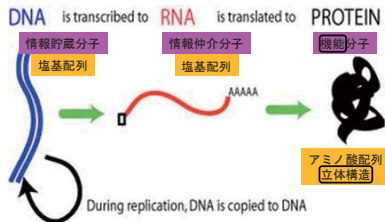


分子生物学のセントラルドグマ
 (1958 イギリスの分子生物学者クリックが提唱)

DNA分子のもつ遺伝情報がRNA分子を介してたんぱく質分子に一方方向に伝えられるという説。

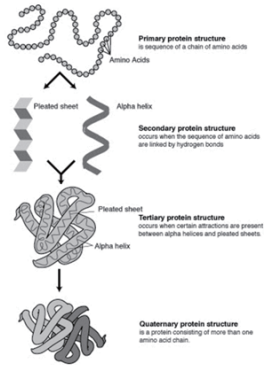


<http://cnx.org/content/m11415/latest/>の図を引用

- 生命維持には特異的分子認識がきわめて重要
 酵素-基質、信号分子-受容体、抗体-抗原
 互いの分子の形や表面の性質を認識している
- 分子の形を知ることが大切
- 平面構造や一次構造(アミノ酸配列)よりも
 立体構造の方が、断然、情報量が多い
- しかし、平面構造や一次構造の情報は
 立体構造解析の基礎になる情報であり必須
 配列から立体構造は予測できる(精度向上中)

タンパク質構造の階層性

タンパク質の構造には4つの階層がある。



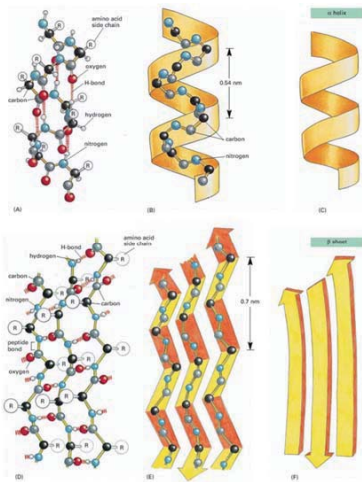
- 一次構造 - ペプチド鎖のアミノ酸配列
 ・共有結合
- 二次構造 - α -ヘリックス、 β -ストランド、 β -シート、ターン
 ・水素結合
- 三次構造 - 単分子の三次元構造
 ・ファンデルワールスカ
 ・水素結合
 ・静電相互作用
 ・疎水相互作用
- 四次構造 - 複数の分子からなる複合体
 ・ファンデルワールスカ
 ・水素結合
 ・静電相互作用
 ・疎水相互作用

一次構造
 (共有結合)

AMINO ACID	Abb.	PROPERTY	AMINO ACID	Abb.	PROPERTY		
Aspartic acid	Asp	D	negative	Alanine	Ala	A	nonpolar
Glutamic acid	Glu	E	negative	Glycine	Gly	G	nonpolar
Arginine	Arg	R	positive	Valine	Val	V	nonpolar
Lysine	Lys	K	positive	Leucine	Leu	L	nonpolar
Histidine	His	H	positive	Isoleucine	Ile	I	nonpolar
Asparagine	Asn	N	uncharged polar	Proline	Pro	P	nonpolar
Glutamine	Gln	Q	uncharged polar	Phenylalanine	Phe	F	nonpolar
Serine	Ser	S	uncharged polar	Methionine	Met	M	nonpolar
Threonine	Thr	T	uncharged polar	Tryptophan	Trp	W	nonpolar
Tyrosine	Tyr	Y	uncharged polar	Cysteine	Cys	C	nonpolar

Legend: POLAR AMINO ACIDS (Asp, Glu, Arg, Lys, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr), NONPOLAR AMINO ACIDS (Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp, Cys).

二次構造
 (水素結合)



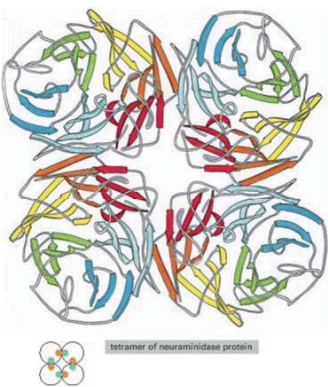
Molecular Biology of the Cellより引用

三次構造
 (ファンデルワールスカ、水素結合、疎水相互作用、静電相互作用、イオン結合)

Molecular Biology of the Cellより引用

四次構造

- ファンデルワールスカ
- 水素結合
- 疎水相互作用
- 静電相互作用 (イオン結合)
- 複数サブユニット



Molecular Biology of the Cellより引用

Anfinsenのドグマ

(タンパク質の立体構造はアミノ酸配列により一義的に決定される)

例外

正常なプリオン PrP^C
 43% α -helix
 3% β -sheet

異常なプリオン PrP^{Sc}
 30% α -helix
 43% β -sheet

神経変性を惹起する
 アミロイド斑形成

・クロイツフェルトヤコブ病
 ・狂牛病

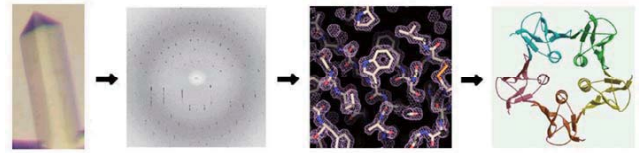
8

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 5-30 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	分子量の上限がない 最高分解能の構造が決められる 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	単結晶が必要 与えられた条件下での構造解析 snapshot像しか得られない	分子量の上限がある

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)



単結晶 X線 回折データ FS 電子密度 モデル構築 分子構造

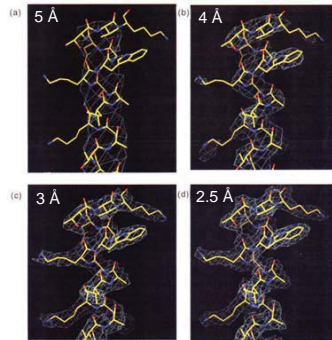
フーリエ合成 (Fourier synthesis)

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp(i\alpha) \exp[-i2\pi(hx + ky + lz)]$$

電子密度 = 構造振幅 位相 × 結晶中の周期構造
= 回折強度の平方根 ↑ 回折斑点の位置。

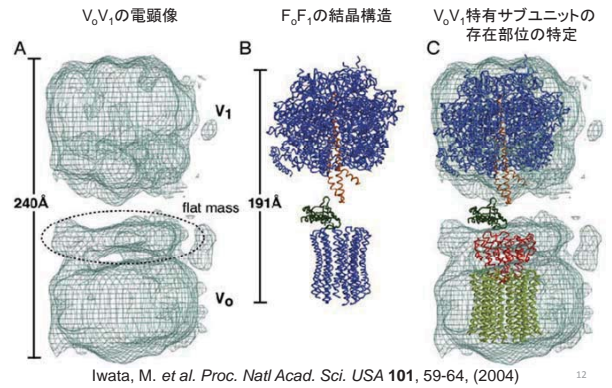
分解能と電子密度の関係

(分解能が高いほど精密な構造解析が可能)



11

低温電子顕微鏡 (cryo EM)



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

12

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
HP: <http://www.ccp4.ac.uk/>
Wiki: http://ccp4wiki.org/~ccp4wiki/wiki/index.php?title=Main_Page

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ソフトウェア。CCP4でもPhenixでも採用されている。
HP (Coot): <http://www.2mc.lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>
HP (WinCoot): <http://www.yssl.york.ac.uk/~lohkamp/coot/wincoot.html>
Wiki: <http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Coot>

14

Phenix: X線結晶構造解析を行うためのプログラムパッケージ。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

15

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)
BioKids Wiki: <http://biokids.org/>
Windowsで行こう: <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcspf/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

16

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 (pp.5-26)
4 (2) Coot で分子モデルを電子密度に合わせてみましょう (pp.27-38)
5 (3) 補足: Protein Data Bank (PDB) からのタンパク質構造情報の入手 (pp.39-43)

6

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

10 1. 背景と目的

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 108,000 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(鑄型)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: http://ccp4wiki.org/~ccp4wiki/wiki/index.php?title=Main_Page

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): <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>33 HP (WinCoot): <http://www.ysbl.york.ac.uk/~lohkamp/coot/wincoot.html>34 Wiki: <http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Coot>

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: <https://www.phenix-online.org/>37 Wiki: http://www.phaser.cimr.cam.ac.uk/index.php/Phaser_Crystallographic_Software

38

39 ④X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)

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. 研究の流れ

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(分子置換法。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

79 3. 本実習の内容

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 X線回折データのフォーマット変換をする。

93 CCP4|Data Reduction and Analysis|Import Integrated Data|Import Merged Data

94 非対称単位中のタンパク質分子数を決定する。

95 CCP4|Molecular Replacement|Analysis|Cell Content Analysis

96 モデルタンパク質 1 分子目の向きと位置を決定する。

97 モデルタンパク質 2 分子目の向きと位置を決定する。

98 CCP4|Molecular Replacement|Model Generation | Run Molrep - auto MR

99 (6) 構造精密化・確認・PDB への登録の仕方の説明

100 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。

101 CCP4|Refinement|Run Refmac5|Do rigid body refinement

102 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)。

103 CCP4|Refinement|Run Refmac5|Do restrained refinement

104 得られた中間構造を目で見確認、手動および自動で補正する(実空間精密化)。

105 Coot|Calculate|Model/Fit/Refine...

106 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。

107 CCP4|Refinement|Run Refmac5|Do restrained refinement

108 Coot|Calculate|Model/Fit/Refine...など

109 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、もし問題があれば修正する。

111 Coot|Validate|Ramachandran Plot など

112 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。

113 <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do#Category-deposit>

114 RCSB PDB | Deposit|Prepare Data

115 RCSB PDB | Deposit|Validate Data

116 RCSB PDB | Deposit|Deposit Data

117 (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。

118

119

120 4. 課題

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 (1) 分子置換法によるタンパク質の立体構造決定

137

138 1. アグリバイオ講義 HP から、圧縮ファイル 150420.zip をデスクトップにダウンロードし、150420.zip のアイコンをダブルクリックして解凍する。□

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

140 デスクトップ上のフォルダ 150420 には、以下の 10 個のファイルが入っている。□

142	s100a13.seq	human S100A13 のアミノ酸配列ファイル (FASTA 形式)
143	s100a13.sca	human S100A13 の X 線回折データファイル (Denzo/HKL2000 フォーマット)
144		
145	s100a13yobi.mtz	human S100A13 の X 線回折データファイル (CCP4 フォーマットに変換したもの)
146		
147	3NXA_A.pdb	human S100A16 の原子座標ファイル
148	1E8A_A.pdb	human S100A12 の原子座標ファイル
149	1E8A_A_molrep1_refmac2yobi.pdb	構造精密化途中の原子座標ファイル
150	1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb	同上 (自動精密化用)
151	1E8A_A_forReference.pdb	構造比較用 S100A12 の原子座標ファイル
152	s100a13_refmac2yobi.mtz	構造精密化途中の X 線回折データファイル
153	PDB ファイルのダウンロードの仕方 doc	Protein Data Bank からタンパク質 構造 (原子座標) 情報を得る方法
154		

155

156 注意: 本日使用するソフトウェア CCP4 や WinCoot は日本語の全角文字 (2 バイト文字) を認識できません。

157 共用 PC のユーザー名は "iu" (半角文字) なので問題ないのですが、私用 PC のユーザー名が全角の方
158 (例: "永田") は、150420 フォルダをデスクトップではなく C ドライブの直下に置いてください。□

159 ○ C:¥Users¥iu¥Desktop¥150420

160 × C:¥Users¥永田¥Desktop¥150420

161 ○ C:¥150420

162

163

164

165

166

167

168 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
169 酸配列の類似したタンパク質を検索する。□

170 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

171

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ⓘ

```
>gi|5174659|ref|NP_005970.1| protein S100-A13 [Homo sapiens]
MAAEPLTELEESIETVVITFFTFARQEGRKDSLVSNEFKELVTQQLPHELLKDVGSLDERMKSLDQVNDSE
LKFNEYWRLIGELAKEIRKKKDLKIRKK
```

Or, upload file ファイルが選択されていません。 ⓘ

Job Title ⓘ
Enter a descriptive title for your BLAST search ⓘ

Align two or more sequences ⓘ

Choose Search Set

Database

Organism Optional
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top

Exclude Optional Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample

Entrez Query Optional
Enter an Entrez query to limit search ⓘ

Program Selection

Algorithm

- blastp (protein-protein BLAST)
- PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)
- PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)
- DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Acc

Choose a BLAST algorithm ⓘ

Search **database Protein Data Bank proteins(pdb)** us ⓘ

Show results in a new window

- 172
- 173 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
- 174 出力される。
- 175 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
- 176 ため)。□
- 177 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
- 178 として用いるには不向きである。ゆえに除外する。□
- 179 結果として、
- 180 11 個目の 3NXA_A (PDB entry: 3NXA の chain A) が最良のモデルと考えられる。
- 181 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。□
- 182 失敗したら、次の候補 1E8A_A をモデルとして用いる。

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Chain A, Crystal Structure Analysis Of Human S100a13 [Homo sapiens]	197	197	100%	7e-66	100%	2H2K_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized Mean Structure) [Homo sapiens]	196	196	100%	2e-65	100%	1YUR_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Calcium-s100a13 (minimized Mean Structure) [Homo sapiens]	195	195	98%	5e-65	100%	1YUT_A
<input type="checkbox"/>	Chain C, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Component In Non-Classic Way Of Fgf1 [Homo sap]	194	194	100%	7e-65	99%	2K14_C
<input type="checkbox"/>	Chain B, Ragec2-S100a13 Tetrameric Complex [Homo sapiens]	194	194	98%	1e-64	100%	2LE9_B
<input type="checkbox"/>	Chain B, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized Mean Structure) [Homo sapiens]	194	194	98%	1e-64	100%	1YUR_B
<input type="checkbox"/>	Chain B, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Component In Non-Classic Way Of Fgf1 [Homo sap]	193	193	97%	3e-64	100%	2K14_B
<input type="checkbox"/>	Chain A, 3d Solution Structure Of S100a13 [Mus musculus]	167	167	100%	3e-54	83%	2CXJ_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure And Dynamics Of Human S100a14 [Homo sapiens]	75.5	75.5	93%	3e-18	38%	2M0R_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Apo S100a16 [Homo sapiens]	60.1	60.1	88%	2e-12	32%	2L50_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, X-Ray Structure Of The Apo Form Of Human S100a16 [Homo sapiens]	59.7	59.7	87%	3e-12	32%	3NXA_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Rabbit Apo-S100a11 (19 Models) [Oryctolagus cuniculus]	57.8	57.8	79%	1e-11	40%	1NSH_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Human S100 Calcium-binding Protein A11 [Homo sapiens]	57.8	57.8	79%	1e-11	40%	2LUC_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Calcium-bound Human S100a12 [Homo sapiens]	56.6	56.6	77%	3e-11	34%	2M9G_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, The Three-Dimensional Structure Of Human S100a12 [Homo sapiens]	55.8	55.8	76%	6e-11	35%	1E8A_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, The Crystal Structure Of Human S100a12 - Copper Complex [Homo sapiens]	55.5	55.5	76%	7e-11	35%	1ODB_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Post-Translational S-Nitrosylation Is An Endogenous Factor Fine-Tuning Human S100a1 Pr	55.1	55.1	78%	1e-10	41%	2LLU_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Human Apo-S100a1 Protein By Nmr Spectroscopy [Homo sapiens]	55.1	55.1	78%	1e-10	41%	2L0P_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Post-Translational S-Nitrosylation Is An Endogenous Factor Fine-Tuning Human S100a1 Pr	54.7	54.7	78%	1e-10	41%	2LLT_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure Of Human Apo-S100a1 C85m [Homo sapiens]	54.7	54.7	78%	1e-10	41%	2LLS_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Solution Structure And Dynamics Of S100a5 In The Apo And Ca2+ -Bound States [Homo sa	54.3	54.3	79%	2e-10	41%	2KAX_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Chemical Shift Assignments And Solution Structure Of Human Apo-S100a1 E32q Mutant [H	53.9	53.9	78%	3e-10	40%	2LHL_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Ca-bound Truncated (delta13c) And C3s, C81s And C86s Mutated S100a4 Complexed Wit	53.9	53.9	79%	3e-10	35%	4CFQ_A
<input type="checkbox"/>	Chain A, Calcium-Free (Apo) S100a12 [Homo sapiens]	53.5	53.5	76%	4e-10	33%	2WCE_A

183

184 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。

185

例: 1xk4_C.pdb。□

186

ATOM 1434 N LYS C 4 9.892 70.055 167.750 1.00 50.82 N

187

ATOM 1435 CA LYS C 4 9.141 68.965 168.427 1.00 49.76 C

188

ATOM 1436 C LYS C 4 9.606 67.576 167.983 1.00 46.94 C

189

(途中省略)

190

ATOM 2176 CD GLU C 92 33.783 49.554 166.930 1.00 44.92 C

191

ATOM 2177 OE1 GLU C 92 34.739 48.784 167.199 1.00 45.60 0

192

ATOM 2178 OE2 GLU C 92 33.105 50.143 167.813 1.00 45.73 0

193

194

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 HAREPLTELEESLETYVYTFFTFARQGRKDSLVNFKELYTQQLPHLLKDVGS---LDEKHKSLDYNQDSELKFNHYRILIGELAKEIRKKKDLKTRKK
1XK4:C  TSKHSQLERNIETILINTFAQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLLKENKNEKVIIEHIMEDLDTNADKQLSFEFFIALMARLTHASHEKHEGDEGPGHHKPGLEGPTP
1XK4:A  HLTELEKALNSIIDYVHKYSLIKGNFHVYRDDLLKLETESPQYIRKKGK---DYVFKELDINTDGAIVNQEFLILVIKNGVARHKKSHEESHKE
Consensus .....$t#LE..i#t!!.t%h.%s...d..1...#fKeLv..#lp..lkk.g.....#.nk.LD.N.D..l.F#E%.L..$.a.hkk.he...k.....

```

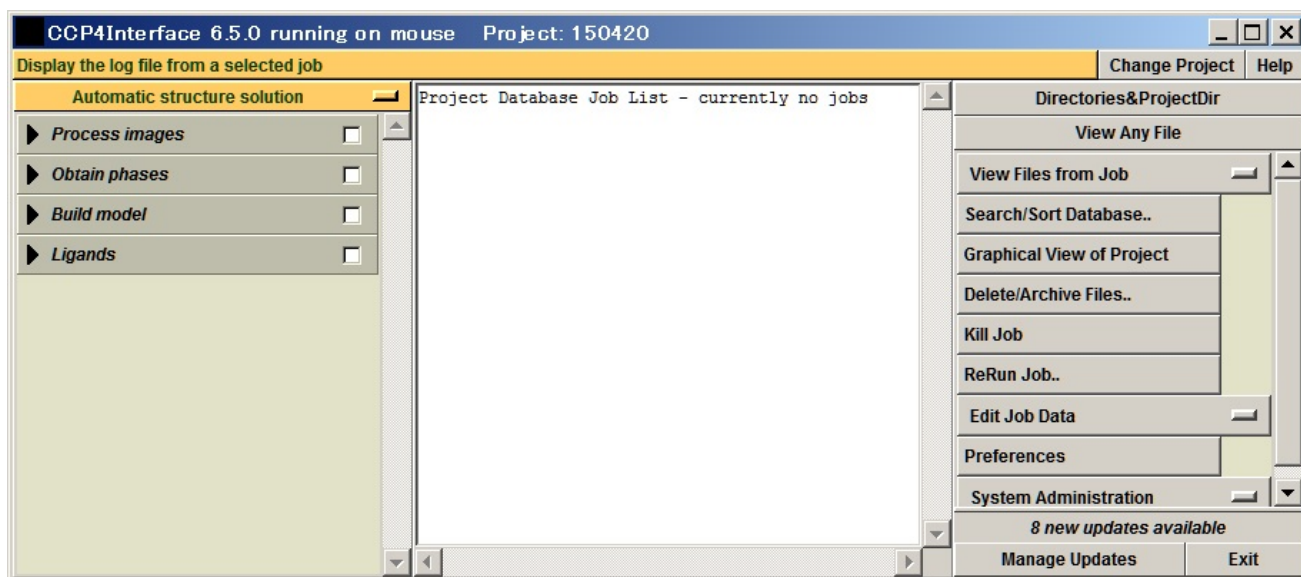
195

196

197

198 3. CCP4 を用いて、分子置換を行う。

199 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。□



200

201

202

203

204 4. 作業ファイルを扱うディレクトリを設定する。

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

206 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。□

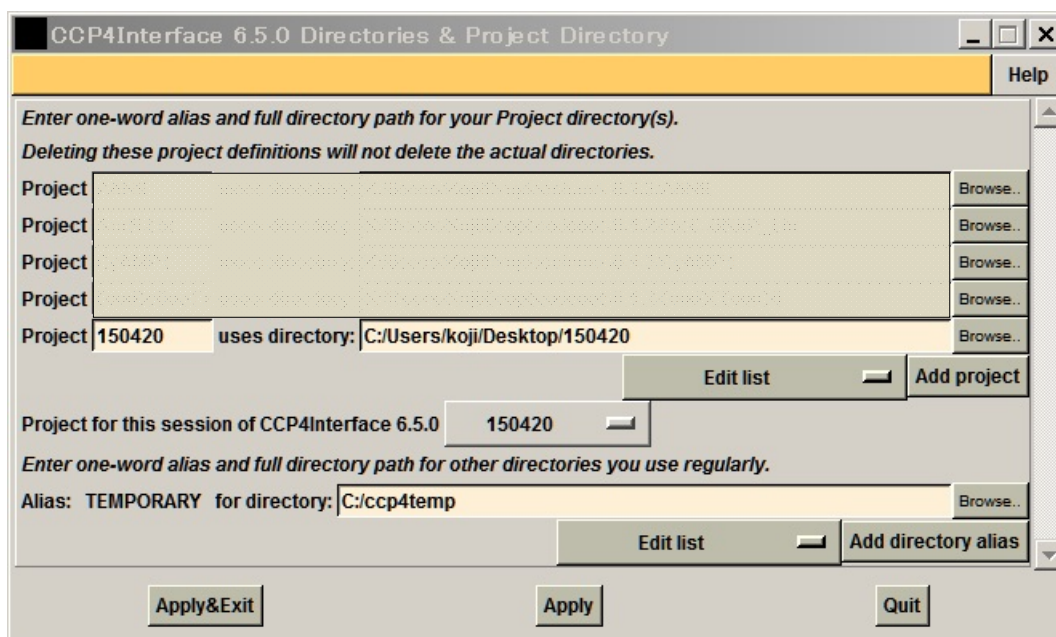
207 Project: 150420 uses directory: C:/Users/iu/Desktop/150420/

208 ただし、150420 フォルダを C ドライブ直下に置いた方は

209 Project: 150420 uses directory: C:/150420/

210 次に、Project for this session of CCP4Interface 6.x.x として 150420 を選択する。□

211 その後、Apply&Exit ボタンを押す。□



212

213

214

- 215 5. X線回折データのフォーマット変換(Denzo/HKL2000 → CCP4)を行う。
 216 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。□

217
 218

Automatic Structure Solution	Data Reduction and Analysis	Experimental Phasing
▶ <i>Process images</i> <input type="checkbox"/>	▶ <i>Data Processing using Mosflm</i> <input type="checkbox"/>	▶ <i>Data Preparation</i> <input type="checkbox"/>
▶ <i>Obtain phases</i> <input type="checkbox"/>	▶ <i>Import Integrated Data</i> <input type="checkbox"/>	▶ <i>Automated Search & Phasing</i> <input type="checkbox"/>
▶ <i>Build model</i> <input type="checkbox"/>	Xia2 - automatic dataprocessing	▶ <i>Heavy Atom Location</i> <input type="checkbox"/>
▶ <i>Ligands</i> <input type="checkbox"/>	Find or Match Laue Group	▶ <i>Phasing & Refinement</i> <input type="checkbox"/>
	Scale and Merge Intensities	▶ <i>Visualisation</i> <input type="checkbox"/>
	Symmetry, Scale, Merge (Aimless)	▶ <i>Utilities</i> <input type="checkbox"/>
	Find Symmetry, Scale & Merge (Scala)	
	Multiple dataset analysis (Blend)	
	▶ <i>Utilities</i> <input type="checkbox"/>	
	▶ <i>Check Data Quality</i> <input type="checkbox"/>	

219
 220

Molecular Replacement	Density Improvement	Model Building
▶ <i>Analysis</i> <input type="checkbox"/>	Cell Content Analysis	Buccaneer - autobuild/refine
▶ <i>Model Generation</i> <input type="checkbox"/>	Find NCS from Heavy Atoms	SLoop - loop building
Phaser MR	Real Space Correlation Search	Nautilus - autobuild/refine
Run Molrep - auto MR	Parrot - density modification	Rapper - conformer modelling
Run MrBUMP	Run DM	Sequins - sequence validation
Run Balbes	Run Solomon	FFFear - Fragment Searching
Run AMPLE	Run DmMulti	FFJoin - Merge fragments
▶ <i>AMoRe Suite</i> <input type="checkbox"/>	Run Pirate	XtalView/xfit
▶ <i>Utilities</i> <input type="checkbox"/>	▶ <i>Utilities</i> <input type="checkbox"/>	ARP Navigator
Phaser Single Atom MR		ARP/wARP Classic
		ARP/wARP Quick Fold
		ARP/wARP Loops
		ARP/wARP DNA/RNA

221
 222

Refinement	Structure Analysis	Validation & Deposition
▶ <i>Model Preparation</i> <input type="checkbox"/>	Accessible Surface Areas	Validate model and/or data
▶ <i>Restraint Preparation</i> <input type="checkbox"/>	Analyse Molecular Contacts	Validate space group
Run Refmac5	▶ <i>Analyse Protein Interfaces (PISA)</i> <input type="checkbox"/>	Run Whatcheck
Run NCS Phased Refinement	Temperature Factor Analysis	Run Rotamer
▶ <i>Model Completion & Analysis</i> <input type="checkbox"/>	Run ProSMART	SFs for Deposition
	DSSP	Data Harvesting Manager
	Predictor of Lysine Carboxylation	Run R500 on PDB

223
 224
 225

226

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 <input type="checkbox"/>	Convert FoM to/from HL	

227

228

Graphics and Viewing Utilities

Program List

AstexViewer	Acorn
CCP4 Molecular Graphics	Aimless
Cool - Model Building	AMoRe
idiffdisp	AMPLE
Loggraph	Anisoanl
MapSlicer	ArealMol
RasMol	ARP Navigator
TopDraw	ARP/wARP Classic
ARP Navigator	ARP/wARP DNA/RNA
	ARP/wARP Ligands
	ARP/wARP Loops
	ARP/wARP Quick Fold
	ARP/wARP Solvent
	AstexViewer

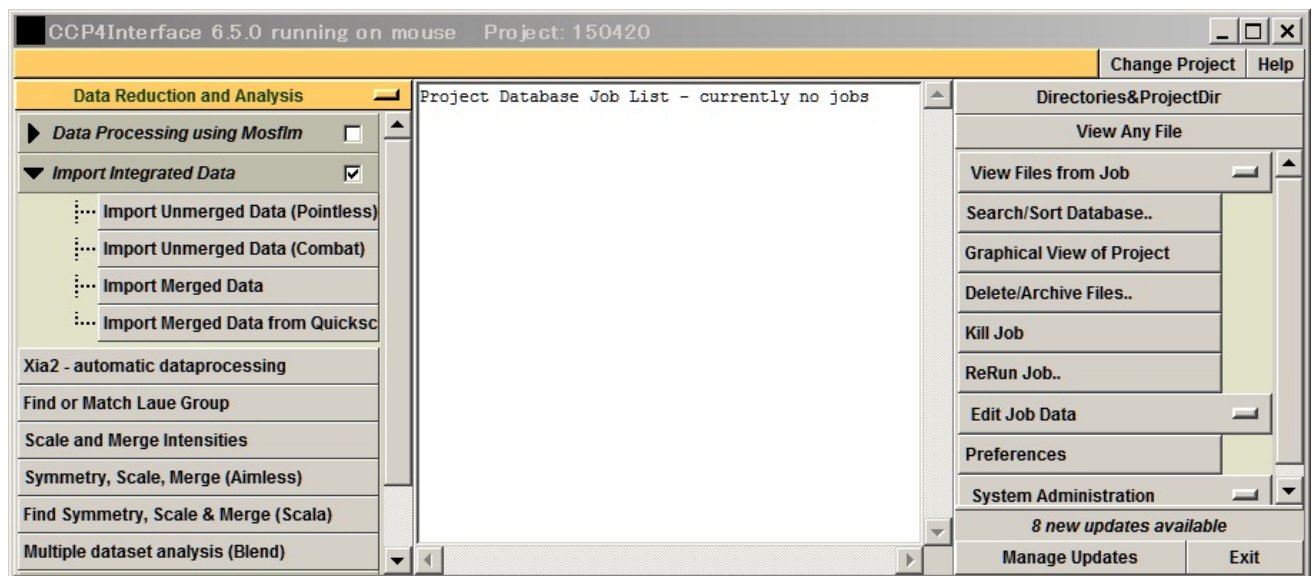
229

230

231

232

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。□



233

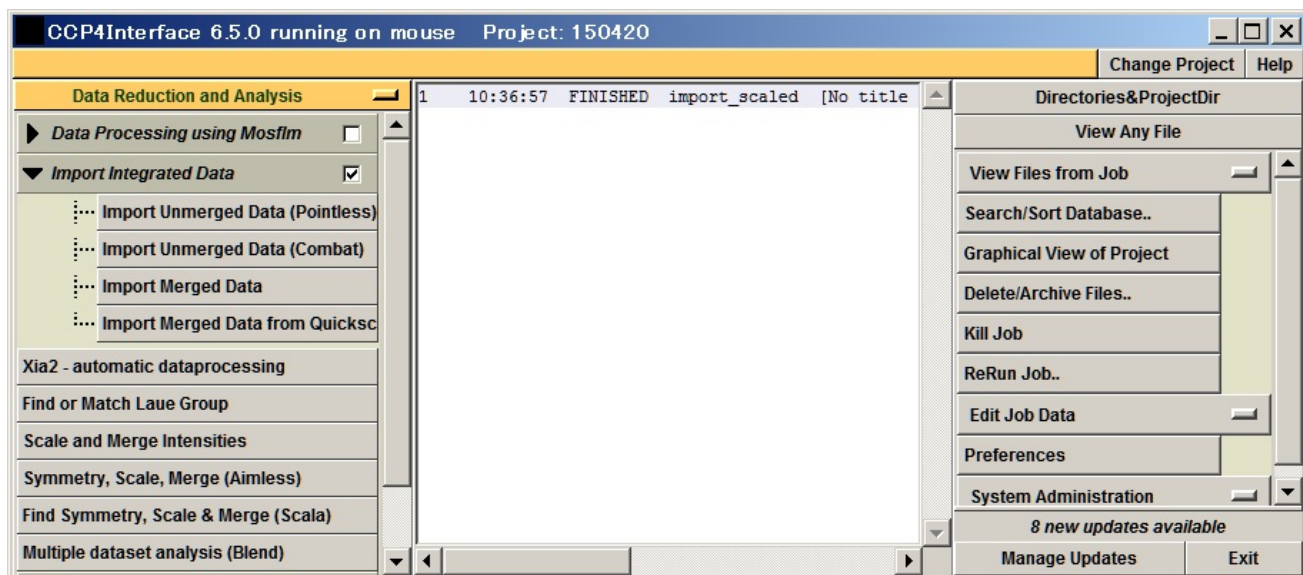
234

235

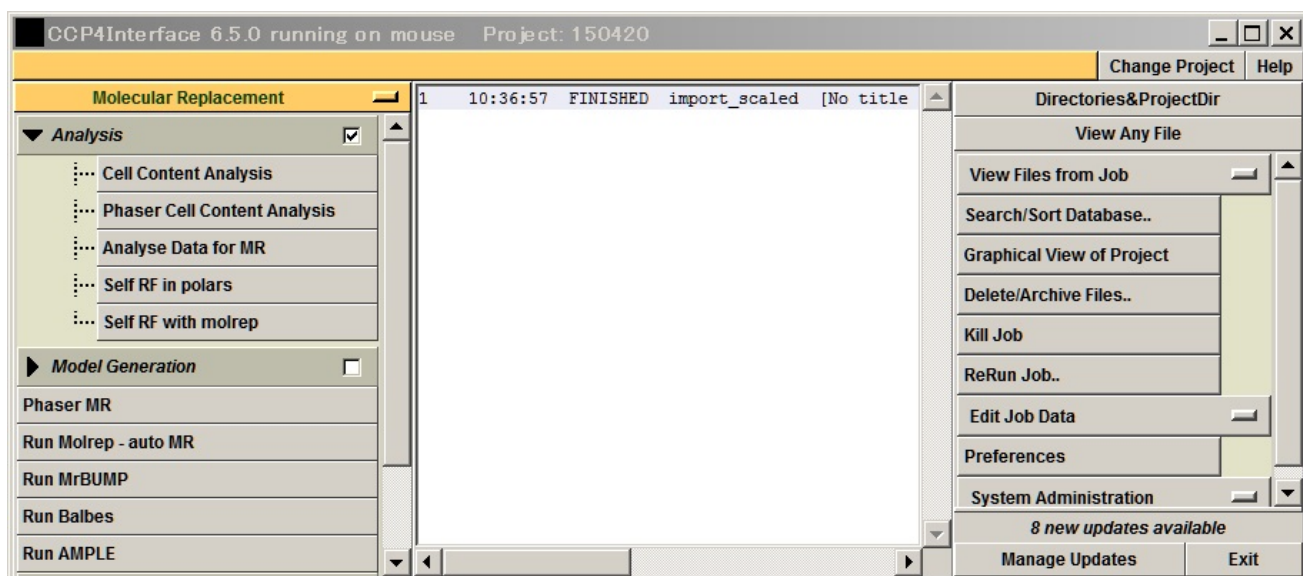
- 236 以下のようにチェックする。□
- 237 □ Use anomalous data(異常分散データでないので、チェックをはずす)
- 238 ■ Run Ctruncate to convert intensities to structure factors
- 239 ■ Keep the input intensities in the output MTZ file
- 240 ■ Ensure unique data & add FreeR column for 0.05 fraction of data.
- 241 □ Copy FreeR from another MTZ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

- 243
- 244 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。□
- 245 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)。
- 246 In 130418: s100a13.sca
- 247 Out 130418: s100a13.mtz
- 248 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。
- 249
- 250 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
- 251 (Angstrom)と入力するが、勝手に 1.0 に変換される。□
- 252 Data collected at wavelength: 1.0 Angstroms
- 253 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、
- 254 Estimated number of residues in the asymmetric unit:
- 255 は空欄のままにしておく。□

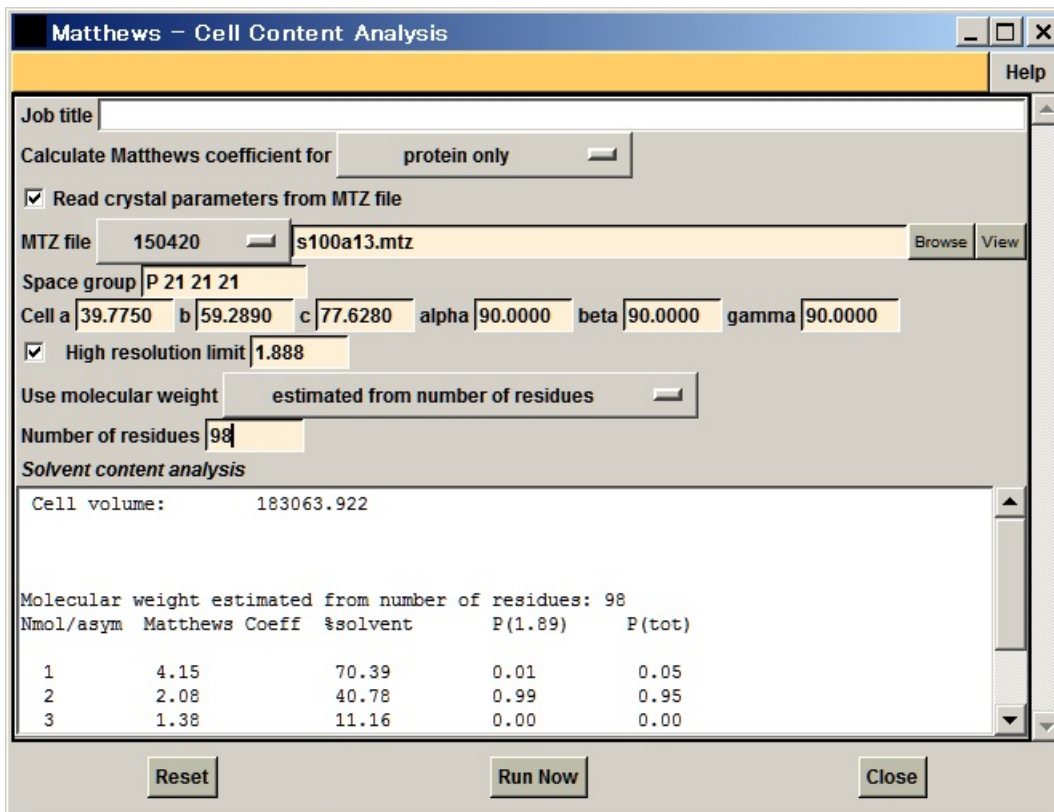
256 Run→ Run Now ボタンを押して、フォーマット変換を実行すると、ファイル s100a13.mtz が作成される。□
 257 CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に”import_scaled”というジョブが完了した(FINISHED)
 258 ことが表示される。□



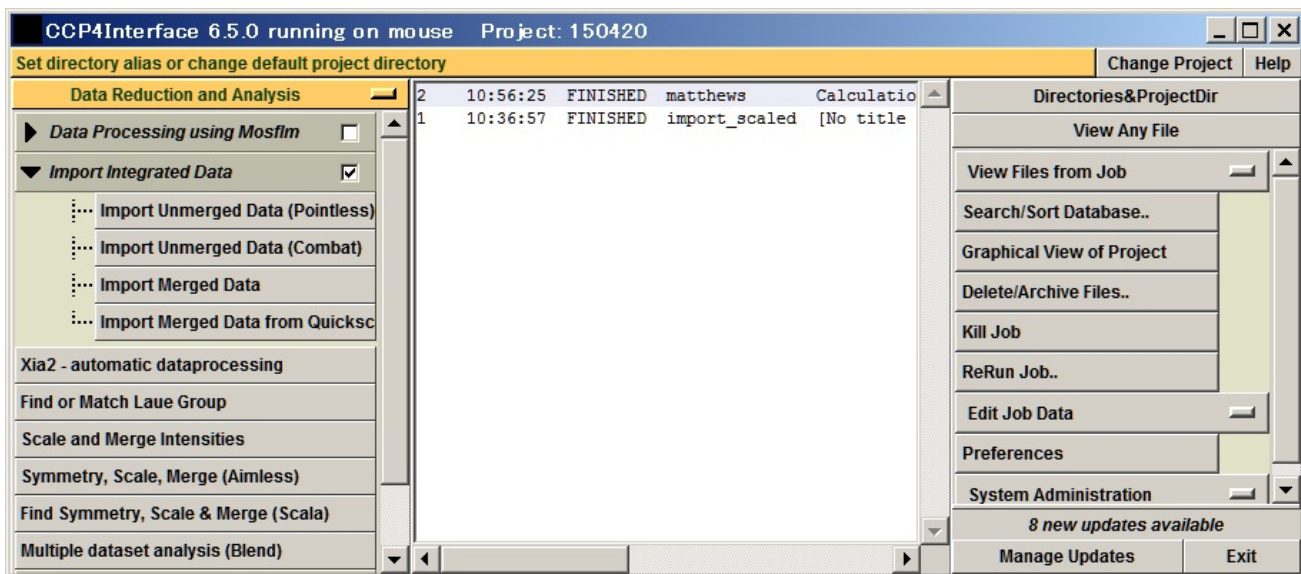
259
 260
 261 6. 分子置換法の準備として、非対称単位中の S100A13 分子数を見積もる。
 262 (非対称単位 = 結晶中に現れる繰り返し構造の 1 つを取り出したもの。実際の結晶
 263 中ではこの構造がある法則(対称性)にそって前後左右上下に繰り返されている)
 264 左側の作業メニューから、Molecular Replacement → Analysis → Cell Content Analysis を選択すると
 265 Matthews のウィンドウが開く。□



266
 267 MTZ file として、s100a13.mtz を選択する。□
 268 Use molecular weight: estimated from number of residues にして
 269 Number of residues: 98 と入力する。□
 270 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
 271 率、確率(2 通り)が表示される。□

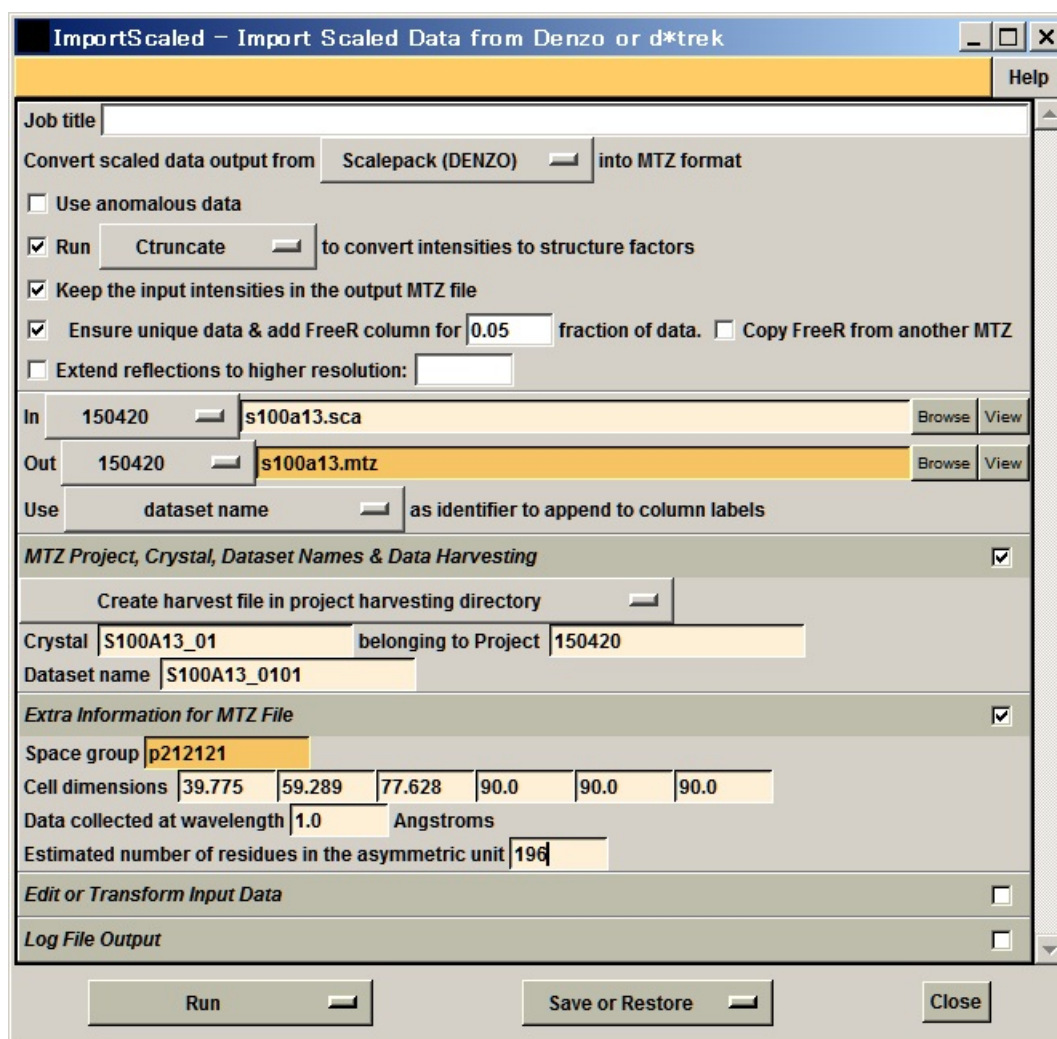


272
 273 この場合、非対称単位中 S100A13 が 2 分子含まれると確定した。□
 274 CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"matthews"という 2 個目のジョブが完了した
 275 (FINISHED)ことが表示される。□

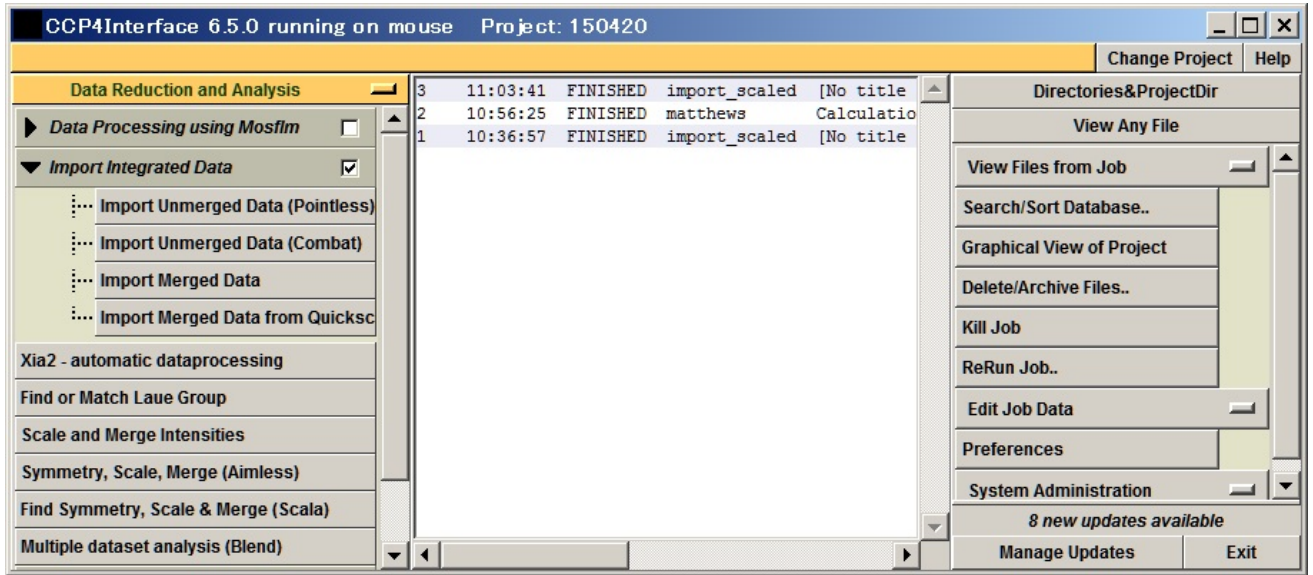


276
 277
 278

- 279 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。
- 280 左側の作業メニューから Data Reduction and Analysis → Import Integrated Data → Import Merged
- 281 Data を選択すると ImportScaled のウィンドウが開く。□
- 282 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
- 283 196 と入力する。□
- 284 その後、Run → 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
- 285 が出るが、Continue ボタンを押して、上書きする。□
- 286 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
- 287 (s100a13.mtz) への書式変換が完了した。□



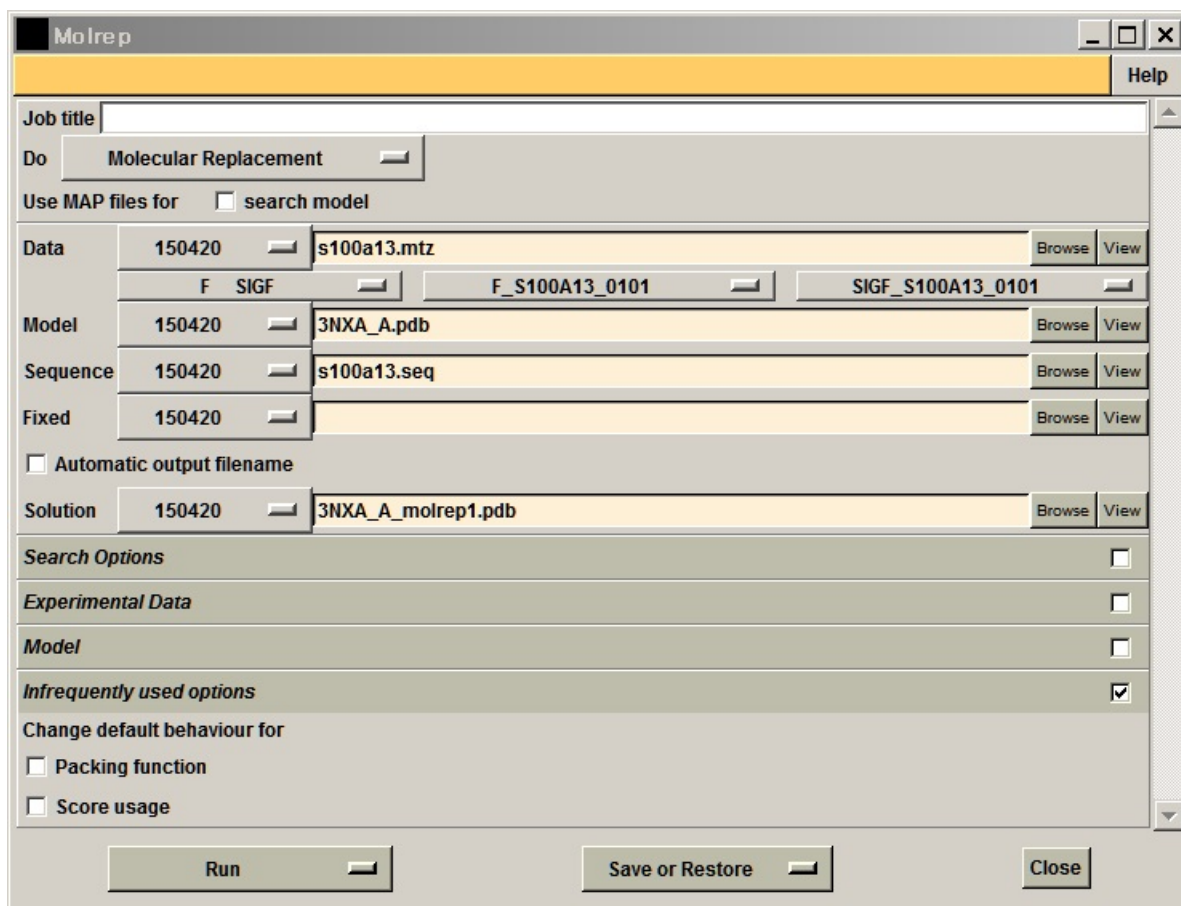
- 288
- 289 CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"import_scaled"という 3 個目のジョブが完了した
- 290 (FINISHED)ことが表示される。□



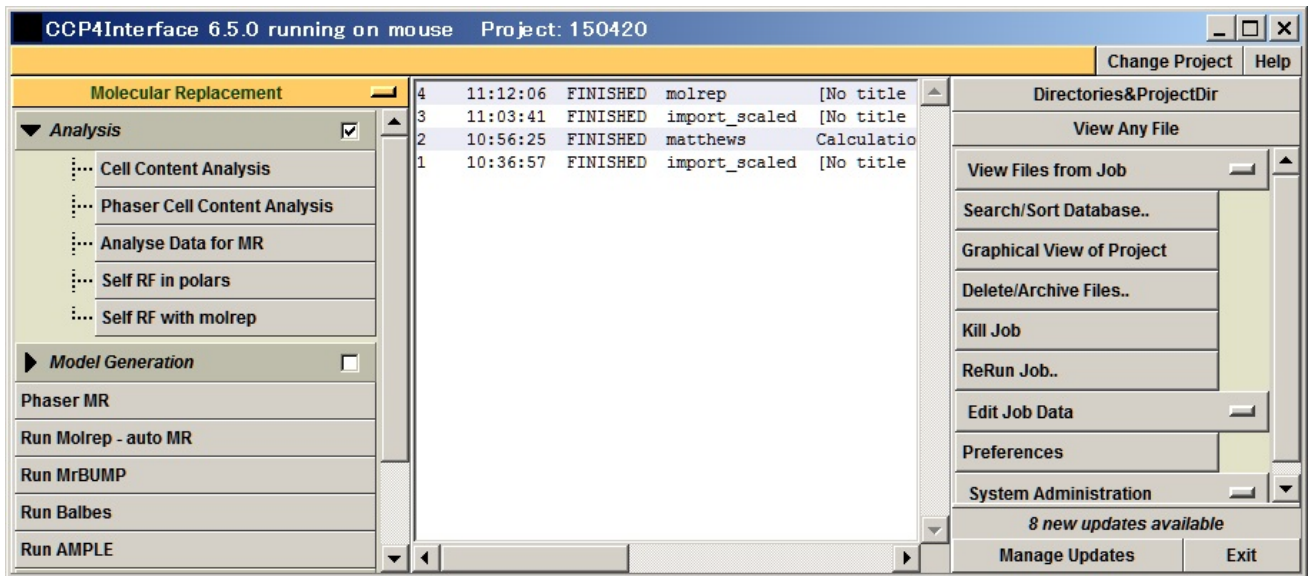
291

292

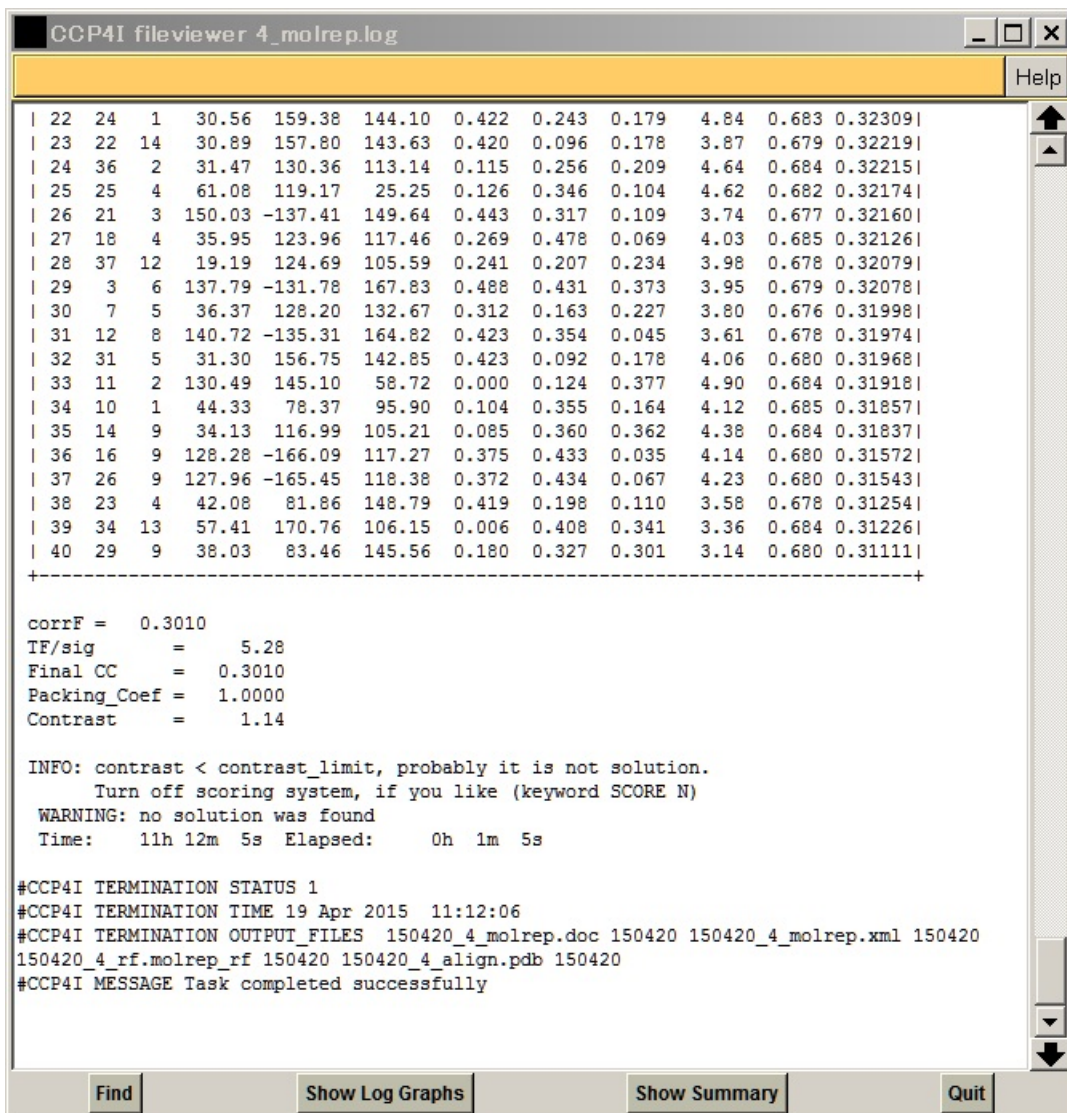
- 293 8. Molrep を用いて分子置換を実行する。
- 294 作業メニューから Molecular Replacement → Model Generation → Run Molrep - auto MR を選択すると、
- 295 Molrep のウィンドウが開く。□
- 296 以下のように設定する。□
- 297 Do: Molecular Replacement
- 298 Use MAP files for search model (チェックしない)
- 299 入力ファイルは以下の 3 つ。□
- 300 Data: 150420: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)
- 301 Model: 150420: 3NXA_A.pdb (立体構造既知配列類似タンパク質 S100A16
- 302 単量体(chain A)の原子座標ファイル)
- 303 Sequence: 130418: s100a13.seq (S100A13 のアミノ酸配列。FASTA フォーマット)
- 304 出力ファイル名は自動で設定される。
- 305 Solution: 150420: 3NXA_A_molrep1.pdb
- 306 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



- 307
- 308 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
- 309 ジョブが完了した (FINISHED) ことが表示される。□

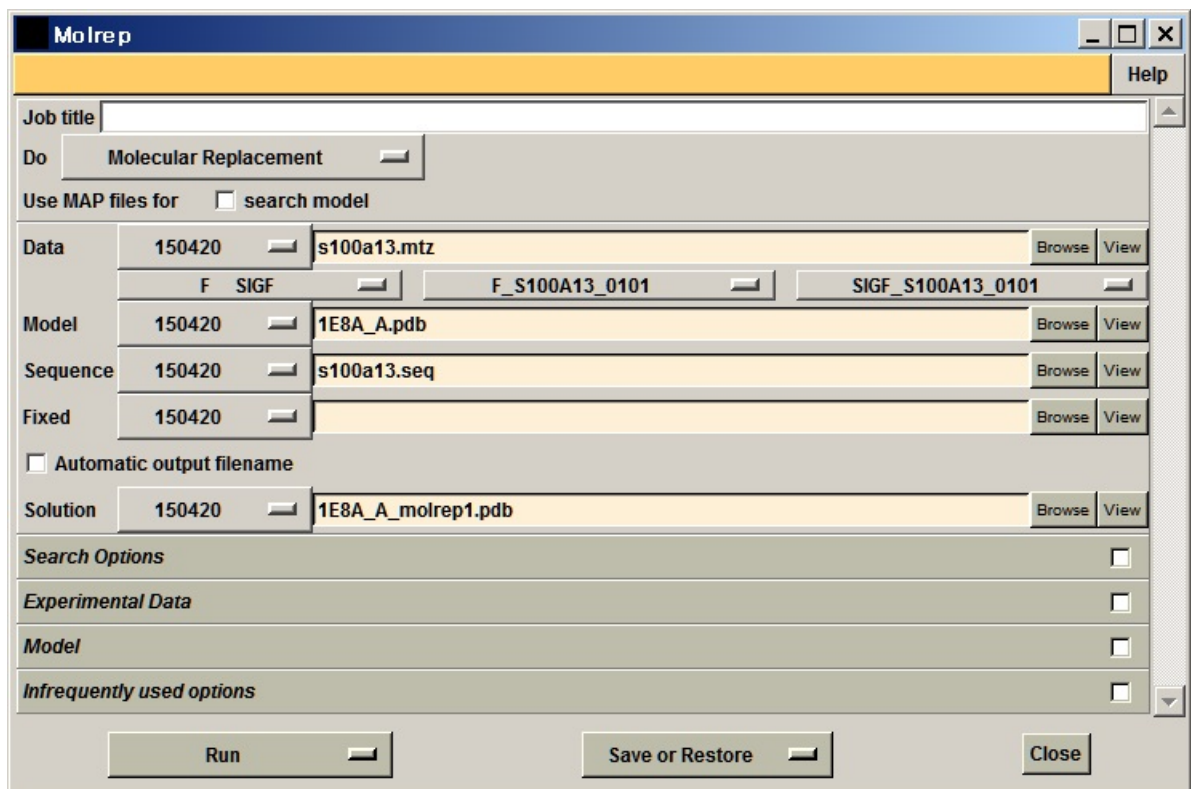


310
 311 CCP4Interface の中央の作業ログで、molrep の行を選択した後、右側の View Files from Job ボタンをクリ
 312 ックし、プルダウンメニューの View Job Result (new style) または View Log File (old style) をクリックすると
 313 計算の過程を追うことができる。□

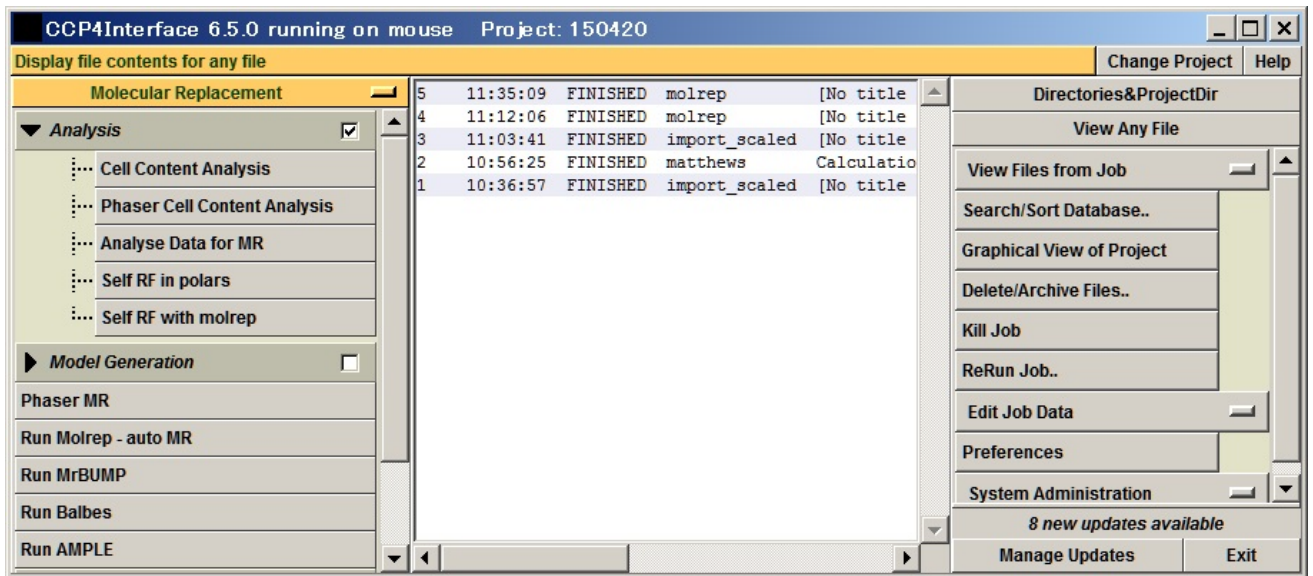


314
 315 ログファイル最終行近くにある解 Summary の wRfac と Scor の値に注目すると、良い解がないことがわか
 316 る。□

317 実際に、"contrast < contrast_limit, probably it is not solution"というメッセージが出ていることを確認する。
 318 □
 319
 320 3NXA_A は分子置換のための良い鑄型ではなかったと割り切って、次の鑄型を使って、分子置換を試みる。
 321 □
 322 先に行った Blast 検索の結果、次に鑄型の候補となるものは、1E8A_A (PDB entry: 1E8A の chain A。タン
 323 パク質名、human S100A12)
 324
 325 9. 再度、Molrep を用いて分子置換を実行する。
 326 作業メニューから Molecular Replacement → Model Generation → Run Molrep - auto MR を選択すると、
 327 Molrep のウィンドウが開く。□
 328 以下のように設定する。前回と比較して、Model が 3NXA_A.pdb から 1E8A_A.pdb に変わっただけ。□
 329 Do: Molecular Replacement
 330 Use MAP files for search model (チェックしない)
 331 入力ファイルは以下の 3 つ。□
 332 Data: 150420: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)
 333 Model: 150420: 1E8A_A.pdb (立体構造既知配列類似タンパク質 S100A16
 334 単量体 (chain A) の原子座標ファイル)
 335 Sequence: 130418: s100a13.seq (S100A13 のアミノ酸配列。FASTA フォーマット)
 336 出力ファイル名は自動で設定される。
 337 Solution: 150420: 1E8A_A.pdb_molrep1.pdb
 338 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



339
 340 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 5 個目の
 341 ジョブが完了した (FINISHED) ことが表示される。□



342
 343 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
 344 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
 345 計算の過程を追うことができる。□

346
 347 非対称単位中に S100A13 分子を 1 個置いたときの解。wRfac、Score の値に注目すると、上位 2 個の値
 348 が良い。□

349
 350 --- Summary (V0) ---

	RF	TF	theta	phi	chi	tx	ty	tz	TF/sg	wRfac	Score
351	1	10	46.73	-157.90	65.12	0.090	0.263	0.356	6.96	0.651	0.38645
352	2	1	158.75	166.63	124.18	0.294	0.374	0.421	6.52	0.651	0.38487
353	3	6	132.64	170.78	87.59	0.097	0.148	0.295	4.16	0.665	0.35717
354	4	4	95.80	-157.24	74.48	0.309	0.305	0.134	3.70	0.666	0.35400
355	5	8	90.50	165.65	87.92	0.083	0.243	0.072	3.50	0.665	0.35224
356	6	14	132.66	-80.40	148.13	0.308	0.226	0.231	4.18	0.666	0.35205
357	7	5	58.71	140.03	50.06	0.324	0.275	0.239	3.51	0.665	0.35172
358	8	35	80.83	166.81	85.76	0.417	0.350	0.470	4.37	0.668	0.35126
359	9	16	134.10	-89.72	159.91	0.160	0.203	0.299	4.09	0.664	0.34916
360	10	22	159.79	-131.76	84.31	0.120	0.244	0.190	3.95	0.669	0.34865

361
 362
 363
 364
 365
 366 corrF = 0.3905
 367 TF/sig = 6.96
 368 Final CC = 0.3905
 369 Packing_Coef = 1.0000
 370 Contrast = 3.43

371

Nmon	RF	TF	theta	phi	chi	tx	ty	tz	TF/sg	wRfac	Score
372	1	10	68.46	66.36	163.04	-0.090	-0.237	0.144	6.96	0.648	0.391

373
 374
 375 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。wRfac、
 376 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、これを採用する。□

377
 378 Number of monomers in fixed model_2 : 1

379
 380
 381 --- Summary (V0) ---

```

382 +-----+
383 |      RF  TF  theta  phi  chi  tx  ty  tz  TF/sg  wRfac  Score |
384 +-----+
385 |  1   1   1  158.75  166.63  124.18  0.797  0.374  0.921  11.11  0.611  0.47930|
386 |  2  16   1  134.10  -89.72  159.91  0.104  0.818  0.528   4.99  0.649  0.39527|
387 |  3   8   1   90.50  165.65   87.92  0.896  0.320  0.973   4.51  0.652  0.39061|
388 |  4   4   1   95.80 -157.24   74.48  0.286  0.915  0.573   4.28  0.651  0.38816|
389 |  5  35   3   80.83  166.81   85.76  0.928  0.347  0.950   3.71  0.655  0.38764|
390 |  6   5   6   58.71  140.03   50.06  0.009  0.959  0.685   3.49  0.648  0.38434|
391 |  7  22   4  159.79 -131.76   84.31  0.519  0.555  0.406   3.53  0.652  0.38366|
392 |  8  23  13   29.59 -170.04  150.41  0.112  0.429  0.990   3.41  0.654  0.38086|
393 |  9  33  12   89.56  149.27   77.88  0.666  0.360  0.049   3.70  0.655  0.38010|
394 | 10  14  11  132.66  -80.40  148.13  0.568  0.048  0.322   2.94  0.656  0.37642|
395 +-----+

```

```

396
397 corrF      =  0.4832
398 TF/sig     =  11.11
399 Final CC   =  0.4832
400 Packing_Coef =  1.0000
401 Contrast   =   6.40
402 CC_for_fixed_model:  0.3905
403

```

```

404      Nmon RF  TF  theta  phi  chi  tx  ty  tz  TF/sg  wRfac  Score
405      2   1   1   34.38 -103.37  69.11 -0.297 -0.374  0.421  11.11  0.841  0.483
406

```

407 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、Score 値が上がる。□

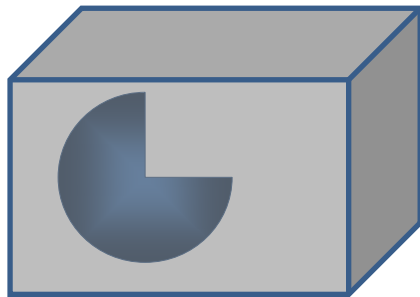
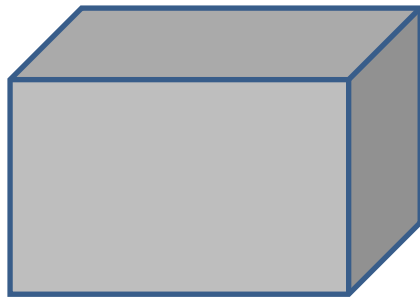
408 このように Molrep を用いる分子置換法により、非対称単位中に S100A13 分子を 2 個置くことができた。□

409 結晶の最小構成単位の箱の中に 2 個のタンパク質分子を置く位置と向きを検討した結果、回折データと割
410 とよく合う位置と向きが見つかった、と理解してください。□

411

412

413



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($\theta_1, \varphi_1, \chi_1$)を決める。

次に位置(tx_1, ty_1, tz_1)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($\theta_2, \varphi_2, \chi_2$)を決める。

次に位置(tx_2, ty_2, tz_2)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。

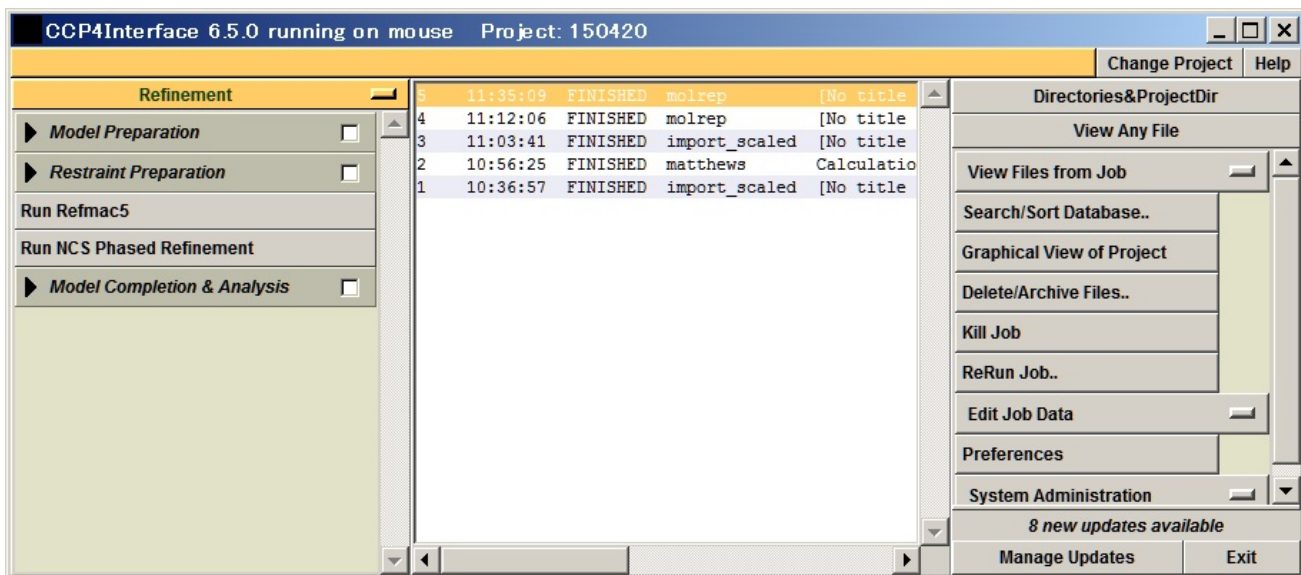
剛体精密化で分子全体の角度と位置を補正。

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。

- 414 10. 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。
 415 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。□



416
 417 以下のように設定する。□

418 Do: rigid body refinement using: no prior phase information

419 □ Input fixed TLS parameters

420 no twin refinement

421 入力ファイルは以下の 2 つ。□

422 MTZ in: 150420: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)

423 PDB in: 150420: 1E8A_A_molrep1.pdb (分子置換法で得られた

424 原子座標ファイル。

425 詳細説明: human S100A12 の側鎖を human S100A13 のものに置換し

426 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

427 2 分子)

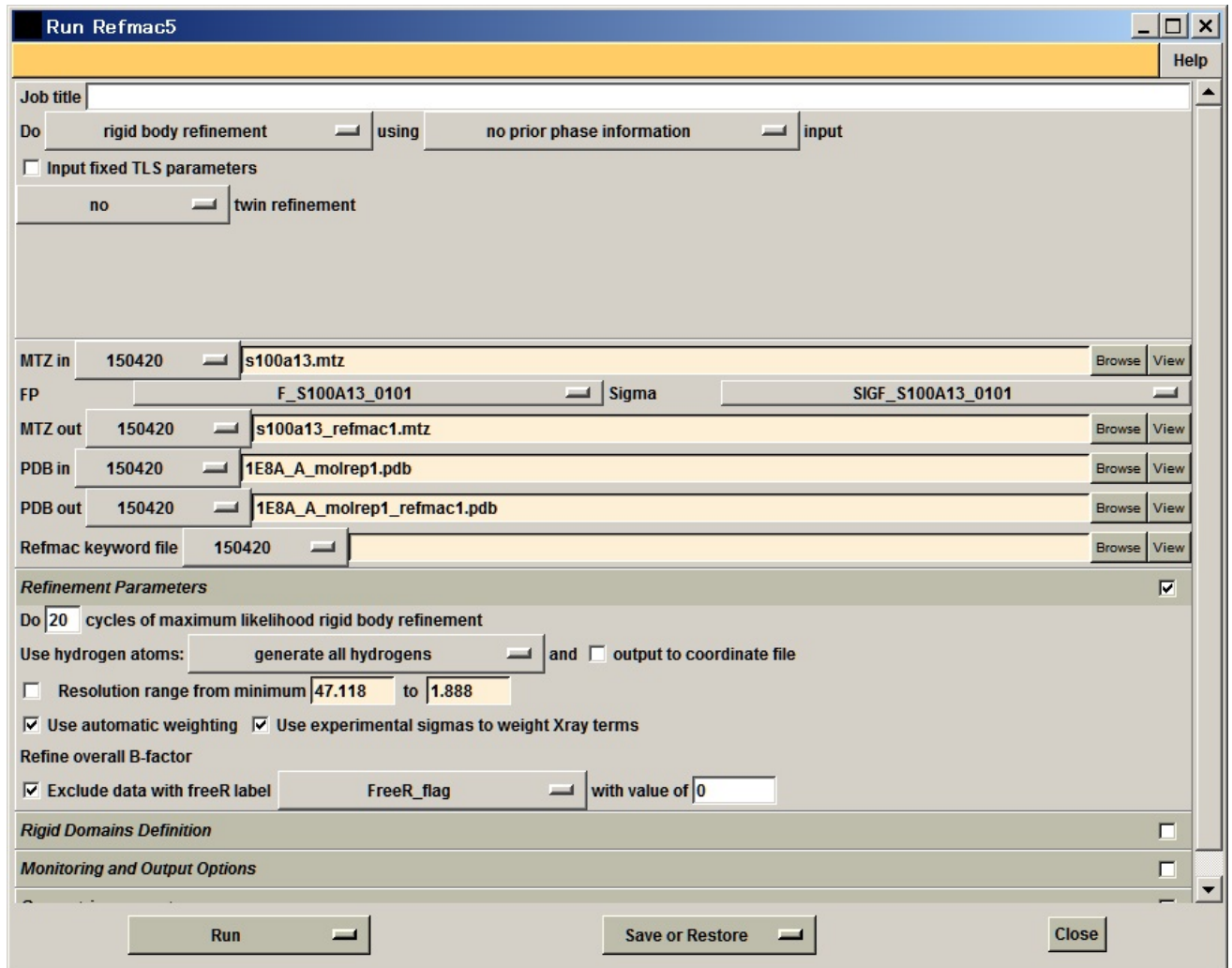
428 出力ファイル名は自動で設定される。

429 MTZ out: 150420: s100a13_refmac1.mtz

430 PDB out: 150420: 1E8A_A_molrep1_refmac1.pdb

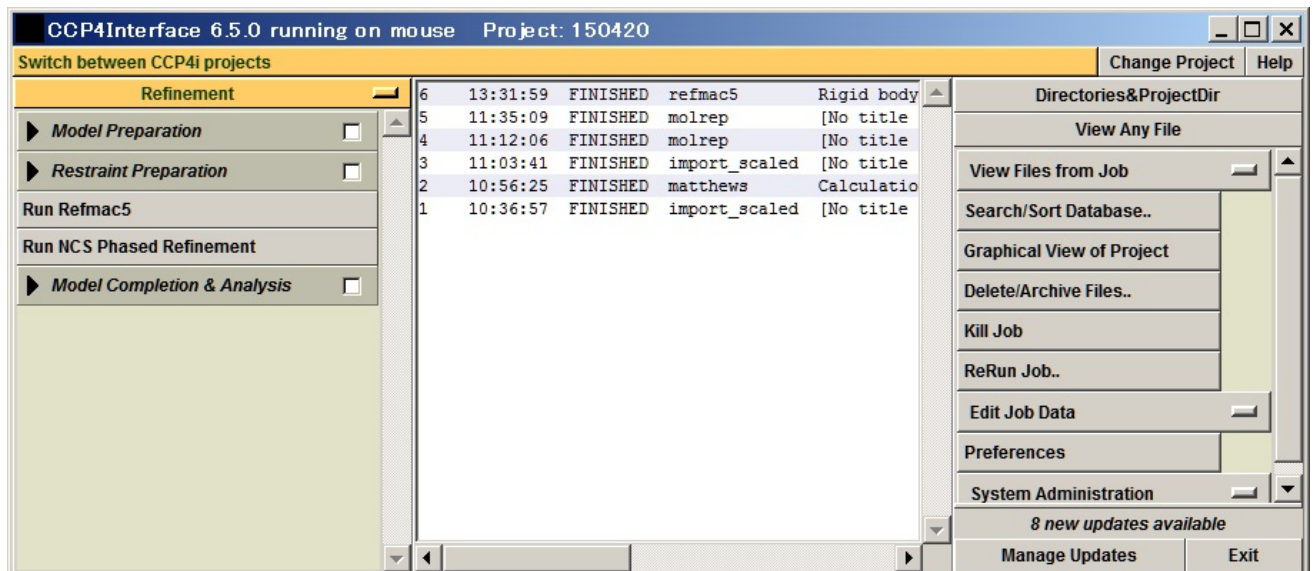
431 Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 20 から 5 に減らしても良い。

432 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



433

434 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”
 435 という 6 個目のジョブが完了した (FINISHED) ことが表示される。□



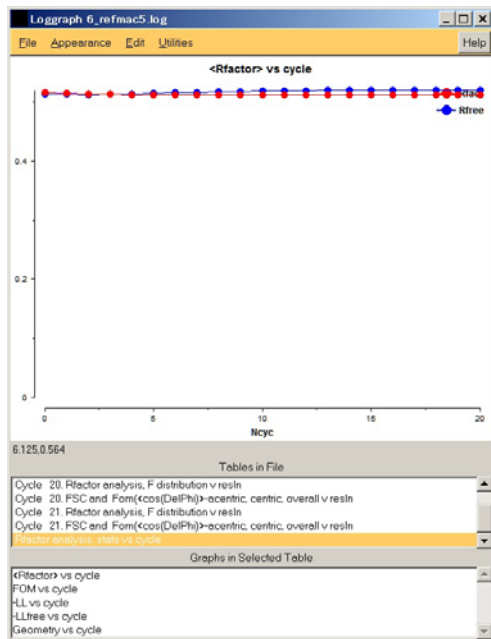
436

437 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
 438 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
 439 やすい。□

440 View Files from Job → View Log Graphs でロググラフを開き、Tables in File → Rfactor analysis, stats
 441 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

442

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。□



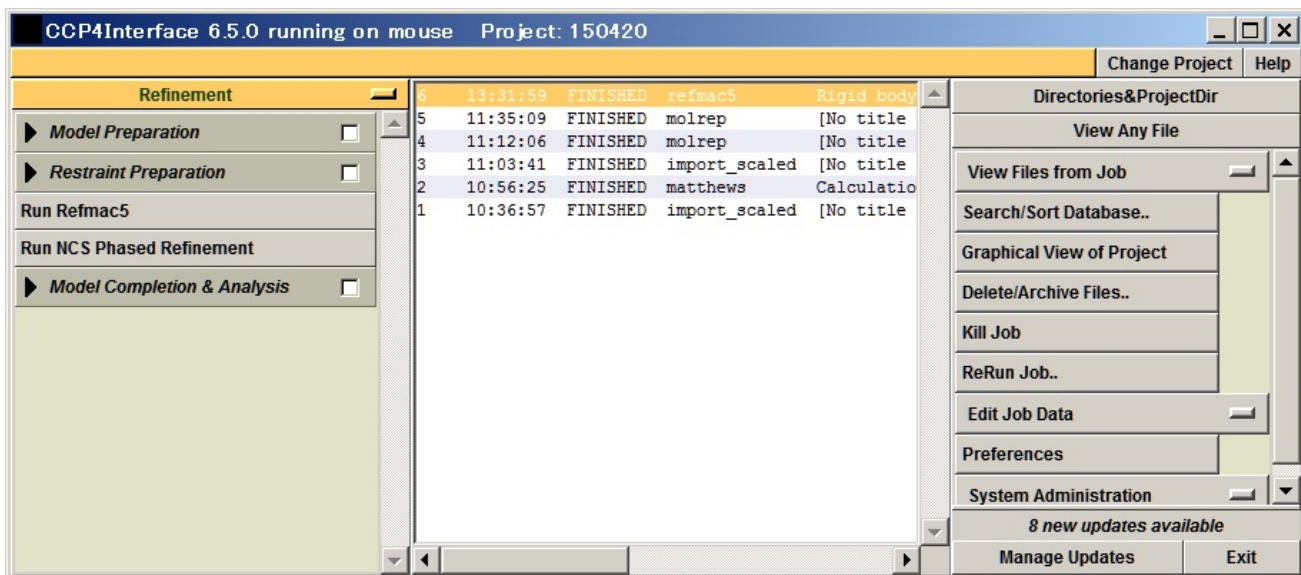
443

444

445

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

447 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。□



448

449 以下のように設定する。□

450 Do: restrained refinement using: no prior phase information

451 □ Input fixed TLS parameters

452 no twin refinement

453 Use Prosmart: no

454 □ Run libg to generate external restraints (DNA/RNA) automatically

455 □ Run Coot:findwaters to automatically add/remove waters to refined structure

456 入力ファイルは以下の 2 つ。□

457 MTZ in: 150420: s100a13_refmac1.mtz

458 (rigid body 構造精密化後の X 線回折データ)

459 PDB in: 150420: 1E8A_A_molrep1_refmac1.pdb

460 (rigid body 構造精密化後の原子座標)

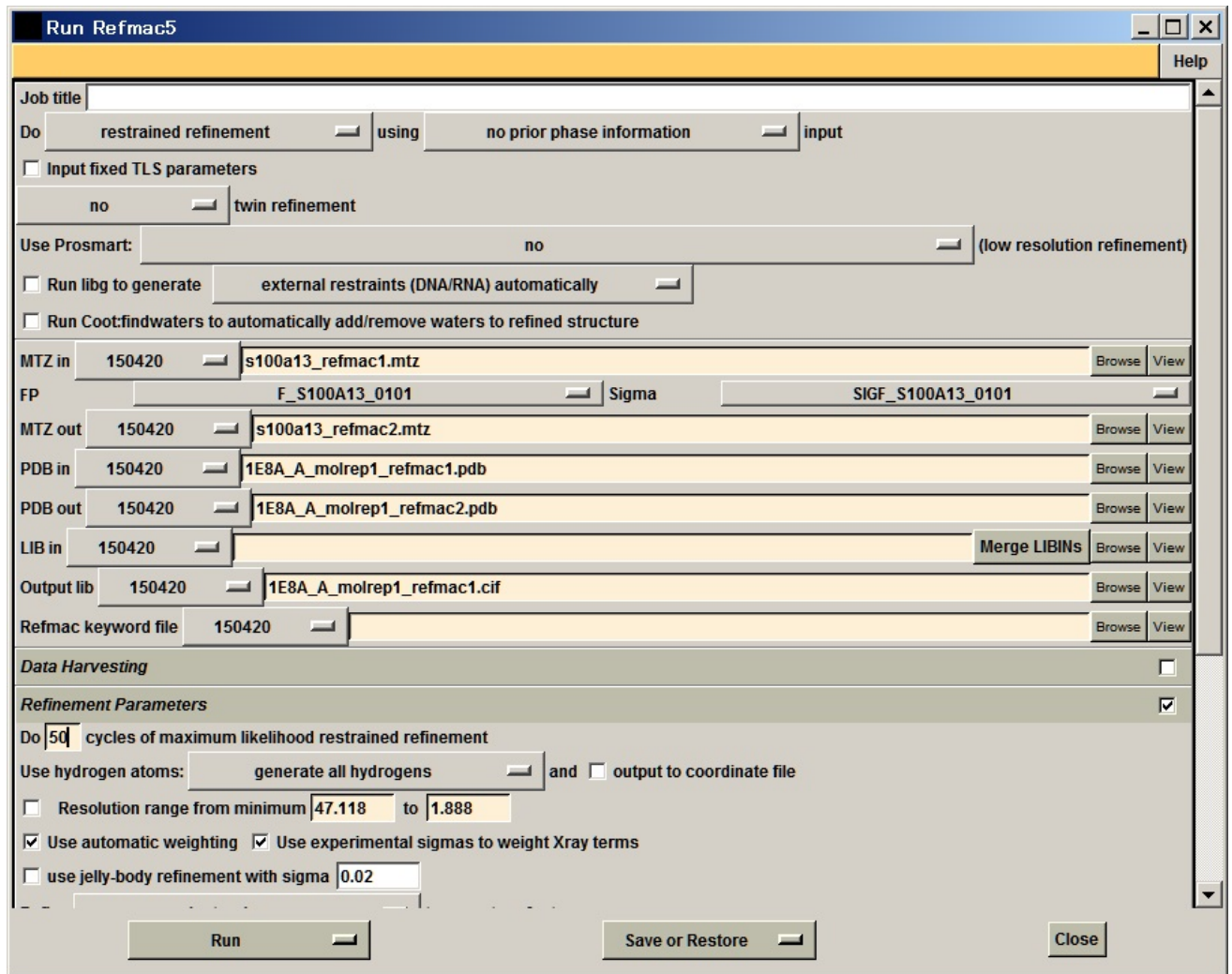
461 出力ファイル名は自動で設定される。

462 MTZ out: 150420: s100a13_refmac2.mtz

463 PDB out: 150420: 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb

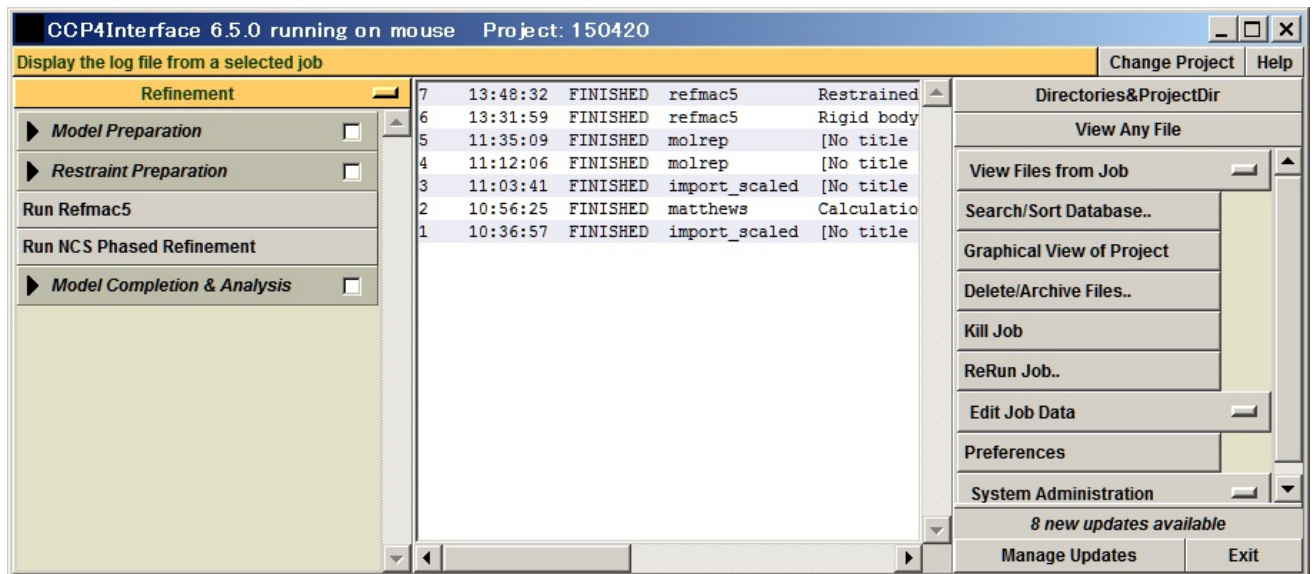
464 Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 10 から 50 に増やした方がよい。

465 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



466
467
468

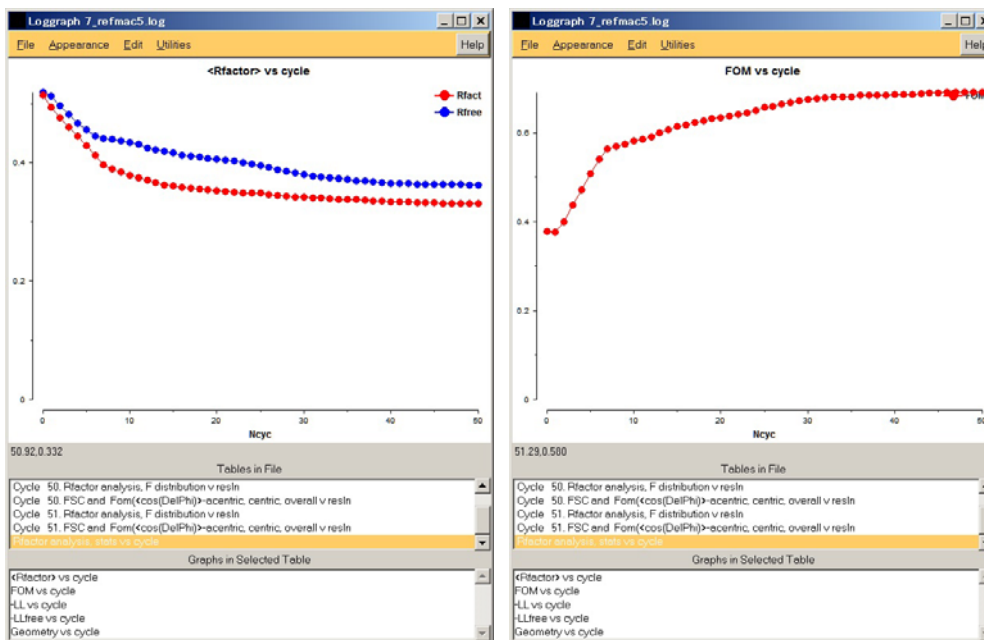
restrained 構造精密化の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に“refmac5”
という7個目のジョブが完了した(FINISHED)ことが表示される。□



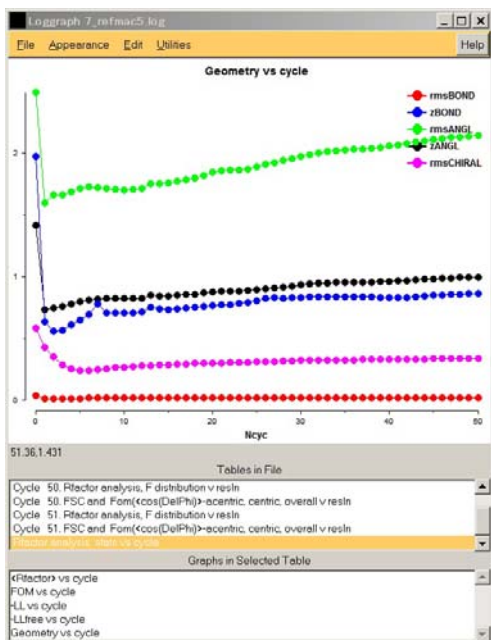
469
470
471
472
473
474

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 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 (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

475 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
 476 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。□
 477



478
 479 Graphs in Selected Table → Geometry vs cycle で rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRAL(それぞれ結合
 480 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。



481
 482 Refmac5を用いた restrained refinement の結果、
 483 R factor は 33.0%、free R factor は 36.2%まで下がった。
 484 (構造精密化計算に使用する回折データは全体の 95%。
 485 残り 5%の回折データの R factor を free R factor と呼ぶ。
 486 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)
 487 FOM は 69.2%まで上がった。
 488 rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRA のいずれも初期値より下がった。□
 489 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。
 490

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 12. 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。

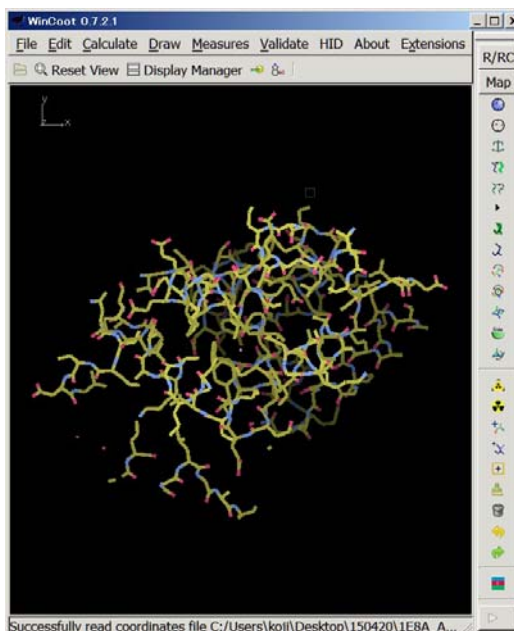
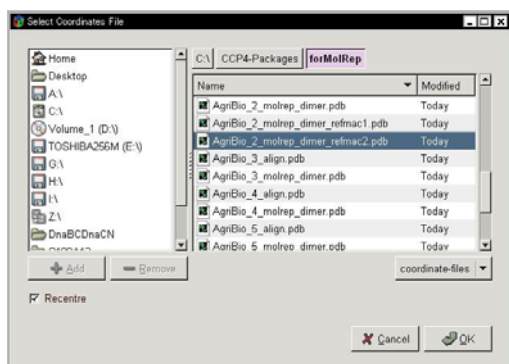
499

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 → Open Coordinates...

502 Places: 150420

503 Select Coordinates File: 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb → OK。



504

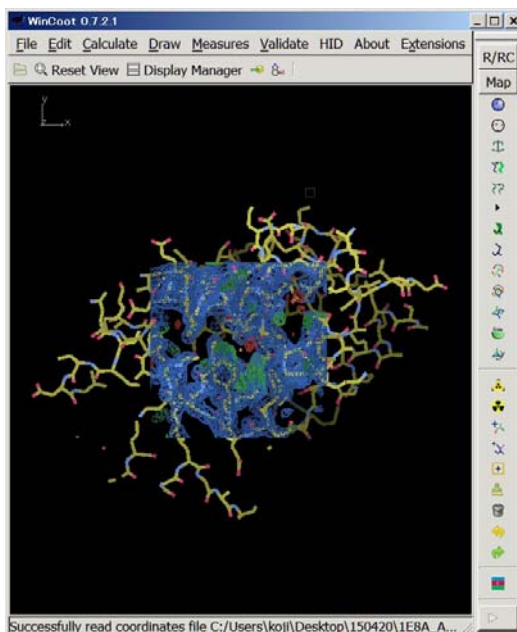
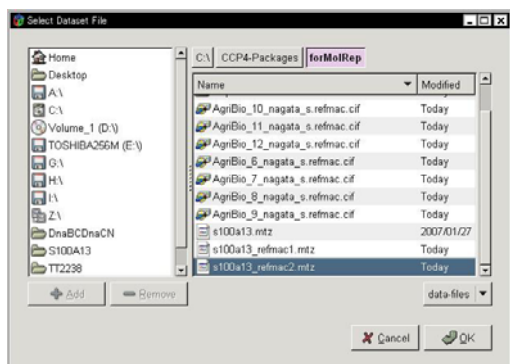
505

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 → Auto Open MTZ...

508 Places: 150420

509 Select Dataset File: s100a13_refmac2.mtz → OK。



510

511

512 電子密度マップの表示領域を半径 20 Å に設定します。

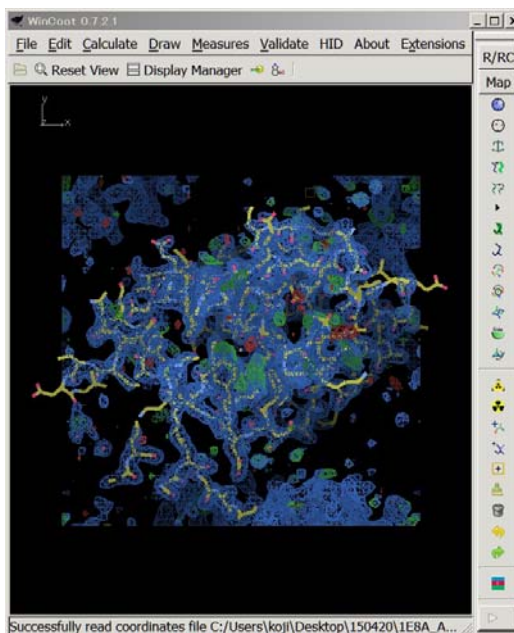
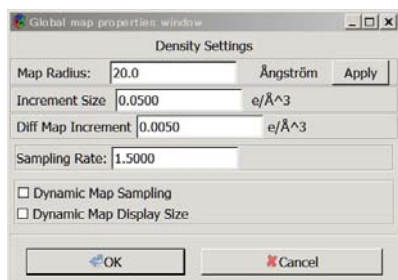
513 WinCoot: Edit → Map Parameters...。

514 Global map properties window: Map Radius: 20.0 Ångström → OK。

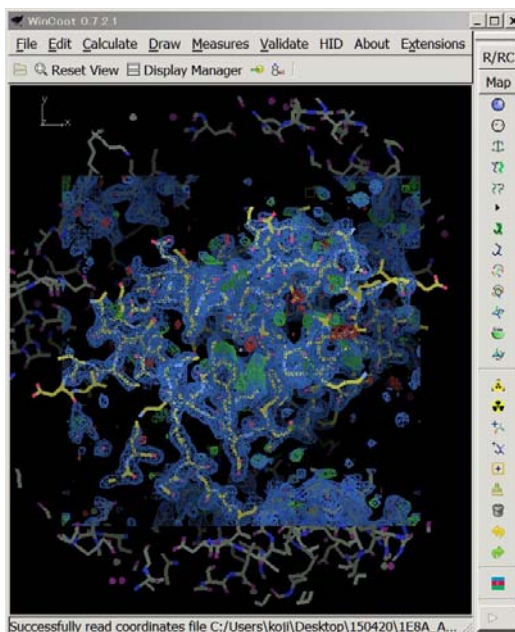
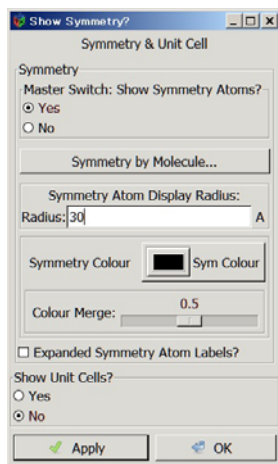
515

516

- 517 電子密度のうち、
518 青は、 $2F_o - F_c$ マップと呼び、電子の存在位置を示します。
519 赤と緑は、 $F_o - F_c$ 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。



- 525
526
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 30 Å 以内のものは表示するように設定
528 します。
529 WinCoot: Draw → Cell & Symmetry...。
530 Symmetry/Master Switch: Show Symmetry Atoms? → Yes。
531 Symmetry Atom Display Radius: 30 Å → OK。



532

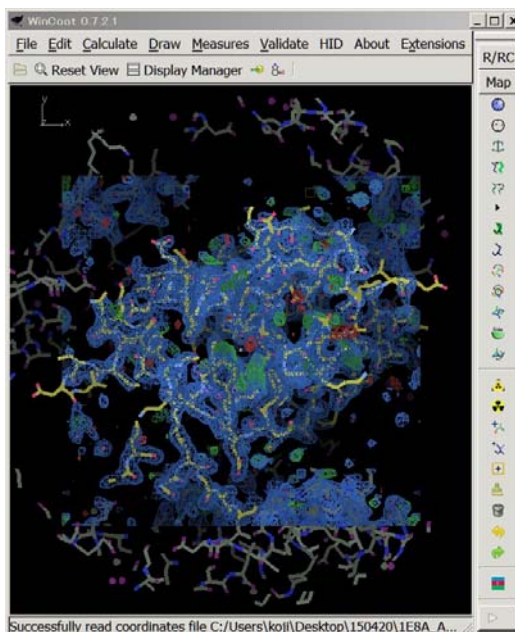
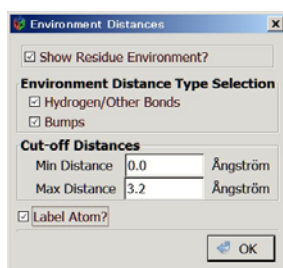
533

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 → Environment Distances...

536 Environment Distances: Show Residue Environment?

537 Label Atom? → OK.



538

539

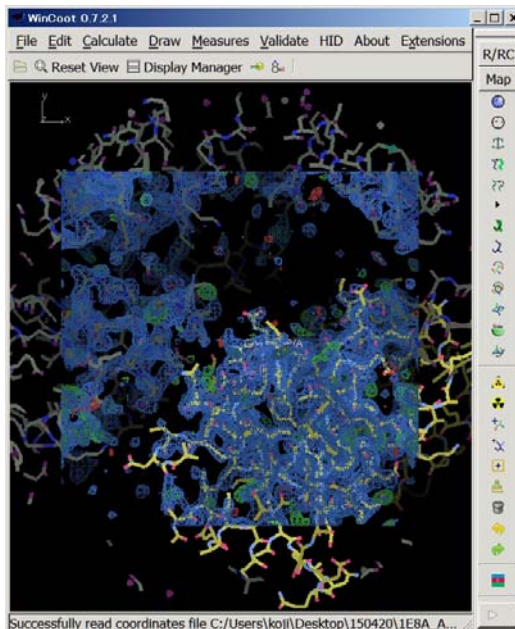
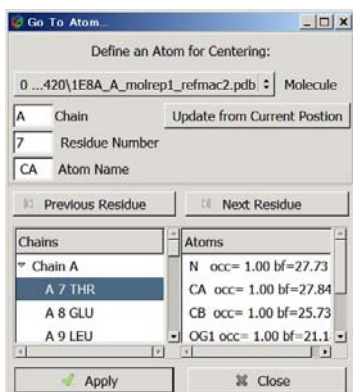
540 WinCoot: Draw → Go To Atom...

541 Go To Atom...: Chain A → A 7 THR → Apply → Close.

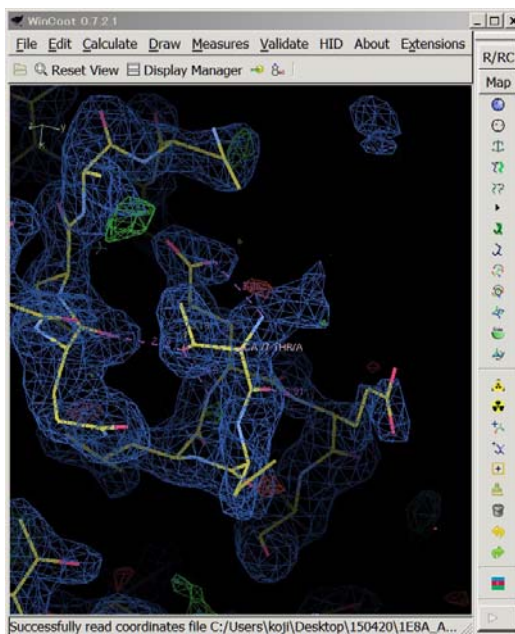
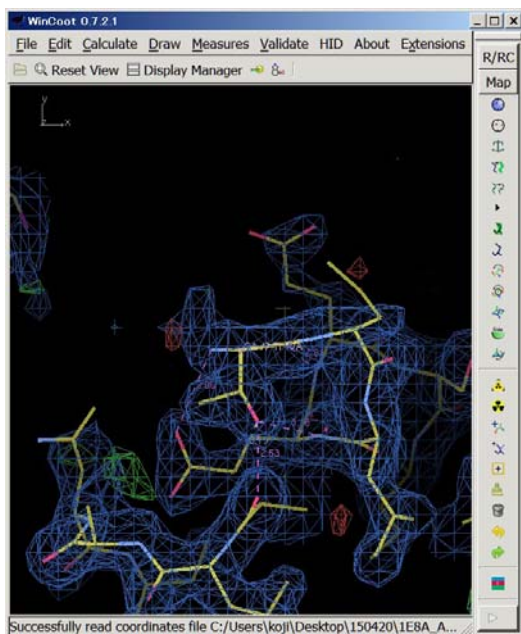
542 右ドラッグ(左から右へ)で、指定したアミノ酸残基を中心に拡大する。

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。

544



545



546

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。

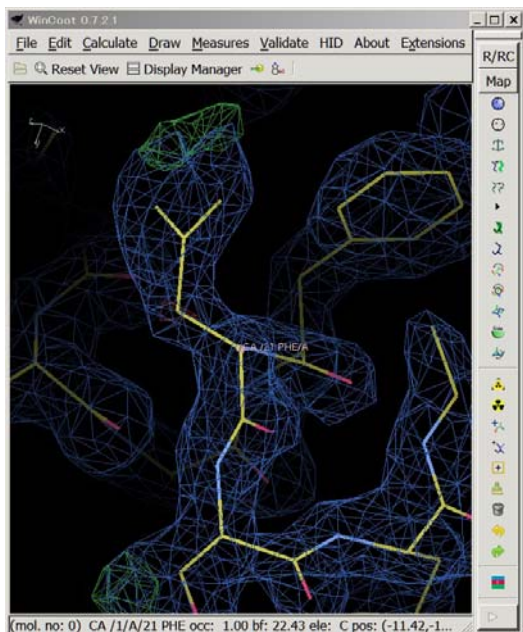
550

551 ここまでが、Coot の使用法の簡単な説明です。

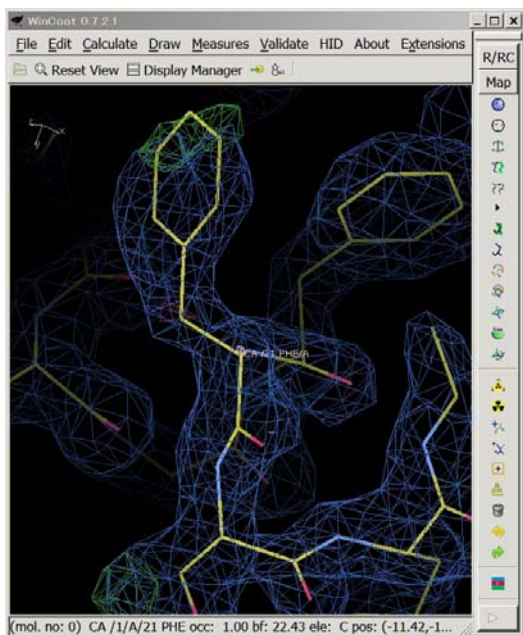
552

553

- 554 スペースバーを何度も押して、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。



- 558
559 WinCoot: Calculate → 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。
562 Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...。
563 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。
564 Resi...: PHE (F)。



- 565
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。
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。

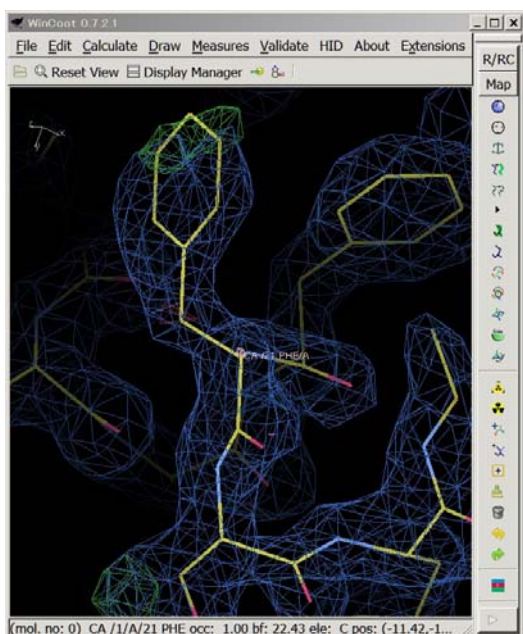
569

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。

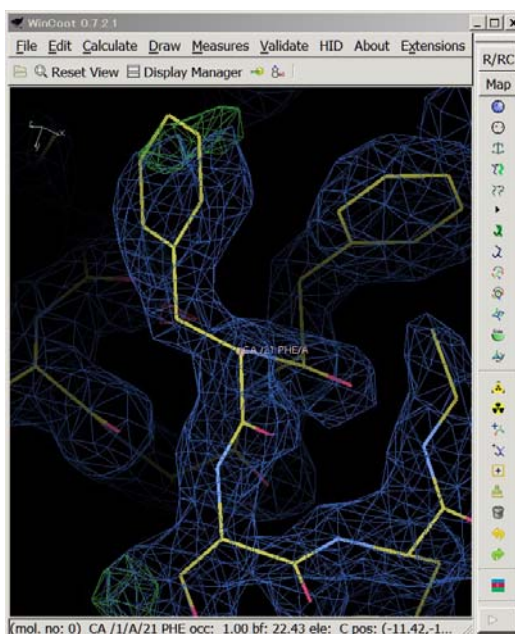
571 Model/Fit/Refine: Simple Mutate...

572 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。

573 Resi...: PHE (F)。



574



575 前回 Mutate & Auto Fit...

今回 Simple Mutate...

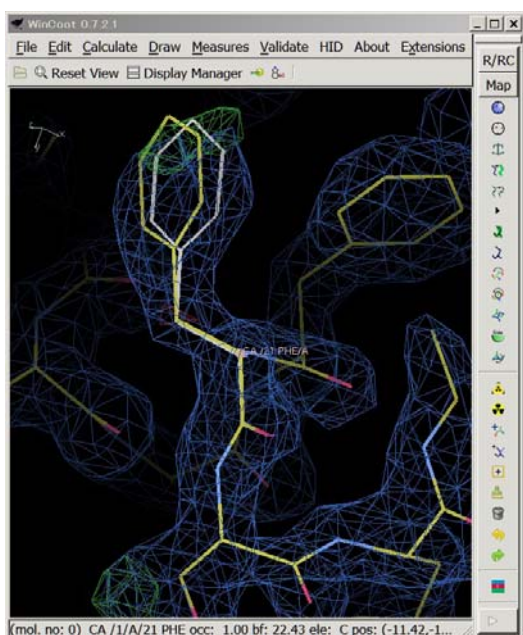
576 さきほど違って、分子モデルと電子密度とが微妙にずれています。

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。



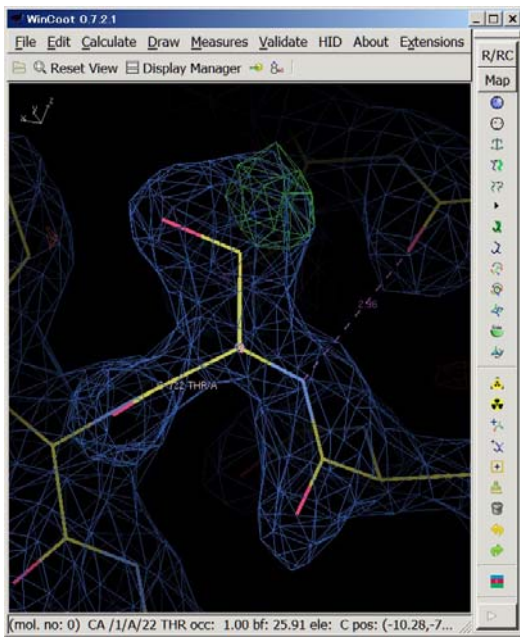
581



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

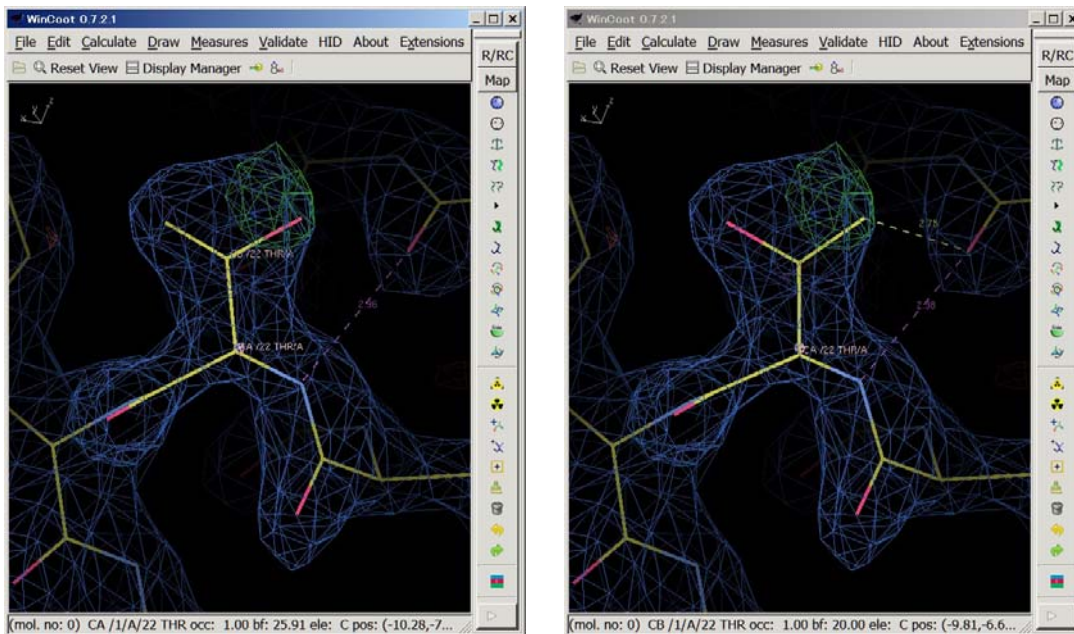
583

- 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。
- 586 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？



590

591 いろいろな角度から見て、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 C 末端(90 LYS)まで、次に B 鎖の N 末端(7 THR)から C 末
602 端(90 LYS)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。

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 → Save Coordinates...

605 Select Molecular Number to Save: 0 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb → Select Filename...

606 Places: 150420

607 Save Hydrogens Save ANISO Records

608 Name: 1E8A_A_molrep1_refmac2-coot-0.pdb → Save。

609 これが提出用ファイル 1 個目です。

610

611
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
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 → Open Coordinates...。
616 Places: 150420
617 Select Coordinates File: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → OK。
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 → All Molecule → [Post MR] Fill Partial Residues →
621 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → 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 → All Molecule → Fit Protein → 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb
631 → 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。
635 WinCoot: Extensions → All Molecule → Stepped Refine →
636 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → OK
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 → Save Coordinates...。
642 Select Molecular Number to Save: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → Select
643 Filename...
644 Places: 150420
645 Save Hydrogens Save ANISO Records
646 Name: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement-coot-0.pdb → 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て、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。

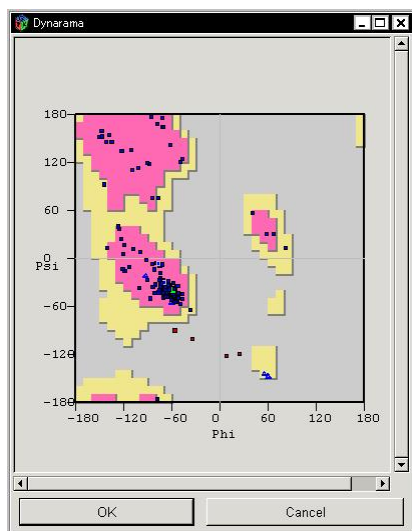
653

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 → Ramachandran Plot → *****.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。



661

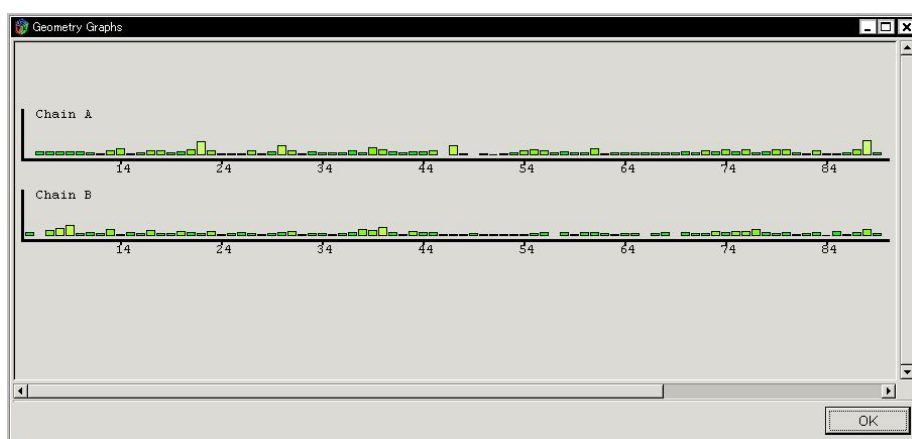
662

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 → Geometry analysis → *****.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

671

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 → Save Coordinates...
674 Save Coordinates Molecule Selector: Save Molecule Number to Save: 0 *****.pdb → Select Filename...
675 Save Filename for Saved Coordinates: Name: デフォルトのまま(*****-coot-1.pdb) → 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 の値が以前より
679 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(<http://www.pdb.org>)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。

The screenshot shows the Protein Data Bank (PDB) website homepage. At the top, there is a search bar with the text "Everything Author Macromolecule Sequence Ligand". Below the search bar, there are several sections: "Biological Macromolecular Resource" with a "Molecule of the Month" section for "RecA and Rad51", "Protein Structure Initiative Featured System" for "New NTF2-like Domains", and an "Explore Archive" section with filters for Organism, Taxonomy, Exp. Method, X-ray Resolution, Release Date, Polymer Type, Enzyme Classification, SCOP Classification, Protein Symmetry, Protein Stoichiometry, and Membrane Proteins. The right sidebar contains "New Features", "Latest release: April 2014", "RCSB PDB News", and "New Structures".

691

692

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。

Filter: Check All View: Detailed Reports: Select one... Sort: Relevance

- 2L07** 1H, 13C, and 15N chemical shifts and structure of brazzein-derived peptide CKR-PNG
 Authors: Ditts, S.M., Assadi-Porter, F.M., Rao, H., Tonelli, M.
 Release: 2011-06-22
 Experiment: SOLUTION NMR Residue Count: 18
 Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: Structural role of the terminal disulfide bond in the sweetness of brazzein. (2011) Chem Senses 36: 821-830 [Display Full Abstract | Display for All Results]
 Search Hit: Title: 1H, 13C, and 15N chemical shifts and structure of brazzein-derived peptide CKR-PNG
- 2LY5** Refined solution structure of recombinant brazzein
 Authors: Cornilescu, C.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Markley, J.L., Assadi-Porter, F.M.
 Release: 2013-01-30
 Experiment: SOLUTION NMR Residue Count: 53
 Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: Temperature-dependent conformational change affecting Tyr11 and sweetness loops of brazzein. (2013) Proteins 81: 919-925 [Display Full Abstract | Display for All Results]
 Search Hit: Title: Refined solution structure of recombinant brazzein
- 4HE7** Crystal Structure of Brazzein
 Authors: Nagata, K., Hongo, N., Kameda, Y., Yamamura, A., Sasaki, H., Lee, W.C., Ishikawa, K., Suzuki, E., Tanokura, M.
 Release: 2013-03-27
 Experiment: X-RAY DIFFRACTION with resolution of 1.80 Å Residue Count: 54
 Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 1 Ligand [Display Full Ligand Details | Display for All Results]
 Citation: The structure of brazzein, a sweet-tasting protein from the wild African plant Pentadiplandra brazzeana (2013) Acta Crystallogr., Sect.D 69: 642-647 [Display Full Abstract | Display for All Results]
 Search Hit: Title: Crystal Structure of Brazzein
- 2KYQ** 1H, 15N, 13C chemical shifts and structure of CKR-brazzein
 Authors: Ditts, S.M., Assadi-Porter, F.M., Rao, H., Tonelli, M.
 Release: 2011-05-18
 Experiment: SOLUTION NMR Residue Count: 53
 Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: Structural role of the terminal disulfide bond in the sweetness of brazzein. (2011) Chem Senses 36: 821-830 [Display Full Abstract | Display for All Results]
 Search Hit: Title: 1H, 15N, 13C chemical shifts and structure of CKR-brazzein
- 2LY6** Refined solution structure of recombinant brazzein at low temperature
 Authors: Cornilescu, C.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Markley, J.L., Assadi-Porter, F.M.
 Release: 2012-10-17
 Experiment: SOLUTION NMR Residue Count: 53
 Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: Temperature-dependent conformational change affecting Tyr11 and sweetness loops of brazzein. (2013) Proteins 81: 919-925 [Display Full Abstract | Display for All Results]
 Search Hit: Title: Refined solution structure of recombinant brazzein at low temperature
- 2KGQ** Refined solution structure of des-pyro Glu brazzein
 Authors: Cornilescu, C.C., Tonelli, M., DeRider, M.L., Markley, J.L., Assadi-Porter, F.M., Center for Eukaryotic Structural Genomics

694

695 そのうちブラゼインの結晶構造は PDB id: 4HE7 であることがわかる。この項目をクリックする。

Crystal Structure of Brazzein

DOI:10.2210/pdb/4he7/pdb

Primary Citation
 The structure of brazzein, a sweet-tasting protein from the wild African plant *Pentadiplandra brazzeana*.
 Nagata, K., Hongo, N., Kameda, Y., Yamamura, A., Sasaki, H., Lee, W.C., Ishikawa, K., Suzuki, E., Tanokura, M.
 Journal: (2013) Acta Crystallogr., Sect.D 69: 642-647
 PubMed: 23519673
 DOI: 10.1107/S0907444913001005
 Search Related Articles in PubMed

PubMed Abstract:
 Brazzein is the smallest sweet-tasting protein and was isolated from the wild African plant *Pentadiplandra brazzeana*. The brazzein molecule consists of 54 amino-acid residues and four disulfide bonds. Here, the first crystal structure of brazzein is reported at 1.8 Å resolution and is compared with previously reported solution structures. Despite the overall structural similarity, there are several remarkable differences between the crystal and solution structures both in their backbone folds and side-chain conformations. Firstly, there is an additional α -helix in the crystal structure. Secondly, the atomic r.m.s.d.s between the corresponding C(α)-atom pairs are as large as 2.0-2.2 Å between the crystal and solution structures. Thirdly, the crystal structure exhibits a molecular shape that is similar but not identical to the solution structures. The crystal structure of brazzein reported here will provide additional information and further insights into the intermolecular interaction of brazzein with the sweet-taste receptor.

Keywords:
 Africa, Brassicaceae, Crystallography, X-Ray, Plant Proteins, Sweetening Agents, Taste

Organizational Affiliation:
 Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Click on abstract words and keywords to add them to the search box.

Molecular Description
 Classification: Plant Protein
 Structure Weight: 6514.34
 Molecule: Defensin-like protein
 Polymer: 1 Type: protein Length: 54
 Chains: A
 Mutation: Q1E
 Organism: *Pentadiplandra brazzeana*
 UniProtKB: [Protein Feature View | Search PDB | P56552]

UP Sites
 SCOP domains
 PDB Sites
 Sequence
 4HE7.A

Structure Validation
 Download full validation report

4HE7 Display Files + Download Files + Share this Page +

Biological Assembly

3D View More Images...

No symmetry
 Stoichiometry: Monomer
 Biological assembly 1 assigned by authors and generated by PISA (software)

Downloadable viewers:
 Simple Viewer Protein Workshop Kiosk Viewer

MyPDB Personal Annotations
 To save personal annotations, please login to your MyPDB account.

Deposition Summary
 Authors: Nagata, K., Hongo, N., Kameda, Y., Yamamura, A., Sasaki, H., Lee, W.C., Ishikawa, K., Suzuki, E., Tanokura, M.
 Deposition: 2012-10-03
 Release: 2013-03-27
 Last Modified (REVDATE): 2013-08-07

Revision History
 Mouse over text for details
 2013-08-07
 Citation

Experimental Details
 Method: X-RAY DIFFRACTION
 Exp. Data:
 Structure Factors
 R-Value: 0.219 (obs.)

696

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

- 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。

The screenshot shows the EDS web interface for PDB entry 4he7. The main content area is titled "EDS Summary" and contains the following information:

- Map status: CCP4 map created on 10-Aug-2013
- Resolution from map calculation: 3070 - 1.80 Å
- Resolution from PDB header: 1.80 Å
- R value for map: 0.253
- R value (free R) from PDB header: 0.219 (0.252)
- Completeness of data: 92.9 %
- Space group: I 41 2 2
- Cell dimensions: a=61.40 Å, b=61.40 Å, c=59.60 Å, alpha=90.00, beta=90.00, gamma=90.00
- Number of reflections: 5144 (5536 in original CIF file)
- Correlation coefficient Fo and Fc: 0.932
- Crickshank DPI: 0.175 Å
- Yeates <L>: 0.439
- Yeates <L^2>: 0.267
- Wilson plot B-factor: 25.4 Å²
- Bulk-solvent scale factor (k): 0.370 e/Å³
- Bulk-solvent B-factor: 50.6 Å²
- Number of non-hydrogen atoms: 441 plus 22 hetero atoms

Below the summary, there are sections for "Mean (st. dev.) values for non-water residues" and "PDB header information". The header information includes:

```

PLANT PROTEIN                    03-OCT-12    4HE7
CRYSTAL STRUCTURE OF BRAZZEIN
ORGANISM SCIENTIFIC: PENTADIPLANDRA BRAZZEANA;
ORGANISM TAXID: 40545
SWEET-TASTING PROTEIN, PLANT PROTEIN
K. NAGATA, N. HONGO, Y. KAMEDA, A. YAMAMURA, H. SASAKI, W. C. LEE, K. ISHII,
2. E. SUZUKI, M. TANOKURA
07-AUG-13 4HE7    1    JRNL
27-MAR-13 4HE7    0
K. NAGATA, N. HONGO, Y. KAMEDA, A. YAMAMURA, H. SASAKI, W. C. L.
K. ISHIKAWA, E. SUZUKI, M. TANOKURA
THE STRUCTURE OF BRAZZEIN, A SWEET-TASTING PROTEIN
WITH AN AFRICAN PLANT PENTADIPLANDRA BRAZZEANA
  
```

- 702
 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。

The screenshot shows the "Electron-density map generation for 4he7" form. The form has two dropdown menus: "Map format" set to "CCP4" and "Type" set to "2mFo-DFc". A "Generate map" button is visible to the right of the dropdowns. Below the form, there is a message: "Generating map.... This may take a few seconds, or many minutes, depending on the size of your map." At the bottom, it says "Here is your gzipped map : [4he7.ccp4.gz](#)".

- 707

Electron-density map generation for 4he7

Map format : CCP4 Type : mFo-DFc Generate map

708 (Note: this may take a few seconds, or many minutes, depending on the size of your map.)

Electron-density map generation for 4he7

Generating map....

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

709 Here is your gzipped map : [4he7_diff.ccp4.gz](#)

710 圧縮ファイルを解凍すると ccp4 を拡張子とするファイルができるが、これらを Coot に読み込む場合は、拡張子
711 を map に変更する必要あり。

712 2mFo-DFc マップ 4he7.ccp4 → 4he7.map

713 mFo-DFc マップ 4he7_diff.ccp4 → 4he7_diff.map

714 ダウンロードしたファイルを Windows PC 上で、CCP4 や Coot で使用する場合には、日本語名のフォルダ内に
715 置いたり、日本語のファイル名を付けないように気をつける。また、ファイル名にスペースを入れないように気
716 をつける。

717 Coot を起動し、File から

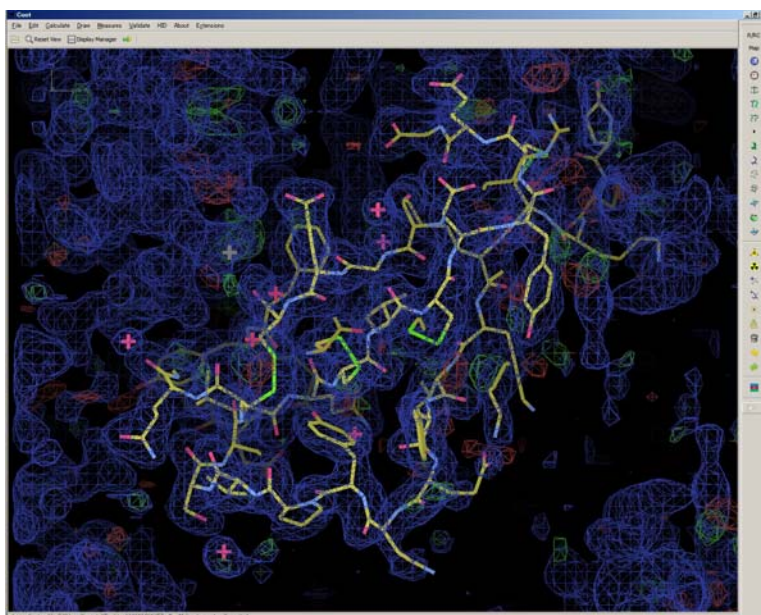
718 Open Coordinates... 4he7.pdb

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 1.5 σ 、4he7_diff.map の閾値を 5.0 σ とすると、以下の通り。



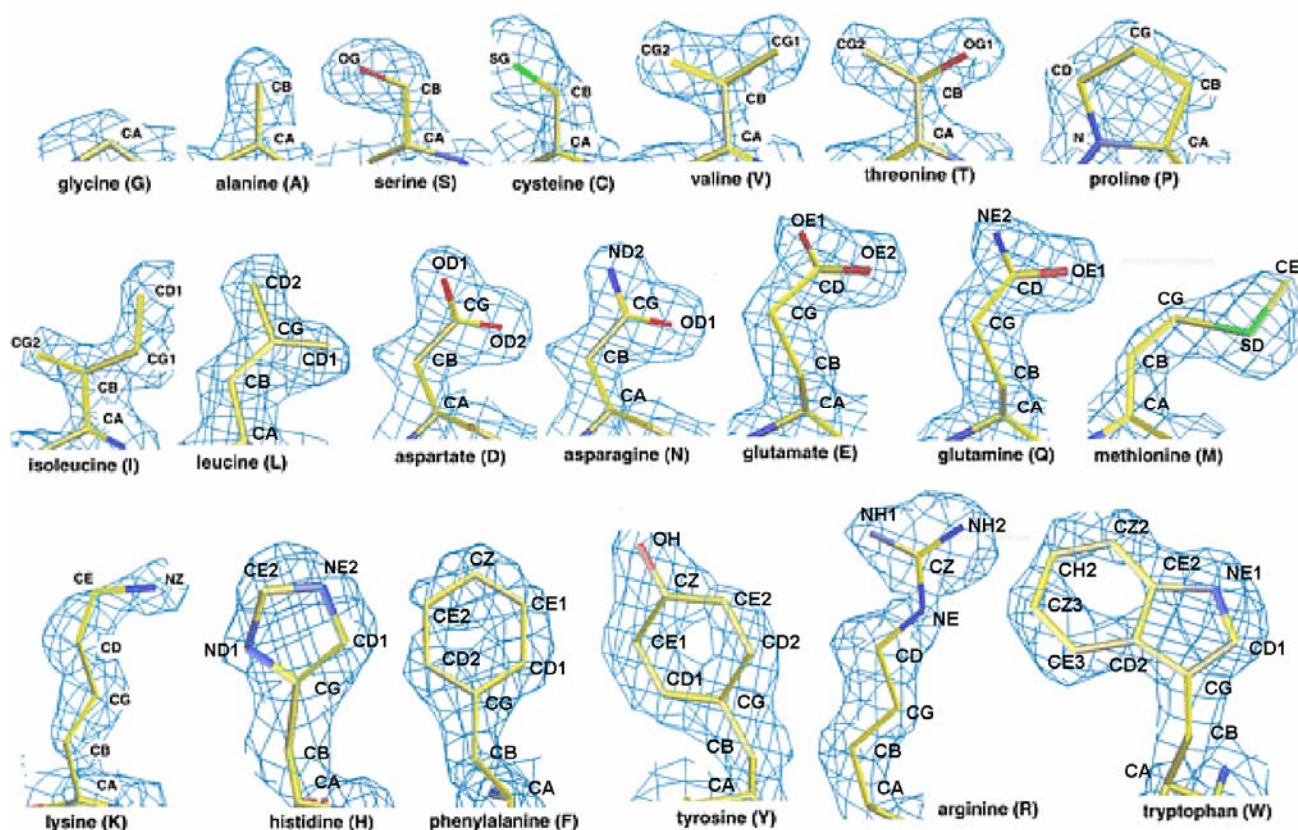
723

724

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)



728

729

730 PDB ファイルの項目

731	COLUMNS	DATA	TYPE	FIELD	DEFINITION
732	<hr/>				
733	1 - 6	Record name	"ATOM "		
734	7 - 11	Integer	serial		Atom serial number
735	13 - 16	Atom	name		Atom name
736	17	Character	altLoc		Alternate location indicator
737	18 - 20	Residue name	resName		Residue name
738	22	Character	chainID		Chain identifier
739	23 - 26	Integer	resSeq		Residue sequence number
740	27	AChar	iCode		Code for insertion of residues
741	31 - 38	Real (8.3)	x		Orthogonal coordinates for X in Angstroms
742	39 - 46	Real (8.3)	y		Orthogonal coordinates for Y in Angstroms
743	47 - 54	Real (8.3)	z		Orthogonal coordinates for Z in Angstroms
744	55 - 60	Real (6.2)	occupancy		Occupancy
745	61 - 66	Real (6.2)	tempFactor		Temperature factor
746	77 - 78	LString(2)	element		Element symbol, right-justified
747	79 - 80	LString(2)	charge		Charge on the atom