

立体構造解析法の特徴

| | 電子顕微鏡 | X線結晶学 | 核磁気共鳴 |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 対象分子量 | > 100 K | 塩からリボソームまで | < 30 K |
| 分解能 | 2次元結晶 2-5 Å 単粒子解析 2-30 Å | 1-3 Å | 3-5 Å相当 |
| 長所 | 巨大分子の大まかな形 を知ることができる > 100 Kであれば 高分解能構造解析が 可能になってきている (2014~) | 分子量の上限がない 最高分解能の構造が決 定できる 立体構造解析法の王道 | 結晶が要らない 溶液状態の構造が得ら れる pH、温度、緩衝液組成 の影響を調べることがで きる |
| 短所 | 小さい分子は見えない 分解能が低い という欠点が克服されつ つある。 | 単結晶が必要 与えられた条件下での 構造解析 ある状態の静止像 パッキングによる歪み | 分子量の上限がある 特に細長い分子は情報 量が少なく、精度も劣る |





タンパク質のX線結晶構造解析 (http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Overview/Overview.htmlより引用)

Iwata, M. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 101, 59-64, (2004)

Coot: X線結晶構造解析で、電子密度を参照しながら、分子モデルの構築や改善を行うため に使用される分子構造可視化用ソフトウェア。CCP4でもPhenixでも採用されている。 HP (Coot): http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/ HP (WinCoot): http://www.ysbl.york.ac.uk/~lohkamp/coot/wincoot.html Wiki: http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Coot



Windows WinCoot

WinCoot-0.8.1.1 available now

Download EAGs Documentation

is a build of Coot (s



at is WinCoot?

X線結晶構造解析を行う際に参考になる日本語のサイト(順不動)

A標柄曲構道時桁を行う除し参与しよる日本語のサイト(順不到) BioKids Wiki: http://biokids.org/ Windowsで行こう: http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/suzuki/jpxtal/Katsutani/ タンパク質結晶構造解析関係のマニュアル: http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/manuals.html 蛋白質科学会アーカイブ: http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Structure/Structure_home.html

| Barnet Danisland | Transferrer and a first the state of the state |
|-----------------------|------------------------------------------------|
| and the second second | |

| Roman During with | Reservation and a field to old three, | | 11-71F891-101888981-422 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | 15.4 | 最新の25世 | under Cathon |
| P AND AN C DOOR | Bolide-1526. | B)+++++++ | EAGELST |
| | Buildes | · C28/Amir 18401/51314/HORPS | 221202-076224500000000000000000000000000000000000 |
| (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) | 1913-00-11. Miles I OF REALEST BY REAL 10(1/0)-01 (0)/(1/ | • (2007)000708401.0000107-0708802007 | Broth Machine Linto and Annual Trans- station manufact, mandatory (model, rearTitle), and Harakababara (montro) of markets (Linto), Trans. Immediate (montro), dimensional (Linto), Trans. |
| AT ALCONT | + 17mg+81101777+14570357/553804/1 | 1720-WE 21100-6 1320-071-6 | T. |
| Coll-Mill | >> みちしるべ << | 2014-10-00 | #288 THEP (DAILST 5.0) CTP) (D2 43) 1-187 |
| 1297 R | 84197 | · COM/MINISTER (18930107-5-0-024 | TT-R.T.T.S.S. |
| BARRCHICK | ####26200 ########################## | R-SERI | 1~1 |
| COLUMN COL | ● 単立の行うに使用法 - 新用学び行うにの他、作 ● 単点が行うパワラク - 単晶体的に思ったまた。 ● はっと・からの知知道 - アニアンドにごがいたかくので ● こと・からの知知道 - アニアンドにごがいたかので | interes | 2011/17/10 / 10000/71/244 / FB 1 2017/123 / 2007/71/244 / FB 1 2016/2236 / 2007/71/244 / FB 1 2016/2266 / 4000/71/244 / FB 1 |
| All with each the substances | (attail) tools | The second secon | ANYON TATLE ANYON TO STATE THE P |
| danim | Invite # - ICALIFAC Assess Invite # - ICALIFAC Assess | - AAUDODE | Disb(11/11 - 100er/decile) ## 9 |
| WILLER-TAAS | #101-9-108188950858 | 10113 12 01 | 新調ブログラム |
| Constant and Const | E.G Linux, Perfex, Personnes Stress Educity (1) = (1 - Stress, (1) + (1) - (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) + (1) | KANCARANI PARA 2023A07,3 F-5 Kes 11-81 C26/000,231/000/37/3 Z233 09.23 | - 2015/2019 - Artilli, 5.4.1 - 2015/2019 - Artilli, 5.4.1 - 2015/2019 - 2019 - 2.5.2 - 2015/2019 - 2019 - 2.5.2 - 2019/2019 - 2019 - 2019 - 2019 - 2019/2019 - 4012 - 2019 - 2019/2019 - 2019 - 2019/2019 - |
| MOTOR TATION | Contraction of | Topological and the second sec | · Josephine J.A Vine Lange B.B. |
| The second second | + As/21000 | + HOLHON | - presentation - Funda 2.5.8 |
| William Statistic | Build Mar Carl | · ONECODE :: | 2010/06/07 - 104/07/07/07/07/07/07/07/07/07/07/07/07/07/ |
| | De andre redreiche composition de la | E 2013 04 25 + D/TERT_546.2000 | + 87 1981 16 |
| | AND A MARKEN AND A COMPANY AND | | |



| Phenix: X線結晶構造解析を行うためのプログラム集。米国NIHが開発支援 HP: https://www.phenix-online.org/ Wiki: http://www.phaser.cimr.cam.ac.uk/index.php/Phaser_Crystallographic | _Software |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| PLANE A software the the damaged definition of metal and anticolar software | <u>Occumentation</u> |
| | License |
| Download the latest official release (1.9) [First request download password] | Download Pher |
| Download the latest nightly build or prerefease | Download Da |
| Heep Limit US REDIT a log LISE ACCIVES SUBSCIDE DEMANDALISE | Recent Change |
| Using Precina (researcing) The PEBNIC Company User Interface - Assessing data quality with <u>phenexisting</u> | Publication |
| - Actomates structure sources was Automates Actomates model sources replacement with TabaccMM - Actomates Inself sources with TabaccMM - Actomates User Africin with Landows | Presentation Computation Crystallograph Toolbo |
| - software remement was precisite - Generation of loand coordinates and restraints with eLBOW | Macromolecul |
| The PHENC system also induces SOLVE/RESOLVE, Phaser, the CCI Applications (phenocxtriage, phenocrefine, elbow and many more), components from HolProbity, and the Comp Crystallography Toolbox in a Python framework. | outational Crystallograph Consortiu |
| China Bufferry | Contact U |
| Henry L. Construction of the structure solution. P. D. Adams, P. V. Monne, G. Bunköczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, LJ. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCay, N. W. Monarty, R. Deffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger and P. H. Zwart. <u>Acta Cryst. D66</u> , 213-2 | N. Hung, G. Ihe PHENIX Tea 21 (2010). Acknowledgmen |
| Funding for PHENIX: httl General Medical Sciences | Intran |
| The PMDX system also can be used for neutron crystallography. NM funding supports the development of this capability through a grant to Paul Langan (Los Alaricos National Lat and Paul Adams. See the <u>Bacremolecular Neutron Crystallography Consectuum site</u> for more deals. Catators for neutron structure influence in Themic: Adams RV, Mustykainow M, Langan P. Generalized X-ray and neutron crystallographysis: more accurate and complete structures for Longan (Los Marcinos (M), Mustykainow M, Langan P. Generalized X-ray and neutron crystallographics: more accurate and complete structures for Longan encommended. <u>Attac RV 90, 065536-737</u> . | oratory) Aforine PV, |
| The PHENIX Industrial Consortium | Informatio |
| For-profit groups can obtain access to PHENIX through a Consortium agreement. This provides a license to use PHENIX and research funds to develop new features in PHENIX take meets of commercial users. | red to the Member |

đđ

• Los Alamos

Randy Read

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE

1 構造バイオインフォマティクス基礎

- 2 X線結晶構造解析における構造バイオインフォマティクス
- 3 (1) 分子置換法によるタンパク質の立体構造決定
- 4 (2) Coot で分子モデルを電子密度に合わせてみましょう
- 5 (3) 補足: Protein Data Bank (PDB) からのタンパク質構造情報の入手
- 7 東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食品生物構造学研究室 永田 宏次
- 8 9

6

10 1. <u>背景と目的</u>

- 11 PowerPoint 資料を使って「予備的」説明
- 12 ①そもそも、なぜタンパク質分子の「かたち」が重要なのか?
- 13 ②目に見えない極小のタンパク質分子のかたちを決めるのにどのような方法があるのか?
- 14
- 15 Protein Data Bank (PDB) には約 118,000 個のタンパク質立体構造が登録されている。この情報を利用して、す
 - 16 でにアミノ酸配列類似タンパク質の立体構造が報告されているタンパク質の X 線結晶構造解析を分子置換法に
 - 17 より行う。分子置換法を用いれば、配列相同性 30%以上の類似タンパク質の立体構造情報をモデル(鋳型)とし
 - 18 て、たいていの場合、目的タンパク質の立体構造解析が可能である。分子置換法で構造が解けない場合は、単
 - 19 波長・多波長異常分散法、重原子同型置換法等により構造解析を行う。
 - 20 この講義で用いる X線結晶構造解析用プログラムパッケージ CCP4 とX線結晶構造解析用分子構造可視化用
 - 21 ソフトウェア Coot は学術目的であれば無料で使用することができ、Unix, Linux, Mac OSX, Windows で動くの
 - 22 で、パソコンでも構造解析が可能である。CCP4 と同様の X 線結晶構造解析用プログラムパッケージとして
 - 23 Phenix もある。
 - 24
 - 25 PowerPoint 資料を使って「ツール」についての説明
 - 26 ③X線結晶構造解析用ソフトウェア
 - 27 (a) CCP4: X 線結晶構造解析を行うためのプログラム集。英国 SCD, BBSRC, MRC が開発支援
 - 28 HP: http://www.ccp4.ac.uk/
 - 29 Wiki: <u>http://ccp4wiki.org/~ccp4wiki/wiki/index.php?title=Main_Page</u>
 - 30 (b) Coot: X 線結晶構造解析で、電子密度を参照しながら、分子モデルの構築や改善を行うために使用される分
 - 31 子構造可視化用ソフトウェア。CCP4 でも Phenix でも採用されている。
 - 32 HP (Coot): <u>http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/</u>
 - 33 HP (WinCoot): http://www.ysbl.york.ac.uk/~lohkamp/coot/wincoot.html
 - 34 Wiki: <u>http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Coot</u>
 - 35 (c) Phenix: X 線結晶構造解析を行うためのプログラム集。米国 NIH が開発支援
 - 36 HP: <u>https://www.phenix-online.org/</u>
 - 37 Wiki: http://www.phaser.cimr.cam.ac.uk/index.php/Phaser_Crystallographic_Software

| 39 | (4)X 線結晶構道解析を行う除に参考になる日本語のサイト(順个動) |
|----|----------------------------------------------------------------------------|
| 40 | (d) BioKids Wiki |
| 41 | http://biokids.org/ |
| 42 | (e) Windows で行こう-構造生物学に関する備忘録- |
| 43 | http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/suzuki/jpxtal/Katsutani/ |
| 44 | (f) タンパク質結晶構造解析関係のマニュアル |
| 45 | http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/manuals.html |
| 46 | (g) 蛋白質科学会アーカイブ |
| 47 | http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Structure/Structure_home.html |
| 48 | |
| 49 | 2. <u>研究の流れ</u> |
| 50 | (1) 目的タンパク質の選択 |
| 51 | human S100A13-シグナルペプチドをもたないタンパク質の非古典的細胞外分泌に関わるカルシウ |
| 52 | ム結合タンパク質。非古典的細胞外分泌に関与するしくみを明らかにするために、human S100A13 |
| 53 | の立体構造を明らかにしたい。 |
| 54 | (2) 発現系作製 |
| 55 | human S100A13 の発現用プラスミドを構築し、宿主大腸菌に導入する。 |
| 56 | (3) 発現・精製・結晶化 |
| 57 | 大腸菌体内で組換え human S100A13 を発現した後、 |
| 58 | カラムクロマトグラフィーにより精製、蒸気拡散法により結晶化する。 |
| 59 | (4) X 線回折データ取得・処理 @放射光施設(Photon Factory, SPring-8 など) |
| 60 | 得られた組換え human S100A13 の結晶を放射光施設に運搬し、 |
| 61 | 結晶に X 線を照射して、回折データを取得する。 |
| 62 | 回折斑点の位置と強度のデータから、結晶の空間群、格子定数、などのパラメタを決定する。 |
| 63 | (5) X 線結晶構造解析(<u>分子置換法</u> 。他に、単波長・多波長異常分散法、重原子同型置換法など) |
| 64 | 分子置換法による結晶構造解析 |
| 65 | 非対称単位中のタンパク質分子数を決定する。 |
| 66 | モデルタンパク質1分子目の向きと位置を決定する。 |
| 67 | モデルタンパク質2分子目の向きと位置を決定する。 |
| 68 | (6) 構造精密化・確認・PDB への登録の仕方の説明 |
| 69 | 構造精密化 |
| 70 | 剛体精密化により、モデルタンパク質(全体)の向きと位置を自動微調整する。 |
| 71 | 制限精密化により、各原子の位置を電子密度に合うように自動補正する。 |
| 72 | 得られた中間構造を目で見て確認、手動で補正する。 |
| 73 | 自動補正と手動補正を繰り返して、最終構造(仮)を得る。 |
| 74 | 最終構造(仮)が実験データとも既知ジオメトリ(結合長・結合角・二面角)とも合致することを |
| 75 | 確認し、もし問題があれば修正する。 |
| 76 | Protein Data Bank に回折データと最終構造の原子座標とを登録する。 |
| 77 | |
| 78 | |

 $\mathbf{2}$

| 79 | 3. <u>本実習の内容(<mark>赤字</mark>)</u> |
|-----|----------------------------------------------------------------------------|
| 80 | |
| 81 | (4) X 線回折データ取得・処理 @放射光施設(Photon Factory, SPring-8 など) |
| 82 | 回折斑点の位置と強度のデータから、結晶の空間群、格子定数、などのパラメタを決定する。 |
| 83 | HKL2000 |
| 84 | 入力: X 線回折イメージ(.img) |
| 85 | 各回折斑点の位置と強度の収集 |
| 86 | 各回折斑点の指数づけ(空間群と格子定数の決定) |
| 87 | 各回折斑点の積分(強度の数値化) |
| 88 | 回折データの統合 |
| 89 | ↓ 統計値の計算 |
| 90 | 出力: X 線回折データ(.sca) |
| 91 | (5) 分子置換法による結晶構造解析 |
| 92 | モデル分子の選定:標的タンパク質と配列相同性があり、立体構造既知のタンパク質を見つける。 |
| 93 | http://web.expasy.org/blast/ |
| 94 | X 線回折データのフォーマット変換をする。 |
| 95 | CCP4 Data Reduction and Analysis Import Integrated Data Import Merged Data |
| 96 | 非対称単位中のタンパク質分子数を決定する。 |
| 97 | CCP4 Molecular Replacement Analysis Cell Content Analysis |
| 98 | モデルタンパク質1分子目、2分子目の非対称単位中の向きと位置について適切な解を探す。 |
| 99 | 良い解が見つかれば、電子密度をはっきりと描くことができる。 |
| 100 | CCP4 Molecular Replacement Model Generation Run Molrep - auto MR |
| 101 | (6) 構造精密化・確認・PDB への登録の仕方の説明 |
| 102 | 剛体精密化により、モデルタンパク質(全体)の向きと位置を自動微調整する。 |
| 103 | CCP4 Refinement Run Refmac5 Do rigid body refinement |
| 104 | 制限精密化により、各原子の位置を電子密度に合うように自動補正する(逆空間精密化)。 |
| 105 | CCP4 Refinement Run Refmac5 Do restrained refinement |
| 106 | 得られた中間構造を目で見て確認、手動および自動で補正する(実空間精密化)。 |
| 107 | Coot Calculate Model/Fit/Refine |
| 108 | 逆空間精密化と実空間精密化を繰り返して、最終構造(仮)を得る。 |
| 109 | CCP4 Refinement Run Refmac5 Do restrained refinement |
| 110 | Coot Calculate Model/Fit/Refine…など |
| 111 | 最終構造(仮)が実験データとも既知ジオメトリ(結合長・結合角・二面角)とも合致することを確認し、 |
| 112 | もし問題があれば修正する。 |
| 113 | Coot Validate Ramachandran Plot など |
| 114 | Protein Data Bank に回折データと最終構造の原子座標とを登録する。 |
| 115 | http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do#Category-deposit |
| 116 | RCSB PDB Deposit Prepare Data |
| 117 | RCSB PDB Deposit Validate Data |
| 118 | RCSB PDB Deposit Deposit Data |
| 119 | (7) タンパク質の原子座標および電子密度データをダウンロードし表示させる。 |



分子置換法による結晶構造解析 非対称単位の箱の中にモデル分子を 決まった数(今回は2個)配置していく。 青=モデル分子 赤=目的タンパク質の構造(解)

1個目を配置する。
 まず角度(θ1, φ1, χ1)を決める。
 次に位置(tx1, ty1, tz1)を決める。
 1個モデルを置いたときの回折データが
 実際の回折データともっともよく一致する角
 度と位置を特定する。

2 個目を配置する。 まず角度(θ2, φ2, χ2)を決める。 次に位置(tx2, ty2, tz2)を決める。 1 個モデルを置いたときの回折データが 実際の回折データともっともよく一致する角 度と位置を特定する。

剛体精密化で分子全体の角度と位置を補正。 制限精密化で各原子の位置を補正。 ↓ 目的タンパク質の構造(解)を得る。



| 120 | 4. <u>課題</u> | |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 121 | | |
| 122 | 提出課題1 | 以下の実習で最終的に作成する PDB ファイル 2 つを |
| 123 | | 1E8A_A_molrep1_refmac2 -coot-0.pdb |
| 124 | | 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement-coot-0.pdb |
| 125 | | (coot-0 が coot-1 になっていても OK です) |
| 126 | | aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp に送ってください。 |
| 127 | | (実空間精密化が途中まででもかまいません。 |
| 128 | | 途中まででも、実際に実空間精密化を行ったということが大切です) |
| 129 | | e-mailの件名は「構造実習」とし、 |
| 130 | | 本文に氏名、受講生 ID、学生証番号を明記してください。 |
| 131 | | |
| 132 | 提出課題2 | 上記 e-mail の本文に講義の感想を5行以上書いてください。 |
| 133 | | 良かったことでも、厳しいご意見でもかまいません。 |
| 134 | | 最上部に氏名、受講生 ID、学生証番号を明記してください。 |
| 135 | | |
| 136 | | |
| 137 | | |
| 138 | Task 1 | Please send me the two PDB files you will obtain at the end of this class: |
| 139 | | 1E8A_A_molrep1_refmac2 -coot-0.pdb |
| 140 | | 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement- <u>coot-0</u> .pdb |
| 141 | | (coot-0 may be coot-1) |
| 142 | | The e-mail title should be "Structural Bioinfo". |
| 143 | | Please do not forget to write your name and your ID number(s) in the e-mail text. |
| 144 | | |
| 145 | Task 2 | In the above e-mail, please write your comments to this class in more than 5 lines. |
| 146 | | Please let me know good and bad things about this class. |
| 147 | | |
| 148 | | |

| 149 (1) 分子置換法によるタンパク質の立体構造 | 決定 |
|----------------------------|----|
|----------------------------|----|

| 150 | | - 4 | | | | | 400 · + - | | |
|-----|-----|-----------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------------|---------------|---------------------|------------------------------|---------------|
| 151 | 1. | アクリバイオ講義 HP から、圧縮ファイル 170420.zip をテスクトッフにダウンロードし、170420.zip のアイ | | | | | 、170420.zipのアイコ | | |
| 152 | | ンをタフルクリックして解凍する。□ | | | | | | | |
| 153 | | <u>nttp://</u> | <u>/www</u> | <u>/.lu.a.u-toky</u> ポトのコッル | <u>0.ac.[p/lec</u> | $\frac{1}{1}$ | / <u>Index.ntmi</u> | - /11 | |
| 154 | | テスク | /トツ. | ノエのノオル | 9 170420 | | の10個のノ | | |
| 155 | | S | 1008 | a13.seq | | numan S10 | | ノ酸配列ノアイル(FASIA 空口ビデッタファイル | 、形式) |
| 156 | | S | 51008 | a13.sca | | numan S10 | | 家回折ナーダノアイル | |
| 157 | | | 400 | | | (Denzo/HK | | | |
| 158 | | S | s100a | a13yobi.mtz | | human S10 |)A13のX線回折データファイル | | |
| 159 | | | | | | | ーマットに変 | 換したもの) | |
| 160 | | 3 | 3NXA | A.pdb | | human S10 | 0A16 の原∃ | 午 座標ファイル | |
| 161 | | 1 | E8A | _A.pdb | | human S10 | 0A12 の原子 | 子座標ファイル | |
| 162 | | 1 | E8A | _A _molrep | 1_refmac2 | 2yobi.pdb | 構造 | 精密化途中の原子座標フ | アイル |
| 163 | | 1 | E8A | _A _molrep | 1_refmac2 | 2_forAutoRe | finement.po | Jb 同上(自動精密化用) | |
| 164 | | 1 | E8A | _A_forRefe | rence.pdb | | 構造 | 比較用 S100A12 の原子/ | 座標ファイル |
| 165 | | S | s100a | a13_refmac | 2yobi.mtz | | 構造 | 精密化途中の X 線回折テ | ・ータファイル |
| 166 | | F | DB. | ファイルのダ | ウンロード | の仕方 doc | Prote | ein Data Bank からタンパ | ク質 |
| 167 | | | | | | | 構造 | (原子座標)情報を得る方: | 法 |
| 168 | | | | | | | | | |
| 169 | | 注意: | 本日 | 使用するソフ | ^ル ウェア C | CP4 やWin | Cootは日本 | 語の全角文字(2バイト文 | 字)を認識できません。 |
| 170 | | 共用 | PC | のユーザー | 名は"iu" (判 | ≜角文字)な(| ので問題ない | いのですが、私用 PC のニ | ューザー名が全角の方 |
| 171 | | (例.": | 永田" |)は、170420 |) フォルダ | をデスクトッフ | プではなく C | ドライブの直下に置いてく | ださい。 🗆 |
| 172 | | C |) | C:¥User | s¥iu¥Des | ktop¥17042 | 0 | | |
| 173 | | > | ¢ | C:¥User | s¥永田¥D | esktop¥170 | 420 | | |
| 174 | | C |) | C:¥1704 | 20 | | | | |
| 175 | | | | | | | | | |
| 176 | | 参考: | hum | an S100A13 | 3のX線回 | 回折データフ | ァイル(s100 | a13.sca)の内容 | |
| 177 | | 1 | | | | | | | |
| 178 | -98 | 35 | | 格子 | 亡定数(辺 | の長さと角 | 度) | | |
| 179 | | a | | b | С | α | β | γ 空間群 | |
| 180 | | 39.77 | 75 | 59.289 | 77.628 | 90.000 | 90.000 | 90.000 p212121 | |
| 181 | P |]折斑, | 点の打 | 旨数、強度、 | 強度の標 | 準偏差 | | | |
| 182 |] | H K | \mathbf{L} | Intensity | σ (Inter | nsity) | | | |
| 183 | (| 0 0 | 4 | 1039.1 | 28.7 | | | | |
| 184 | (| 0 0 | 6 | 244.8 | 11.8 | | | | |
| 185 | (| 0 0 | 8 | 2410.0 | 56.3 | | | | |
| 186 | (| 0 0 | 10 | 269.2 | 13.9 | | | | |
| 187 | (| 0 0 | 12 | 82.1 | 8.7 | | | | |
| 188 | | (つづく | <) | | | | | | |
| 189 | | | | | | | 5 | | |

- 190 2. Blast を使って、PDB(すなわち立体構造情報が登録されているタンパク質)から human S100A13 にアミノ
- 191 酸配列の類似したタンパク質を検索する。NCBIの Blast でも良いが、今回は ExPASy の Blast を使う。□
- 192 <u>http://web.expasy.org/blast/</u>

SIB BLAST+ Network Service Form

You can also use this tool programmatically ...

| nter <mark>a sequ</mark> e | ence | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Examples >gi 5174659 ref NP_005970.1 protein S100-A13 [Homo sapiens] MAAEPLTELEESIETVVTTFFTFARQEGRKDSLSVNEFKELVTQQLPHLLKDVGSLDEKMKS LDVNQDSELKFNEYWRLIGELAKEIRKKKDLKIRKK | | BLAST programs available on ExPASy: ? ks blastp: protein query -> protein sequence database blastn: nucleotide query -> nucleotide sequence database tblastn: protein query -> nucleotide sequence database blastr: nucleotide query -> nucleotide sequence database blastr: nucleotide query -> protein sequence database |
| e.g. P00750, Run BLAST | P05067-5, A4_HUMAN or acccgtggtcgctgctg ? | |

| rotein databases: | | |
|------------------------------------------|-------------------|--|
| niProt Knowledgebase (UniProtKB) ? | × . | |
| | Restrict taxonomy | |
| niProtKB taxonomic subsets ? | ~ | |
| | | |
| niProt prokaryotic reference proteomes ? | ~ | |
| ther databases ? | PDB ~ | |
| lucleotide databases: | | |
| equence databases ? | ~ | |
| NA taxonomic subsets ? | ~ | |
| rekenvetic genemes | | |

| 194 | S100A13 にアミノ酸配列相同性が高く、かつ立体構造情報が | 「PDB に登録されているタンパク質のリストが |
|-----|----------------------------------------|------------------------------|
| 195 | 出力される。 | |
| 196 | この中から、S100A13 の立体構造情報は除外する(S100A1 | 3 の結晶構造は未知と仮定して講義している |
| 197 | ため)。ロ | |
| 198 | また、NMR で決定された溶液構造は、結晶構造に比べて正確 | 雀さと精密さで劣るので、分子置換法のモデル |
| 199 | として用いるには不向きである。ゆえに除外する。□ | |
| 200 | 結果として、20 位までのうち、以下の 3 つが S100A13 類似タ | シパク質の結晶構造として得られた。 |
| 201 | 11 位 3NXA_A(PDB entry: 3NXA の chain A) | S100A16 の結晶構造 |
| 202 | 19 位 1ODB_A(PDB entry: 1ODB の chain A) | S100A12 の結晶構造 |
| 203 | 20 位 1E8A_A(PDB entry: 1E8A の chain A) | S100A12 の結晶構造 |
| 204 | 11 位の 3NXA_A が最良のモデルと考えられるので、まずは | この座標をモデル(鋳型)として用いて分子置 |

換を試みる。失敗したら、次の候補の 10DB_A または 1E8A_A をモデルとして用いる。□

V

206 207 今回の例では、3NXA_Aをモデルとすると分子置換が失敗し、1E8A_Aをモデルとすると成功することが分かっているので、今後は 1E8A_A をモデルとして用いる分子置換の方法を述べる。

送信

List of the matches

Clustal W (multiple alignment)

Select up to...

Include query sequence

| | Accession | Db | Description | Score | E-value |
|----|-----------|-----|-------------------------------------------------------|-------------------|---------|
| 1 | 2H2K | PDB | Chain A, Crystal Structure Analysis Of Human S100a13 | 172 | 6e-56 |
| 2 | 1YUT | PDB | Chain A, Solution Structure Of Calcium-s100a13 (minim | 171 | 1e-55 |
| 3 | 2KI4 | PDB | Chain C, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Componen | 171 | 1e-55 |
| 4 | 1YUR | PDB | Chain A, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized | 171 | 1e-55 |
| 5 | 2KI4 | PDB | Chain B, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Componen | 171 | 1e-55 |
| 6 | 2LE9 | PDB | Chain B, Ragec2-S100a13 Tetrameric Complex | 16 <mark>9</mark> | 8e-55 |
| 7 | 1YUR | PDB | Chain B, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized | 169 | 8e-55 |
| 8 | 2CXJ | PDB | Chain A, 3d Solution Structure Of S100a13 | <mark>14</mark> 9 | 7e-47 |
| 9 | 2M0R | PDB | Chain A, Solution Structure And Dynamics Of Human S10 | 70.9 | 2e-16 |
| 10 | 2L50 | PDB | Chain A, Solution Structure Of Apo S100a16 | 57.8 | 1e-11 |
| 11 | 3NXA | PDB | Chain A, X-Ray Structure Of The Apo Form Of Human S10 | 57.4 | 2e-11 |
| 12 | 2LUC | PDB | Chain A, Solution Structure Of Human S100 Calcium-bin | 57.0 | 2e-11 |
| 13 | 1NSH | PDB | Chain A, Solution Structure Of Rabbit Apo-S100a11 (19 | 57.0 | 2e-11 |
| 14 | 2M9G | PDB | Chain A, Solution Structure Of Calcium-bound Human S1 | 56.2 | 4e-11 |
| 15 | 2L0P | PDB | Chain A, Solution Structure Of Human Apo-S100a1 Prote | 55.8 | 7e-11 |
| 16 | 2LLU | PDB | Chain A, Post-Translational S-Nitrosylation Is An End | 55.5 | 7e-11 |
| 17 | 2LLS | PDB | Chain A, Solution Structure Of Human Apo-S100a1 C85m | 55.5 | 8e-11 |
| 18 | 2LLT | PDB | Chain A, Post-Translational S-Nitrosylation Is An End | 55.5 | 8e-11 |
| 19 | 10DB | PDB | Chain A, The Crystal Structure Of Human S100a12 - Cop | 55.5 | 9e-11 |
| 20 | 1E8A | PDB | Chain A, The Three-Dimensional Structure Of Human S10 | 55.1 | 9e-11 |

208

| 209 | PDB ファ・ | イル | が複 | 数のペプ | チド鎖を | 含む場合 | は、似てし | いるペプチ | ド鎖だけの |)情報を抽出し | て、別名で保存 |
|-----|----------|------|------|--------------------|------|---------|--------|--------|----------|----------|----------|
| 210 | する。 | | | | | | | | | | |
| 211 | 例: PDB: | 1E8 | BA の |)A 鎖の ¹ | 昜合、A | TOM で始 | まる A 鎖 | だけの行 | をテキストニ | エディタで抽出し | して、ファイル名 |
| 212 | 1E8A_A.p | db a | として | 保存する | • | | | | | | |
| 213 | ATOM | 1 | Ν | THR A | 1 | 15. 352 | 25.025 | -7.964 | 1.00 18. | 82 | Ν |
| | | | | | | | | | | | |

 $\mathbf{7}$

215 3. CCP4 を用いて、分子置換を行う。

216 まず、デスクトップ上の CCP4i アイコンをダブルクリックして CCP4i(CCP4Interface)を起動する。□

| Pofinoment | I Project Database Job List - currently no jobs | ~ | Direct | | 1 |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|---|----------------|--------------|---|
| Model Preparation | A | - | Viecto | iew Any File | |
| Restraint Preparation | | - | View Files fro | m Job | |
| Run Refmac5 | | | Search/Sort D | atabase | |
| Run NCS Phased Refinement | | | Graphical Viev | v of Project | |
| Run Low Resolution Refinement | | 8 | Delete/Archive | Files | |
| Model Completion & Analysis | | 1 | Kill Job | | |
| | | | ReRun Job | | |
| | | | Edit Job Data | | - |
| | | | Preferences | | |
| | | | System Admir | nistration | |

- 217
- 218
- 219
- 220

221 4. 作業ファイルを扱うディレクトリを設定する。

| 222 | 右上にある Directories&ProjectDir ボタンを押すと以下のウインドウが開く。□ |
|-----|---------------------------------------------------|
| | |

- 223 Add project ボタンをクリックして、追加された空行に以下のように記入する。□
- 224 Project: 170420 uses directory: C:/Users/iu/Desktop/170420/
- 225 ただし、170420 フォルダを Cドライブ直下に置いた方は
- 226 Project: 170420 uses directory: C:/170420/
- 227 次に、Project for this session of CCP4Interface 7.0.010 として 170420 を選択する。 🗆
- 228 その後、Apply&Exit ボタンを押す。□

| CCI | P4Interfac | e 6.5.0 Direc | tories & | Project | Directo | ory | | | _ | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------|--------------|-----------|----------------|--|-----|----------|------|
| | | | | | | | | | | Help |
| Enter of | Enter one-word alias and full directory path for your Project directory(s). | | | | | | | | | |
| Deleting | Deleting these project definitions will not delete the actual directories. | | | | | | | | | |
| Project | APR - | aaasaa daasaxdaasyot | 201144-440 | | 20020303 | 111238099 | | | Brow | vse |
| Project | Andstead | | | | | | | | Brow | vse |
| Project | egener: | | | | | | | | Brow | vse |
| Project | (and the set of | | | | | | | | Brow | vse |
| Project | 150420 | uses directory: | C:/Users/k | oji/Desktop | /150420 | | | | Brow | vse |
| | | | | | | Edit list | | | Add proj | iect |
| Project | for this sessi | ion of CCP4Interf | ace 6.5.0 | 150420 | _ | | | | | |
| Enter of | ne-word alias | and full director | y path for | other direct | ories you | use regularly. | | | | |
| Alias: 1 | TEMPORARY | for directory: C: | /ccp4temp | , | | | | | Brow | vse |
| | Edit list Add directory alias | | | | | | | | | |
| | Apply | &Exit | | A | pply | | | Qui | it | |

229

230

2325. X線回折データのフォーマット変換(Denzo/HKL2000 → CCP4)を行う。

左側の作業メニューの黄色いバーをクリックすると CCP4 で実行可能な種々のメニューが現れる。□

| 233 | 左側の作業メニューの黄色いバー | をクリックすると CCP4 で実行可能 |
|-----|------------------------------|--------------------------------------|
| 234 | | |
| 235 | Automatic Structure Solution | Data Reduction and Analysis |
| | ▶ Process images □ | Data Processing using Mosfim |
| | ▶ Obtain phases □ | Import Integrated Data |
| | Build model | Xia2 - automatic dataprocessing |
| | Ligands | Find or Match Laue Group |
| | | Scale and Merge Intensities |
| | | Symmetry, Scale, Merge (Aimless) |
| | | Find Symmetry, Scale & Merge (Scala) |
| | | Multiple dataset analysis (Blend) |
| | | Utilities |
| | | Check Data Quality |
| | | |
| 236 | | |
| 237 | Molecular Replacement | Density Improvement |
| | Analysis | Cell Content Analysis |
| | Model Generation | Find NCS from Heavy Atoms |
| | Phaser MR | Real Space Correlation Search |
| | Run Molrep - auto MR | Parrot - density modification |

| Density Improvement | Model Building |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Cell Content Analysis | Buccaneer - autobuild/refine |
| Find NCS from Heavy Atoms | SLoop - loop building |
| Real Space Correlation Search | Nautilus - autobuild/refine |
| Parrot - density modification | Rapper - conformer modelling |
| Run DM | Sequins - sequence validation |
| Run Solomon | FFFear - Fragment Searching |
| Run DmMulti | FFJoin - Merge fragments |
| Run Pirate | XtalView/xfit |
| Utilities | ARP Navigator |
| | |

238239

Refinement

Run Refmac5

Model Preparation

Restraint Preparation

Run NCS Phased Refinement

Model Completion & Analysis

Phaser Single Atom MR

Run MrBUMP

Run Balbes

Run AMPLE AMoRe Suite

Utilities

Structure Analysis

- **Accessible Surface Areas** Analyse Molecular Contacts Analyse Protein Interfaces (PISA)
- **Temperature Factor Analysis**
- **Run ProSMART**

Predictor of Lysine Carboxylation

Validation & Deposition

Experimental Phasing

Automated Search & Phasing

П

Data Preparation

Heavy Atom Location

Phasing & Refinement

Visualisation

Utilities

| Validate model and/or data |
|----------------------------|
| Validate space group |
| Run Whatcheck |
| Run Rotamer |
| SFs for Deposition |
| Data Harvesting Manager |
| Run R500 on PDB |
| |

- 240
- 241
- 242

| 243 | Map & Mask Utilities | Reflection Data Utilities | Coordinate Utilities |
|-----|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Create Task-Specific Maps | Analyse Data Quality | Cell Content Analysis |
| | Run FFT - Create Map | Calculate Fs & Phases | Convert PDB-2 to PDB-3 |
| | Generate Patterson Map | Convert to/modify/extend MTZ | Convert Coordinate Formats |
| | Create/Edit Masks | Convert from MTZ | Edit PDB File |
| | Edit/Rotate Maps & Masks | Edit MTZ File (Sftools) | Add riding Hs |
| | Map Averaging | Merge MTZ Files (Cad) | Superpose Molecules |
| | Map Correlation | Edit MTZ Datasets | Symmetry match models |
| | Map Cutting | Reindex Reflections | Phaser Model Generation (NMA) |
| | View map sections | SF File Analysis | Create/Edit TLS File |
| | Calculate Omit Map | Phase Analysis (Phistats) | Import/Edit Protein Sequence |
| | Calculate Composite Omit Map | Sigma-A | ClustalW Interface |
| | Clipper Map Utilities | Convert FoM to/from HL | |

AstexViewer

idiffdisp Loggraph MapSlicer RasMol TopDraw

CCP4 Molecular Grap

Graphics and Viewing Utilities Program List

| | Acorn |
|-----|---------------------|
| ics | Aimless |
| | AMoRe |
| | AMPLE |
| | Anisoanl |
| | ArealMol |
| | ARP Navigator |
| | ARP/wARP Classic |
| | ARP/WARP DNA/RNA |
| | ARP/wARP Ligands |
| | ARP/wARP Loops |
| | ARP/wARP Quick Fold |
| | ARP/wARP Solvent |
| | AstexViewer |

 $\begin{array}{c} 246 \\ 247 \end{array}$

247 248

249

Data Reduction and Analysis → Import Integrated Data → Import Merged Data を選択すると ImportScaled のウィンドウが開く。□

| CCP4Interface 6.5.0 running on m | ouse Project: 150420 | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------|---|---------------------------|
| | | | Change Project Help |
| Data Reduction and Analysis | Project Database Job List - currently no jobs | | Directories&ProjectDir |
| 🕨 Data Processing using Mosfim 🛛 🗖 | | | View Any File |
| ▼ Import Integrated Data 🔽 | | | View Files from Job 📃 📥 |
| Import Unmerged Data (Pointless) | | | Search/Sort Database |
| Import Unmerged Data (Combat) | | | Graphical View of Project |
| Import Merged Data | | | Delete/Archive Files |
| import Merged Data from Quicksc | | | Kill Job |
| Xia2 - automatic dataprocessing | | | ReRun Job |
| Find or Match Laue Group | | | Edit Job Data 🔟 |
| Scale and Merge Intensities | | | Preferences |
| Symmetry, Scale, Merge (Aimless) | | | System Administration |
| Find Symmetry, Scale & Merge (Scala) | | - | 8 new updates available |
| Multiple dataset analysis (Blend) | | | Manage Updates Exit |

 $\begin{array}{c} 250\\ 251 \end{array}$

- 253 以下のようにチェックする。□
- 254 □ Use anomalous data(異常分散データでないので、チェックをはずす)
- 255 Run Ctruncate to convert intensities to structure factors
- Keep the input intensities in the output MTZ file
- Ensure unique data & add FreeR column for 0.05 fraction of data.
- 258 □ Copy FreeR from another MTZ
- 259 \Box Extend reflections to higher resolution:

| ImportScaled - Import Scaled Data from Denzo or d*trek | | | × |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------|------|
| | | | Help |
| Job title | | | |
| Convert scaled data output from Scalepack (DENZO) - into MTZ format | | | |
| ☐ Use anomalous data | | | |
| Run Ctruncate - to convert intensities to structure factors | | | |
| Keen the input intensities in the output MT7 file | | | |
| Foregoing and the states in the output in 12 me Foregoing and the states in the output in 12 me Foregoing and the states in the output in 12 me Foregoing and the states in the output in 12 me | from on | othor | 177 |
| Future difference to higher recelution of user. Copy Freek | i nom an | ouler | 112 |
| | | | |
| In 160426 - s100a13.sca | E | Browse | View |
| Out 160426 - s100a13.mtz | E | Browse | View |
| Use dataset name — as identifier to append to column labels | | | |
| MTZ Project, Crystal, Dataset Names & Data Harvesting | | | |
| Create harvest file in project harvesting directory — | | | |
| Crystal S100A13_01 belonging to Project 160426 | | | |
| Dataset name S100A13_0101 | | | |
| Extra Information for MTZ File | | | |
| Space group p212121 | | | |
| Cell dimensions 39.775 59.289 77.628 90.000 90.000 90.000 | | | |
| Data collected at wavelength 1.0 Angstroms | | | |
| Estimated number of residues in the asymmetric unit | | | |
| Edit or Transform Input Data | | | |
| Log File Output | | | |
| Run - Save or Restore - | 1 | Close | |

- 261 入力ファイルとして、s100a13.scaを選択する。Browse ボタンを使うと楽。□
- 262 出力ファイル名が、勝手に指定される(拡張子が.mtz に変わっただけ)。
- 263 In 170420: s100a13.sca
- 264 Out 170420: s100a13.mtz
- 265 Crystal と Dataset name の入力不要だが、ここでは S100A13_01、S100A13_0101 と入力しておく。それ
- 266 ぞれ、S100A13の1個目の結晶、その結晶の1個目の回折データを意味する。
- 267 その他、入力が必要な項目は、Extra information for MTZ file の波長の値。有効数字を考慮して、1.0000
- 268 (Angstrom)と入力するが、勝手に 1.0 に変換される。□

- 269 Data collected at wavelength: 1.0 Angstroms
- 270 現段階では非対称単位中のタンパク質分子数(アミノ酸残基数)が分からないので、
- 271 Estimated number of residues in the asymmetric unit:
- 272 は空欄のままにしておく。□
- 273 Run \rightarrow Run Now ボタンを押して、フォーマット変換を実行すると、ファイル s100a13.mtz が作成される。 \Box
- 274 CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"import_scaled"というジョブが完了した(FINISHED)
- 275 ことが表示される。ロ

| CCP4Interface 6.5.0 running o | n ma | ouse | e Project | : 150420 | | | | |
|--------------------------------------|------|------|-----------|----------|---------------|-----------|---|---------------------------|
| | | | | | | | | Change Project Help |
| Data Reduction and Analysis | | 1 | 10:36:57 | FINISHED | import_scaled | [No title | | Directories&ProjectDir |
| Data Processing using Mosfim | | | | | | | | View Any File |
| ▼ Import Integrated Data | | | | | | | | View Files from Job 📃 🛋 |
| ··· Import Unmerged Data (Pointless |) | | | | | | | Search/Sort Database |
| ···· Import Unmerged Data (Combat) | | | | | | | | Graphical View of Project |
| Import Merged Data | | | | | | | | Delete/Archive Files |
| import Merged Data from Quicks | C | | | | | | | Kill Job |
| Xia2 - automatic dataprocessing | | | | | | | | ReRun Job |
| Find or Match Laue Group | | | | | | | | Edit Job Data |
| Scale and Merge Intensities | | | | | | | | Preferences |
| Symmetry, Scale, Merge (Aimless) | | | | | | | | System Administration |
| Find Symmetry, Scale & Merge (Scala) | | | | | | | | 8 new updates available |
| Multiple dataset analysis (Blend) | - | • | | | | Þ | ŕ | Manage Updates Exit |

283

278 6. 分子置換法の準備として、非対称単位中の S100A13 分子数を見積もる。

279 (非対称単位 = 結晶中に現れる繰り返し構造の1つを取り出したもの。実際の結晶

- 280 中ではこの構造がある法則(対称性)にそって前後左右上下に繰り返されている)
- 281 左側の作業メニューから、Molecular Replacement → Analysis → Cell Content Analysis を選択すると
- 282 Matthews のウィンドウが開く。□



- 284 MTZ file として、s100a13.mtz を選択する。□
- 285 Use molecular weight: estimated from number of residues にして
- 286 Number of residues: 98 と入力する。 🗆
- 287 Run Now ボタンを押すと、下の白い枠に、非対称単位中のタンパク質分子数、Matthews 係数、溶媒含有

| Matthews – Cell Content Analysis | × |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| F Contraction of the second | lelp |
| Job title | |
| Calculate Matthews coefficient for protein only | |
| Read crystal parameters from MTZ file | |
| MTZ file 150420 - s100a13.mtz Browse View | , |
| Space group P 21 21 21 | |
| Cell a 39.7750 b 59.2890 c 77.6280 alpha 90.0000 beta 90.0000 gamma 90.0000 | |
| High resolution limit 1.888 | |
| Use molecular weight estimated from number of residues 🔟 | |
| Number of residues 98 | |
| Solvent content analysis | |
| Cell volume: 183063.922 | |
| | |
| Molecular weight estimated from number of residues. 98 | |
| Nmol/asym Matthews Coeff %solvent P(1.89) P(tot) | |
| 1 4.15 70.39 0.01 0.05 | - |
| 2 2.08 40.78 0.99 0.95 | |
| 3 1.38 11.16 0.00 0.00 | _ |
| Reset Run Now Close | |
| | |

289 290

291

292

この場合、非対称単位中 S100A13 が 2 分子含まれると確定した。□

CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"matthews"という 2 個目のジョブが完了した

(FINISHED)ことが表示される。□

| CCP4Interface 6.5.0 running or | m | ouse | Project | : 150420 | | | | _ | |
|-----------------------------------------------|-------|----------|----------|---------------|-----------|------------|---------------|---------------------------|-------|
| Set directory alias or change default project | direa | ctory | | | | | | Change Project | Help |
| Data Reduction and Analysis | | 2 | 10:56:25 | FINISHED | matthews | Calculatio | * | Directories&ProjectDir | |
| ▶ Data Processing using Mosflm 🔲 📤 1 | | 10:36:57 | FINISHED | import_scaled | [No title | | View Any File | | |
| ▼ Import Integrated Data | | | | | | | | View Files from Job | ┛┥ |
| Import Unmerged Data (Pointless) | | | | | | | | Search/Sort Database | |
| ··· Import Unmerged Data (Combat) | | | | | | | | Graphical View of Project | |
| Import Merged Data | | | | | | | | Delete/Archive Files | |
| Import Merged Data from Quicksc | | | | | | | | Kill Job | |
| Xia2 - automatic dataprocessing | | | | | | | | ReRun Job | |
| Find or Match Laue Group | | | | | | | | Edit Job Data | - |
| Scale and Merge Intensities | | | | | | | | Preferences | |
| Symmetry, Scale, Merge (Aimless) | | | | | | | | System Administration | _ ▼ |
| Find Symmetry, Scale & Merge (Scala) | | | | | | | _ | 8 new updates available | |
| Multiple dataset analysis (Blend) | • | • | | | | F | * | Manage Updates E | xit |

 $\begin{array}{c} 293\\ 294 \end{array}$

- 296 7. 非対称単位中の残基数 196 を入力し、Import Merged Data を再実行する。
- 297 左側の作業メニューから Data Reduction and Analysis → Import Integrated Data → Import Merged
- 298 Data を選択すると ImportScaled のウィンドウが開く。□
- 299基本的に5と同じ設定だが、前回未入力だった Estimated number of residues in the asymmetric unit に300196と入力する。□
- 301 その後、Run \rightarrow Run Now ボタンを押すと、すでに同じ名称の出力ファイルが存在するという警告メッセージ
- 302 が出るが、Continue ボタンを押して、上書きする。□
- 303 これで、human S100A13 の X 線回折データファイル(Denzo 形式。s100a13.sca)の CCP 形式
 304 (s100a13.mtz)への書式変換が完了した。□

| ImportScaled - Import Scaled Data from Denzo or d*trek | _ | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| | | Help |
| Job title | | |
| Convert scaled data output from Scalepack (DENZO) 🛋 into MTZ format | | |
| Use anomalous data | | |
| Run Ctruncate ito convert intensities to structure factors | | |
| Keep the input intensities in the output MTZ file | | |
| Ensure unique data & add FreeR column for 0.05 fraction of data. Copy FreeR from a | nother I | NTZ |
| Extend reflections to higher resolution: | | |
| In 150420 🛋 s100a13.sca | Browse | View |
| Out 150420 - s100a13.mtz | Browse | View |
| Use dataset name as identifier to append to column labels | | |
| MTZ Project, Crystal, Dataset Names & Data Harvesting | | |
| Create harvest file in project harvesting directory | | |
| Crystal S100A13_01 belonging to Project 150420 | | |
| Dataset name S100A13_0101 | | |
| Extra Information for MTZ File | | |
| Space group p212121 | | |
| Cell dimensions 39.775 59.289 77.628 90.0 90.0 90.0 | | |
| Data collected at wavelength 1.0 Angstroms | | |
| Edit or Transform Input Data | | _ |
| | | |
| Log File Output | | <u> </u> |
| Run Save or Restore | Close | |

- CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"import_scaled"という 3 個目のジョブが完了した
- 307 (FINISHED)ことが表示される。□

| CCP4Interface 6.5.0 runni | ngonm | no u | ıse Project | : 150420 | | | | | _ 🗆 × |
|--------------------------------------------|---------|------|-------------|----------|---------------|------------|---|---------------------------|-----------|
| | | | | | | | | Change Proj | ject Help |
| Data Reduction and Analysis | _ | 3 | 11:03:41 | FINISHED | import_scaled | [No title | - | Directories&ProjectD | lir |
| Data Processing using Mosfim | | 2 | 10:56:25 | FINISHED | matthews | Calculatio | | View Any File | |
| Import Integrated Data | | | 10:36:57 | FINISHED | import_scaled | [NO CICLE | | View Files from Job | |
| Import Unmerged Data (Poi | ntless) | | | | | | | Search/Sort Database | |
| ···· Import Unmerged Data (Cor | nbat) | | | | | | | Graphical View of Project | |
| ···· Import Merged Data | | | | | | | | Delete/Archive Files | |
| i Import Merged Data from Q | uicksc | | | | | | | Kill Job | |
| Xia2 - automatic dataprocessing | | | | | | | | ReRun Job | |
| Find or Match Laue Group | | | | | | | | Edit Job Data | |
| Scale and Merge Intensities | | | | | | | | Preferences | |
| Symmetry, Scale, Merge (Aimless) | | | | | | | | Sustam Administration | |
| Find Symmetry, Scale & Merge (Scala | 1) | | | | | | | System Administration | |
| Multiple dataset analysis (Blend) | | | (| | | • | - | Manage Updates | Exit |

- 310 8. Molrep を用いて分子置換を実行する。
- 311 作業メニューから Molecular Replacement → Model Generation → Run Molrep auto MR を選択すると、
 312 Molrep のウィンドウが開く。□
- 313 以下のように設定する。□
- 314 Do: Molecular Replacement
- 315 Use MAP files for \Box search model (f_{xy})
- 316 入力ファイルは以下の3つ。□
- 317 Data: 170420: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)
- 318 Model: 170420: 1E8A_A.pdb
- (立体構造既知配列類似タンパク質 S100A16単量体(chain A)の原子座標ファイル)
- 320 Sequence: 170420: s100a13.seq
- (S100A13 のアミノ酸配列。FASTA フォーマット)
- 321 出力ファイル名は自動で設定される。
- 322 Solution: 170420: 1E8A_A.pdb_molrep1.pdb
- 323 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□

| Molre | p | | | | | | | _ | | × |
|------------|-----------------|---------|-------------|-----------|--------------|-------|---------------|--------|------|-----|
| | | | | | | | | | He | elp |
| Job title | | | | | | | | | | |
| Do M | lolecular Rep | lacemer | t 💷 | | | | | | | |
| Use MAP fi | les for 🗌 | search | model | | | | | | | |
| Data | 150420 | | s100a13.mt | Z | | | | Browse | View | |
|] | F | SIGF | | F_\$100A | 13_0101 | | SIGF_S100A13_ | 0101 | 1 | |
| Model | 150420 | - | 1E8A_A.pdb | | | | | Browse | View | |
| Sequence | 150420 | 1 | s100a13.sec | 1 | | | | Browse | View | |
| Fixed | 150420 | 1 | | | | | | Browse | View | |
| | tic output file | ename | | | | | | | | |
| Solution | 150420 | | 1E8A_A_mo | lrep1.pdb | | | | Browse | View | |
| Search Op | tions | | | | | | | | | |
| Experimen | tal Data | | | | | | | | | |
| Model | | | | | | | | | | |
| Infrequent | ly used option | ns | | | | | | | | - |
| | Run | 1 | - | | Save or Rest | ore 🗕 | 1 | Close | | |

 $324 \\ 325$

319

分子置換の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"molrep"という4 個目の

326 ジョブが完了した(FINISHED)ことが表示される。□

| ist of jobs for project. Double-click on a job | uisp | nays | the log file, si | int-uouble-c | lick returns the job. | | | Change Project | нер |
|------------------------------------------------|------|------|------------------|--------------|-----------------------|-------------|----------------|-------------------|-----|
| Molecular Replacement | - | 4 | 10:19:33 | FINISHED | molrep | [No title 🗥 | Direct | tories&ProjectDir | |
| | ^ | 3 | 09:31:48 | FINISHED | import_scaled | [No title | 1 | /iew Any File | |
| Phaser Model Generation (NMA) | | 2 | 09:30:30 | FINISHED | matthews | Calculatio | | | 1. |
| Sculptor - MR model improvement | | ľ | 09:28:36 | FINISHED | import_scaled | [NO TITLE | View Files fro | om Job | - 1 |
| Ensembler - MR ensemble genera | | | | | | | Search/Sort D | Database | |
| Arcimboldo Lite | | | | | | | Graphical Vie | w of Project | |
| Phaser MR | | | | | | | Delete/Archiv | e Files | |
| Run Molrep - auto MR | | | | | | | Kill Job | | |
| Run MrBUMP | | | | | | | ReRun Job | | |
| Run Balbes | | | | | | | Edit Job Data | | |
| Run AMPLE | | | | | | | Preferences | | |
| AMoRe Suite | | | | | | | System Admi | inistration | |
| Utilities | | | | | | | - | | |
| Obseas Single Atom MD | 1 | I | | | | × | - | | |

328 CCP4Interface の中央の作業ログで、molrep の行を選択した後、右側の View Files from Job ボタンをクリ
 329 ックし、プルダウンメニューの View Job Result (new style)または View Log File (old style)をクリックすると
 330 計算の過程を追うことができる。□

327

331

332

 $\frac{333}{334}$

非対称単位中に S100A13 分子を 1 個置いたときの解。TF/sg、wRfac、Score の値に注目すると、上位 2 個の値が良い。□

| 335 | | | | | | Sum | nary (VC |)) | | | | |
|-----|-------|------|-------|--------|---------|---------|----------|---------|--------|-------|--------|---------|
| 336 | + | | | | | | | | | | | + |
| 337 | | RF | TF | theta | phi | chi | tx | ty | tz | TF/sg | wRfac | Score |
| 339 | + | 1 | 1 | 159 21 | 167 66 | 124 42 | 0 294 | 0 374 | 0 421 | 6 50 | 0 652 | 0 38560 |
| 340 | 1 2 | 4 | 1 | 47 98 | -157 11 | 63 88 | 0.090 | 0 263 | 0.356 | 7 16 | 0 653 | 0 38534 |
| 341 | 3 | 20 | 12 | 57 75 | 141 17 | 49 40 | 0 234 | 0 459 | 0.080 | 3 34 | 0 666 | 0 35348 |
| 342 | 4 | 8 | 6 | 95 45 | -157 64 | 75 28 | 0 280 | 0 414 | 0 073 | 3 91 | 0 666 | 0 35193 |
| 343 | 5 | 29 | 1 | 132 83 | -80 39 | 149 26 | 0 309 | 0 226 | 0 232 | 4 28 | 0 666 | 0 35134 |
| 344 | 6 | 6 | 8 | 132 99 | 170 53 | 86 71 | 0 097 | 0 147 | 0 295 | 3 93 | 0 668 | 0 34889 |
| 345 | 1 7 | 16 | 10 | 71 27 | -148 58 | 85 90 | 0 450 | 0 138 | 0 193 | 3 26 | 0 667 | 0 34784 |
| 346 | | 17 | 15 | 57.87 | 139.09 | 47.78 | 0.226 | 0.114 | 0.018 | 3.25 | 0.665 | 0.34760 |
| 347 | 9 | 7 | 4 | 96.13 | -158.34 | 76.14 | 0.282 | 0.413 | 0.073 | 4.30 | 0.667 | 0.34706 |
| 348 | 1 10 | 36 | 1 | 42.72 | -151.16 | 76.94 | 0.129 | 0.099 | 0.022 | 3.66 | 0.672 | 0.34572 |
| 349 | + | | | | | | | | | | | + |
| 350 | | | | | | | | | | | | |
| 351 | corrF | = | 0.4 | 125 | | | | | | | | |
| 352 | Scale | Bsc | ale | = 1. | 5855 -1 | 1. 1870 | | | | | | |
| 353 | TF/si | g | | = 6. | 50 | | | | | | | |
| 354 | Final | CC | | = 0.41 | 25 | | | | | | | |
| 355 | Packi | ng (| oef | = 1.00 | 00 | | | | | | | |
| 356 | Contr | ast | | = 3. | 58 | | | | | | | |
| 357 | | | | | | | | | | | | |
| 358 | Nmor | n RF | TF | theta | phi | chi | tx | ty | tz | TF/sg | wRfac | Score |
| 359 | 1 | 1 | 1 | 107.90 | -29. 41 | 172. 31 | -0. 294 | -0. 126 | 0. 079 | 6. 50 | 0. 636 | 0. 412 |
| 360 | | | | | | | | | | | | |
| | | | AT 4- | | | | | | | | | |

361 最上位の解を採用し(S100A13分子を非対称単位中に1個置き)、2個目の分子を置いたときの解。TF/sg、
 362 wRfac、Score の値に注目すると、最上位の解(さきほどの2位の解)が飛びぬけて良いので、これを採用
 363 する。□

Number of monomers in fixed model_2 : 1

| | Summary | (V0) | |
|--|---------|------|--|
|--|---------|------|--|

| + | | | | | | | | | | | + |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|------------------|-------------------|
| | RF | TF | theta | phi | chi | tx | ty | tz | TF/sg | wRfac | Score |
| + | 4 | 1 | 47.98 | -157. 11 | 63.88 | 0. 591 | 0. 264 | 0. 855 | 10. 32 | 0. 620 | 0. 46179 |
| 2 | 36 | 1 | 42.72 | -151.16 | 76.94 | 0.577 | 0. 262 | 0.849 | 5.01 | 0.654 | 0.39795 |
| 3 | 5 | 1 | 40.94 | 69.00 | 136.59 | 0.008 | 0. 264 | 0.144 | 4. 70 | 0.653 | 0.38913 |
| 4 | 7 | 1 | 96.13 | -158.34 | 76.14 | 0.310 | 0.811 | 0. 382 | 5.24 | 0.653 | 0.38824 |
| 5 | 8 | 1 | 95.45 | -157.64 | 75. 28 | 0.311 | 0.809 | 0. 381 | 5.06 | 0.654 | 0.38693 |
| 6 | 6 | 4 | 132.99 | 170.53 | 86.71 | 0.557 | 0. 525 | 0. 218 | 4.12 | 0.650 | 0. 37991 |
| 7 | 37 | 10 | 136.40 | 165.04 | 79.64 | 0. 401 | 0.166 | 0.834 | 3.34 | 0.654 | 0. 37553 |
| 8 | 16 | 10 | 71.27 | -148. 58 | 85.90 | 0.990 | 0.770 | 0. 326 | 3.16 | 0. 652 | 0. 37551 |
| 9 | 20 | 4 | 57.75 | 141.17 | 49.40 | 0. 681 | 0. 278 | 0.847 | 3.50 | 0. 658 | 0.37518 |
| 10 | 17 | 1 | 57.87 | 139.09 | 47.78 | 0. 681 | 0. 278 | 0.846 | 3. 47 | 0.659 | 0. 37474 |
| Scale TF/si Final Packi Contr CC_fc Nmor 2 | e Bsc g CC ng_C ast or_fi n RF 4 | ale coef xed_ TF 1 | = 1. = 10. = 0.49 = 1.00 = 4. model: theta 155.15 | 5855 -1 32 87 00 22 0.4125 phi 112.89 | 1. 1870 chi 138. 52 | tx -0.091 | ty -0.264 | tz 0.355 | TF/sg 10. 32 | wRfac 0.598 | Score 0.499 |
| | ወን | 分子 | を置くと、 | 1 個だ(| ナの時よ | りも、w | ′Rfac 値 | iが下か | ヾり、TF/ | /sg 值と | <u>-</u> Score 値か |
| ?個目 | _ | Мо | Irep を用 | いる分 | 子置換法 | まにより | 、非対称 | 尔単位中 | 中に S1 | 00A13 | 分子を2個 |
| ? 個目 このよ | うに | | | | いこう低 | のタン | パク質タ | う子を置 | 置く 位置 | と向き | を検討した結 |
| 2 個 E このよ 吉晶 G | うに の最 | 小構 | 成単位(| の箱の中 | | | | | | | |
| 2 個目 このよ 洁晶の こよく | うに の最 合う | 小構 立置 | 成単位の と向きが | の箱の中 見つかっ | った(かも | しれな | い)、と | 理解して | てください | ر, ⊔ | |
| 個E のよ 話晶の よく | ;うに の最 合う(| 小構 立置 | 成単位0 と向きが | の箱の中 見つかっ | った(かも | もしれな | い)、と | 理解して | てください | , ⁰ □ | |
| 個 E の よ 古 品 C : よ く | <うに の最 [、] 合う(| 小構 立置 | 成単位(と向きが | の箱の中 「見つか ⁻ | った(かも | しれな | い)、と | 理解して | てください | , [,] □ | |

401 9. Refmac を用いて、まず rigid body 構造精密化(分子の向きの微調整)を行う。

402 作業メニューから Refinement \rightarrow Run Refmac5 を選択すると、Run Refmac5 のウィンドウが開く。 \Box

| | | | | | | | | | 1 | |
|-------------------------------|---|---|----------|----------|-----------------------------------|-------------------------|----------------|---------------------|---|--|
| Refinement | | 4 | 10:19:33 | FINISHED | molrep | [No title o | Direct | ories&ProjectDir | | |
| Model Preparation | ^ | 3 | 09:31:48 | FINISHED | <pre>import_scaled matthews</pre> | [NO TITLE Calculatio | V | liew Any File | | |
| Restraint Preparation | | 1 | 09:28:36 | FINISHED | import_scaled | [No title | View Files fro | View Files from Job | | |
| Run Refmac5 | | | | | | | Search/Sort D |)atabase | | |
| Run NCS Phased Refinement | | | | | | | Graphical View | w of Project | | |
| Run Low Resolution Refinement | | | | | | | Delete/Archive | e Files | | |
| Model Completion & Analysis | | | | | | | Kill Job | | | |
| | | | | | | | ReRun Job | | | |
| | | | | | | | Edit Job Data | | | |
| | | | | | | | Preferences | | | |
| | | | | | | | System Admi | nistration | _ | |

403

- 404 以下のように設定する。□
- 405 Do: rigid body refinement using: no prior phase information
- 406 \Box Input fixed TLS parameters
- 407 no twin refinement
- 408 入力ファイルは以下の2つ。□
- 409 MTZ in: 170420: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)
- 410 PDB in: 170420: 1E8A_A _molrep1.pdb(分子置換法で得られた
 - 原子座標ファイル。
- 412 詳細説明: human S100A12 の側鎖を human S100A13 のものに置換し
- 413 非対称単位の中でX線回折データに合うように位置と向きを調整した
- 4142分子)
- 415 出力ファイル名は自動で設定される。
- 416 MTZ out: 170420: s100a13_refmac1.mtz
- 417 PDB out: 170420: 1E8A_A_molrep1_refmac1.pdb
- 418 Refiment Parameters で refinement のサイクル数を 20 から 5 に減らしても良い。
- 419 Run \rightarrow Run Now ボタンを押すと計算が始まる。 \Box

| 🕼 Run Refmac5 | - 0 | × |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------|
| | | Help |
| Job title | | |
| Do rigid body refinement — using no prior phase information — input | | |
| Input fixed TLS parameters | | |
| no — twin refinement | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| MTZ in 160426 - s100a13.mtz | Browse | View |
| FP F_\$100A13_0101 Sigma SIGF_\$100 | A13_0101 | |
| MTZ out 160426 - s100a13_refmac1.mtz | Browse | View |
| PDB in 160426 - 1E8A_A_molrep1.pdb | Browse | View |
| PDB out 160426 - 1E8A_A_moirep1_refmac1.pdb | Browse | View |
| Refmac keyword file 160426 | Browse | View |
| Refinement Parameters | | V |
| Do 20 cycles of maximum likelihood rigid body refinement | | |
| Use hydrogen atoms: generate all hydrogens 🛁 and 🗂 output to coordinate file | | |
| Resolution range from minimum 47.118 to 1.888 | | |
| 🔽 Use automatic weighting 🛛 Vse experimental sigmas to weight Xray terms | | |
| Refine overall B-factor | | |
| Exclude data with freeR label FreeR_flag with value of 0 | | |
| Rigid Domains Definition | | N |
| Edit list | Add Domain Defi | nition |
| Monitoring and Output Options | | |
| Scaling | | |
| | | |

421 422

rigid body 構造精密化の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"refmac5"

という5個目のジョブが完了した(FINISHED)ことが表示される。□

| Refinement | - | _ 5 | 10:32:03 | FINISHED | refmac5 | Rigid body ^ | Directe | ories&ProjectDir | |
|-------------------------------|---|------------|----------|----------|-----------------------------------|-------------------------|----------------|------------------|---|
| Model Preparation | | ^ 4 | 10:19:33 | FINISHED | molrep | [No title | V | iew Any File | |
| Restraint Preparation | | 2 | 09:31:48 | FINISHED | <pre>import_scaled matthews</pre> | [No title Calculatio | View Files fro | m loh | |
| Run Refmac5 | | 1 | 09:28:36 | FINISHED | import_scaled | [No title | Search/Sort D | atahaco | T |
| Run NCS Phased Refinement | | | | | | | Granhical View | v of Project | |
| Run Low Resolution Refinement | | | | | | | Delete/Archive | Files | |
| Model Completion & Analysis | | | | | | | Kill Job | riles. | |
| | | | | | | | Kill JOD | | |
| | | | | | | | ReRun Job | | |
| | | | | | | | Edit Job Data | | |
| | | | | | | | Preferences | | |
| | | | | | | | System Admir | nistration | - |

423

424 CCP4Interface の中央の作業ログで、refmac5 の行を選択した後、右側の View Files from Job ボタンをク

425 リックし、プルダウンメニューの View Log Fileをクリックすると、構造精密化の過程を視覚的に追えて分かり 426 やすい。□

427 View Files from Job \rightarrow View Log Graphs でロググラフを開き、Tables in File \rightarrow Rfactor analysis, stats

vs cycle を選択する。Graphs in Selected Table → <Rfactor> vs cycle で R factor(X 線回折データと立体 構造とのずれの指標。小さい値ほど望ましい)が微減したことを確認できる。□



433 10. Refmac を用いて、次に restrained 構造精密化を行う。

434 作業メニューから Refinement → Run Refmac5 を選択すると、Run Refmac5 のウィンドウが開く。□

| | | 1 | | | | | | chunge i rojec | |
|-------------------------------|---|---|----------|----------|---------------|------------|----------------|------------------|---|
| Refinement | - | 5 | 10:32:03 | FINISHED | refmac5 | Rigid body | Direct | ories&ProjectDir | |
| Model Preparation | | 4 | 10:19:33 | FINISHED | molrep | [No title | V | iew Any File | |
| Restraint Preparation | | 2 | 09:30:30 | FINISHED | matthews | Calculatio | View Files fro | m Job | |
| lun Refmac5 | | 1 | 09:28:36 | FINISHED | import_scaled | [No title | Search/Sort D | atabase | |
| Run NCS Phased Refinement | | | | | | | Graphical Viev | w of Project | - |
| Run Low Resolution Refinement | | | | | | | Delete/Archive | Files | - |
| Model Completion & Analysis | | | | | | | Kill Job | | - |
| | | | | | | | ReRun Job | | |
| | | | | | | | Edit Job Data | | |
| | | | | | | | Preferences | | |
| | | | | | | | System Admi | nistration | |

435

445

447

- 436 以下のように設定する。□
- 437 Do: restrained refinement using: no prior phase information
- 438 \Box Input fixed TLS parameters
- 439 no twin refinement
- 440 Use Prosmart: no

- 443 入力ファイルは以下の2つ。□
- 444 MTZ in: 170420: s100a13_refmac1.mtz

(rigid body 構造精密化後の X 線回折データ)

446 PDB in: 170420: 1E8A_A_molrep1_refmac1.pdb

(rigid body 構造精密化後の原子座標)

- 448 出力ファイル名は自動で設定される。
- 449 MTZ out: 170420: s100a13_refmac2.mtz
- 450 PDB out: 170420: 1E8A_A _molrep1_refmac2.pdb
- 451 Refiment Parameters で refinement のサイクル数を 10 から 50 に増やした方がよい。
- 452 Run \rightarrow Run Now ボタンを押すと計算が始まる。 \Box

| Run Refmac5 | _ | | > | < |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|----------|----|
| | | | He | lp |
| Job title | | | 60 C | |
| Do restrained refinement — using no prior phase information — input | | | | |
| Input fixed TLS parameters | | | | I |
| no — twin refinement | | | | I |
| Use Prosmart: no | (low resolution | n refine | ment) | |
| □ Run libg to generate external restraints (DNA/RNA) automatically | | | | |
| Run Coot:findwaters to automatically add/remove waters to refined structure | | | | |
| MTZ in 160426 s100a13_refmac1.mtz | | Browse | View | i |
| FP F_\$100A13_0101 Sigma SIGF_\$100A13 | 3_0101 | | 1 | i |
| MTZ out 160426 - s100a13_refmac2.mtz | | Browse | View | 1 |
| PDB in 160426 | | Browse | View | Ì |
| PDB out 160426 – 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb | | Browse | View | i |
| LIB in 160426 - | Merge LIBINs | Browse | View | i |
| Output lib 160426 - 1E8A A molrep1 refmac1.cif | | Browse | View | i |
| Refmac keyword file 160426 | | Browse | View | i |
| Data Harvesting | | | | 1 |
| Refinement Parameters | | | N | |
| Do 50 cycles of maximum likelihood restrained refinement | | | City of | |
| Use hydrogen atoms: generate all hydrogens — and \Box output to coordinate file | | | | Ľ |
| Resolution range from minimum 47.118 to 1.888 | | | | |
| 🔽 Use automatic weighting 🔽 Use experimental sigmas to weight Xray terms | | | | |
| use jelly-body refinement with sigma 0.02 | | | | |
| Refine isotropic | | | | |
| C Evoludo data with frooD labol ErooD flag + with value of 0 | | | | |
| | Close | | | |

 $\begin{array}{c} 453 \\ 454 \end{array}$

455

restrained 構造精密化の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"refmac5"

という6個目のジョブが完了した(FINISHED)ことが表示される。□

| CCP4Interface 6.5.0 runn | ning or | n m | o use | e Project | : 150420 | | | |
|-----------------------------------------|---------|-----|----------|-----------|-----------|---------------|------------------------|---------------------------|
| Display the log file from a selected jo | b | | | | | | | Change Project Hel |
| Refinement | ent 🗖 7 | | 13:48:32 | FINISHED | refmac5 | Restrained 🔺 | Directories&ProjectDir | |
| Model Preparation | Г | | 6 | 13:31:59 | FINISHED | refmac5 | Rigid body | View Any File |
| moderrieparatori | | | 15 | 11:35:09 | FINISHED | molrep | [No title | |
| Restraint Preparation | | | 4 | 11:12:06 | FINISHED | molrep | [No title | View Files from Job 📃 |
| Run Refmac5 | | 1 | 2 | 10:56:25 | FINISHED | import_scaled | [NO title | Soarch/Sort Databaso |
| Kun Kennaco | | 4 | 1 | 10:36:57 | FINISHED | import scaled | [No title | Search/Sort Database |
| Run NCS Phased Refinement | | | Ľ | 10.00.07 | 1 INIDIED | Import_bourcu | [no brote | Graphical View of Project |
| Model Completion & Analysis | | | | | | | | Delete/Archive Files |
| | | | | | | | | Kill Job |
| | | | | | | | | ReRun Job |
| | | | | | | | | Edit Job Data 🛁 |
| | | | | | | | | Preferences |
| | | | | | | | | System Administration 💷 |
| | | | | | | | - | 8 new updates available |
| | | - | Í∙[| | | | Þ | Manage Updates Exit |

456

457 CCP4Interface の中央の作業ログで、2回目の refmac5 の行を選択した後、右側の View Files from Job
 458 ボタンをクリックし、プルダウンメニューの View Log File をクリックすると計算の過程を追うことができる。□
 459 Job が FINISHED になった後、View Files from Job → View Log Graphs でロググラフを開き、Tables in
 460 File → Rfactor analysis, stats vs cycle を選択する。Graphs in Selected Table → <Rfactor> vs cycle で

461 サイクル毎に R factor(X 線回折データと立体構造とのずれの指標。小さい値ほど望ましい)が低下していく

462 様子を確認できる。Graphs in Selected Table \rightarrow <Rfactor> vs cycle でサイクル毎に FOM vs cycle でサ 463 イクル毎に FOM(位相の確からしさの指標。大きい値ほど望ましい)が向上していく様子を確認できる。 \Box

> Loggraph 6_refmac5.log × Loggraph 6_refmac5.log X <u>File Appearance Edit Utilities</u> Help Help <u>File Appearance Edit Utilities</u> FOM vs cycle <Rfactor> vs cycle Rfact Rfree 0.6 0 4 0 4 0.2 0.2 0 0 n 10 20 30 40 50 10 20 30 40 50 Ncyc Neve 50.0.0.729 47.86.0.243 Tables in File Tables in File Cycle 50. Rfactor analysis, F distribution v resh Cycle 50. FSC and Fom(<cos(DelPhi)>-acentric, centric, overall v resh Cycle 51. Rfactor analysis, F distribution v resh Cycle 51. FSC and Fom(<cos(DelPhi)>-acentric, centric, overall v resh Cycle 50. Rfactor analysis, F distribution v resh Cycle 50. FSC and Fom(<cos(DelPhi)>-acentric, centric, overall v resh Cycle 51. Rfactor analysis, F distribution v resh Cycle 51. FSC and Fom(<cos(DelPhi)>-acentric, centric, overall v resh * • Graphs in Selected Table Graphs in Selected Table <Rfactor> vs cycle FOM vs cycle Rfactor> vs cycle
> FOM vs cycle --LL vs cycle -LLfree vs cycle Geometry vs cycle LL vs cycle -LLfree vs cycle Geometry vs cycle

464



465

466 Graphs in Selected Table → Geometry vs cycle で rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRAL(それぞれ結合

- 467 長、結合角、不斉性における理想値からのずれ。小さい値ほど良い)が低下傾向にあればなお良い。
- 468
- 469 Refmac5を用いた restrained refinement の結果、
- 470 R factor は 33.7%、free R factor は 39.0%まで下がった。

- 471 (構造精密化計算に使用する回折データは全体の 95%。
- 472 残り5%の回折データの R factor を free R factor と呼ぶ。
- 473 free R factor は、構造精密化が正しく進んでいるか否かの客観的な指標になる)
- 474 FOMは69.6%まで上がった。
- 475 rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRA のいずれも初期値より下がった。□
- 476 ということで、すべての点において望ましい構造精密化をすることができた。
- 477
- 478 この後、Cootで電子密度をみて、問題がないことを確認したら、S100A13の分子置換に成功したと言える。
- 479 今回モデル(鋳型)として 1E8A A.pdb を用いたが、Blast サーチでより上位に来ていた 3NXA A.pdb をモ
- 480 デルに用いた場合、Molrep で解が得られたものの、Refmac の Restrained refinement 後も、Graphs in
- 481 Selected Table \rightarrow <Rfactor> vs cycle で R factor が十分下がらず(50.5%)、R free はむしろ上がった
- 482 (56.7%)。FOM も十分に上がらなかった(38.3%)。この場合は、分子置換は失敗したと判断する。



484

487

488

- 485 分子置換に失敗しても、あきらめず、以下のことを試す。
- 486 (1) モデル構造に別の PDB 座標を用いる。
 - (2) Phaser MR など Molrep 以外の分子置換プログラムを使う。
 - (3) Model Generation にあるツールを使って PDB 座標を修飾してみる。
 - (4) 経験者に聞く。

- 491 (2) Coot で分子モデルを電子密度に合わせてみましょう
- 492
- 493 11. さらに構造精密化を進めるために、Coot を用いて、視覚的に、分子モデルを電子密度に合わせていく。 494 □
- 495 Coot Tutorial で Coot の使い方を一通り説明した後、Run Refmac5 の View from Job → Output files ..
- 496 の PDB ファイルと MTZ ファイルを使って、立体構造モデルを電子密度に合わせて行きます。
- 497
- 498 Coot(クロガモ=鳥)アイコンをダブルクリックして、Cootを起動。Close。No。
- 499
- 500 まず、構造精密化した原子座標ファイルを開きます。
- 501 WinCoot: File \rightarrow Open Coordinates....
- 502 Places: 170420
- 503 Select Coordinates File: 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb \rightarrow OK_o





- 504
- 505
- 506 次に、精密化した X 線回折データファイルを開きます。
- 507 WinCoot: File \rightarrow Auto Open MTZ....
- 508 Places: 170420
- 509 Select Dataset File: s100a13_refmac2.mtz \rightarrow OK_o



- 512 電子密度マップの表示領域を半径 20 Å に設定します。
- 513 WinCoot: Edit \rightarrow Map Parameters....
- 514 Global map properties window: Map Radius: 20.0 Ångström \rightarrow OK_o

517 電子密度のうち、

- 518 青は、2Fo Fc マップと呼び(o = observed、c = calculated)、電子の存在位置を示します。
- 519 赤と緑は、Fo Fc マップのそれぞれ正と負を示し、
- 520 本来電子密度がないはずなのに構造が置かれている場所が 赤
- 521 本来電子密度があるはずなのに構造が置かれていない場所が 緑
- 522 で示されています。
- 523 この赤と緑の電子密度が現れている場所は、構造を修正する必要があるので、N 末端から順に手動で修正して 524 行きます。



| Contrait map properties, which we | -10 | |
|-----------------------------------|----------|-------|
| Density S | ettings | |
| Map Radius: 20.0 | Ångström | Apply |
| Increment Size 0.0500 | e/Å^3 | |
| Diff Map Increment 0.0050 | e/Å^3 | |
| Sampling Rate: 1.5000 | | |
| Dynamic Map Sampling | | |
| Dynamic Map Display Size | | |
| | | |

- 527 注目している2分子の他に、結晶格子中の隣の2分子についても半径30Å以内のものは表示するように設定
- 528 します。
- 529 WinCoot: Draw \rightarrow Cell & Symmetry....
- 530 Symmetry/Master Switch: Show Symmetry Atoms? \rightarrow Yes.
- 531 Symmetry Atom Display Radius: $30 \text{ A} \rightarrow \text{OK}_{\circ}$





537

- 534 注目している原子のその周囲の原子との距離を表示するように設定します。
- 535 WinCoot: Measures \rightarrow Environment Distances...
- 536 Environment Distances:
- Label Atom? \rightarrow OK_o

Show Residue Environment?



| 😺 Environment Di | stances | × |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------|
| Show Residue | Environ | ment? |
| Environment D Hydrogen/Ot Bumps | istance her Bond | Type Selection |
| Cut-off Distant | es | |
| Min Distance | 0.0 | Ångström |
| Max Distance | 3.2 | Ångström |
| Label Atom? | | |
| | | < ок |

- 539
- 540 WinCoot: Draw \rightarrow Go To Atom....
- 541 $\,$ Go To Atom...: Chain A \rightarrow A 7 THR \rightarrow Apply \rightarrow Close $_{\circ}$
- 542 右ドラッグ(左から右へ)で、指定したアミノ酸残基を中心に拡大する。
- 543 右ドラッグ(右から左へ)で、指定したアミノ酸残基を中心に縮小する。



547 左ドラッグ(上←→下、左←→右)で指定したアミノ酸残基を中心に回転する。

- 548 スペースバーを押すと次のアミノ酸残基に移動する。
- 549 Shift + スペースバーを押すと前のアミノ酸残基に移動する。
- 551 ここまでが、Cootの使用法の簡単な説明です。

- 554 スペースバーを何回も押して、21 PHE/A まで移動してください。
- 555 もし、行きすぎた時は、Shift + スペースバーを押して 21 PHE/A まで戻ってください。
- 556

557 21 PHE/A は、分子モデルの側鎖の構造が Leu になっています。これを修正します。



- 559 WinCoot: Calculate \rightarrow Model/Fit/Refine....
- 560 Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit....
- 561 Choose a Map: 1 s100a13_refmac2.mtz FWT PHWT を選択し、OK。(不要?)
- 562 Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...。(不要?)
- 563 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。
- 564 Resi...: PHE (F)。



566 側鎖の構造が Phe に修正されて、かつ、分子モデルの側鎖と電子密度とが合いましたか? 合ったことを確認し

567 てください。

565

568 今の方法は簡単過ぎるので、別の方法で合わせてみましょう。

574

581

- 570 Model/Fit/Refine: Undo を 2 回クリックして、分子モデルの側鎖を元に戻します。
- 571 Model/Fit/Refine: Simple Mutate....
- 572 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。
- 573 Resi...: PHE (F)。



- 575
 前回
 Mutate & Auto Fit...
 今回

 576
 さきほどと違って、分子モデルと電子密度とが微妙にする
- 576 さきほどと違って、分子モデルと電子密度とが微妙にずれています。
- 577 Model/Fit/Refine: Real Space Refine Zone。
- 578 WinCoot: 21 PHE/A の任意の原子をダブルクリック。
- 579 補正後の座標(白で表示される)が補正前の座標(黄色)よりも電子密度に合っていたら、受理する。
- 580 Accept Refinement?: Accept。



582 "Mutate & Auto Fit..." = "Sinple Mutate..." + "RealSpace Refine Zone"の関係にあります。 583

- 584 スペースバーを押して、次のアミノ酸残基 22 THR/A に進みます。
- 585 課題: 22 THR/A の分子モデルの側鎖が SER になっていて、電子密度と合っていません。
 - これを修正してください(5分間 自分でやってみる。質問は受け付けます)。



587

588 修正できた方は、この先を読みながら、作業を進めてください。

589 考えられる解答は以下の2通り。どちらが適切な解か?



591 いろんな角度から見て、電子密度とモデルがよく合っている方を選びます。



- 592
- 593 また、構造の歪みが小さい方がより妥当であると考えられます。
- 594 それぞれ Real Space Refine Zone してみると、左側のモデルの方が、右側のモデルよりも Bonds, Angles,
- 595 Chirals において歪みが小さく、より妥当であると結論付けることができます。
- 596
- 597 各アミノ酸残基の側鎖を見ていると、側鎖が不完全な(あるべき原子が一部ない)場合が時々あります。そのよう
- 598 な場合は Mutate & Auto Fit...で側鎖を完全にしてから向きを補正しましょう。すでに側鎖が完全である場合は
- 599 Real Space Refine Zone で向きを補正します。電子密度が薄いなどの理由で補正が難しい場合は、次回に補
- 600 正することにしてそのまま放置しておきます。
- 601 このようにして、まず A 鎖の N 末端(7 THR)から 22 THR まで、アミノ酸残基の分子モデルと電子密度とを合わ
- 602 せていきます。特に、8 GLU, 13 ILE, 15 THR, 18 THR の 4 つの残基の修正を行ってください。
- 603 この手動修正後の分子構造ファイル(=原子座標ファイル ***.pdb)を以下のように保存します。
- 604 WinCoot: File \rightarrow Save Coordinates....
- 605 Select Molecular Number to Save: 0 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb \rightarrow Select Filename...
- 606 Places: 170420
- 607 🛛 Save Hydrogens 🖾 Save ANISO Records
- 608 Name: 1E8A_A_molrep1_refmac2-coot-0.pdb \rightarrow Save.
- 609 これが提出用ファイル1個目です。
- 610

- 612 教育的配慮から、N末端からC末端まで、1残基ずつ確認・修正する方法を述べましたが、手動で全部やってい
- 613 ると時間も必要で疲れますので、自動で修正する方法も紹介します。
- 614 手動修正したものと自動修正したものを比較するため、自動修正用の座標を開きます。
- 615 WinCoot: File \rightarrow Open Coordinates....
- 616 Places: 170420
- 617 Select Coordinates File: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb \rightarrow OK_o
- 618
- 619 まず、分子置換後の座標は側鎖が不完全なものがありますので、それを修正します。
- 620 WinCoot: Extensions \rightarrow All Molecule \rightarrow [Post MR] Fill Partial Residues \rightarrow 621 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb \rightarrow OK
- 622
- 623 つぎに、タンパク質の構造を電子密度に自動でフィットさせます。chain A の N 末端から C 末端まで、その後、
 624 chain B の N 末端から C 末端まで、1 残基ずつ順次修正してくれます。
- 625
- 626 2 通りの方法があります。
- 627
- 628 前者は "Fit Protein using Rotamer Search" です。これは、各アミノ酸側鎖がとりやすい構造が数通りずつ知ら
 629 れているので、その構造(rotamers)の中から電子密度に一番合うものを選択する方法です。
- 630 WinCoot: Extensions \rightarrow All Molecule \rightarrow Fit Protein \rightarrow 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb 631 \rightarrow OK
- 632
- 633 後者は "Fit Protein using Real-Space Refinement" です。これは、電子密度に合うように構造を微調整する方
 634 法です。
- 637
- 638 上記2通りの方法を、上記の順番で実行しても良いと思います。
- 639
- 640 この自動修正後の分子構造ファイル(=原子座標ファイル ***.pdb)を以下のように保存します。
- 641 WinCoot: File \rightarrow Save Coordinates....
- 642 Select Molecular Number to Save: $1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb \rightarrow$ Select
- 643 Filename...
- 644 Places: 170420
- 645 \Box Save Hydrogens \Box Save ANISO Records
- 646 Name: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement-coot-0.pdb \rightarrow Save.
- 647 これが提出用ファイル2個目です。
- 648
- 649
- 650

- 651 原子座標をできるだけ電子密度に合わせたら、次に、WinCoot: Validate の種々のメニューを使って、立体構造
- 652 の不適切な箇所を見つけ出し、修正して行きます。
- 653
- 654 まず、Ramachandran プロットで、主鎖の二面角(φ , ψ)の分布が適切かどうか調べます。不適切な残基は修正
- 655 します。
- 656 WinCoot: Validate \rightarrow Ramachandran Plot \rightarrow *****.pdb
- 657 Dynarama: Ramachandran Plot (Phi-Psi Plot)で Disallowed Region にあるアミノ酸残基 にカーソルを合わせ
- 658 ると、そのアミノ酸残基を表示する。
- 659 87 ILE A, 88 ARG A, 8 GLU B, 88 ARG B の4 残基。いずれもペプチド鎖末端付近のアミノ酸残基なので、修正
- 660 が難しい。



 $\begin{array}{c} 661 \\ 662 \end{array}$

- 663 次に、結合長、結合角などの化学構造が不適切な残基を見つけて、修正します。
- 664 WinCoot: Validate \rightarrow Geometry analysis \rightarrow *****.pdb
- 665 Geometry Graphs: 各アミノ酸残基の理想の geometry からのずれが表示されている。
- 666 赤いアミノ酸残基があれば、そのバーをクリックし、その残基の分子モデルを修正する。



- 667
- 668

669 同様に、Peptide omega analysis、Temp. fact. variance analysis、Rotamer analysis を行います。

670

- 672 すべての項目について validate された分子モデルが得られたら、ファイルに保存。
- 673 WinCoot: File \rightarrow Save Coordinates...
- 674 Save Coordinates Molecule Selector: Save Molecule Number to Save: 0*****.pdb \rightarrow Select Filename...
- 675 Save Filename for Saved Coordinates: Name: デフォルトのまま(*****-coot-1.pdb) \rightarrow Save in folder:
- 676 CCP4 で指定したフォルダ → OK
- 677
- 678 修正された分子モデルを使って、Refmac5によりさらに構造精密化すると、R factor および free R の値が以前よ 679 り小さくなっている(改善されている)はずです。
- 680
- 681 その後、小さな電子密度にリガンドや水分子を当てはめ、Refmac5 で精密化し、最終構造を求めることで、立体682 構造解析が完了します。
- 683
- 684 そして、得られた原子座標ファイルとX線回折データファイルとを Protein Data Bank に登録します。
- 685
- 686

687 (3) Protein Data Bank (PDB) からのタンパク質構造情報の入手

688

- 689 13. PDB の WEB サイト(<u>http://www.pdb.org</u>)でキーワード検索
- 690 "brazzein"というタンパク質の名前を入力して、虫眼鏡マークをクリックする。



 $\begin{array}{c} 691 \\ 692 \end{array}$

693 甘味タンパク質ブラゼインに関する情報が8件、検索された。





697 右上の Download Files からアミノ酸配列や立体構造のファイルを入手できる。

698 アミノ酸配列 FASTA Sequence

699 立体構造 PDB file (Text)

700 電子密度ファイルの入手は以下のように行う。

701 右下の Experimental Details の枠内の EDS (Electron Density Server)をクリックして以下の画面を開く。



702

706

707

- 703 左カラムの Download から Maps をクリックする。
- 704 Map format を CCP4 として (Coot で読み込めるように)、Type を 2mFo-DFc にすると 2Fo-Fc マップが、Type
- 705 を mFo-DFc にすると Fo-Fc マップが作成される。



Generating map....

This may take a few seconds, or many minutes, depending on the size of your map.

Here is your gzipped map : <u>4he7.ccp4.gz</u>

| | Electron-dens | ity map ge | neration for 4he7 | | | | | | | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| | Map format : CCP | 4 🔽 Type : mFo-D | Fc 💌 Generate map | | | | | | | | |
| | <u>.</u> | | | | | | | | | | |
| 708 | (Note: this may take a few second | s, or many minute | s, depending on the size of your map.) | | | | | | | | |
| | Electron-density map generation for 4he7 | | | | | | | | | | |
| | Generating man | | | | | | | | | | |
| | | Generating map | | | | | | | | | |
| | This may take a few seconds, or | r many minutes, (| depending on the size of your map. | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| 5 00 | Here is your go | vinned man : | 4he7 diff.ccp4 gz | | | | | | | | |
| 709 | | | | = -> | | | | | | | |
| 710 | 圧縮ノアイルを解凍すると CCP4 を払 た man に亦更する必要ない | 張士とするノアイル | かできるか、これらを Coot に読み込む場合は、拡張 | ξ <u></u> | | | | | | | |
| 711 719 | で IIIdp に変更する必安のり。 2mEc_DEc マップ | Abe7.ccn4 | Ahe7 man | | | | | | | | |
| 712 | | 4he7.ccp4 | \rightarrow 4he7. Inap | | | | | | | | |
| 713 | がウンロードレナファイルを Windows | | → 4He7_uIII.IIIap わ Coot で使用する提合には、日本語をのつ+ルダは | 51- | | | | | | | |
| 714 | プリンロ いしにファイルを <u>Windows</u> 置いたり 日本語のファイル名を付け | <u>けていよう</u> に気をつい | +ろ また ファイルタにスペースを入れたいように気 | <u>)」</u> 示 を | | | | | | | |
| 716 | つける。 | | | | | | | | | | |
| 717 | <u></u> Cootを起動し、File から | | | | | | | | | | |
| 718 | Open Coordinates | 4he7.pdb | | | | | | | | | |
| 719 | Open Map | 4he7.map | □Is Difference Map 青 1 色表示 | | | | | | | | |
| 720 | Open Map | 4he7 diff.map | ☑Is Difference Map 緑·赤表示 | | | | | | | | |
| 721 | Display Manager で Map を選択して | 、+または-で表示 | の閾値を変更できる。 | | | | | | | | |
| 722 | 4he7.mapの閾値を1.5σ、4he7_dif | f.map の閾値を 5.0 | οとすると、以下の通り。 | | | | | | | | |
| | Cont En Lis Genate Dan Brann Jutain HD Ann Egimene ⊡ Cylenetten ⊟thein Henger sil | | AIM X ARC | | | | | | | | |
| | The second | | | | | | | | | | |
| | | - 2 yrd | | | | | | | | | |
| | | - x-t | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | ~ EX | | | | | | | | | |
| | | X CAY | | | | | | | | | |
| | REAL PLAN STRAIN FOR THE | a hand | * | | | | | | | | |

- 725
- 726 各アミノ酸残基の電子密度例
- 727 (http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Modelbuilding/aadensity.png より引用)

