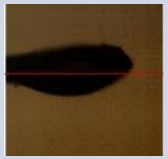
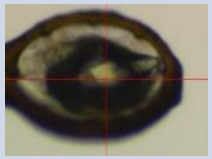
第3回タンパク質結晶構造解析
中級者講習会
2018年10月27日(土)
東京理科大学葛飾キャンパス

CCP4iによる構造精密化演習

真板宣夫
徳島大学先端酵素学研究所

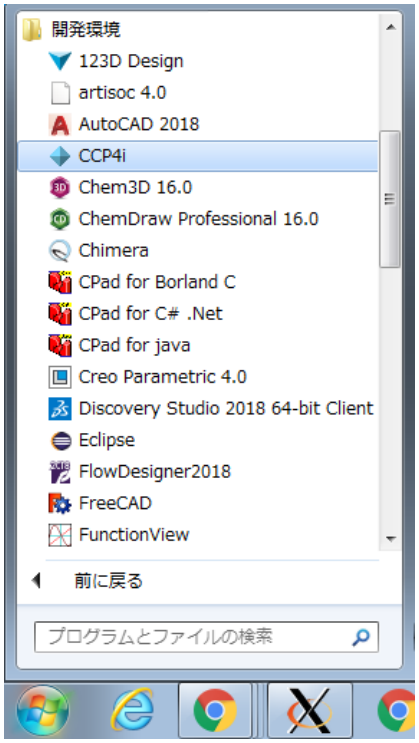
位相を高分解能データに付替える

Sample: Thaumatin crystal (208 a.a., 17 S atoms)

Data set	Native_sad1	Native_sad2	Native_sad3	High_reso
Crystal				
Beamline	BL-1A	BL-1A	BL-1A	BL-17A
Wavelength (Å)	2.700	2.700	2.700	0.9800
Beam size (μm^2)	13 x 13	13 x 13	13 x 13	40 x 20
Transmittance (%)	1.5	1.5	1.5	9.9
Exposure time (sec.)	1.0	1.0	1.0	1.0
Oscillation width (deg.)	1.0	1.0	1.0	1.0
Total frame	360	360	360	180
Detector	EIGER X 4M	EIGER X 4M	EIGER X 4M	PILATUS3 S 6M
Detector distance (mm)	60	60	60	243.9

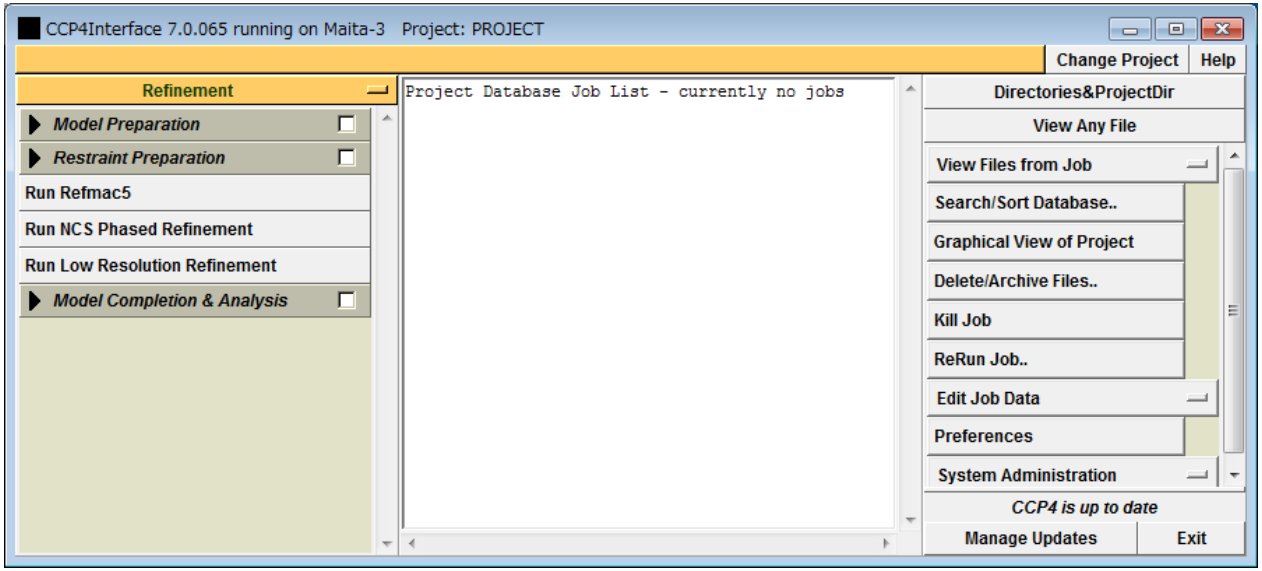
Data sets are available at Zenodo. https://doi.org/10.5281/zenodo.1471237

CCP4iの起動

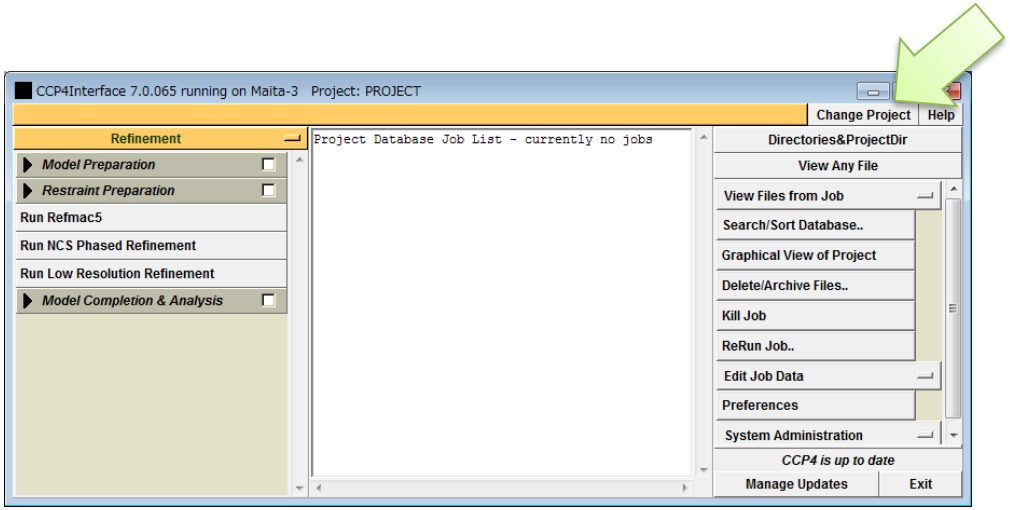


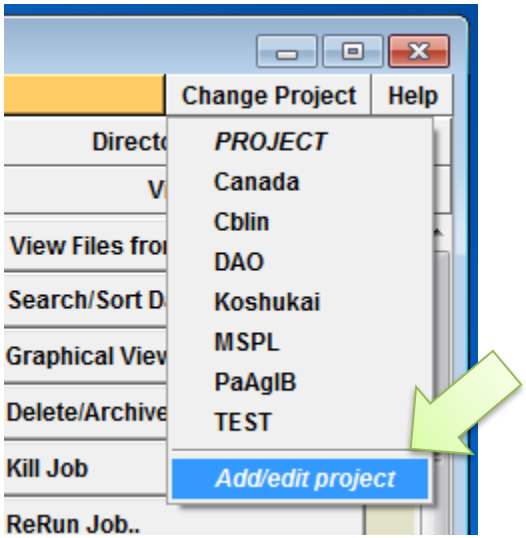
＜＝　アイコンを選択

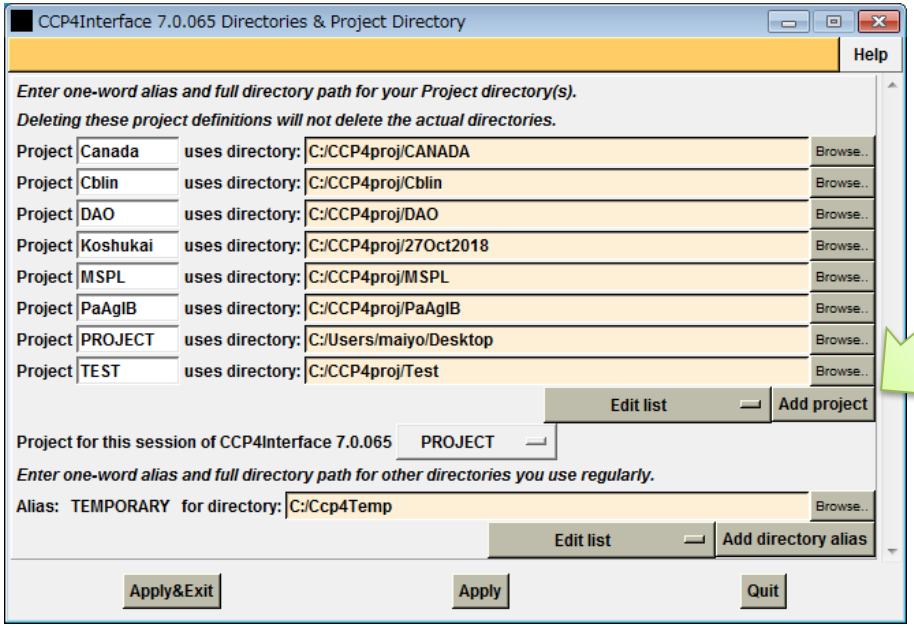
CCP4iの初期画面



作業ディレクトリの設定

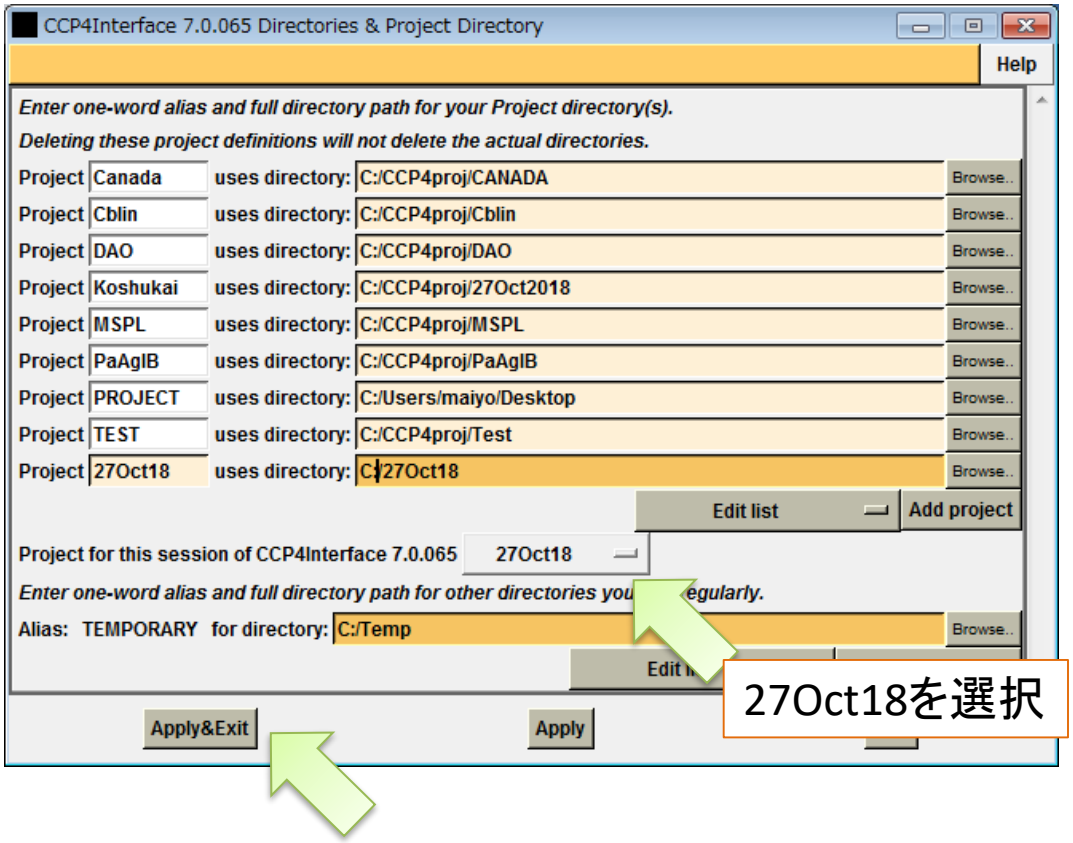






Add project

作業ディレクトリの設定



Project name : 27Oct18

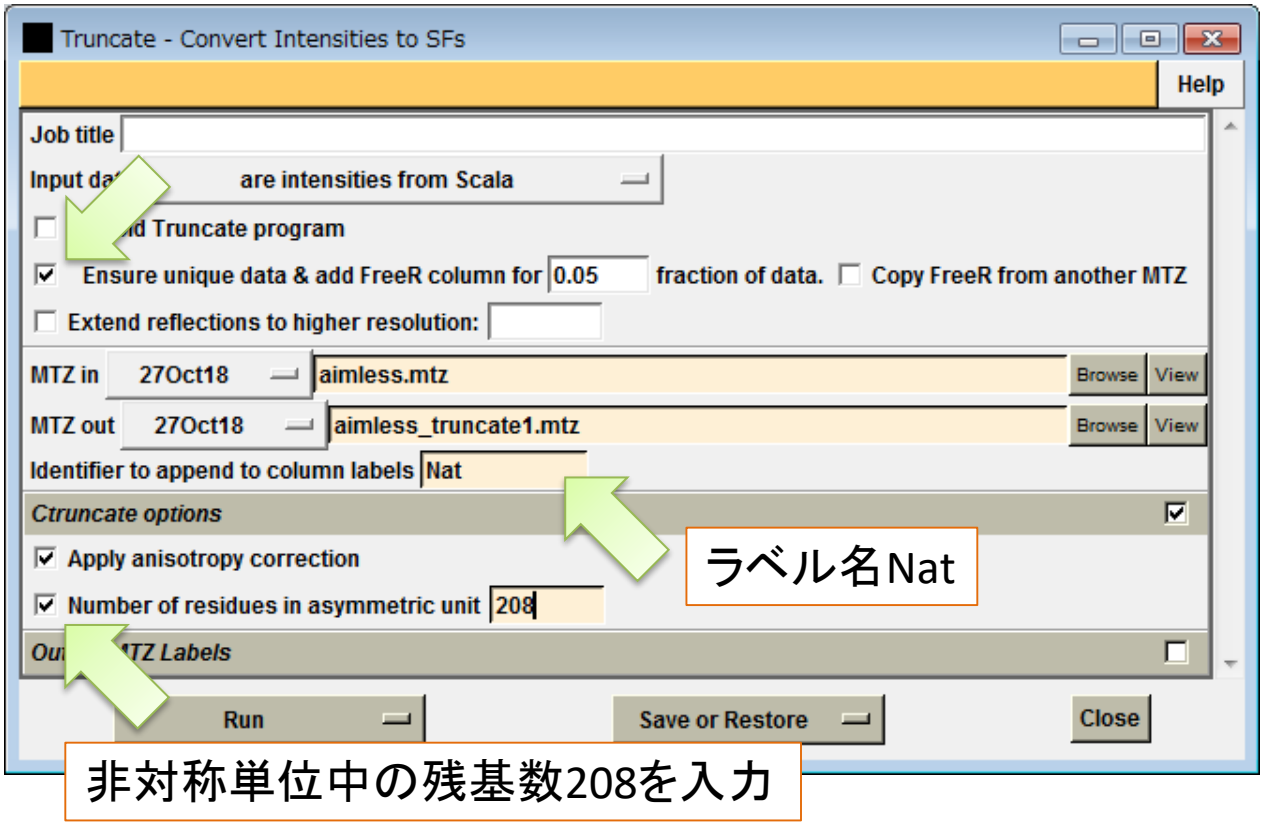
Directory : C:/27Oct18

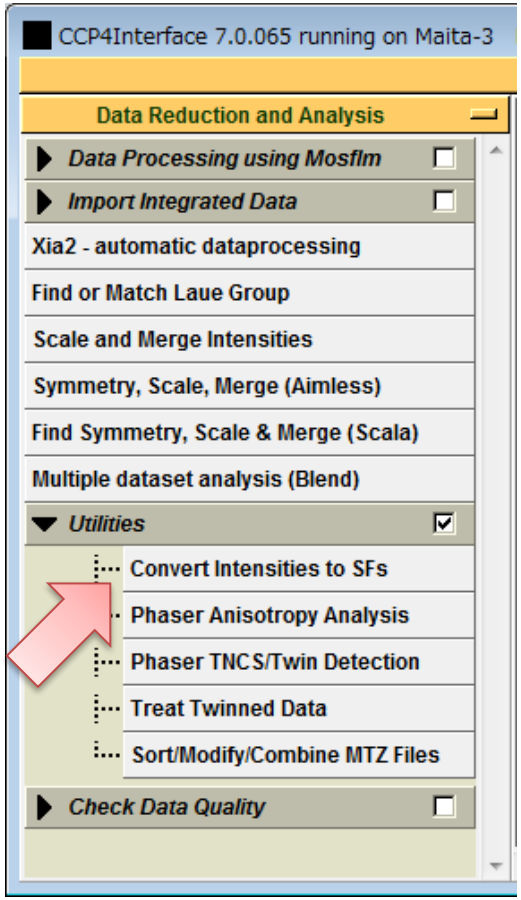
リモートディスク（Z:）に入り、.mtzファイル、.fastaをC:/27Oct18にコピーする

強度Iを構造因子Fに変換

タブ

Data Reduction & Analysis => Utilities => Convert Intensities to SFs

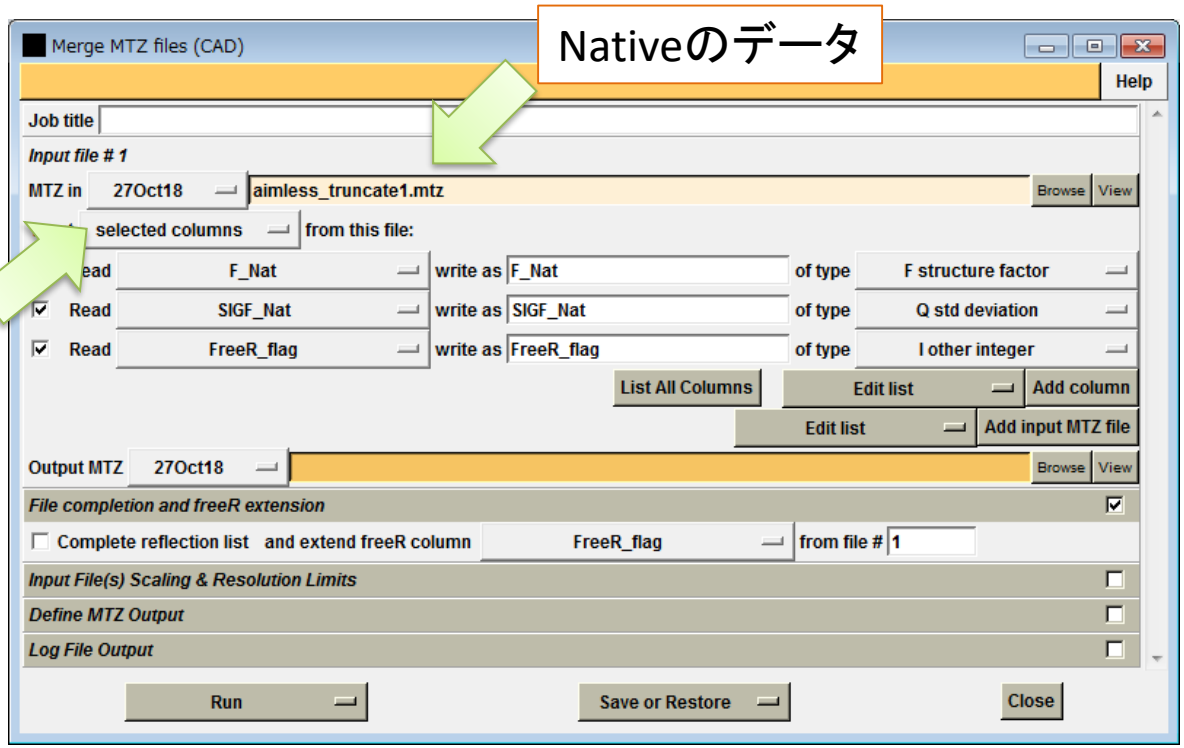


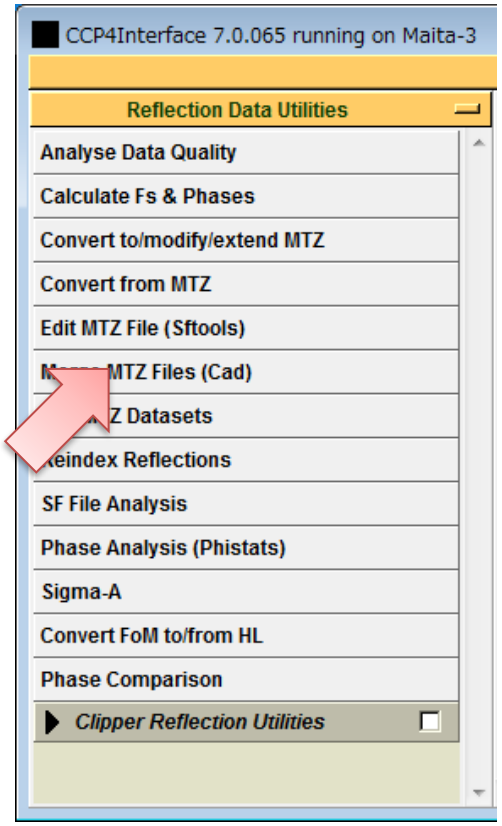


構造因子ファイルの結合

タブ

Reflection Data Utilities => Merge MTZ Files (Cad)

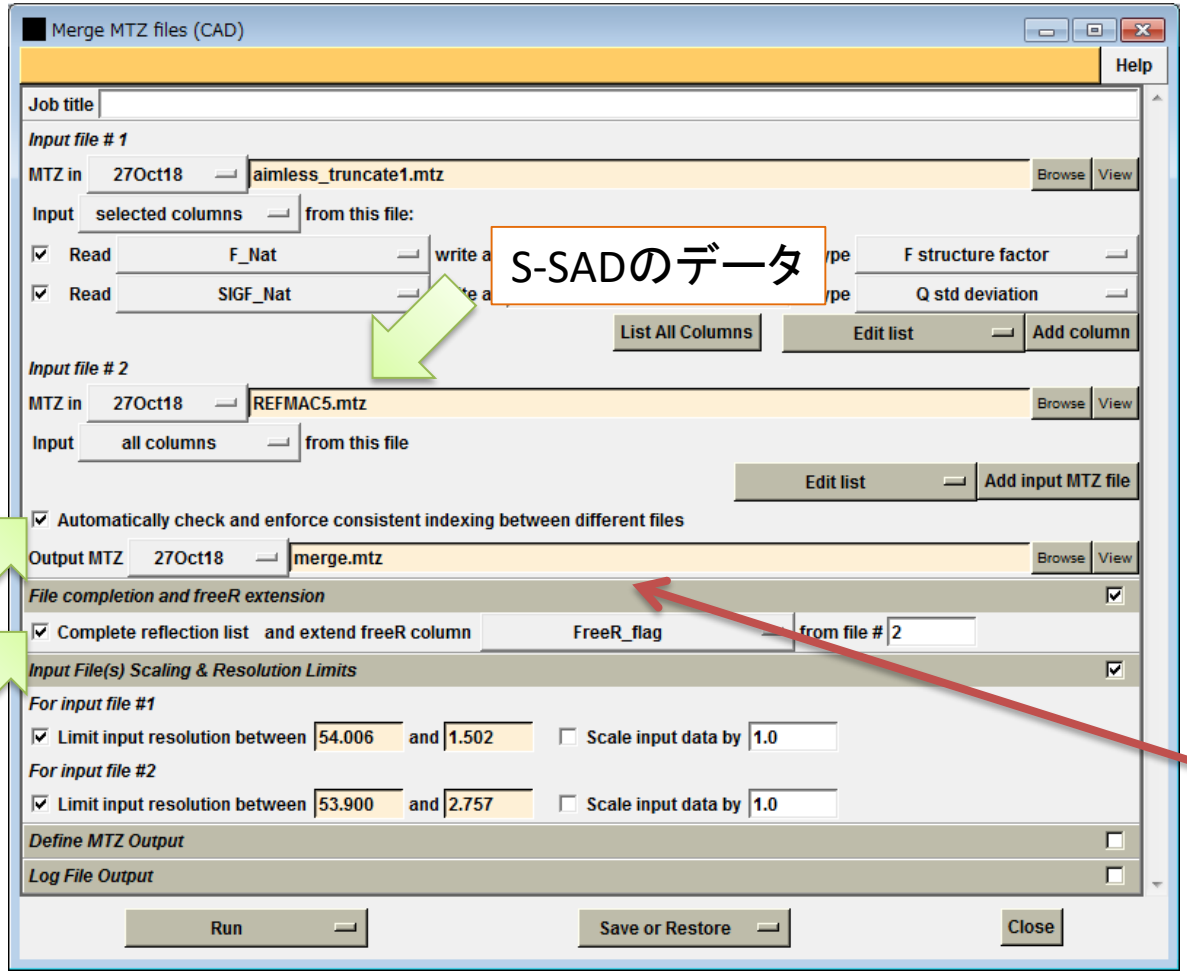




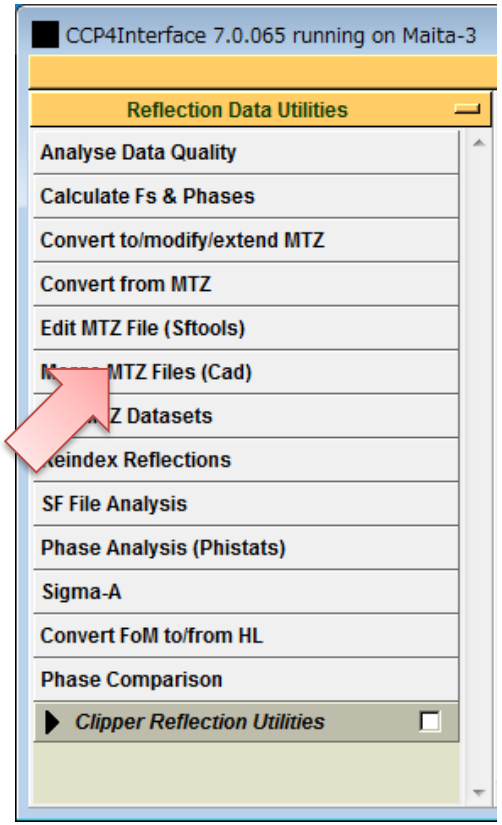
構造因子ファイルの結合

タブ

Reflection Data Utilities => Merge MTZ Files (Cad)



S-SADのデータ

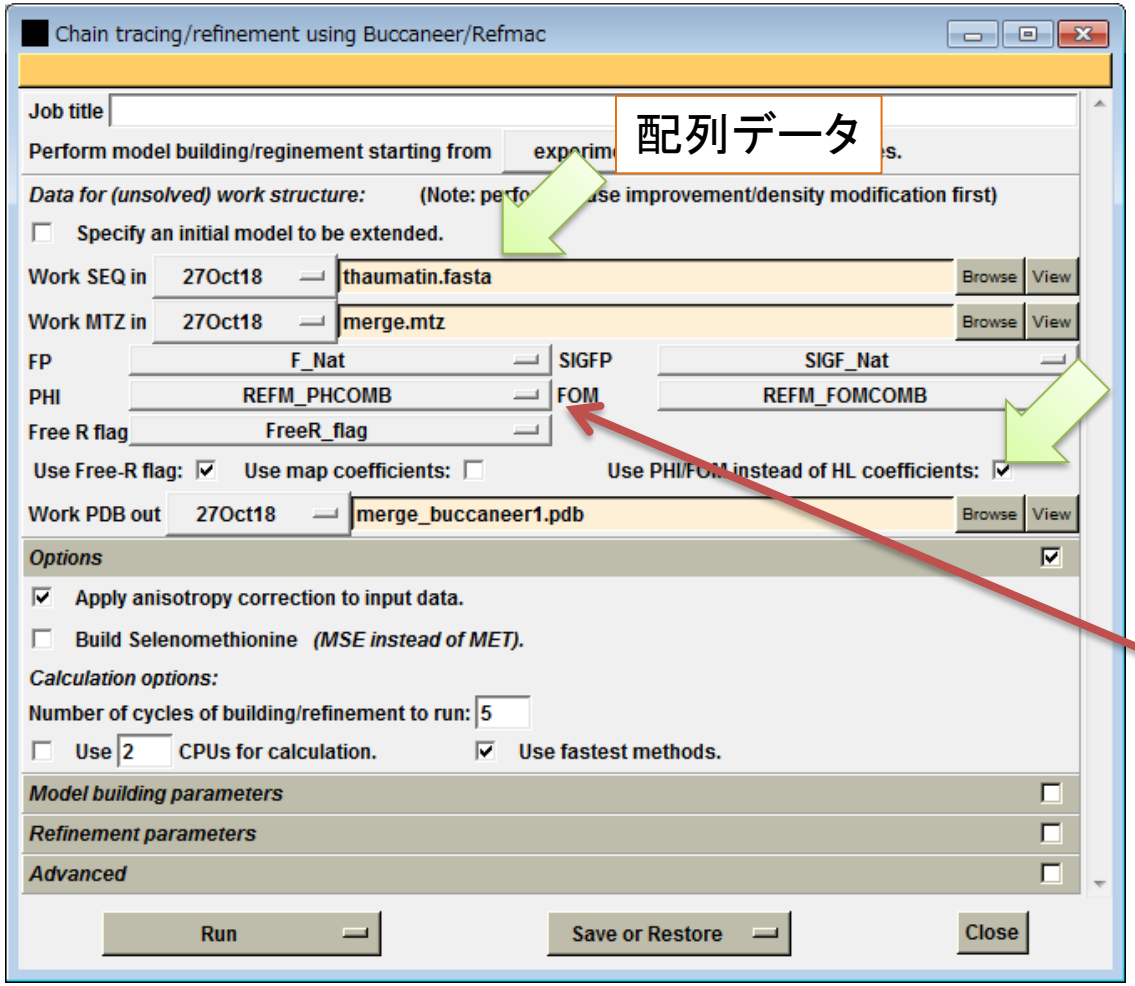


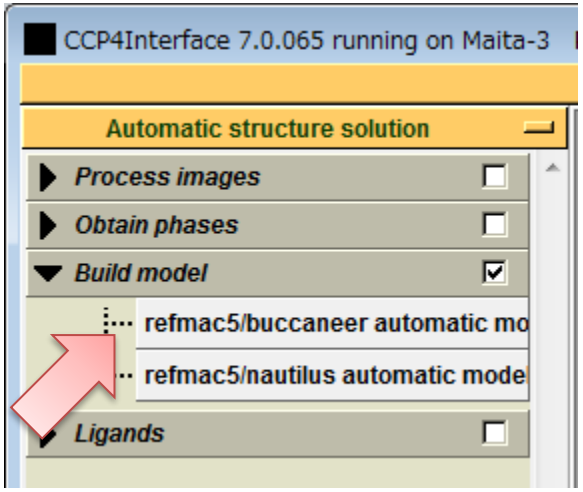
結合ファイル名 : merge.mtz

Buccaneer_pipeline

タブ

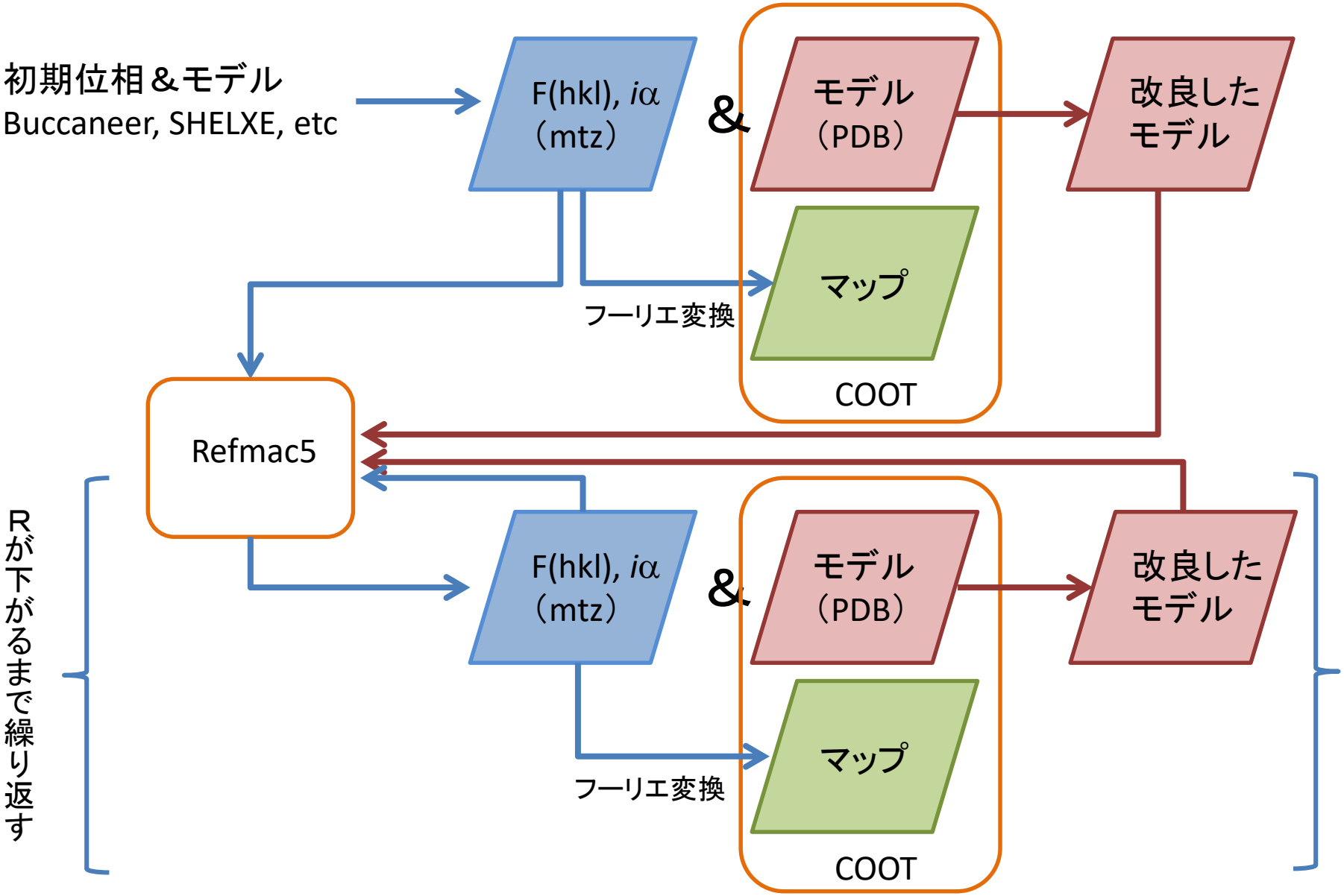
Automatic structure solution => refmac5/buccaneer automatic model building & refinement





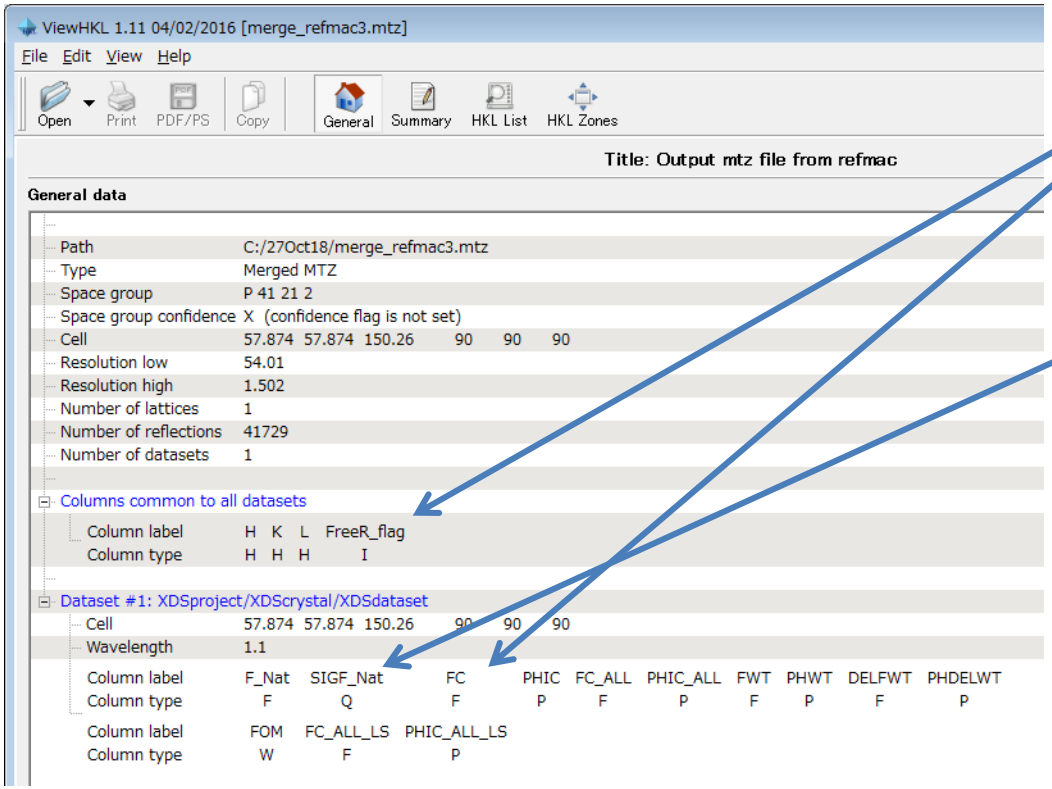
位相とFOMを指定
（PHWTは使わない）

構造精密化の流れ


初期位相＆モデル
Buccaneer, SHELXE, etc
F(hkl), iα
（mtz）
&
モデル
（PDB）
改良した
モデル
マップ
フーリエ変換
COOT
Refmac5
F(hkl), iα
（mtz）
&
モデル
（PDB）
改良した
モデル
マップ
フーリエ変換
COOT
Rが下がるまで繰り返す

よくあるエラー

Column_label関連のエラー



名前は重複していないか？

名前は正しく指定しているか？

よくあるエラー

PDBのヘッダ関連

LINKやSSBONDの残基番号ミス

※Cootで残基番号を変えても、ヘッダ部分の番号は変わらないので注意

```
REMARK   3  OTHER REFINEMENT REMARKS:
REMARK   3  HYDROGENS HAVE BEEN ADDED IN THE RIDING POSITIONS
REMARK   3  U VALUES       : REFINED INDIVIDUALLY
REMARK   3
SSBOND   1 CYS A  121    CYS A  193
SSBOND   2 CYS A  126    CYS A  177
SSBOND   3 CYS A  134    CYS A  145
SSBOND   4 CYS A  149    CYS A  158
SSBOND   5 CYS A  159    CYS A  164
SSBOND   6 CYS A  204    CYS A    9
SSBOND   7 CYS A   56    CYS A   66
SSBOND   8 CYS A   71    CYS A   77
CISPEP   1 PRO A   83    PRO A   84          0.00
CISPEP   2 PRO A   83    PRO A   84          0.00
CRYST1  57.874   57.874  150.257  90.00  90.00  90.00 P 41 21 2
SCALE1   0.017279  0.000000  0.000000        0.00000
SCALE2  -0.000000  0.017279  0.000000        0.00000
SCALE3   0.000000 -0.000000  0.006655        0.00000
ATOM     1  N   ALA A   1      39.870   6.634   9.932  1.00 18.72          N
ATOM     2  CA  ALA A   1      41.311   7.059  10.067  1.00 17.40          C
ATOM     3  CB  ALA A   1      41.853   7.650   8.820  1.00 17.84          C
ATOM     4  C   ALA A   1      41.379   8.087  11.160  1.00 16.27          C
ATOM     5  O   ALA A   1      40.446   8.887  11.287  1.00 18.91          O
ATOM     6  N   THR A   2      42.486   8.097  11.863  1.00 14.20          N
ATOM     7  CA  THR A   2      42.700   9.092  12.906  1.00 15.27          C
ATOM     8  CB  THR A   2      43.125   8.532  14.249  1.00 17.97          C
```

CRYST1が存在しないor間違っている

※PyMOLでセーブしたPDBファイルはCRYST1の行が削除されてる

Coot基本ワザ

Ctrlキーを使う

<u>通常</u>

Ctrl+マウス右／上下ドラッグ	Z方向の移動
Ctrl+マウス右／左右ドラッグ	Z方向のスラブ範囲
Ctrl+マウス左／ドラッグ	中心位置を動かす

<u>Rotate/Translate</u>

Ctrl+マウス左／ドラッグ	対象の残基をマウスで自由に動かせる

<u>残基を選択して白くなっている状態で、白の残基の原子どれかをクリック</u>

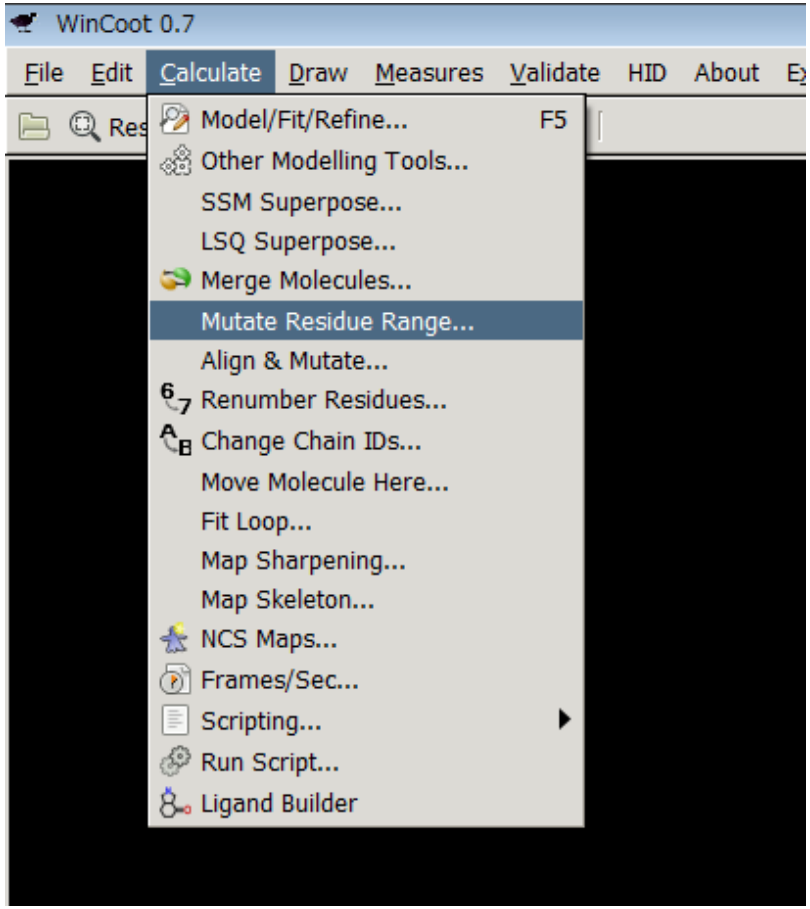
Ctrl+マウス左クリック／ドラッグ	対象の原子のみをマウスで自由に動かせる

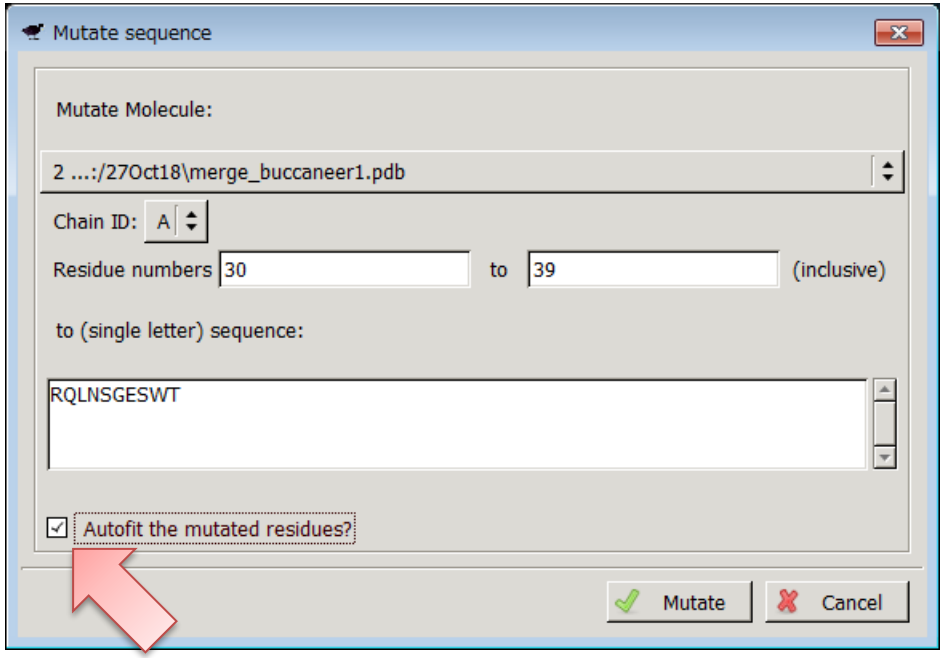
Shortcutキーを使う

“M”	Zoom in
“N”	Zoom out
“I”	回転
“L”	中心から近い残基のラベルを表示
“C”	十字のスケールを表示
“Space”	一つ大きい残基番号に移動
“Space＋Shift”	一つ小さい残基番号に移動

Coot裏ワザ

Case#1
配列を一気に変えたい

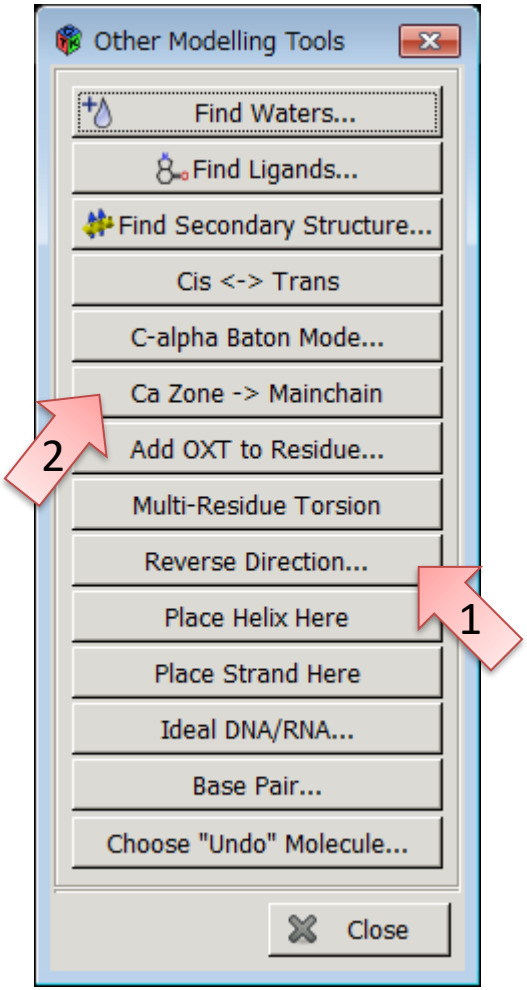




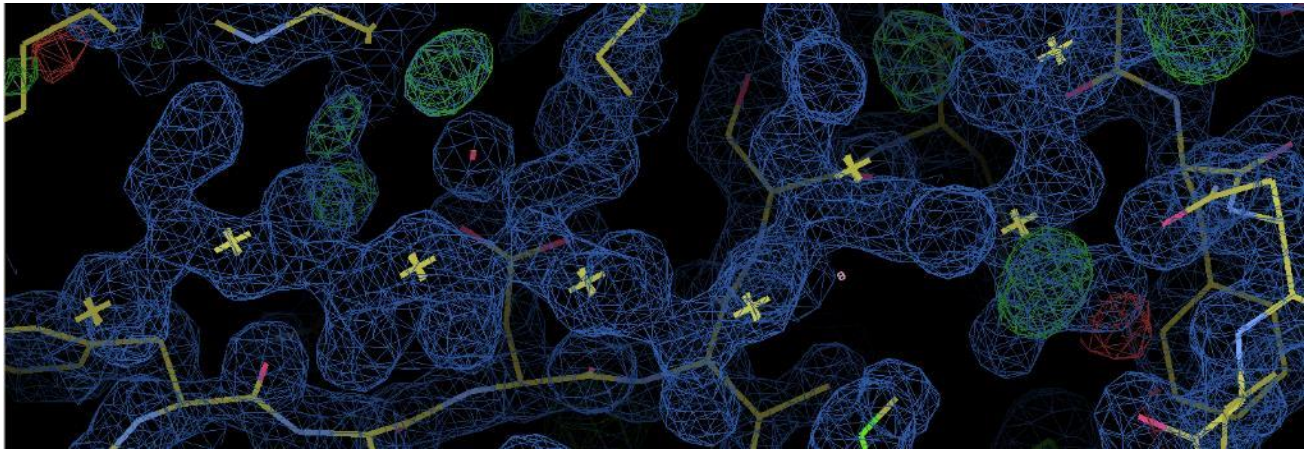
ここをチェックすると電子密度にfitしてくれる

Coot裏ワザ

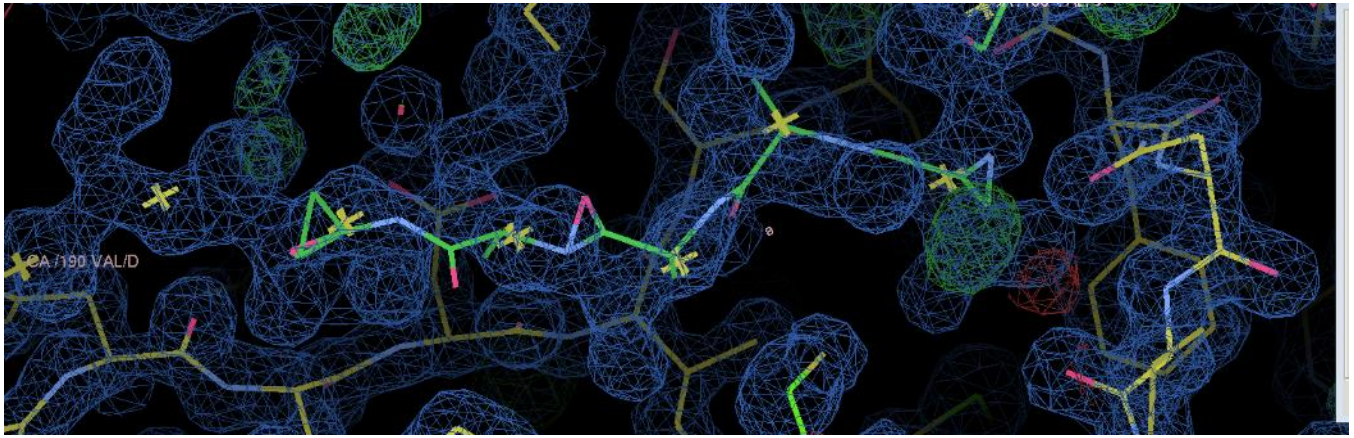
Case#2
Autobuildの向きが逆



1. Reverse Direction...
変えたいフラグメントをクリックするとCaバトンモードになる



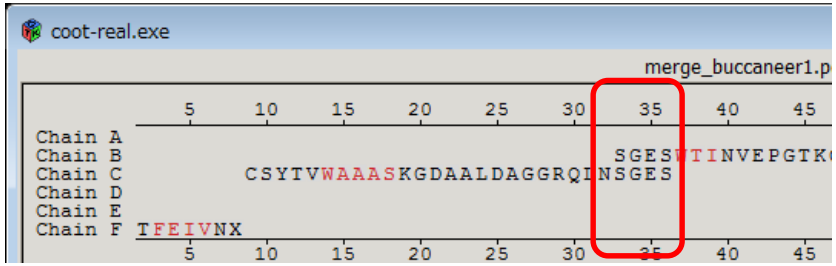
2.Ca Zone -> Mainchain
2点をクリックすると、その範囲が逆向きでpoly-ALAになる

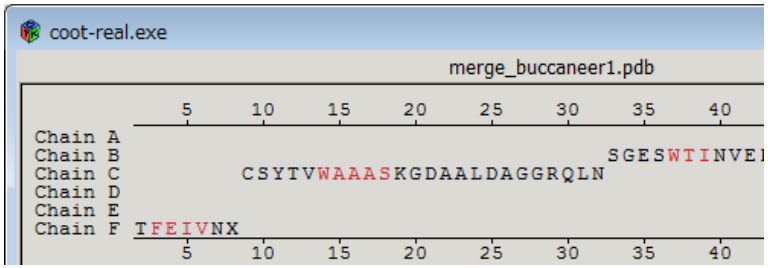


Coot裏ワザ

Case#3
複数のChainを一つにしたい

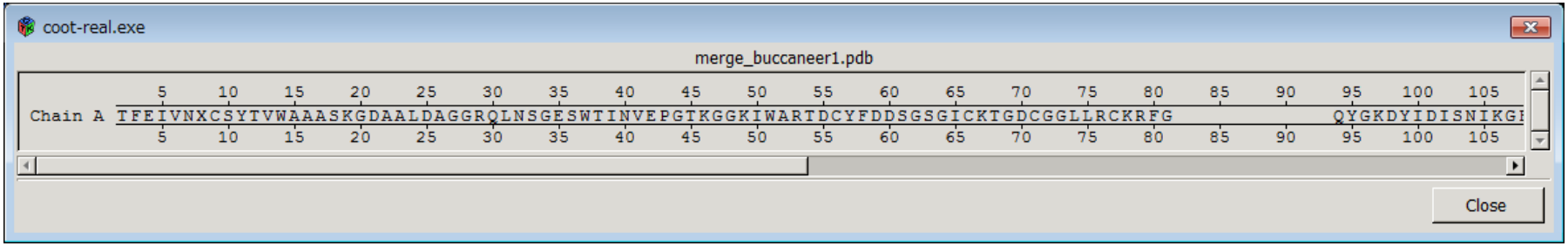
1. すべてのオーバーラップを取り除く！





2. Extensions => Modelling => Use SEGIDs…

3. Calculate => Change Chain IDs…



Coot裏ワザ

Case#4
ファイルの中身も並べなおす

Case#3で出来たPDBファイルは実は順番が残基番号通りに並んでいない

```
CRYST1   57.874   57.874  150.257  90.00  90.00  90.00 P 41 21 2
SCALE1     0.017279  0.000000  0.000000        0.00000
SCALE2    -0.000000  0.017279  0.000000        0.00000
SCALE3     0.000000 -0.000000  0.006655        0.00000
ATOM      1  N   LYS A 106      45.224  28.483  -1.532  1.00 12.06          N
ATOM      2  CA  LYS A 106      44.295  29.454  -0.962  1.00 12.45          C
ATOM      3  CB  LYS A 106      43.112  28.712  -0.349  1.00 13.40          C
ATOM      4  CG  LYS A 106      42.195  28.025  -1.348  1.00 14.48          C
ATOM      5  CD  LYS A 106      41.321  29.012  -2.046  1.00 17.70          C
ATOM      6  CE  LYS A 106      40.461  28.385  -3.128  1.00 21.04          C
ATOM      7  NZ  LYS A 106      39.666  29.467  -3.741  1.00 25.86          N
ATOM      8  C   LYS A 106      45.083  30.282   0.061  1.00 12.27          C
ATOM      9  O   LYS A 106      44.514  30.720   1.045  1.00 11.86          O
ATOM     10  N   GLY A 107      46.366  30.510  -0.190  1.00 11.14          N
ATOM     11  CA  GLY A 107      47.196  31.379   0.651  1.00 11.51          C
ATOM     12  C   GLY A 107      47.764  30.599   1.821  1.00 10.42          C
ATOM     13  O   GLY A 107      47.647  29.342   1.896  1.00 11.96          O
ATOM     14  N   PHE A 108      48.365  31.324   2.745  1.00 10.82          N
```

＜＝　ファイルの中身

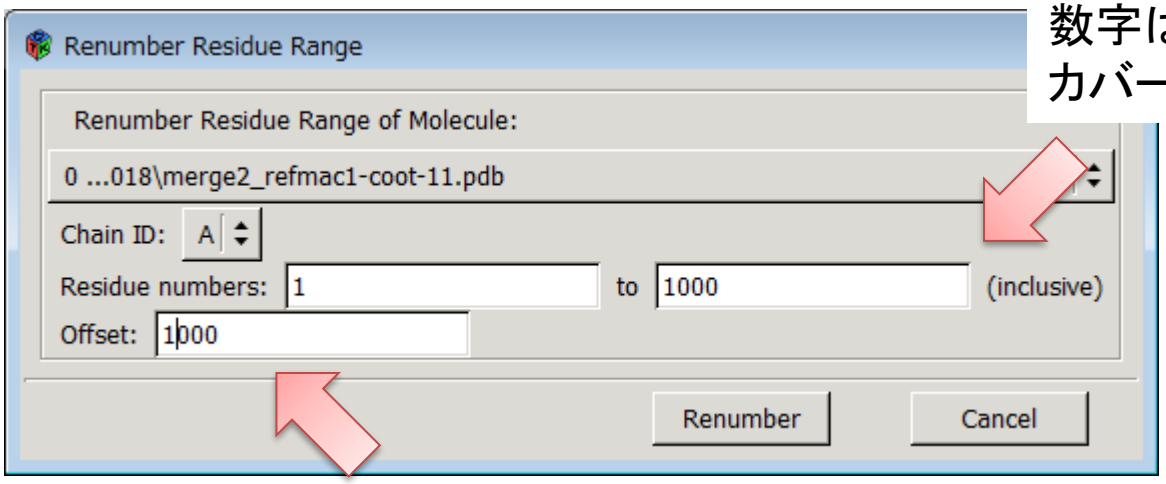
１行目はLys106になっている

ファイル中で順番通りになっていないと、Density fitが上手く動かない
　例えば、残基番号104-108までをDensity fitしようとすると105と106で繋いでくれない

Coot裏ワザ

Case#5
ファイルの中身も並べなおす

1. Calculate => Renumber Residues…



数字は適当に、全範囲をカバーするように

ここも適当に、本来のものと被らないように大きめの値が良い

Coot裏ワザ

Case#5
ファイルの中身も並べなおす

```
SSBOND   7 CYS A   56    CYS A   66
SSBOND   8 CYS A   71    CYS A   77
CRYST1  57.874   57.874  150.257  90.00  90.00  90.00 P 41 21 2
SCALE1     0.017279  0.000000  0.000000        0.00000
SCALE2    -0.000000  0.017279  0.000000        0.00000
SCALE3     0.000000 -0.000000  0.006655        0.00000
ATOM      1  N   ALA A1001      39.871   6.659   9.902  1.00 18.10          N
ATOM      2  CA  ALA A1001      41.291   7.038  10.080  1.00 18.49          C
ATOM      3  CB  ALA A1001      41.905   7.573   8.833  1.00 19.57          C
ATOM      4  C   ALA A1001      41.372   8.112  11.139  1.00 17.58          C
ATOM      5  O   ALA A1001      40.472   8.948  11.229  1.00 18.21          O
ATOM      6  N   THR A1002      42.465   8.114  11.863  1.00 14.91          N
ATOM      7  CA  THR A1002      42.687   9.138  12.893  1.00 15.64          C
ATOM      8  CB  THR A1002      43.126   8.578  14.246  1.00 16.76          C
ATOM      9  OG1 THR A1002      44.322   7.839  14.146  1.00 19.77          O
ATOM     10  CG2 THR A1002      42.067   7.664  14.825  1.00 18.97          C
ATOM     11  C   THR A1002      43.686  10.160  12.388  1.00 14.06          C
ATOM     12  O   THR A1002      44.753   9.819  11.803  1.00 13.42          O
ATOM     13  N   PHE A1003      43.306  11.400  12.667  1.00 12.83          N
ATOM     14  CA  PHE A1003      44.160  12.589  12.501  1.00 13.00          C
ATOM     15  CB  PHE A1003      43.508  13.563  11.535  1.00 13.19          C
```

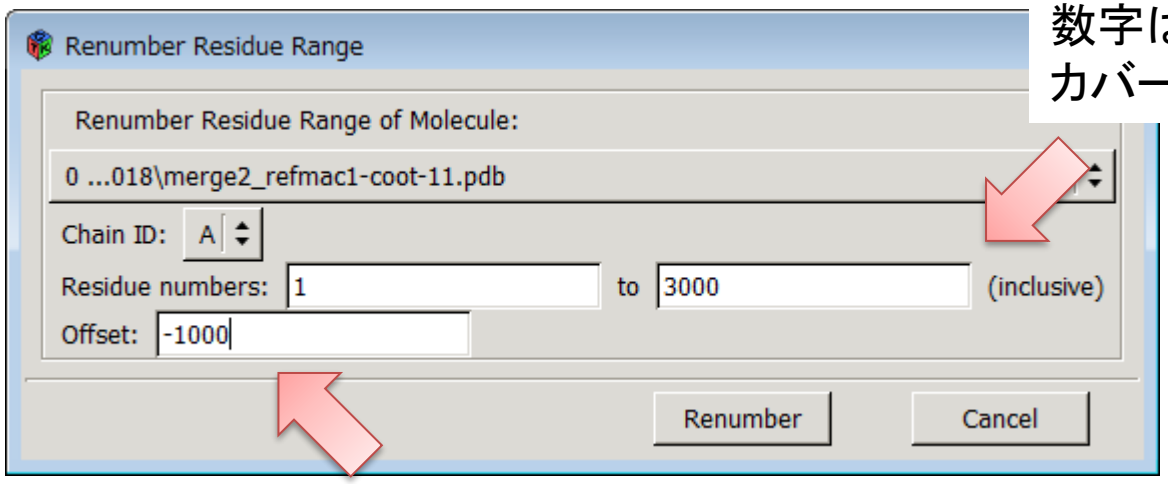
＜＝　新しいファイルの中身

1行目はALA1001になっている

Coot裏ワザ

Case#5
ファイルの中身も並べなおす

２．再びCalculate => Renumber Residues…



数字は適当に、全範囲を
カバーできるように

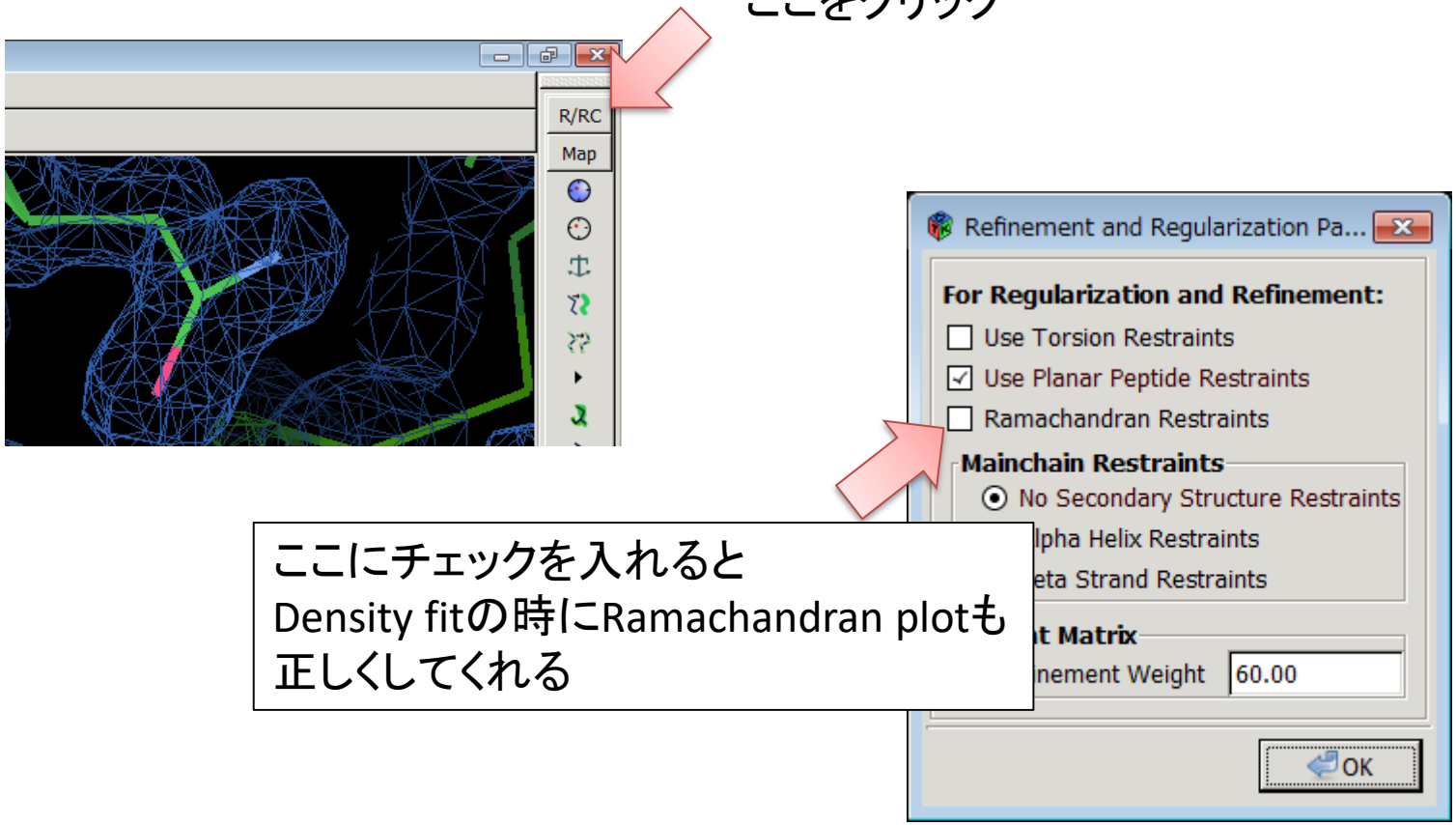
ここは、前回増やした分だけ減らす

Validation

PDB登録の際は構造の間違いをすべてチェックされるので、
普段から気を付けて精密化しましょう

Ramachandran plot

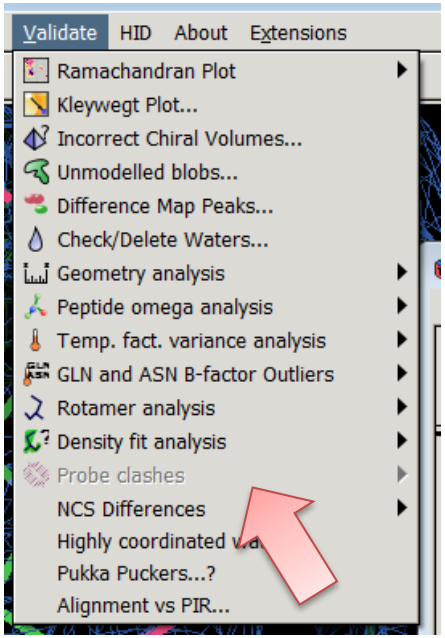
ここをクリック

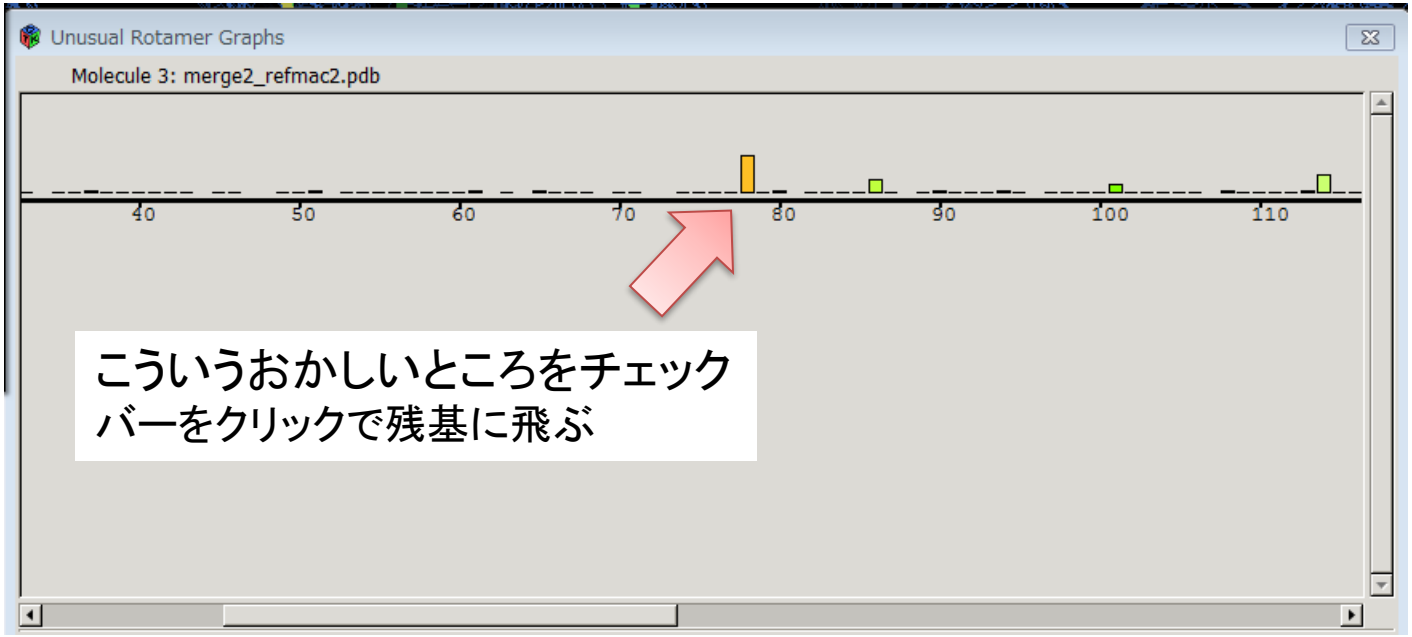


ここにチェックを入れると
Density fitの時にRamachandran plotも
正しくしてくれる

Validation

モデルの間違いチェック（Validate）を上から順に選択して
エネルギーの高い（黄～赤）残基があれば見て直す





Probe clashesは、全水素を発生させて、衝突している箇所が分かる機能