

第4回タンパク質結晶構造解析中級者向け講習会  
2019年10月31日 東京大学山上会館

# パネルディスカッション

～精密化はいつ『完了した』といえるのか～

# パネリスト紹介

---

## パネリスト (50音順)

- ・学習院大学 理学部 中村顕さん
- ・東京大学 定量生命科学研究所 野澤佳世さん
- ・慶應大学 薬学部・大学院薬学研究科 原田彩佳さん
- ・東京大学 大学院薬学系研究科 平野良憲さん
- ・東京大学 大学院理学系研究科 山下恵太郎さん

## 司会進行

- ・京都大学 大学院理学研究科 藤橋雅宏

# アンケートにご協力ありがとうございました

---

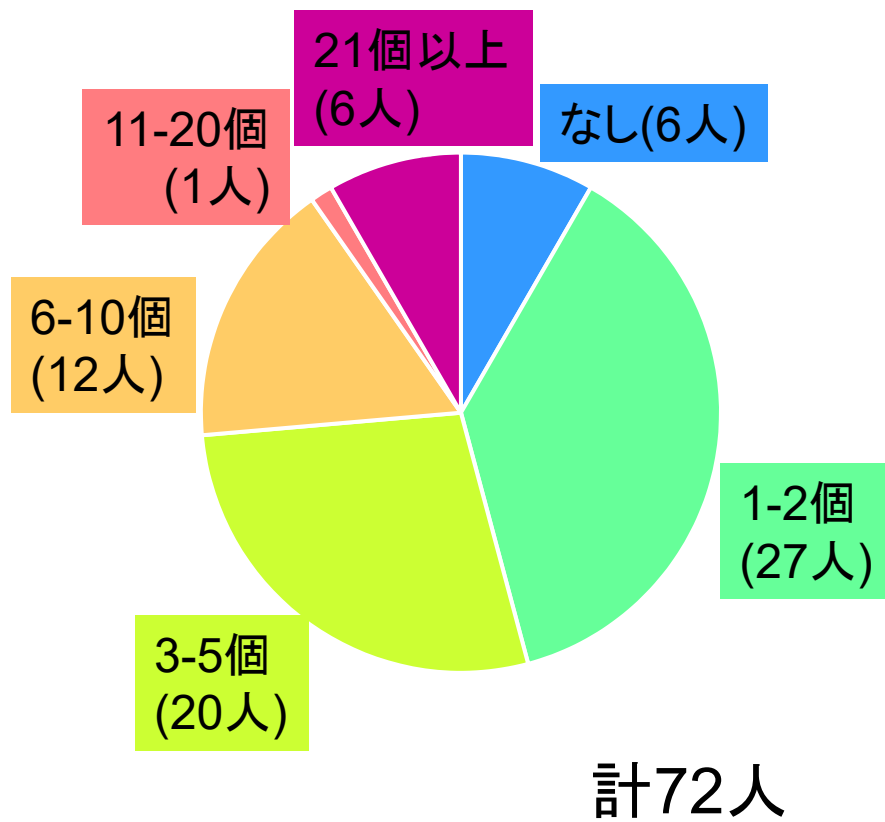
2019/10/30現在

96人の方に参加登録いただきました

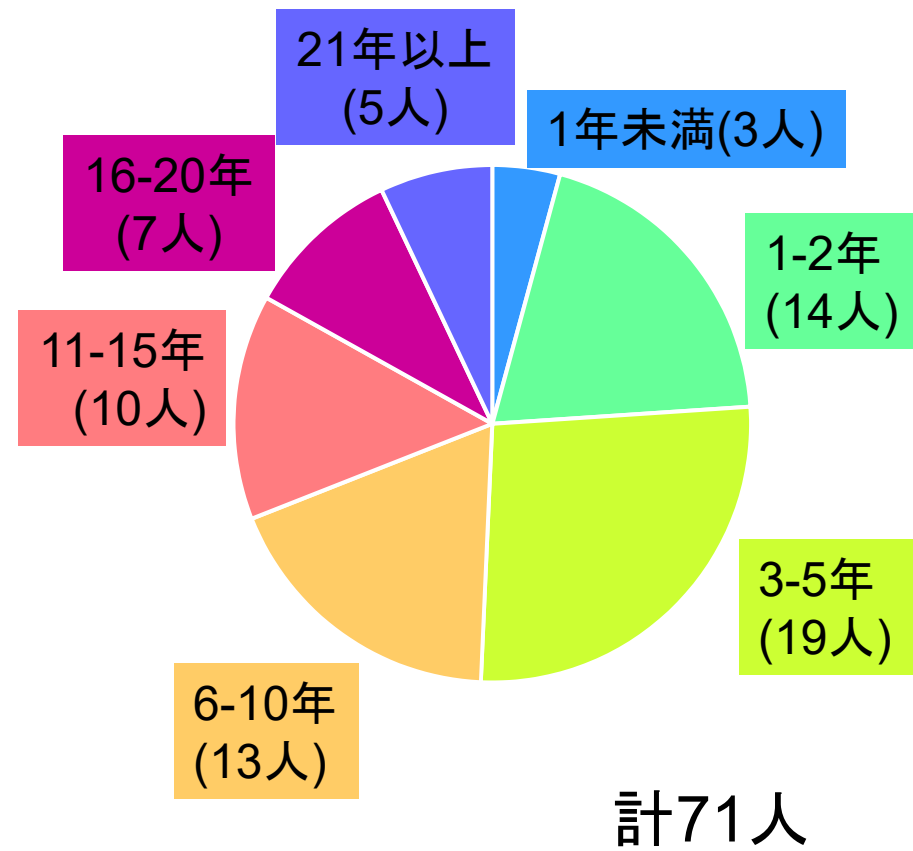
参加登録に際しての、アンケートへのご協力  
ありがとうございました!

# アンケートのまとめ

## 1年に関わる精密化の個数



## 結晶構造解析の経験年数



# アンケートのまとめ

---

2019/10/30現在

「構造精密化が完了したと見なすために必要な項目」  
に、コメントをくださった方

48人

ありがとうございました。

# アンケートのまとめ

---

コメントを下記のように分類しました

- $R$ と $R_{\text{free}}$ 
  - $R$ と $R_{\text{free}}$ それぞれについて
  - $R$ と $R_{\text{free}}$ の差
- validation
  - Ramachandran plot
  - Rotamer
  - RMS bonds/angles
  - Clash
  - その他
- map
  - $2F_o - F_c / 2mF_o - DF_c$  map
  - $F_o - F_c / mF_o - DF_c$  map

# 精密化完了の基準: $R$ と $R_{\text{free}}$

$R$  and/or  $R_{\text{free}}$  に言及していた人29人 (48人中)

$R$ について (11人言及)

- ・30%以下 1
- ・27%ぐらい 1
- ・20%以下 2
- ・最大分解能の1/10ぐらい 1
- ・分解能に依存するが、  
20%ぐらい 1
- ・分解能に依存するとコメント、  
具体的値は無回答 3
- ・具体的値は無回答 2

$R_{\text{free}}$ について (10人言及)

- ・30%以下 1
- ・27%ぐらい 1
- ・25%以下 1
- ・最大分解能の1/10ぐらい 1
- ・分解能に依存・26%ぐらい 1
- ・分解能に依存・20%前半以下 1
- ・目安として、2.0 Å以下で20%以下,  
2.0-2.4 Åで24%以下,  
2.4-3.0 Åで26%程度 1
- ・目安として、3 Åレベルで30%,  
2.5 Å以下は25%, 2 Å以下は20% 1
- ・分解能に近い登録構造の  
 $R_{\text{free}}$ の中央値より低い 1
- ・精密化を続けても下がらなくなる 1

# 精密化完了の基準: $R$ と $R_{\text{free}}$

$R$  and/or  $R_{\text{free}}$ に言及していた人29人 (48人中)

$R$ と $R_{\text{free}}$ の差について (6人言及)

- ・5%以下または5%程度 4
- ・目標3%以内、5%以下 1
- ・同等分解能の登録済みデータから考えて、  
偏差値40以上 1

$R$ と $R_{\text{free}}$ に同時に言及 (10人言及)

- ・落ち着いたら 1
- ・具体的値に言及無し 6
- ・分解能依存・具体的値に言及無し 2
- ・同等分解能の登録済みデータから考えて、  
偏差値40以上 1



# 精密化完了の基準: Validation

Validationに言及していた人33人 (48人中)

Ramachandran analysis(22人言及)

- ・極端に外れたところがないこと 1
- ・問題が無いこと 5
- ・問題が無いこと(map poorの領域を除く) 1
- ・問題が無いこと(説明が出来る) 1
- ・disallowed/outlierがない 7
- ・disallowedがない(目で見て電子密度に合っているものは除く) 1
- ・disallowed/outlierを可能な限り0に 1
- ・outlier 0.1%以下 1
- ・outlier 0.2%以下, favored 98%以上 1
- ・outlier 0.2-0.3%程度以下 1
- ・outlier 0.3%以下 1
- ・outlier 0.5%以下 1

# 精密化完了の基準: Validation

Validationに言及していた人33人 (48人中)

Rotamer analysis(7人言及)

- ・問題が無いこと 2
- ・問題が無いこと(map poorの領域を除く) 1
- ・disallowed/outlierがない 1
- ・disallowed/outlierを可能な限り0に 1
- ・outlier 0.3%以下, favored 95%以上 1
- ・outlier 1%以下(出来れば無し) 1

RMS bond/angle(5人言及)

- ・問題が無いこと 1
- ・disallowed/outlierがない 1
- ・disallowed/outlierを可能な限り0に 1
- ・bond < 0.015 Å, angle < 1.5 deg. 1
- ・bond 言及無し, angle < 1.7 deg. 1

# 精密化完了の基準: Validation

---

Validationに言及していた人33人 (48人中)

Clash (6人言及)

- ・なるべく少ない 1
- ・問題が無いこと 1
- ・可能な限り取り除く 1
- ・異常を修正する 1
- ・clash score が2-3以下 1
- ・clash score が4以下 1

# 精密化完了の基準: Validation

Validationに言及していた人33人 (48人中)

Cootのvalidation (5人言及)

- ・問題が無い 3
- ・geometryとrotamerに問題が無い 1
- ・問題が無い(電子密度に合っていれば問題と指摘されても許容) 1

Molprobitのvalidation (6人言及)

- ・全体に問題が無い 2
- ・指摘されるものを修正(全ては無理) 1
- ・Basic geometryとC-betaにoutlierなし 1
- ・peptide omegaのoutlierを可能な限り修正 1
- ・Asn/Gln/His flipを参考に修正する 1

# 精密化完了の基準: Validation

---

Validationに言及していた人33人 (48人中)

PDBのvalidation server (9人言及)

- ・登録時の要求が全て満たされる 1
- ・問題が指摘されない 4
- ・明らかな異常がない/恥ずかしくない 3
- ・指摘を参考に修正する 1

# 精密化完了の基準: map

mapに言及していた人23人 (48人中)

$2F_o - F_c / 2mF_o - DF_c$  map (1人言及)

- ・水, alternate conformer, 末端残基がこれ以上置けない 1

$F_o - F_c / mF_o - DF_c$  map (6人言及)

- ・Phenixで大きい赤や緑のメッシュがでない 1
- ・ノイズと見なせないピークが残っていない 2
- ・修正可能なピークが残っていない 2
- ・基質の確認に用いている。 1

map typeの明示は無かった例 (17件該当)

- ・CootのUnmodeled blobや拾い残した水がない 7
- ・有意な電子密度に過不足無く適切にモデルを置く 9
- ・occupancy 1の水をそれ以上置けない 1

# 精密化完了の基準：その他

## その他頂いたコメント

- ・論文の図表を全て作り終えている
- ・複数の結晶データを持っている場合、データ間で結果の解釈に違いがないことを確認
  
- ・最近Molprobityのスコアを論文に記載することも多いので、molprobityによる二面角や側鎖rotamerの分析結果を最も大事にしている
- ・ $R$ は低い方が良いが、よりgeometry優先
  
- ・異常に高い温度因子のところが無い
- ・水素結合距離・ピーク高さが異常な水の削除
- ・基質複合体などの場合は、基質等の $mF_o - DF_o$  SA-omit mapが3 sigmaで明確に観察でき、基質とアミノ酸残基、水分子の温度因子に大きな差がないこと
- ・リガンドについてはomit mapとmodelのrscを妥当性評価に用いている

# 精密化完了の基準??

---

$R, R_{\text{free}}$

Ramachandran plot

Rotamer

RMS bond/angle

Clash

その他

電子密度

当日の議論をふまえての、パネリストの先生方のコメントを別紙に掲載しています。そちらもご覧下さい。



便利なソフトウェアについて

# RefmacとPhenix.refine

## RefmacとPhenixの違いに関するコメントを多数頂きました

- ・本当はphenixの方がよさそうなのだけれどつい使い慣れたRefmacを使ってしまう。
- ・基本的に全ての精密化をphenix.refineをGUIを使って行っています。
- ・時々over fittingが気になるものの、PHENIXが出てからはこれ一本で済ませています。
  
- ・Refinementの初期は計算の速いRefmacを、後半はPhenix.refineを使う。  
Phenix.refineは計算時間はかかるが、geometry/統計値がより改善する。simulated annealingが使える。水を拾う精度も高く、validationとの連携が便利。精密化最終段階にはparameterを細かく指定できる (複数の方の意見を統合)
  
- ・*R*-work/*R*-freeの値を下げたいときはRefmac、  
Geometry Analysisの結果を改善したいときにはPhenix.refine
  
- ・rigid bodyはphenix.refineが収束半径が大きくて便利。  
refmac5のjelly bodyは分子置換直後に有用
  
- ・異常散乱体が含まれているときはrefmac5のSAD functionも有用

# その他便利なsoftwares(1)

---

- ・自動モデリングはBuccaneerが高速で良いモデルを組んでくれる
- ・分子置換後のモデル構築は、buccaneer, arpwrap, phenix.autobuildの流れで効率化できる
  
- ・Phenix のMorph model(時間がかかる)やRefmac のjelly body refinement(比較的すぐ終わる)はMRの後にやると大幅にRが下がる場合が(たまに)あるのでとりあえず試します。
  
- ・ラマチャンドランプロットの改善に取り組んでいて行き詰まった時に cootの Extention, All Molecule, Refine/improve Ramachandran plot... を試すこともあります。cootではRamachandran restraintsにチェックを入れたりしますが(効果があるかはよくわかりません)。

# その他便利なsoftwares(2)

---

- ・特殊なリガンドはJLigandでPDBとcifを作る。
- ・それ以外は殆どCoot & Refmac5でできる。
  
- ・低分子リガンドを入れる場合はphenix.ligand\_fitを用いるのが有効。
- ・phenix.ligand\_fitのためのligand pdbファイルとcifファイルの準備にはmarvin sketchとjligandの組み合わせが便利
  
- ・同形性のある結晶を大量に解く場合、dimpleが良い。早く、かつジオメトリーもボロボロにしない程度で結果を返してくれる。
  
- ・占有率の低い分子をomit mapで可視化するために、phenixのpolderが便利

# アンケート回答者の知りたいこと

---

- ・モデリングでRamachandran が許容範囲になっても、精密化を走らせた後には元に戻ってしまうような場合に、有用な方法があるか知りたいです。
- ・自分がrefmacを使っていてRが改善されなかったものが、他の研究室でPhenix.refineを使っている人では落ちたと聞きました。どんな違いがあったのか講習を通して分かったら良いなと思いました。
- ・基本的にはPDB のバリデーションレポートで明らかな異常値がなくなるまで行っていますが、かなりの労力と時間を費やしてしまいます。どこまで気にしたらよいのかよくわかりません。