

# タンパク質結晶構造解析装置 リガク Micro7 HFM-AXIS7 Part 2 CCP4i 4.6.0 による解析マニュアル

東京大学工学系研究科 総合研究機構 ナノ工学研究センター X線実験室

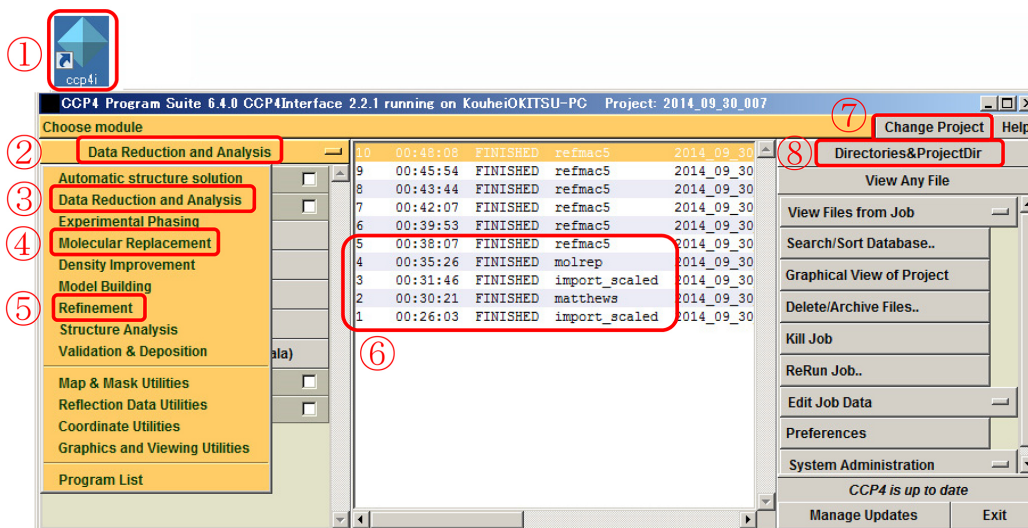


図0 CCP4i のメインウィンドウ

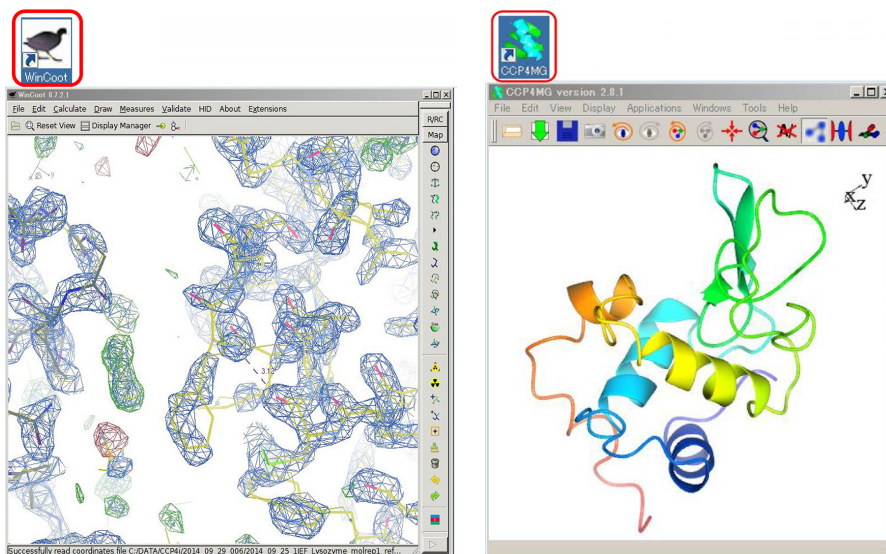


図1 電子密度マップ

図2 リボンモデル

図0は CCP4i 4.6.0 を起動したメインウィンドウで、「[2] メインプルダウンメニュー」を開いたところ。ニワトリ卵白リゾチームの構造を、一次構造 (アミノ酸配列) が類似した相同タンパク質である七面鳥卵白リゾチームの構造から、分子置換法で求める手順を記述します。図0 [1]~[8] をどう使うかがポイントです。図1は、WinCoot で求められた構造の電子密度マップを表示したところ、図2は、CCP4MG でリボンモデルを表示したところです。

# 目次

<b>第 1 章</b>	<b>CCP4i による分子構造の決定</b>	<b>1</b>
1.1	必要なファイルの準備	2
1.1.1	実験で得た積分強度データファイルの準備	2
1.1.2	アミノ酸配列のデータの準備	2
1.1.3	相同タンパク質の分子構造データの準備	2
1.2	CCP4i の起動	3
1.3	CCP4i の起動とプロジェクトの設定	3
1.4	反射強度データのフォーマット変換	5
1.5	非対称ユニット数の見積もり	6
1.6	反射強度データのフォーマット変換 (再実行)	8
1.7	Molrep による分子置換の実行	8
1.8	分子構造の最適化 (Refinement)	9
<b>第 2 章</b>	<b>WinCoot による電子密度マップの表示</b>	<b>13</b>
2.1	WinCoot の立ち上げ	13
2.2	背景色の変更 (任意)	13
2.3	PDB ファイルのロード	14
2.4	MTZ ファイルのロード	14
2.5	任意の原子付近の拡大表示	15
<b>第 3 章</b>	<b>CCP4MG によるリボンモデルの表示</b>	<b>18</b>
3.1	CCP4MG の立ち上げ	18
3.2	PDB ファイルの読み込みとリボンモデルの描画	18
<b>索引</b>		<b>20</b>

# 目次

0	CCP4i のメインウィンドウ	i
1	電子密度マップ	i
2	リボンモデル	i
1.1	PDB の URL で 2LYZ を入力	2
1.2	2LYZ の URL からアミノ酸シーケンスファイルをダウンロード	2
1.3	ニワトリ卵白リゾチームのアミノ酸配列	2
1.4	PDB の URL で 1JEF を入力	3
1.5	1JEF の URL から PDB ファイルをダウンロード	3
1.6	プロジェクトフォルダーの中身	3
1.7	プロジェクトフォルダーの設定	4
1.8	プロジェクトフォルダーの設定	4
1.9	プロジェクトフォルダーの中にできたサブフォルダー	4
1.10	プロジェクトの変更	4
1.11	反射強度データのフォーマット変換開始	5
1.12	反射強度データのインポート	5
1.13	反射強度データのフォーマット変換画面	5
1.14	反射強度データファイルの選択	5
1.15	反射強度データのフォーマット変換画面	6
1.16	フォーマット変換実行中のメッセージ	6
1.17	フォーマット変換終了のメッセージ	6
1.18	分子置換メニューを選択	6
1.19	Cell Content Analysis の選択	6
1.20	Cell Content Analysis 設定画面	7
1.21	Cell Content Analysis 設定画面	7
1.22	Cell Content Analysis 終了のメッセージ	7
1.23	Cell Content Analysis の結果	7
1.24	フォーマット変換の再実行	8
1.25	確認メッセージ	8
1.26	フォーマット変換の終了	8
1.27	Molrep(分子置換) を選択	8
1.28	分子置換設定画面	8
1.29	分子置換実行中のメッセージ	8

1.30	分子置換の終了のメッセージ	8
1.31	Refinement を選択	9
1.32	Refmac5 を選択	9
1.33	リファインメント設定画面	9
1.34	リファインするファイルを選択	10
1.35	リファインメント設定画面	10
1.36	リファインメント実行中のメッセージ	10
1.37	リファインメント終了のメッセージ	10
1.38	リファインメントのグラフ表示を選択	10
1.39	リファインメントによる R 因子の変化	10
1.40	リファインメント設定画面	11
1.41	リファインメント終了のメッセージ	11
1.42	リファインメントのグラフ表示を選択	11
1.43	リファインメントによる R 因子の変化	11
1.44	リファインメントのグラフ表示を選択	12
1.45	リファインメントによる R 因子の変化	12
2.1	WinCoot を立ち上げたところ	13
2.2	背景色の白への変更	14
2.3	原子座標ファイルのオープン	14
2.4	Recently Used をクリック	14
2.5	プロジェクトフォルダーを指定	14
2.6	最終リファイン後の PDB ファイルをオープン	14
2.7	アミノ酸配列を表示	14
2.8	MTZ ファイルのオープン	15
2.9	Recently Used をクリック	15
2.10	プロジェクトフォルダーを指定	15
2.11	最終リファイン後の MTZ ファイルをオープン	15
2.12	アミノ酸配列と電子密度を重ねて表示	15
2.13	分子中の任意の原子を指定	15
2.14	Chain A をプルダウン	16
2.15	アミノ酸と原子の指定	16
2.16	指定したアミノ酸と原子を中心に再表示	16
2.17	A 38 Phe を中心に拡大表示	16
3.1	CCP4MG を立ち上げたところ	18
3.2	ファイルオープン	19
3.3	PDB ファイルのオープン	19
3.4	リボンモデルの表示	19



# 第 1 章

## CCP4i による分子構造の決定

この章では、フリーソフトウェア CCP4i による分子構造の決定について説明します。

結晶構造解析には、結晶構造因子の絶対値は測定できるものの、その位相角がわからないという問題 (位相問題) があります。低分子結晶に対しては直接法がきわめて有効で、これが開発されてから事実上位相問題がなくなっていました。直接法は、電子密度が正の実数であるというあたりまえの事実が、位相に対して強い縛りを与えていることをもとに、純粋に数学的な手法で位相を決定してしまうというものです。この手法を開発したハウプトマン (Herbert Aaron Hauptman; 1917/2/14-2011/10/23) とカール (Jerome Karle; 1918/6/18-2013/6/6) には、1985 年ノーベル化学賞が与えられています。ところがタンパク質結晶の場合は、分子量が低分子結晶と比較して懸絶して大きく、直接法だけで位相決定を行うことは、ほぼできません。最初のタンパク質結晶構造解析は、ヘモグロビンとミオグロビンに対して成功を収めたのですが、このときに用いられた位相決定法が水銀による重原子同型置換法でした。この仕事を行ったペルーツ (Max Ferdinand Perutz; 1914/5/19-2002/2/6) とケンドルー (John Cowdery Kendrew; 1917/3/24-1997/8/23) には、1962 年ノーベル化学賞が与えられています。

さらに、1980 年代以降、タンパク質が大腸菌などの生物を使って遺伝子工学の手法により人工的に生成できるようになってから、20 種類のアミノ酸のひとつメチオニンが持つイオウ原子を周期律表のすぐ下にあるセレンの原子で置き換えてや

ることにより、セレノメチオニルタンパク質を合成できるようになりました。セレンの  $K$  吸収端は  $1\text{\AA}$  付近 ( $0.979\text{\AA}$ ,  $12.662\text{ keV}$ ) にあり、吸収端の上下で、X 線に対して大きく異なる異常分散を示します。シンクロトロン放射光を使ってセレンの吸収端付近で回折データを得ることにより位相決定ができることを示したのは、ヘンドリックソン (Wayne A. Hendrickson; 1941/4/25-) です。

全く分子構造が未知のタンパク質結晶に対する位相決定法は、上記の重原子同型置換法と異常分散法の主にふたつで、これらを組み合わせて位相決定が行われることもあります。重原子同型置換法と異常分散法は、導入した重原子かセレン原子かを目印として位相を決定する手法です。

これらの手法により今日プロテインデータバンク [Protein Data Bank(PDB)] に登録されているタンパク質構造は、100,000 種類以上に達しています。このため、分子構造が未知のタンパク質でも、アミノ酸配列 (一次構造) が似たタンパク質 (相同タンパク質) の分子構造がわかっているケースが多々あります。相同タンパク質の分子構造から出発して、対象とするタンパク質の分子構造が決定できる場合が多く、この手法を分子置換法 (Molecular replacement) と言います。

このマニュアルでは、この手法を用いて分子構造を決定する手順を記述します。七面鳥卵白リゾチームの分子構造から出発して、ニワトリ卵白リゾチームの分子構造を決定する例を紹介します。

なお、1 本のアミノ酸が折りたたまれて (フォールディング) ひとつの分子を形成するタンパク質を単量体といいませんが、単量体のユニットがいく

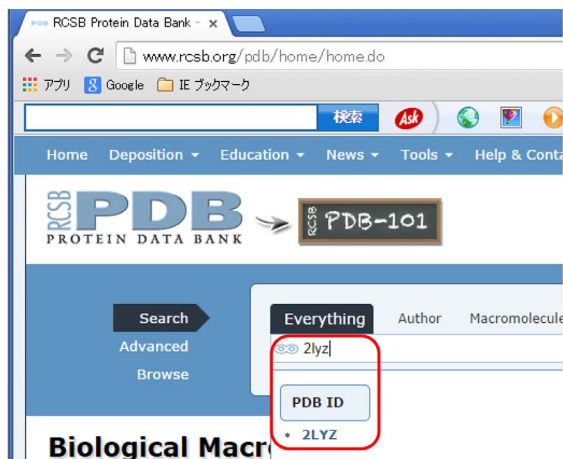


図 1.1 PDB の URL で 2LYZ を入力

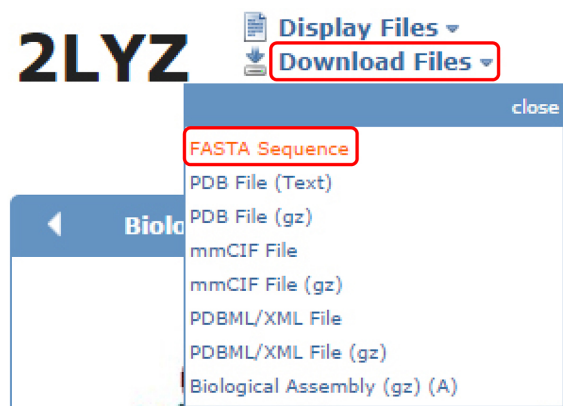


図 1.2 2LYZ の URL からアミノ酸シーケンスファイルをダウンロード

つか集合してひとつの分子を構成するタンパク質を複合体といいます。ユニットごとの分子構造がわかっている場合に、その位置と回転角を決めることにより構造決定する手法も分子置換法とよばれますが、これについてはこのマニュアルでは記述しません。

## 1.1 必要なファイルの準備

### 1.1.1 実験で得た積分強度データファイルの準備

Part 1 マニュアルの手順で最後に得られるのは反射指数と積分強度のデータで、これは Crystal-Clear 1.3.5 で用いた作業フォルダーに「ScalAveraged.ref」という名前で保存されています。まずこれがが必要です。



図 1.3 ニワトリ卵白リゾチームのアミノ酸配列

### 1.1.2 アミノ酸配列のデータの準備

タンパク質結晶構造解析はアミノ酸配列 (一次構造) が既知であることが大前提です。構造解析の対象とするタンパク質分子のアミノ酸配列を記述したデータファイルが必要です。

図 1.1 は、プロテインデータバンク [Protein Data Bank(PDB)] のホームページ左上でニワトリ卵白リゾチームの PDB ID, 2LYZ をタイプしたところです。PDB のホームページはグーグルで「PDB」とタイプして検索すると第 1 候補にヒットします。ニワトリ卵白リゾチームの PDB ID もサーチエンジンで簡単に調べられます。図 1.1 赤枠の上に 2LYZ とタイプすると赤枠の一番下に 2LYZ と表示されますが、これをクリックします。

ニワトリ卵白リゾチーム (PDB ID: 2LYZ) の URL にジャンプすると、右上に図 1.2 のように表示されています。「Download Files」をクリックするとプルダウンメニューが開きます。一番上の「FASTA Sequence」を左クリックしてシーケンスファイルをダウンロードします。ファイル名を「2LYZ\_HenEggWhite.seq」と付けたとして、以下の記述をします。

図 1.3 は、2LYZ\_HenEggWhite.seq の中身をエディターで開いて表示しています。一文字のアルファベットがひとつのアミノ酸に対応しており、129 個のアミノ酸配列がテキストデータとして書かれています。

### 1.1.3 相同タンパク質の分子構造データの準備

図 1.4 は、PDB の URL 左上で七面鳥卵白リゾチームの PDB ID, 1JEF をタイプしたところです。赤枠一番下の 1JEF の文字をクリックすると 1JEF の URL にジャンプします。このホームページの右上には図 1.5 が表示され

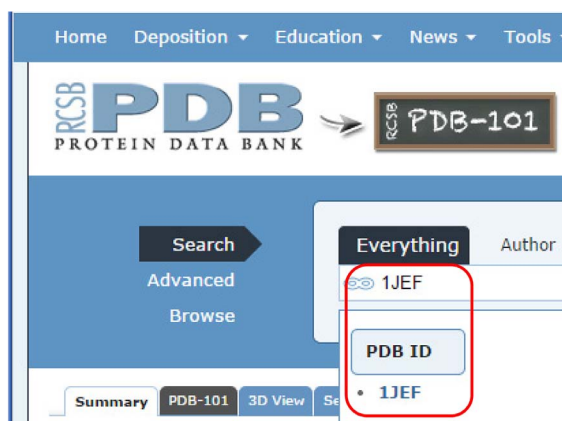


図 1.4 PDB の URL で 1JEF を入力



図 1.5 1JEF の URL から PDB ファイルをダウンロード

ています。「Download Files」をクリックするとプルダウンメニューが開きます。2 番目の「PDB File (Text)」を左クリックして PDB ファイルをダウンロードします。このファイルに「1JEF\_TurkeyEggWhite.PDB」と名前をつけます。

図 1.6 では、準備した 3 つのファイルが、CCP4i の作業フォルダー「C:\ DATA\ CCP4i\ 2014.09.30.018\_K.Okitsu」の中に置かれていることがわかります。

## 1.2 CCP4i の起動

表紙、図 0 の左上「[1]」のアイコンをクリックすると CCP4i のメインウィンドウが立ち上がります。



図 1.6 プロジェクトフォルダーの中身

表紙、図 0 左プルダウンメニューの「[1] Data Reduction and Analysis」「[4] Molecular Replacement」「[5] Refinement」をクリックすることによりデータ処理を進めてゆきます。「[2]」のボタンにはこれをクリックして開いたプルダウンメニューの処理が表示されます。中央の「[6]」は、ジョブ表示フィールドで、実行中ないしは終了したジョブが表示されます。表紙、図 0 右の「[7] Change Project」「[8] Directories&ProjectDir」のボタンは、プロジェクトを変えるときおよびプロジェクトの作業フォルダーを設定するときにクリックします。

## 1.3 CCP4i の起動とプロジェクトの設定

表紙、図 0 左上「[1]」CCC4i アイコンをダブルクリックすると、この図のような CCP4i メインウィンドウが立ち上がります。表紙、図 0 右「[8] Directories&ProjectDir」をクリックすると図 1.7 [p.4] のようなウィンドウが立ち上がります。多くのプロジェクトが設定されているときは「Edit list」をクリックしてプルダウンメニューを表示させ、「Delete last item」をクリックすることにより、一番下に表示されたプロジェクトを削除することができます。

図 1.7 [p.4] 右の「Add Project」をクリックすると図 1.8 [p.4] 右「Add Project」の上に、新たな「Browse ボタン」が表示されます。これをクリックして図 1.6 の上に表示されているプロジェクトフォルダーをセットします。「2014.09.30.018\_K.Okitsu」をプロジェクト名にすることにして、[Ctrl]+[C] で、クリップボードにコピーします。左の Project の欄は最

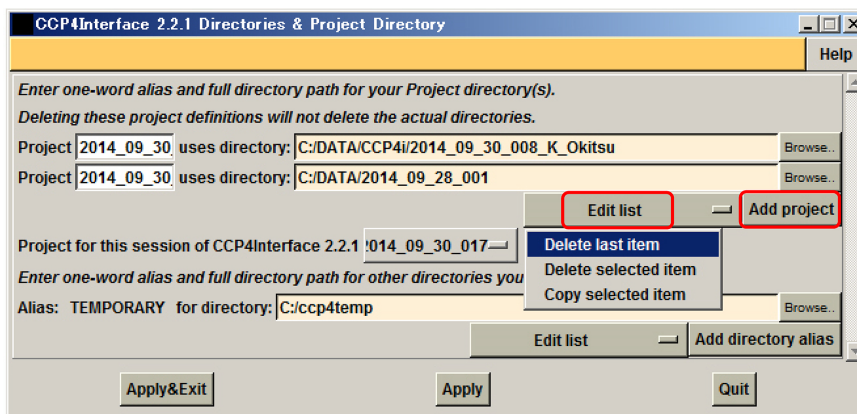


図 1.7 プロジェクトフォルダーの設定

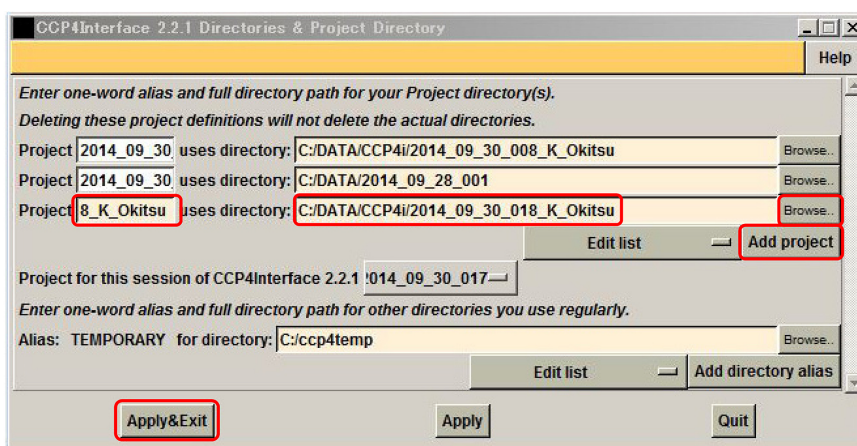


図 1.8 プロジェクトフォルダーの設定

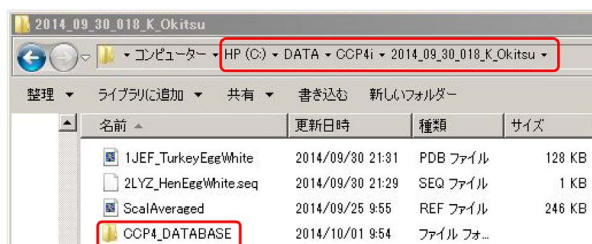


図 1.9 プロジェクトフォルダーの中にできたサブフォルダー

初は空欄になっていますが、[Ctrl]+[V] で、プロジェクト名をペーストします。図 1.8 左下の「Apply&Exit ボタン」をクリックして、このウィンドウを閉じます。すると図 1.9 のように、プロ

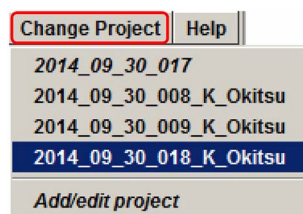


図 1.10 プロジェクトの変更

ジェクトフォルダーの中に、新しいサブフォルダーが生成されます。

次に表紙、図 0 右「[7] Change Project」をクリックして図 1.10 のようにプルダウンメニューを表示させ、「2014.09.30.018\_K\_Okitsu」をカレントプロジェクトとして選択します。



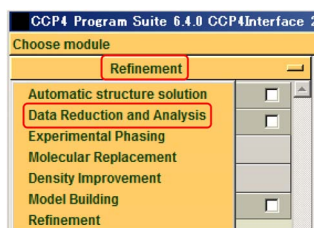


図 1.11 反射強度データのフォーマット変換開始

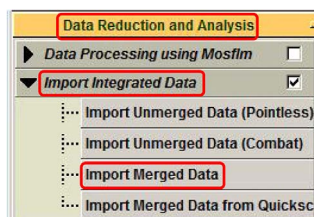


図 1.12 反射強度データのインポート

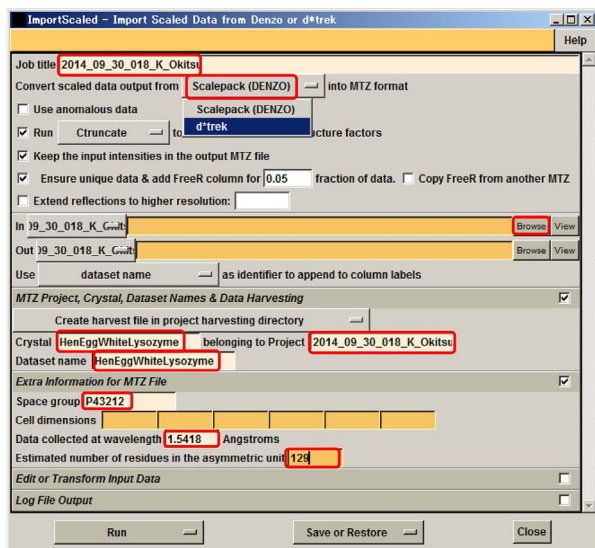


図 1.13 反射強度データのフォーマット変換画面

## 1.4 反射強度データのフォーマット変換

図 1.9 のフォルダーにある「ScalAveraged.ref」は CrystalClear 1.3.5 により処理された X 線積分回折強度データですが、これを CCP4i で取り扱える mtz のフォーマットに変換する必要があります。

表紙, 図 0 左「[2]」をクリックしてプルダウンメニューを開き「[3] Data Reduction and Analysis」

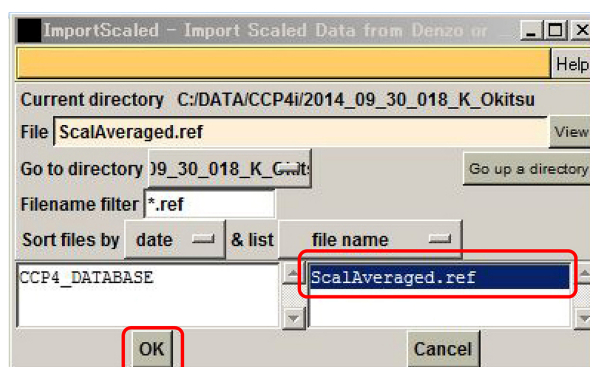


図 1.14 反射強度データファイルの選択

をクリックします。図 1.11 のように表示されている場合は「Refinement」をクリックして開き、プルダウンメニューから「Data Reduction and Analysis」を選択すると「Refinement」が表示されていた部分に、図 1.12 のように「Data Reduction and Analysis」が表示されます。これのふたつ下にある「Import Integrated Data」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Import Merged Data」をクリックすると図 1.13 が表示されます。

図 1.13 一番上の Job Title と中程やや右にある belonging to Project に、先ほどコピーした「2014\_09\_30\_018\_K.Okitsu」を [Ctrl]+[V] によりペーストします。また、図 1.13 上部中央にある「Scalepack (DENZO)」をクリックしてプルダウンメニューを表示させ「d\*trek」を選択すると「Scalepack (DENZO)」の表示は「d\*trek」に変わります。左やや下の Crystal と Dataset name は任意ですが、ここでは「HenEggWhiteLysozyme」と入力してあります。

左下の Space group(空間群)には CrystalClear 1.3.5 で推定した「P43212」( $P4_32_12$ ), その下の wavelength(波長)には、CuK $\alpha$  線の波長「1.5418」(Angstroms)を入力します。一番下の number of residues はアミノ酸残基 (residue) 数でニワトリ卵白リゾチームについてわかっている値「129」を入力します。

図 1.13 右にある「Browse ボタン」をクリックすると図 1.14 が表示されます。プロジェクトフォルダーが正しくセットされていれば図右のよ

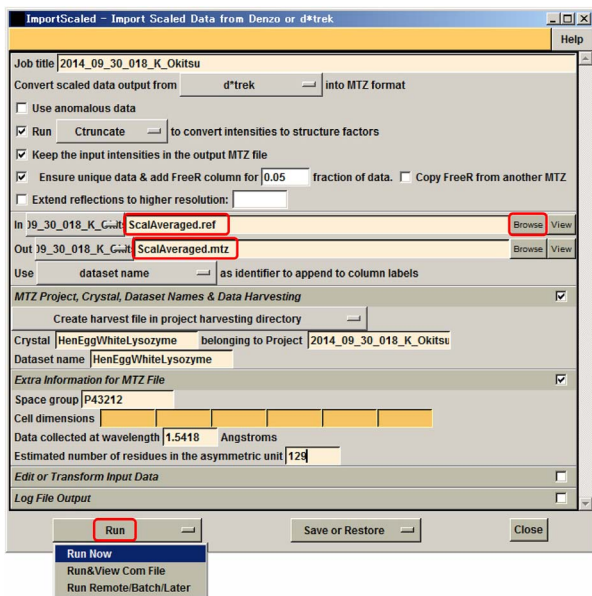


図 1.15 反射強度データのフォーマット変換画面

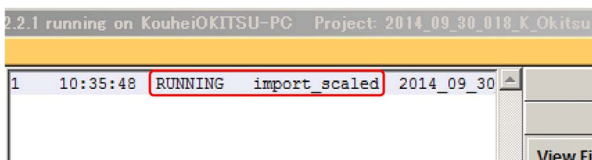


図 1.16 フォーマット変換実行中のメッセージ

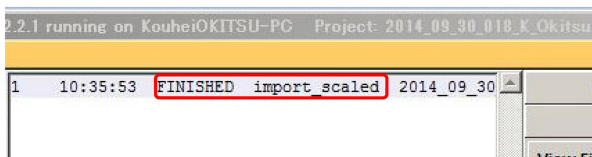


図 1.17 フォーマット変換終了のメッセージ

うに「ScalAveraged.ref」が表示されますが、もし何も表示されなかったら、図 1.13 [p.5] 上部で「Scalepack (DENZO)」の表示が「d\*trek」に正しく変わっているかどうかを確認してください。

図 1.14 [p.5] 左下の「OK」をクリックすると図 1.15 が表示されます。右の「Browse ボタン」の左に「ScalAveraged.ref」がセットされ、その下には「ScalAveraged.mtz」が自動的にセットされています。左下の「Run ボタン」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Run Now」をクリックすると「ScalAveraged.ref」から「ScalAveraged.mtz」へのフォーマット変換がスタート

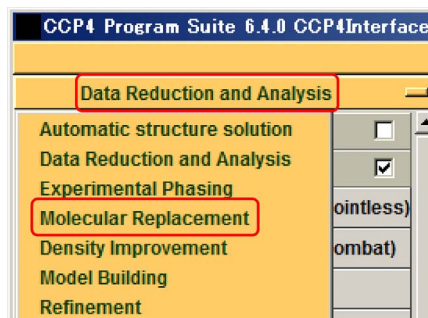


図 1.18 分子置換メニューを選択

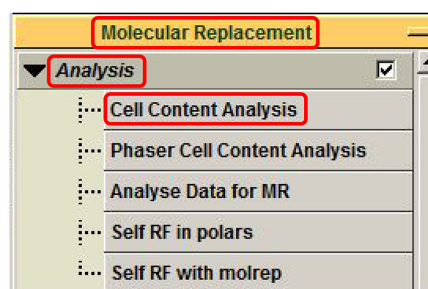


図 1.19 Cell Content Analysis の選択

します。

フォーマット変換実行中は図 1.16 のように「RUNNING」のメッセージが表示され、終了すると図 1.17 のように「FINISHED」のメッセージに変わります。

## 1.5 非対称ユニット数の見積もり

このマニュアルに記述しているニワトリ卵白リゾチームの結晶の空間群は  $P4_32_12$  で、ひとつの単位法に含まれる対称ユニットは 8 個です。ただし、129 個のアミノ酸残基からなるひとつの分子が対称ユニットひとつに対応しているとは現時点では断定できていません。複数個の分子でひとつの対称ユニットを構成している場合があります。このステージでは、対称ユニットがいくつの分子で構成されているかを、単位胞の体積と分子の分子量を比較することで推定します。

CCP4i のメインウィンドウ左上に図 1.18 のように「Data Reduction and Analysis」が表示されているはずですがこれをクリックしてプルダウンメニューを開き「Molecular Replacement」を

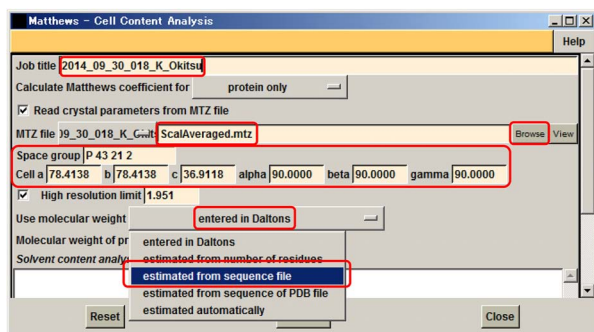


図 1.20 Cell Content Analysis 設定画面

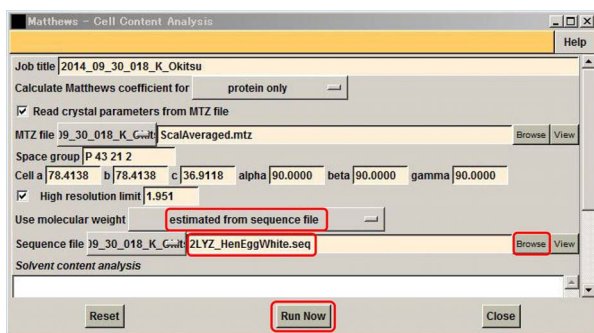


図 1.21 Cell Content Analysis 設定画面

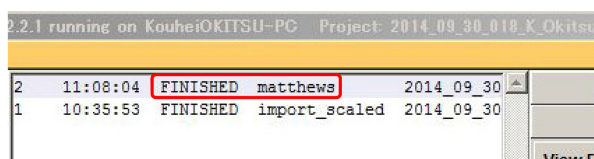


図 1.22 Cell Content Analysis 終了のメッセージ

クリックします。

図 1.19 が表示されたら「Analysis」をクリックしてプルダウンメニューを開き、その中の「Cell Content Analysis」をクリックします。図 1.20 が表示されますので、一番上の Job title にはプロジェクト名をクリップボードから [Ctrl]+[V] でペーストします。その下にある MTZ file は、右側の「Browse ボタン」をクリックして開きプロジェクトフォルダーにある Mtz の拡張子のファイルを選択してロードします。このファイルには、結晶情報がすでに格納されているので、その下の Space group と格子定数は自動的にセットされます。中央下にある「entered in Daltons」は分子量がわかっていたらそれをタイプしても構

Nmol/asym	Matthews Coeff	%solvent	P(1.95)	P(tot)
1	1.99	38.13	1.00	1.00

図 1.23 Cell Content Analysis の結果

わないのですが、ここではこのボタンをクリックしてプルダウンメニューを開き「estimated from sequence file」を選択することになります。

図 1.21 のようになりますが、右にある「Browse ボタン」をクリックしてプロジェクトフォルダーにある「2LYZ\_HenEggWhite.seq」をロードします。このファイルにはニワトリ卵白リゾチームの amino acid sequence が書かれているので分子量が自動的に見積もられることになります。図 1.21 下の「Run Now ボタン」をクリックすると計算が始まり、終了すると図 1.22 のメッセージがメインウィンドウに表示され、図 1.21 の下にある solvent content analysis のウィンドウには図 1.23 が表示されます。

図 1.23 の上には計算された分子量と単位胞の体積が記述されます。分子量から分子が占める体積を見積もることができます。空間群 (Space group)  $P4_32_12$  の単位胞中の対称ユニットの数は 8 ですが、図 1.23 左下に記されたように非対称ユニットの数 (NMol/Aym) が 1、すなわち対称ユニットが 1 分子で構成されるとき、図 1.23 中央下に示されるように溶媒 (solvent) のパーセンテージは 38.13% であると見積もられ、そうである確率は図 1.23 右下に示されるように 100% であるという計算結果が出てきています。

タンパク質結晶に含まれる溶媒は一般に 30 ~ 70% であることから、非対称ユニットの数 (NMol/Aym) が 2 以上ではあり得ない、と見積もられています。この例では、たまたまそのような結果になったのですが、非対称ユニットの数 (NMol/Aym) が 2 以上になることもあり得ます。



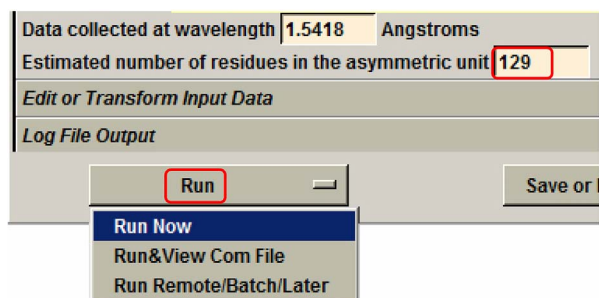


図 1.24 フォーマット変換の再実行

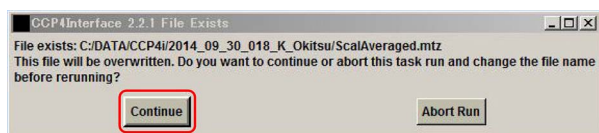


図 1.25 確認メッセージ

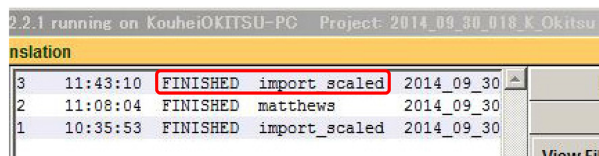


図 1.26 フォーマット変換の終了

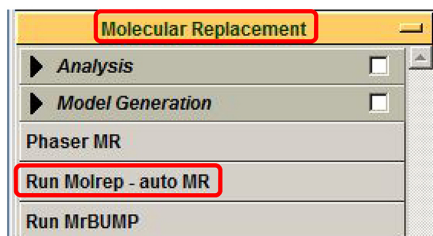


図 1.27 Molrep(分子置換) を選択

## 1.6 反射強度データのフォーマット変換 (再実行)

前節 §1.5 の手順で非対称ユニットの数を決めた上で反射強度データフォーマット変換を再実行する必要があります。

図 1.13 [p.5] の左下の部分を拡大表示したのが図 1.24 です。図 1.24 右上にアミノ酸残基数が「129」のままになっていますが、もし非対称ユニットの数が 2 と計算されたのであれば、この 2 倍の数を入力しなければなりません。ここでは、

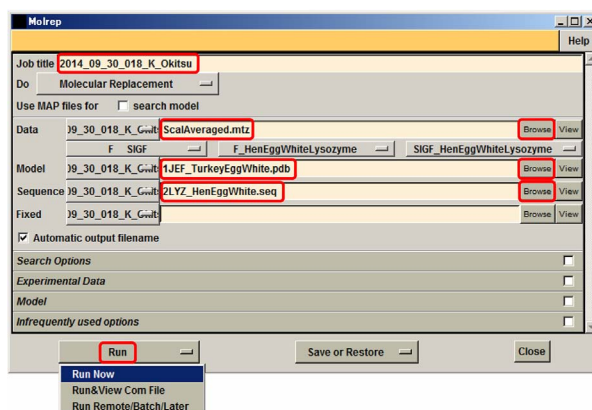


図 1.28 分子置換設定画面

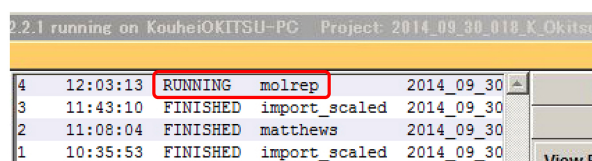


図 1.29 分子置換実行中のメッセージ

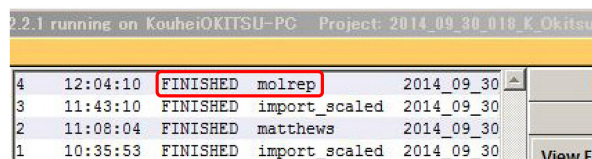


図 1.30 分子置換の終了のメッセージ

このまま下の「Run ボタン」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Run Now」をクリックします。

図 1.25 のような確認メッセージが出ますが、「Continue」をクリックして続行します。フォーマット変換が終了すると図 1.26 のメッセージが表示されます。

## 1.7 Molrep による分子置換の実行

この節では、七面鳥卵白リゾチーム分子のアミノ酸配列をニワトリ卵白リゾチームのアミノ酸配列に置き換える手順について記述します。「Molrep」というプログラムユニットを用います。

図 1.27 上の「Molecular Replacement」の「Run Molrep-auto MR」をクリックすると図



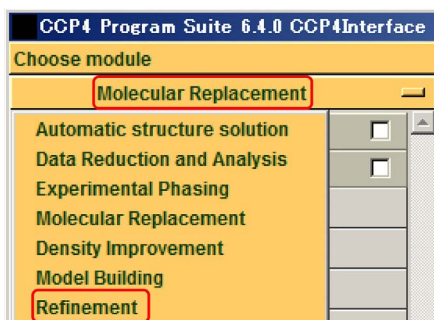


図 1.31 Refinement を選択

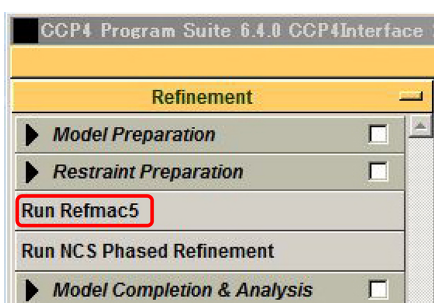


図 1.32 Refmac5 を選択

1.28 が表示されます。

図 1.28 一番上の Job title にクリップボードにコピーしたプロジェクト名をペーストします。中央部左に表示された Data, Model, Sequence には、それぞれ、X線回折積分強度、もとのひな形になる分子 (七面鳥卵白リゾチーム) の原子座標データ、構造を求めようとする分子 (ニワトリ卵白リゾチーム) のアミノ酸配列のデータをセットします。図 1.28 右の 3 つの「Browse ボタン」をクリックしてプロジェクトフォルダーにある拡張子が、mtz, pdb, seq のデータを、それぞれセットします。

図 1.28 左下の「Run ボタン」をクリックしてプルダウンメニューを開き、「Run Now ボタン」をクリックすると分子置換を実行します。

分子置換実行中には図 1.29 が表示され、終了すると図 1.30 の表示に変わります。

## 1.8 分子構造の最適化 (Refinement)

この節では、前節 §1.7 でひな形となる分子のアミノ酸配列の一部を変えただけの分子構造を、測

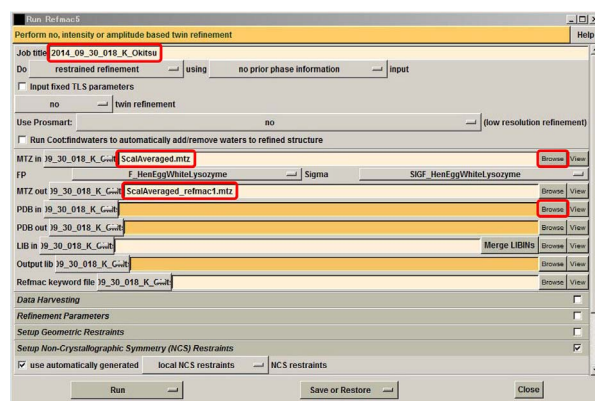


図 1.33 リファインメント設定画面

定された X 線回折積分強度データに合うように、分子構造を最適化してゆく手順を記述します。

結晶中の電子密度を  $\rho(\mathbf{r})$  とするとそれは次のように表されます。

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{h}} F_{\mathbf{h}} \exp(-i2\pi\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}) \quad (1.1)$$

$$= \sum_{\mathbf{h}} |F_{\mathbf{h}}| \exp(i\phi_{\mathbf{h}}) \exp(-i2\pi\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}). \quad (1.2)$$

ここで、 $F_{\mathbf{h}}$  は  $\mathbf{h}$  反射の結晶構造因子、 $\mathbf{r}$  は結晶内の位置ベクトル、 $|F_{\mathbf{h}}|$  は結晶構造因子の絶対値、 $\phi_{\mathbf{h}}$  は結晶構造因子の位相です。 $\phi_{\mathbf{h}}$  が X 線回折強度データだけでは求められない、というのが位相問題です。

ところで、次のような関数  $P(\mathbf{r})$  を定義することができます。

$$P(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{h}} |F_{\mathbf{h}}|^2 \exp(-i2\pi\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}). \quad (1.3)$$

$P(\mathbf{r})$  をパターソン関数といいます。上の式 (1.3) からわかるようにパターソン関数の計算には結晶構造因子の位相  $\phi_{\mathbf{h}}$  が必要ありません。

X 線回折積分強度の実測データと前節 §1.7 で作った仮の結晶構造からそれぞれパターソン関数を計算し、それらの差が最小になるように最小 2 乗フィットにより分子構造を求めるのが、分子置換法の要諦です。

図 1.31 上「Molecular Replacement」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Refinement」をクリックし図 1.32 を表示させます。「Run Refmac5」をクリックすると図 1.33 が表示されます。

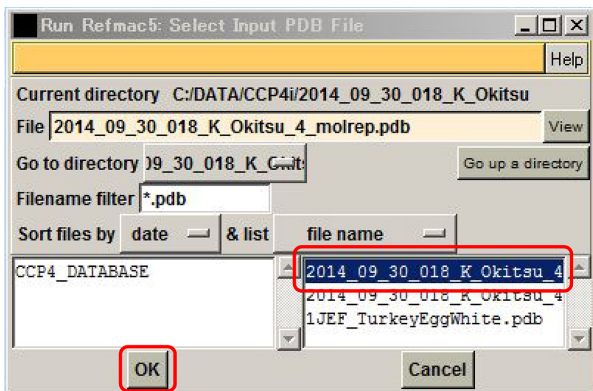


図 1.34 リファインするファイルを選択

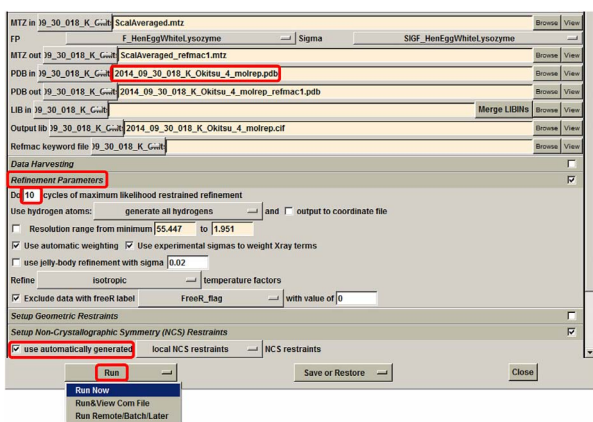


図 1.35 リファインメント設定画面

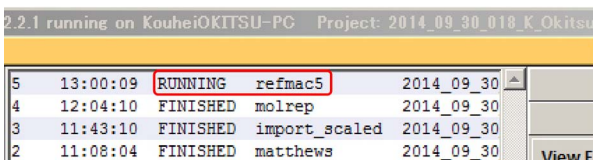


図 1.36 リファインメント実行中のメッセージ

図 1.33 [p.9] 一番上の Job title にはクリップボードのプロジェクト名をペーストします。次に右にある上の「Browse ボタン」をクリックしてプロジェクトフォルダーにある mtz のファイルをロードします。その下にアウトプットされる mtz ファイル名が自動的にセットされます。右にある下の「Browse ボタン」をクリックすると図 1.34 が表示されます。右下にあるボックスの赤枠のファイルをクリックすると上の File の欄にそのファイル名が表示されます。これは前節 §1.7 [p.8] で Molrep を実行することにより作

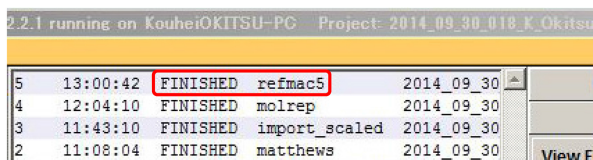


図 1.37 リファインメント終了のメッセージ

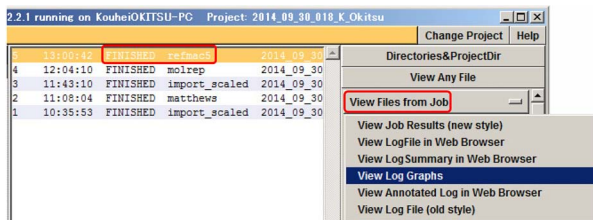


図 1.38 リファインメントのグラフ表示を選択

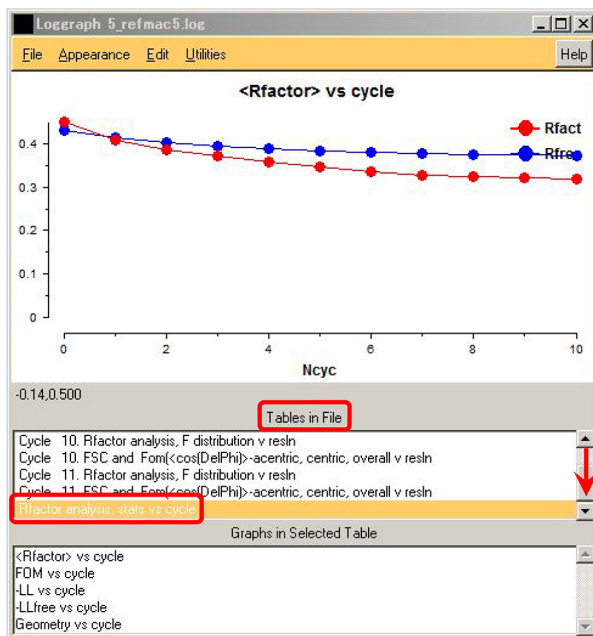


図 1.39 リファインメントによる R 因子の変化

成された新しい pdb ファイル (原子座標を格納したファイル) です。

図 1.34 左下の「OK」をクリックすると図 1.35 が表示されます。上の赤枠の中に図 1.34 で選択した pdb ファイルがセットされています。その下にはリファインメントの後に作られる新しい pdb ファイル名が自動的にセットされます。

図 1.35 中程の左にある「Refinement Parameters」をクリックするとパラメーターを設定するウィンドウが開きます。デフォルトのまま構

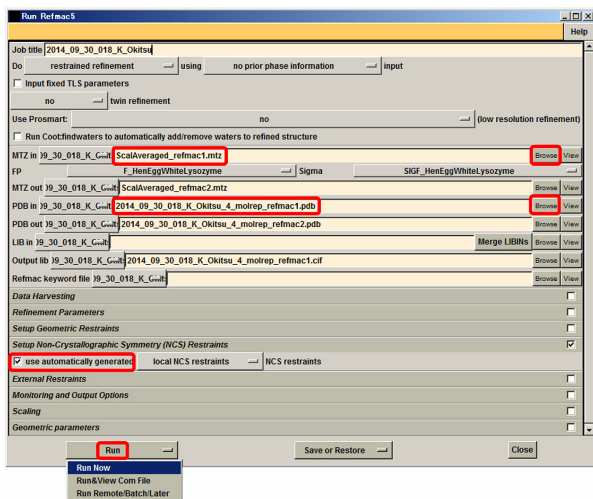


図 1.40 リファインメント設定画面

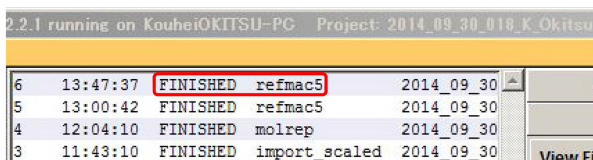


図 1.41 リファインメント終了のメッセージ

いませんが、何サイクルのリファインメントを実行するかを指定することもできます。ここではデフォルトのまま 10 を設定してあります。左下の「use automatically generated」にチェックを入れ、その下の「Run」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Run Now」をクリックするとリファインメントが始まります。

リファインメントの実行中は図 1.36 が表示され、終了すると図 1.37 の表示に変わります。

リファインメントの経過を視覚的に確認するには、図 1.38 で、一番上に表示されているジョブをクリックしてオレンジ色にしてから右の「View Files from Job」をクリックしてプルダウンメニューを開き「View Log Graphs」をクリックすると、図 1.39 が表示されます。中央下の「Tables in File」のウィンドウでは、右のスクロールバーを一番下までクリック&ドラッグして、

$$R = \sum_{\mathbf{h}} \frac{||F_{\mathbf{h}(obs)}| - |F_{\mathbf{h}(cal)}||}{|F_{\mathbf{h}(obs)}|}. \quad (1.4)$$

ここで、 $F_{\mathbf{h}(obs)}$  は実測データから見積もられた

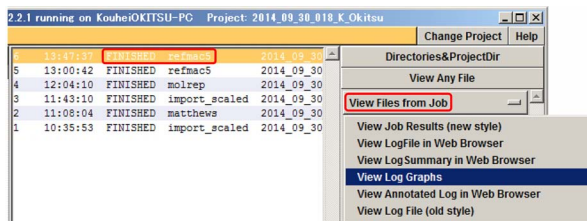


図 1.42 リファインメントのグラフ表示を選択

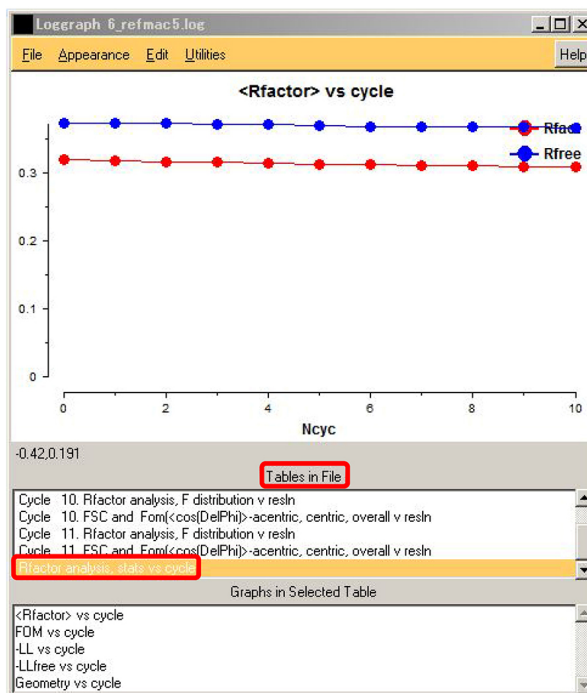


図 1.43 リファインメントによる R 因子の変化

結晶構造因子、 $F_{\mathbf{h}(cal)}$  は求められた分子構造から計算された結晶構造因子です。一番下にある「Rfactor analysis, status vs cycle」がクリック、選択されています。図 1.39 上のグラフでは、R 因子 (信頼性因子) がリファインを繰り返すごとに下がっているのがわかります。R 因子は、次のように定義されています。要するに、実測と計算による結晶構造因子のズレの加重平均をとったものになります。当然、R 因子が小さくなるほど構造解析の信頼性が高いことになります。R<sub>free</sub> 因子は、ある割合の  $\mathbf{h}$  をランダムに抽出してやはり式 (1.4) によって計算した値です。

もう一度 10 回のリファインメントを繰り返すには、図 1.40 右、ふたつの「Browse ボタン」をクリックして最初のリファインメントに



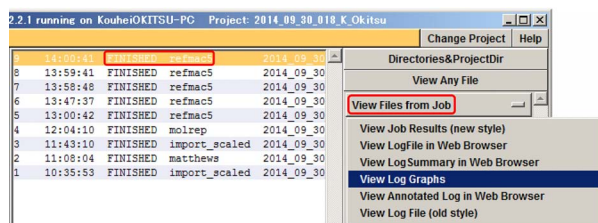


図 1.44 リファインメントのグラフ表示を選択

よって得られた mtz と pdb ファイルをセットします。MTZ in と PDB in のファイル名が図 1.35 [p.10] で設定された MTZ out と PDB out のファイル名であることに注目してください。アウトプットファイル名は自動的にセットされます。図 1.40 [p.11] 左下の「use automatically generated」にチェックを入れ、その下の「Run」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Run Now」をクリックするとリファインメントが始まります。リファインメントが終了すると図 1.41 [p.11] が表示されます。

図 1.42 [p.11] で一番上に表示されたジョブを選択し右の「View Files from Job」をクリックしてプルダウンメニューを開いたあと「View Log Graphs」をクリックすると図 1.39 [p.10] と同様にして図 1.43 [p.11] を表示させることができます。R 因子の上がり方はかなり緩やかになっています。

同様にしてさらに 3 回のリファインメントを行ったあと図 1.44 で一番上に表示されたジョブを選択し、右の「View Files from Job」をク

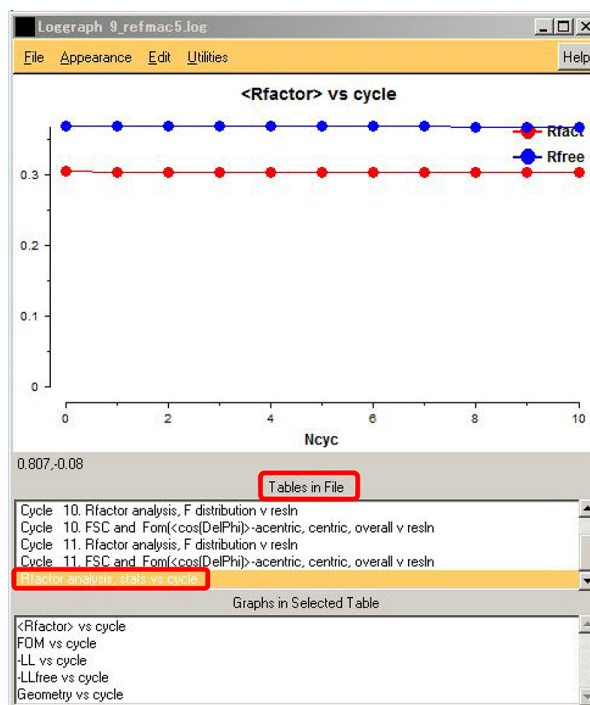


図 1.45 リファインメントによる R 因子の変化

リックしてプルダウンメニューを開き「View Log Graphs」をクリックすると、図 1.39, [p.10] 図 1.43 [p.11] と同様にして図 1.45 を表示させることができます。R 因子にはほとんど低下が見られなくなっています。

最終的に見積もられた R 因子は 30% 程度ですが、良質の結晶が得られた場合はさらに小さくなるため、許容できるぎりぎりの値の解析結果となりました。

求められた分子構造を視覚的に確認するには、次の第 2 章と第 3 章を参照してください。

## 第2章

# WinCoot による電子密度マップの表示

近年、パーソナルコンピューターの著しい高機能化によって、タンパク質分子の立体構造をディスプレイ上で容易に確認することができるようになってきました。本章では、フリーソフトウェアである WinCoot を用いて、タンパク質分子の電子密度分布をディスプレイに表示する方法について記述します。

### 2.1 WinCoot の立ち上げ

図 2.1 は左上の「[1] アイコン」をダブルクリックして WinCoot を立ち上げたところです。「[2]」は使い方のコツ (Tip) が表示されるウィンドウでこれを参照することにより利用者はこのソフトウェアを使い慣れてゆくことができます。とりあえずは閉じて構いません。「[3]」は WinCoot

で行っている処理の内容を表示するウィンドウです。「[4]」は前回の処理内容を続けるかどうかを訊いてきているウィンドウで、ここでは右下の「No」をクリックして閉じることにします。「[5]」はグラフィックウィンドウで、ここに電子密度マップが表示されることとなります。

### 2.2 背景色の変更 (任意)

まず図 2.1 右「[5]」グラフィックウィンドウ上のメニューバーで、図 2.2 [p.14] 左上の「Edit」をクリックしてプルダウンメニューを開き「Background Colour」「White」をクリックして背景色を白に切り替えます。これは利用者個人の好みの問題で、デフォルトでは黒い背景になっています。

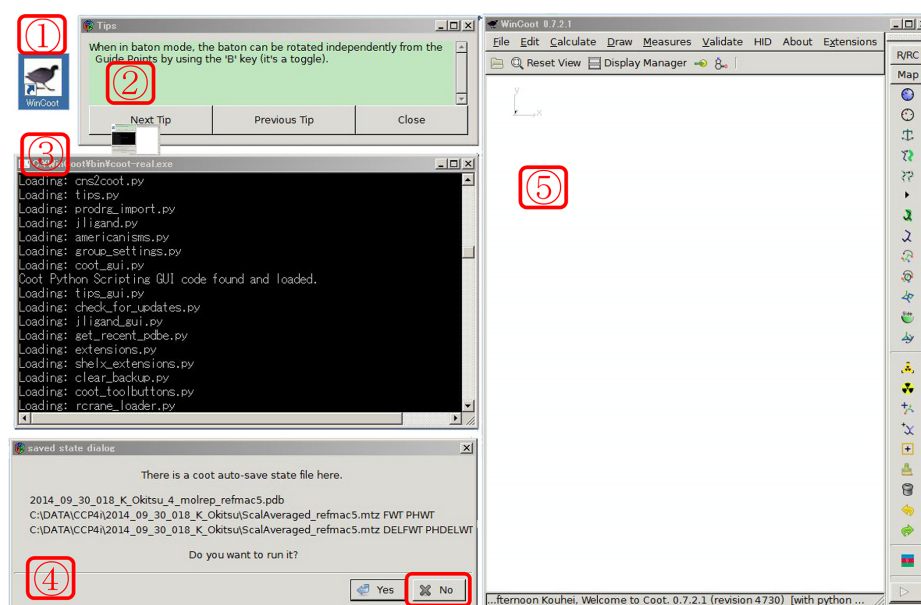


図 2.1 WinCoot を立ち上げたところ

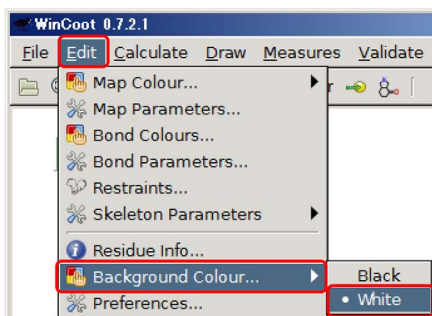


図 2.2 背景色の白への変更

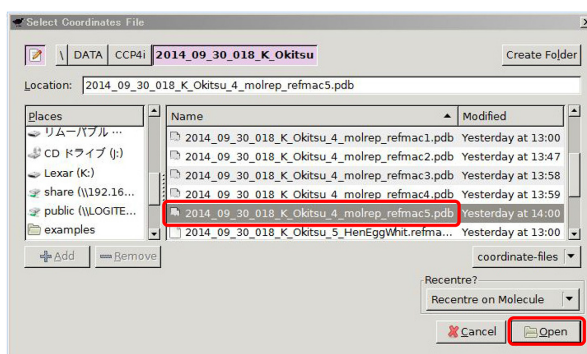


図 2.6 最終リファイン後の PDB ファイルをオープン

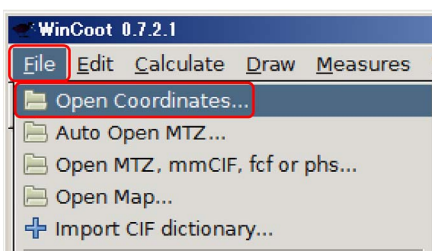


図 2.3 原子座標ファイルのオープン

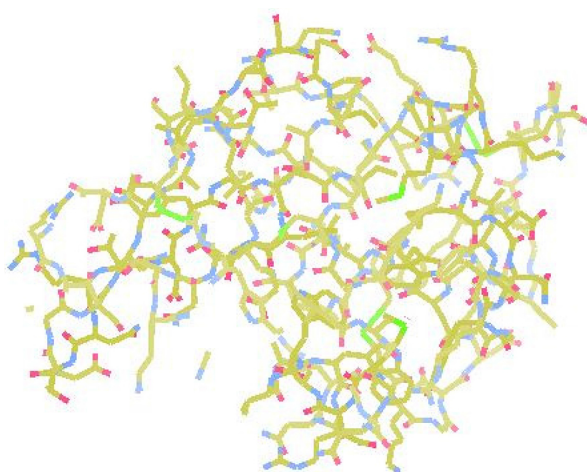


図 2.7 アミノ酸配列を表示

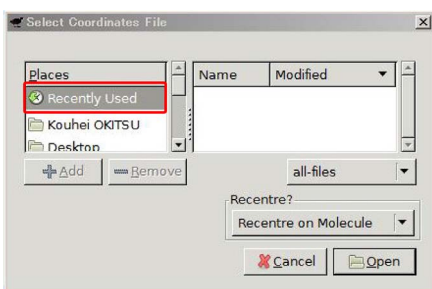


図 2.4 Recently Used をクリック

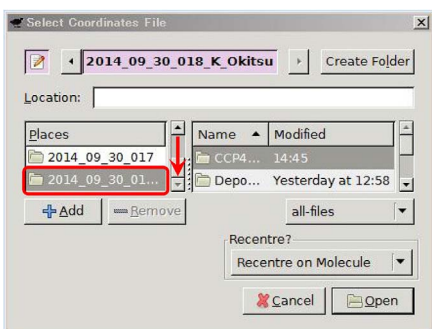


図 2.5 プロジェクトフォルダーを指定

2.4 を表示させます。図 2.4 左上のウィンドウの一番上にある「Recently Used」をクリックすると、最近使ったフォルダーがメニューに表示されます。図 2.5 のスクロールバーを下までクリック&ドラッグすると最近使ったフォルダー、前の第 1 章で使ったプロジェクトフォルダーが表示されます。これをクリックすると図 2.6 が開きます。この画面で前の第 1 に記述した最後のリファインメントでできた PDB ファイルを選択し右下の「Open」をクリックします。PDB ファイルには、原子座標のデータが格納されており、図 2.7 のように、アミノ酸配列が表示されます。

## 2.3 PDB ファイルのロード

図 2.3 の WinCoot のメインメニューで「File」を開き「Open Coordinates」をクリックして図

## 2.4 MTZ ファイルのロード

次に図 2.8 メインメニュー左の「File」を開き「Auto Open MTZ」をクリックすると図 2.9 が表



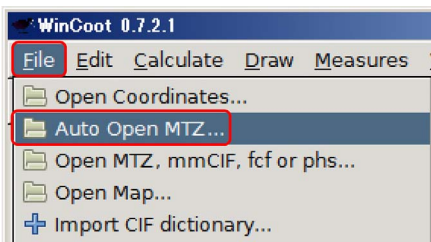


図 2.8 MTZ ファイルのオープン

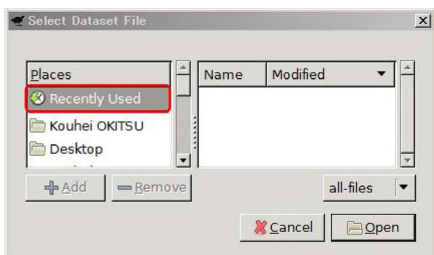


図 2.9 Recently Used をクリック

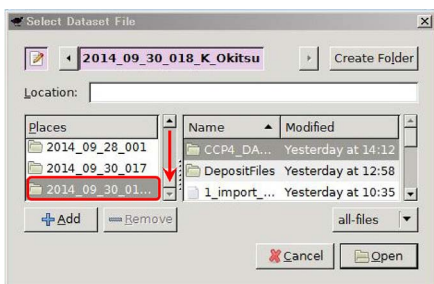


図 2.10 プロジェクトフォルダーを指定

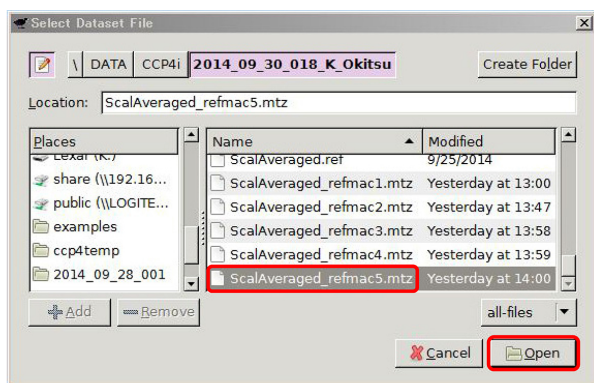


図 2.11 最終リファイン後の MTZ ファイルをオープン

示されます。左上の「Recently Used」をクリックするとプロジェクトフォルダーが一覧に加わるので図 2.10 のスクロールバーを下までクリッ

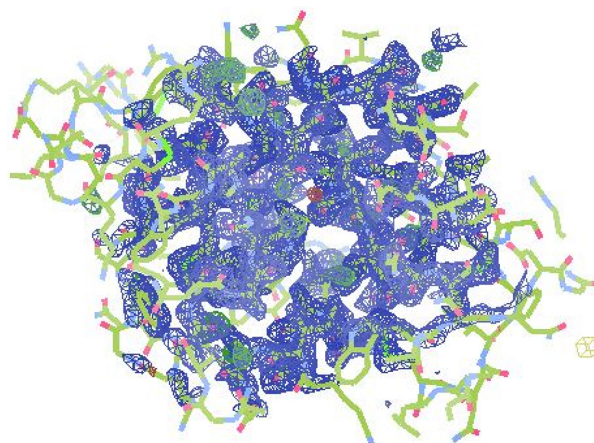


図 2.12 アミノ酸配列と電子密度を重ねて表示

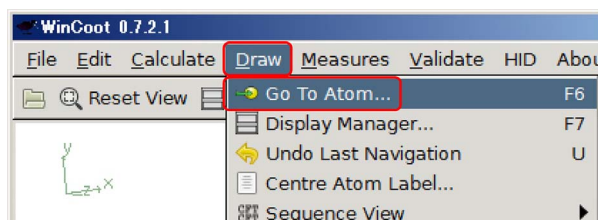


図 2.13 分子中の任意の原子を指定

ク&ドラッグしてプロジェクトフォルダーを選択します。

図 2.11 が表示されたら PDB ファイル同様、一番最後に作成された MTZ ファイルを選択して右下の「Open」をクリックすると図 2.12 のようにアミノ酸配列に、電子密度が重ねて表示されます。

## 2.5 任意の原子付近の拡大表示

メインメニューで図 2.13 のように「Draw」を開き「Go To Atom」をクリックすると図 2.14 [p.16] が表示されます。「Chain A」の右にある下向き三角形をクリックするとアミノ酸配列をプルダウン表示させることができます。

図 2.15 では、38 番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン (Phe) が選択され、さらに右にウィンドウでフェニル基の先端にある炭素 (CZ) が選択されています。図 2.15 中央にある「Previous Residue」ないしは「Next Residue」をクリックするととなりの残基に移動することができます。

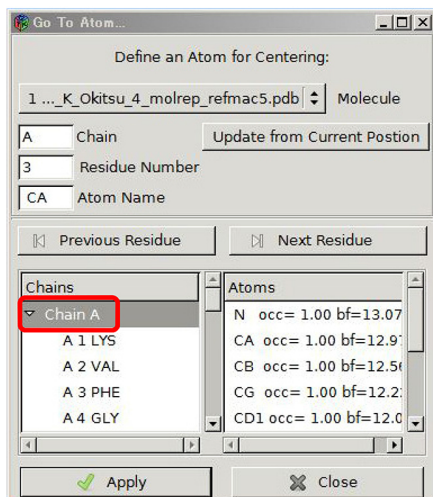


図 2.14 Chain A をプルダウン

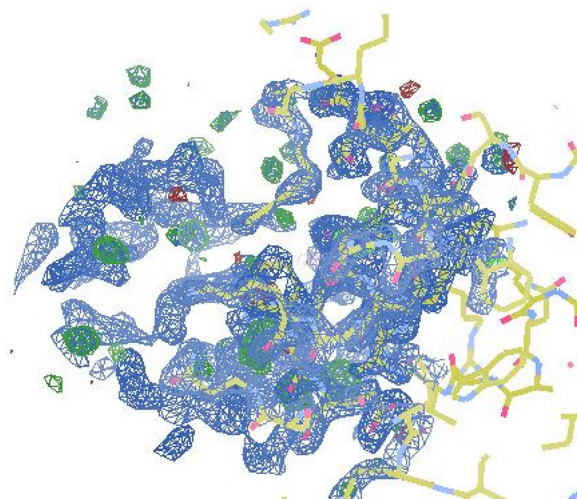


図 2.16 指定したアミノ酸と原子を中心に再表示

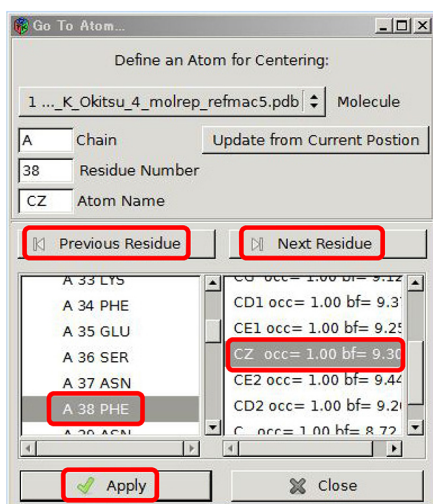


図 2.15 アミノ酸と原子の指定



図 2.17 A 38 Phe を中心に拡大表示

左下の「Apply」をクリックすると図 2.16 が表示されます。これは指定した残基の指定した原子を中心に描画し直した図です。

図 2.16 でマウスを右クリックしながら右にドラッグすると図 2.17 のように指定した元素を中心に拡大表示させることができます。左に見られるボールのような電子密度は、水分子の酸素のもので

マウスを右クリックしながら左にドラッグすると縮小表示させることができます。また、分子モデルの中央付近を左クリックしながら上下左右にドラッグすると指定した原子を中心として縦および横方向に分子を回転させることができます。図の端の部分でマウスを左クリック&ドラッグすると分子を面内回転させることができます。

また、マウスのホイールを回転させると電子密度表示のしきい値を変えることができます。



To be continued

## 第3章

# CCP4MG によるリボンモデルの表示

CCP4MG もまた、WinCoot 同様 CCP4i のダウンロードの URL で 入手できるソフトウェアです。本章では、CCP4i によって第1章 [p.1] に記述した手順で作成したファイルを読み込んで、タンパク質分子のリボンモデルをディスプレイ上に描画する手順を記述します。

### 3.1 CCP4MG の立ち上げ

図 3.1 は、左上の「Icon」をクリックして立ち上がった CCP4MG の画面です。上の「Restore status メッセージ」は以前立ち上げたときの状態を保存するかどうかを訊いてきているのですが、とりあえず、ここでは「No」をクリックします。左下の「メッセージウィンドウ」には実行中のジョブが表示されます。右側の「モデル表示ウィンドウ」には分子モデルが表示されます。

### 3.2 PDB ファイルの読み込みとリボンモデルの描画

図 3.1 右の「モデル表示ウィンドウ」上にあるメニューバーで、図 3.2 のように「File」をクリックしてプルダウンメニューを開き、一番上にある「Open」をクリックすると、図 3.3 が表示されます。

図 3.3 中央に表示されるフォルダーに、CCP4i で用いたプロジェクトフォルダーを選択します。表示されるファイルの一覧から第1章 [p.1] に記述した手順で最後に作成された PDB ファイルを選択して、右下の「Open」をクリックしてください。図 3.4 のように分子のリボンモデルが表示されます。マウスのホイールを回転させると分子

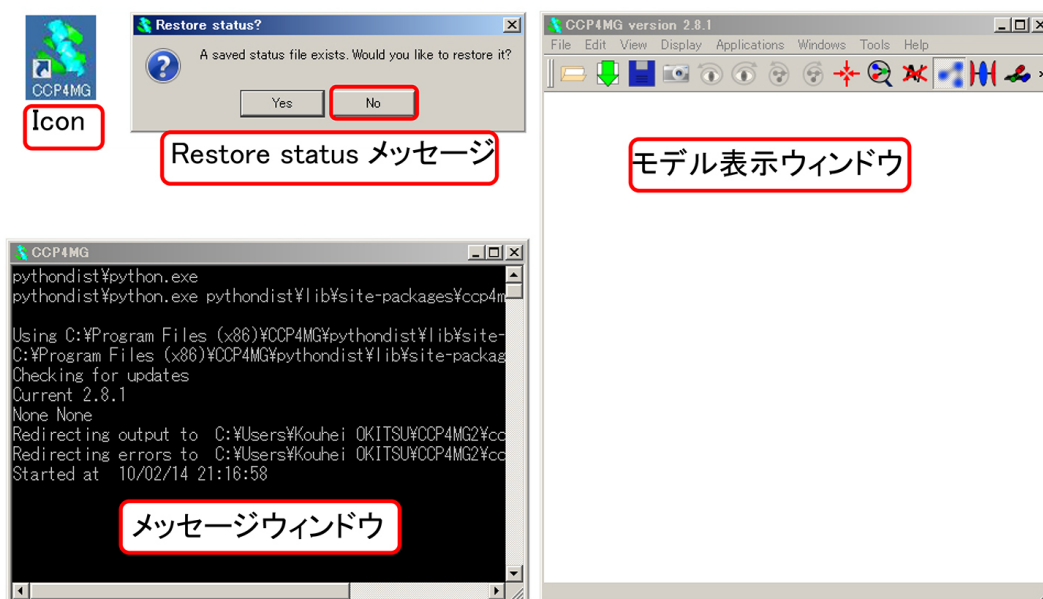


図 3.1 CCP4MG を立ち上げたところ

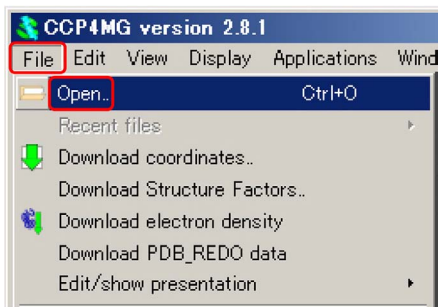


図 3.2 ファイルオープン

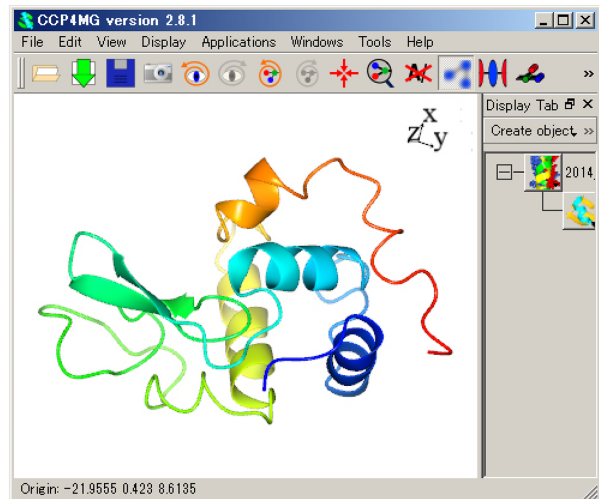


図 3.4 リボンモデルの表示

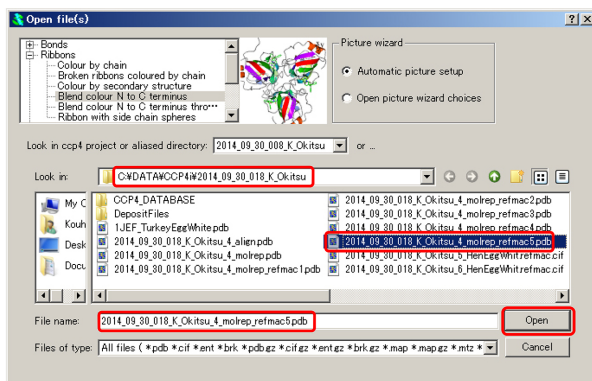


図 3.3 PDB ファイルのオープン

モデルの拡大縮小ができます。マウスを左クリックしながら上下左右にドラッグすると、縦および横方向に分子を回転させることができます。また、[Shift] キーを押しながら図の端の部分でマウスを左クリック&ドラッグすると、分子を面内回転させることができます。

## 索引

## 記号/数字

1JEF	2
2LYZ	1, 14

## A

A 38 Phe	16
----------	----

## C

CCP4i	1, 5, 18
CCP4MG	i, 18
Chain A	15
Coot	i, 13, 18
CrystalClear 1.3.5	2, 5
CuK $\alpha$ 線の波長	5

## G

Go To Atom	14
------------	----

## H

Hauptman, H. A.	1
Hendrickson, W. A.	1

## K

Karle, J.	1
Kendrew, J. C.	1

## M

Molecular replacement	1, 8, 9
Molrep	8
mtz	5
MTZ ファイル	14

## P

$P4_32_12$ (#96)	5-7
PDB	1, 2
PDB ファイル	2, 13
Perutz, M. H.	1
Protein Data Bank(PDB)	1, 2

## R

$R_{free}$ 因子	11
Recently Used	13, 14, 19
Refinement	8, 9
Refmac5	8
residue	5, 8
R 因子	9, 11, 12

## S

ScalAveraged.ref	2
Space group	5-7

## W

WinCoot	i, 13, 18
---------	-----------

## あ

アミノ酸残基	15
アミノ酸残基数	5, 6, 8

アミノ酸配列	i, 1, 2, 7-9, 13-15
イオウ	1
異常分散法	1
位相決定	1
位相問題	1, 9
一次構造	i, 1, 2, 7-9

## か

カール (Karle, J.)	1
空間群	5-7
結晶構造因子	1, 9
原子座標ファイル	13, 19
ケンドルー (Kendrew, J. C.)	1

## さ

シーケンスファイル	1
七面鳥卵白リゾチーム	i, 1, 2, 8, 9
重原子同型置換法	1
シンクロトン放射光	1
信頼性因子	11
水銀	1
セレノメチオニルタンパク質	1
セレノメチオニン	1
セレン	1
相同タンパク質	i, 1

## た

対称ユニット	6
大腸菌	1
単量体	2
直接法	1
電子密度	9
電子密度マップ	i, 13, 14

## な

ニワトリ卵白リゾチーム	i, 1, 2, 5-9
-------------	--------------

## は

背景色	13, 19
ハウプトマン (Hauptman, H.A.)	1
パターン関数	9
非対称ユニット	6
フェニルアラニン (Phe)	15
フォーマット変換	5
フォーレンジング	1
複合体	2
プロジェクトフォルダー	3, 13, 14
プロテインデータバンク	1, 2
分子構造の決定	1
分子置換	8, 9
分子置換法	1, 2
ヘモグロビン	1
ペルーツ (Perutz, M. H.)	1
ヘンドリックソン (Hendrickson, W. A.)	1

## ま

ミオグロビン	1
--------	---

---

水分子	16	リゾチーム	i
メチオニン	1	リファインメント	9
ら		リボンモデル	i, 18

---