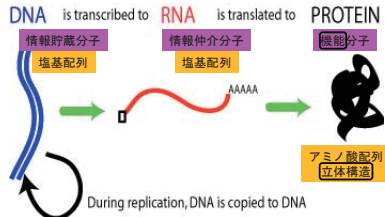


分子生物学のセントラルドグマ (1958 イギリスの分子生物学者クリックが提唱)

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。



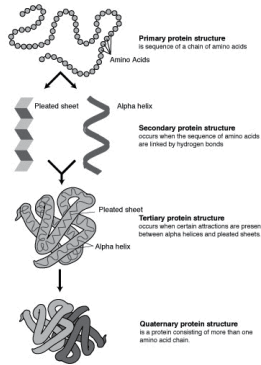
<http://cnx.org/content/m11415/latest/>の図を引用

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)

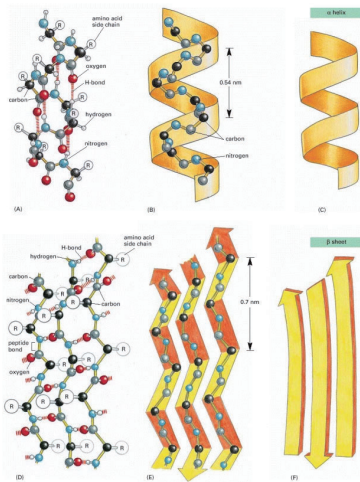
AMINO ACID	SIDE CHAIN	AMINO ACID	SIDE CHAIN
Aspartic acid Asp D	negative	Alanine Ala A	nonpolar
Glutamic acid Glu E	negative	Glycine Gly G	nonpolar
Arginine Arg R	positive	Valine Val V	nonpolar
Lysine Lys K	positive	Leucine Leu L	nonpolar
Histidine His H	positive	Isoleucine Ile I	nonpolar
Asparagine 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

SCHEMATIC: Met - Ala - Leu - Tyr

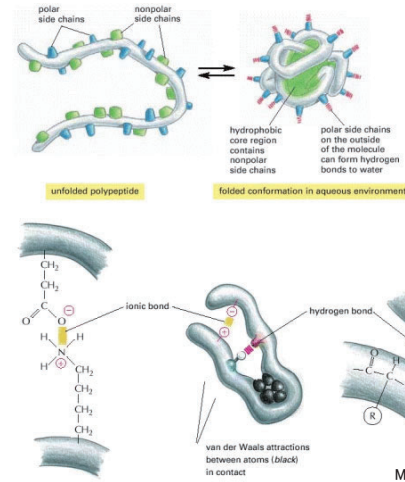
SEQUENCE: Met - Ala - Leu - Tyr

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



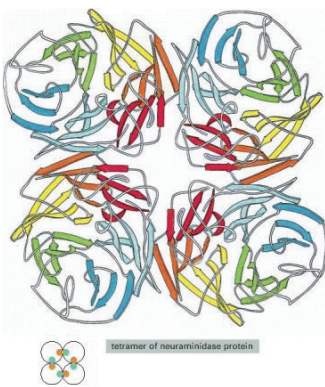
Molecular Biology of the Cellより引用

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

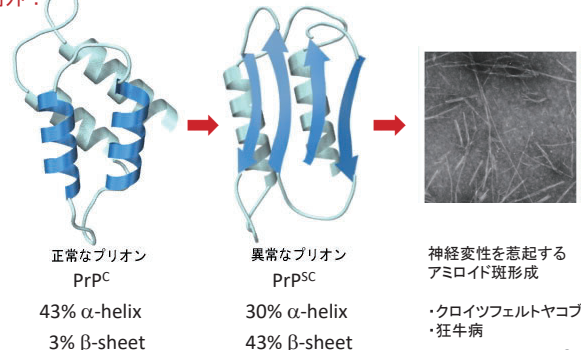


Molecular Biology of the Cellより引用

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?

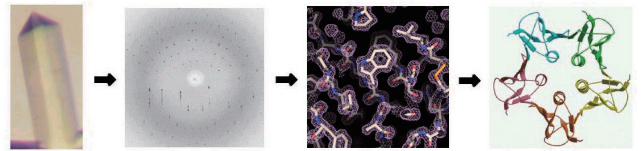


立体構造解析法の特徴

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

タンパク質のX線結晶構造解析

(http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Overview/Overview.htmlより引用)



単結晶 X線 回折データ FS 電子密度 モデル構築 分子構造

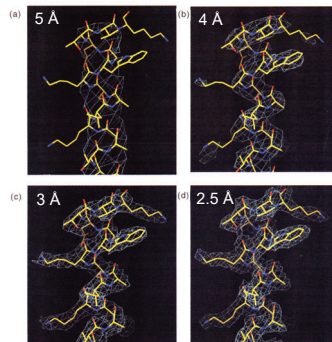
フーリエ合成 (Fourier synthesis)

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

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。

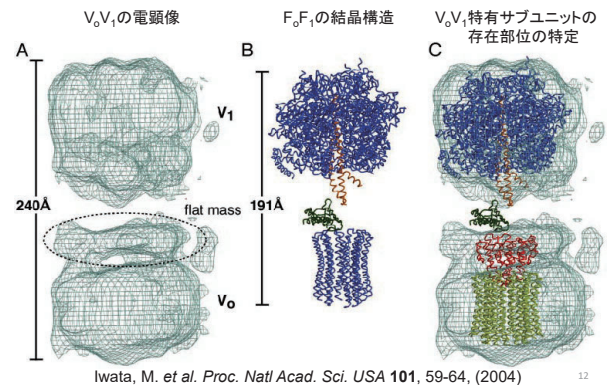
分解能と電子密度の関係

(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)



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://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>
HP (WinCoot): <http://www.yzbl.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

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

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15万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、すでにアミノ酸配列類似タンパク質の立体構造が報告されているタンパク質のX線結晶構造解析を分子置換法により行う。分子置換法を用いれば、配列相同性30%以上の類似タンパク質の立体構造情報をモデル(鋳型)として、たいいていの場合、目的タンパク質の立体構造解析が可能である。分子置換法で構造が解けない場合は、単波長・多波長異常分散法、重原子同型置換法等により構造解析を行う。

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(赤字)

80

81 (4) X線回折データ取得・処理 @放射光施設(Photon Factory, SPring-8 など)

82 回折斑点の位置と強度のデータから、結晶の空間群、格子定数、などのパラメタを決定する。

83 HKL2000

84 入力: X線回折イメージ(.img)

85 | 各回折斑点の位置と強度の収集

86 | 各回折斑点の指数づけ(空間群と格子定数の決定)

87 | 各回折斑点の積分(強度の数値化)

88 | 回折データの統合

89 ↓ 統計値の計算

90 出力: X線回折データ(.sca)

91 (5) 分子置換法による結晶構造解析

92 **モデル分子の選定: 標的タンパク質と配列相同性があり、立体構造既知のタンパク質を見つける。**

93 <http://web.expasy.org/blast/>

94 **X線回折データのフォーマット変換をする。**

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

96 **非対称単位中のタンパク質分子数を決定する。**

97 CCP4|Molecular Replacement|Analysis|Cell Content Analysis

98 **モデルタンパク質 1 分子目、2 分子目の非対称単位中の向きと位置について適切な解を探す。**

99 **良い解が見つかれば、電子密度をはっきりと描くことができる。**

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

101 (6) 構造精密化・確認・PDB への登録の仕方の説明

102 **剛体精密化により、モデルタンパク質(全体)の向きと位置を自動微調整する。**

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

104 **制限精密化により、各原子の位置を電子密度に合うように自動補正する(逆空間精密化)。**

105 CCP4|Refinement|Run Refmac5|Do restrained refinement

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

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

108 **逆空間精密化と実空間精密化を繰り返して、最終構造(仮)を得る。**

109 CCP4|Refinement|Run Refmac5|Do restrained refinement

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

111 **最終構造(仮)が実験データとも既知ジオメトリ(結合長・結合角・二面角)とも合致することを確認し、**
112 **もし問題があれば修正する。**

113 Coot|Validate|Ramachandran Plot など

114 Protein Data Bank に回折データと最終構造の原子座標とを登録する。

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

116 RCSB PDB | Deposit|Prepare Data

117 RCSB PDB | Deposit|Validate Data

118 RCSB PDB | Deposit|Deposit Data

119 (7) タンパク質の原子座標および電子密度データをダウンロードし表示させる。

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

137

138 Task 1

Please send me the two PDB files you will obtain at the end of this class:

139 1E8A_A_molrep1_refmac2 -coot-0.pdb

140 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement-coot-0.pdb

141 (coot-0 may be coot-1)

142 The e-mail title should be "Structural Bioinfo".

143 Please do not forget to write your name and your ID number(s) in the e-mail text.

144

145 Task 2

In the above e-mail, please write your comments to this class in more than 5 lines.

146 Please let me know good and bad things about this class.

147

148

149 (1) 分子置換法によるタンパク質の立体構造決定

150

151 1. アグリバイオ講義 HP から、圧縮ファイル 190418.zip をデスクトップにダウンロードし、190418.zip のアイコンをダブルクリックして解凍する。□

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

153 デスクトップ上のフォルダ 190418 には、以下の 10 個のファイルが入っている。□

155	s100a13.seq	human S100A13 のアミノ酸配列ファイル (FASTA 形式)
156	s100a13.sca	human S100A13 の X 線回折データファイル (Denzo/HKL2000 フォーマット)
157		
158	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)
159		
160	3NXA_A.pdb	human S100A16 の原子座標ファイル
161	1E8A_A.pdb	human S100A12 の原子座標ファイル
162	1E8A_A_molrep1_refmac2yobi.pdb	構造精密化途中の原子座標ファイル
163	1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb	同上 (自動精密化用)
164	1E8A_A_forReference.pdb	構造比較用 S100A12 の原子座標ファイル
165	s100a13_refmac2yobi.mtz	構造精密化途中の X 線回折データファイル
166	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
167		

168

169 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。
170 共用 PC のユーザー名は "student" または "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
171 が全角の方 (例. "永田") は、190418 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。□

- 172 ○ C:¥Users¥student¥Desktop¥190418
- 173 ○ C:¥Users¥iu¥Desktop¥190418
- 174 × C:¥Users¥永田¥Desktop¥190418
- 175 ○ C:¥190418

176

177 参考: human S100A13 の X 線回折データファイル (s100a13.sca) の内容

178 1
179 -985

格子定数 (辺の長さ と 角度)

180	a	b	c	α	β	γ	空間群
181	39.775	59.289	77.628	90.000	90.000	90.000	p212121

182 回折斑点の指数、強度、強度の標準偏差

183	H	K	L	Intensity	σ (Intensity)
184	0	0	4	1039.1	28.7
185	0	0	6	244.8	11.8
186	0	0	8	2410.0	56.3
187	0	0	10	269.2	13.9

188 (つづく)

189

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

SIB BLAST+ Network Service Form

国産の検索エンジン

You can also use this tool programmatically...

Enter a sequence

Examples

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

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

Run BLAST Reset

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 ?

Run BLAST Reset

- 193 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
 194 出力される。
 195 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
 196 ため)。□
 197 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
 198 として用いるには不向きである。ゆえに除外する。□
 199 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。
 200
- | | | |
|-----|--|---------------|
| 201 | 11 位 3NXA_A(PDB entry: 3NXA の chain A) | S100A16 の結晶構造 |
| 202 | 19 位 1ODB_A(PDB entry: 1ODB の chain A) | S100A12 の結晶構造 |
| 203 | 20 位 1E8A_A(PDB entry: 1E8A の chain A) | S100A12 の結晶構造 |
- 204 11 位の 3NXA_A が最良のモデルと考えられるので、まずはこの座標をモデル(鋳型)として用いて分子置

205 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。□
 206 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
 207 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

208 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
 209 する。

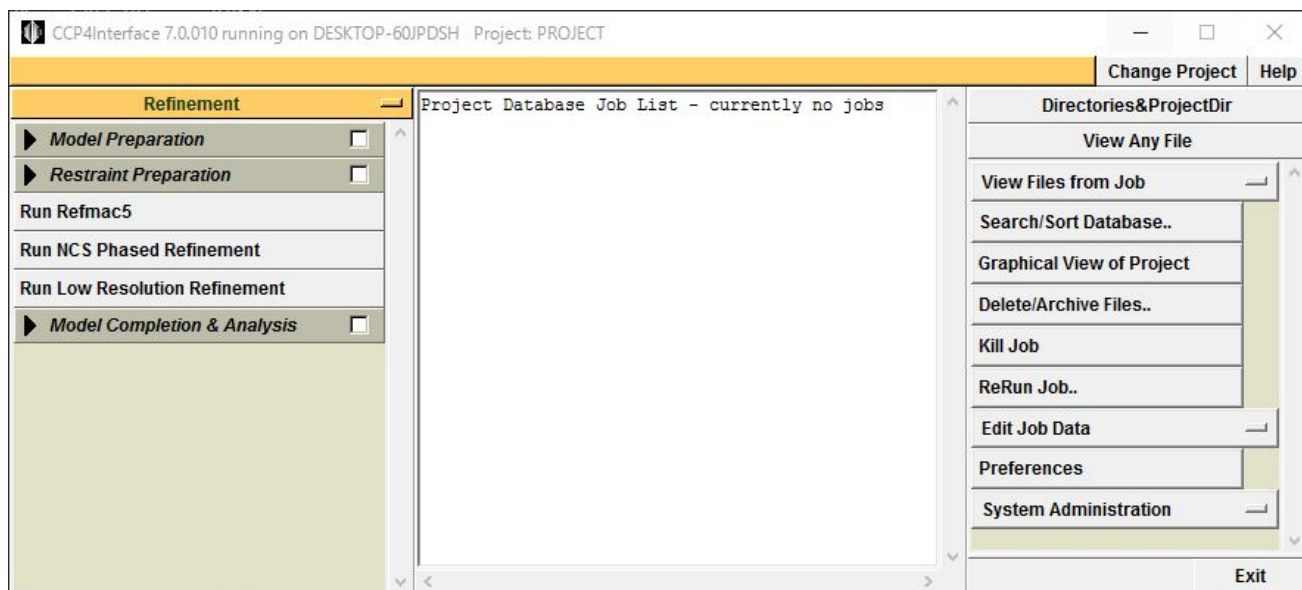
211 例: PDB: 1E8A の A 鎖の場合、ATOM で始まる A 鎖だけの行をテキストエディタで抽出して、ファイル名
 212 1E8A_A.pdb として保存する。□

213 ATOM 1 N THR A 1 15.352 25.025 -7.964 1.00 18.82 N

214

215 3. CCP4 を用いて、分子置換を行う。

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



217

218

219

220 4. 作業ファイルを扱うディレクトリを設定する。

221 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。□

222 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。□

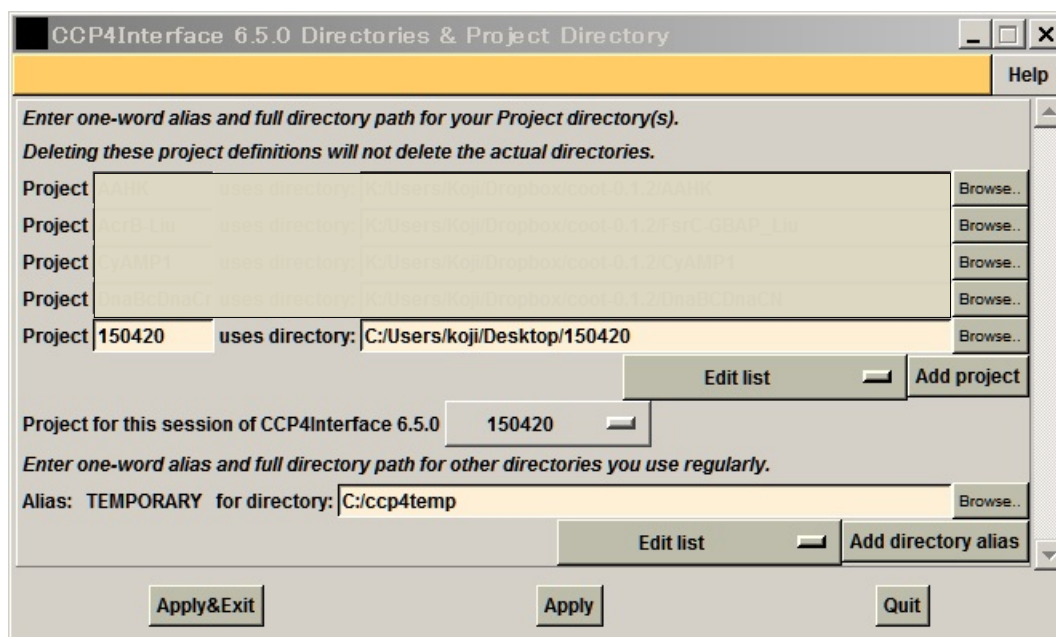
223 Project: 190418 uses directory: C:/Users/student/Desktop/190418/

224 ただし、190418 フォルダを C ドライブ直下に置いた方は

225 Project: 190418 uses directory: C:/190418/

226 次に、Project for this session of CCP4Interface 7.0.010 として 190418 を選択する。□

227 その後、Apply&Exit ボタンを押す。□



228

229

230

- 231 5. X線回折データのフォーマット変換(Denzo/HKL2000 → CCP4)を行う。
 232 左側の作業メニューの黄色いバーをクリックすると CCP4 で実行可能な種々のメニューが現れる。□

233
 234

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"/>	

235
 236

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

237
 238

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

239
 240
 241

242

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	

243

244

Graphics and Viewing Utilities

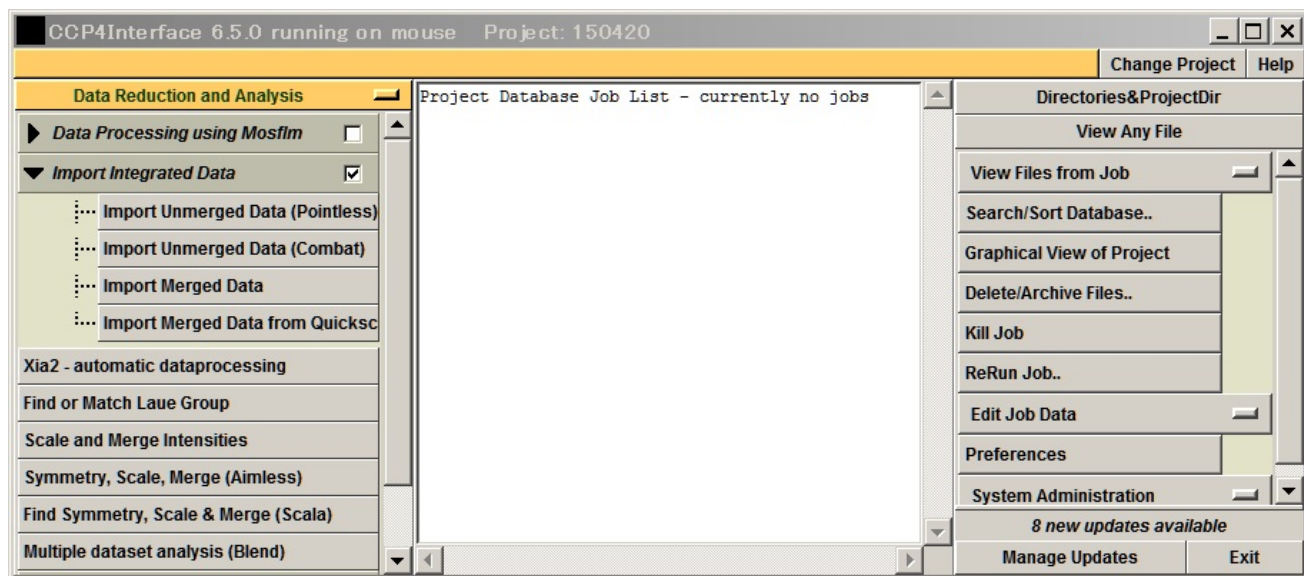
Program List

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

245

246

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



249

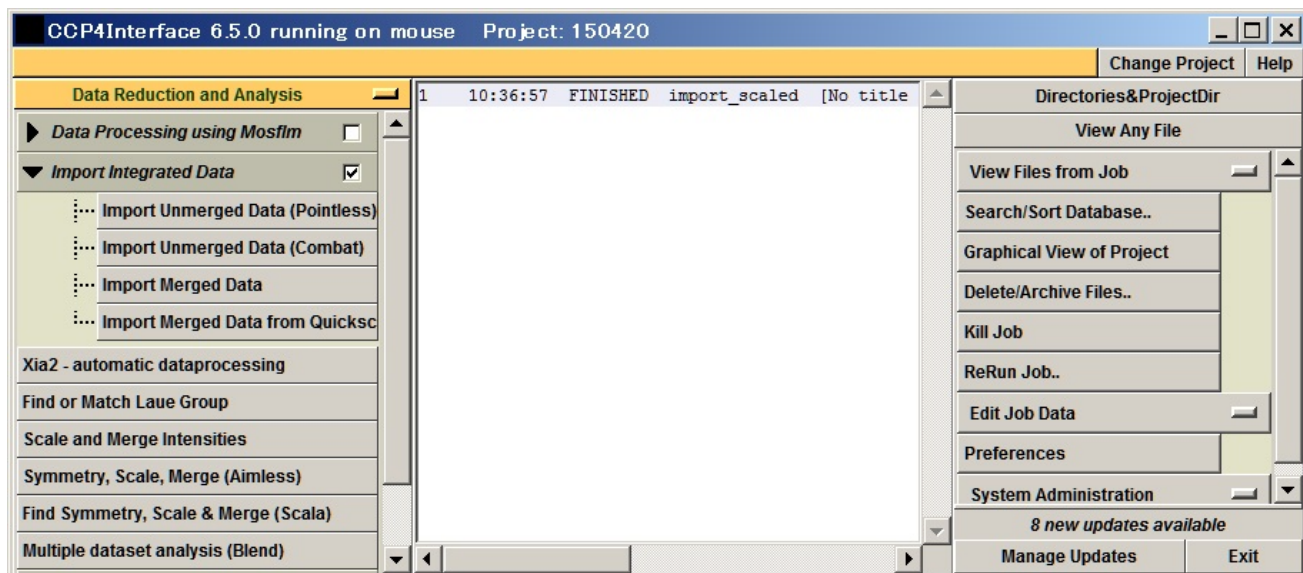
250

251

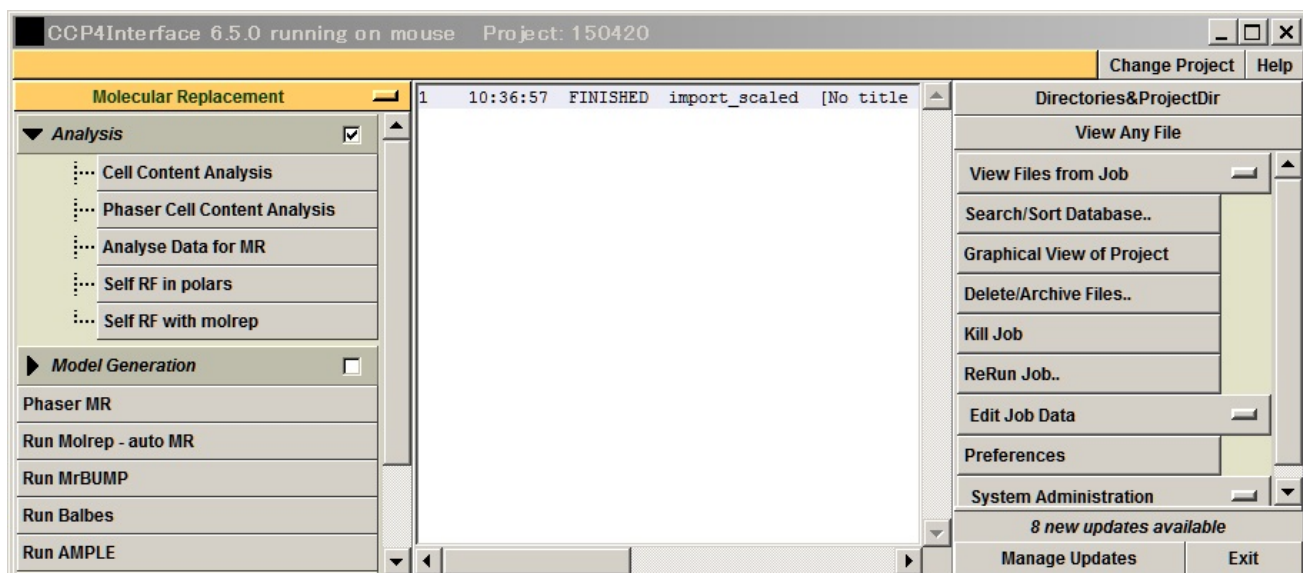
- 252 以下のようにチェックする。□
- 253 □ Use anomalous data(異常分散データでないので、チェックをはずす)
- 254 ■ Run Ctruncate to convert intensities to structure factors
- 255 ■ Keep the input intensities in the output MTZ file
- 256 ■ Ensure unique data & add FreeR column for 0.05 fraction of data.
- 257 □ Copy FreeR from another MTZ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

- 259 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。□
- 260 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)。
- 261 In 190418: s100a13.sca
- 262 Out 190418: s100a13.mtz
- 263 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。
- 264 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
- 265 (Angstrom)と入力するが、勝手に 1.0 に変換される。□

268 Data collected at wavelength: 1.0 Angstroms
 269 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、
 270 Estimated number of residues in the asymmetric unit:
 271 は空欄のままにしておく。□
 272 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。□
 273 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)
 274 ことが表示される。□

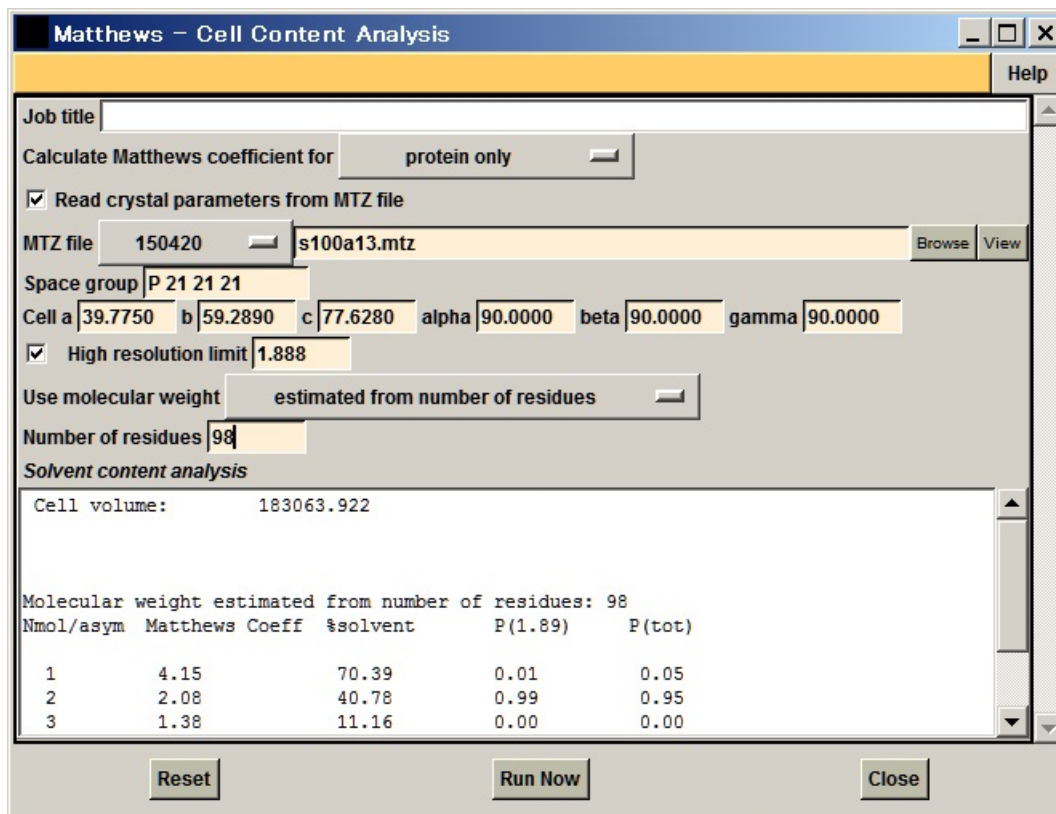


275
 276
 277 6. 分子置換法の準備として、非対称単位中の S100A13 分子数を見積もる。
 278 (非対称単位 = 結晶中に現れる繰り返し構造の 1 つを取り出したもの。実際の結晶
 279 中ではこの構造がある法則(対称性)にそって前後左右上下に繰り返されている)
 280 左側の作業メニューから、Molecular Replacement → Analysis → Cell Content Analysis を選択すると
 281 Matthews のウィンドウが開く。□

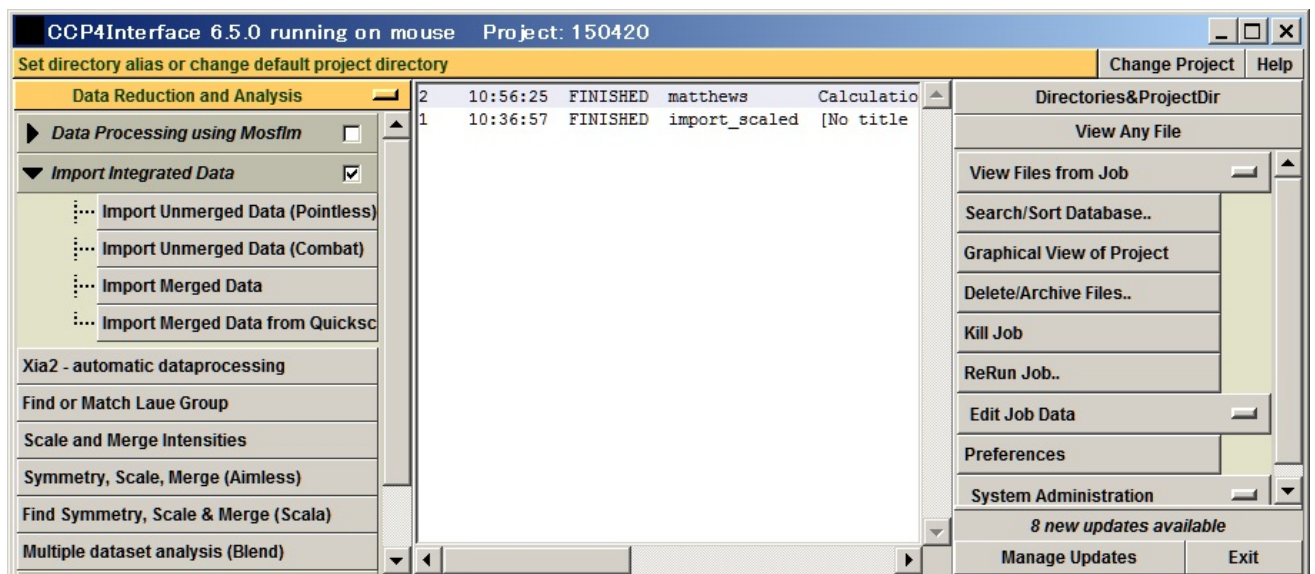


282
 283 MTZ file として、s100a13.mtz を選択する。□
 284 Use molecular weight: estimated from number of residues にして
 285 Number of residues: 98 と入力する。□
 286 Run Now ボタンを押すと、下の白い枠に、非対称単位中のタンパク質分子数、Matthews 係数、溶媒含有

287 率、確率(2通り)が表示される。□



288
289 この場合、非対称単位中 S100A13 が2分子含まれると確定した。□
290 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
291 (FINISHED)ことが表示される。□



292
293
294

- 295 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。
296 左側の作業メニューから Data Reduction and Analysis → Import Integrated Data → Import Merged
297 Data を選択すると ImportScaled のウィンドウが開く。□
298 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
299 196 と入力する。□
300 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
301 が出るが、Continue ボタンを押して、上書きする。□
302 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
303 (s100a13.mtz) への書式変換が完了した。□

ImportScaled - Import Scaled Data from Denzo or d*trek

Job title

Convert scaled data output from Scalepack (DENZO) into MTZ format

Use anomalous data

Run Ctruncate to convert intensities to structure factors

Keep the input intensities in the output MTZ file

Ensure unique data & add FreeR column for 0.05 fraction of data. Copy FreeR from another MTZ

Extend reflections to higher resolution:

In 150420 s100a13.sca Browse View

Out 150420 s100a13.mtz Browse View

Use dataset name as identifier to append to column labels

MTZ Project, Crystal, Dataset Names & Data Harvesting

Create harvest file in project harvesting directory

Crystal S100A13_01 belonging to Project 150420

Dataset name S100A13_0101

Extra Information for MTZ File

Space group p212121

Cell dimensions 39.775 59.289 77.628 90.0 90.0 90.0

Data collected at wavelength 1.0 Angstroms

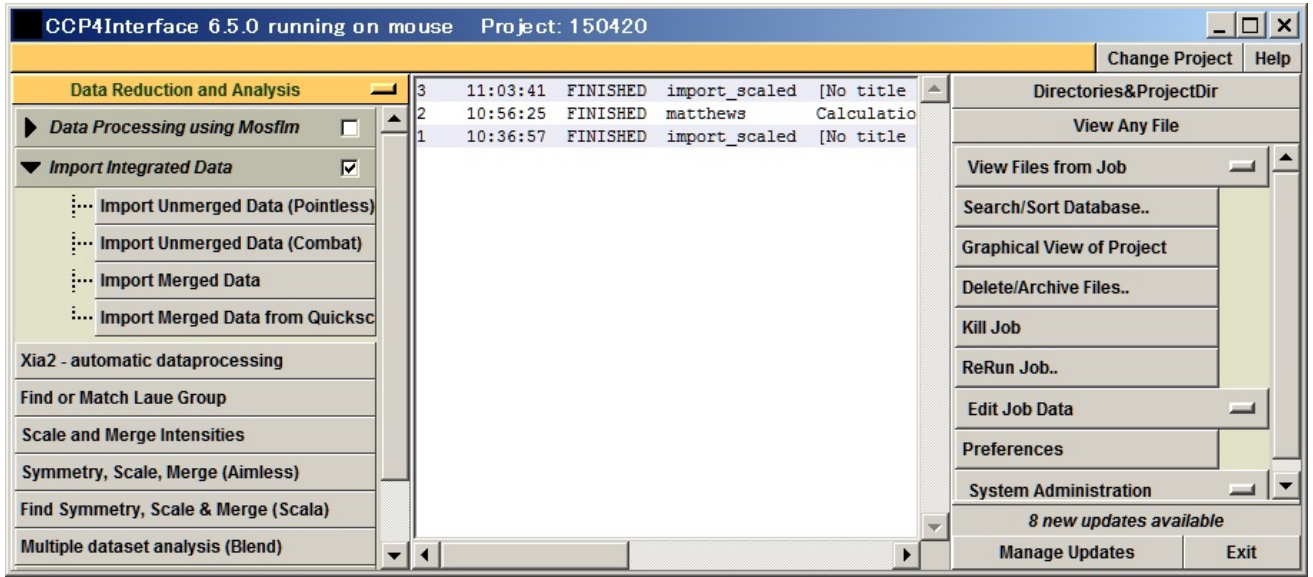
Estimated number of residues in the asymmetric unit 196

Edit or Transform Input Data

Log File Output

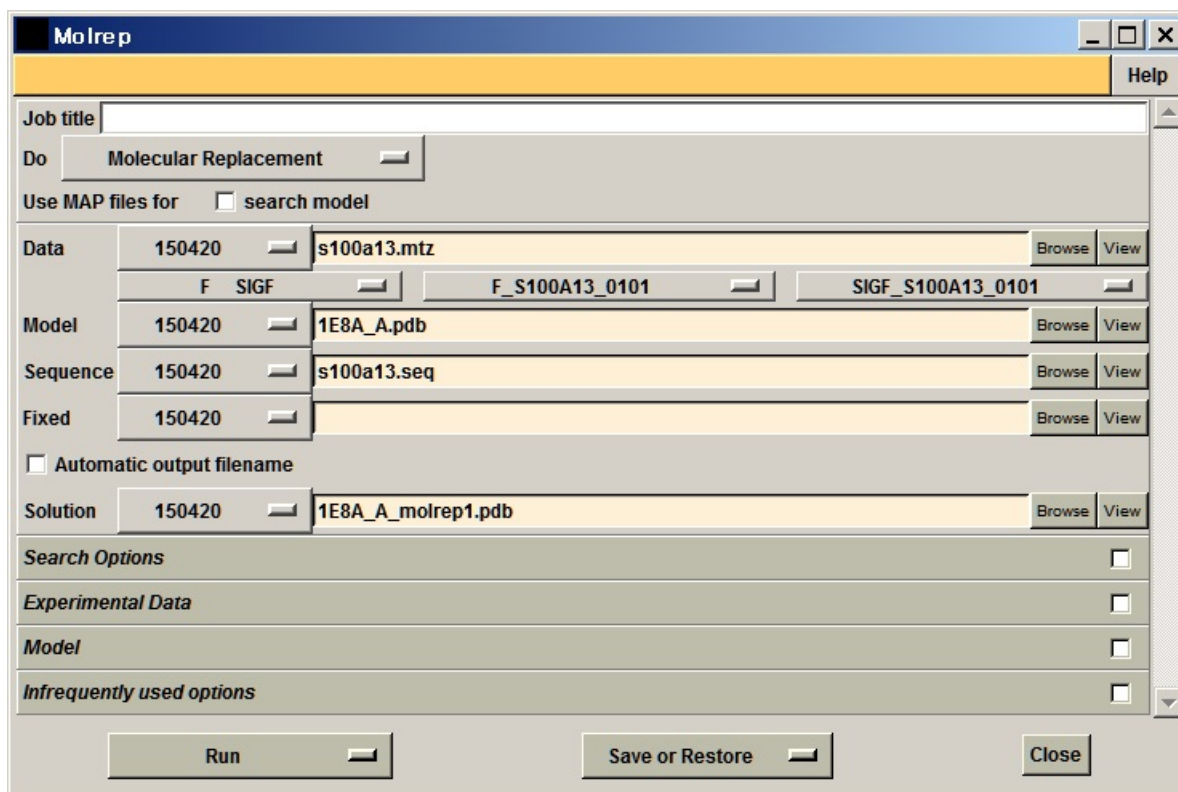
Run Save or Restore Close

- 304
305 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
306 (FINISHED)ことが表示される。□

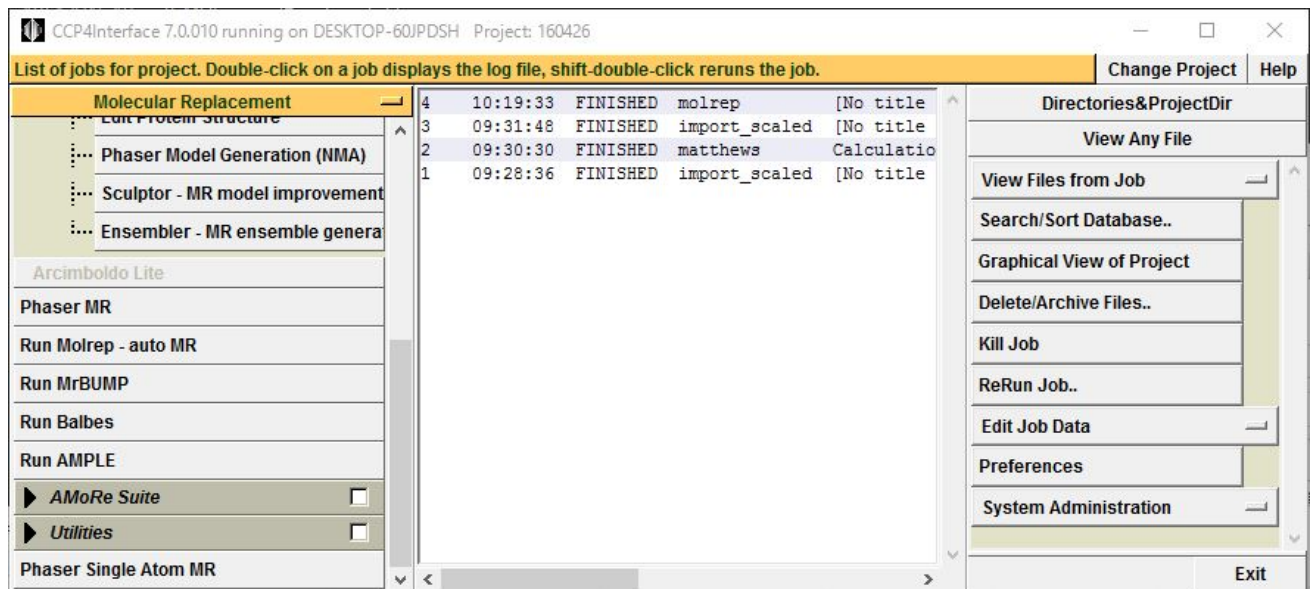


307
308

- 309 8. Molrep を用いて分子置換を実行する。
- 310 作業メニューから Molecular Replacement → Model Generation → Run Molrep - auto MR を選択すると、
- 311 Molrep のウィンドウが開く。□
- 312 以下のように設定する。□
- 313 Do: Molecular Replacement
- 314 Use MAP files for search model (チェックしない)
- 315 入力ファイルは以下の 3 つ。□
- 316 Data: 190418: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)
- 317 Model: 190418: 1E8A_A.pdb (立体構造既知配列類似タンパク質 S100A16
- 318 単量体(chain A)の原子座標ファイル)
- 319 Sequence: 190418: s100a13.seq (S100A13 のアミノ酸配列。FASTA フォーマット)
- 320 出力ファイル名は自動で設定される。
- 321 Solution: 190418: 1E8A_A.pdb_molrep1.pdb
- 322 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



- 323
- 324 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
- 325 ジョブが完了した(FINISHED)ことが表示される。□



326

327 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
 328 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
 329 計算の過程を追うことができる。□

330

331 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
 332 個の値が良い。□

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

--- 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_Coef = 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

360 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、
 361 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
 362 する。□

363

364

Number of monomers in fixed model_2 : 1

365

366

--- Summary (V0) ---

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

corrF = 0.4987

383

Scale Bscale = 1.5855 -11.1870

384

TF/sig = 10.32

385

Final CC = 0.4987

386

Packing_Coef = 1.0000

387

Contrast = 4.22

388

CC_for_fixed_model: 0.4125

389

390

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

391

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

392

393

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。□

394

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。□

395

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

396

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。□

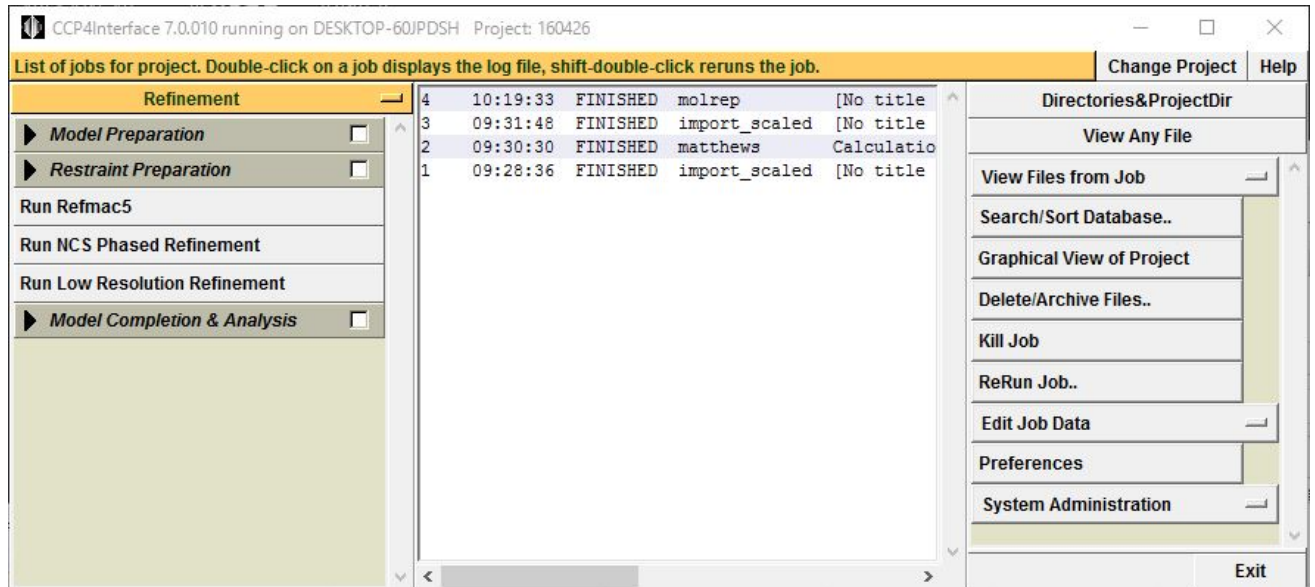
397

398

399

399

- 400 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。
 401 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。□



402
 403 以下のように設定する。□

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

405 □ Input fixed TLS parameters

406 no twin refinement

407 入力ファイルは以下の 2 つ。□

408 MTZ in: 190418: s100a13.mtz (S100A13 の X 線回折データ)

409 PDB in: 190418: 1E8A_A_molrep1.pdb (分子置換法で得られた
 410 原子座標ファイル。)

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

412 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
 413 2 分子)

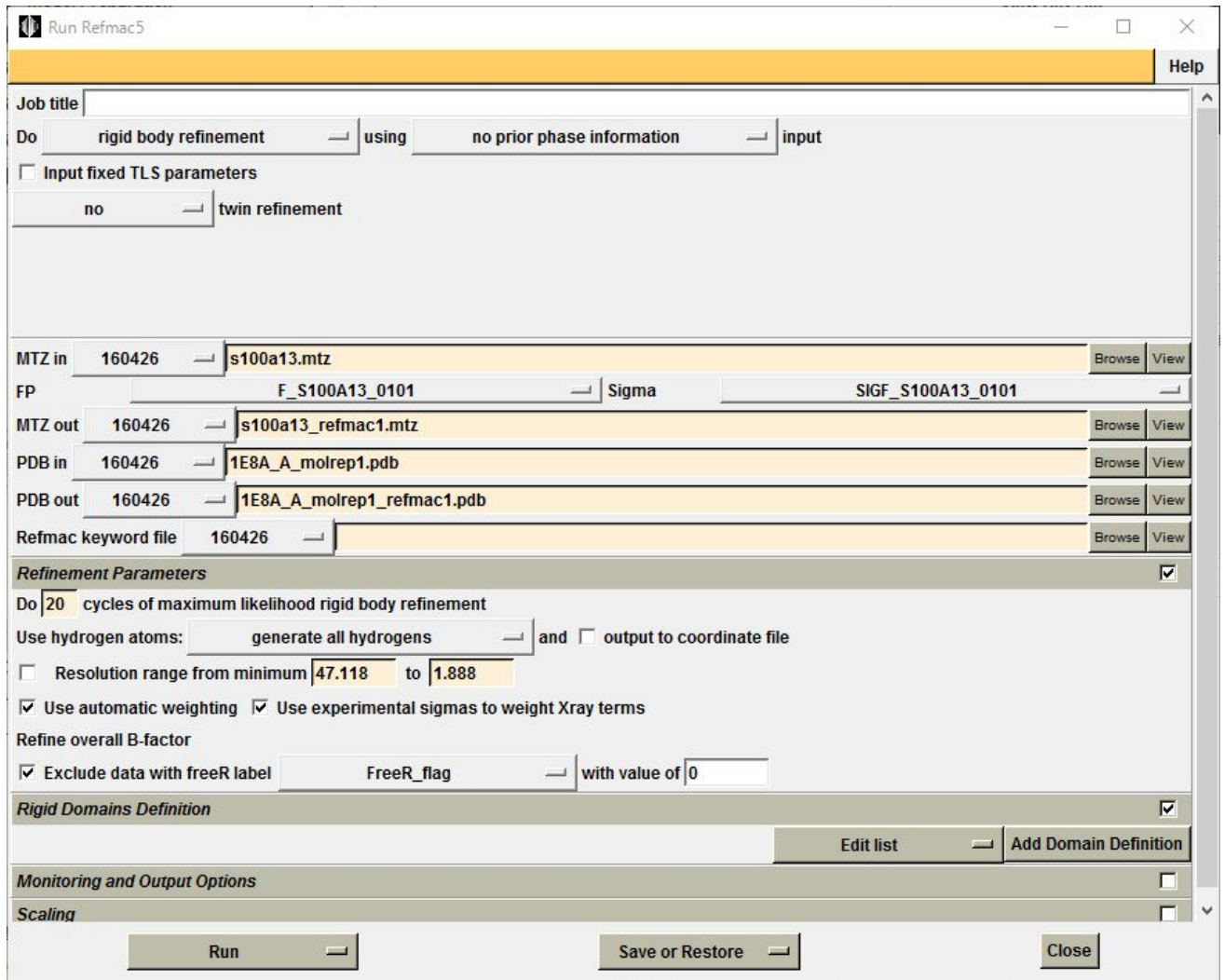
414 出力ファイル名は自動で設定される。

415 MTZ out: 190418: s100a13_refmac1.mtz

416 PDB out: 190418: 1E8A_A_molrep1_refmac1.pdb

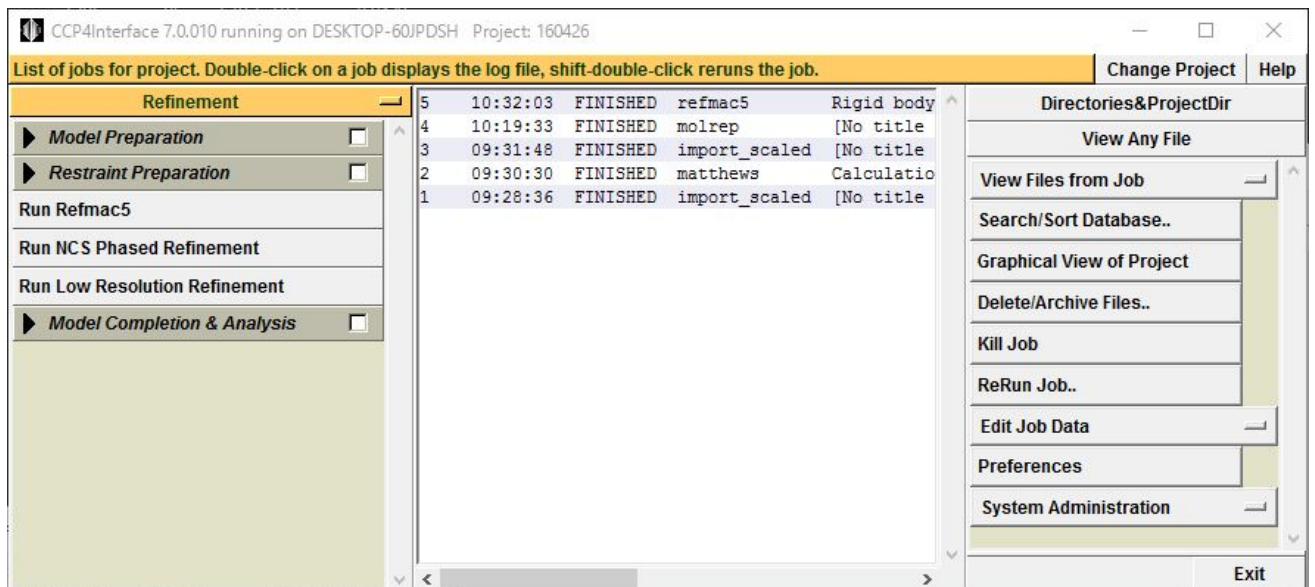
417 Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 20 から 5 に減らしても良い。

418 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



419
420
421

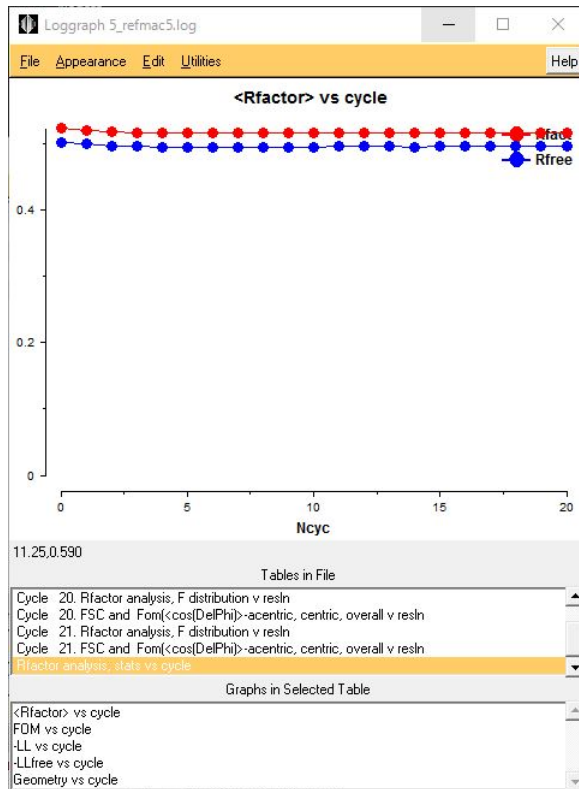
rigid body 構造精密化の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に"refmac5"
という 5 個目のジョブが完了した (FINISHED) ことが表示される。□



422
423
424
425
426

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

427 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
428 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。□

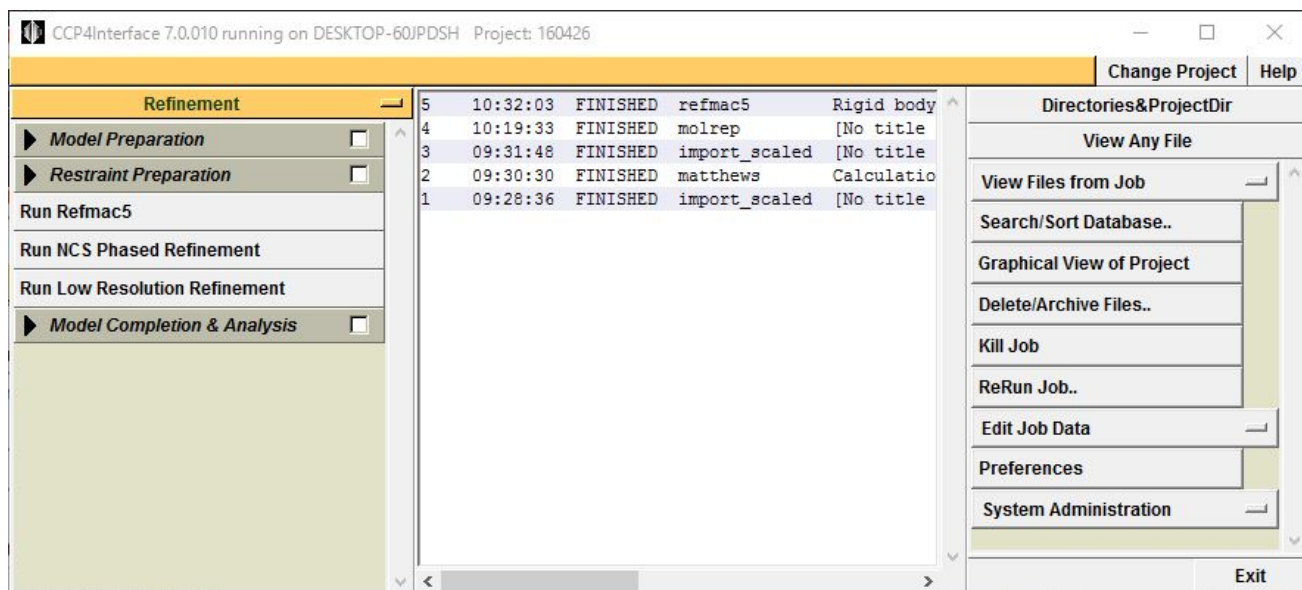


429

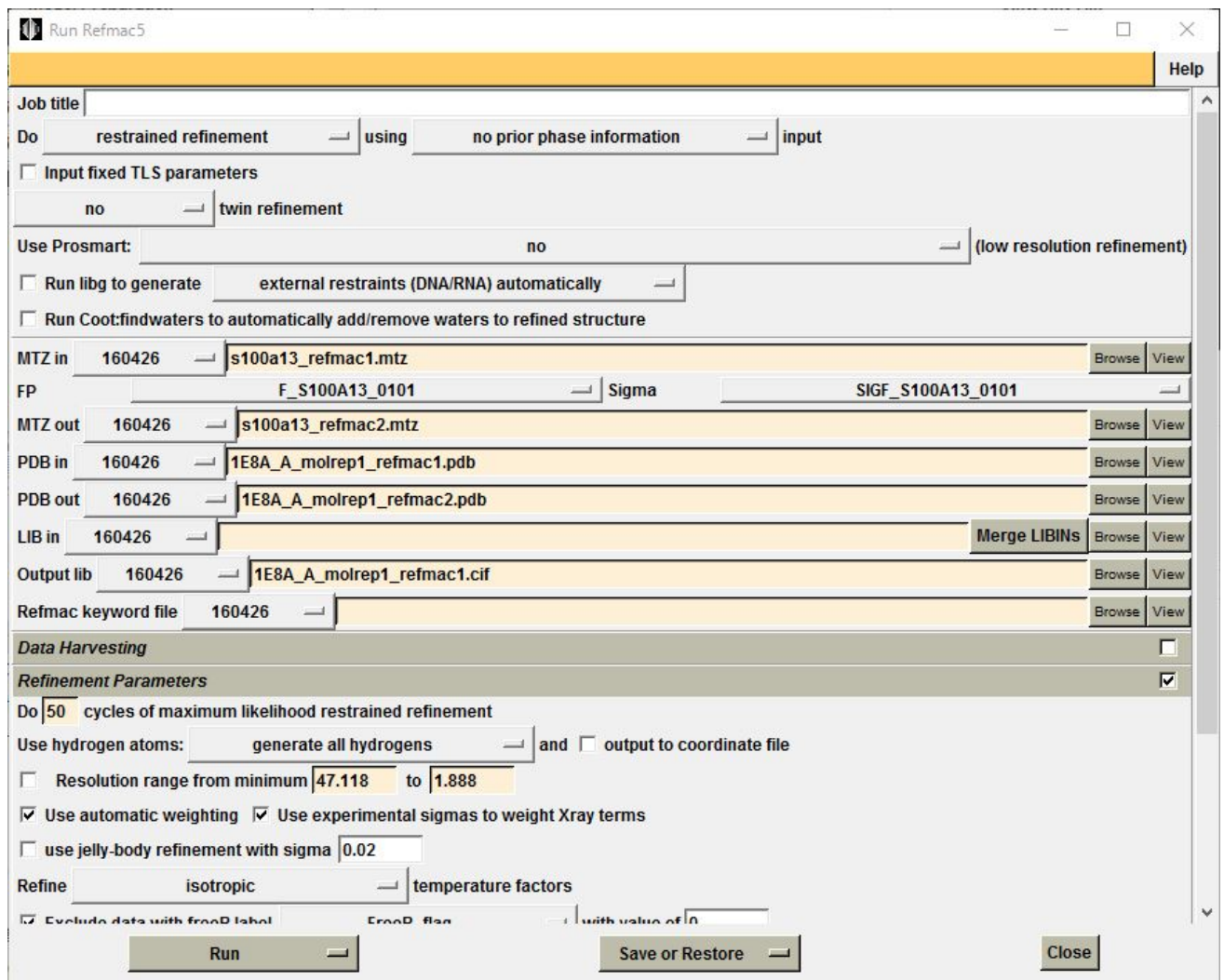
430

431

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

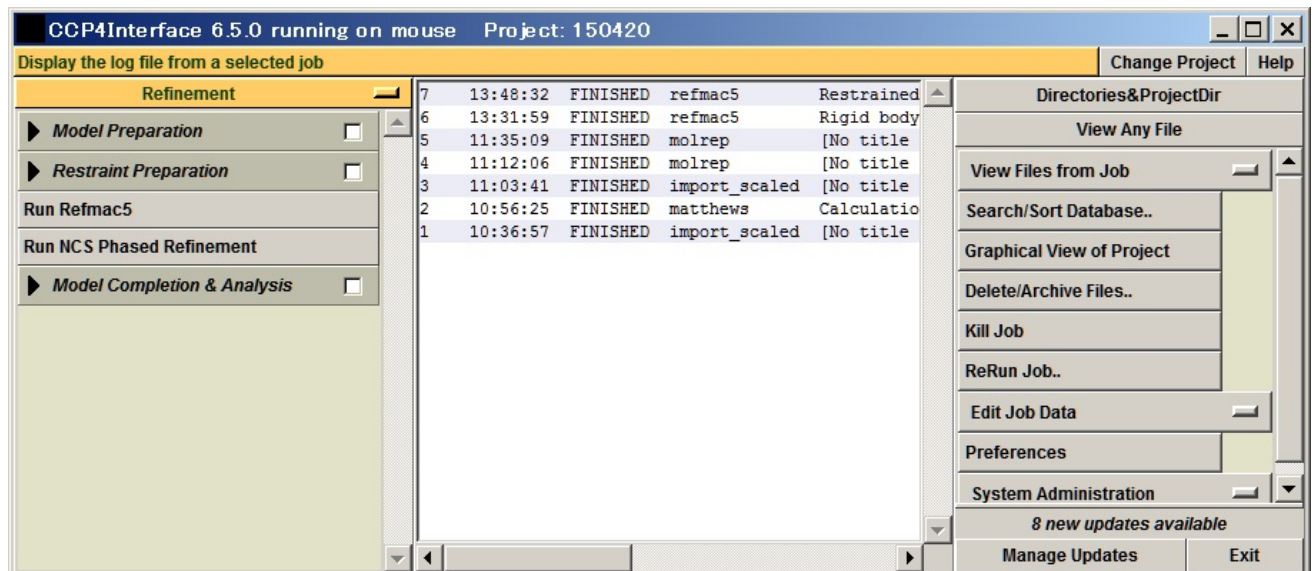


- 434
 435 以下のように設定する。□
 436 Do: restrained refinement using: no prior phase information
 437 □ Input fixed TLS parameters
 438 no twin refinement
 439 Use Prosmart: no
 440 □ Run libg to generate external restraints (DNA/RNA) automatically
 441 □ Run Coot:findwaters to automatically add/remove waters to refined structure
 442 入力ファイルは以下の 2 つ。□
 443 MTZ in: 190418: s100a13_refmac1.mtz
 444 (rigid body 構造精密化後の X 線回折データ)
 445 PDB in: 190418: 1E8A_A_molrep1_refmac1.pdb
 446 (rigid body 構造精密化後の原子座標)
 447 出力ファイル名は自動で設定される。
 448 MTZ out: 190418: s100a13_refmac2.mtz
 449 PDB out: 190418: 1E8A_A_molrep1_refmac2.pdb
 450 Refinement Parameters で refinement のサイクル数を 10 から 50 に増やした方がよい。
 451 Run → Run Now ボタンを押すと計算が始まる。□



452
453
454

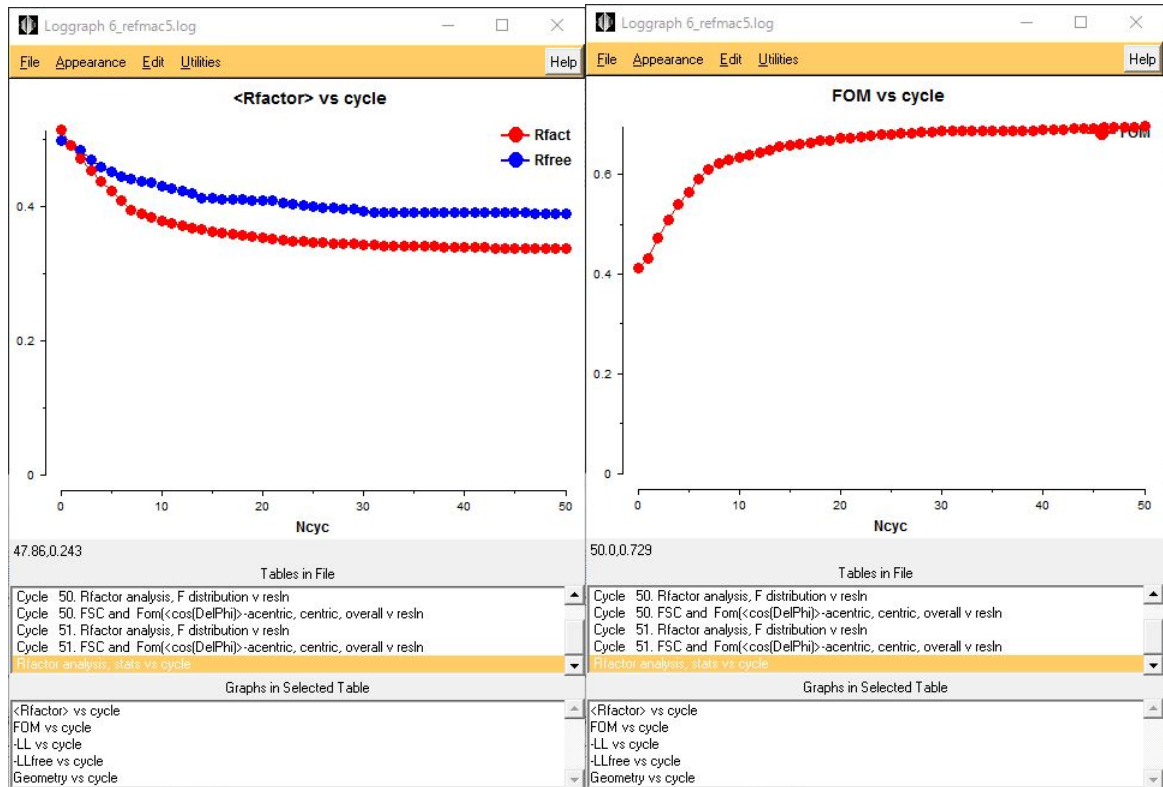
restrained 構造精密化の計算が終わると、CCP4Interface ウィンドウ中央の作業記録表示板に“refmac5”
という 6 個目のジョブが完了した (FINISHED) ことが表示される。□



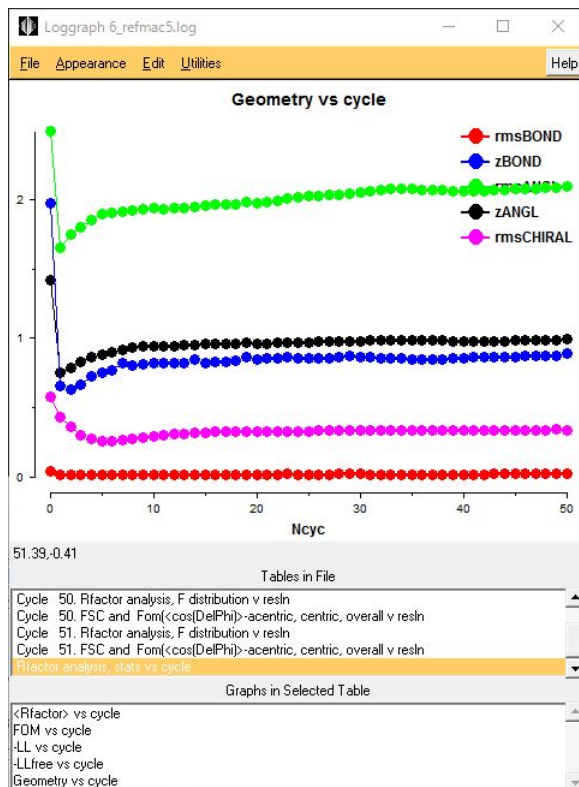
455
456
457
458
459
460

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

461 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
 462 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。□



463



464

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

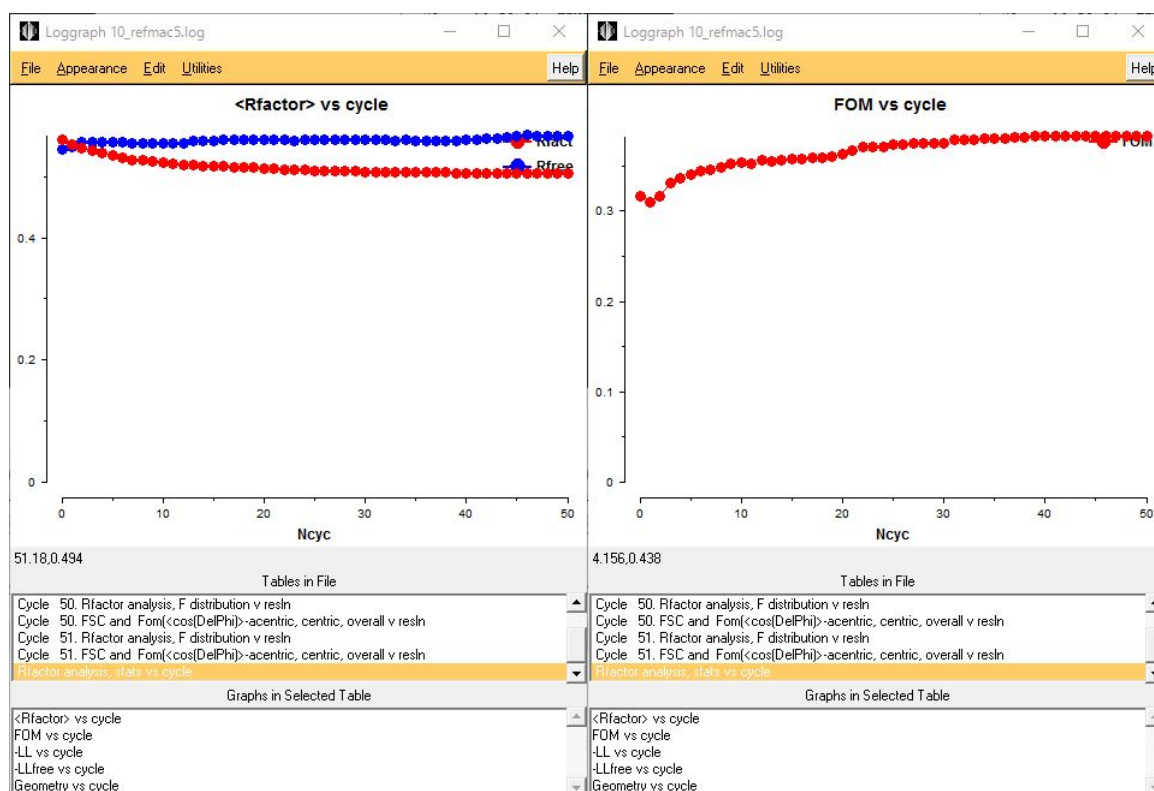
467

468 Refmac5を用いた restrained refinement の結果、

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

470 (構造精密化計算に使用する回折データは全体の 95%。
471 残り 5%の回折データの R factor を free R factor と呼ぶ。
472 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)
473 FOM は 69.6%まで上がった。
474 rmsBOND, rmsANGLE, rmsCHIRA のいずれも初期値より下がった。□
475 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。

476
477 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。
478 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
479 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
480 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
481 (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。



482
483
484 分子置換に失敗しても、あきらめず、以下のことを試す。

- 485 (1) モデル構造に別の PDB 座標を用いる。
- 486 (2) Phaser MR など Molrep 以外の分子置換プログラムを使う。
- 487 (3) Model Generation にあるツールを使って PDB 座標を修飾してみる。
- 488 (4) 経験者に聞く。

489

490 (2) Coot で分子モデルを電子密度に合わせてみましょう

491

492 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。

493 □

494 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 ..
495 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。

496

497 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。

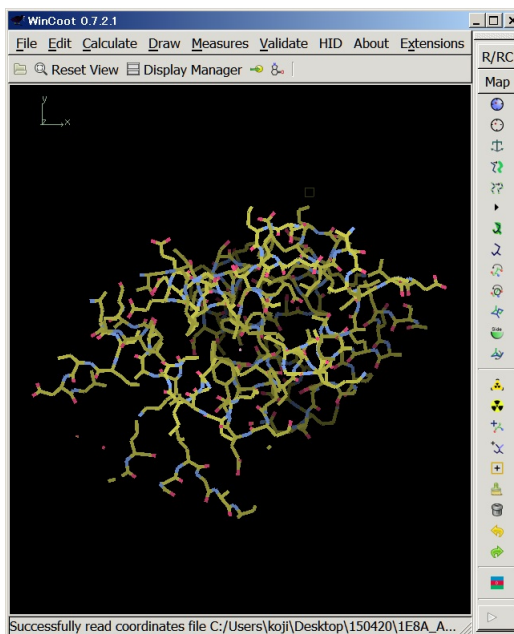
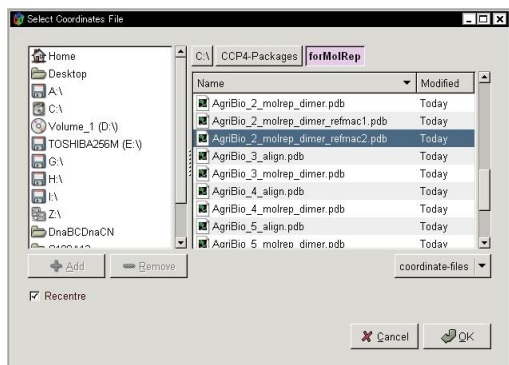
498

499 まず、構造精密化した原子座標ファイルを開きます。

500 WinCoot: File → Open Coordinates...

501 Places: 190418

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



503

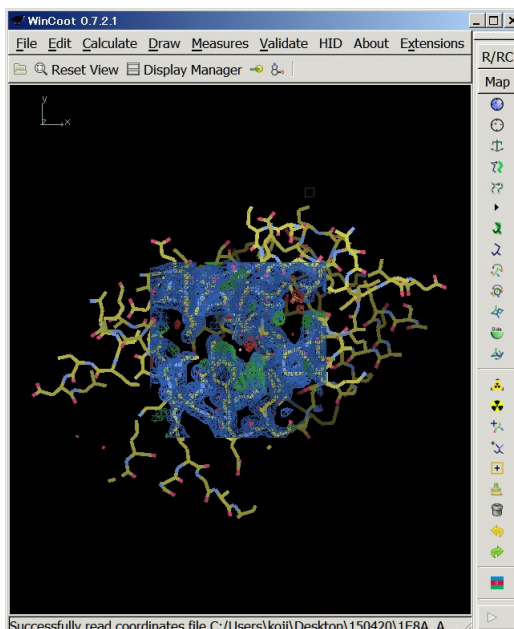
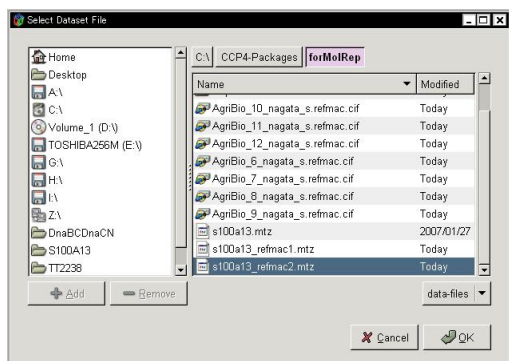
504

505 次に、精密化した X 線回折データファイルを開きます。

506 WinCoot: File → Auto Open MTZ...

507 Places: 190418

508 Select Dataset File: s100a13_refmac2.mtz → OK。



509

510

511 電子密度マップの表示領域を半径 20 Å に設定します。

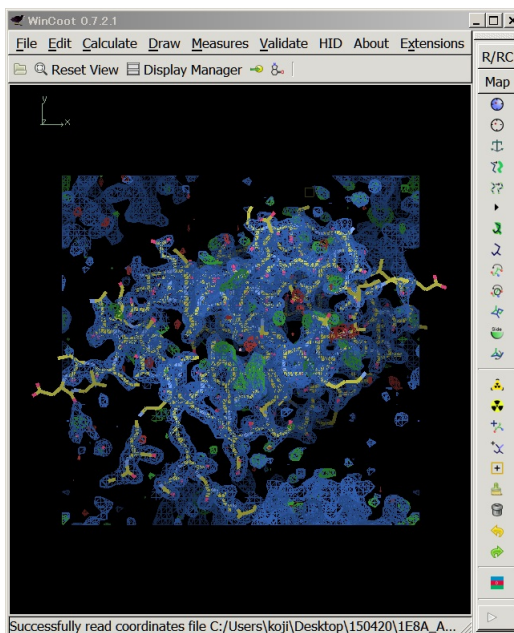
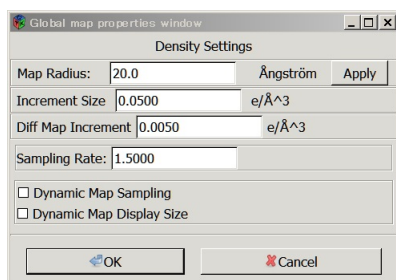
512 WinCoot: Edit → Map Parameters...。

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

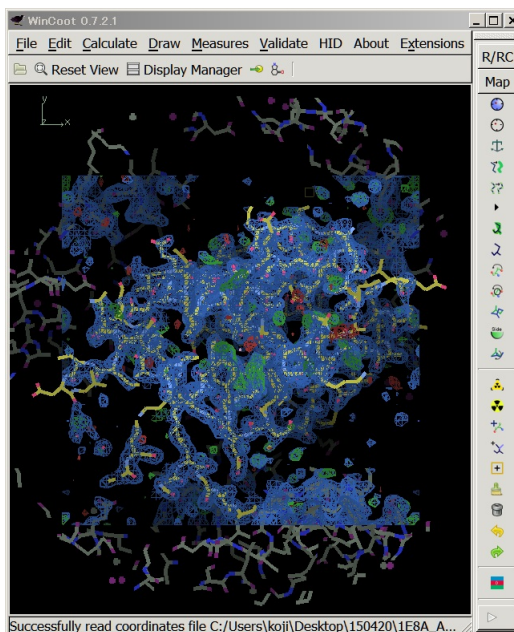
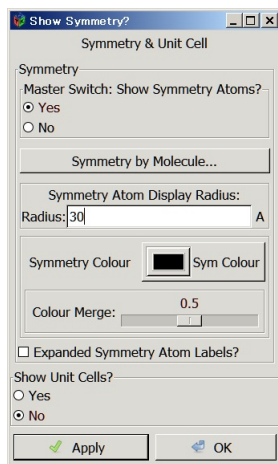
514

515

516 電子密度のうち、
 517 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。
 518 赤と緑は、 $F_o - F_c$ マップのそれぞれ正と負を示し、
 519 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
 520 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
 521 で示されています。
 522 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
 523 行きます。



524
 525
 526 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
 527 します。
 528 WinCoot: Draw → Cell & Symmetry...。
 529 Symmetry/Master Switch: Show Symmetry Atoms? → Yes。
 530 Symmetry Atom Display Radius: 30 Å → OK。



531

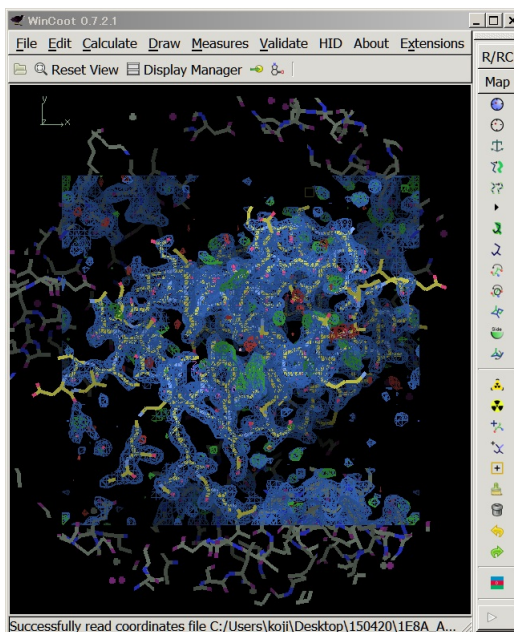
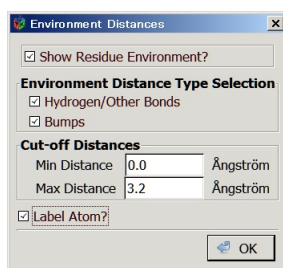
532

533 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。

534 WinCoot: Measures → Environment Distances...

535 Environment Distances: ■ Show Residue Environment?

536 ■ Label Atom? → OK。



537

538

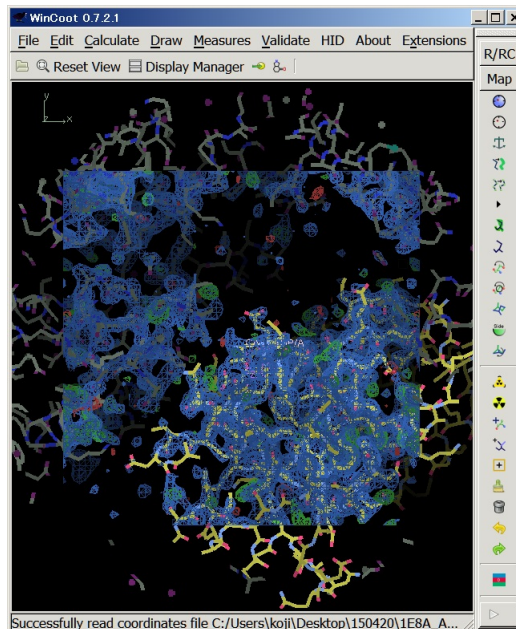
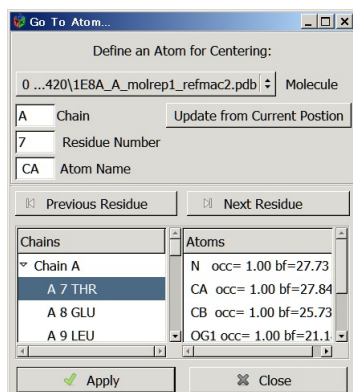
539 WinCoot: Draw → Go To Atom...

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

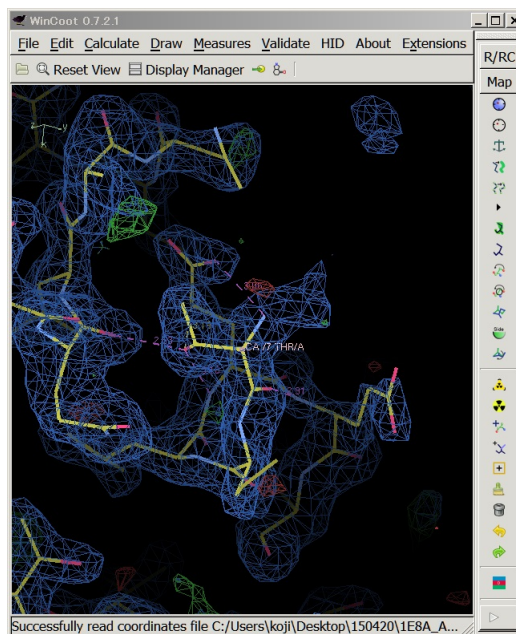
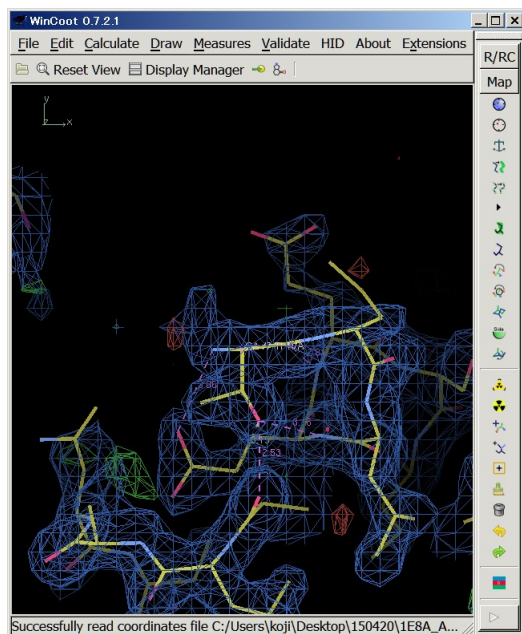
541 右ドラッグ(左から右へ)で、指定したアミノ酸残基を中心に拡大する。

542 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。

543



544



545

546 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。

547 スペースバーを押すと次のアミノ酸残基に移動する。

548 Shift + スペースバーを押すと前のアミノ酸残基に移動する。

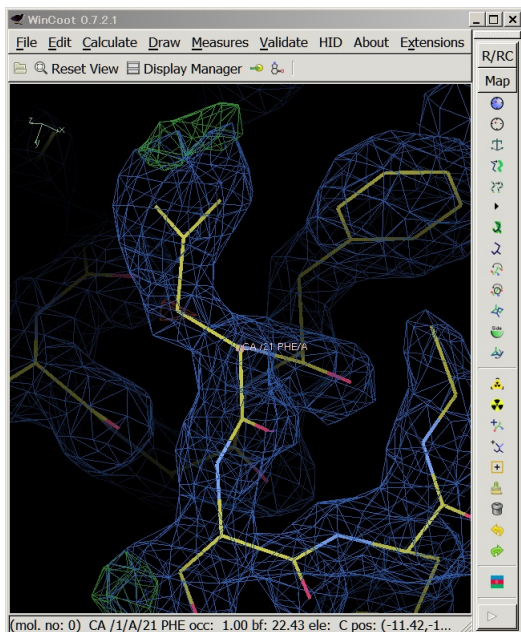
549

550 ここまでが、Coot の使用法の簡単な説明です。

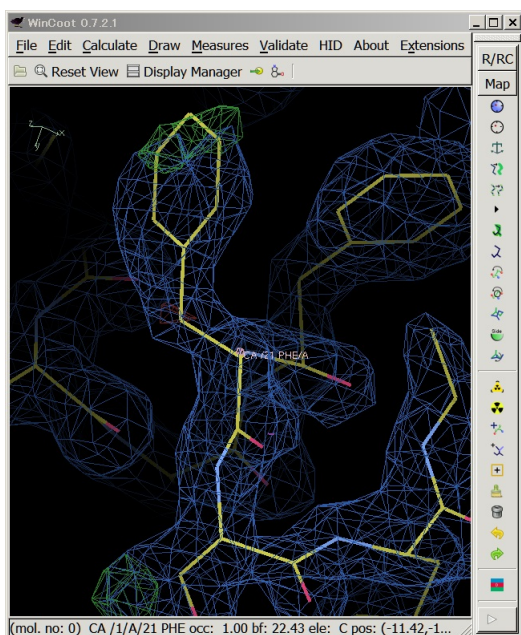
551

552

- 553 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。
554 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。
555
556 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。



- 557
558 WinCoot: Calculate → Model/Fit/Refine...。
559 Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...。
560 Choose a Map: 1 s100a13_refmac2.mtz FWT PHWT を選択し、OK。(不要?)
561 Model/Fit/Refine: Mutate & Auto Fit...。(不要?)
562 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。
563 Resi...: PHE (F)。



- 564
565 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
566 てください。
567 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。

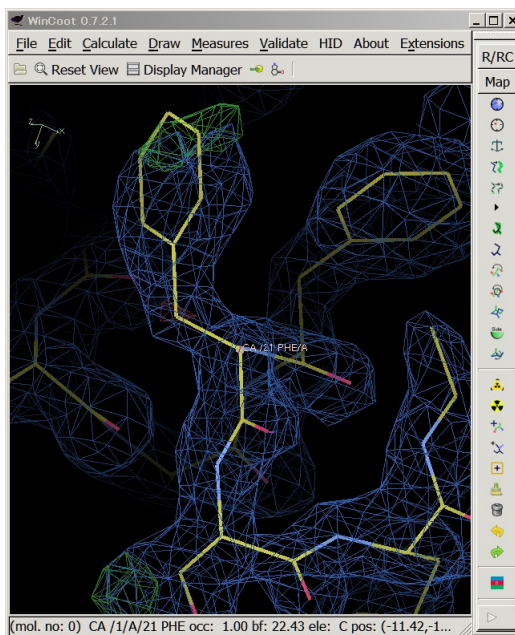
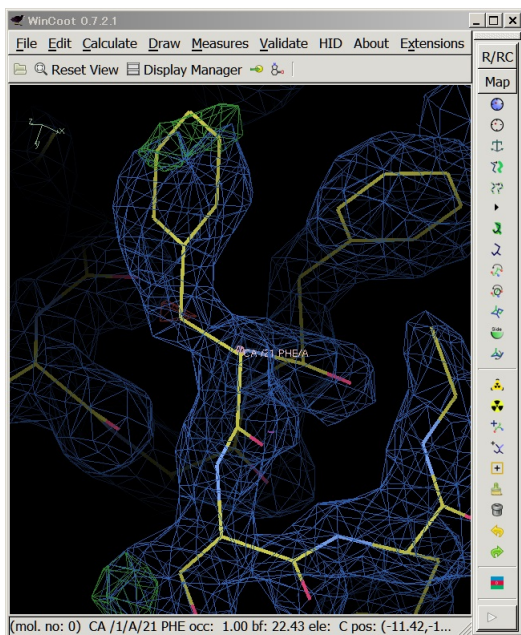
568

569 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。

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

571 WinCoot: CA/21 PHE/A 原子をクリック。

572 Resi...: PHE (F)。



573

574 前回 Mutate & Auto Fit...

今回 Simple Mutate...

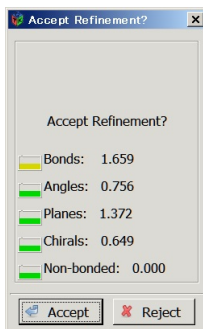
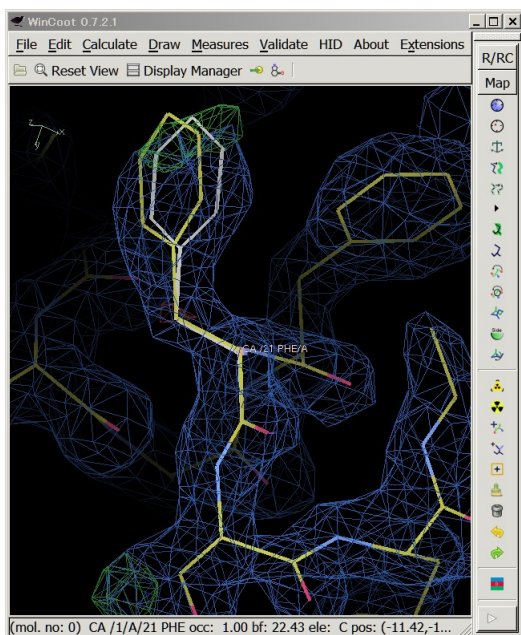
575 さきほど違って、分子モデルと電子密度とが微妙にずれています。

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

577 WinCoot: 21 PHE/A の任意の原子をダブルクリック。

578 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。

579 Accept Refinement?: Accept。

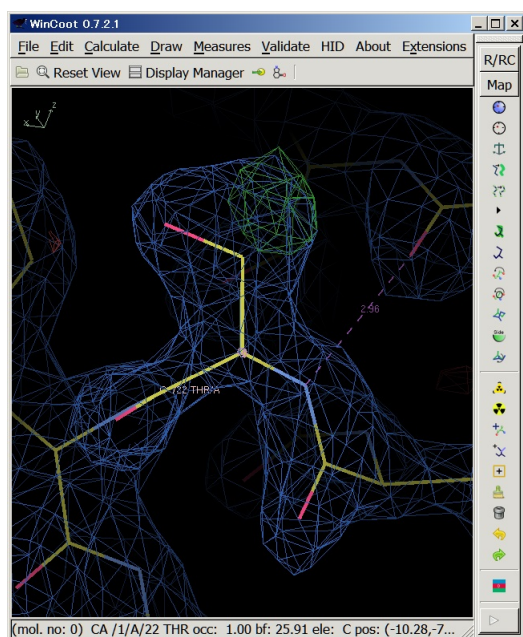


580

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

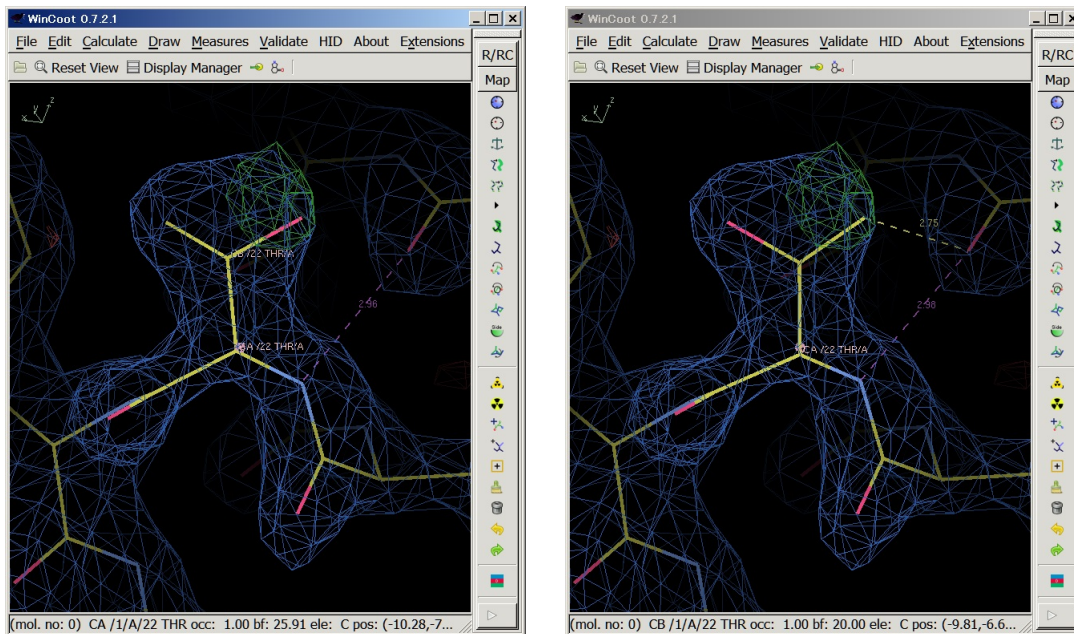
582

- 583 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。
- 584 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。
- 585 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)。



- 586
- 587 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。

588 考えられる解答は以下の2通り。どちらが適切な解か？



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



592 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。

593 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,
594 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。

595
596 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
597 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
598 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
599 正することにしてそのまま放置しておきます。

600 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
601 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。

602 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。

603 WinCoot: File → Save Coordinates...

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

605 Places: 190418

606 Save Hydrogens Save ANISO Records

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

608 これが提出用ファイル 1 個目です。

609

610
611 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
612 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。
613 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。
614 WinCoot: File → Open Coordinates...。
615 Places: 190418
616 Select Coordinates File: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → OK。
617
618 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。
619 WinCoot: Extensions → All Molecule → [Post MR] Fill Partial Residues →
620 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → OK
621
622 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、
623 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。
624
625 2 通りの方法があります。
626
627 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
628 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。
629 WinCoot: Extensions → All Molecule → Fit Protein → 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb
630 → OK
631
632 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
633 法です。
634 WinCoot: Extensions → All Molecule → Stepped Refine →
635 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → OK
636
637 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。
638
639 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。
640 WinCoot: File → Save Coordinates...。
641 Select Molecular Number to Save: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement.pdb → Select
642 Filename...
643 Places: 190418
644 Save Hydrogens Save ANISO Records
645 Name: 1E8A_A_molrep1_refmac2_forAutoRefinement-coot-0.pdb → Save。
646 これが提出用ファイル 2 個目です。
647
648
649

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

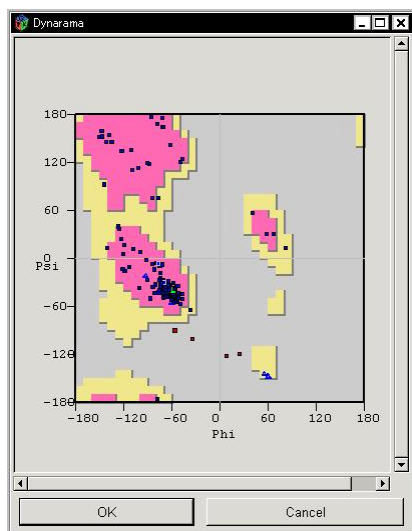
652

653 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
654 します。

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

656 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
657 ると、そのアミノ酸残基を表示する。

658 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
659 が難しい。



660

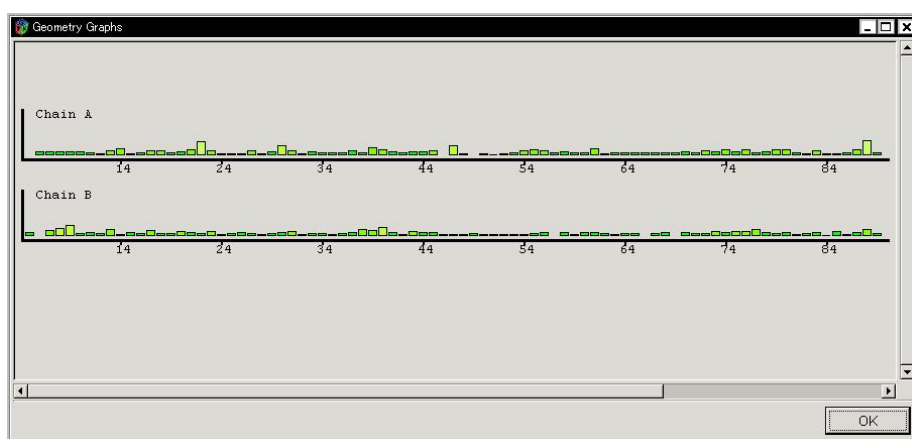
661

662 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。

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

664 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。

665 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。



666

667

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

669

670

671 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。
672 WinCoot: File → Save Coordinates...
673 Save Coordinates Molecule Selector: Save Molecule Number to Save: 0 *****.pdb → Select Filename...
674 Save Filename for Saved Coordinates: Name: デフォルトのまま(*****-coot-1.pdb) → Save in folder:
675 CCP4 で指定したフォルダ → OK
676
677 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
678 小さくなっている(改善されている)はずです。
679
680 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
681 構造解析が完了します。
682
683 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。
684
685

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

687

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

689 “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 PDB website interface. At the top, there's a search bar with the text "Everything" and a search button. Below the search bar, there are navigation tabs for "Author", "Macromolecule", "Sequence", and "Ligand". The main content area is titled "Biological Macromolecular Resource" and includes a "Full Description" section with a "Learn: Featured Molecules" link. A "Molecule of the Month" section highlights "RecA and Rad51" with a 3D protein structure image. Below this, there is a "Protein Structure Initiative Featured System" section for "New NTF2-like Domains". The page also has a sidebar with various links and a right-hand column with news and updates, including a "Latest release: April 2014" announcement and "Resources for High School Video Challenge".

690

691

692 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。

The screenshot shows a search results page for 'brazein' on the RCSB PDB website. The search criteria are 'Check All' and 'View: Detailed'. The results list 8 entries, with the first five visible:

- 2L07**: 1H, 13C, and 15N chemical shifts and structure of brazein-derived peptide CKR-PNG. Authors: Dittli, S.M., Assadi-Porter, F.M., Rao, H., Tonelli, M. Release: 2011-06-22. Experiment: SOLUTION NMR. Residue Count: 18. Citation: Structural role of the terminal disulfide bond in the sweetness of brazein. (2011) Chem Senses 36: 821-830.
- 2LY5**: Refined solution structure of recombinant brazein. 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. Citation: Temperature-dependent conformational change affecting Tyr11 and sweetness loops of brazein. (2013) Proteins 81: 919-925.
- 4HE7**: Crystal Structure of Brazein. 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. Citation: The structure of brazein, a sweet-tasting protein from the wild African plant Pentadiplandra brazzeana. (2013) Acta Crystallogr., Sect. D 69: 642-647.
- 2KYQ**: 1H, 15N, 13C chemical shifts and structure of CKR-brazein. Authors: Dittli, S.M., Assadi-Porter, F.M., Rao, H., Tonelli, M. Release: 2011-05-18. Experiment: SOLUTION NMR. Residue Count: 53. Citation: Structural role of the terminal disulfide bond in the sweetness of brazein. (2011) Chem Senses 36: 821-830.
- 2LY6**: Refined solution structure of recombinant brazein 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. Citation: Temperature-dependent conformational change affecting Tyr11 and sweetness loops of brazein. (2013) Proteins 81: 919-925.

693

694 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。

The screenshot shows the detailed entry page for PDB ID 4HE7, titled 'Crystal Structure of Brazein'. The primary citation is 'The structure of brazein, a sweet-tasting protein from the wild African plant Pentadiplandra brazzeana.' by Nagata, K., Hongo, N., Kameda, Y., Yamamura, A., Sasaki, H., Lee, W.C., Ishikawa, K., Suzuki, E., Tanokura, M. (2013) Acta Crystallogr., Sect. D 69: 642-647. The abstract states: 'Brazein is the smallest sweet-tasting protein and was isolated from the wild African plant Pentadiplandra brazzeana. The brazein molecule consists of 54 amino-acid residues and four disulfide bonds. Here, the first crystal structure of brazein 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 brazein reported here will provide additional information and further insights into the intermolecular interaction of brazein with the sweet-taste receptor.'

Key information from the page:

- Classification:** Plant Protein
- Structure Weight:** 6514.34
- Molecule:** Defensin-like protein
- Polymer:** 1
- Chains:** A
- Mutation:** Q1E
- Organism:** Pentadiplandra brazzeana
- UniProtKB:** P56552
- Sequence:** QDKCKKVVYENYPVSKCQLANQCNYDCKL DKHARS GECFYEDEKRNLCICDVCYEE
- Resolution:** 1.80 Å
- R-Value:** 0.219 (obs.)

695

696 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。

- 697 アミノ酸配列 FASTA Sequence
 698 立体構造 PDB file (Text)
 699 電子密度ファイルの入手は以下のように行う。
 700 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 divided into several sections:

- Plots:** Links to various plots like Real-space R-value, correlation coefficient, etc.
- Download:** Links to coordinates, maps, statistics, and all files.
- 4he7 Links:** Links to PDB, RCSB, PDBsum, PDB REDO, PDBWiki, PROCHECK, PDBREPORT, JenaLib, OCA, and Proteopedia.
- Miscellaneous:** Links to EDS home page, EDS help, and mail options.
- EDS Summary:** A central box containing map status (CCP4 map created on 10-Aug-2013), resolution (30.70 - 1.80 Å), R value (0.253), cell dimensions, and other statistics.
- PDB header information:** A table with columns for ID, Name, Date, and EDS ID. It lists several entries related to the structure of Brazein.
- PDB entry quality indicators:** A chart comparing key quality metrics (Rfree, Clashscore, Ramachandran outliers, etc.) against percentile ranks and values.

- 701
 702 左カラムの Download から Maps をクリックする。
 703 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
 704 を mFo-DFc にすると Fo-Fc マップが作成される。

The screenshot shows a form titled "Electron-density map generation for 4he7". It contains two dropdown menus: "Map format" set to "CCP4" and "Type" set to "2mFo-DFc". To the right of these dropdowns is a button labeled "Generate map", which is highlighted with a red border.

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

The screenshot shows the progress of map generation. At the top, it says "Electron-density map generation for 4he7". Below that, it says "Generating map....". At the bottom, it says "Here is your gzipped map : [4he7.ccp4.gz](#)".

- 706

Electron-density map generation for 4he7

Map format : CCP4 Type : mFo-DFc Generate map

707 (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.

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

708

709 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
710 を map に変更する必要あり。

711 2mFo-DFc マップ 4he7.ccp4 → 4he7.map

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

713 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
714 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を
715 つける。

716 Coot を起動し、File から

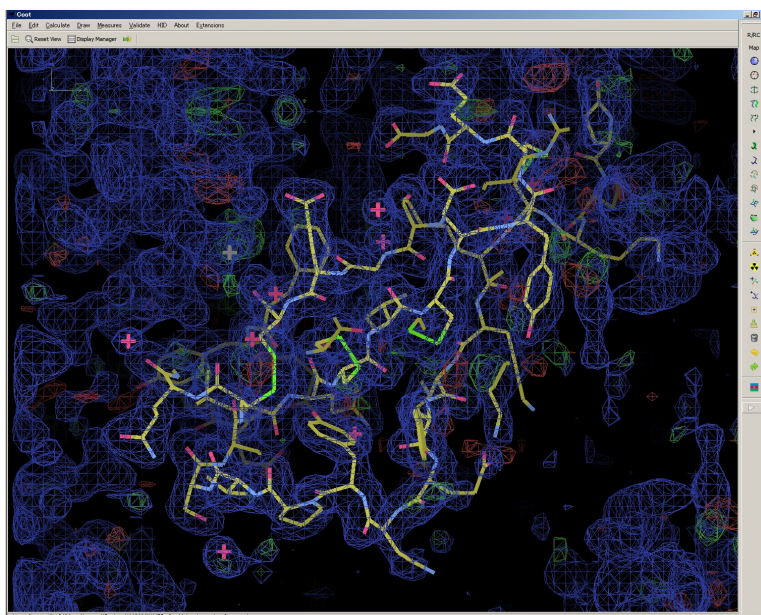
717 Open Coordinates... 4he7.pdb

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

719 Open Map... 4he7_diff.map Is Difference Map 緑・赤表示

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

721 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。



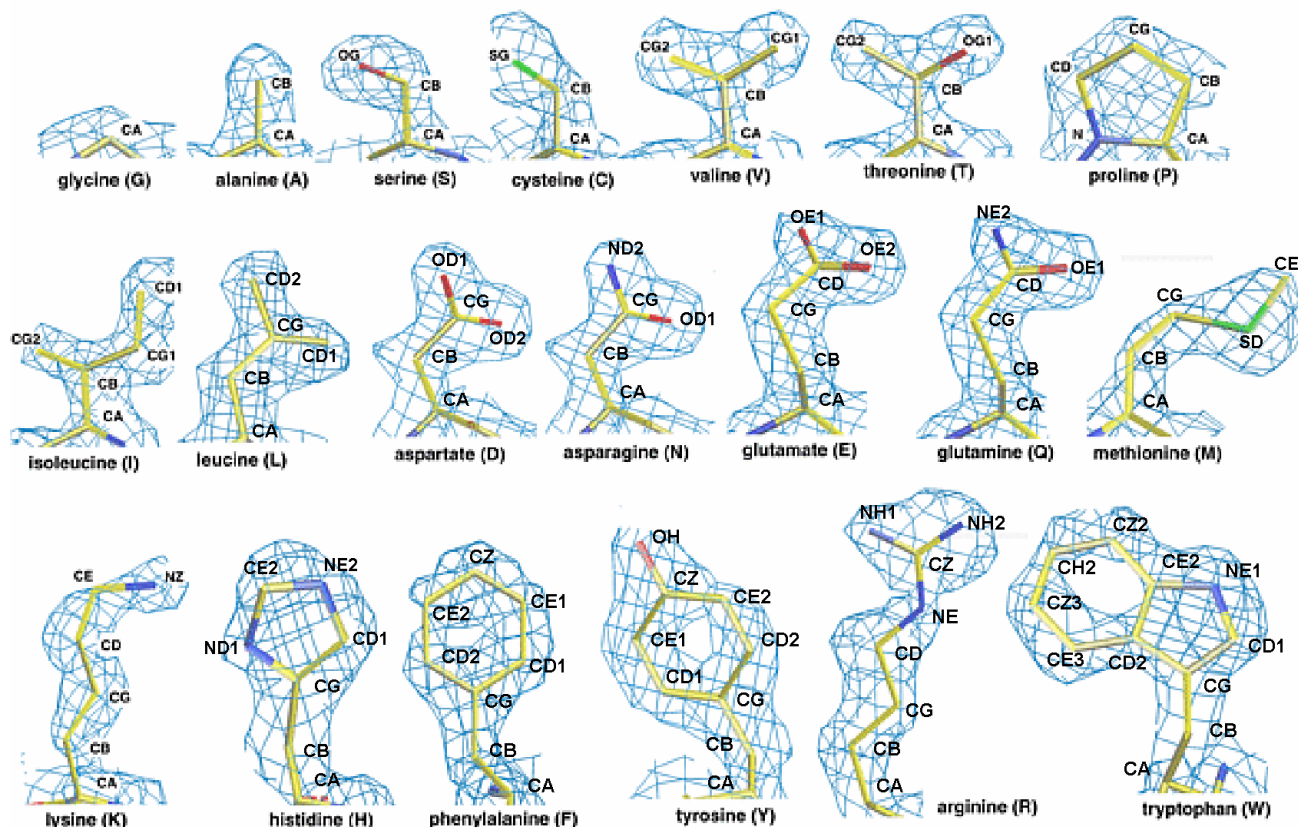
722

723

724

725 各アミノ酸残基の電子密度例

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



727

728

729 PDB ファイルの項目

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