分泌効率を上げるべく改変したものをを用いた (文献 12)。またプロモーターも MWP 遺伝子由来のものをを用いた (図 1 B)。



B. pNU211R2L5 より構築した *B. brevis* の発現プラスミド pNU-ANB.

### 3-2. 発現

アスペルギロペプシノーゲン I および II, ペプシノーゲン A のうち, アスペルギロペプシノーゲン II については, 菌体内, 菌体外のいずれからもウェスタンブロットにより発現タンパク質を検出することができなかった。ペプシノーゲン A は, 菌体成分からはウェスタンブロットにより発現タンパク質を検出できたが, 菌体外の培養液からはわずかに検出できる程度であった。一方, アスペルギロペプシノーゲン I については, 培養 2~4 日目の培養液中から明確に検出することができた。また, 酸性プロテアーゼ活性も検出され, 天然の精製酵素の比活性との比較から, 培養液 1 リット

ルあたり約 50 mg のアスペルギロペプシン I に相当した (図 3)。

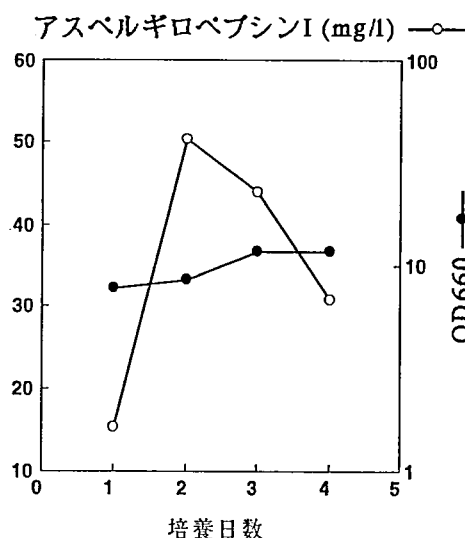


図 3. *B. brevis* HPD31 によるアスペルギロペプシノーゲン I の発現。菌体量を OD660 で示す。発現したアスペルギロペプシノーゲン I を pH 2 で活性化して酸変性したヘモグロビンに対する活性を測定し, 天然試料から精製したアスペルギロペプシン I の比活性を基に発現したタンパク質量を換算した。

### 4. アスペルギロペプシノーゲン I の活性化 (文献 3, 13)

*B. brevis* で発現したアスペルギロペプシノーゲン I は, 大腸菌で発現したアスペルギロペプシノーゲン I と同様に酸性条件下で自己触媒的に活性化した。活性化により精製したアスペルギロペプシン I は天然のものと同等の性質を示したが, N 末端のアミノ酸配列は, いずれの発現系で調製したのも天然のものより 3 残基長く, Lys66 と Glu67 の間で切断されていた (図 4)。このことは, *A. niger* var. *macrosporus* では, 他のプロテアーゼによるプロセッシングも受けていることを示唆する。

*B. brevis* で発現したアスペルギロペプシノーゲン I においても活性化の過程で中間体の生成が見られ, 微量のペプスタチンを加えることにより中間体をトラップすることができた (図 5 A)。その N 末端のアミノ酸配列は Ser-Leu-Ala-Lys-Phe であり, Arg52 と Ser53 の間で切断したことがわかる。Arg52 を Gln に

置換した変異体を *B. brevis* 発現系で調製し、酸性条件下でインキュベートしたところ、活性化はまったく

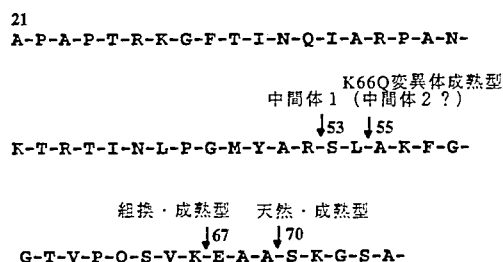


図4. アスペルギロペプシノーゲンIのプロ配列のアミノ酸配列とプロセッシング部位(↓). 数字はプレプロ体でのアミノ酸配列の番号.

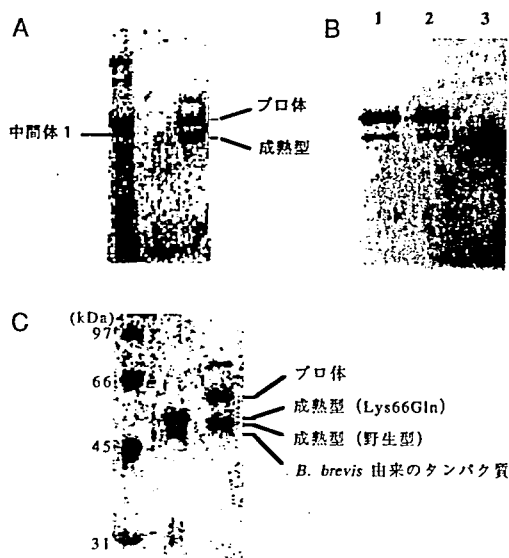


図5. アスペルギロペプシノーゲンIの活性化過程の解析 (pH 2.2).

A. レーン左, ペプスタチンAを添加することにより中間体をトラップした. レーン右, 活性化していないプロ体と, 天然試料から精製したアスペルギロペプシノーゲンI (成熟型).

B. Arg52Gln 変異体の活性化. レーン1, 酸性条件下でインキュベートする前のプロ体 (上のバンド). レーン2, 酸性条件下でインキュベート後. レーン3, 天然試料から精製したアスペルギロペプシノーゲンIを微量加えてインキュベートしたもの.

C. Lys66Gln 変異体の活性化. レーン右, 分子量マーカー. レーン中, 酸性条件下で活性化したもの (上のバンド). レーン左, 活性化していないプロ体と天然試料から精製したアスペルギロペプシノーゲンI.

起こらなかった (図5B). しかし, ここに天然のアスペルギロペプシノーゲンIを微量加えたところ, Arg52Gln 変異体の活性化が見られた. このことは,

アスペルギロペプシノーゲンIの活性化の第一段階は, 分子内の Arg52-Ser53 を切断することであり, 自己活性化にはこの過程が必須であることが考えられる. ただし, 活性化したアスペルギロペプシノーゲンIが存在する場合は, 分子間の反応で, Arg52-Ser53 の切断を介さずに活性化することができる.

Lys66 を Gln に置換した変異体では, 活性化は起こるが, 成熟型の分子量は野生型のものより大きく, N末端は Leu54 であった (図5C). おそらく, この型が図2で観察された中間体2であると推測される.

### 5. プロ配列の分子内シャペロンの役割と Lys56 の重要性

アスパラギン酸プロテアーゼの前駆体では, ペプシノーゲンAやプロガストリクシンのX線結晶構造解析が報告されているが, プロ配列は触媒部位の溝を埋めるように結合しており, 触媒部位の二つのアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基とプロ配列の Lys56 の側鎖アミノ基との間に相互作用が見られる (文献14, 15) (図6). この静電的相互作用が触媒部位のプロッ

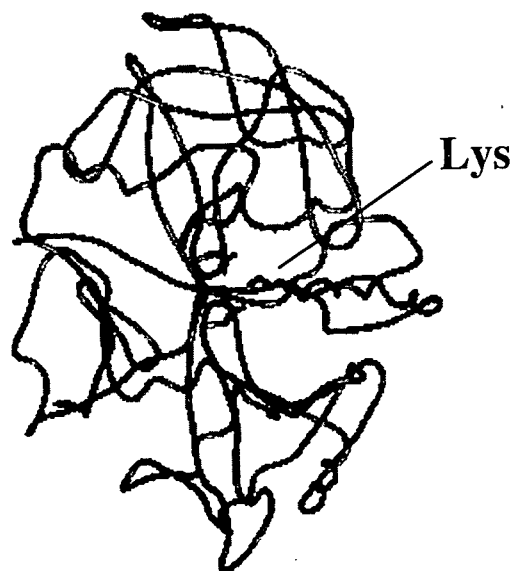


図6. ブタ・ペプシノーゲンAのX線結晶解析によるデータ (PDB ファイル 2PSG) を基に作図したもの. プロ配列36位の Lys (本文中の Lys56 に相当) の側鎖と触媒中心の二つのアスパラギン酸が表示してある.

クや活性化の条件に重要であると考え、Lys56をAsnに置換した変異体を*B. brevis*分泌発現系により調製した。しかし、Lys56Asnタンパク質の発現は見られるものの、酸性条件下でインキュベートしても活性化は全く見られなかった。また、Lys56Asn変異体を大腸菌を用いて発現させ、8M尿素で可溶化したタンパク質を種々の条件で巻き戻しを行った。しかし、試みたいずれの条件においても活性の発現は見られなかった。一方、Lys56をArgに置換した変異体では、活性化が見られた。これらのことから、アスペルギロペプシノーゲンIのプロ体はフォールディングに必須であり、56位のアミノ酸残基の側鎖と触媒部位との間の静電的な結合が特に重要であると考えられる。

#### 6. アスペルギロペプシノーゲンIの活性化機構とプロ配列中の塩基性残基の役割

以上の結果から、アスペルギロペプシノーゲンIの活性化の過程は図7のように推測される。生合成された直後のアスペルギロペプシノーゲンIは、中性条件下で立体構造を形成する。このとき、プロ配列のリジン残基(Lys56)が触媒残基のアスパラギン酸とイオン結合を生じることが重要である。また、これにより触媒部位がブロックされ、アスペルギロペプシノーゲンはプロテアーゼ活性を発現しない。アスペルギロペプシノーゲンIが分泌顆粒中あるいは菌体外の酸性条件下にさらされることによりコンフォーメーションの変化が誘導され、Lys56と触媒残基との間の結合が解離する。しかし、プロ配列はまだ触媒部位の溝をふさいでおりプロテアーゼ活性を発現することはできない。分子内のArg52-Ser53の結合を切断することにより、プロ配列とアスペルギロペプシン触媒部位との結合が弱まり、プロテアーゼ活性を発現する。ただし、Arg52-Ser53の結合が切断されなくても低分子である阻害剤ペプスタチンAは触媒部位に入り込むことができ、触媒部位に結合してアスペルギロペプシノーゲンIの活性化を阻害することができる。Arg52-Ser53を切断して生じた中間体1は引き続いて分子内または分子間反応でLeu54-Ala55を切断して中間体2を生

じ、そしてLys66-Glu67を切断して成熟型のアスペルギロペプシンIとなる。

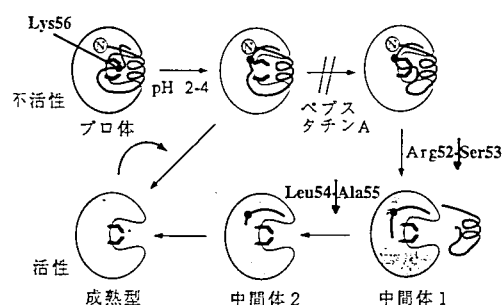


図7. アスペルギロペプシノーゲンIの活性化機構。

#### 7. *B. brevis*分泌発現系による発現量とプロ配列構造との相関

アスペルギロペプシノーゲンIのプロ配列には8個の塩基性残基がある(図4)。このうち、Arg52, Lys56, Lys66を部位特異的に変異した結果は既に述べた。他の5つの塩基性残基についてもGlnに置換した部位特異的変異体を作製した。これらの変異体は、活性化の過程に本質的な影響は与えなかったが、*B. brevis*発現系における発現量には影響が見られるものがあった。すなわち、N端に近いArg26とLys27は、Glnに置換することにより、発現量が上昇した(表1)。

表1. アスペルギロペプシノーゲンI変異体の*B. brevis*による発現量

	培地	発現量(1リットルあたり)
野生型	5'PY	50 mg
Arg27Gln	5'PY	80 mg
Arg26Gln	5'PY	90 mg
Arg26Gln	5'PY + 0.3% グリシン	118 mg

Arg26Gln変異体では1リットルの培養で、90mgのアスペルギロペプシンIに相当する活性の発現が見られた。この発現量は、培地に0.3%のグリシンを添加することにより、さらに118mgまで上昇した。このことから、N端に近い位置の塩基性残基は*B. brevis*による発現において不利であり、中性残基と置換することにより発現量が増す可能性が考えられる。ヒト・ペプシノーゲンの発現量は非常に低く、アスペルギロペプシンIIはまったく発現が検出できなかったが、これらを比較するとN端近傍の塩基性残基の数が多

い程発現量が減る傾向が見られる(図8)。この点についてはさらに検討が必要であるが、アスパラギン酸プロテアーゼの発現系をデザインするにあたり、N端近傍の塩基性残基を減らすことは有効かもしれない。

アスペルギロペプシノーゲン I	APAPTRKGFITINQIA
ヒト・ペプシノーゲン A	IMYKVPLIRKKSLLRR
アスペルギロペプシノーゲン II	APLTKRRRARKEARA

図8. アスペルギロペプシノーゲン I, ヒト・ペプシノーゲン A, アスペルギロペプシノーゲン II の N 末端から 15 残基目までのアミノ酸配列の比較。塩基性残基を太字で示す。

#### 今後の展望

この研究で構築した *B. brevis* による発現系は、アスパラギン酸プロテアーゼの発現系として、発現量の点で最も成功した部類に入り、また、人為的なリフォーディングの操作を必要とせずに培養液から直接に立体構造を形成したプロテアーゼ前駆体を得られる点でも優れている。また、プロ配列を改変することにより、アスペルギロペプシノーゲン I 以外のアスパラギン酸プロテアーゼも大量に発現することが可能であると思われる。現在、前駆体の配列の N 端にアスペルギロペプシノーゲン I のプロ配列の N 末端近傍の数残基を付加した融合タンパク質として発現することにより、マラリア・プラスメプシン I 及び II の *B. brevis* による大量発現を試みているところである。また、フィラリア症の原因寄生虫に由来するアスパラギン酸プロテアーゼについても現在クローニングを進めているところであり、発現系の構築を試みる予定である。これらのアスパラギン酸プロテアーゼは抗寄生虫薬の標的となることが期待される。

#### 謝 辞

この研究は高橋健治教授の指導のもとに高橋研究室の呂 静芳氏、林 貴明氏、セナラツ・B・P・アウダ博士、黄 湘萍氏との共同研究として行ったものであり、深く感謝致します。

この研究で用いた *B. brevis* による発現系は、鶴高

重三教授(東京農大)、山形秀夫教授(東京薬大・生命科学部)が開発されたものであり、ご指導頂きましたことを深く感謝致します。

また、生命科学部での研究の機会を与えて下さいました故水島昭二先生に心より感謝致します。

#### 文 献

1. Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Weber, I.T. Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J. & Kent, S.B.H. (1989) *Science* 245, 616-621.
2. Inoue, H., Lu, J.-F., Athauda, S. B. P., Kong, K.-H., Hayashi, T., Kimura, T., Makabe, O., and Takahashi, K. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 362, 581-587.
3. Inoue, H., Hayashi, T., Huang, X.-P., Lu, J.-F., Athauda, S.B.P., Kong, K.-H., Yamagata, H., Udaka, S. & Takahashi, K. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237, 719-725.
4. Lu, J.-F., Inoue, H., Kimura, T., Makabe, O. & Takahashi, K. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 954-955.
5. von Heijne, G. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4683-4690.
6. Studier, F.W., Rosenberg, A.M., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
7. Hayashi, T., Inoue, H., Kato, M., Udaka, S., & Takahashi, K. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 362, 589-596.
8. Udaka, S. & Yamagata, H. (1993) *Methods Enzymol.* 217, 23-33.
9. Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Ichihara, Y. & Takahashi, K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5306-5311.
10. Takahashi, K., Inoue, H., Sakai, K., Kohama, T., Kitahara, S., Takishima, K., Tanji, M., Athauda, S. B. P., Takahashi, T., Akanuma,

- H., Mamiya, G. & Yamasaki, M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19480-19483.
11. Inoue, H., Kimura, T., Makabe, O. & Takahashi, K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19484-19489.
12. Sagiya, Y., Yamagata, H. & Udaka, S. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 358-363.
13. Inoue, H., Huang, X.-P., Hayashi, T., Athauda, S.B.P., Yamagata, H., Udaka, S., & Takahashi, K. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.* in press.
14. Sielecki, A.R., Fujinaga, M., Read, R.J. & James, M.N.G. (1991) *J. Mol. Biol.* 219, 671-692.
15. Moore, S.A., Sielecki, A.R., Chernaia, M.M., Tarasova, N.I. & James, M.N.G. (1995) *J. Mol. Biol.* 247, 466-485.