福島県立医科大学学術成果リポジトリ



FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY

グロビンタンパク質の多様性-立体構造と機能

メタデータ	言語: Japanese			
	出版者: 福島県立医科大学総合科学教育研究センター			
	公開日: 2018-10-24			
	キーワード (Ja):			
	キーワード (En):			
	作成者: 五十嵐, 城太郎			
	メールアドレス:			
	所属:			
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000704			

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、へムの 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 , α 2, α 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_{γ} , A_{γ} , 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、 へ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 に酸素分子のへ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

1

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のもの (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 グロビン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ンタン パク質の模式図を示す。



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

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 のグロビンタンパク質、グロビンドメインにつ 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, ゾウリムシ Paramecium caudatum などの原生生 物繊毛虫にグロビン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 のグロビン 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 P₅₀ 値が 0.2 Torr 以下であることがわかった[6]。

他のグロビンタンパク質が 150 アミノ酸残基 程度から成るのに比べて, *T. pyriformis* のグロビ ンタンパク質は 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 Å = 0.1 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
Homo sapiens	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				
Tetrahymena pyriformis	trHb	0.018*	0.0038	[12]
Paramecium caudatum	trHb	0.46*	0.031	[13,14]
Mycobacterium tuberculosis	HbN	0.013	0.0013	[15]
フラボヘモグロビン				
Candida norvegensis	fHb	0.01	0.024	[16,17]
Saccharomyces cerevisiae	YHB1	0.020*	b	[18]
Cupriavidus necator	FHP	0.0022*	b	[18]
Escherichia coli	Hmp	0.0064*	b	[18]
Bacillus subtilis	HmpBs	0.088*	b	[19]
Salmonella enterica	HmpSe	0.14*	b	[19]
グロビン結合型センサー				
Escherichia coli	DgcO	0.77*	0.55	[20]
Azotobacter vinelandii	AvGReg	0.015	_	[21]
Bordetella pertussis	<i>Bpe</i> GReg	0.35*		[22]
Desulfotalea psychrophila	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 Torr ÷ 1.38×10⁻³ 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 μ M⁻¹s⁻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 3.8×10^{-3} 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 Å, c = 354 Å) 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 Å 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 オ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 Å³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 Å 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,空洞を通っ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 *I*432 (単位格子 *a* = *b* = *c* = 242 Å) に属した。回折データの分解能は 4.0 Å 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)。



Fe(II)-O₂

Fe(III)-H₂O

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(3σ) 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 μM 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 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。

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はへ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ル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 Å, b = 66.1 Å, c = 83.2 Å) 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 Å でへ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ン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,佐瀨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

- 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.
- Shimizu T, Huang D, Yan F, Stranava 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-Creuza 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.