

応用生命科学科

生物物理化学実験

(後半)

—タンパク質のX線結晶構造解析—

(応用構造生物学)

三上文三

高橋延行

水谷公彦

氏名 _____

実験予定表

	1組(A-E 班)	2組(F-J 班)
1 日目	講義 リゾチームの結晶化 密度勾配の作成	
2 日目	スクリーニング試薬調製	
3 日目	宇治地区(農学部バス)A-E 班 回折データ収集, ブラッグの式	結晶密度の測定 計算 F-J 班
4 日目	結晶密度の測定 計算 F-J 班	宇治地区(農学部バス)A-E 班 回折データ収集 ブラッグの式
5 日目	スクリーニング, 講義 回折デー タの収集と構造の精密化	
6 日目	サテライト 構造の精密化 モデ リング	
7 日目	サテライト 構造の精密化 モデ リング	
8 日目	スクリーニング観察 評価 後片 付け	
9 日目	講義 空間群の決定, 構造解析 例 レポートの書き方等	

1.1 リゾチームのX線結晶構造解析

1.1.0 はじめに

タンパク質の立体構造解析はタンパク質の機能を明らかにし、その機能改変を行うために不可欠の手段となっている。立体構造解析のためには、現在 X 線結晶構造解析が一般的であり、その方法はルーチン化されている。X 線結晶構造解析のためには、目的タンパク質を精製、結晶化する必要がある。ここでは市販精製リゾチームを用いて結晶化を行い、結晶の回折データを収集して結晶学的性質を明らかにする。また、得られた回折データを用いて構造モデルの精密化計算とグラフィックスによるモデリングをサテライトのコンピューターを用いて体験する。一方、結晶化条件の未知のタンパク質の場合には結晶化条件の検索が重要であり、そのためにはスクリーニング法が一般に用いられている。そこで、スクリーニング試薬を調製し、結晶化条件未知のサンプルを用いてスクリーニングを行う。また、構造が不明な結晶の構造解析のためには結晶の単位格子中の非対称単位に含まれるタンパク質の分子数を決定することが重要であり、このために有機溶媒の濃度勾配中で浮遊法によりリゾチーム結晶の密度の測定を行う。

1.1.1 リゾチームの単結晶の調製

【目的】 タンパク質の結晶化はタンパク質の精製法として古くから用いられており、近年は X 線結晶構造解析によるタンパク質の立体構造解析のための重要な研究手段となっている。ここではリゾチームを用いて結晶化の原理および方法を学ぶ。

【試薬】 市販卵白リゾチーム粉末, 0.5M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5), 食塩 (NaCl), 50%w/v PEG4000 溶液

【器具】 結晶化用 3 連の血液凝集板 (ガラス製), セロテープ (大), 拡大鏡 (実体顕微鏡), ピペットマン 200 μ l あるいは 20 μ l

【リゾチームの準備】 市販卵白リゾチーム 50mg を 1ml の pH4.5, 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液溶液に溶解し、タンパク質溶液とする。

【リゾチームの結晶化】 上記濃縮タンパク溶液を沈殿化剤として NaCl を用い、バッチ法あるいは蒸気拡散法 (シッティングドロップ法およびハンギングドロップ法) により結晶化し、結晶の外形を拡大鏡で観察する。

沈殿化剤 1. 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) と 1.0 M NaCl

沈殿化剤 2. 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) と 1.5 M NaCl

沈殿化剤 3. 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) , 1.0 M NaCl と 40%w/v PEG4000

各沈殿化剤 10 μ l とタンパク質溶液 10 μ l を 3 連の血液凝集板のくぼみに取り混合して、すばやくセロテープで被い結晶化を観察する (図)。通常 1 時間程度で結晶が現れその後成長し、0.3mm 角程度の結晶が得られる。得られた結晶は数日間は安定である。

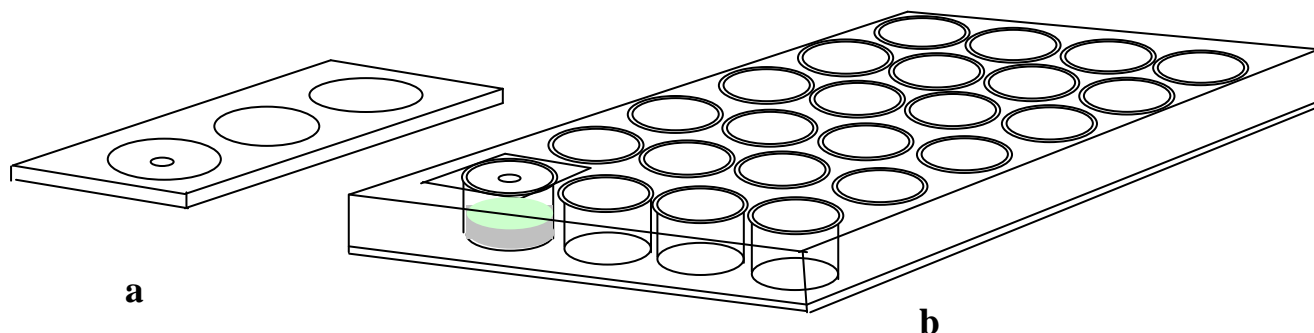


図 1 結晶化容器

a はバッチ法に用いる 3 連の血液凝集板でセロテープで密封する。この時テープに皺がよると密閉できず、溶液はすぐに乾燥するので注意する。**b** は市販の 24 穴ハンギングドロップ蒸気拡散用プレートでウェルに 1ml の母液を入れ、母液 $5\mu\text{l}$ とタンパク溶液 $5\mu\text{l}$ をシリコナイズしたカバーガラス上で混合し、カバーガラスをひっくり返し、あらかじめシリコングリースを載せたウェル上に固定密封する。

1.1.2 リゾチーム結晶の回折データの収集

【目的】 タンパク質結晶の回折データの測定法を経験し、空間群の決定法および回折点の強度データの収集法を理解する。回折点の現れる位置は結晶の格子定数と点群によって決められ、各回折点は指数 (h, k, l) によって区別される。結晶中の分子情報は各回折点の強度に関係しているため、できるだけ正確な強度データの測定が重要である。

【安全上の注意】 X 線は有害な電磁波であり、被曝は深刻な事態を引き起こす。最近の装置は安全性には十分に配慮されており、測定中の被曝線量は 0 であるが、それでも結晶の装置への取り付けは X 線のシャッターの閉を十分確認して行う。

【装置・器具】 低温装置付 X 線発生装置およびデテクター、(ガラスキャピラリー)、凍結用ループ、実体顕微鏡

【実験】

1.1.1 で得られたリゾチームの結晶を X 線結晶構造解析装置のゴニオメーターにマウントする。この際、沈殿化剤 1, 2 で得られたものは結晶 1 個を内径 0.8mm のガラスキャピラリーに移し、キャピラリーの一端に結晶化母液を少量入れた状態で両端を加熱したワックスで封じ、このキャピラリーをマウントする。一方、沈殿化剤 3 で得られ

たものはループで結晶 1 個をすくって低温窒素ガス気流化で凍結し、凍結状態で測定する。沈殿化剤 1, 2 で得られたものも沈殿化剤 3 の母液に移せば凍結できる。うまく凍結できれば結晶は透明で、氷による回折リングは観察されない。結晶の測定条件は結晶からデテクターまでの距離を 13~16cm に設定し、ゴニオメーターの ϕ 角を 0.25° ずつ回転させ全部で 180° の範囲のデータを収集する。イメージ 1 枚あたりの露光時間は結晶の大きさによって決める。一枚 20 秒で露光すると測定には 4 時間要し、720 枚のイメージが得られる (表 1)。できるだけ高分解能のデータを測定するためには測定後、 2θ 角を高分解側に振り (35°) 再度 180° の範囲のデータを収集する。

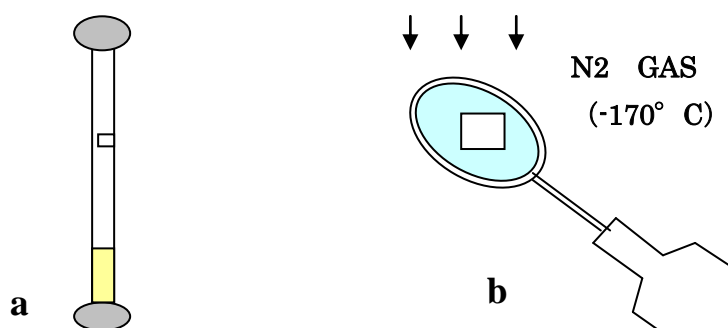


図 1 結晶のマウントの方法

a, キャピラリー内に吸い込み母液をろ紙で除き両側を加温したワックスで閉じる。一端には母液を入れておく。b, 結晶をナイロンループにすくい、液体窒素中で凍結する。

表 1. リゾチーム結晶の回折データ測定条件

X線発生装置	回転対陰極式X線発生装置 (ブルカーM18XHF) 45 kV, 90 mA
検出器	マルチワイヤーデテクター (ブルカーHighStar)
デテクター距離	16 cm
露出時間	20 sec
回転角度(ω)/フレーム	0.25°
2θ 角	18° , 35°
全フレーム数	2500
限界分解能	1.77 \AA

測定を開始したら得られたイメージの一部を用いて解析ソフト (SADIE) によって結晶の格子定数と方位および対称性 (点群) を決定する。決定したパラメーターに従って各イメ

ージの回折点の強度を測定するためのプログラム (SAINT) をスタートする. リゾチームの結晶は正方晶であるので点群として $4/mmm$ を選択する. 測定終了後, すべてのデータをスケールリングし強度データ (I) を構造因子 (F , $|F|^2=I$) に変換し, 一つのファイルにまとめる. 表 2 に測定例のまとめを示す. ここで, データの質の目安は R_{sym} と I/σ に現れる. σ とはバックグラウンドの強度のことで I/σ はデータの S/N を示すことになる. また, 目的の分解能での予定されるデータ数の完全性も重要である. どこまでの分解能までのデータが測定できるかは結晶に依存することが多い. 回折データの強度は入射 X 線に比例するので, 放射光を利用すれば分解能を向上できる場合が多い.

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

表 2. リゾチーム結晶の回折データ測定統計値

	リゾチーム
空間群	$P4_32_12$
a, b, c (Å)	77.321, 77.321, 37.257
分解能 (Å)	27.3-1.77 (1.84-1.77)
測定された反射数	76,714 (2,164)
平均測定回数	6.9
I/σ	45.6 (7.91)
独立な反射数	11,280
完全性 (%)	98.2
R_{sym} , (%)	3.1 (9.4)

最も高分解能側のシェルでの統計値を括弧に示した.

【参考 単結晶 X 線回折装置】

農学研究科宇治地区に設置されている単結晶 X 線回折装置を用いる (写真 1). 装置は回転対陰極方式 (ローター) の X 線発生装置①と検出器 (デテクター) ②および低温試料吹き付け装置③から成る. 検出器としては一般的にはイメージングプレートや CCD が用いられているが, 農学研究科の装置はマルチワイヤー方式であり, 感度が高く, リアルタイムで測定できる. X 線発生装置の①の部分には真空中で回転する銅の陽極とフィラメントがあり, ここで発生する銅の $K\alpha$ 線を両側の窓から取り出す. 入射 X 線はミラー装置④により, 単色化と焦点化され, コリメーター⑤を経て試料結晶 (写真 2) に照

射される。試料の単結晶はループ（図1）⑥にすくい取った後、直ちに -173 度の低温窒素ガス中で凍結し、凍結状態を維持した状態で回折X線の測定を行う。結晶はゴニオメーターヘッド⑧に取り付け、2つの並進ノブでセンタリングする。プラットフォーム⑨は3軸（ 2θ , ω , ϕ ）方向の回転を可能にしている。入射X線はビームストッパー⑦によって停止され、回折X線のみがデテクターで検出される。デテクターの窓はベリリウム製で中は4気圧のXeガスで満たされ、電極として1mm間隔のワイヤーが3層あり、回折X線によって電離したXeイオンの位置と量を検出し、モニター画面にリアルタイムで表示する（写真3）。得られた回折画像をプログラムによって処理して各回折点の位置と強度を計算する。

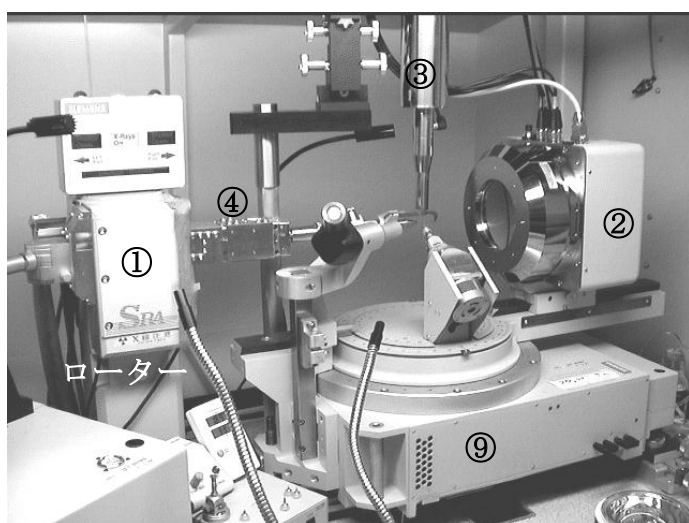


写真1

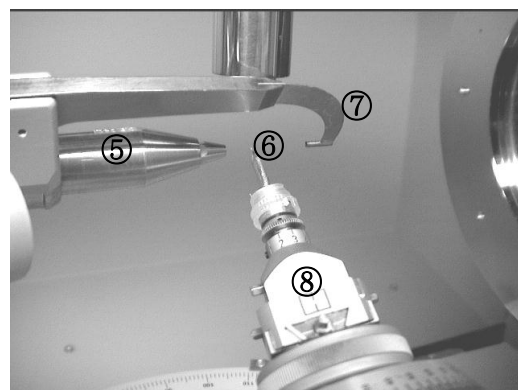
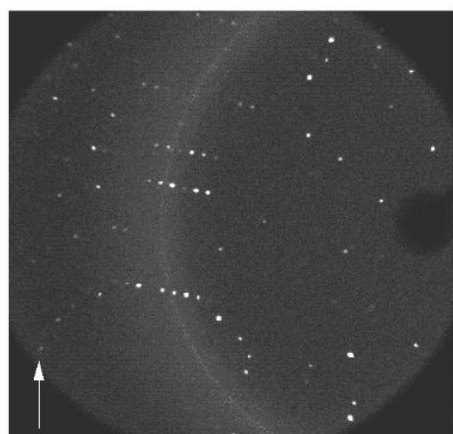


写真2

Data collection of PTP No.10 crystal by Multiwire Detector



Detector: Bruker Hi-Star
 Film distance: 13.0 cm
 Exposure time: 40s/frame
 Optics: Gebel mirror
 Scan width: 0.25° deg/frame
 Total frames: 1120
 Temperature: -170°

Crystal system: orthorhombic

a = 57.136
 b = 77.007
 c = 81.470
 (Å)
 $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$

2.4 Å

写真3

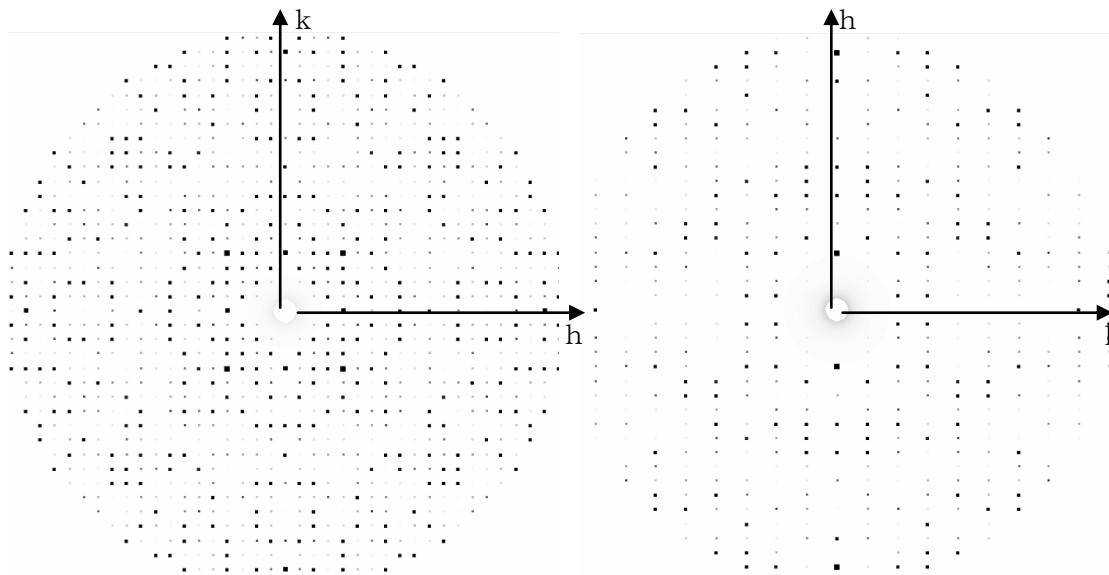
1.1.3 リゾチーム結晶の空間群の決定

結晶の空間群が不明である場合には、対称性の最も低い三斜晶系 (P1) として処理して逆格子の対称性と消滅則から本来の点群と空間群を決定する。そこで、リゾチーム結晶の回折データを点群が $\bar{1}$ であるとして測定し、同様に SAINT で処理し、データを F に変換する。得られたデータの逆格子点の並びを表示して対称性と消滅則から本来の空間群を決定する。結晶はその対称性によって 7 晶系 (三斜晶, 単斜晶, 斜方晶, 正方晶, 三方晶, 六方晶, 立方晶), 14 のブラベス格子, 32 の点群および 230 の空間群に分けることができる (表 3) が, 中心対称をもたないもの (タンパク質等) は 65 の空間

表 3. 結晶単位胞の格子定数と晶系, ブラベス格子と逆格子の対称

晶系(7)	格子定数		[ブラベス格子(14)]	逆格子の対称
三斜晶	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$	[P]	1
単斜晶	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \quad \beta \neq 90^\circ$	[P, C]	2/m
斜方晶	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	[P, C, F, I]	mmm
正方晶	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	[P, I]	4/m, 4/mmm
立方晶	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	[P, F, I]	m3, m3m
三方晶	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ \quad \gamma = 120^\circ$	[P]	3, 3m1, 31m
	$(a = b = c)$	$(\alpha = \beta = \gamma)$	[R]	
六方晶	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ \quad \gamma = 120^\circ$	[P]	6/m, 6/mmm

群しかとれず, その中でも数種類の空間群 ($P2_12_12_1$, $P2_1$, C2, $P4_32_12$, $P3_121$...など) を持つものが多い。それぞれの空間群の対称性や消滅則は International Table of Crystallography に記述されている。簡単に言えば空間群とは結晶の単位格子の中の対称性を示すものであり, 単位格子中の非対称単位の対称性を記述する。P1 の結晶では非対称単位が単位格子を作るが, リゾチーム結晶 ($P4_32_12$) の場合単位格子中に 8 個の非対称単位が存在し, それらが c 軸方向に 4 回らせん軸, a 軸方向に 2 回らせん軸, b 軸方向に 2 回軸を持つように配置されている。従って, 逆格子面のイメージは c*軸方向に 4 回回転軸と左右対称, 上下対称, a*, b*軸方向では左右対称, 上下対称の図形が現れる。また, らせん軸の情報はそれぞれの軸上の消滅則となって現れる。c*軸 (0, 0, 1) 上の回折点は 4 の倍数 ($l = 4n$) のみ, a*, b*軸上では 2 の倍数 ($h = 2n$) にだけ観測される。



hk0面

h0l面

図2 逆格子点のイメージ

これらの情報を基に空間群決定の表（表4）を参照してリゾチーム結晶の空間群を決定する。P4₃2₁2 と P4₁2₁2 とは絶対配置の異なる空間群であり、逆格子の対称からは区別できない。

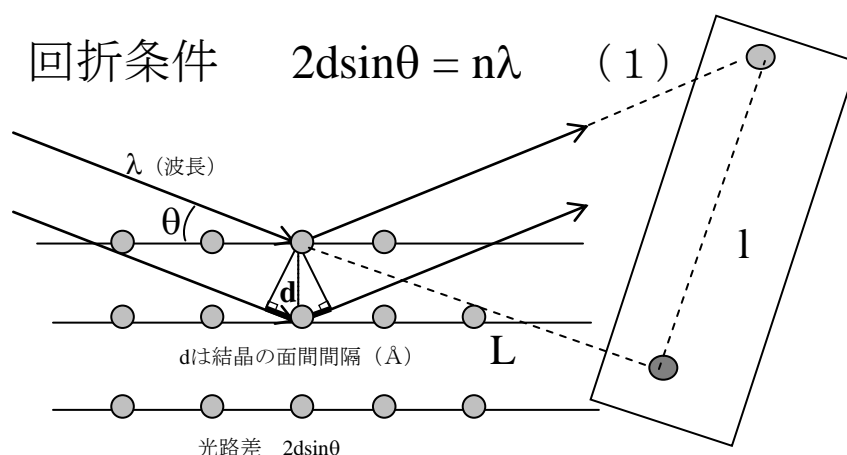
表4 空間群決定表（4/mmmの一部のみ記載，X線結晶構造解析の手引き，桜井敏夫著，裳華房より引用）

点群 (ラウエ群)	消滅則						点群と空間群					
	hk l	hk0	h0 l	hh l	h00	00 l	[]の中の記号は点群を示す					
正 方 (4/mmm)							[42m]	[4mm]	[422]	[4/mmm]		
							P4 ₂ m (111) P4 _m 2 (115)	P4mm (99)	P4 ₂ 2 (89)	P4/mmm (122)		
						/			P4 ₃ 2 ₂ (93)			
						$l=4n$			P4 ₁ 2 ₂ (93) P4 ₃ 2 ₂ (95)			
					h		P4 ₂ ₁ m (113)		P4 ₂ 2 (90)			
					h	/			P4 ₃ 2 ₁ 2 (94)			
					h	$l=4n$			P4 ₁ 2 ₁ 2 (92) P4 ₃ 2 ₁ 2 (96)			
				/			(l)	P4 ₂ c (112)				

1.1.4 光による2次元格子の回折実験

【目的】 結晶格子によるX線の回折現象は格子の間隔がX線を回折するのに適当であることから生じる。もし格子の間隔がもっと長ければX線よりも長い波長の光でも生じることになる。そこで、光源として赤色レーザーポインターを用いて2次元格子による光の回折実験を行い、回折の条件を与えるブラッグの式を理解する。

【原理】 ブラッグの式は以下のように与えられる。



ここで θ は入射角を、 d は結晶格子の間隔を示し、用いた光の波長を λ とする。回折格子の後方1 m以上の所 (距離 L) に適当なスクリーンを置き、入射光があたる位置から回折点までの距離 (l) を測定すると $\tan 2\theta = l/L$

であることから (1) 式の θ が分かり、半導体赤色レーザーの波長を650nmとして (1) 式から2次元格子の間隔が決定できることになる。

【装置・器具】 2次元格子のシート、赤色レーザーポインター、メジャー、ものさし

【安全上の注意】 レーザーポインター使用中は絶対光源を覗かないこと。

【実験】 各班で工夫して実験すること。回折格子からスクリーンまでの距離、測定する回折点を変えて10点以上 l と L を測定し、(1) 式から $n=1$ として d を求める。回折格子の間隔は実体顕微鏡でマイクロスケールを用いて読み取り、 d の値との相違を検討する。

1.1.5 リゾチーム結晶の密度の測定

【目的】 結晶構造解析において決定する電子密度は結晶の非対称単位であることから、非対称単位中の目的分子の数を予め知っておくことは重要である。理想的には1分子が都合がよいが、複数の分子が含まれることもよくあり、分子数が多すぎる場合は解析が困

難であり、結晶化の条件を再検討する必要がある。1.1.1のハンギングドロップ蒸気拡法で作製したリゾチームの結晶を用いて2種類の有機溶媒で作る密度勾配を用いて浮遊法によりリゾチーム結晶と結晶母液の密度を測定し、非対称単位中の分子数を求める。

【原理】結晶中のタンパク質の体積分率 (ϕ_p) は結晶の密度 (ρ_c) と母液の密度 (ρ_s) およびタンパク質の偏比容 (\bar{v}_p) から次式で示される。一般にタンパク質結晶の場合には ϕ_p は0.5付近にあることが多い。

$$\phi_p = (\rho_c - \rho_s) / (1/\bar{v}_p - \rho_s) \quad (1)$$

[$V \cdot \rho_c = V \cdot (1/\bar{v}_p) \cdot \phi_p + V \cdot \rho_s \cdot \phi_s$ と $\phi_p + \phi_s = 1$] から変形

結晶の重さ = タンパクの重さ + 溶媒の重さ V は単位格子の体積

一方、単位格子の単位格子中のタンパク質の分子数 (n) と分子量 (M) から N をアボガドロ数として次式の関係がある。

$$\phi_p = n\bar{v}_p M / NV \quad (2)$$

(1) で求めた ϕ_p を (2) に代入して n の値を計算する。ある空間群の単位格子中の非対称単位の数 Z であらわす (正方晶リゾチームの場合 $Z=8$ である) ので非対称単位中の分子数は n/Z で求めることができる。 \bar{v}_p の単位は cm^3/g であり、タンパク質溶液と溶媒の密度を測定して求めるか、タンパク質のアミノ酸組成から計算する。今回はリゾチームのアミノ酸配列データを用いて Web 上のサイトで計算する。

[http://proteins.msu.edu/Servers/Sequence_Analysis/sequence_partial_specific_volume.html]

【試薬】 m-xylene, bromobenzene 各 10 ml NaNO_3 水溶液

【器具】 25 ml メスシリンダー (ガラス製), 拡大鏡 (実体顕微鏡), ピペットマン 200 μl あるいは 20 μl , 結晶取り出し器具 (ルーブ)

【実験】

1. 密度勾配の作製

20 ml のメスシリンダー中で 10 ml の m-xylene を 10 ml の bromobenzene に重層し 2 日間以上静置し濃度勾配を作成する。安全ピペッターを用いること。いずれも有害な試薬であるのでドラフト中で作業すること。特にメスシリンダーを倒さないよう十分気を付けること。

2. 密度マーカー溶液の作製

適当な濃度の NaNO_3 溶液を用いてマーカーを作成する。(密度 1.1-1.3 の範囲で 1 ml の重量を秤量し、密度を決定する。1 ml をピペットマン等で測る場合、ピペットの誤差が大きい場合が多い。そのためまず、用いるピペットマンの検定を行う必要がある。

繰り返し誤差の大きなピペットはパッキン不良の疑いがあり用いない) 5 g の硝酸ナトリウムを 10 m l の水に溶解し, その水溶液の密度を測定する. 次に, この溶液を適当に希釈して密度 1. 1-1. 3 の範囲でマーカーを 5 点作製する. 各マーカー溶液は密度測定後, 1 m l のエッペンチューブに保存する.

3. リズチーム結晶 (ρ_c) と母液 (ρ_s) の密度の測定

まず, 密度の大きい順にマーカー数 μ 1 を滴下して, その停止位置の目盛りを読み取り, 密度と目盛りの検量線を作成する. 次に結晶 1 個を実体顕微鏡を用いてループ等の器具により取り出し, 結晶が乾燥しないうちにすばやく滴下する. 結晶は素早く沈降し, 停止する. この時のシリンダーの目盛りを読み取り, マーカーのドロップで作成した検量線からそれらの密度を決定する. 同様の実験を結晶母液についても行い, 式 (1) (2) から非対称単位中の分子数を計算する. **実験に際してはシリンダーを倒さないよう十分注意すること.**

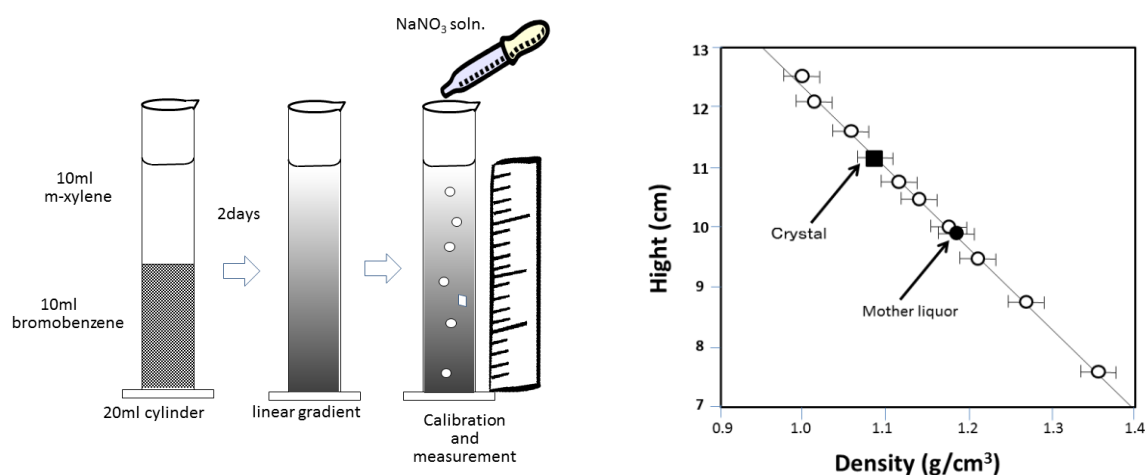


図3. 密度勾配の作製と検量線の例

【予備実験】 1 m l ピペットマンの検定

密度マーカー作製用 1 m l ピペットマンは精度の高いものを用いる必要がある. 一般に吸引ピペットはパッキン等の劣化により誤差を生じやすく, 目盛りで 1 m l に合わせても 1 m l である保証はない. また, 溶液の吸引や排出時に残留誤差も生じやすく, 操作に慣れる必要がある. ここでは 1 m l ピペットマンの検定法について述べる. 1 m g まで秤量できる天秤に 50 m l のビーカーを置き, 重量を 0 にセットし, 純水 1 m l をピペットにとり, ビーカーに注ぎ, 重量の増加を読み取る. 吸引と排出は少しゆっくりと一定の時間で行う. 重量を 0 にセットし, 同様の操作を 10 回繰り返す. 値の平均値と標準偏差を計算し, 日付と値を小さなラベルに書き込みピペットに貼り付けておく. 密度計算のためには決定したピペットの体積を用いる.

$$\text{平均値 } \bar{x} = (x_1+x_2+x_3...)/n$$

$$\text{標準偏差 } s = \sqrt{(x_1-\bar{x})+(x_2-\bar{x})+(x_3-\bar{x})...}/(n-1)}$$

【補足】溶媒の密度の測定はタンパク質，PEGを含まない母液を作成し，その重量を検定したピペットを用いて測定する．結晶によっては有機溶媒中で直ちに劣化し，今回用いた方法は適用できない．密度勾配の作製法としては水溶性多糖のフィコールを用いる方法もあるが，粘度が高く扱いにくい．結晶の密度測定が困難な場合，非対称単位中に1分子，2分子…存在すると仮定して(2)式から ϕ_p を計算して， ϕ_p が0.5に近い値を採用する場合が多い．

1.1.6 スクリーニングによるタンパク質の結晶化

【目的】構造未知のタンパク質を結晶化する場合，その結晶化の条件は全く不明であることが多い．このような場合の常套手段として市販スクリーニング試薬による結晶化が一般的に行われている．いかに少量のサンプルで迅速に結晶化するかが問題であり，その解決法としてナノリッターレベルのタンパク質溶液を用いてロボットによる結晶化も行われている．結晶化の方法としてはポリエチレングリコールや硫酸アンモニウムなどの沈殿化剤を用いて蒸気拡散法等でタンパク質の溶解度を穏やかに下げ，結晶化を促進するが，タンパク質濃度，沈殿化剤の濃度，温度，pH，バッファーの種類，共存する塩や金属イオン，核形成に重要な因子等の多くの条件が関与する．今回はスクリーニング試薬のキットを自作し，構造未知タンパク質の結晶化に挑戦する．

【試薬】表5に示す試薬を各25mlずつ作製する．pHが記されているものはまずそのpHのバッファーを調製してから他の試薬を加える．調製した試薬は50mlのポリ溶液に保存する．各班に1mlずつエッペンチューブに小分けして結晶化の実験に用いる．試薬の秤量においては，用いる天秤と風袋の選択に注意し，天秤の周りを汚さないよう十分気をつける．

表5. 結晶化試薬

まず化学式, 分子量, pKa を調べること

結晶化溶液の組成	沈殿化剤 元番号
A1. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Magnesium Chloride	PEG 6
A2. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate	PEG 9
A3. 30% PEG 8000, 0.2 M Ammonium sulfate	PEG 30
A4. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Acetate	PEG 10
A5. 30% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Sodium Citrate	PEG 13
B6. 30% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Ammonium Sulfate	PEG 28
B7. 30% PEG 4000, 0.2 M Ammonium Sulfate	PEG 31
B8. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Lithium Sulfate	PEG 17
B9. 30% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Sodium Acetate	PEG 15
B10. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Sodium Acetate	PEG 22
C11. 30% PEG 400, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride	PEG 23
C12. 30% PEG 1500	PEG 43
C13. 28% PEG 400, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Calcium Chloride	PEG 14
C14. 25% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Sulfate	PEG 20
C15. 20% PEG 8000, 0.05 M Potassium Phosphate	PEG 42
D16. 20% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Magnesium Acetate	PEG 18
D17. 18% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Calcium Acetate	PEG 46
D18. 15% PEG 8000, 0.5 M Lithium Sulfate	PEG/塩 50
D19. 8% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6	PEG 37
E20. 8% PEG 8000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5	PEG 36
E21. 2% PEG 400, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 2.0 M Ammonium Sulfate	PEG/塩 39
E22. 2% PEG 8000, 1.0 M Lithium Sulfate	PEG 49
E23. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.02 M Calcium Chloride	MPD 1
E24. 30% MPD, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Sodium Citrate	MPD 5
F25. 30% MPD, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Magnesium Acetate	MPD 21
F26. 30% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate	MPD 26
F27. 30% iso-Propanol, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Ammonium Acetate	アルコール 19
F28. 30% iso-Propanol, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride	アルコール 12
F29. 30% iso-Propanol, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Sodium Citrate	アルコール 8
G30. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Sodium Citrate	アルコール 27
G31. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Calcium Chloride	アルコール 24
G32. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 20% PEG 4000	アルコール/PEG 40
G33. 10% iso-Propanol, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 20% PEG 4000	アルコール/PEG 41
G34. 2.0 M Ammonium Sulfate	塩 32
H35. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5	塩 4
H36. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Sodium Acetate pH 4.6	塩 47
H37. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5	塩 48
H38. 0.4 M Ammonium Phosphate	塩 3
H39. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6	塩 11
I40. 1.5 M Lithium Sulfate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5	塩 16
I41. 1.4 M Sodium Acetate, 0.1 M Na PIPES pH 6.5	塩 7
I42. 1.0 M Sodium Acetate, 0.1 M Imidazole pH 6.5	塩 25
I43. 4.0 M Sodium Formate	塩 33
I44. 2.0 M Sodium Formate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6	塩 34
J45. 1.4 M Sodium Citrate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5	塩 38
J46. 1.6 M Na, K Phosphate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5	塩 35
J47. 0.4 M K, Na Tartrate	塩 2
J48. 0.8 M K, Na Tartrate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5	塩 29

表 6. 結晶化用タンパク質

A1. リゾチーム 50mg/ml in 50 mM NaAc pH4.5
B2. 卵白アルブミン OVA 40mg/ml
C3. 卵白アルブミン SOVA 40mg/ml
D4. リポキシゲナーゼ (LOX) 10mg/ml 20mMTris, 0.2MNaCl pH7.5
E5. ビリルビンオキシダーゼ (BOD) 30mg/ml in 50 mM SPB pH7.5
F6. トランスグルタミナーゼプロ型 (OD280nm=21)
G7. 未知タンパク質 AS (20mg/ml)
H8. オボトランスフェリンAポ型 (20mg/ml)
I9. オボトランスフェリンホロ型 (20mg/ml)
J10. ヒトトランスフェリンAポ型 (20mg/ml)
K11. ヒトトランスフェリンホロ型 (20mg/ml)

【器具】 ビーカー，メスシリンダー等のガラス容器，スターラー，pHメーター

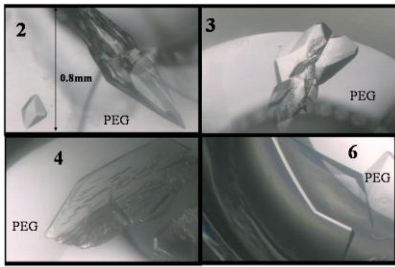
【実験】 1.1.1で行った蒸気拡散法によって未知試料の結晶化を行う。20℃で静置して1週間後に観察する。観察結果は評価シートに書き込む。一般的には4℃と20℃で行った方がよいが、4℃での結晶化は遅い。結晶化に要する時間も様々で3ヶ月程度は時々観察する必要がある。もし、結晶か微結晶が得られたら、その条件の近くでタンパク濃度、沈殿化剤濃度、pH等を変化させて2次スクリーニングを行う。2次スクリーニングを有効に行うには目的タンパク質の安定な条件をあらかじめ調べておくことが重要である。

【参考 結果 070514】

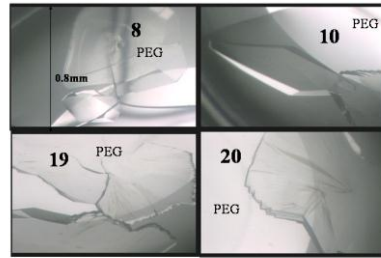
スクリーニングの結果

Reagent Content	1	7	8
A1. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.8, 0.2 M Magnesium Chloride			●
A2. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Cl pH 8.8, 0.2 M Ammonium Acetate	●		
A3. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Cl pH 8.8, 0.2 M Ammonium Acetate	●		
A4. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.8, 0.2 M Ammonium Acetate	●	●	
A5. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.8, 0.2 M Sodium Citrate			
B1. 30% PEG 8000, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Ammonium Sulfate	●	●	
B2. 30% PEG 4000, 0.2 M Ammonium Sulfate		●	
B3. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.8, 0.2 M Lithium Sulfate	●	●	
B4. 30% PEG 8000, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Sodium Acetate	●	●	
B5. 30% PEG 4000, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Sodium Acetate	●		
C1. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride			
C2. 30% PEG 8000, 0.2 M Ammonium Sulfate		●	●
C3. 30% PEG 1500			
C4. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Calcium Chloride			
C5. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.8, 0.2 M Ammonium Sulfate		●	
D1. 30% PEG 8000, 0.5 M Potassium Phosphate			
D2. 30% PEG 8000, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Magnesium Acetate	●		
D3. 30% PEG 8000, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Calcium Acetate	●	●	
D4. 30% PEG 8000, 0.5 M Lithium Sulfate		●	
E1. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.8			
E2. 30% PEG 8000, 0.1 M Tris HCl pH 8.8			
E3. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Ammonium Sulfate			
E4. 30% PEG 8000, 1.0 M Lithium Sulfate		●	
E5. 30% MPEO, 0.1 M Na Acetate pH 4.8, 0.2 M Calcium Chloride			●
F1. 30% MPEO, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Ethidium Chloride			
F2. 30% MPEO, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Magnesium Acetate			
F3. 30% MPEO, 0.1 M Na Cl pH 8.8, 0.2 M Ammonium Acetate			
F4. 30% MPEO, 0.1 M Tris HCl pH 8.8, 0.2 M Ammonium Acetate			●
F5. 30% MPEO, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride			
G1. 30% MPEO, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8, 0.2 M Ethidium Chloride			
G2. 30% MPEO, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Ethidium Chloride			
G3. 30% MPEO, 0.1 M Na Cl pH 8.8, 0.2 M Ethidium Chloride			
G4. 30% MPEO, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Ethidium Chloride			
G5. 2.0 M Ammonium Sulfate			
H1. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5			
H2. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Ethidium Acetate pH 4.6			
H3. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5			
H4. 0.4 M Ammonium Phosphate			
I1. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Cl pH 5.6		●	
J1. 1.5 M Lithium Sulfate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5			
J2. 1.4 M Ethidium Acetate, 0.1 M Na ₂ S ₂ O ₈ pH 8.8		●	
J3. 1.0 M Ethidium Acetate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5		●	
J4. 4.0 M Ethidium Formate			
J5. 2.0 M Ethidium Formate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6		●	
J6. 0.5 M Magnesium Chloride			
J7. 1.4 M Ethidium Chloride, 0.1 M Na Hepes pH 7.5			
J8. 1.6 M Na ₂ K ₂ P ₂ O ₇ , 0.1 M Na Hepes pH 7.5			
J9. 0.4 M K ₂ NaTartrate			
J10. 0.8 M K ₂ NaTartrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5		●	

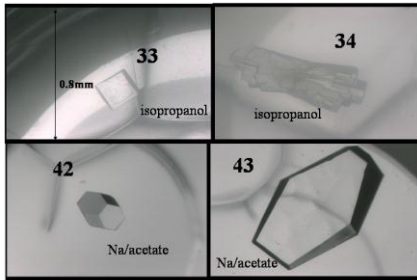
1. Lysozyme



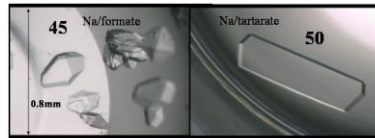
2. Lysozyme



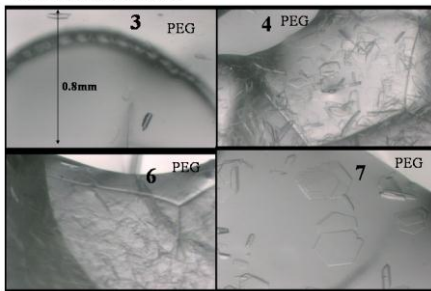
3. Lysozyme



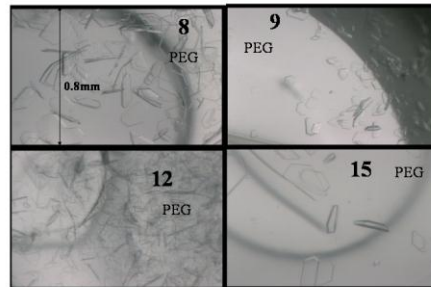
4. Lysozyme



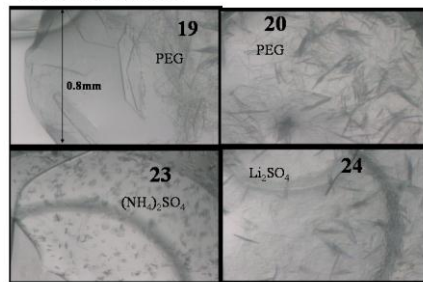
5. Protein glutaminase



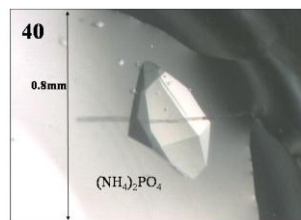
6. Protein glutaminase



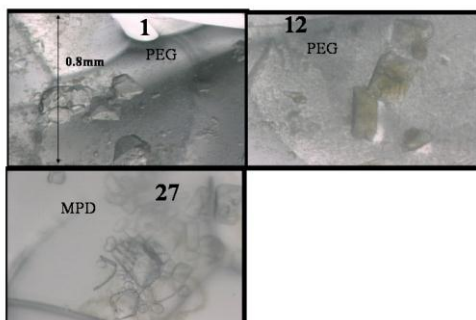
7. Protein glutaminase



8. Protein glutaminase



9. Transglutaminase (OD. 20)



1.1.7 構造の精密化とモデリング

【目的】 1.1.2 で正しい空間群 ($P4_32_12$) を用いて処理したリゾチームの F データと既にデータベースに登録されているリゾチームの構造を用いて、構造の精密化とモデリングの実習を行う。精密化とモデリングには種々のプログラムがあるが、今回は CCP4 と Coot を用いる。

【データ】 PDB (Protein Data Bank, <http://pdb.protein.osaka-u.ac.jp/pdb/>) に登録されているリゾチームの座標 (4LYM のタンパク質の部分のみ) および SAINT のデータを FOB 形式に変換したデータ (070418_lys.fob)。

【プログラム】 CCP4 はイギリスで開発されている (Collaborative Computational Project-Number 4) X線構造解析のプログラムパッケージであり、多くのプログラムを含み、初心者のためのメニュープログラム (CCP4i) を使用できる。使用にあたってはまず、プロジェクトと用いるデータベースの設定を行う必要がある。FOB 形式のデータの変換にはメニューの Program list から f2mtz を選択する。構造の精密化には refmac5 を使用するが、最初に rigid body refinement を行い、次に restrained refinement を行う。モデリング用の Coot は Paul Emsley によって比較的最近 (2004) 開発されたプログラムであり、分子のモデリングが短時間で行えるような機能が豊富である。FFT (First Fourier Transport) を内蔵しているため refmac の出力ファイル (PDB と mtz) から直ちに電子密度マップを描くことができる。

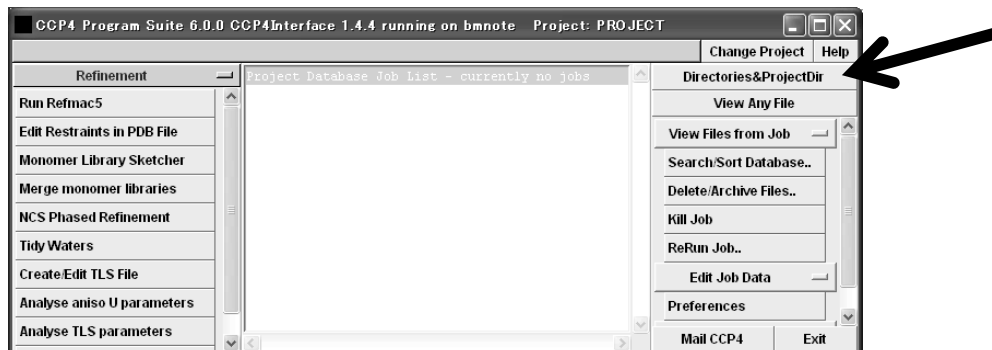
【コンピューター】 サテライトの端末を用いる。インストールの都合により CCP4 は LINUX 版を Coot は Windows xp 版を用いる。測定データと PDB の入った USB スティックメモリーを各班に 1 個ずつ配るので各人、自分のホームに作業フォルダーを作りそこへコピーすること。

【PDB ファイル】 PDB ファイルの中にはそのタンパク質分子の情報、構造解析の方法や結果および決定された原子座標が書き込まれている。Refinement にはその中の座標データのみを使用する。4LYM の座標部分は次のようになっている。

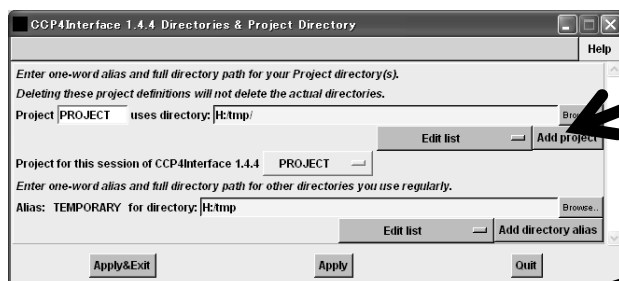
CRYST1	78.400	78.400	37.600	90.00	90.00	90.00	P 43 21 2	8	(結晶情報)
ATOM	1	N	LYS	1	2.761	9.528	10.118	1.00	11.84
ATOM	2	CA	LYS	1	1.871	10.148	9.078	1.00	7.53
ATOM	3	C	LYS	1	1.885	11.657	9.008	1.00	7.41
	(原子番号	原子名	残基名	残基番号	X	Y	Z	(Å)	占有率 温度因子 (Å ²)
.....									

【ccp4 の操作】

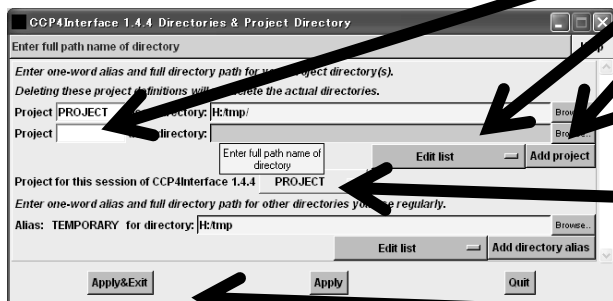
1. LINUX の terminal から ccp4i でメニューを出す.



2. Directory&ProjectDir をクリック.



① Add で行を追加



② Project 名を入力
Browse でフォルダーを指定
(ファイルではない)

③ Project を今入れた
Project 名に変更

④ Apply&Exit は最後に押す

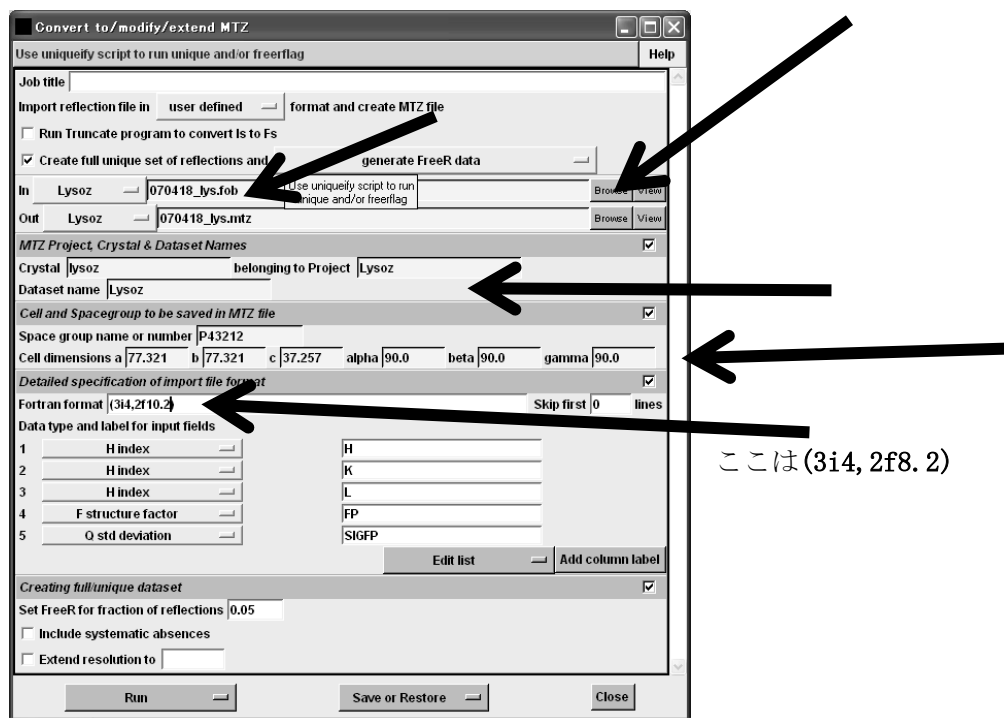
3. Add project をクリックした後, Project 名と作業 directory を browse より書き込み Apply&Exit.

【データの変換 (FOB→MTZ)】 CCP4 ではデータの形式は MTZ 形式というバイナリーファイルを用いている. SAINT の出力を変換した FOB ファイルの中身は次のようになっている.

(h	k	l	Fob	Fsigma)
0	0	2	13.10	3.32
0	0	3	11.25	5.20
0	0	4	627.88	1.77
0	0	8	830.60	1.98

データの変換 (import) は以下のように行う.

メニューの ProgramList から f2mtz を選択. MTZ になっている上部のボタンを user define に切り替え, 追加されたメニューを表示させる. In と out のボタンのプロジェクトを Lysoz などに切り替え browse からファイルを入力. (in の場合, *.hkl をただの*にかえてファイルを表示し, 070418_lys.fob を指定) このとき Out は 070418_lys.mtz となる.



Cryst, belong to Project, Dataset name には Lysoz と入力.

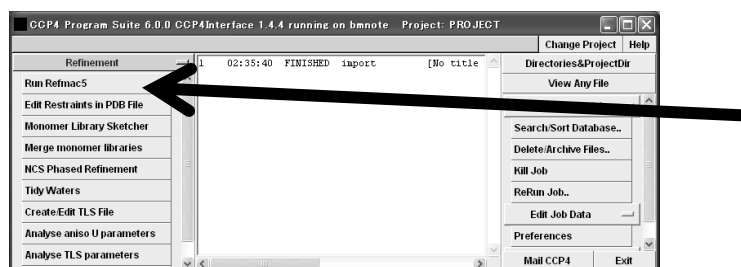
Space group name に P43212, 格子定数 (a, b=77.321, c=37.257 を入力) .

Fortran format のところに (3i4, 2f8. 2) と入力

Run (Run now)

メインメニューの右, View Files from Job から View Log file をチェック.

【refmac5による rigid body refinement】 今回測定した結晶データはデータベースに登録されているリゾチームと同じ空間群に属し, 格子定数もほぼ等しいが, 全く同一ではない. モデル分子の結晶中での回転および並進を低分解能 (4 Åまで) のデータを用いて動かし, データに最も一致させる手法が rigid body refinement である. 実際の操作は以下のように行う. メインメニュー左 Refinement の中から RunRefmac5 を選択.



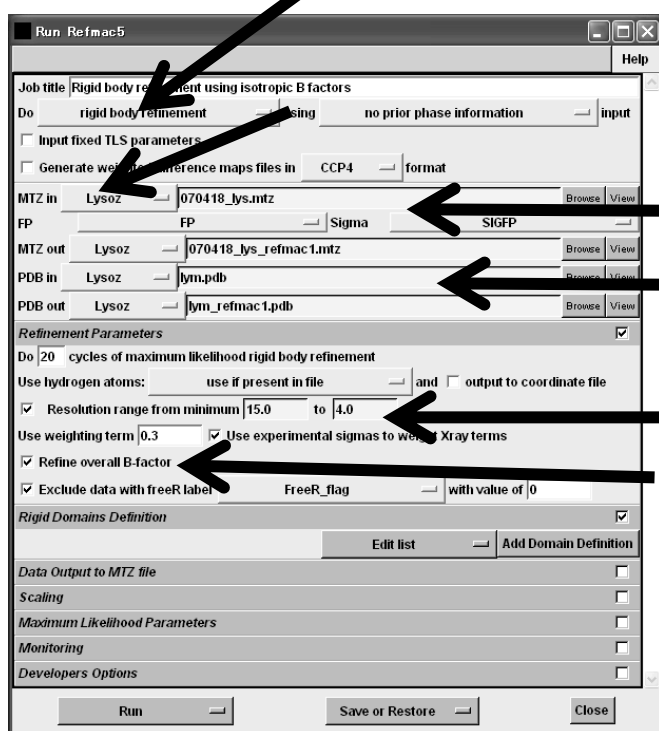
Do の右の restrained refinement を rigid body refinement に切り替える。

MTZ in, out, PDB in, out の Project を Lysoz に切り替える。

Brows から mtz (070418_lys.mtz) と PDB (lym.pdb) を入力 (output は自動的に命名される)。

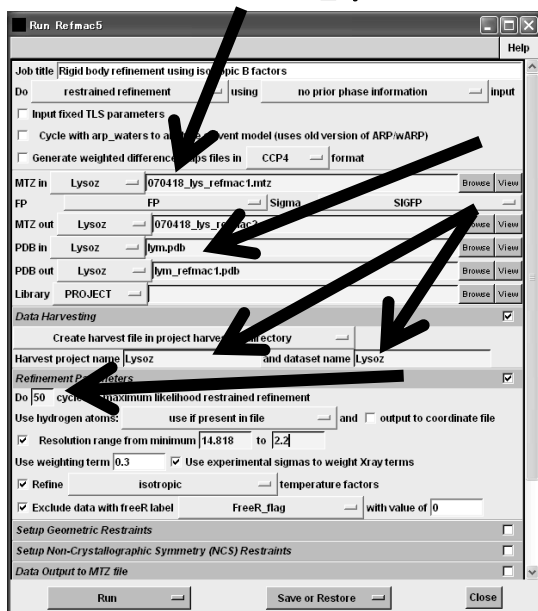
Resolution range を 15 to 4.0 に変更

Run (Run now)



メインメニューの右, View Files from Job から View Log file を見て計算に使われた分解能, データの個数等を確認する. R factor および Free R factor が 30%以下に下がっていたら OK.

【refmac5による restrained refinement】 モデル分子のすべての原子座標と温度因子を動かしてデータに合わせる (R 値を下げる) のが一般的な refinement である. 通常の分解能の範囲ではこの時にジオメトリの辞書を用いる. 使用しているリゾチームの座標には水分子は含まれていないので, 15 から 2.2 Å までのデータを用いて refinement する.



Refmac5 のメニューにもどり Do の右の rigid body refinement を restrained refinement に切り替える. MTZ in にもとのデータ (070418_lys.mtz) を入力, PDB に lym_refmac1.pdb を入力. Refinement

0

Parameters のところで, cycle 数を 50 にセット, resolution を 15 to 2.2 にセットして Run (Run now)

メインメニューの右, View Files from Job から View Log file を見て計算に使われた分解能, データの個数等を確認する.

R factor および Free R factor が 25%, 30%程度まで下がっていたら OK.

Refinement によって PDB ファイルの各原子の座標と温度因子は書き換えられる. データファイルのデータ (F と σ) は元のままであるが, モデルから計算された各回折点の位相角 (ϕ) の値が書き込まれている.

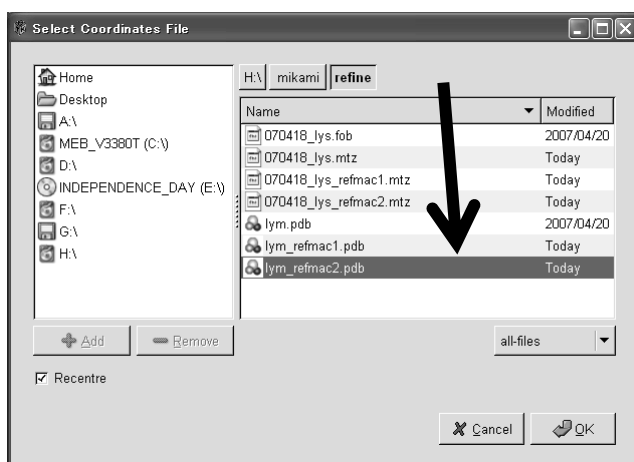
【R と Free R】 結晶からの散乱因子である F の値はモデル分子を結晶中に置くことができれば, そこから原子散乱因子の足し合わせとして計算できる (F_{calc}). そこで, F_{calc} と測定した F の値 (F_{obs}) を比較することでモデルとデータの一一致を調べることができる.

$$R = \frac{\sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

しかし, この計算に用いる F_{obs} は refinement にも用いられるため, R は実際よりも小さく見積もられてしまう. そこで F_{obs} の一部 (5%~10%をランダムに選ぶ) を別にしておいて, そのデータは refinement に用いずに R の計算だけに用いればより客観的な R が計算できることになり, それを **Free R** という.

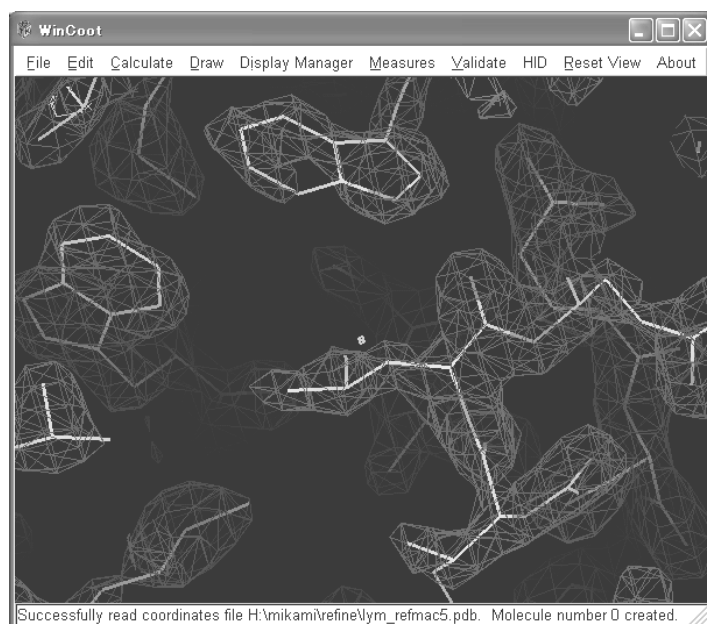
【Coot の操作】

1. Windows のスタートメニューから WinCoot を実行する.
2. グラフィック window 左のファイルから Open coordinate でフォルダーとファイルを指定, lym_refmac2.pdb を指定



3. 座標が画面に現れたら, もう一度メニューの File から Auto Open MTZ を押して

同様に 070418_lys_refmac2.mtz を指定する. OK を押してマップが現れる.



Coot の使用方法については別に配布するマニュアルおよび本テキスト後半を参照する.

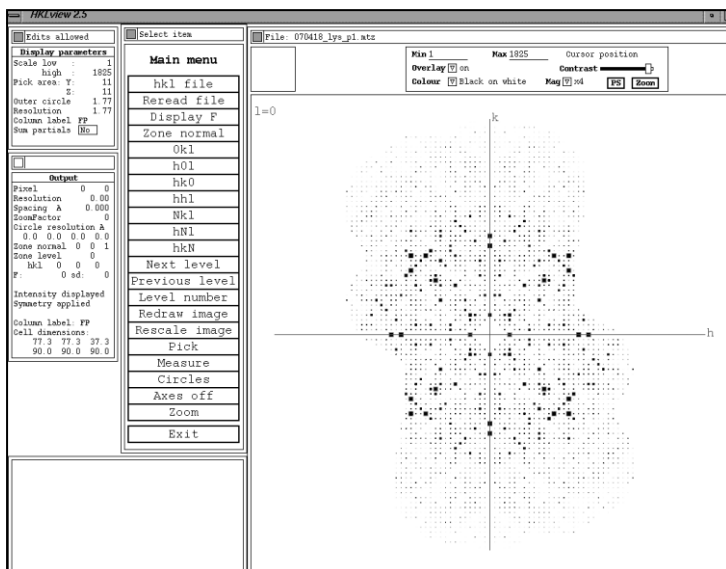
【マップの種類について】 電子密度マップを描くには各回折点の F と位相角の値が必要であり, 位相角はモデルの原子座標から計算される. 従って, 計算されるマップには必ずモデルバイアスが生じることになる. そこで複数の種類のマップを計算, 表示してモデルの修正をやりやすくする. $2|f_o|-|f_c|$ マップ ($2|f_o|-|f_c|$ を係数とするフーリエ合成) はモデルとデータにあるものが表示され, 一般的なマップとして用いられる. Coot では青く表示されている. マップの強度は1シグマ程度で表示するのが適当. $|f_o|-|f_c|$ マップ ($|f_o|-|f_c|$ を係数とするフーリエ合成) はデータとモデルの差のみが現れるマップで正と負のピークを示す. Coot では正が緑で負が赤く表示されている. マップの強度は±3シグマ程度で表示するのが適当. 例えばモデルに無い水分子はタンパク質の主鎖および側鎖の近く (水素結合の距離) で緑色の球として表示される.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |2F_o - F_c| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha'_{\text{calc}})} \quad 2|f_o|-|f_c| \text{マップ}$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_o - F_c| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha'_{\text{calc}})} \quad |f_o|-|f_c| \text{マップ}$$

【CCP4 による逆格子平面の表示】 CCP4 の hklview を用いて逆格子イメージを表示して対称性と消滅則を調べる. 空間群が P1 であるとして処理したデータ (070418_lys_p1.fob) を f2mtz で 070418_lys_p1.mtz に変換する. hklview は CCP4i のメニューに無いので terminal から hklview と打ち込んで立ち上げる. メニューから 070418_lys_p1.mtz を読

み込んで逆格子平面 (h, k, 0 等) を表示する. p 7-8 に記述した対称性と消滅則が現れ

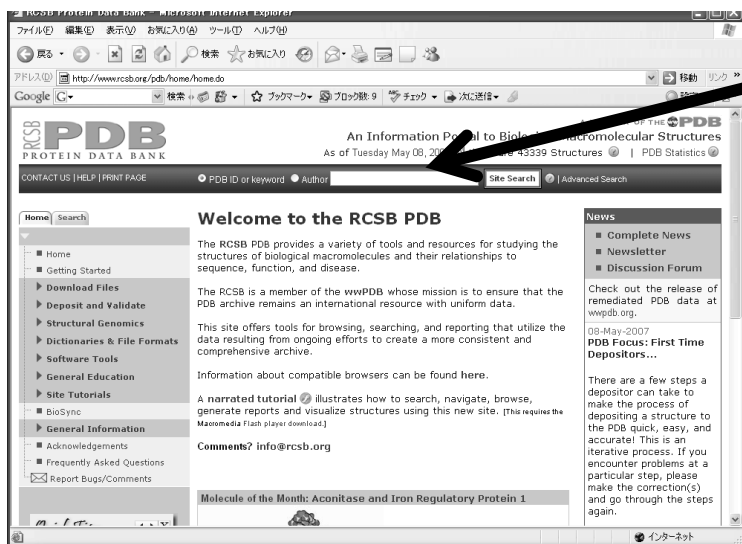


ていることを確認する.

データの読み込み, 表示はメニューの hkl file および Ok1, h01, hk0 などによって行う. 回折点の指数と強度は左下の output パネルに表示される.

【PDB データベースの使い方

と座標の表示】構造解析されたタンパク質 (X 線, NMR, 電子顕微鏡) の座標や回折データは PDB (RCSB Protein Data Bank) [http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do] に登録されている. これらのデータは web 上で表示でき, 自由に download できるようになっている. PDB に登録されているデータを検索し, 座標データを download して, 自分の端末上のソフトウェア (PyMOL) で表示する.



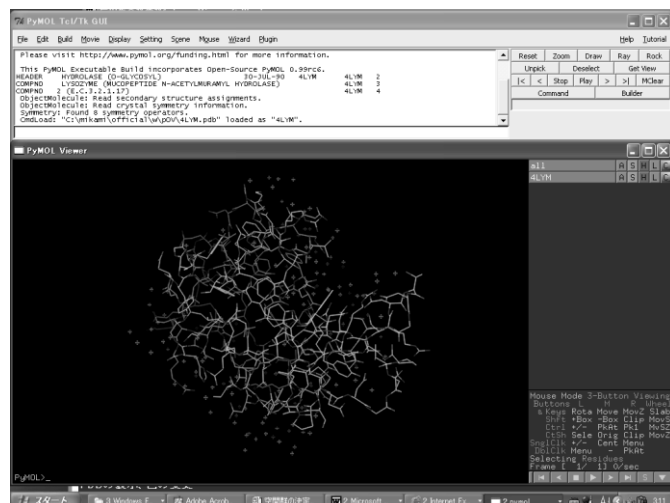
PDB に接続したら上部にデータ検索バーが出ているので ID が分かっている場合には ID を直接入力し, 分からない場合はキーワードを入力して目的タンパク質を検索する. 例えば lysozyme と入力すると 1022 個のデータの要約が, lysozyme egg と入力すると 359 個のデータの要約が表示される. この中から更に詳しい 2 次検索を行うには左のメニューの Modify/Refine this search から条件を入力する. ID が 4LYM と分かっている時は, そ

のまま 4LYM を入力する。4LYM の登録タイトルから始まって種々の情報と右側に分子



モデルが表示される。分子モデルの下の DISPLAY OPTION にある Viewer 端末にインストールされていれば、動かせるモデルを viewer から立ち上げることができる。分子の情報の主なものは発表された論文、構造解析の方法、結晶構造解析の分解能、R 値、結晶の空間群、格子定数、タンパク質の分類データベース (SCOP, CATH, PFAM) 上での分類等である。これらの情報は座標データ (PDB file) にヘッダーとして書き込まれている。PDB file を Down load するには左メニューの Down load file の▼をクリックしてサブメニューを表示し、PDB file を選択して、端末内の適当なフォルダーに保存する。

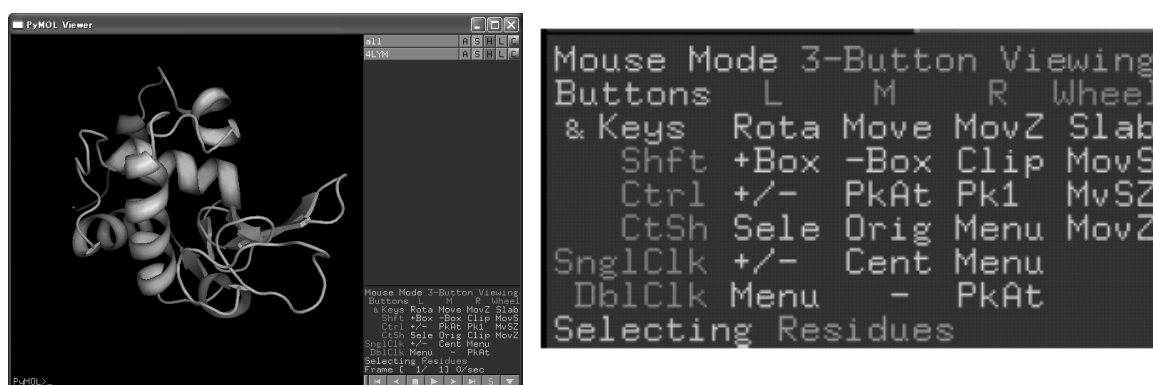
【PyMOL による座標の表示】 PyMOL (ピーモルまたはパイモル) はオープンソースの分子グラフィックスツールである。ウォーレン・デラノにより開発され、個人経営のソフトウェア会社であるデラノ・サイエンティフィック (DeLano Scientific LLC) によって営利化された。コンパイルされた旧バージョンは無償である。特徴として (1) RasMol 等と比較して非常に美しいグラフィック表示、(2) Raster3D 形式のファイルを読み込むことができる、(3) 電子密度図 (ccp4 形式) を表示することができる、(4) 振動や、



回転などの表示が可能。といった点が挙げられる。現在、構造生物学の論文でタンパク質の図を描くソフトのスタンダードとなっている。端末から PyMOL を立ち上げて File から 4LYM.pdb を読み込むか、4LYM.pdb を右クリックし、ソフトを指定して PyMOL を立ち上げる。

上部に Tcl/Tk GUI と下部に viewer の二つの window が開き、4LYM が表示される。PDB の表示は、右の方にある A(Action), S(Show), H(Hide), L(Label), C(Color) と書いたバーで簡単に変更できる。バーの (all) は複数の分子を表示した時にすべて操作するとき用い、4LYM の部分はその分子のみの操作となる。もし、Cartoon 表示がしたいのなら、Show ボタン (S と書かれたボタン) を押して Cartoon を選ぶ。消したい表示があれば、Hide ボタン (H と書かれたボタン) で選択すれば画面上から消える。同様に色についても種々の変更ができる。二次構造で色分けするには C の中の by SS から選ぶ。

マウス操作による分子の移動、拡大等の操作は右下に表示されている。例えば真ん中ボ



タン (ホイールボタン) を押しながらマウスを動かせば上下左右に分子を動かすことができる。特定残基の選択法としてはマウスからと配列からの両方が可能である。マウスの場合は左シングルクリックで選択できる。このとき、GUI のメニューの Display から Sequence を指定すると viewer 上部に配列が表示され、指定された残基が濃く区別されている。逆に配列上の残基を左クリックすると分子上に指定マークが入る。L (Label) で residue とすると指定された残基がラベルされる。もっと複雑な指定は GUI パネルにコマンドを打ち込んで指定する。(select 93C, 93/) 指定された残基や領域は新しいパネルバーとして表示されているので、ここから種々の表示を行うことが可能である。

PyMOL は非常に多くの機能を持っているので、各自試すこと。距離を測定したり、電子密度マップを表示したり、分子が回転している動画等が簡単にできる。分からないことはマニュアルやネット上の情報を参考にする。

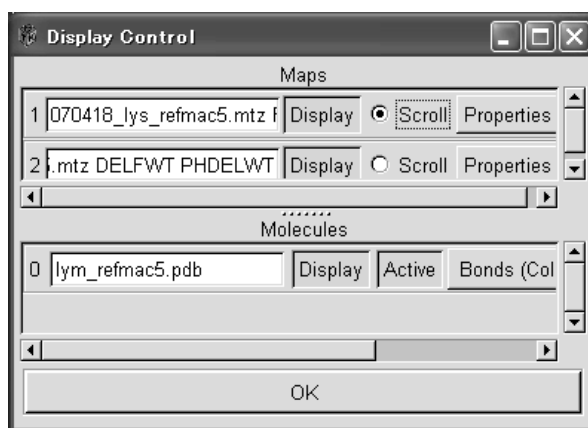
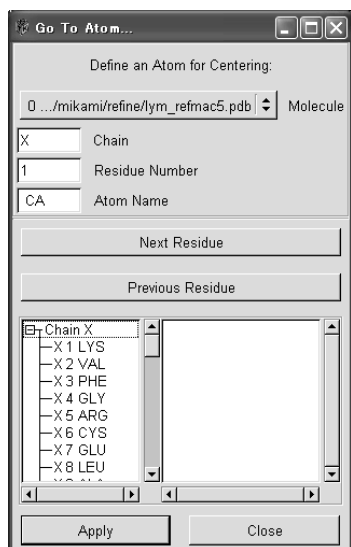
【Coot の使い方とモデルの修正】

Coot でモデルとマップが表示できたら、まず基本的な操作に慣れる。基本的にはメニューから作業を選び、残基等を指定する。マウスの操作は次のようになっている。

左クリックしながら	————	分子の回転
中クリック	————	中心の移動
右クリックしながら	————	分子の拡大縮小
Ctrl 押しながら左	————	分子の並進
Ctrl 押しながら右	————	分子の奥行き変更
スペースキー	————	次の残基が中心になる
Shift+スペース	————	ひとつ前の残基が中心になる

・**メインメニュー**は window の上部にある文字を左クリックしながら押すことによってサブメニューが表示される。メインメニューには File (各種ファイル操作), Edit (色や各パラメーターの変更), Calculate (モデリング操作, 分子の重ねあわせ, 番号や chain の付け替え, ループのフィッティング, NCS マップ操作など), Draw (表示位置の移動, 各種描画, ラベルの表示, シンメトリー分子の表示, ステレオ表示等), Display Manager (各分子やマップの表示/非表示), Measures (結合長, 結合角度等の表示), Validate (モデルの評価: ラマチャンドラランプロット, 差マップピーク, 水分子の管理, 各種モデル解析等), HID (スクロールボタン, トラックボールの設定), Reset View, About がある。Coot は PyMOL とは異なりタンパク質のモデリング専用のソフトであり, 美しい図を作るためのソフトではないが, 各種モデリング操作のための豊富な機能を持っている。まず基本的な機能を用いて Coot によるモデリングに慣れ, 順次自分にとって使える機能を増やしていくのがよい。[無理に使い方を覚えてもすぐに忘れてしまうので, 意識せずにメニューからなんとなく使えるようにしておく]

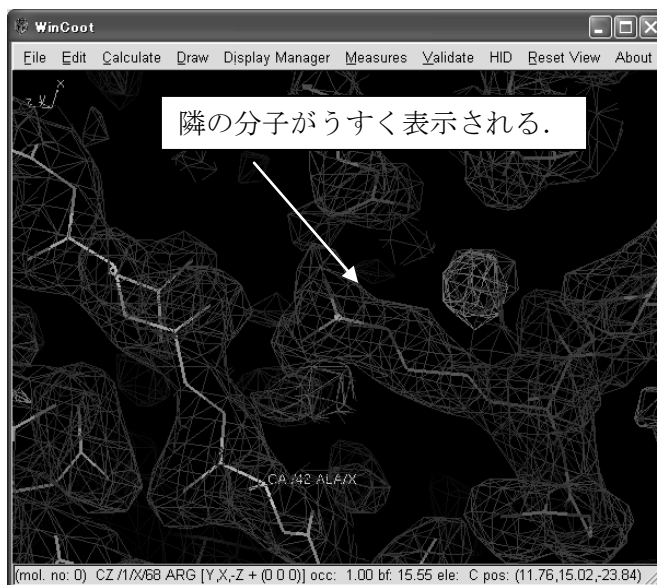
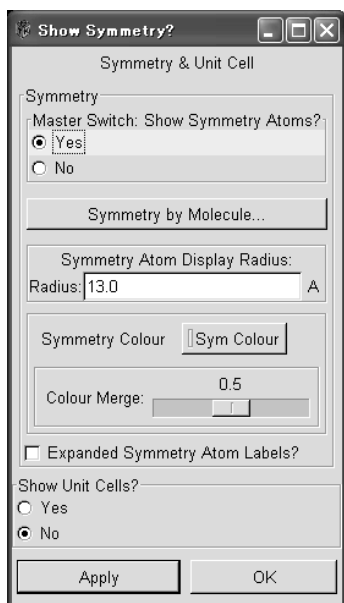
・メニューの Draw から Go to Atom を選び Go to Atom window に配列を表示させ, 中心に表示する残基を指定する。Apply を押すとその CA ($C\alpha$) が中心に来る (下左)。



・電子密度マップの濃さの調整は メニュー > Display Manager から Display Control window を表示させ (上右) 調整したいマップの Scroll に●を入れてマップを見ながらマ

ウスのスクロールボタンで調製する。 $2|f_o| - |f_c|$ マップ (青) は 1σ くらい。 $|f_o| - |f_c|$ マップ (緑と赤) は $\pm 3\sigma$ くらいが適当。普通の静止画像では立体感が得られにくいので、左マウスでモデルを回転させ、立体感を得ながら問題の残基や電子密度を探す。

・**シンメトリー分子の表示** 分子境界付近では隣の分子 (シンメトリー分子) の電子密度が見えているはずである。シンメトリー分子を表示するには Draw > Cell&Symmetry から Show symmetry atoms を Yes にして下ボタンの Apply を押す(下左右)。



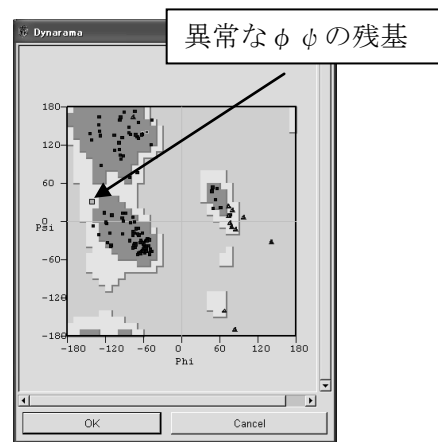
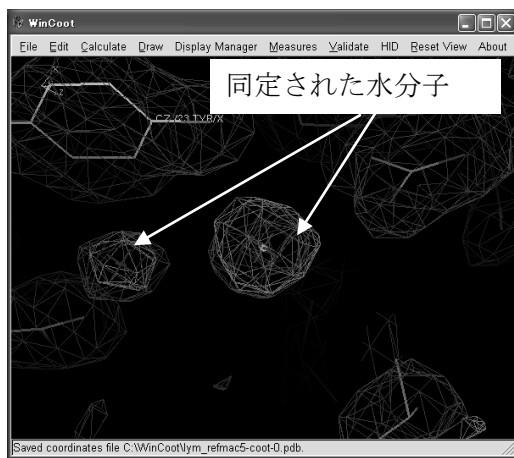
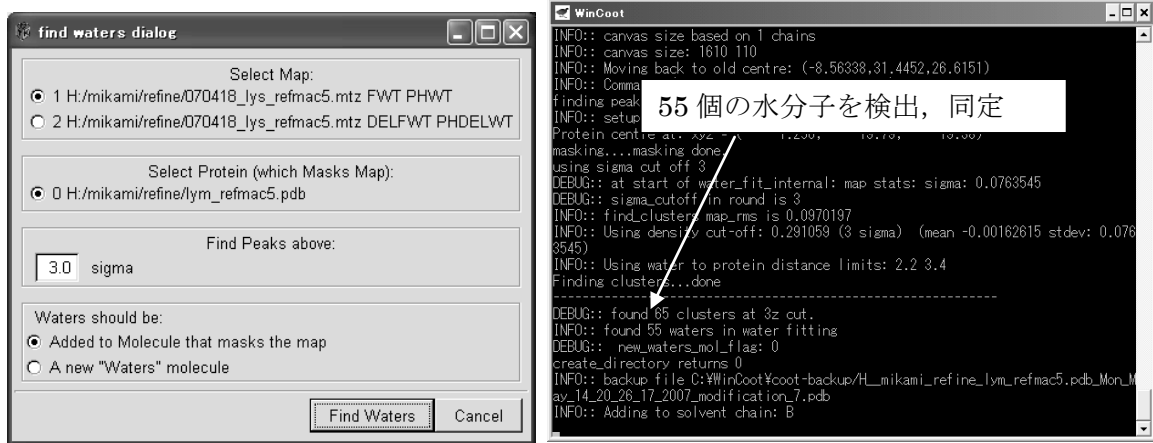
・**距離や角度の表示** Measures > Geometry で Geometry の window が表示される。例えば距離を測定する場合、Distance ボタンを押してから左クリックで2つの原子を指定する。

・**アミノ酸残基の電子密度マップへのフィティングの方法はいくつかの方法がある。**

メニューの Calculate から Model/Fit/Refine のサブメニューを表示させ、方法を選択する。よく用いるのが Real Space Refine Zone (部分の電子密度へのフィティング), Regularize zone (部分のモデル適正化), Auto fit Rotamer (側鎖の Rotamer のフィティング), Flip Peptide (主鎖の O 原子の逆転), Edit Chi angle (側鎖の個々の torsion angle (Chi angle) の調節), Mutate & Auto fit (残基の交換とフィティング), Find Waters (水分子の自動フィティング) などである。だいたいメニューを選び、カーソルが十字に変わったら範囲、あるいは側鎖 (原子) を指定する。最後に結果を許容するかどうか聞いてくるので許容する場合は accept を押す。もし、決定した後でひとつ前に戻りたければメニューの下の方にある

Undo を押す.

・**水分子の追加** Model/Fit/Refine のサブメニューから Find water を選択する. Find water dialog が現れるので水分子を探すマップ (普通は|fo|-|fc|マップ, 2の DELFWT PHDELWT の方のマップ) で 3 sigma を選択する. Find water ボタンを実行すると WinCoot のテキスト画面の方に結果が表示され, グラフィック画面には挿入された水分子が×として表示される. 水分子は普通, 主鎖および側鎖の O, N 原子と水素結合がとれる距離にあるはずである. (だいたい 2.6~3.2 Å)



この時, 水分子の酸素原子の座標が与えられ, もとのタンパク部分 (x) とは異なる chain 番号 (B) で残基名 HOH で記録されている.

ATOM	1000	O	LEU	X	129	-18.280	18.987	8.382	1.00	35.49	0
ATOM	1001	OXT	LEU	X	129	-18.945	20.846	7.440	1.00	35.51	0
ATOM	1002	O	HOH	B	1	-11.595	28.728	12.515	1.00	20.00	0
ATOM	1003	O	HOH	B	2	7.323	30.127	17.298	1.00	20.00	0
ATOM	1004	O	HOH	B	3	-7.530	10.137	13.870	1.00	20.00	0

・**Validate による修正すべき部位の検討** Validate メニューからラマチャンドラプロットを表示させ, 明らかにエネルギーの高いところに存在する点をクリックするとグラフィック画面ではその残基を中心に表示される. もし, その残基のモデルが電子密度か

らずれていれば修正する必要がある。修正した後のラマチャンドラプロットを確認する。(側鎖の位置がズレていて結果として主鎖の位置もズレていることがある) 同様に Geometry analysis で表示される棒グラフでエネルギーの高いところがあれば、そのモデルがおかしい可能性が高い。また、B Factor Variance Graph で示される温度因子/残基番号のプロットで温度因子の高いところは電子密度が薄くなって(場合によっては見えない)いてモデルもマップからズレていることがある。これらのグラフをクリックすることで、グラフィック画面ではその残基を中心に表示される。マップとの一致は Density fit analysis で表示することができる。

・修正したモデルの保存 メインメニューの File から Save Coordinate を選択し、保存すべきもとの座標ファイル名を Select File name で指定(ファイルが複数あることが普通なので)、次のウィンドウで保存先フォルダーとファイル名を指定して保存する。

Coot の欠点として使用中の何らかのトラブルによりプログラムが落ちることが多い。

Coot 自身 coot-backup フォルダに自動 backup を行っているの、再立ち上げ後、backup を開くことで、ある程度復活できることが多いが、念のため時々 backup ファイルを保存することが必要である。

[以上]

2008年 5月 15日 (2008年5月12日作製) 氏名 _____

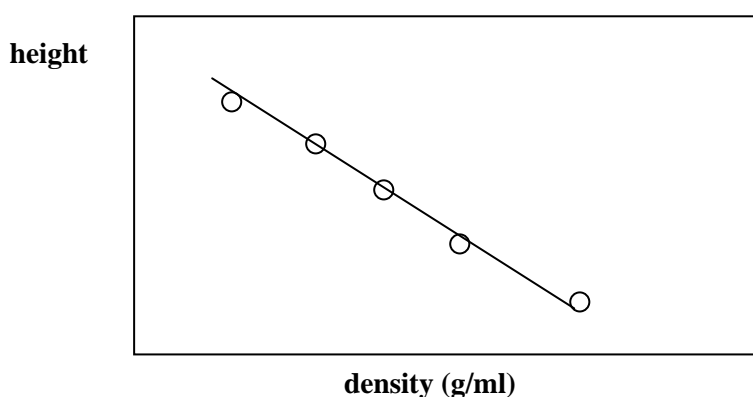
結晶観察シート 結晶, ◎ 微結晶, ○ 沈殿 △

Reagent Content	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1. 30% PEG 4000. 0.1 M Tris HCl pH 8.5. 0.2 M Magnesium Chloride										
A2. 30% PEG 4000. 0.1 M Na Citrate pH 5.6. 0.2 M Ammonium Acetate										
A3. 30% PEG 8000. 0.2 M Ammonium sulfate										
A4. 30% PEG 4000. 0.1 M Na Acetate pH 4.6. 0.2 M Ammonium Acetate										
A5. 30% PEG 400. 0.1 M Tris HCl pH 8.5. 0.2 M Sodium Citrate										
B6. 30% PEG 8000. 0.1 M Na PIPES pH 6.5. 0.2 M Ammonium Sulfate										
B7. 30% PEG 4000. 0.2 M Ammonium Sulfate										
B8. 30% PEG 4000. 0.1 M Tris HCl pH 8.5. 0.2 M Lithium Sulfate										
B9. 30% PEG 8000. 0.1 M Na PIPES pH 6.5. 0.2 M Sodium Acetate										
B10. 30% PEG 4000. 0.1 M Tris HCl pH 8.5. 0.2 M Sodium Acetate										
C11. 30% PEG 400. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 0.2 M Magnesium Chloride										
C12. 30% PEG 1500										
C13. 28% PEG 400. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 0.2 M Calcium Chloride										
C14. 25% PEG 4000. 0.1 M Na Acetate pH 4.6. 0.2 M Ammonium Sulfate										
C15. 20% PEG 8000. 0.05 M Potassium Phosphate										
D16. 20% PEG 8000. 0.1 M Na PIPES pH 6.5. 0.2 M Magnesium Acetate										
D17. 18% PEG 8000. 0.1 M Na PIPES pH 6.5. 0.2 M Calcium Acetate										
D18. 15% PEG 8000. 0.5 M Lithium Sulfate										
D19. 8% PEG 4000. 0.1 M Na Acetate pH 4.6										
E20. 8% PEG 8000. 0.1 M Tris HCl pH 8.5										
E21. 2% PEG 400. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 2.0 M Ammonium Sulfate										
E22. 2% PEG 8000. 1.0 M Lithium Sulfate										
E23. 30% MPD. 0.1 M Na Acetate pH 4.6. 0.02 M Calcium Chloride										
E24. 30% MPD. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 0.2 M Sodium Citrate										
E25. 30% MPD. 0.1 M Na PIPES pH 6.5. 0.2 M Magnesium Acetate										
F26. 30% MPD. 0.1 M Na Citrate pH 5.6. 0.2 M Ammonium Acetate										
F27. 30% iso-Propanol. 0.1 M Tris HCl pH 8.5. 0.2 M Ammonium Acetate										
F28. 30% iso-Propanol. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 0.2 M Magnesium										
F29. 30% iso-Propanol. 0.1 M Na PIPES pH 6.5. 0.2 M Sodium Citrate										
G30. 20% iso-Propanol. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 0.2 M Sodium Citrate										
G31. 20% iso-Propanol. 0.1 M Na Acetate pH 4.6. 0.2 M Calcium										
G32. 20% iso-Propanol. 0.1 M Na Citrate pH 5.6. 20% PEG 4000										
G33. 10% iso-Propanol. 0.1 M Na HEPES pH 7.5. 20% PEG 4000										
G34. 2.0 M Ammonium Sulfate										
H35. 2.0 M Ammonium Sulfate. 0.1 M Tris HCl pH 8.5										
H36. 2.0 M Ammonium Sulfate. 0.1 M Sodium Acetate pH 4.6										
H37. 2.0 M Ammonium Phosphate. 0.1 M Tris HCl pH 8.5										
H38. 0.4 M Ammonium Phosphate										
H39. 1.0 M Ammonium Phosphate. 0.1 M Na Citrate pH 5.6										
I40. 1.5 M Lithium Sulfate. 0.1 M Na HEPES pH 7.5										
I41. 1.4 M Sodium Acetate. 0.1 M Na PIPES pH 6.5										
I42. 1.0 M Sodium Acetate. 0.1 M Imidazole pH 6.5										
I43. 4.0 M Sodium Formate										
I44. 2.0 M Sodium Formate. 0.1 M Na Acetate pH 4.6										
J45. 1.4 M Sodium Citrate. 0.1 M Na HEPES pH 7.5										
J46. 1.6 M Na ₂ K Phosphate. 0.1 M Na HEPES pH 7.5										
J47. 0.4 M K ₂ Na Tartrate										
J48. 0.8 M K ₂ Na Tartrate. 0.1 M Na HEPES pH 7.5										
J48. 0.4 M K ₂ Na Tartrate										

リゾチーム結晶の密度の測定のまとめ

番号	NaNO ₃ 濃度 (M)	重量 (g)	ピペット体積 (ml)	密度 (g/ml)	シリンダーの目盛	(界面からの目盛)
1						
2						
3						
4						
5						
結晶 1						
結晶 2						
母液 1						
母液 2						

密度の検量線



偏比容の推定		M_i	\bar{v}_a
アミノ酸残基	残基量		偏比容(ml/g)
Ala	12	71.1	0.74
Arg	11	157.2	0.70
Asn	13	114.1	0.62
Asp	7	114.1	0.60
Cys	8	103.1	0.63
Gln	3	128.1	0.67
Glu	2	128.1	0.66
Gly	12	57.1	0.64
His	1	137.1	0.67
Ile	6	113.2	0.90
Leu	8	113.2	0.90
Lys	6	128.1	0.82
Met	2	131.2	0.75
Phe	3	147.2	0.77
Pro	2	97.1	0.76
Ser	10	87.1	0.63
Thr	7	101.1	0.70
Trp	6	186.2	0.74
Tyr	3	153.2	0.71
Val	5	99.1	0.86

分子量 14400

左の表を用いて

$$\bar{v}_p = \frac{\sum N_i M_i \bar{v}_a}{\sum N_i M_i}$$

から計算する.

1. 体積分率を計算する.

$$\phi_p = (\rho_c - \rho_s) / (1/\bar{v}_p - \rho_s)$$

2. リゾチームの分子量と単位格子の体積から n (単位格子中の分子数) の値を計算する.

$$\phi_p = n \bar{v}_p M / NV$$

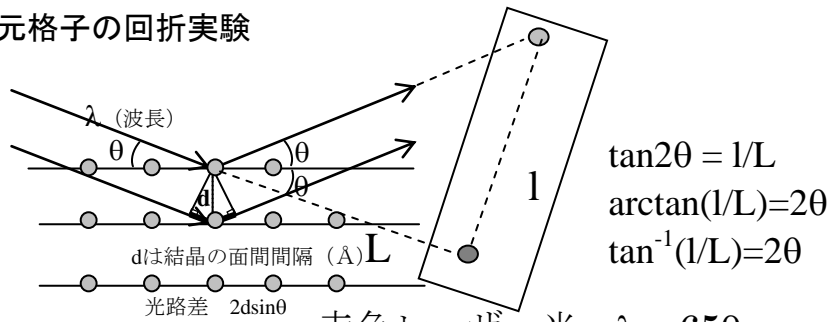
3. リゾチームの結晶 (P4₃2₁2) では1つの単位格子中に非対称単位が8個ある.非対称単位中の分子数を求める.

$$m = n/8$$

1.1.2 リゾチーム結晶の回折データの収集

格子定数						体積 (Å ³)	分解能 (Å)
a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)		

1.1.4 光による2次元格子の回折実験



回折条件 $2d \sin \theta = \lambda$ (1)

赤色レーザー光 $\lambda = 650 \text{ nm}$
 緑色レーザー光 $\lambda = 532 \text{ nm}$

回折格子1 メガネ状 線模様

L(cm)	l(cm)	θ (°)	d (μm)
平均値			
顕微鏡からの値			

回折格子2 格子状

L(cm)	l(cm)	θ (°)	d (μm)
緑			
緑			
平均値			

1. 構造を見たいタンパク質を PDB で検索し，端末に download して，PyMOL で表示する.
 - a. 見たいタンパク質の名前 ()
 - b. PDB での登録名 ()
 - c. SCOP データベースでの分類 ()
 - d. アミノ酸残基数 ()
 - e. 水分子の数 ()
 - f. リガンドの有無 ()
 - g. 結晶の格子定数と空間群の記号 (a= , b= , c= , α = , β = , γ =)
()
 - h. 分解能 (Å)
 - i. PyMOL で Cartoon 表示を二次構造で色分けした時の二次構造の特徴

- k. このタンパク質の構造と機能との関連について
(できれば関連の PDB を検索して表示してみる)

2. リゾチームの精密化と Coot によるモデルとマップの表示
 データは各班で USB メモリーから各自の M ドライブ(マイドキュメント) にコピーする。
 [lym.pdb (タンパク部分のみ), 070418_lys.fob (1.8 Å までのデータ)]
 格子定数, 空間群は lym.pdb の先頭行に書き込まれている。
 [CRYST1 77.321, 77.321, 37.257 90.00 90.00 90.00 P 43 21 2 8]
- a. WindowsからLinuxを立ち上げてccp4iを実行。
 TEXTを参考にして, まずDirectory&ProjectDirを設定 [Project名:]
- b. メニューのProgram Listからf2mtzを設定, 実行。
 [変換されたデータの数 (View files from jobから調べる):]
- c. refmac5によるrigid body refinementの設定, 実行
 [用いたデータの分解能: から Å]
 [用いたサイクル数:]
 [計算に用いたデータの数 (View files from jobから調べる):]
 [最初のRとFreeR (View files from jobから調べる): ,]
 [最後のRとFreeR (View files from jobから調べる): ,]
- d. refmac5によるrestrained refinementの設定, 実行
 [用いたデータの分解能: から Å]
 [用いたサイクル数:]
 [計算に用いたデータの数 (View files from jobから調べる):]
 [最初のRとFreeR (View files from jobから調べる): ,]
 [最後のRとFreeR (View files from jobから調べる): ,]
 * Rの値が異常に高いか低い, あるいはデータの個数が少ない場合, 何か間違っている。もう一度パラメーター, ファイルを確かめる。
- e. Cootによるモデルとマップの表示 <Windows側から>
 計算した結果のモデルとmtz (070418_lys_refmac2.mtzには位相角が書き込まれている)をCootで読み込み, モデルとマップを表示する。
 マウス操作の練習として, N末端から順に1残基ずつ見ていく。この時, アミノ酸配列を参考にして修正すべき残基の場所をチェックしておく。
 Validationの各種グラフを表示して修正すべき箇所を検討する。
 時間があればCalculateModel/Fit/Refineのサブメニューを表示させ, モデル修正および水分子の追加の練習をする。
 * 元のlym.PDBIには数残基の間違ひがある。
 [修正すべき残基の候補 (残基番号)]

リゾチームの精密化の完成へ（R-factor 20%以下に挑戦）

精密化の方法

1. refmac5による rigid body refinement 4 Å（1日目）
2. refmac5による restrained refinement 2.2 Å（1日目）
3. Cootによるモデル修正, 残基の入れ替え, 水分子導入1（2日目）
4. refmac5による restrained refinement 1.9 Å（2日目）
5. Cootによるモデル修正, 残基の入れ替え, 水分子追加2（2日目）
6. refmac5による最終 restrained refinement 1.9 Å（2日目）

もし R-factor が 20%以下（Rfree が 25%以下）に下がらなければ5, 6を繰り返す.

3. Coot で入れ替えた残基の残基番号 [_____]
Coot で導入した水分子の数 [_____]

4. [用いたデータの分解能： _____ から 1.9 Å]
[用いたサイクル数： _____]
[計算に用いたデータの数（View files from jobから調べる）： _____]
[最初のRとFreeR（View files from jobから調べる）： _____ , _____]
[最後のRとFreeR（View files from jobから調べる）： _____ , _____]

5. Coot で入れ替えた残基の残基番号 [_____]
Coot で追加した水分子の数 [_____]

6. [用いたデータの分解能： _____ から 1.9 Å]
[用いたサイクル数： _____]
[計算に用いたデータの数（View files from jobから調べる）： _____]
[最初のRとFreeR（View files from jobから調べる）： _____ , _____]
[最後のRとFreeR（View files from jobから調べる）： _____ , _____]

ニワトリリゾチームのアミノ酸配列

KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC AAKFESNFNT QATNRNTDGS
TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
DGNMGMAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRL 129

リゾチームの精密化のまとめ

ステップ	残基数 (修正した数)	水分子数	分解能 (Å)	データの数	R/Rfree	r. m. s. bond/angle
1. rigid body						
2. restrained						
4. restrained						
6. restrained						

レポート提出締め切り 6月1日

成績評価は出席とレポートによって行う

【スクリーニング試薬データ】

沈殿化剤

ポリエチレングリコール (PEG) 400(液体), 1500, 4000, 8000

メチルペンタンジオール (MPD)

イソプロパノール	C_3H_8O	60.10
Ammonium sulfate,	$(NH_4)_2SO_4$	132.14
Ammonium acetate	$(NH_4)CH_3COO$	77.08
Ammonium phosphate	$(NH_4)_2HPO_4$	132.06
Lithium sulfate	$Li_2SO_4 \cdot H_2O$	127.95
Sodium acetate	$NaCH_3CO_2 \cdot 3H_2O$	136.08
Sodium formate	$NaCO_2$	68.01
Na/K phosphate		
Sodium tartarate	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 6H_2O$	282.22

バッファー

Tris	$(HOCH_2)_3CNH_2$	121.14	pKa=8.06
PIPES	$C_8H_{18}N_2O_6S_2$	302.4	pKa=6.80
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238.3	pKa=7.55
Imidazole	$C_3H_4N_2$	68.08	pKa=6.95
Potassium phosphate	K_2HPO_4	174.18	pKa2=7.2, pKa3=12.3
Potassium phosphate	KH_2PO_4	136.09	
Acetate (液体)	CH_3COOH	60.05	pKa=4.76
Citrate	$C_6H_5O_7$	294.1	pKa3=6.4

塩

塩化マグネシウム	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203.3
塩化カルシウム	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.01
酢酸カルシウム	$Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$	176.18
酢酸マグネシウム	$Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$	214.46

pH調製用試薬

2M NaOH

2M HCl

【各バッファの作り方】

各バッファは終濃度の2倍の濃度のバッファを25ml調製する.

酢酸バッファ

0.2M acetate と 0.2M Na acetate を調製し, 両者を混合して pH を調整する.

Tris バッファ

Tris を量り, 10ml の水に溶解, 2N HCl で pH を調整し, 25ml にする.

クエン酸バッファ

0.2M citrate と 0.2M Na₃ citrate を調製し, 両者を混合して pH を調整する.

イミダゾールバッファ

imidazole を量り, 10ml の水に溶解, 2N HCl で pH を調整.

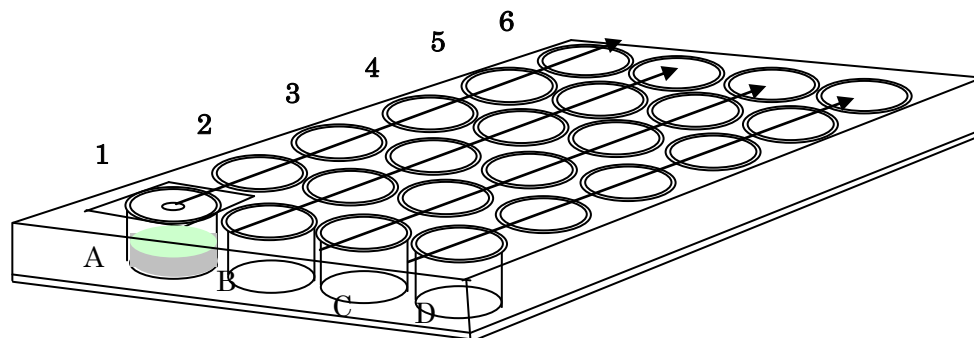
HEPES

10ml の水に溶解, 2N NaOH で pH を調整し, 25ml にする.

PIPES

10ml の水に溶解, 2N NaOH で pH を調整し, 25ml にする.

【結晶化プレートの番号のつけ方】

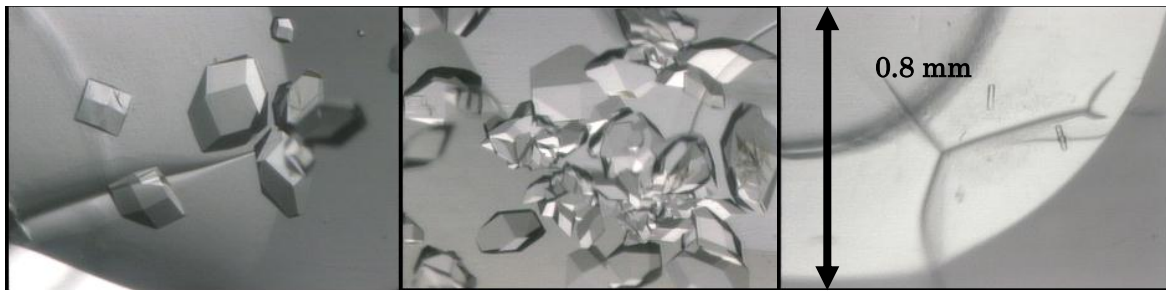


080515結晶化の結果

Lysozyme_1

Lysozyme 2

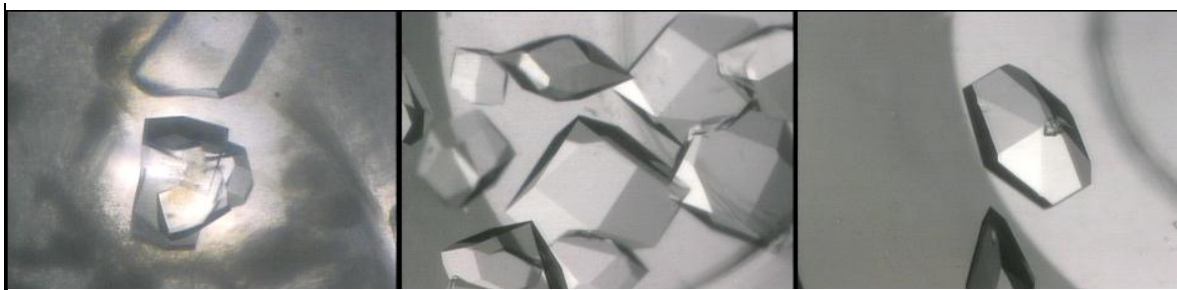
Lysozyme 5



Lysozyme 7

Lysozyme 8

Lysozyme 9



Lysozyme 14

Lysozyme 35

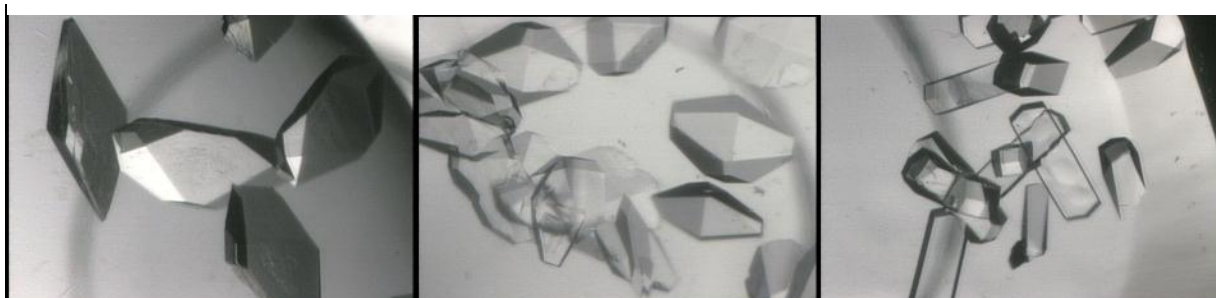
Lysozyme 40



Lysozyme 41

Lysozyme 44

Lysozyme 48



OVA 3

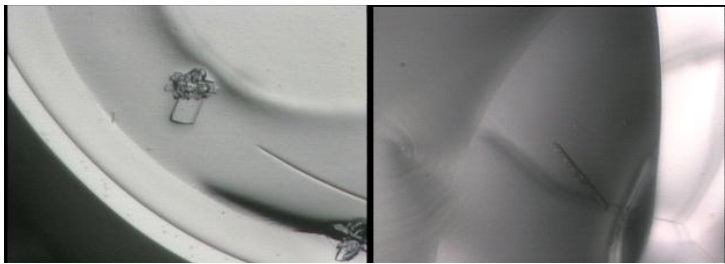
OVA 4

OVA 14



OVA 18

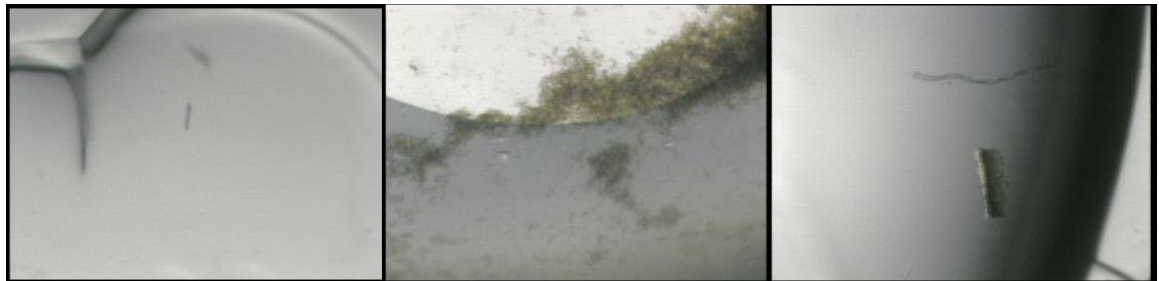
OVA 25



LOX 7

LOX 22

LOX 27



TGP 20

