

## 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

(1) 分子置換法を使ってタンパク質の立体構造を決定してみよう。

(2) Coot で分子モデルを電子密度に合わせてみよう。

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食品工学研究室 永田 宏次

## 1. 背景と目的

PDBには60,000個以上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。

今回、X線結晶構造解析に用いるソフトウェアパッケージCCP4はフリーウェアで、Unix, Linux, Mac OSX, Windowsで動くので、パソコンでも構造解析が可能である。

<http://www.ccp4.ac.uk/>

## 2. 流れ

目的タンパク質の選択—human S100A13

発現系作成

発現・精製・結晶化

X線回折データ取得・処理

X線結晶構造解析(分子置換法、単波長・多波長異常分散法、重原子同型置換法)

構造精密化・確認・PDBへの登録の仕方の説明

## 3. 実習

以下の実習で最終的に作成したPDBファイルを [aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp) に送ってください。

1. アグリバイオ講義HPから、圧縮ファイル100507.lzhをデスクトップにダウンロードし、100507.lzhのアイコンをダブルクリックして解凍する。□

<http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/lectures/AG04/index.html>

デスクトップ上のフォルダ100507には、以下の7個のファイルが入っている。□

s100a13.seq human S100A13のアミノ酸配列ファイル(一文字表記)

s100a13.sca human S100A13のX線回折データファイル

(Denzo/HKL2000フォーマット)

s100a13yobi.mtz	human S100A13 の X 線回折データファイル (予備) (CCP4 フォーマット)
1XK4_A.pdb	human calgranulin A の原子座標ファイル
1XK4_C.pdb	human calgranulin B の原子座標ファイル
1XK4_C_molrep1_refmac2yobi.pdb	構造精密化途中の原子座標ファイル
s100a13_refmac2yobi.mtz	構造精密化途中の X 線回折データファイル

2. [この作業は時間節約のため、永田が実行するのを見るだけにしてください]  
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 にアミノ酸配列の類似したタンパク質を検索する。□

<http://www.expasy.org/tools/blast/>

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出力される。

この中から、S100A13 の立体構造情報は除外する (S100A13 の結晶構造は未知と仮定して講義しているため)。□

また、NMR で決定された溶液構造は、結晶構造に比べて正確さと精密さで劣るので、分子置換法のモデルとして用いるには不向きである。ゆえに除外する。□

結果として、

10 個目の 1XK4-C (PDB entry: 1XK4 の chain C) が最良のモデルと考えられる。

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 1IRJ-A をモデルとして用いる。

List of potentially matching sequences

Send selected sequences to

Include query sequence

Db	AC	Description	Score	E-value
<input type="checkbox"/>	pdb	2KI4-C FGF1_HUMAN.. Chain C, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Componen...	166	2e-42
<input type="checkbox"/>	pdb	2KI4-B FGF1_HUMAN.. Chain B, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Componen...	166	2e-42
<input type="checkbox"/>	pdb	2H2K-A S10AD_HUMAN Chain A, Crystal Structure Analysis Of Human S100a13 ...	166	2e-42
<input type="checkbox"/>	pdb	1YUT-A S10AD_HUMAN Chain A, Solution Structure Of Calcium-S100a13 (Minim...	166	2e-42
<input type="checkbox"/>	pdb	1YUR-A S10AD_HUMAN Chain A, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized...	166	2e-42
<input type="checkbox"/>	pdb	1YUR-B S10AD_HUMAN Chain B, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized...	164	6e-42
<input type="checkbox"/>	pdb	2CXJ-A S10AD_MOUSE Chain A, 3d Solution Structure Of S100a13 >gi 1105910...	144	9e-36
<input type="checkbox"/>	pdb	2KAX-A S10A5_HUMAN Chain A, Solution Structure And Dynamics Of S100a5 In...	59	5e-10
<input type="checkbox"/>	pdb	1NSH-A S10AB_RABIT Chain A, Solution Structure Of Rabbit Apo-S100a11 (19...	57	2e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	1XK4-C S10A8_HUMAN.. Chain C, Crystal Structure Of Human Calprotectin(S100...	57	2e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	1IRJ-A S10A9_HUMAN Chain A, Crystal Structure Of The Mrp14 Complexed Wit...	57	2e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	1ODB-A S10AC_HUMAN Chain A, The Crystal Structure Of Human S100a12 - Cop...	56	4e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	1E8A-A S10AC_HUMAN Chain A, The Three-Dimensional Structure Of Human S10...	56	4e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	2WCE-A S10AC_HUMAN Chain A, Calcium-Free (Apo) S100a12 >gi 241913116 pdb...	55	9e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	3C1V-A S10A4_HUMAN Chain A, The 1.5 Å Crystal Structure Of Ca2+-Bound S1...	55	9e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	1M31-A S10A4_HUMAN Chain A, Three-Dimensional Solution Structure Of Apo-...	55	9e-09
<input type="checkbox"/>	pdb	2JPT-A S10A1_BOVIN Chain A, Structural Changes Induced In Apo-S100a1 Pro...	54	1e-08
<input type="checkbox"/>	pdb	1K2H-A S10A1_RAT Chain A, Three-Dimensional Solution Structure Of Apo-...	54	2e-08
<input type="checkbox"/>	pdb	2RGI-A S10A2_HUMAN Chain A, Crystal Structure Of Ca2+-Free S100a2 At 1.6...	53	3e-08
<input type="checkbox"/>	pdb	1QLS-A ANXA1_HUMAN.. Chain A, S100c (S100a11),Or Calgizzarin, In Complex W...	53	3e-08
<input type="checkbox"/>	pdb	1CFP-A S100B_BOVIN Chain A, S100b (S100beta) Nmr Data Was Collected From...	50	2e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1SYM-A S100B_RAT Chain A, 3-D Solution Structure Of Reduced Apo-S100b ...	50	3e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1MHO-A S100B_BOVIN Chain A, The 2.0 Å Structure Of Holo S100b From Bovin...	50	3e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1PSB-A S100B_BOVIN.. Chain A, Solution Structure Of Calcium Loaded S100b C...	50	3e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1OZO-A S100P_HUMAN Chain A, Three-Dimensional Solution Structure Of Apo-...	49	4e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1J55-A S100P_HUMAN Chain A, The Crystal Structure Of Ca+-Bound Human S10...	49	4e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	2H61-A S100B_HUMAN Chain A, X-Ray Structure Of Human Ca2+-Loaded S100b >...	49	4e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	2K7O-A S100B_RAT Chain A, Ca2+-S100b, Refined With Rdc >gi 213424020 ...	49	5e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1KSM-A S100G_BOVIN Chain A, Average Nmr Solution Structure Of Ca Ln Calb...	49	5e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1HT9-A S100G_BOVIN Chain A, Domain Swapping Ef-Hands >gi 14277911 pdb 1H...	49	5e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	2H61-C S100B_HUMAN Chain C, X-Ray Structure Of Human Ca2+-Loaded S100b >...	49	6e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1N65-A S100G_BOVIN Chain A, Family Of Nmr Solution Structures Of Ca Ce C...	49	6e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1MQ1-A CAZA1_HUMAN.. Chain A, Ca2+-S100b-Trtk-12 Complex >gi 27573963 pdb ...	49	6e-07
<input type="checkbox"/>	pdb	1CB1-A S100G_PIG Chain A, Three-Dimensional Solution Structure Of Ca2+...	48	1e-06
<input type="checkbox"/>	pdb	1BOC-A S100G_BOVIN Chain A, The Solution Structures Of Mutant Calbindin ...	48	1e-06
<input type="checkbox"/>	pdb	4ICB-A S100G_BOVIN Chain A, Proline Cis-Trans Isomers In Calbindin D9k O...	47	1e-06
<input type="checkbox"/>	pdb	1IG5-A S100G_BOVIN Chain A, Bovine Calbindin D9k Binding Mg2+ >gi 142783...	47	1e-06

複数のペプチド鎖を含む場合は、似ているペプチド鎖だけの情報を抽出して、別名で保存する。例: 1xk4\_C.pdb。

ATOM	1434	N	LYS C	4	9.892	70.055	167.750	1.00	50.82	N
ATOM	1435	CA	LYS C	4	9.141	68.965	168.427	1.00	49.76	C
ATOM	1436	C	LYS C	4	9.606	67.576	167.983	1.00	46.94	C
(途中省略)										
ATOM	2176	CD	GLU C	92	33.783	49.554	166.930	1.00	44.92	C
ATOM	2177	OE1	GLU C	92	34.739	48.784	167.199	1.00	45.60	O
ATOM	2178	OE2	GLU C	92	33.105	50.143	167.813	1.00	45.73	O

アミノ酸配列のアラインメントをとると、以下の通り。配列相同性は30%弱。

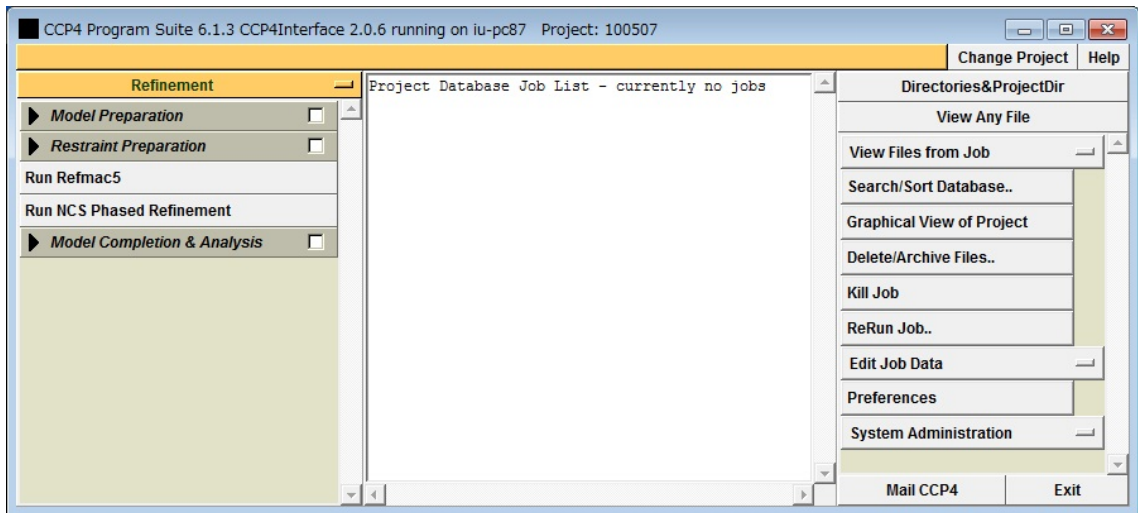
```

      1      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110     115
S100a13 MAREPLTELEESITVYVTFFFRROGRKQSLVMEFKELYTQQLPHLLKDVGS----LDEKHKSLDYNQDSELKFNFYHRLIGELAKEIRKKDLKIRKK
1XK4:C   TSKNSQLERNIETITINTFHQYSVKLGHPTLNQGEFKELVYKQLQNFLLKKEKNEKYIEIIMEDI.DTNRKQLSFEFFIMLHARLTHASHEKHAHGDEGPGHHKPLGEGTP
1XK4:A   MLTELEKALNSIDVYHKYSLKGNFHAYRDLKLLLETESPOYIRKKA----DVMFKELDINTDQAVNFQEFILVIKIGVAAHKKSHIESHKE
Consensus .....$t#LE...i#t!!t#h,%$...G..d..l...#fK#L#v...#lp...lkk.g.....#..nk.LD.N.D..L.F#%Z..L...$.a.hk.h#e...k.....

```

3. [お待たせしました。CCP4 を用いて、分子置換を行います。ここから皆さんに実行してもらいます]

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。□



4. 作業ファイルを扱うディレクトリを設定する。

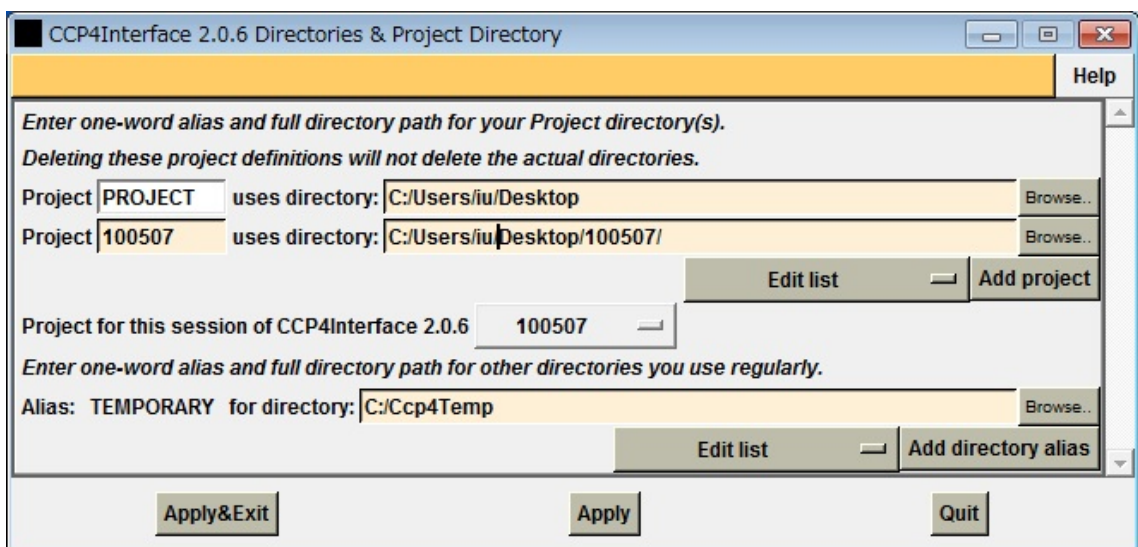
右上にある Directories&ProjectDir ボタンを押すと以下のウインドウが開く。□

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。□

Project: 100507 uses directory: C:/Users/iu/Desktop/100507/

Project for this session of CCP4Interface 2.0.6 として 100507 を選択する。□

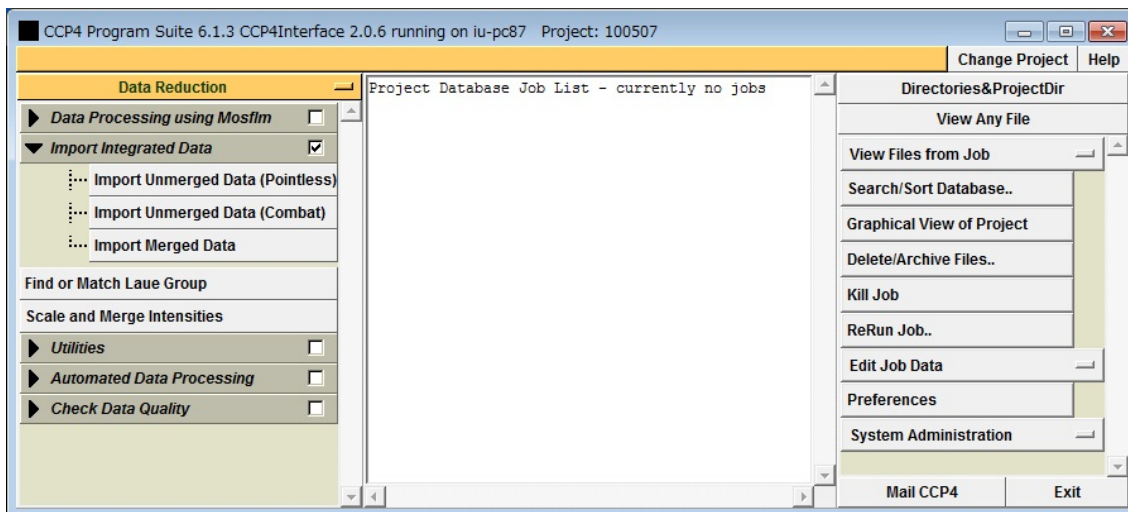
その後、Apply&Exit ボタンを押す。□



5. 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種々のメニューが現れる。□

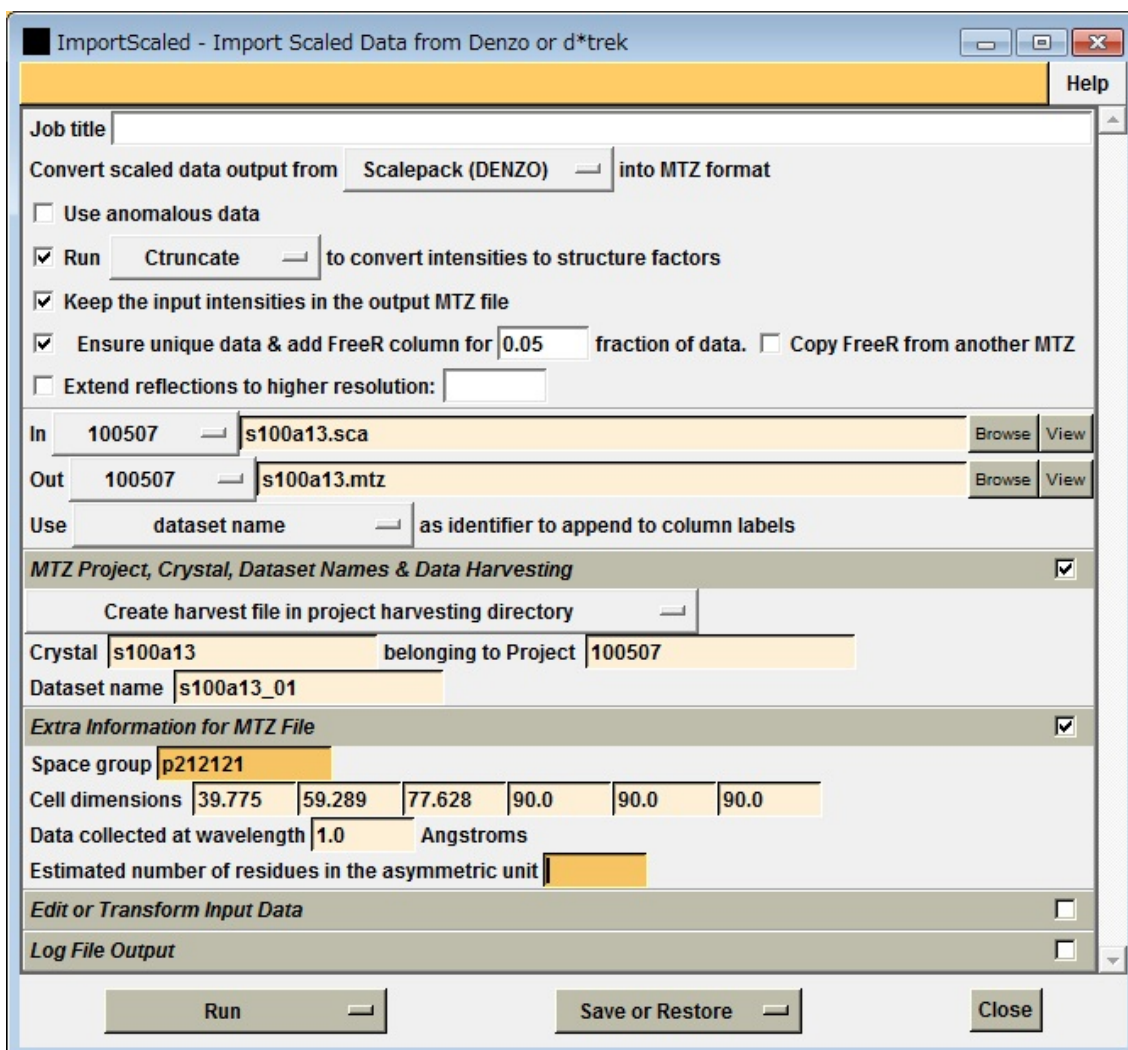
Data Reduction → Import Integrated Data → Import Merged Data を選択すると ImportScaled のウインドウが開く。□



以下のようにチェックする。

- Use anomalous data
- 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.
- Copy FreeR from another MTZ
- Extend reflections to higher resolution:

(次ページに続く)



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。□  
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）。

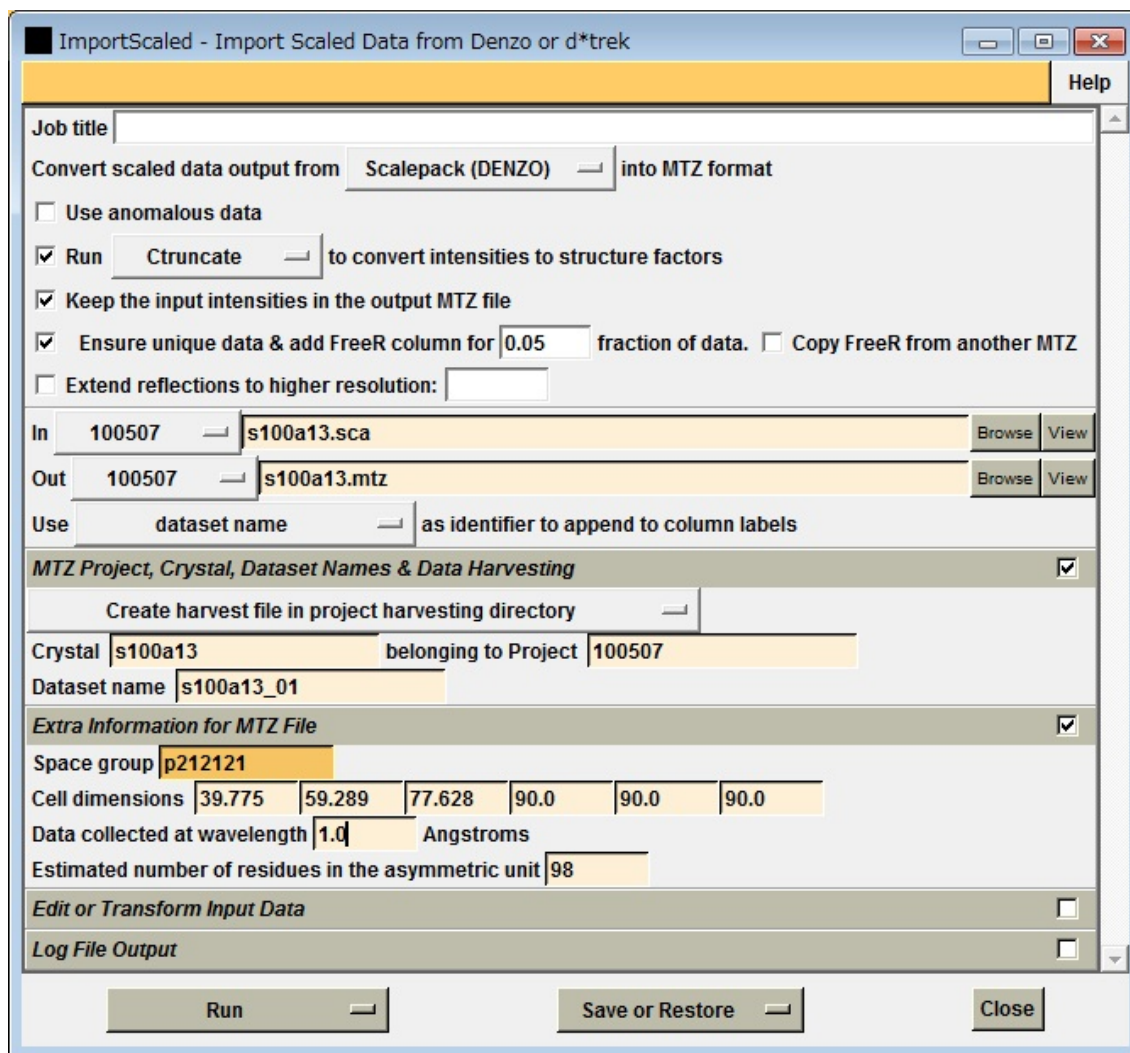
In 100507: s100a13.sca

Out 100507: s100a13.mtz

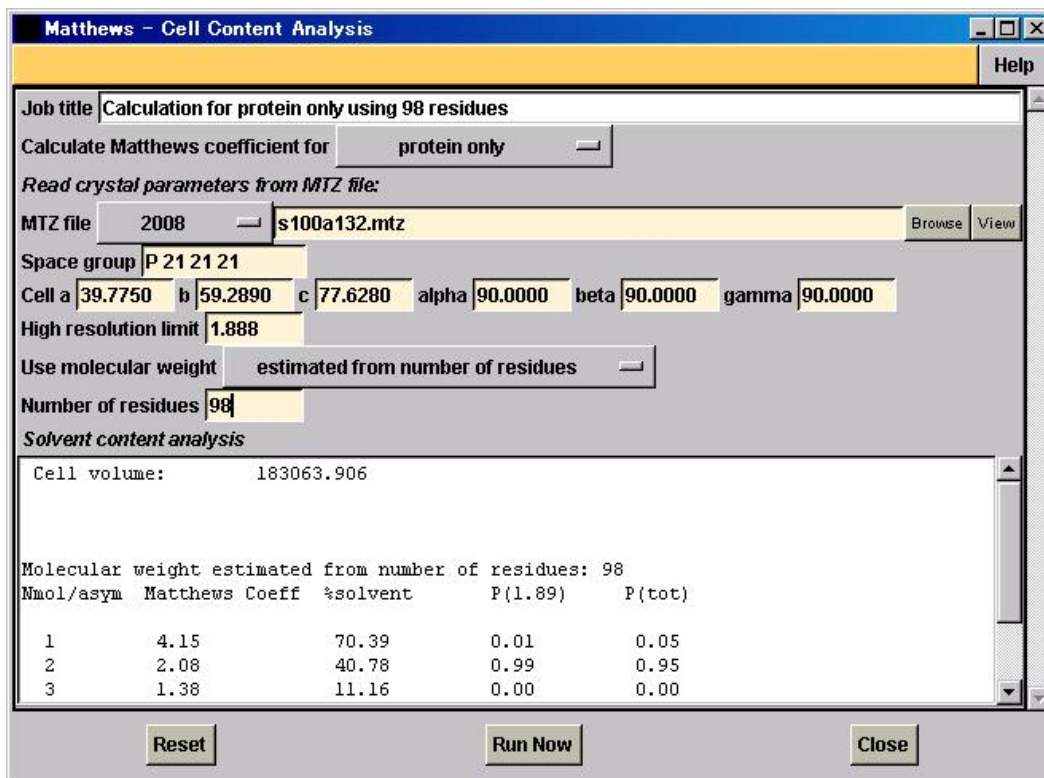
その他、入力が必要な項目は、Extra information for MTZ file の波長の値。有効数字を考慮して、1.0000 (Angstrom)と入力するが、勝手に 1.0 に変換される。□

Data collected at wavelength: 1.0 Angstroms

Run 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。□



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。  
左側の作業メニューから、Molecular Replacement → Analysis → Cell Content Analysis を選択すると Matthews のウィンドウが開く。□  
MTZ file として、s100a13.mtz を選択する。□  
Use molecular weight: estimated from number of residues にして  
Number of residues: 98 と入力する。□  
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、溶媒含有率、確率（2通り）が表示される。□



この場合、非対称単位中 S100A13 が 2 分子含まれると確定した。□

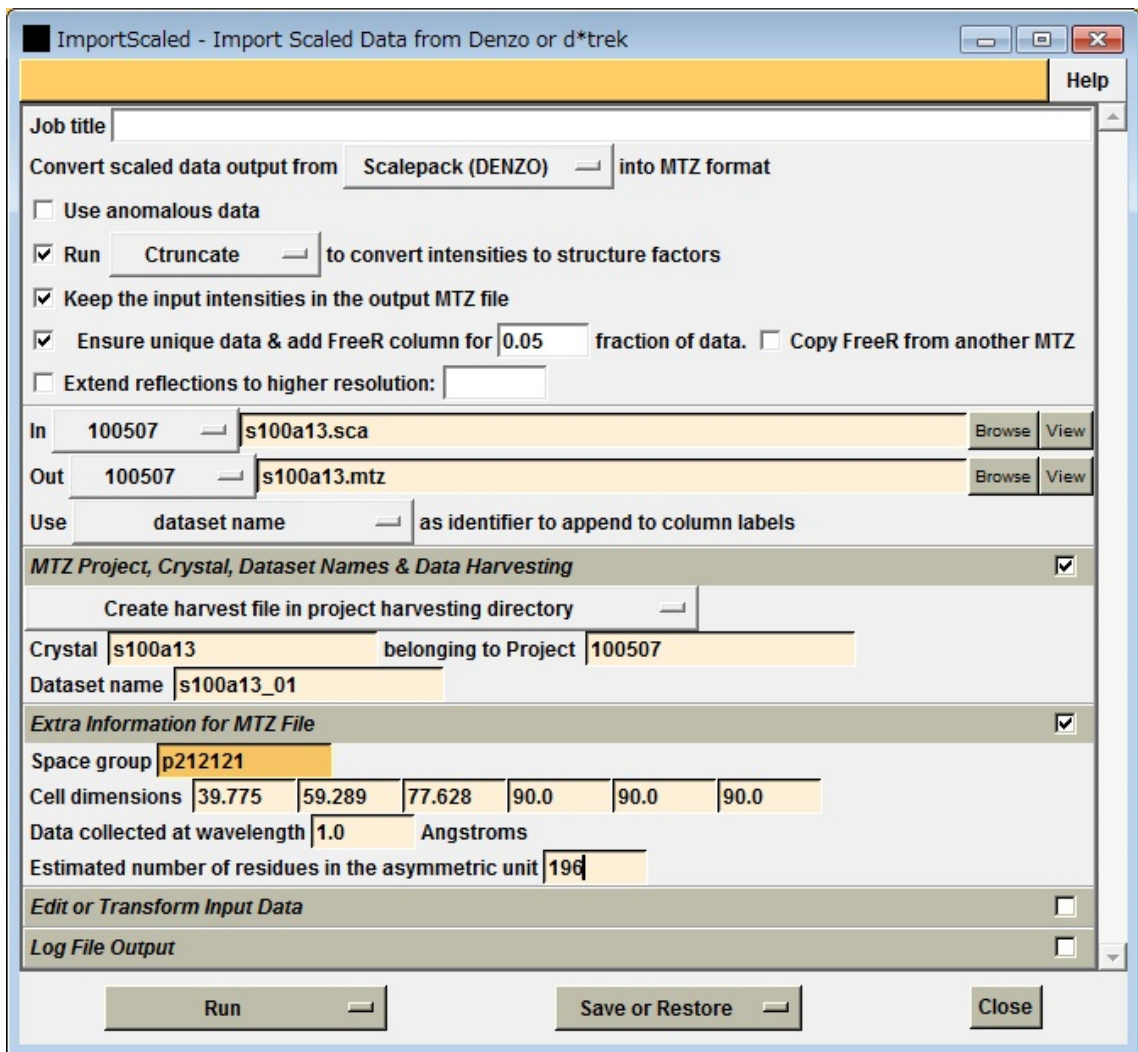
7. 非対称単位中の残基数 196 を入力し、Data Reduction → Import Integrated Data → Import Merged Data を再実行する。

左側の作業メニューから Data Reduction → Import Integrated Data → Import Merged Data を選択すると ImportScaled のウィンドウが開く。□

基本的に 5 と同じ設定だが、Extra information for MTZ file 中の

Estimated number of residues in the asymmetric unit に 196 と入力する。□

その後、Run 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が出るが、Continue ボタンを押して、上書きする。□



8. Molrep を用いて分子置換を実行する。

作業メニューから Molecular Replacement → Model Generation → Run Molrep - auto MR を選択すると、Molrep のウィンドウが開く。□

以下のように設定する。□

Do: molecular replacement performing: rotation and translation function

Get structure factors from MTZ file

Input fixed model

Multi-copy search

Use sequence

入力ファイルは以下の 3 つ。□

MTZ in: 100507: s100a13.mtz

Model in: 100507: 1XK4\_C.pdb

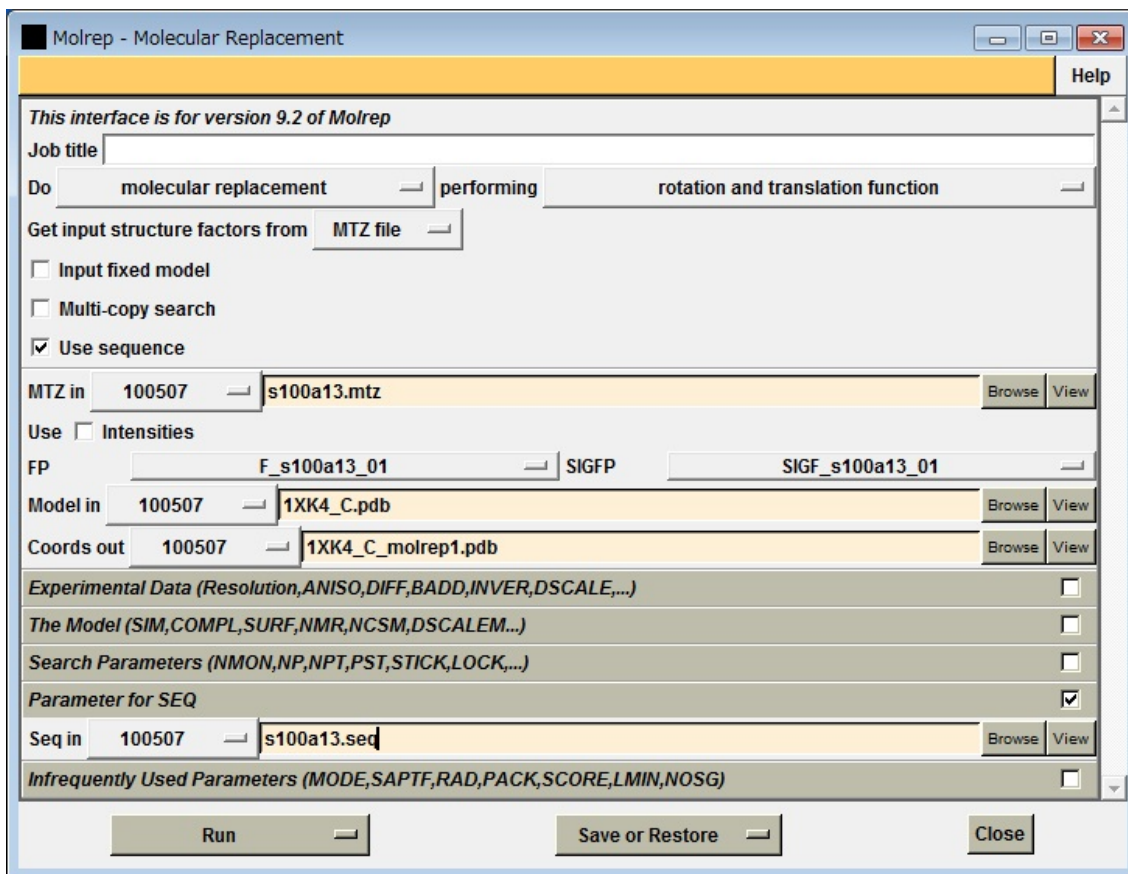
Seq in: 100507: s100a13.seq

出力ファイル名は自動で設定される。

Coords out: 100507: 1XK4\_C\_molrep1.pdb

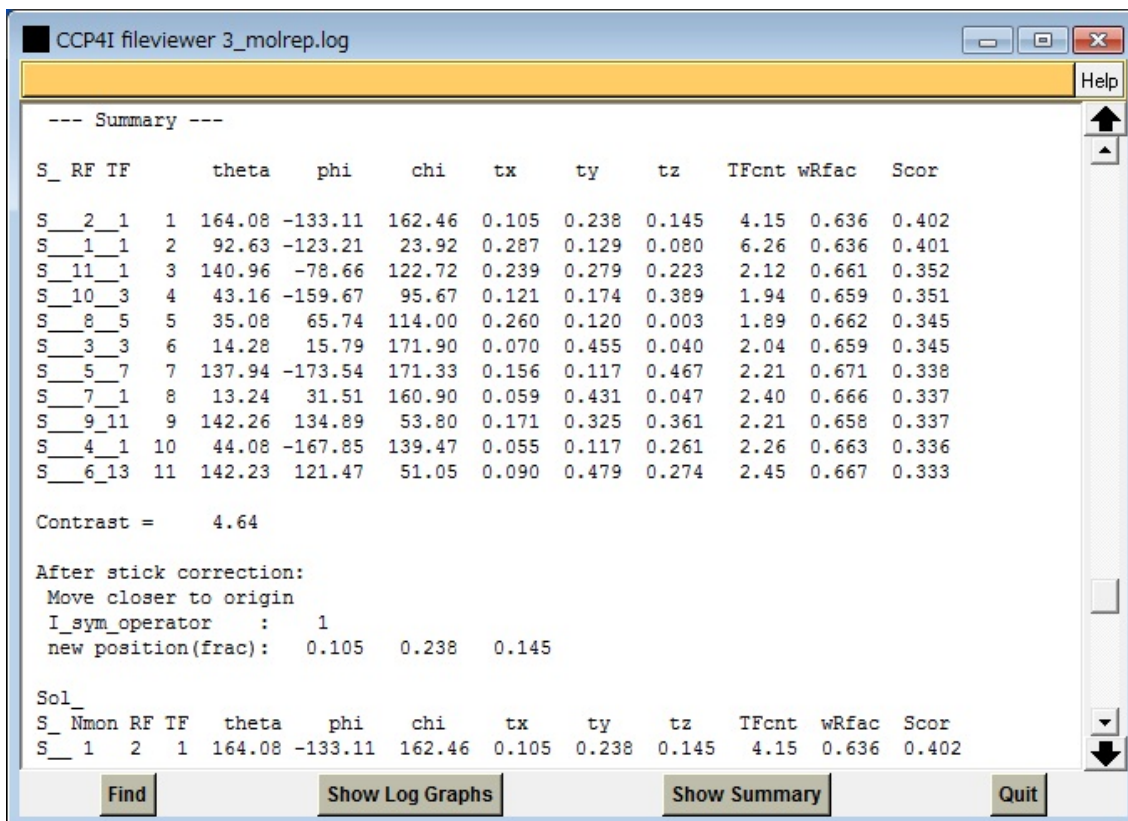
Run ボタンを押すと計算が始まる。□





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。□

非対称単位中に S100A13 分子を 1 個置いたときの解。ログファイル最終行近くにある解 Sol<sub>1</sub> の Rfac と Scor の値に注目すると、上位 2 個の値が良い。□



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。Rfac と Scor 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、これを採用する。□

2 個目の分子を置くと、1 個だけの時よりも、wRfac 値が下がり、Scor 値が上がる。□  
このように Molrep を用いる分子置換法により、非対称単位中に S100A13 分子を 2 個置くことができた。□

```

--- Summary ---

S_ RF TF      theta   phi    chi    tx    ty    tz    TFcnt wRfac  Scor
S_ 1_ 1  1   92.63 -123.21  23.92  0.789  0.129  0.580  18.74  0.579  0.507
S_ 8_ 1  2   35.08  65.74  114.00  0.970  0.587  0.950   2.04  0.635  0.403
S_13_14 3  171.12 -162.05  141.11  0.843  0.611  0.021   1.90  0.631  0.401
S_ 3_ 2  4   14.28  15.79  171.90  0.025  0.095  0.637   3.32  0.632  0.401
S_12_ 4  5   68.87  88.34   38.24  0.218  0.877  0.033   1.75  0.634  0.400
S_11_10 6  140.96 -78.66  122.72  0.503  0.929  0.292   2.14  0.631  0.398
S_ 5_ 1  7  137.94 -173.54  171.33  0.918  0.633  0.974   2.68  0.638  0.398
S_10_ 9  8   43.16 -159.67   95.67  0.574  0.090  0.380   0.68  0.638  0.394
S_ 7_14  9   13.24  31.51  160.90  0.827  0.869  0.940   0.90  0.637  0.387
S_ 9_11 10  142.26  134.89   53.80  0.421  0.663  0.056   0.37  0.637  0.387
S_ 6_ 5 11  142.23  121.47   51.05  0.030  0.599  0.026   0.62  0.638  0.386
S_ 4_ 2 12   44.08 -167.85  139.47  0.614  0.216  0.399  -0.01  0.632  0.386
S_ 2_ 1 13  164.08 -133.11  162.46  0.105  0.238  0.145   4.15  0.636 -3.000

Contrast =      8.62

After stick correction (more information in molrep.doc):
Move closer to molecule N :      1
--- Dimer ---
Rotation to molecule N (polar angles) :   74.15 -77.18  179.86
Distance between centres (Å) :   23.9
Orthogonal axis distance and parallel (Å) :  23.9  0.0
I_sym_operator      :      3
new position(frac):   0.289  0.371  0.420

INFO: you can find this dimer in molrep_dimer.pdb
Sol_
S_ Nmon RF TF  theta   phi    chi    tx    ty    tz    TFcnt wRfac  Scor
S_ 2  1  1  100.04  0.56  166.98  0.289  0.371  0.420  18.74  0.579  0.507
--- convert "molrep.crd" to "molrep.pdb" ---

Find      Show Log Graphs      Show Summary      Quit

```

## 9. Refmac を用いて、まず rigid body 構造精密化を行う。

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。□

以下のように設定する。□

Do: rigid body refinement using: no prior phase information

Input fixed TLS parameters

no twin refinement

入力ファイルは以下の 2 つ。□

MTZ in: 100507: s100a13.mtz

PDB in: 100507: 1XK4\_C\_molrep1.pdb

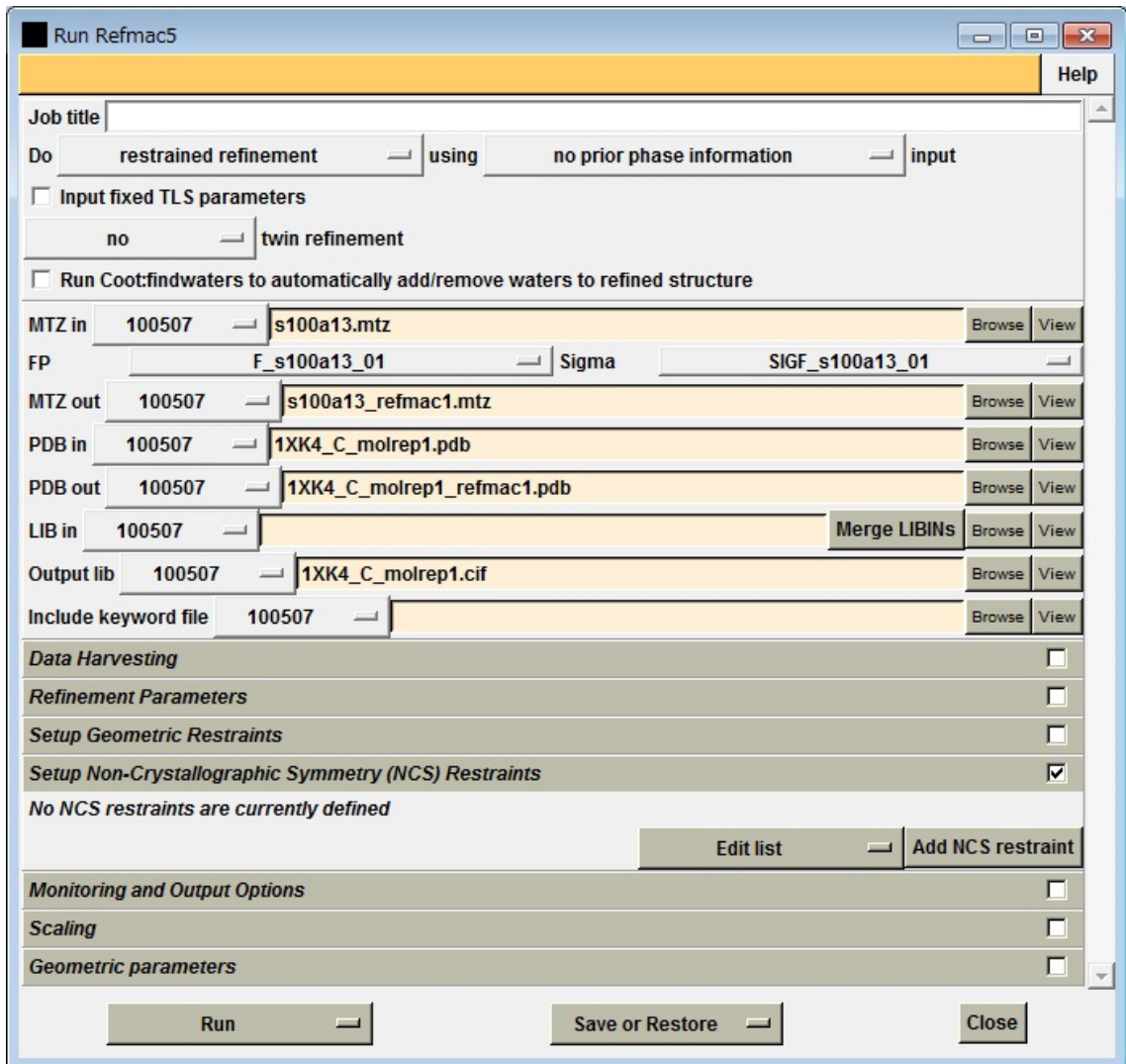
出力ファイル名は自動で設定される。

MTZ out: 100507: s100a13\_refmac1.mtz

PDB out: 100507: 1XK4\_C\_molrep1\_refmac1.pdb

Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 20 から 5 に減らしても良い。

Run ボタンを押すと計算が始まる。□



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。□

Job が FINISHED になった後、View Log Graph で構造精密化の過程を視覚的に追えて分かりやすい。□

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

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。□

以下のように設定する。□

Do: restrained refinement    using: no prior phase information

Input fixed TLS parameters

no twin refinement

入力ファイルは以下の 2 つ。□

MTZ in: 100507: s100a13\_refmac1.mtz

PDB in: 100507: 1XK4\_C\_molrep1\_refmac1.pdb

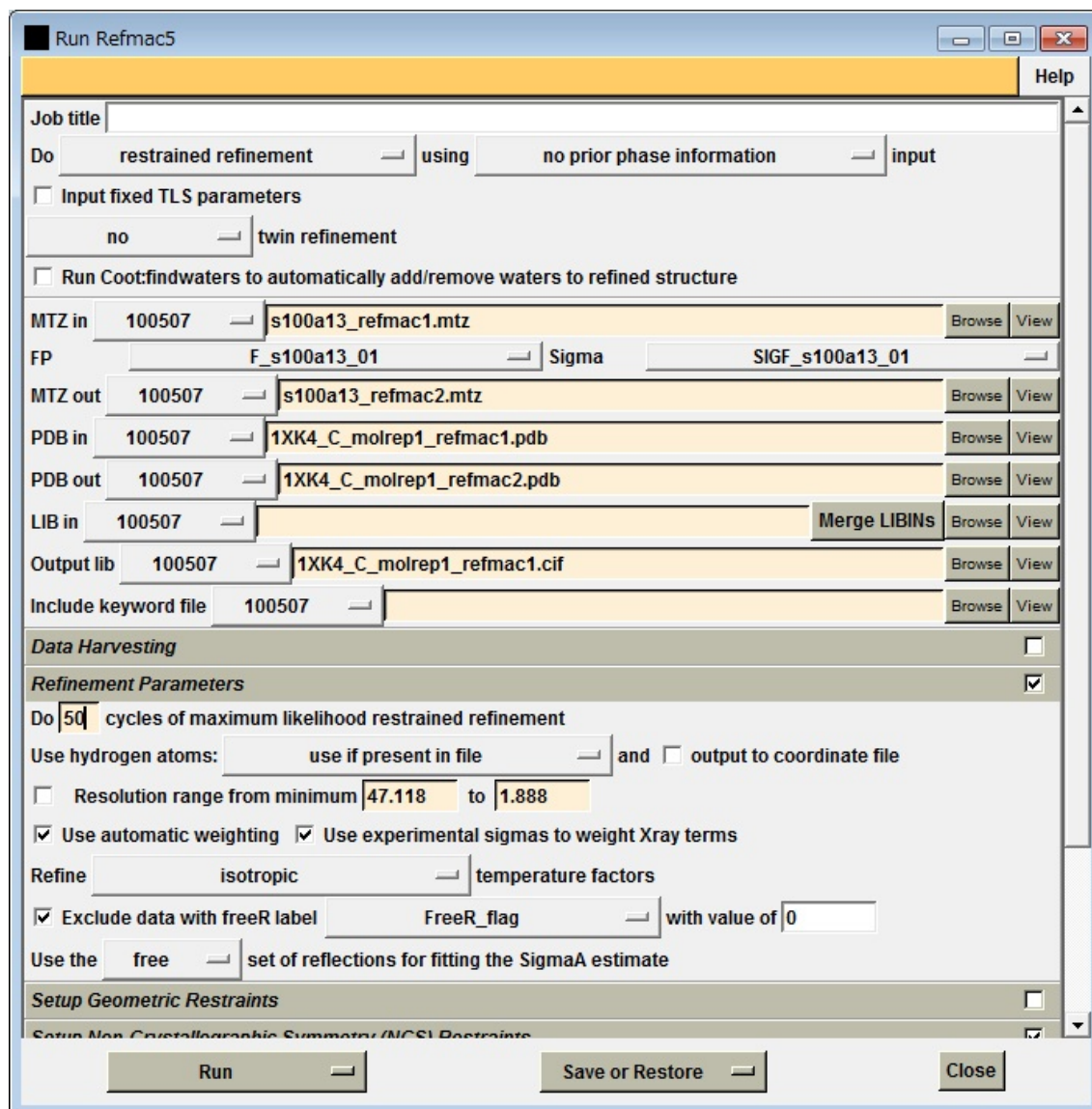
出力ファイル名は自動で設定される。

MTZ out: 100507: s100a13\_refmac2.mtz

PDB out: 100507: 1XK4\_C\_molrep1\_refmac2.pdb

Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 20 から 50 に増やした方がよい。

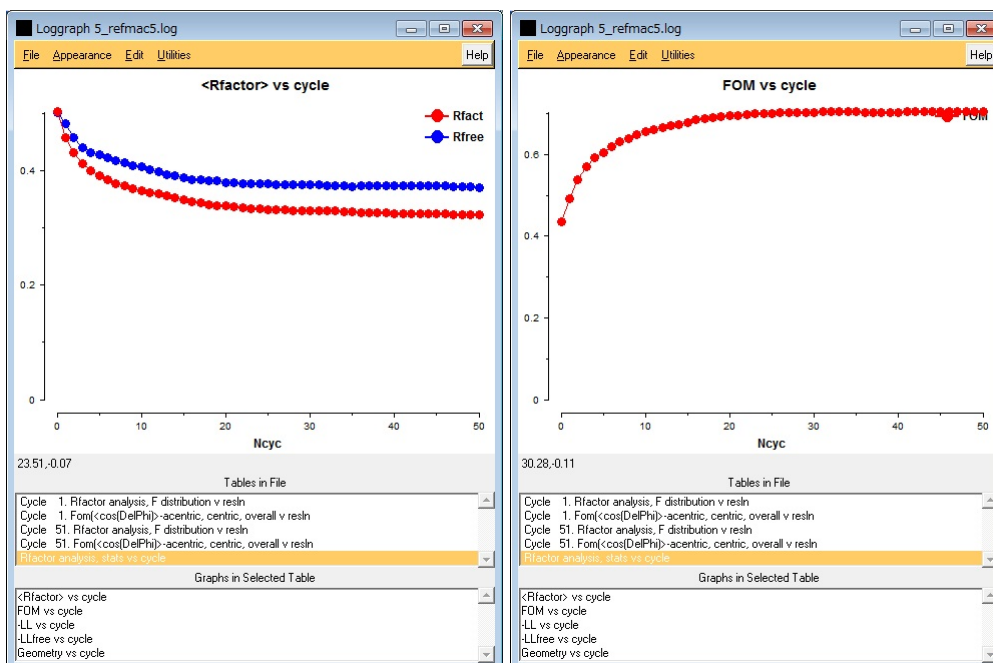
Run ボタンを押すと計算が始まる。□



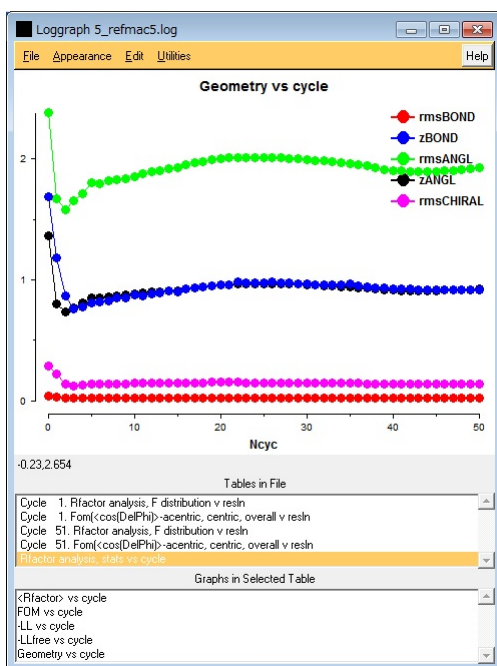
CCP4Interface の中央の作業ログで、2 回目の refmac5 の行を選択した後、右側の View Files from Job ボタンをクリックし、プルダウンメニューの View Log File をクリックすると計算の過程を追うことができる。□

Job が FINISHED になった後、View Log Graph で構造精密化の過程を視覚的に追えて分かりやすい。□

View Files from Job → View Log Graphs でロググラフを開き、Tables in File → Rfactor analysis, stats vs cycle を選択する。Graphs in Selected Table → <Rfactor> vs cycle でサイクル毎に R factor が低下していく様子を確認できる。Graphs in Selected Table → <Rfactor> vs cycle でサイクル毎に FOM vs cycle でサイクル毎に FOM (位相の確からしさ) が向上していく様子を確認できる。□



Graphs in Selected Table → Geometry vs cycle で rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRAL が低下傾向にあればなお良い。



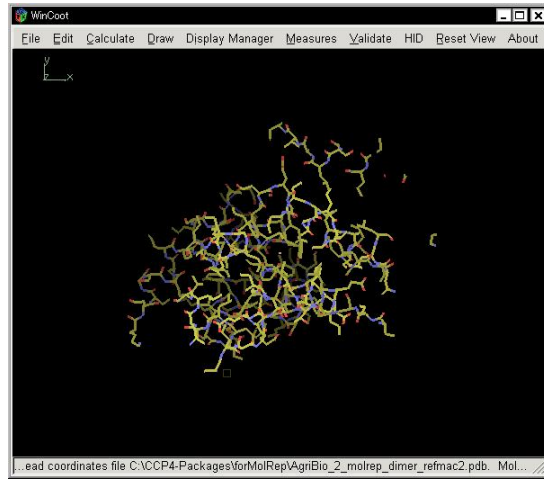
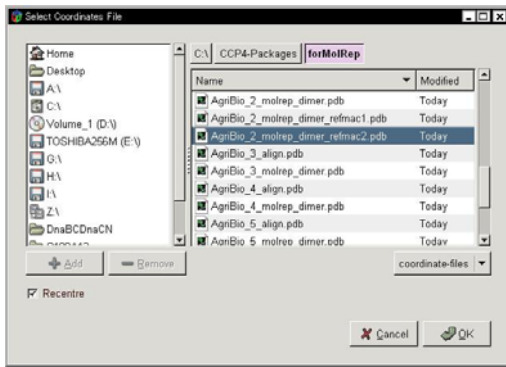
Refmac5 を用いた restrained refinement の結果、R factor は 32%、free R factor は 37%まで下がった。□

- 1 1. 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。□

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 ..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。

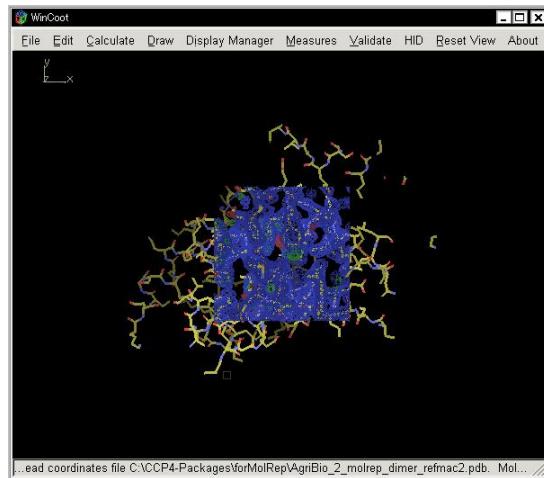
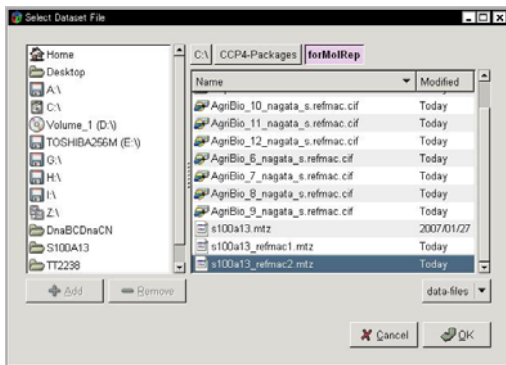
Coot (クロガモ=鳥) アイコンをダブルクリックして、Coot を起動。Close。No。  
WinCoot: File → Open Coordinates...

Select Coordinates File: AgriBio\_2\_molrep\_dimer\_refmac2.pdb → OK.



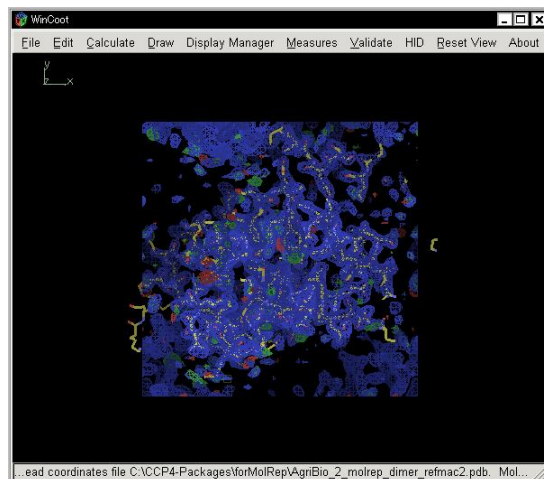
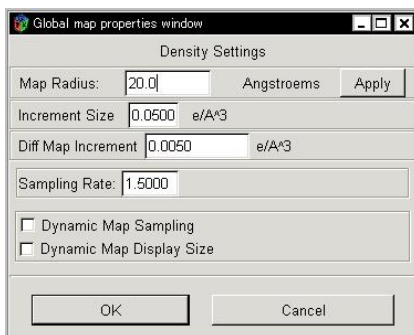
WinCoot: File → Auto Open MTZ....

Select Dataset File: s100a13\_refmac2.mtz → OK.



WinCoot: Edit → Map Parameters....

Global map properties window: Map Radius: 20.0 Angstrom → OK.

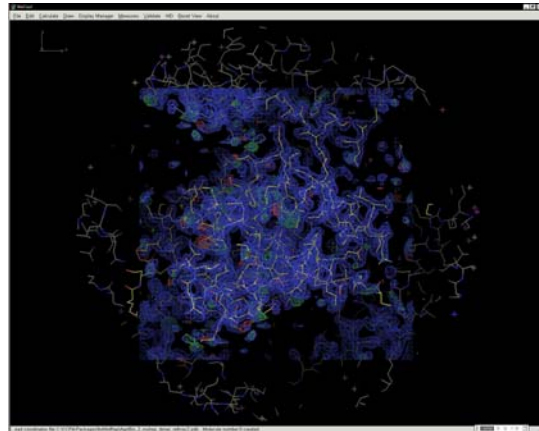
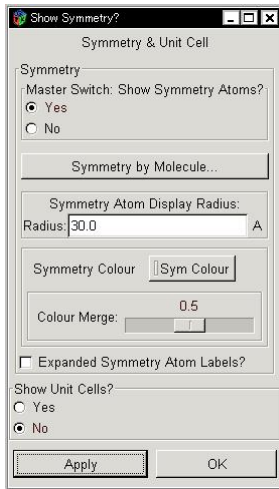


WinCoot: Draw → Cell & Symmetry...

Show Symmetry?: 20.0 Angstrom → OK。

Symmetry/Master Switch: Show Symmetry Atoms? → Yes。

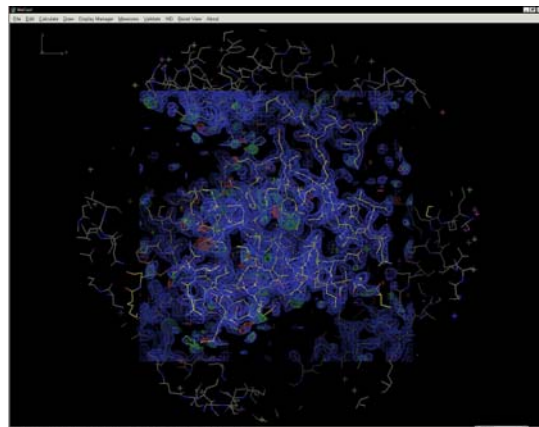
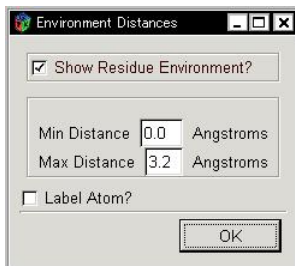
Symmetry Atom Display Radius: 30 Å → OK。



WinCoot: Measures → Environment Distances...

Environment Distances: ■ Show Residue Environment?

■ Label Atom? → OK。

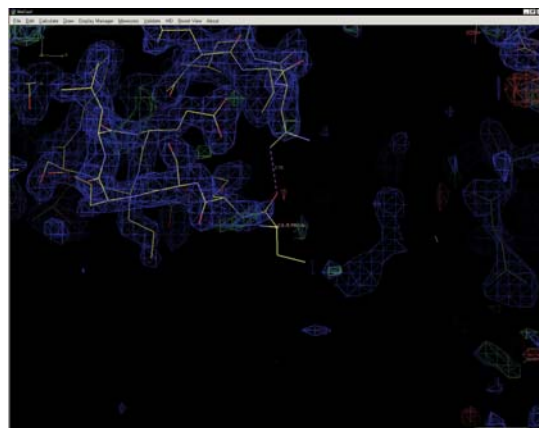
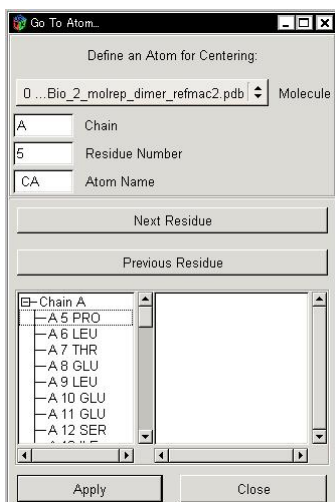


WinCoot: Draw → Go To Atom...

Go To Atom...: +-Chain A → A 5 PRO → Apply → Close。

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。

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。



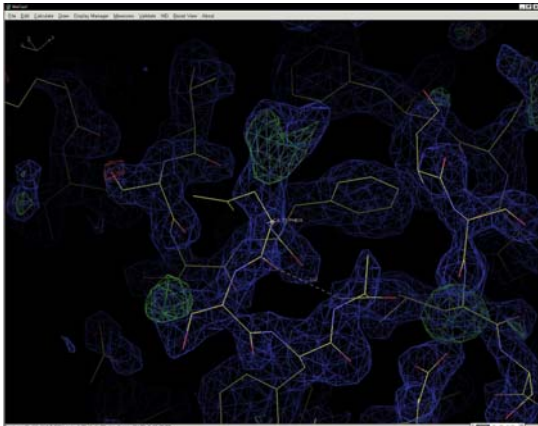
左ドラッグ（上←→下、左←→右）で指定したアミノ酸残基を中心に回転する。

スペースバーを押すと次のアミノ酸残基に移動する。

Shift + スペースバーを押すと前のアミノ酸残基に移動する。

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。

21 PHE/A は、分子モデルの側鎖と電子密度とが合っていない。これを合わせます。

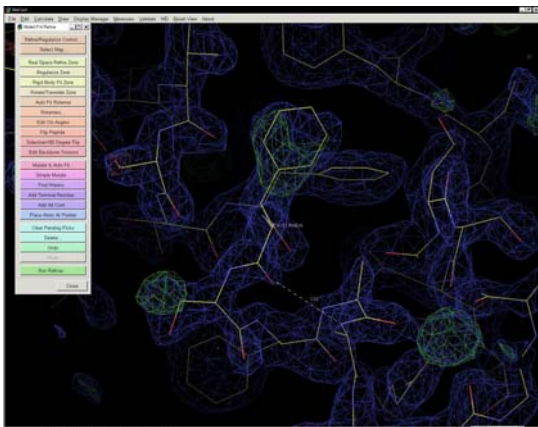


WinCoot: Calculate → Model/Fit/Refine...

Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...

WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。

Resi...: PHE (F)。



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てください。

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。

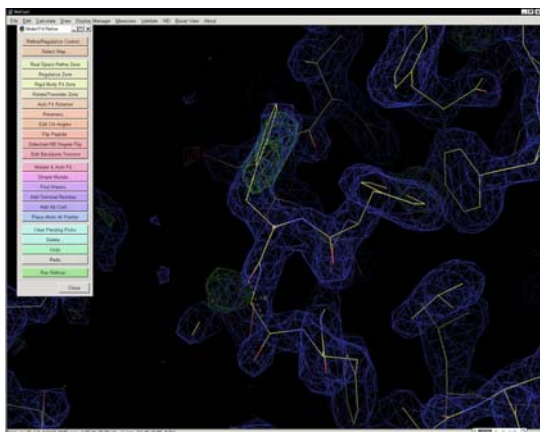


Model/Fit/Refine: Undo を 2 回クリックして、分子モデルの側鎖を元に戻します。

Model/Fit/Refine: Simple Mutate...

WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。

Resi...: PHE (F)。

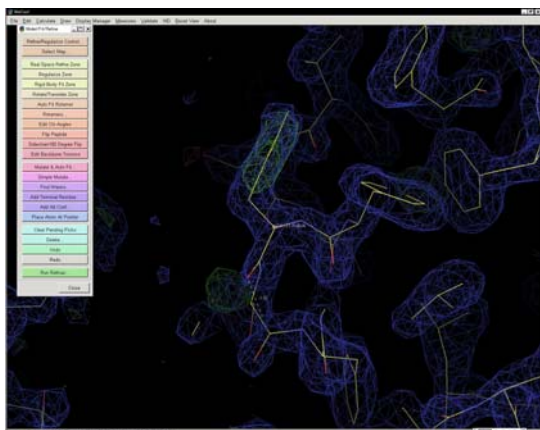


さきほどと違って、分子モデルと電子密度とが微妙にずれています。

Model/Fit/Refine: Real Space Refine Zone。

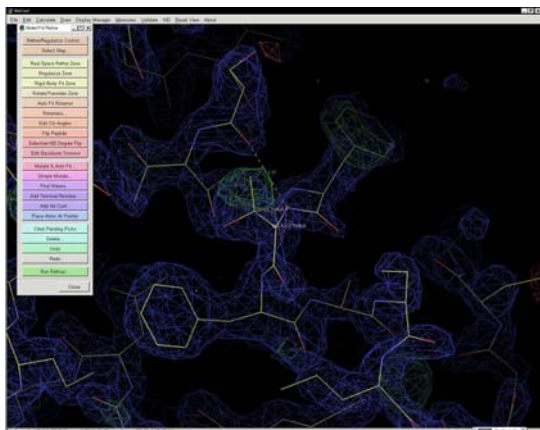
WinCoot: 21 PHE/A の任意の原子をダブルクリック。

Accept Refinement?: Accept。



分子モデルと電子密度とが完全に合いました。

課題 : 22 THR/A の分子モデルの側鎖と電子密度とが合っていません。これを合わせてください。

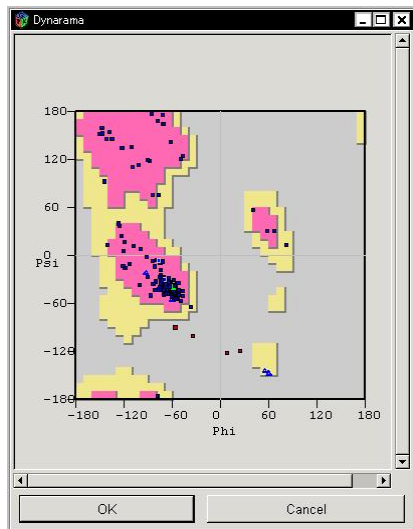


このようにして、N 末端から C 末端まで、すべてのアミノ酸残基の分子モデルと電子密度とを合わせていきます。

その後、WinCoot: Validate の種々のメニューを使って、立体構造を修正します。

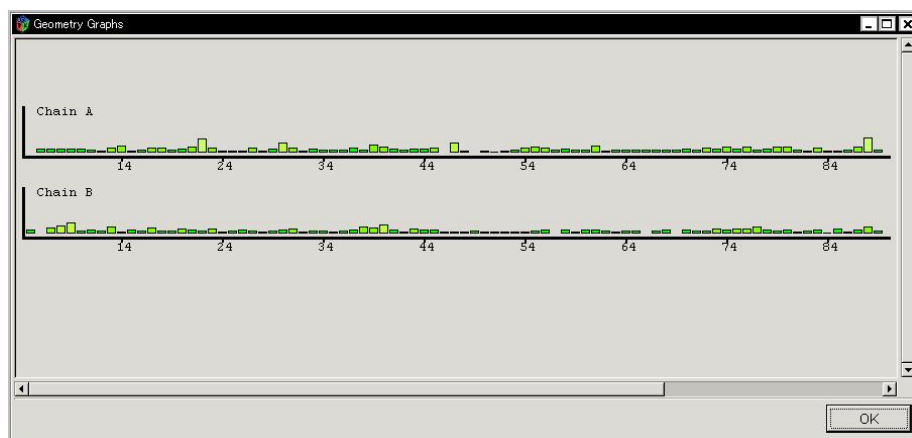
WinCoot: Validate → Ramachandran Plot → \*\*\*\*\*.pdb

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ると、そのアミノ酸残基を表示する。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、修正が難しい。



WinCoot: Validate → Geometry analysis → \*\*\*\*\*.pdb

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。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。



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

WinCoot: File → Save Coordinates...

Save Coordinates Molecule Selector: Save Molecule Number to Save: 0 \*\*\*\*\*.pdb → Select Filename...

Save Filename for Saved Coordinates: Name: デフォルトのまま (\*\*\*\*\*-coot-0.pdb) → Save in folder: CCP4 で指定したフォルダ → OK

修正された分子モデルを使って、Refmac5 により構造精密化すると、R factor および free R の値が以前より小さくなっている (改善されている) はず。この後、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。