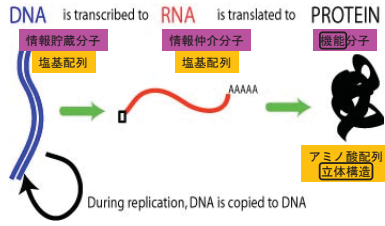


## 分子生物学のセントラルドグマ (1958 イギリスの分子生物学者クリックが提唱)

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



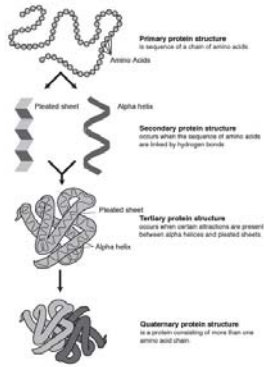
<http://cnx.org/content/m11415/latest/>の図を引用

## 立体化学の重要性

- 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)

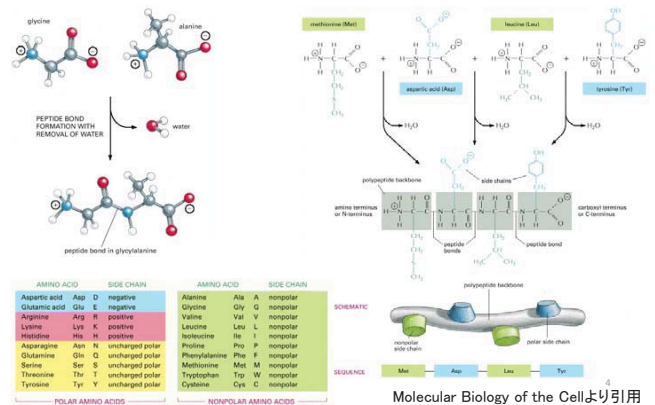
## タンパク質構造の階層性

タンパク質の構造には4つの階層がある。



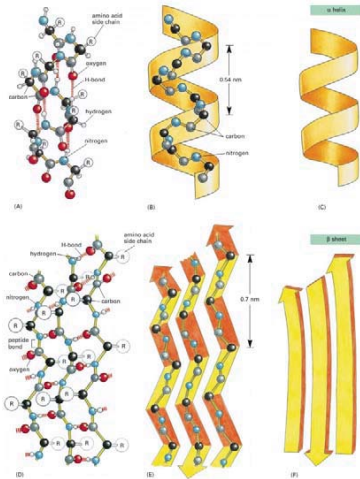
- 一次構造 - ペプチド鎖のアミノ酸配列  
 ・共有結合
- 二次構造 - α-ヘリックス、β-ストランド、β-シート、ターン  
 ・水素結合
- 三次構造 - 単分子の三次元構造  
 ・ファンデルワールスカ  
 ・水素結合  
 ・静電相互作用  
 ・疎水相互作用
- 四次構造 - 複数の分子からなる複合体  
 ・ファンデルワールスカ  
 ・水素結合  
 ・静電相互作用  
 ・疎水相互作用

## 一次構造 (共有結合)

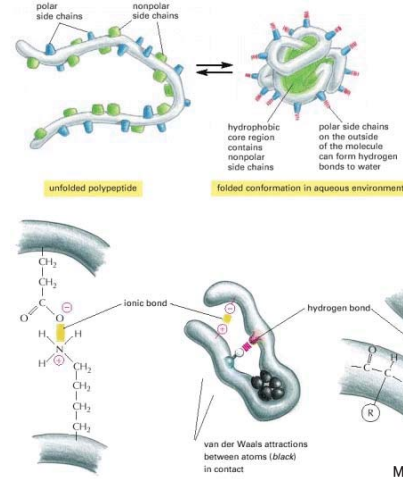


Molecular Biology of the Cellより引用

## 二次構造 (水素結合)



Molecular Biology of the Cellより引用



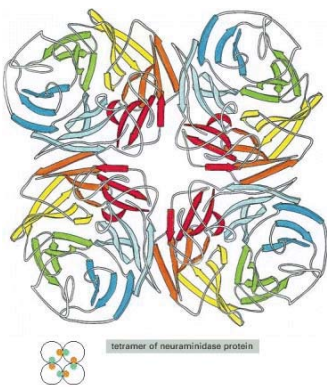
Molecular Biology of the Cellより引用

## 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)

## 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

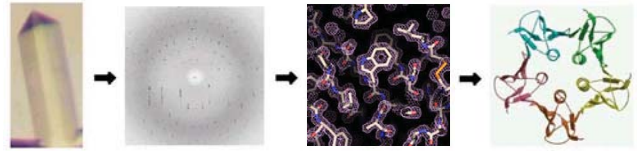
正常なプリオン PrP <sup>C</sup>	異常なプリオン PrP <sup>Sc</sup>	神経変性を惹起する アミロイド斑形成
43% α-helix 3% β-sheet	30% α-helix 43% β-sheet	・クロイツフェルトヤコブ病 ・狂牛病

# 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事ができる	分子量の上限がない 最高分解能の構造が決定できる <b>立体構造解析法の王道</b>	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

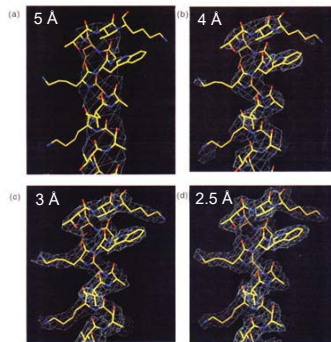
## フーリエ合成 (Fourier synthesis)

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

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

# 分解能と電子密度の関係

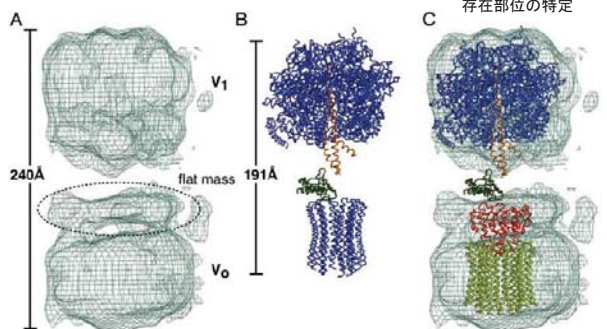
(分解能が高いほど精密な構造解析が可能)



11

# 低温電子顕微鏡 (cryo EM)

V<sub>0</sub>V<sub>1</sub>の電頭像 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>の結晶構造 V<sub>0</sub>V<sub>1</sub>特有サブユニットの存在部位の特定



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/wiki/index.php?title=Main\\_Page](http://ccp4wiki.org/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://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>  
HP (WinCoot): <http://www.yzsl.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](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/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](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 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: [http://ccp4wiki.org/~ccp4wiki/wiki/index.php?title=Main\\_Page](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](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](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

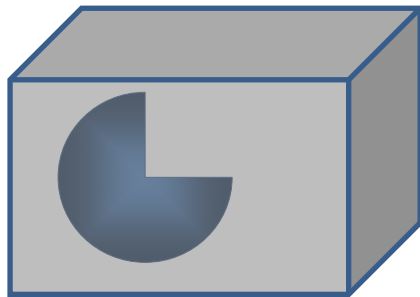
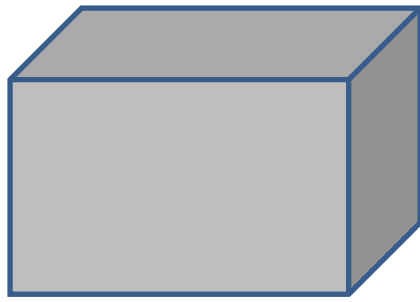
132 提出課題2

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



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。

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 160426.zip をデスクトップにダウンロードし、160426.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 160426 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、160426 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¥160426
- 160 × C:¥Users¥永田¥Desktop¥160426
- 161 ○ C:¥160426

162

163



- 164 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  
 165 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。□  
 166 <http://web.expasy.org/blast/>

## SIB BLAST+ Network Service Form

日本語のページはこちら

You can also use this tool programmatically...

Enter a sequence

**Examples**

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

e.g. P00750, P05067-5, A4\_HUMAN or acccgtgctgctgctg... ?

BLAST programs available on ExPASy: ?

- [blastp](#): protein query -> protein sequence database
- [blastn](#): nucleotide query -> nucleotide sequence database
- [tblastn](#): protein query -> nucleotide sequence database
- [blastx](#): nucleotide query -> protein sequence database

Choose a database

**Protein databases:**

UniProt Knowledgebase (UniProtKB) ?

Restrict taxonomy ?

UniProtKB taxonomic subsets ?

UniProt prokaryotic reference proteomes ?

Other databases ?

**Nucleotide databases:**

Sequence databases ?

ENA taxonomic subsets ?

Prokaryotic genomes ?

- 167 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  
 168 出力される。  
 169 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  
 170 ため)。□  
 171 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  
 172 として用いるには不向きである。ゆえに除外する。□  
 173 結果として、20 位までのうち、以下の 3 つが S100A13 類似タンパク質の結晶構造として得られた。  
 174
- |  |               |
|--|---------------|
| 11 位 3NXA_A(PDB entry: 3NXA の chain A) | S100A16 の結晶構造 |
| 19 位 1ODB_A(PDB entry: 1ODB の chain A) | S100A12 の結晶構造 |
| 20 位 1E8A_A(PDB entry: 1E8A の chain A) | S100A12 の結晶構造 |
- 175  
 176  
 177  
 178 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

179 換を試みる。失敗したら、次の候補の 1ODB\_A または 1E8A\_A をモデルとして用いる。□  
 180 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  
 181 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。

## List of the matches

Clustal W (multiple alignment)

Select up to...  
 Include query sequence

	Accession	Db	Description	Score	E-value
<input type="checkbox"/> 1	2H2K	PDB	Chain A, Crystal Structure Analysis Of Human S100a13	172	6e-56
<input type="checkbox"/> 2	1YUT	PDB	Chain A, Solution Structure Of Calcium-s100a13 (minim...	171	1e-55
<input type="checkbox"/> 3	2KI4	PDB	Chain C, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Componen...	171	1e-55
<input type="checkbox"/> 4	1YUR	PDB	Chain A, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized...	171	1e-55
<input type="checkbox"/> 5	2KI4	PDB	Chain B, Fgf1-S100a13 Complex Structure: Key Componen...	171	1e-55
<input type="checkbox"/> 6	2LE9	PDB	Chain B, Ragec2-S100a13 Tetrameric Complex	169	8e-55
<input type="checkbox"/> 7	1YUR	PDB	Chain B, Solution Structure Of Apo-S100a13 (Minimized...	169	8e-55
<input type="checkbox"/> 8	2CXJ	PDB	Chain A, 3d Solution Structure Of S100a13	149	7e-47
<input type="checkbox"/> 9	2M0R	PDB	Chain A, Solution Structure And Dynamics Of Human S10...	70.9	2e-16
<input type="checkbox"/> 10	2L50	PDB	Chain A, Solution Structure Of Apo S100a16	57.8	1e-11
<input type="checkbox"/> 11	3NXA	PDB	Chain A, X-Ray Structure Of The Apo Form Of Human S10...	57.4	2e-11
<input type="checkbox"/> 12	2LUC	PDB	Chain A, Solution Structure Of Human S100 Calcium-bin...	57.0	2e-11
<input type="checkbox"/> 13	1NSH	PDB	Chain A, Solution Structure Of Rabbit Apo-S100a11 (19...	57.0	2e-11
<input type="checkbox"/> 14	2M9G	PDB	Chain A, Solution Structure Of Calcium-bound Human S1...	56.2	4e-11
<input type="checkbox"/> 15	2L0P	PDB	Chain A, Solution Structure Of Human Apo-S100a1 Prote...	55.8	7e-11
<input type="checkbox"/> 16	2LLU	PDB	Chain A, Post-Translational S-Nitrosylation Is An End...	55.5	7e-11
<input type="checkbox"/> 17	2LLS	PDB	Chain A, Solution Structure Of Human Apo-S100a1 C85m	55.5	8e-11
<input type="checkbox"/> 18	2LLT	PDB	Chain A, Post-Translational S-Nitrosylation Is An End...	55.5	8e-11
<input type="checkbox"/> 19	1ODB	PDB	Chain A, The Crystal Structure Of Human S100a12 - Cop...	55.5	9e-11
<input type="checkbox"/> 20	1E8A	PDB	Chain A, The Three-Dimensional Structure Of Human S10...	55.1	9e-11

182 PDB ファイルが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  
 183 する。

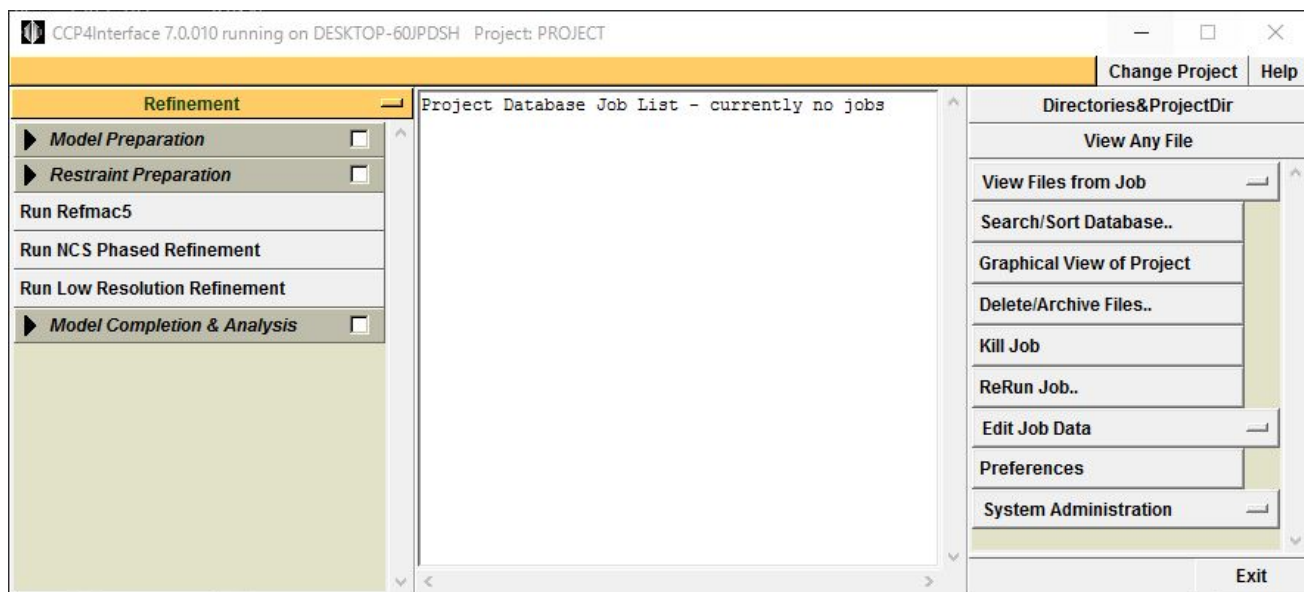
184 例: PDB: 1E8A の A 鎖の場合、ATOM で始まる A 鎖だけの行をテキストエディタで抽出して、ファイル名  
 185 1E8A\_A.pdb として保存する。□

186  
 187 ATOM 1 N THR A 1 15.352 25.025 -7.964 1.00 18.82 N

188

189 3. CCP4 を用いて、分子置換を行う。

190 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。□



191

192

193

194

195 4. 作業ファイルを扱うディレクトリを設定する。

196 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。□

197 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。□

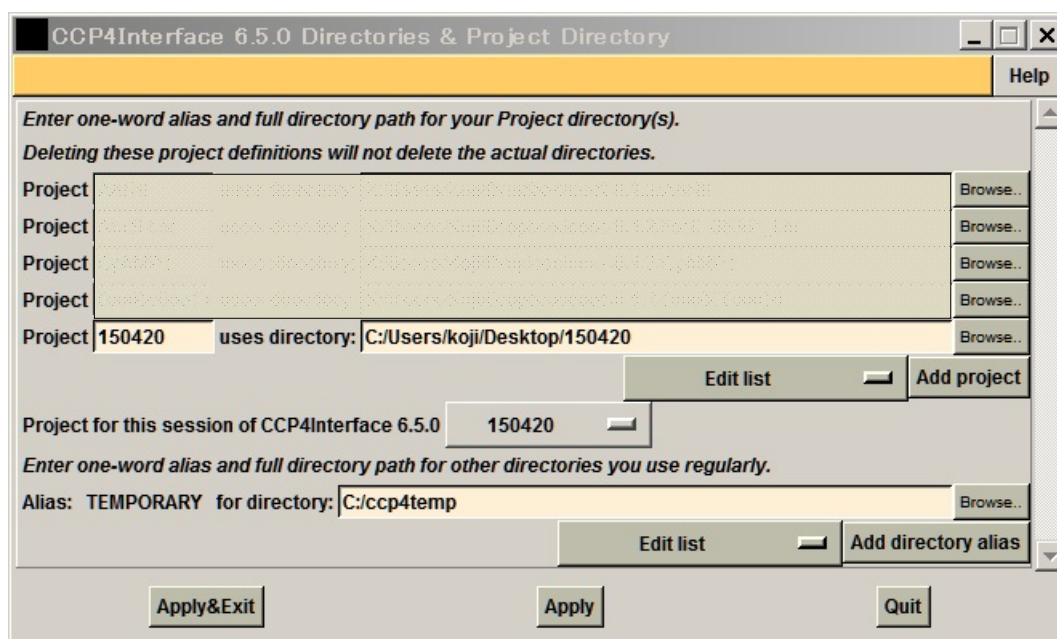
198 Project: 160426 uses directory: C:/Users/iu/Desktop/160426/

199 ただし、160426 フォルダを C ドライブ直下に置いた方は

200 Project: 160426 uses directory: C:/160426/

201 次に、Project for this session of CCP4Interface 7.0.010 として 160426 を選択する。□

202 その後、Apply&Exit ボタンを押す。□



203

204

205



- 206 5. X線回折データのフォーマット変換(Denzo/HKL2000 → CCP4)を行う。  
 207 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。□

208  
 209

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 &amp; 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 &amp; 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"/>	

210  
 211

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

212  
 213

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 &amp; Analysis</i> <input type="checkbox"/>	Run ProSMART	SFs for Deposition
	DSSP	Data Harvesting Manager
	Predictor of Lysine Carboxylation	Run R500 on PDB

214  
 215  
 216

217

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	

218

219

Graphics and Viewing Utilities

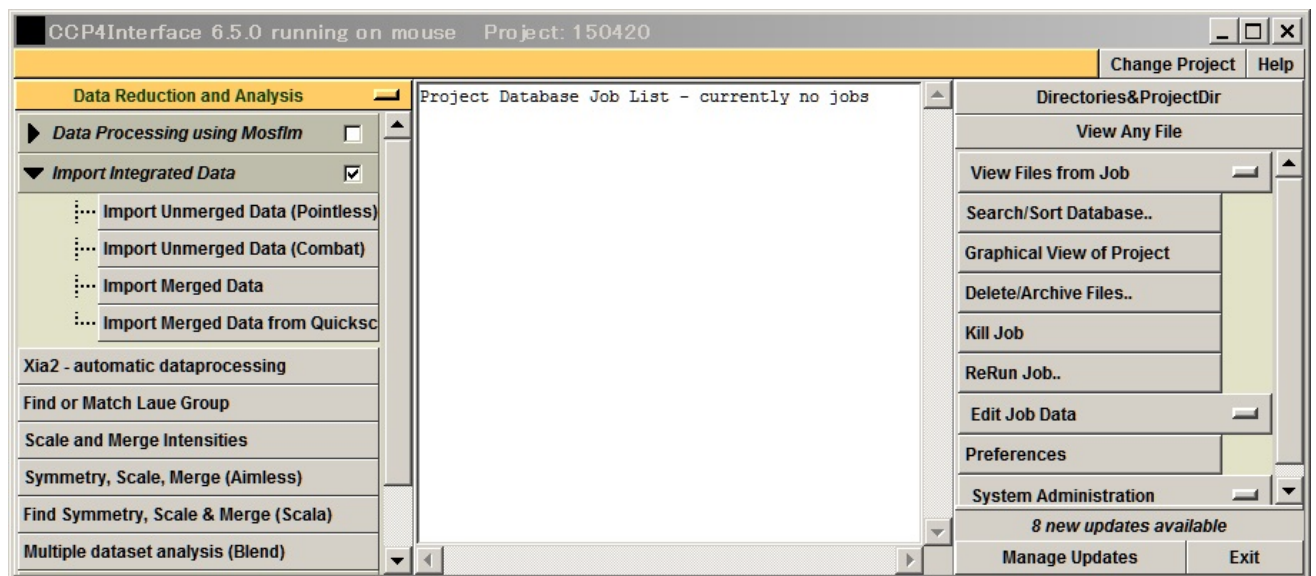
Program List

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

220

221

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



224

225

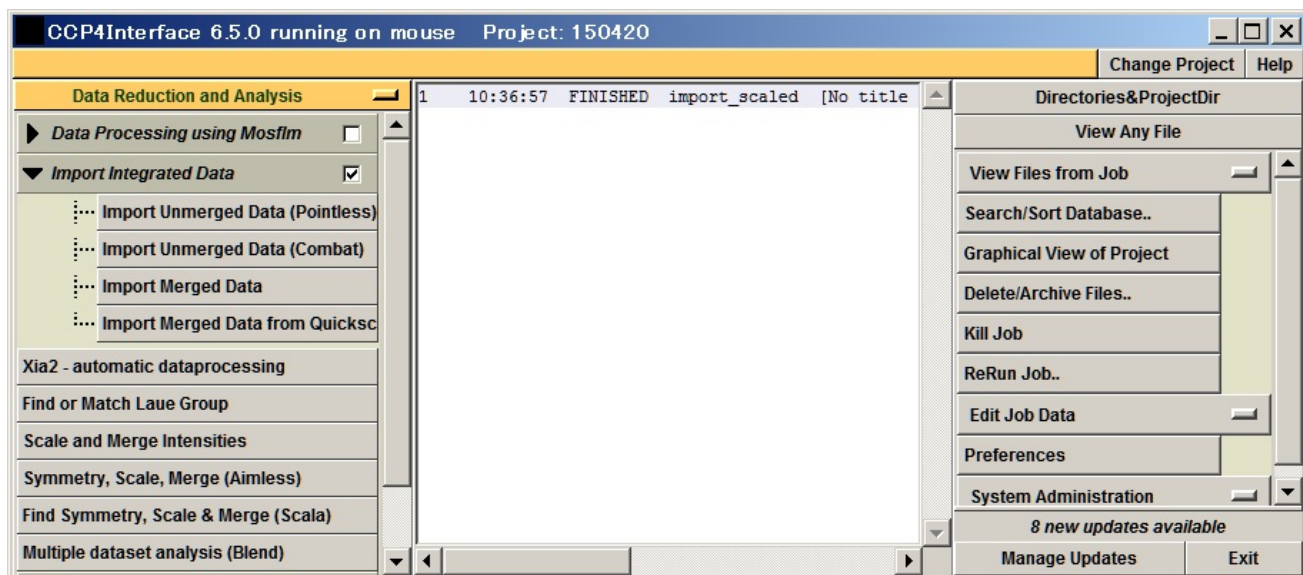
226



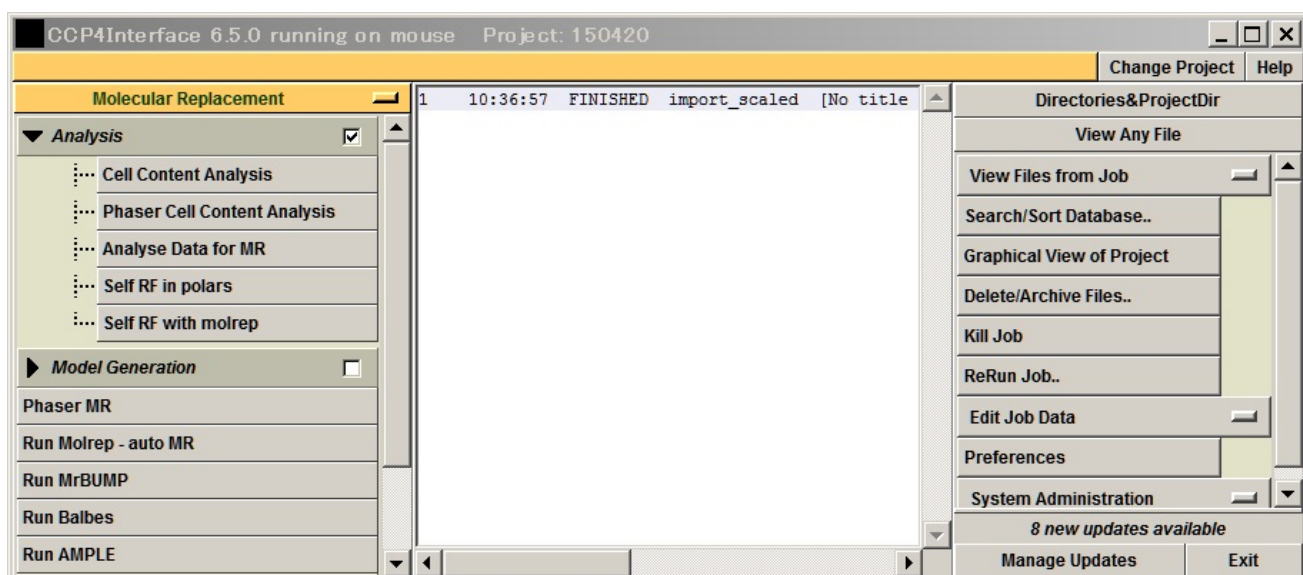
- 227 以下のようにチェックする。□
- 228 □ Use anomalous data(異常分散データでないので、チェックをはずす)
- 229 ■ Run Ctruncate to convert intensities to structure factors
- 230 ■ Keep the input intensities in the output MTZ file
- 231 ■ Ensure unique data & add FreeR column for 0.05 fraction of data.
- 232 □ Copy FreeR from another MTZ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

- 234
- 235 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。□
- 236 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)。
- 237 In 130418: s100a13.sca
- 238 Out 130418: s100a13.mtz
- 239 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。
- 240
- 241 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
- 242 (Angstrom)と入力するが、勝手に 1.0 に変換される。□

243 Data collected at wavelength: 1.0 Angstroms  
 244 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、  
 245 Estimated number of residues in the asymmetric unit:  
 246 は空欄のままにしておく。□  
 247 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。□  
 248 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)  
 249 ことが表示される。□



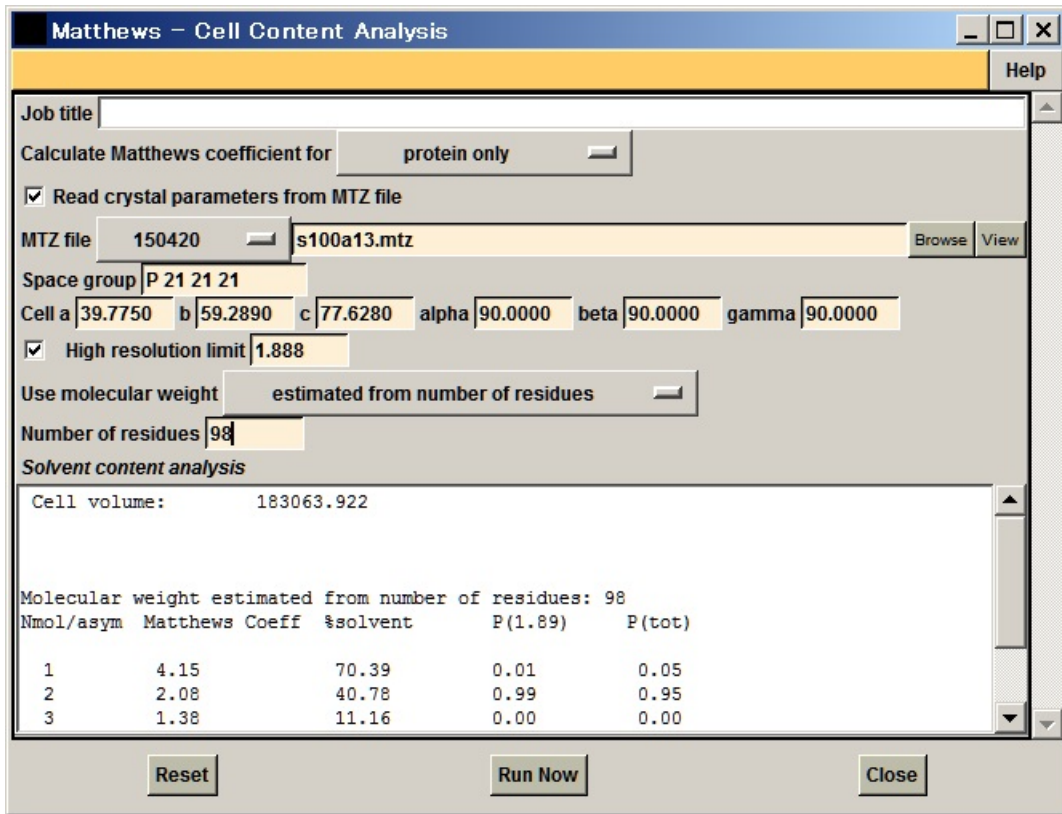
250  
 251  
 252 6. 分子置換法の準備として、非対称単位中の S100A13 分子数を見積もる。  
 253 (非対称単位 = 結晶中に現れる繰り返し構造の 1 つを取り出したもの。実際の結晶  
 254 中ではこの構造がある法則(対称性)にそって前後左右上下に繰り返されている)  
 255 左側の作業メニューから、Molecular Replacement → Analysis → Cell Content Analysis を選択すると  
 256 Matthews のウィンドウが開く。□



257  
 258 MTZ file として、s100a13.mtz を選択する。□  
 259 Use molecular weight: estimated from number of residues にして  
 260 Number of residues: 98 と入力する。□  
 261 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

262

率、確率(2通り)が表示される。□



263

264

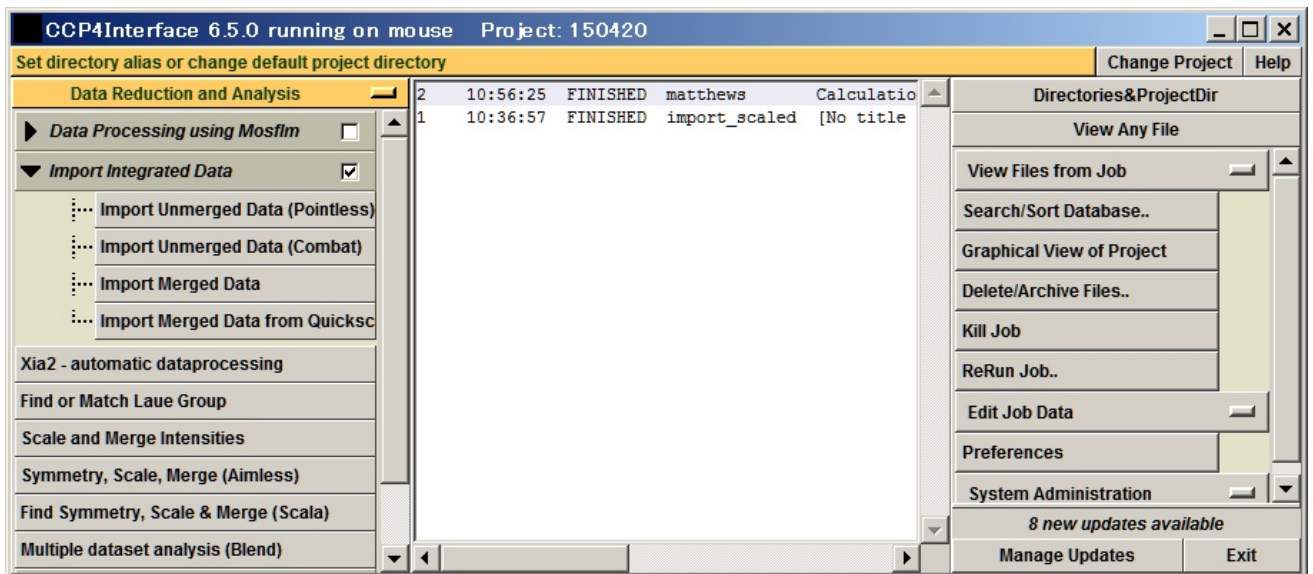
この場合、非対称単位中 S100A13 が 2 分子含まれると確定した。□

265

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

266

(FINISHED)ことが表示される。□



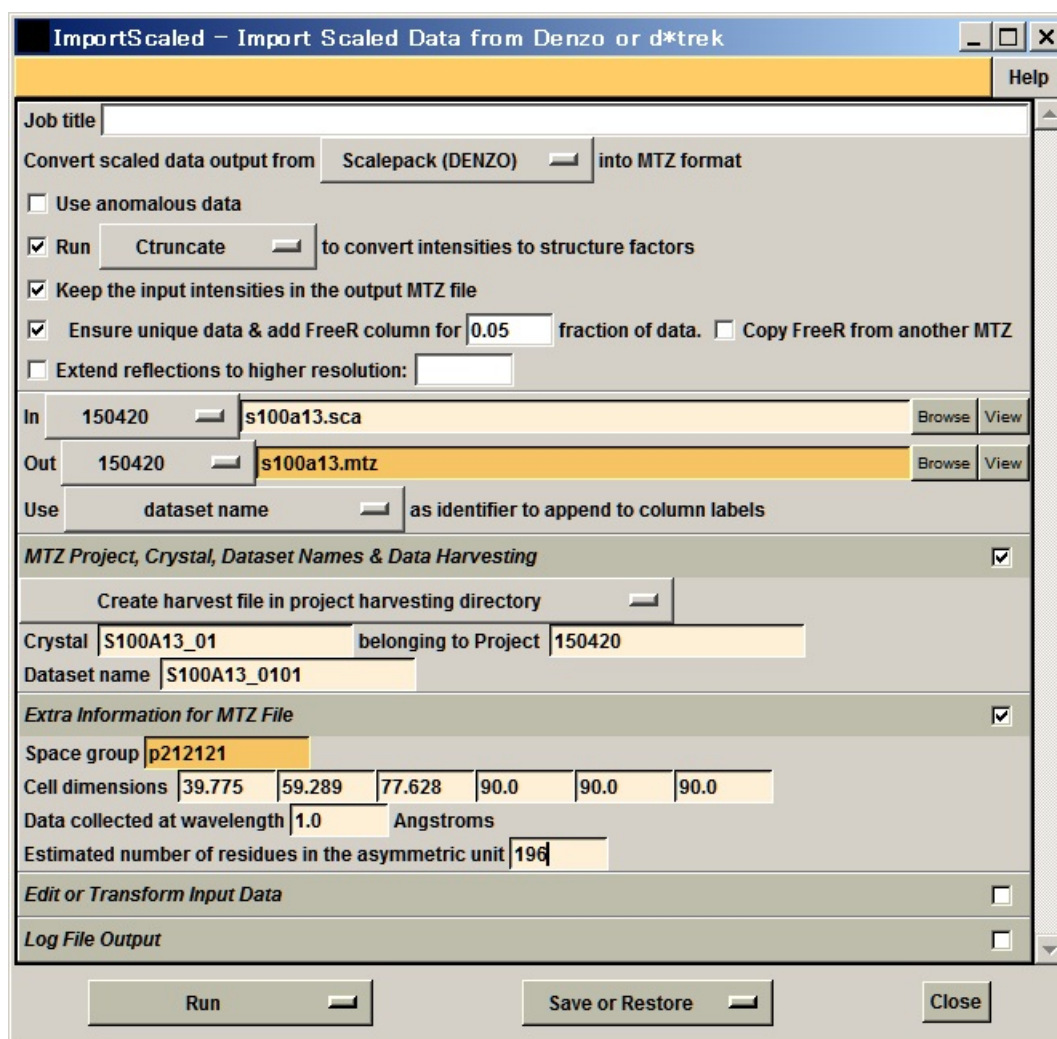
267

268

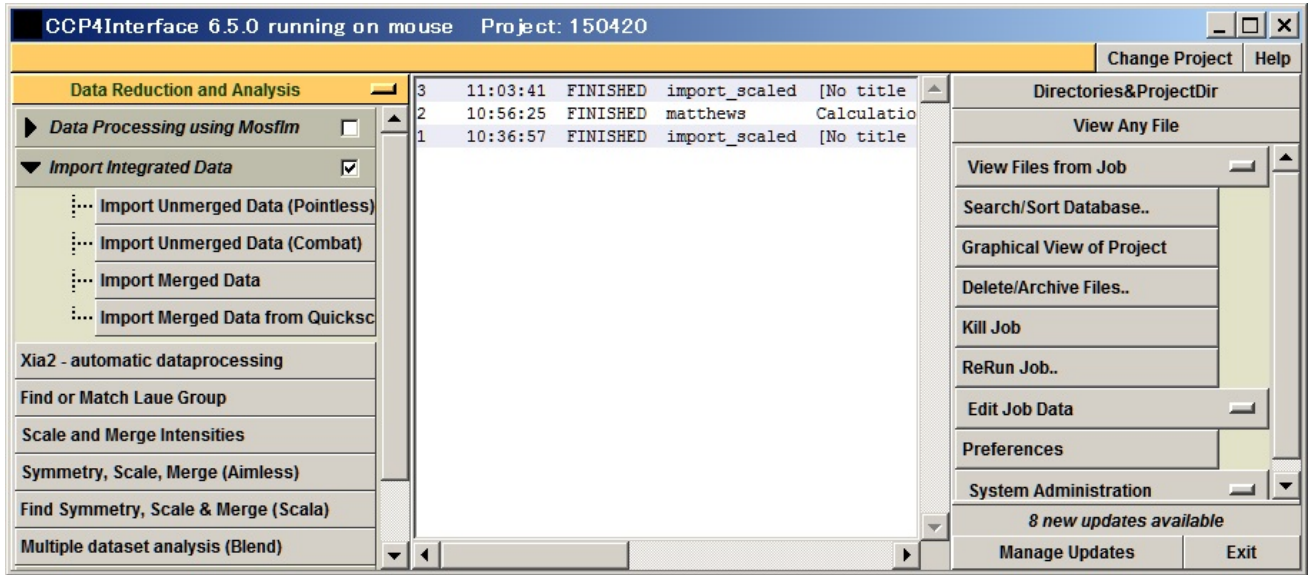
269



- 270 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。
- 271 左側の作業メニューから Data Reduction and Analysis → Import Integrated Data → Import Merged
- 272 Data を選択すると ImportScaled のウィンドウが開く。□
- 273 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
- 274 196 と入力する。□
- 275 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
- 276 が出るが、Continue ボタンを押して、上書きする。□
- 277 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
- 278 (s100a13.mtz) への書式変換が完了した。□



- 279 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
- 280 (FINISHED)ことが表示される。□
- 281

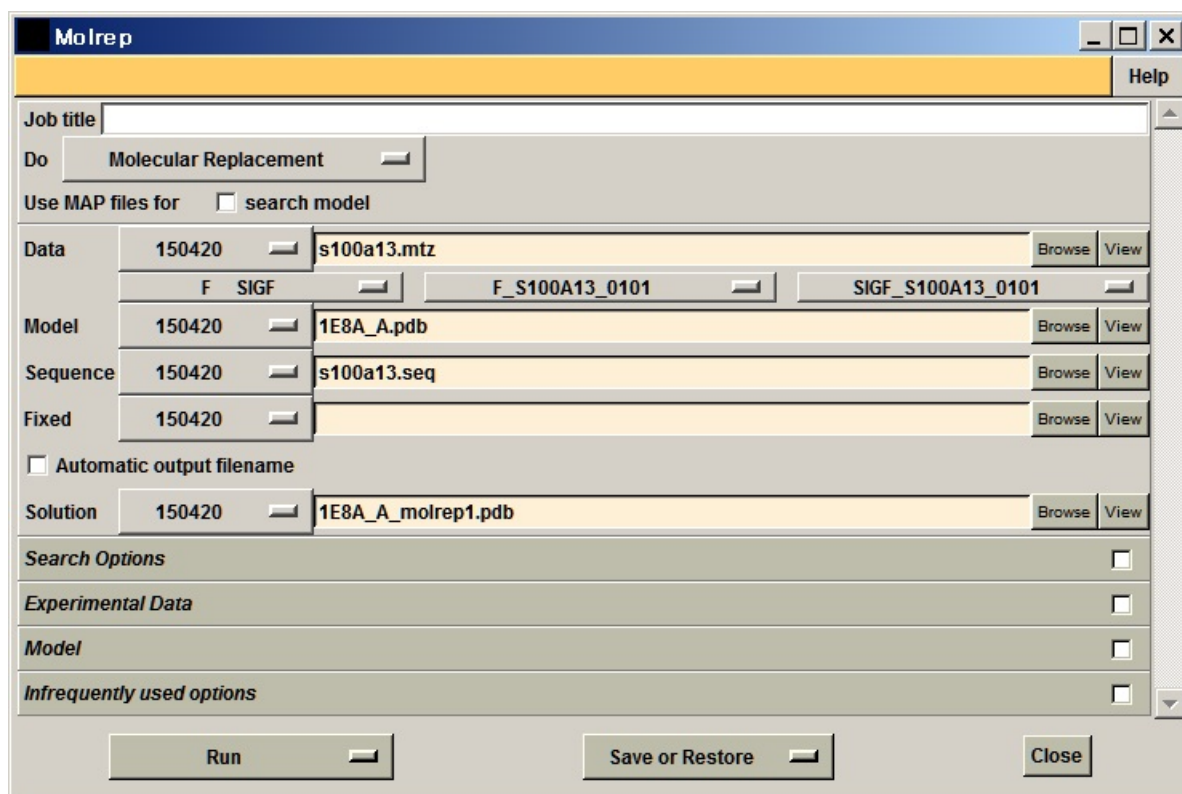


282

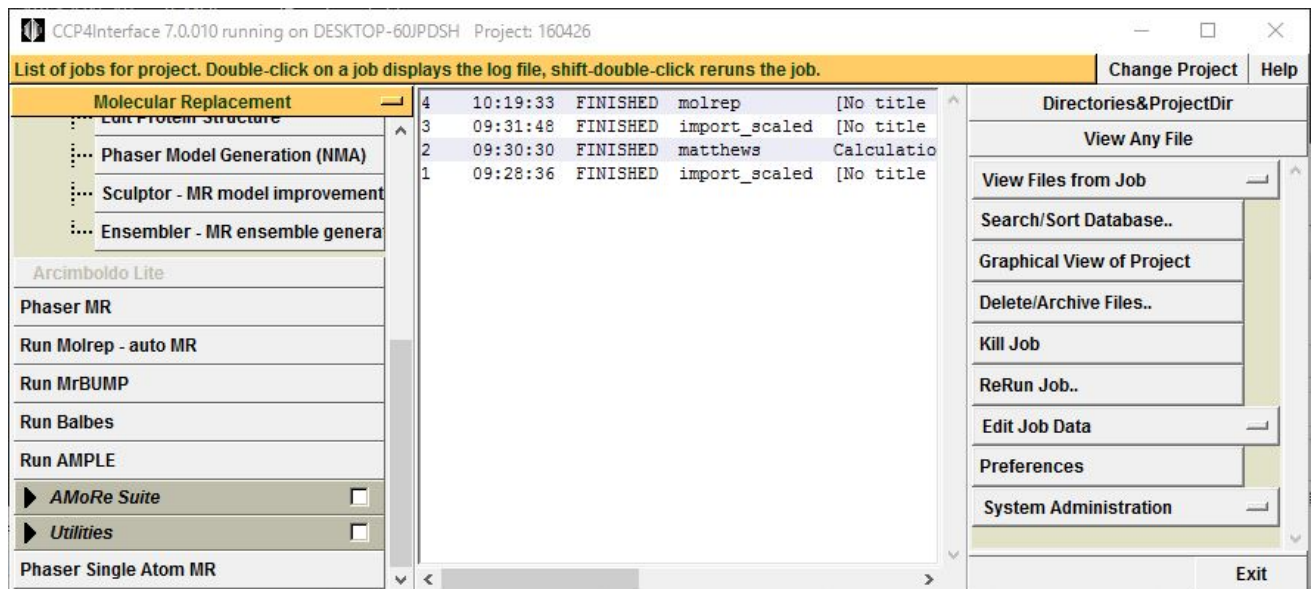
283



- 284 8. Molrep を用いて分子置換を実行する。
- 285 作業メニューから Molecular Replacement → Model Generation → Run Molrep - auto MR を選択すると、
- 286 Molrep のウィンドウが開く。□
- 287 以下のように設定する。□
- 288 Do: Molecular Replacement
- 289 Use MAP files for  search model (チェックしない)
- 290 入力ファイルは以下の 3 つ。□
- 291 Data: 160426: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)
- 292 Model: 160426: 1E8A\_A.pdb (立体構造既知配列類似タンパク質 S100A16
- 293 単量体(chain A)の原子座標ファイル)
- 294 Sequence: 130418: s100a13.seq (S100A13 のアミノ酸配列。FASTA フォーマット)
- 295 出力ファイル名は自動で設定される。
- 296 Solution: 160426: 1E8A\_A.pdb\_molrep1.pdb
- 297 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



- 298
- 299 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
- 300 ジョブが完了した(FINISHED)ことが表示される。□



301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

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 Job Result (new style) または View Log File (old style) 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。TF/sg、wRfac、Score の値に注目すると、上位 2 個の値が良い。□

--- Summary (V0) ---

	RF	TF	theta	phi	chi	tx	ty	tz	TF/sg	wRfac	Score
1	1	1	159.21	167.66	124.42	0.294	0.374	0.421	6.50	0.652	0.38560
2	4	1	47.98	-157.11	63.88	0.090	0.263	0.356	7.16	0.653	0.38534
3	20	12	57.75	141.17	49.40	0.234	0.459	0.080	3.34	0.666	0.35348
4	8	6	95.45	-157.64	75.28	0.280	0.414	0.073	3.91	0.666	0.35193
5	29	1	132.83	-80.39	149.26	0.309	0.226	0.232	4.28	0.666	0.35134
6	6	8	132.99	170.53	86.71	0.097	0.147	0.295	3.93	0.668	0.34889
7	16	10	71.27	-148.58	85.90	0.450	0.138	0.193	3.26	0.667	0.34784
8	17	15	57.87	139.09	47.78	0.226	0.114	0.018	3.25	0.665	0.34760
9	7	4	96.13	-158.34	76.14	0.282	0.413	0.073	4.30	0.667	0.34706
10	36	1	42.72	-151.16	76.94	0.129	0.099	0.022	3.66	0.672	0.34572

corrF = 0.4125  
 Scale Bscale = 1.5855 -11.1870  
 TF/sig = 6.50  
 Final CC = 0.4125  
 Packing\_Coeff = 1.0000  
 Contrast = 3.58

Nmon	RF	TF	theta	phi	chi	tx	ty	tz	TF/sg	wRfac	Score
1	1	1	107.90	-29.41	172.31	-0.294	-0.126	0.079	6.50	0.636	0.412

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、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、これを採用する。□

338

339 Number of monomers in fixed model\_2 : 1

340

341 --- Summary (V0) ---

342

	RF	TF	theta	phi	chi	tx	ty	tz	TF/sg	wRfac	Score	
343	1	4	1	47.98	-157.11	63.88	0.591	0.264	0.855	10.32	0.620	0.46179
344	2	36	1	42.72	-151.16	76.94	0.577	0.262	0.849	5.01	0.654	0.39795
345	3	5	1	40.94	69.00	136.59	0.008	0.264	0.144	4.70	0.653	0.38913
346	4	7	1	96.13	-158.34	76.14	0.310	0.811	0.382	5.24	0.653	0.38824
347	5	8	1	95.45	-157.64	75.28	0.311	0.809	0.381	5.06	0.654	0.38693
348	6	6	4	132.99	170.53	86.71	0.557	0.525	0.218	4.12	0.650	0.37991
349	7	37	10	136.40	165.04	79.64	0.401	0.166	0.834	3.34	0.654	0.37553
350	8	16	10	71.27	-148.58	85.90	0.990	0.770	0.326	3.16	0.652	0.37551
351	9	20	4	57.75	141.17	49.40	0.681	0.278	0.847	3.50	0.658	0.37518
352	10	17	1	57.87	139.09	47.78	0.681	0.278	0.846	3.47	0.659	0.37474

353

354

355

356

357 corrF = 0.4987

358 Scale Bscale = 1.5855 -11.1870

359 TF/sig = 10.32

360 Final CC = 0.4987

361 Packing\_Coef = 1.0000

362 Contrast = 4.22

363 CC\_for\_fixed\_model: 0.4125

364

365 Nmon RF TF theta phi chi tx ty tz TF/sg wRfac Score

366 2 4 1 155.15 112.89 138.52 -0.091 -0.264 0.355 10.32 0.598 0.499

367

368 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、TF/sg 値と Score 値が上がる。□

369 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。□

370 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

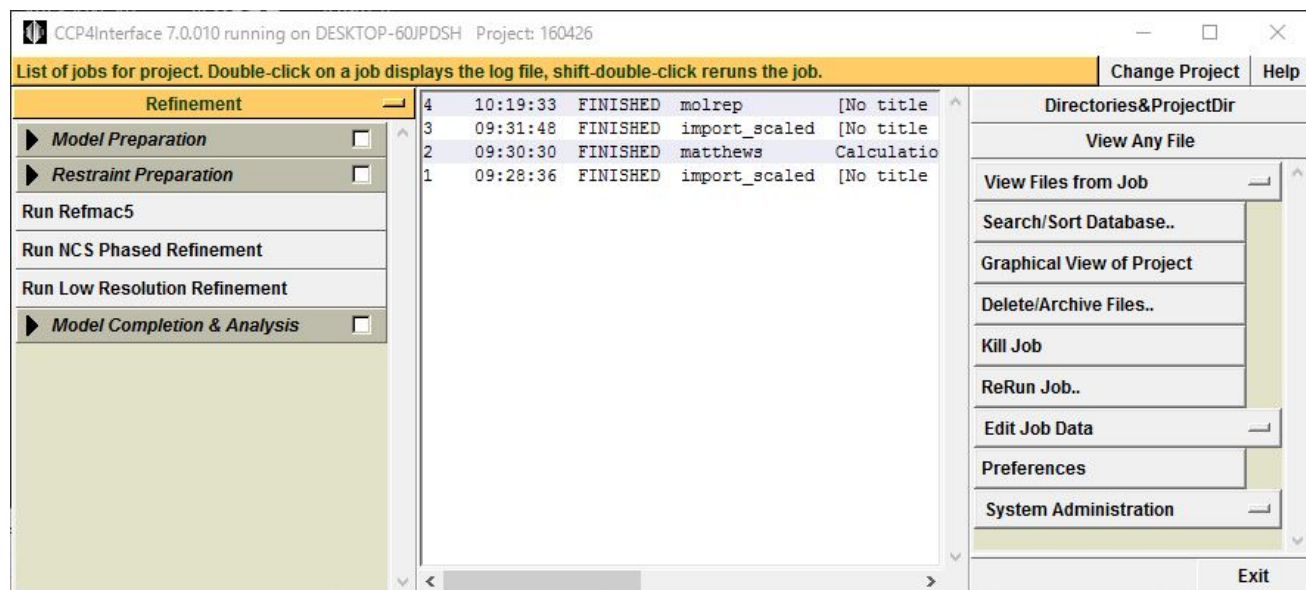
371 とよく合う位置と向きが見つかった(かもしれない)、と理解してください。□

372

373

374

- 375 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。  
 376 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。□



377  
 378 以下のように設定する。□

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

380 □ Input fixed TLS parameters

381 no twin refinement

382 入力ファイルは以下の 2 つ。□

383 MTZ in: 160426: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)

384 PDB in: 160426: 1E8A\_A\_molrep1.pdb (分子置換法で得られた

385 原子座標ファイル。

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

387 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

388 2 分子)

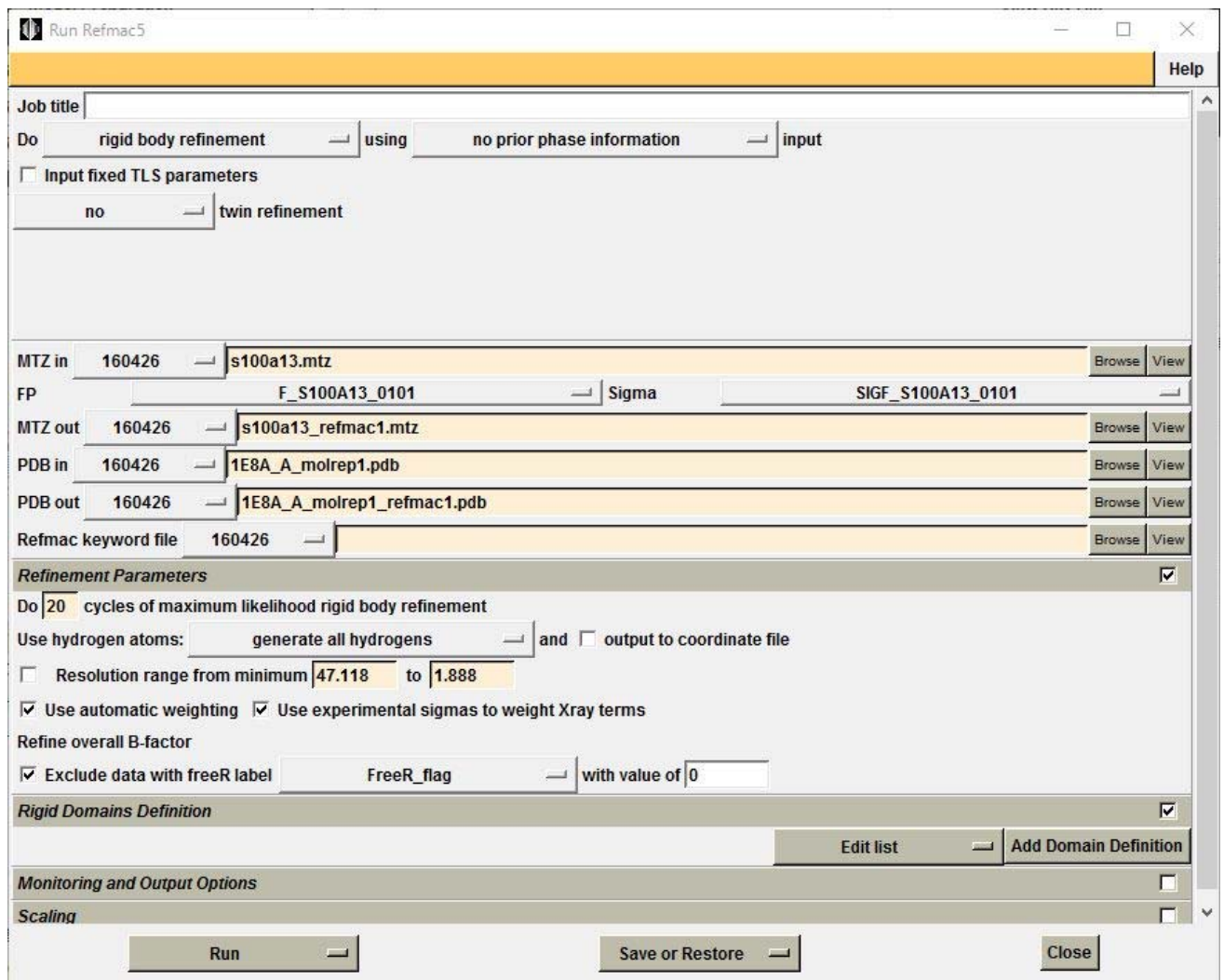
389 出力ファイル名は自動で設定される。

390 MTZ out: 160426: s100a13\_refmac1.mtz

391 PDB out: 160426: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac1.pdb

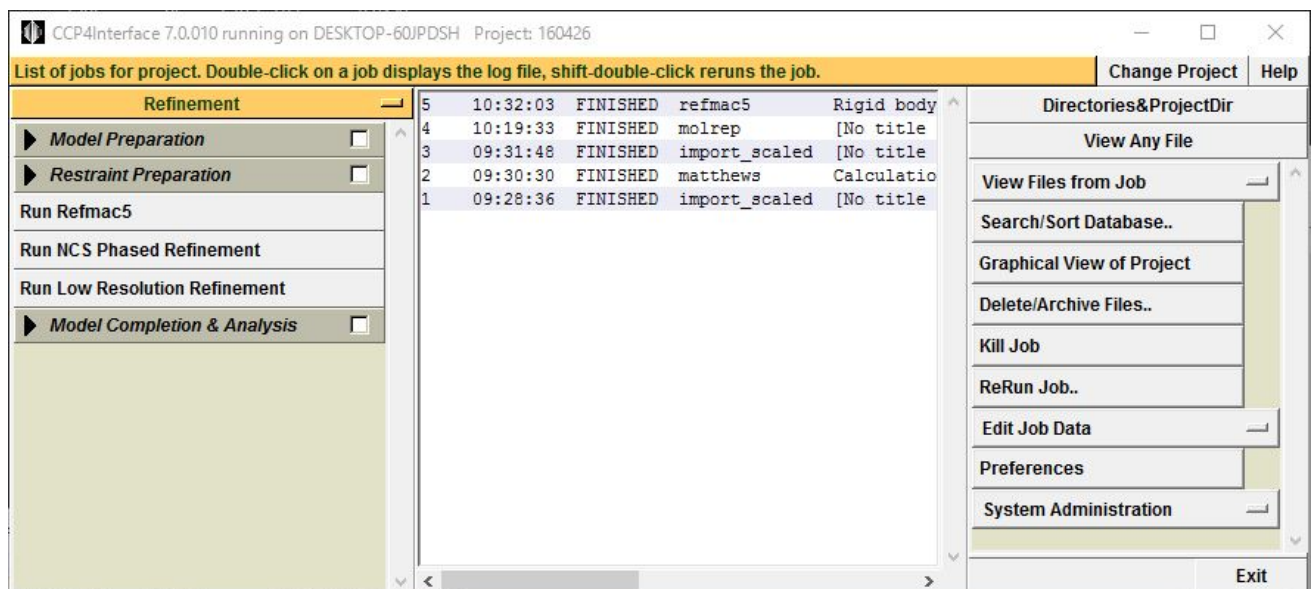
392 Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 20 から 5 に減らしても良い。

393 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



394  
395  
396

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。□

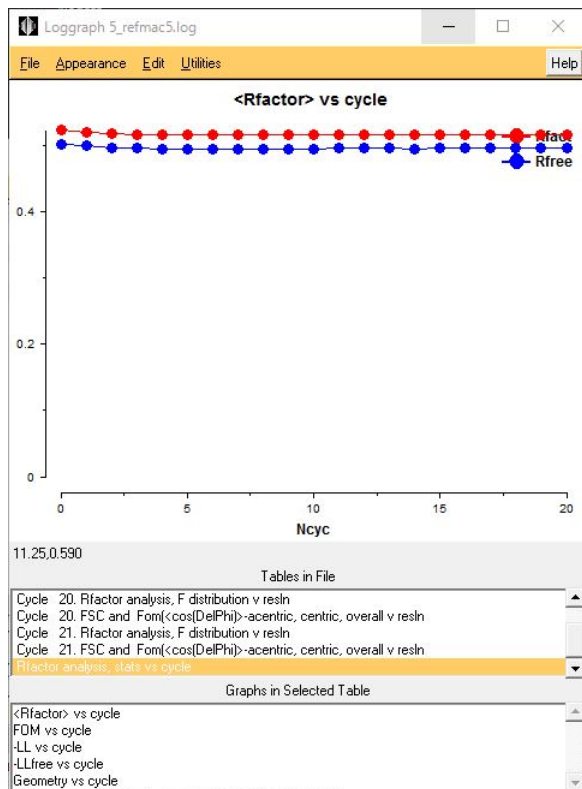


397  
398  
399  
400  
401

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、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



402 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  
403 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。□

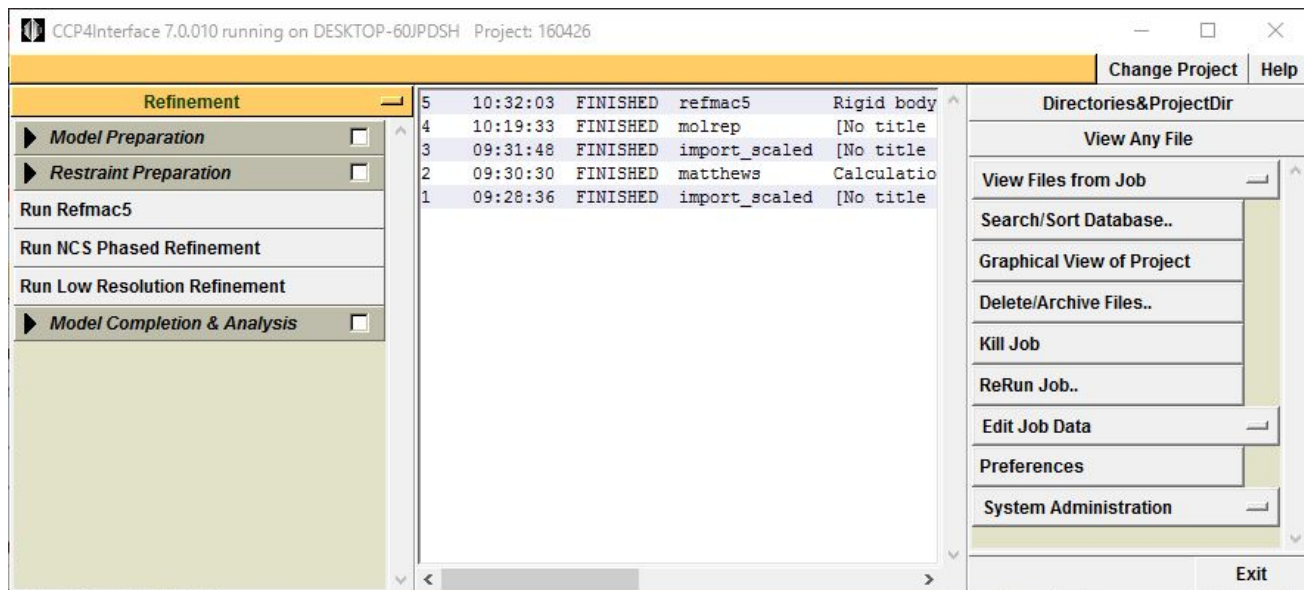


404

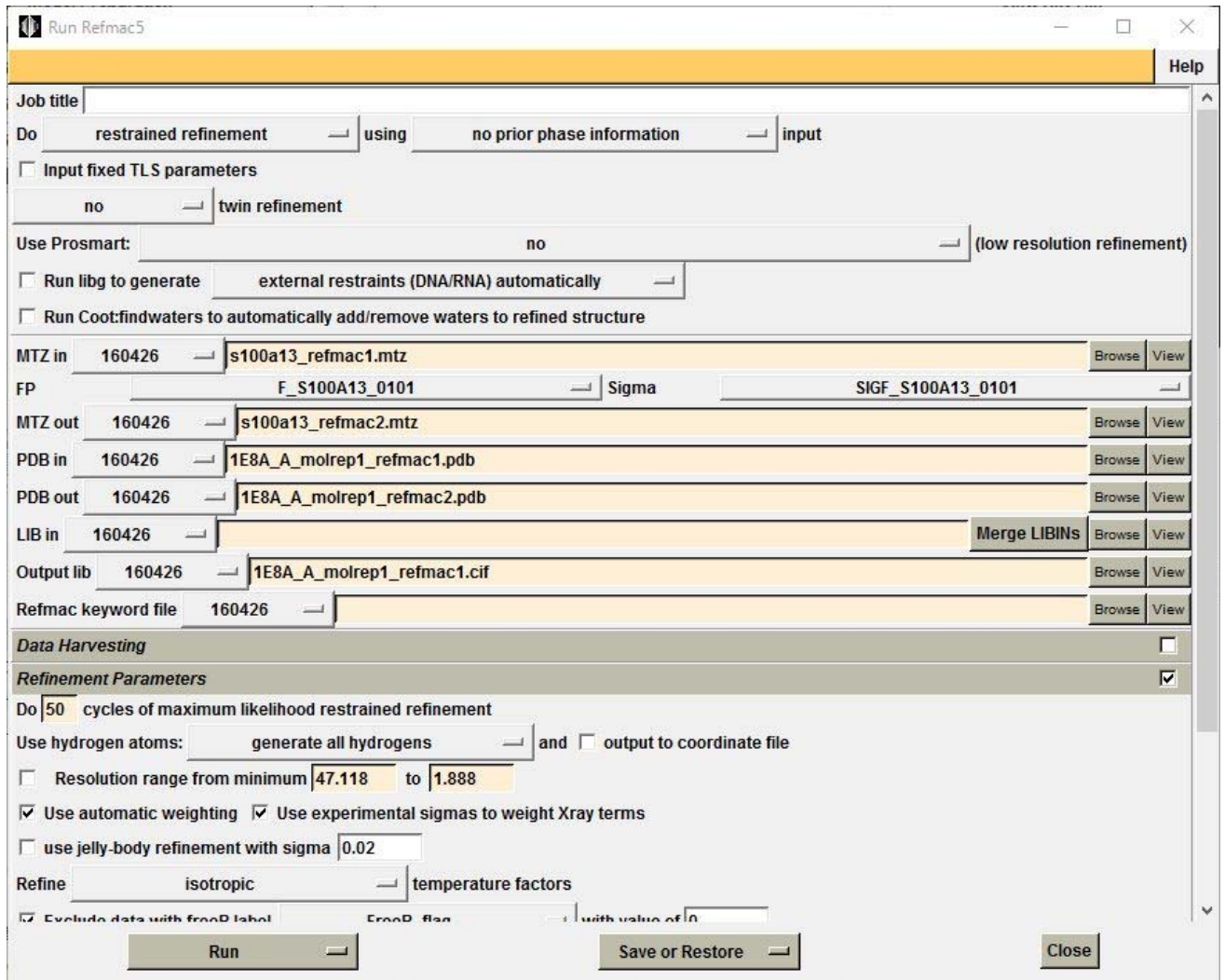
405

406

- 407 10. Refmac を用いて、次に restrained 構造精密化を行う。  
 408 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。□

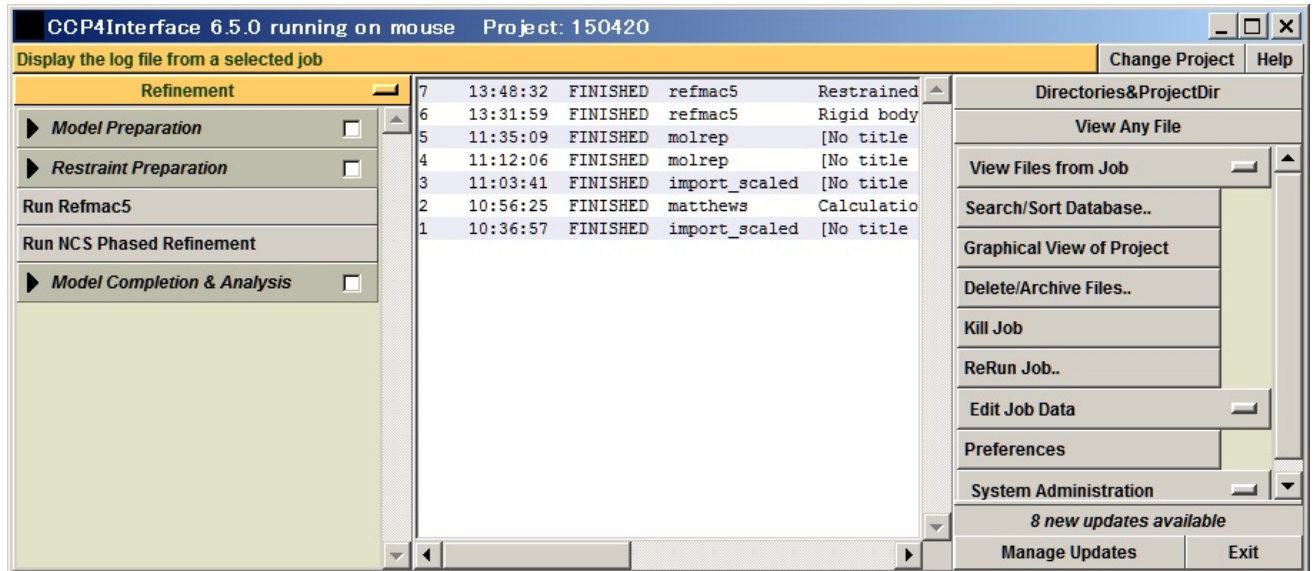


- 409  
 410 以下のように設定する。□  
 411 Do: restrained refinement using: no prior phase information  
 412 □ Input fixed TLS parameters  
 413 no twin refinement  
 414 Use Prosmart: no  
 415 □ Run libg to generate external restraints (DNA/RNA) automatically  
 416 □ Run Coot:findwaters to automatically add/remove waters to refined structure  
 417 入力ファイルは以下の 2 つ。□  
 418 MTZ in: 160426: s100a13\_refmac1.mtz  
 419 (rigid body 構造精密化後の X 線回折データ)  
 420 PDB in: 160426: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac1.pdb  
 421 (rigid body 構造精密化後の原子座標)  
 422 出力ファイル名は自動で設定される。  
 423 MTZ out: 160426: s100a13\_refmac2.mtz  
 424 PDB out: 160426: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2.pdb  
 425 Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 10 から 50 に増やした方がよい。  
 426 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



427  
428  
429

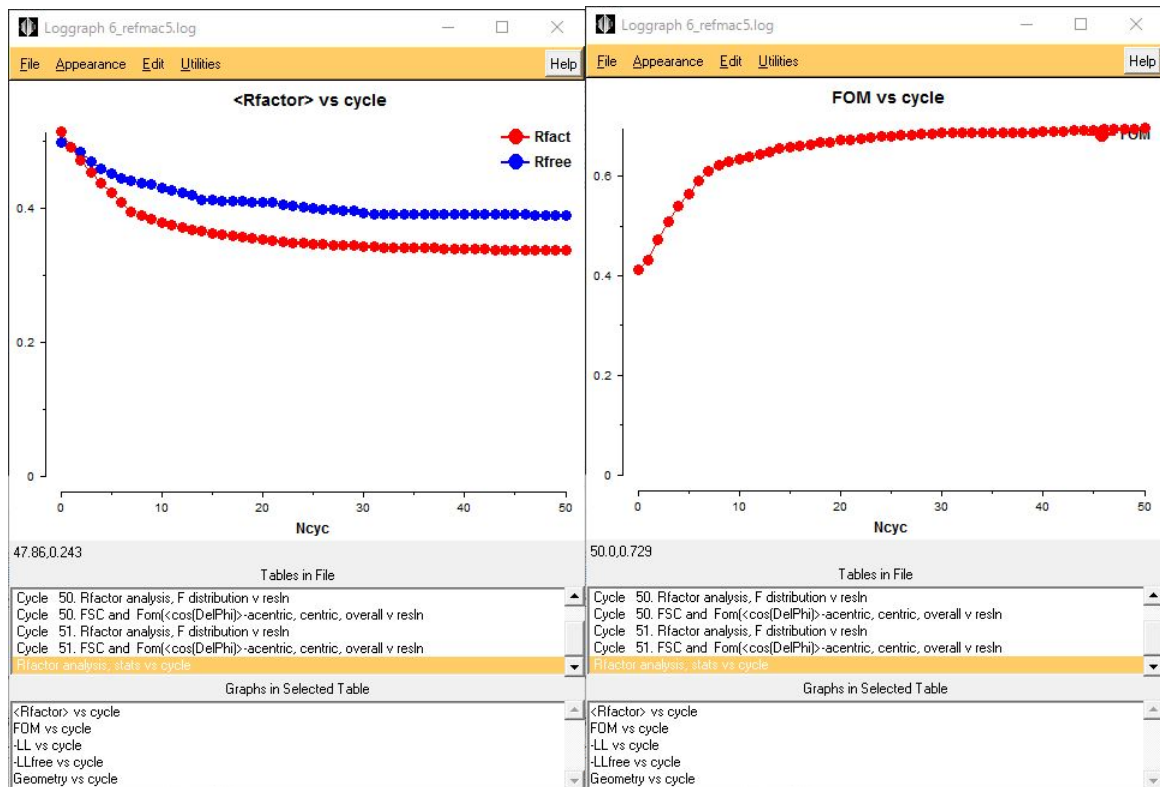
restrained 構造精密化の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"refmac5" という 6 個目のジョブが完了した (FINISHED) ことが表示される。□



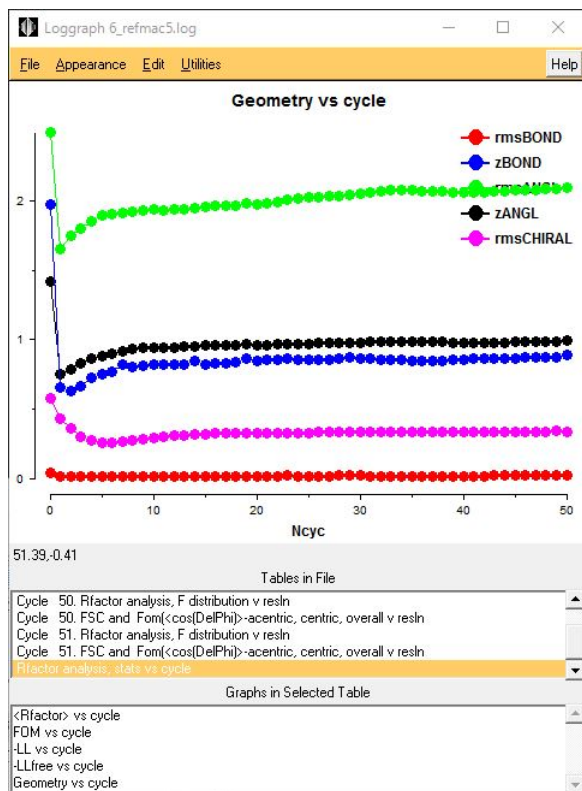
430  
431  
432  
433  
434  
435

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

436 様を確認できる。Graphs in Selected Table → <Rfactor> vs cycle でサイクル毎に FOM vs cycle でサ  
 437 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。□



438



439

440 Graphs in Selected Table → Geometry vs cycle で rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRAL(それぞれ結合  
 441 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。

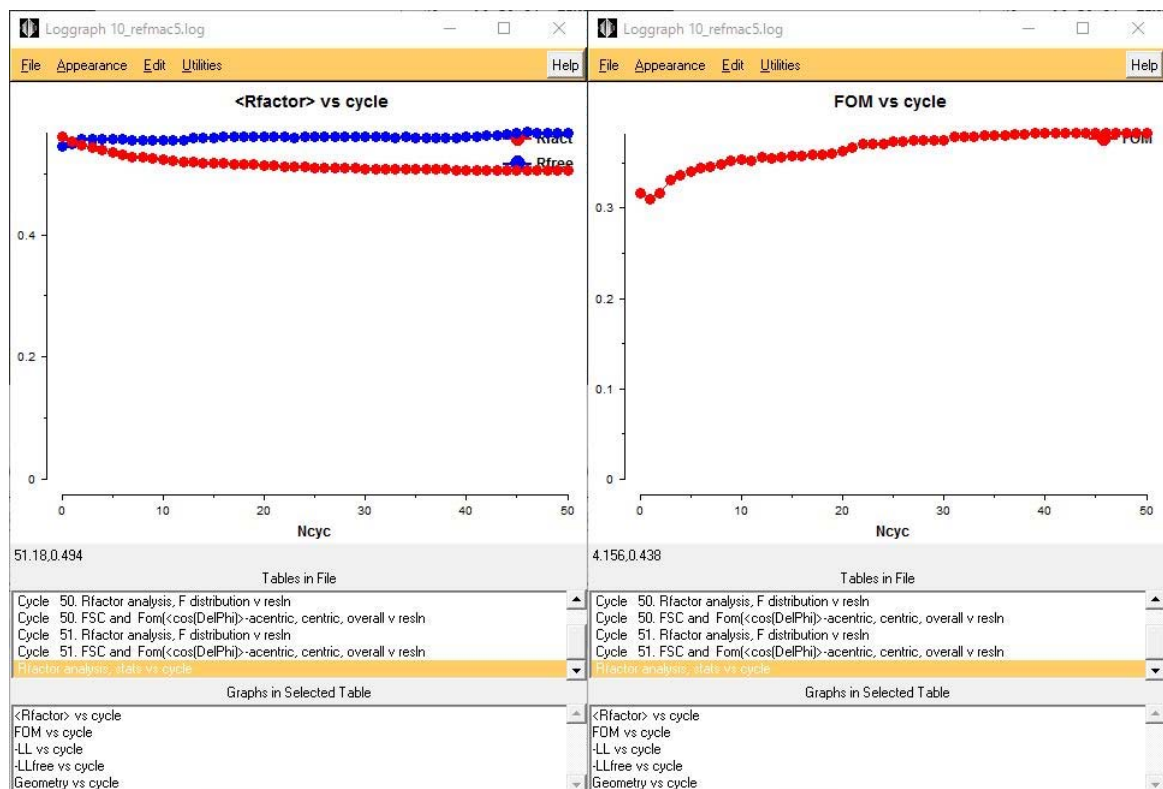
442

443 Refmac5を用いた restrained refinement の結果、

444 R factor は 33.7%、free R factor は 39.0%まで下がった。

445 (構造精密化計算に使用する回折データは全体の 95%。  
 446 残り 5%の回折データの R factor を free R factor と呼ぶ。  
 447 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)  
 448 FOM は 69.6%まで上がった。  
 449 rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRA のいずれも初期値より下がった。□  
 450 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。

451  
 452 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。  
 453 今回モデル(鑄型)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  
 454 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  
 455 Selected Table → <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  
 456 (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。



457  
 458 分子置換に失敗しても、あきらめず、以下のことを試す。  
 459 (1) モデル構造に別の PDB 座標を用いる。  
 460 (2) Phaser MR など Molrep 以外の分子置換プログラムを使う。  
 461 (3) Model Generation にあるツールを使って PDB 座標を修飾してみる。  
 462 (4) 経験者に聞く。  
 463  
 464



465 (2) Coot で分子モデルを電子密度に合わせてみましょう

466

467 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。

468 □

469 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 ..  
470 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。

471

472 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。

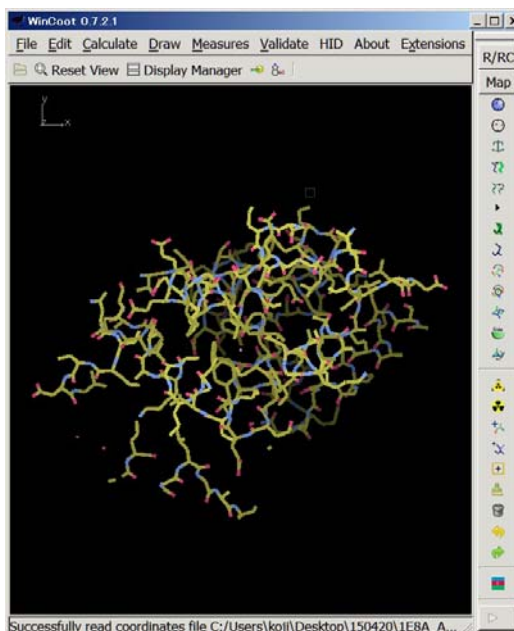
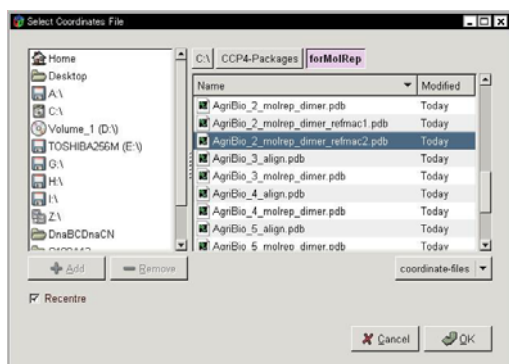
473

474 まず、構造精密化した原子座標ファイルを開きます。

475 WinCoot: File → Open Coordinates...。

476 Places: 160426

477 Select Coordinates File: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2.pdb → OK。



478

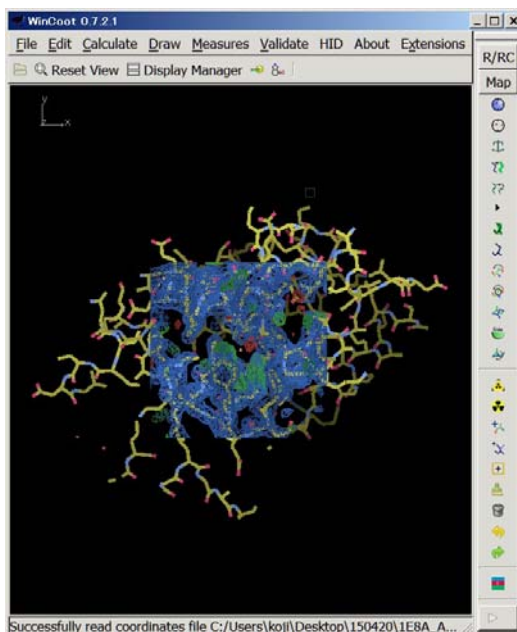
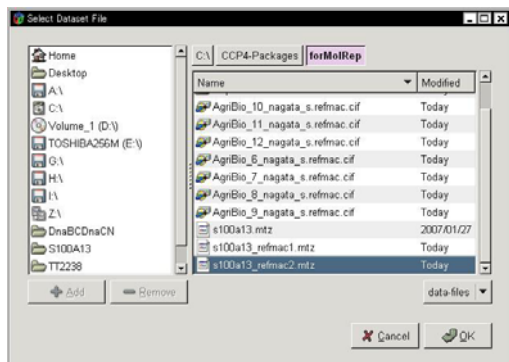
479

480 次に、精密化した X 線回折データファイルを開きます。

481 WinCoot: File → Auto Open MTZ...。

482 Places: 160426

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



484

485

486 電子密度マップの表示領域を半径 20 Å に設定します。

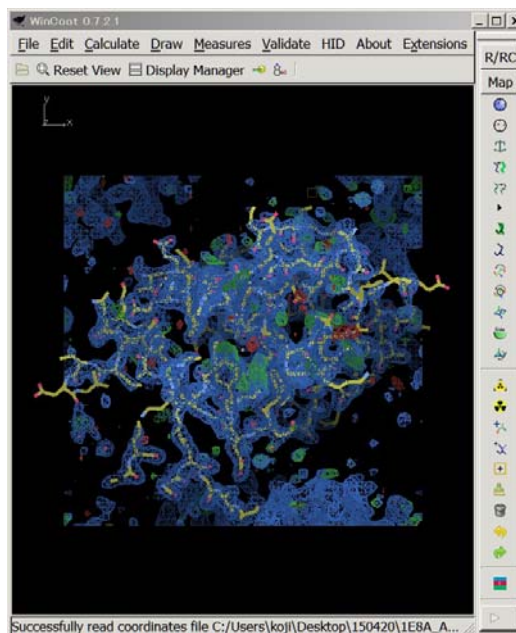
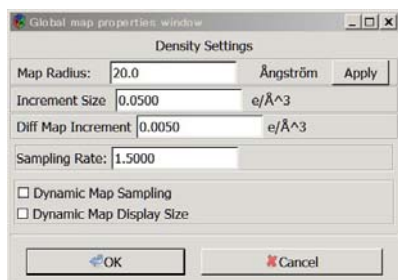
487 WinCoot: Edit → Map Parameters...。

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

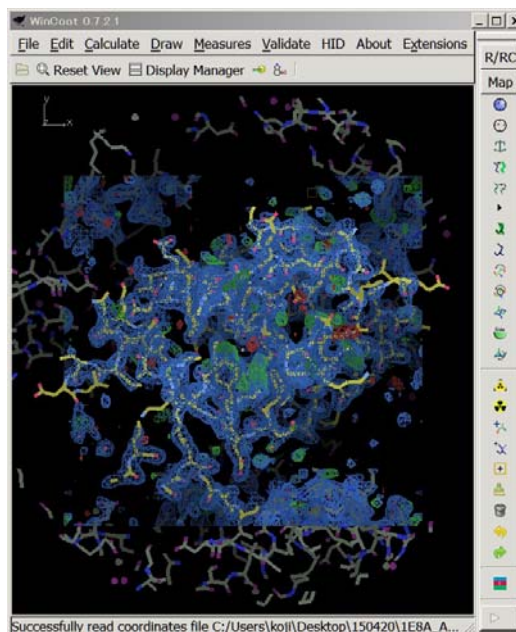
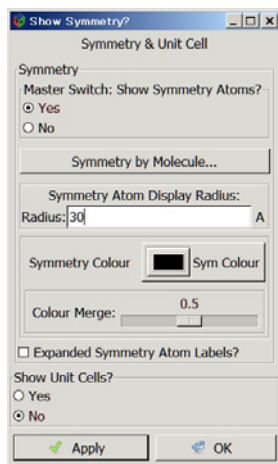
489

490

- 491 電子密度のうち、  
492 青は、 $2F_o - F_c$  マップと呼び(o = observed、c = calculated )、電子の存在位置を示します。  
493 赤と緑は、 $F_o - F_c$  マップのそれぞれ正と負を示し、  
494 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  
495 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  
496 で示されています。  
497 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  
498 行きます。



- 499  
500  
501 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  
502 します。  
503 WinCoot: Draw → Cell & Symmetry...。  
504 Symmetry/Master Switch: Show Symmetry Atoms? → Yes。  
505 Symmetry Atom Display Radius: 30 Å → OK。



506

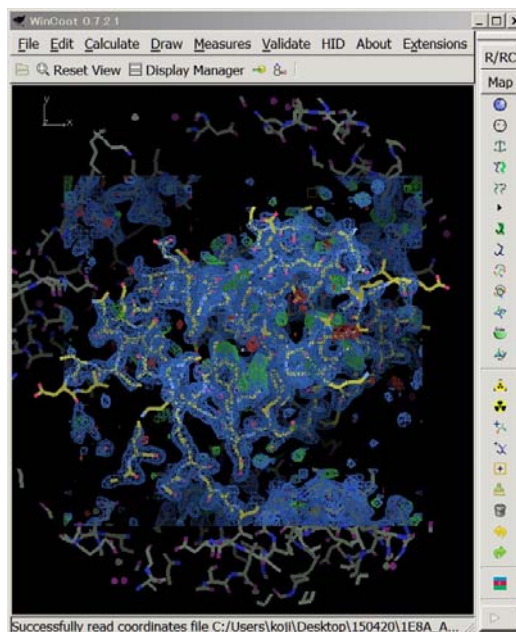
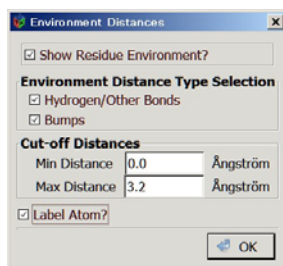
507

508 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。

509 WinCoot: Measures → Environment Distances...

510 Environment Distances: ■ Show Residue Environment?

511 ■ Label Atom? → OK.



512

513

514 WinCoot: Draw → Go To Atom...

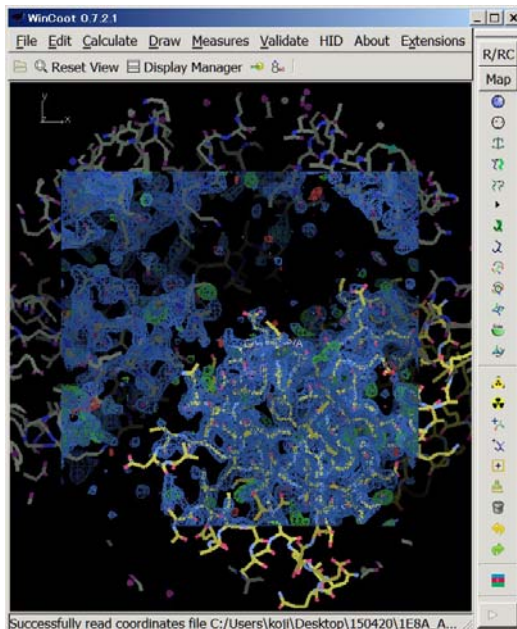
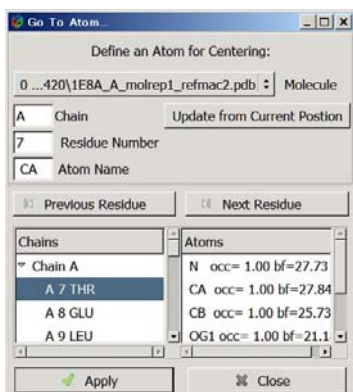
515 Go To Atom...: Chain A → A 7 THR → Apply → Close.

516 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。

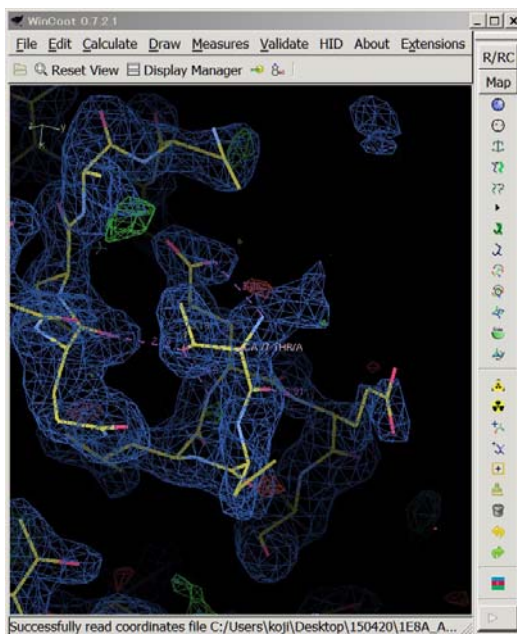
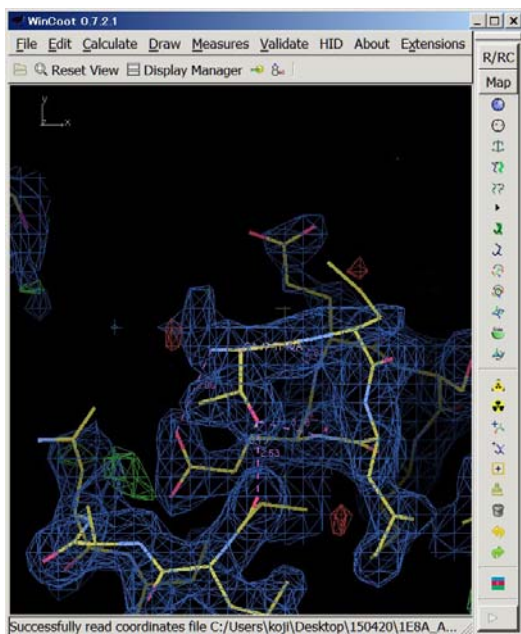
517 右ドラッグ(右から左へ)で、指定したアミノ酸残基を中心に縮小する。



518



519



520

521 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。

522 スペースバーを押すと次のアミノ酸残基に移動する。

523 Shift + スペースバーを押すと前のアミノ酸残基に移動する。

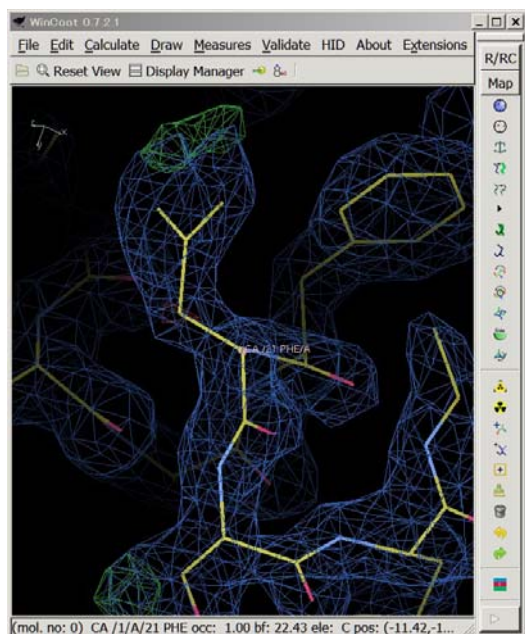
524

525 ここまでが、Coot の使用法の簡単な説明です。

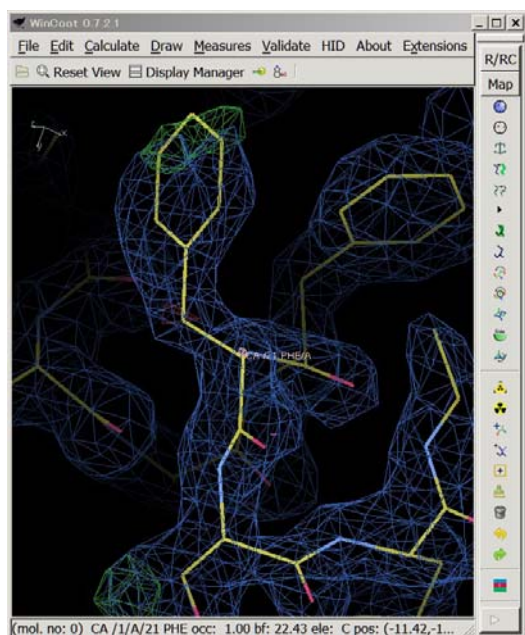
526

527

- 528      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。
- 529      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。
- 530
- 531      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。



- 532
- 533      WinCoot: Calculate → Model/Fit/Refine...。
- 534      Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...。
- 535      Choose a Map: 1 s100a13\_refmac2.mtz FWT PHWT を選択し、OK。(不要?)
- 536      Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...。(不要?)
- 537      WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。
- 538      Resi...: PHE (F)。



- 539
- 540      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
- 541      てください。
- 542      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。

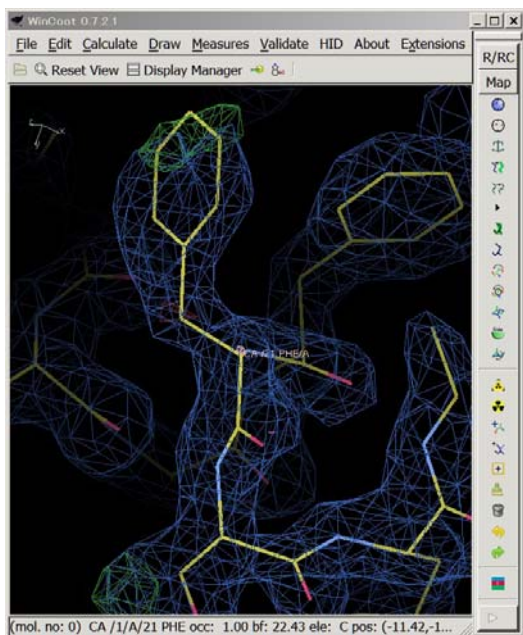
543

544 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。

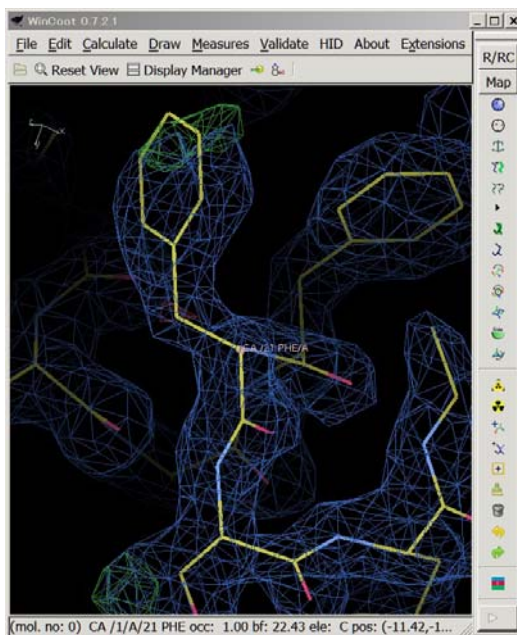
545 Model/Fit/Refine: Simple Mutate...

546 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。

547 Resi...: PHE (F)。



548



549 前回 Mutate & Auto Fit...

今回 Simple Mutate...

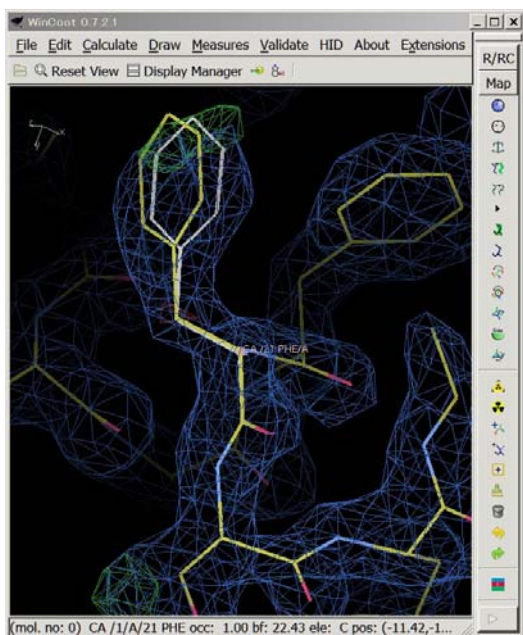
550 さきほど違って、分子モデルと電子密度とが微妙にずれています。

551 Model/Fit/Refine: Real Space Refine Zone。

552 WinCoot: 21 PHE/A の任意の原子をダブルクリック。

553 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。

554 Accept Refinement?: Accept。



555

Accept Refinement?

Accept Refinement?

Bonds:	1.659
Angles:	0.756
Planes:	1.372
Chirals:	0.649
Non-bonded:	0.000

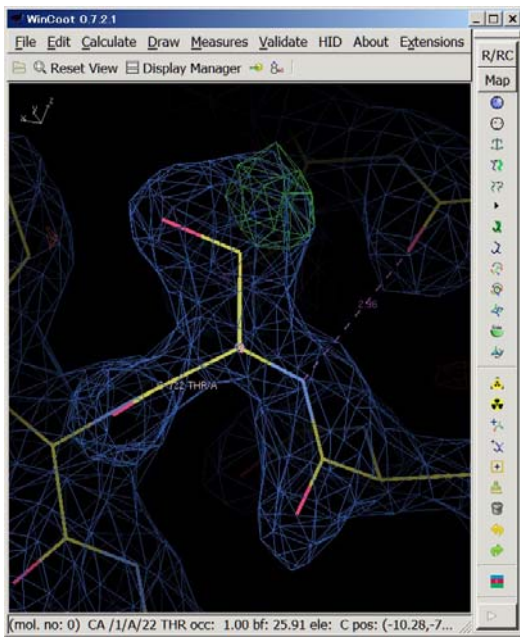
Accept Reject

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

557



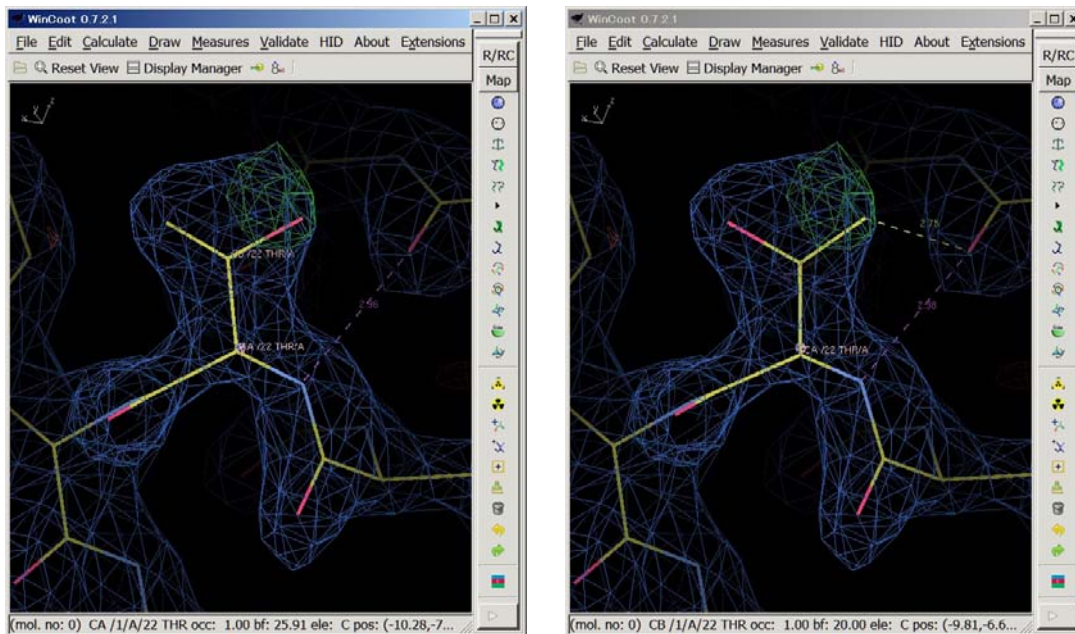
- 558 スペースバーを押して、次のアミノ酸残基 22 THR/A に進みます。
- 559 課題： 22 THR/A の分子モデルの側鎖が SER になっていて、電子密度と合っていません。
- 560 これを修正してください(5 分間 自分でやってみる。質問は受け付けます)。



- 561
- 562 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。



563 考えられる解答は以下の2通り。どちらが適切な解か？



564

565 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。



566

567 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。

568 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,  
569 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。

570

571 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  
572 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  
573 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  
574 正することにしてそのまま放置しておきます。

575 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  
576 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。

577 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。

578 WinCoot: File → Save Coordinates...

579 Select Molecular Number to Save: 0 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2.pdb → Select Filename...

580 Places: 160426

581  Save Hydrogens  Save ANISO Records

582 Name: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2-coot-0.pdb → Save。

583 これが提出用ファイル 1 個目です。

584

585  
586 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  
587 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。  
588 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。  
589 WinCoot: File → Open Coordinates...。  
590 Places: 160426  
591 Select Coordinates File: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2\_forAutoRefinement.pdb → OK。  
592  
593 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。  
594 WinCoot: Extensions → All Molecule → [Post MR] Fill Partial Residues →  
595 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2\_forAutoRefinement.pdb → OK  
596  
597 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、  
598 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。  
599  
600 2 通りの方法があります。  
601  
602 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  
603 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。  
604 WinCoot: Extensions → All Molecule → Fit Protein → 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2\_forAutoRefinement.pdb  
605 → OK  
606  
607 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  
608 法です。  
609 WinCoot: Extensions → All Molecule → Stepped Refine →  
610 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2\_forAutoRefinement.pdb → OK  
611  
612 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。  
613  
614 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。  
615 WinCoot: File → Save Coordinates...。  
616 Select Molecular Number to Save: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2\_forAutoRefinement.pdb → Select  
617 Filename...  
618 Places: 160426  
619  Save Hydrogens  Save ANISO Records  
620 Name: 1E8A\_A\_molrep1\_refmac2\_forAutoRefinement-coot-0.pdb → Save。  
621 これが提出用ファイル 2 個目です。  
622  
623  
624

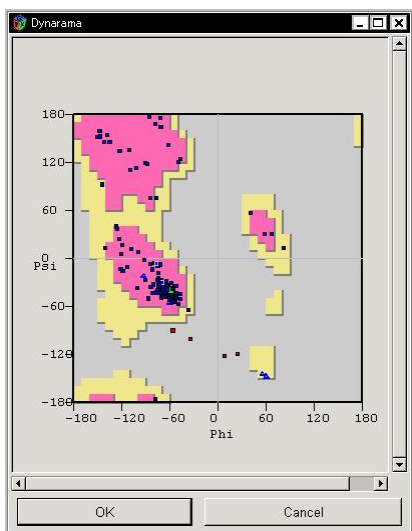
625 原子座標をできるだけ電子密度に合わせて、WinCoot: Validate の種々のメニューを使って、立体構造  
626 の不適切な箇所を見つけ出し、修正して行きます。

627  
628 まず、Ramachandran プロットで、主鎖の二面角( $\phi$ ,  $\psi$ )の分布が適切かどうか調べます。不適切な残基は修正  
629 します。

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

631 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  
632 ると、そのアミノ酸残基を表示する。

633 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  
634 が難しい。



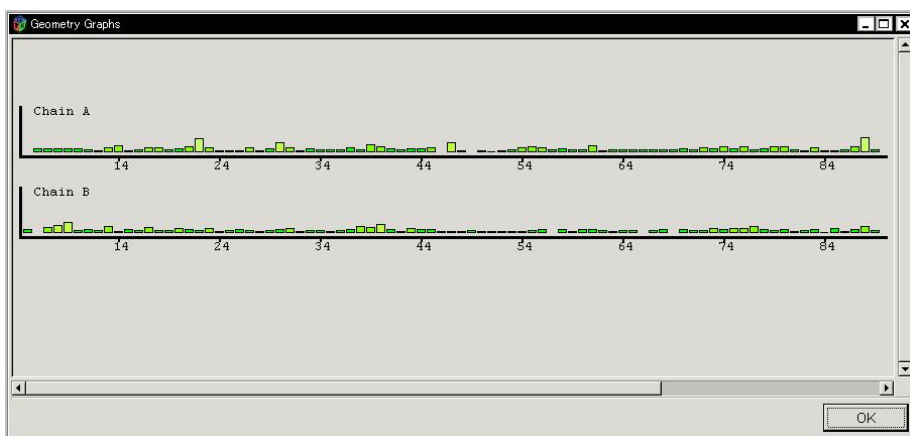
635  
636

637 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。

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

639 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。

640 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。



641  
642  
643  
644  
645

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

646 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。  
647 WinCoot: File → Save Coordinates...  
648 Save Coordinates Molecule Selector: Save Molecule Number to Save: 0 \*\*\*\*\*.pdb → Select Filename...  
649 Save Filename for Saved Coordinates: Name: デフォルトのまま(\*\*\*\*-coot-1.pdb) → Save in folder:  
650 CCP4 で指定したフォルダ → OK  
651  
652 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  
653 小さくなっている(改善されている)はずです。  
654  
655 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  
656 構造解析が完了します。  
657  
658 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。  
659  
660



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

662

663 13. PDB のWEB サイト( <http://www.pdb.org> )でキーワード検索

664 “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 navigation links for "Search", "Advanced", and "Browse". The main content area is titled "Biological Macromolecular Resource" and includes sections for "Molecule of the Month" (RecA and Rad51), "Protein Structure Initiative Featured System" (New NTF2-like Domains), and "Explore Archive". The left sidebar contains links for "Customize This Page", "Available on the App Store", "ANDROID APP ON Google play", "PDB-101", "MyPDB", "Home", "Deposition", and "Tools". The right sidebar contains "New Features", "Latest release: April 2014", "RCSB PDB News", "Resources for High School Video Challenge", and "New Structures".

665

666

667 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

668

669 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/pdb4he7/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  $\alpha$ -helix in the crystal structure. Secondly, the atomic r.m.s.d.s between the corresponding C( $\alpha$ )-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 ]

**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 (REVDT): 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.)

670

671 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。

- 672                    アミノ酸配列        FASTA Sequence  
 673                    立体構造            PDB file (Text)  
 674                    電子密度ファイルの入手は以下のように行う。  
 675                    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。

- 676  
 677                    左カラムの Download から Maps をクリックする。  
 678                    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  
 679                    を mFo-DFc にすると Fo-Fc マップが作成される。

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

681                    Here is your gzipped map : [4he7.ccp4.gz](#)



## Electron-density map generation for 4he7

Map format : CCP4 Type : mFo-DFc Generate map

682 (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.

683 Here is your gzipped map : [4he7\\_diff.ccp4.gz](#)

684 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  
685 を map に変更する必要あり。

686 2mFo-DFc マップ 4he7.ccp4 → 4he7.map

687 mFo-DFc マップ 4he7\_diff.ccp4 → 4he7\_diff.map

688 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  
689 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  
690 をつける。

691 Coot を起動し、File から

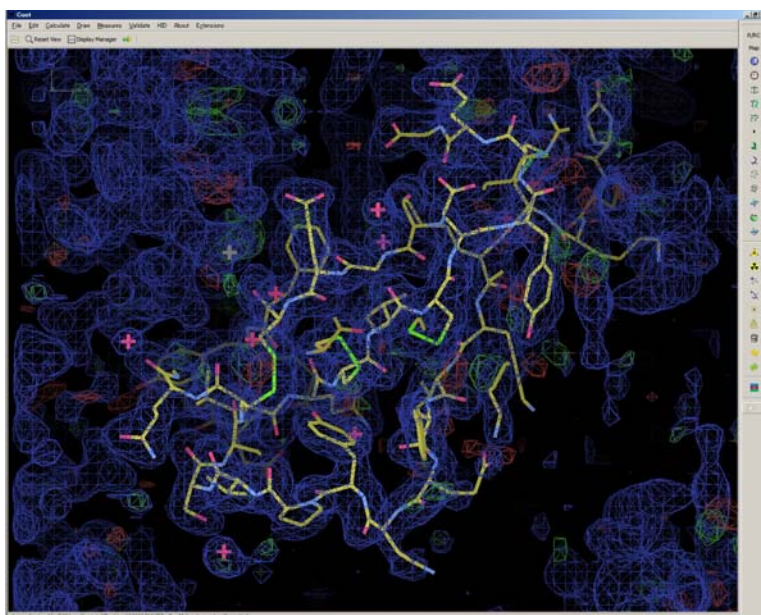
692 Open Coordinates... 4he7.pdb

693 Open Map... 4he7.map  Is Difference Map 青 1 色表示

694 Open Map... 4he7\_diff.map  Is Difference Map 緑・赤表示

695 Display Manager で Map を選択して、+ または - で表示の閾値を変更できる。

696 4he7.map の閾値を 1.5 $\sigma$ 、4he7\_diff.map の閾値を 5.0 $\sigma$  とすると、以下の通り。



697

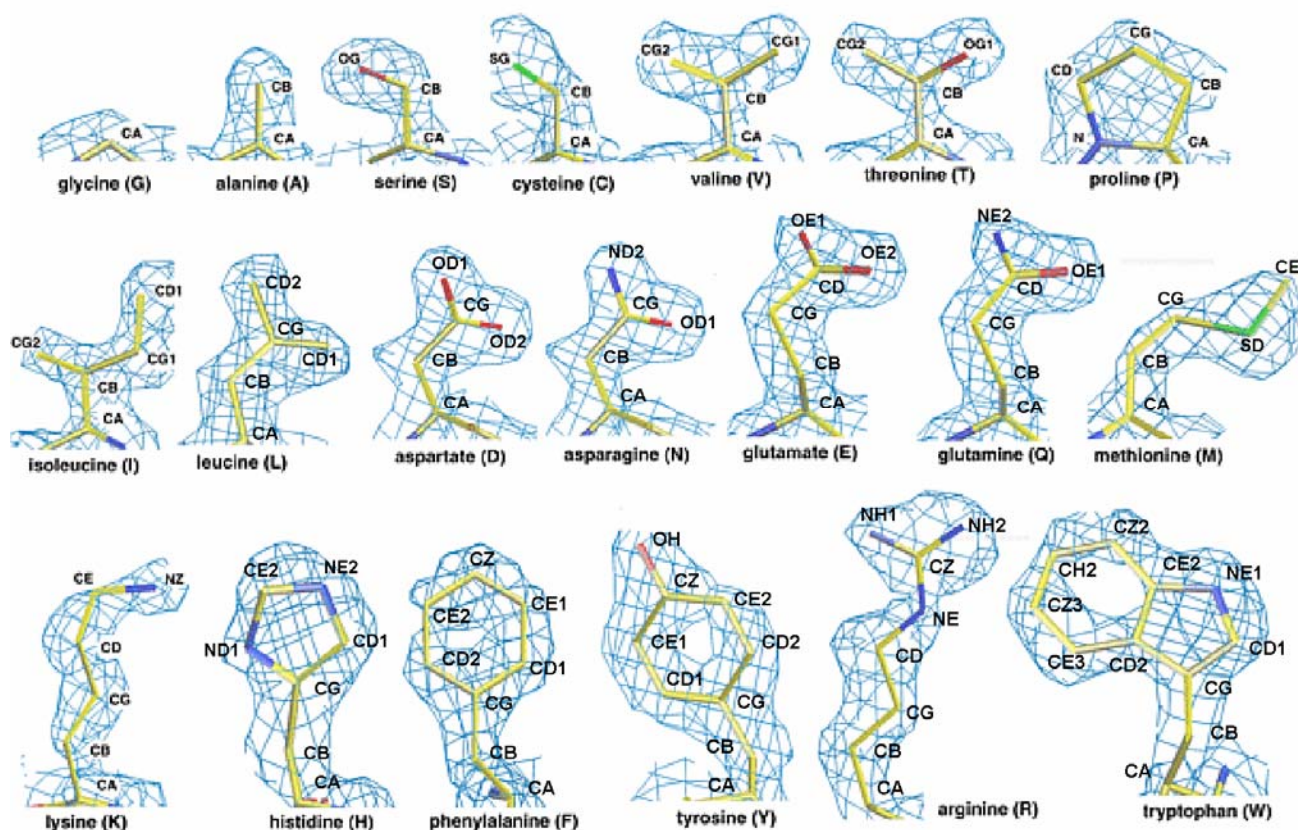
698



699

700 各アミノ酸残基の電子密度例

701 (<http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Modelbuilding/aadensity.png> より引用)



702

703

704 PDB ファイルの項目

COLUMNS	DATA	TYPE	FIELD	DEFINITION
707	1 - 6	Record name	"ATOM "	
708	7 - 11	Integer	serial	Atom serial number
709	13 - 16	Atom	name	Atom name
710	17	Character	altLoc	Alternate location indicator
711	18 - 20	Residue name	resName	Residue name
712	22	Character	chainID	Chain identifier
713	23 - 26	Integer	resSeq	Residue sequence number
714	27	AChar	iCode	Code for insertion of residues
715	31 - 38	Real (8. 3)	x	Orthogonal coordinates for X in Angstroms
716	39 - 46	Real (8. 3)	y	Orthogonal coordinates for Y in Angstroms
717	47 - 54	Real (8. 3)	z	Orthogonal coordinates for Z in Angstroms
718	55 - 60	Real (6. 2)	occupancy	Occupancy
719	61 - 66	Real (6. 2)	tempFactor	Temperature factor
720	77 - 78	LString(2)	element	Element symbol, right-justified
721	79 - 80	LString(2)	charge	Charge on the atom