

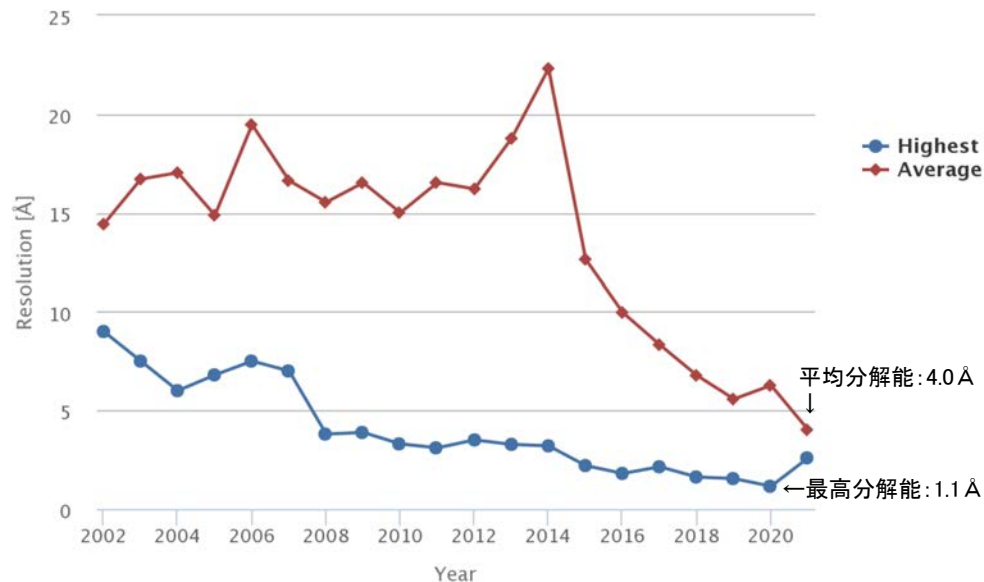
# Cootによる原子モデリング

大阪大学蛋白質研究所

田中 秀明

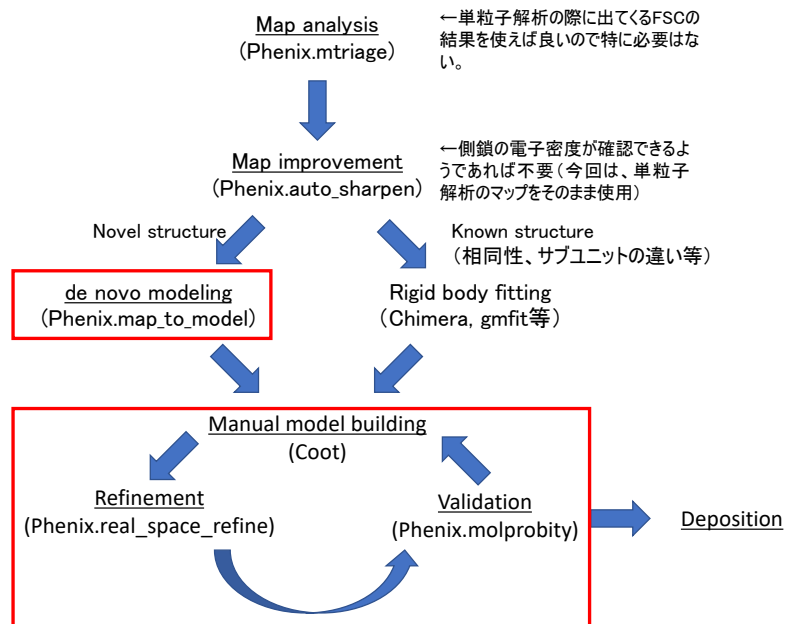


Resolution trends



EMDB statistics

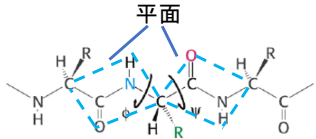
## モデル構築の流れ



## 低分解能(3-5 Å)でのモデル構築

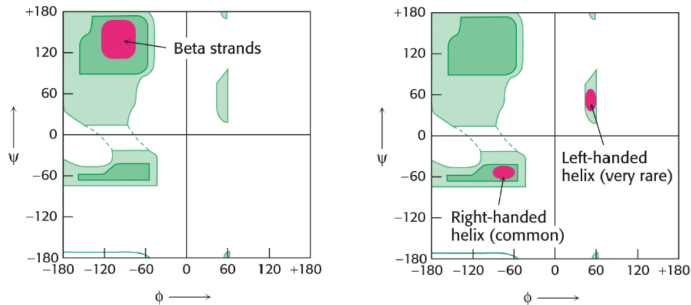
1.  $\alpha$ -helixや $\beta$ -sheetなどの二次構造の主鎖は正しく配置することができるので、まずはポリアラニンでモデルを構築する。
2. マップから全てのアミノ酸側鎖をアサインすることは難しいが、かさ高い側鎖の電子密度を目印にしてモデルを構築する。
3. 分解能にもよるがreal space refinementをする際に二次構造が崩れてしまう場合がある。その際は、制限を掛けながら精密化を進める。
  - ・二次構造、Ramachandran plotのrestraint
  - ・高分解能で決定された構造をreference modelとして使用したrestraint
4. モデル構築、精密化の際には、常にRamachandran plotを確認しながら進める。

# Ramachandran Plot

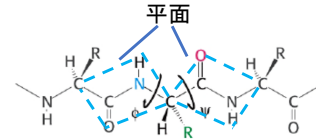


ペプチド結合は電子が非局在化した 共鳴構造を取る ことにより、窒素とカルボニル炭素との間の結合が 二重 結合性を持つので自由回転が制限され、ペプチド結合 を形成している炭素、酸素、窒素、水素の各原子とペ プチド結合をはさむ二つの  $\alpha$  炭素は同一平面上に並 ぶ。

$\Phi$ と $\Psi$ の角度を二次元プロットしたのがRamachandran Plotで、ほとんどの領域では近 接した原子間の衝突が起こる。衝突しない領域のほとんどは、二次構造が取る領域と よく一致している。

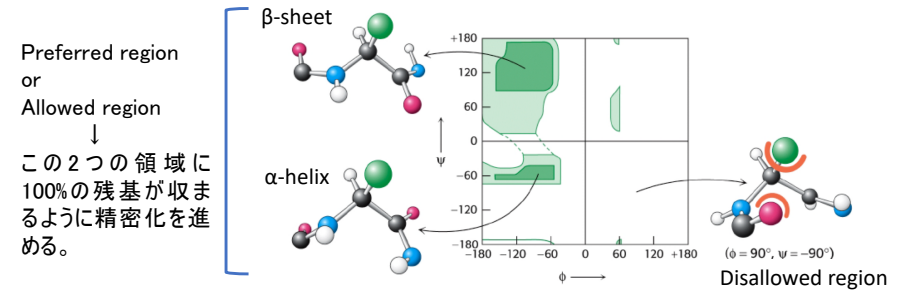


# Ramachandran Plot

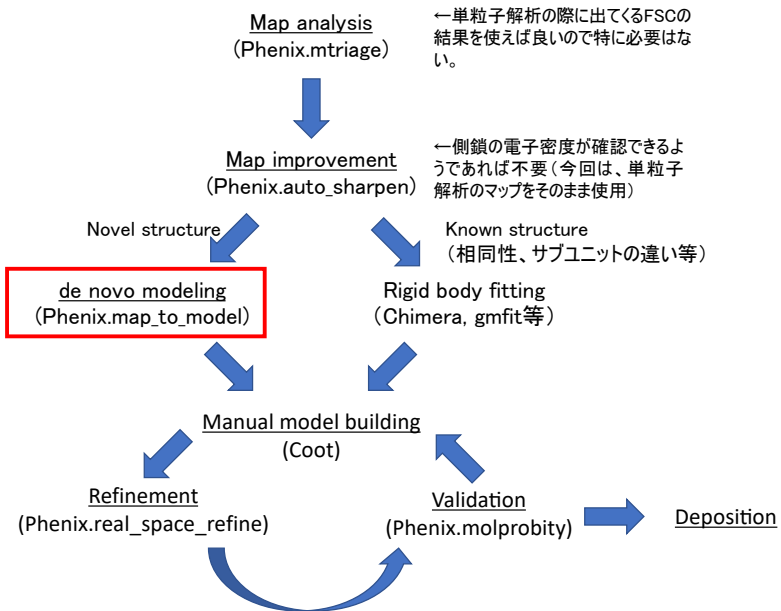


ペプチド結合は電子が非局在化した 共鳴構造を取る ことにより、窒素とカルボニル炭素との間の結合が 二重 結合性を持つので自由回転が制限され、ペプチド結合 を形成している炭素、酸素、窒素、水素の各原子とペ プチド結合をはさむ二つの  $\alpha$  炭素は同一平面上に並 ぶ。

$\Phi$ と $\Psi$ の角度を二次元プロットしたのがRamachandran Plotで、ほとんどの領域では近 接した原子間の衝突が起こる。衝突しない領域のほとんどは、二次構造とよく対応して いる。



# モデル構築の流れ



# Phenix

プロジェクトを作る (計算結果の保存先などの指定)

## Phenix

プログラム“Map Symmetry”を用いた対称マトリックスの計算

① Select Map Symmetry

② Input Map file  
EM\_koushuukai/EM\_map/emd\_9973.map

③ Input high resolution limit determined by FSC  
3.6

④ Click Run

## Phenix

プログラム“Map Symmetry”を用いた対称マトリックスの計算

Mapから対称マトリックスが計算される。

Final symmetry obtained:  
Correlation of symmetry-related regions: 0.96  
Copies: 8

Phenix “Map Symmetry”はこのmapに8回回転対称があることを認識した。

計算結果で得られた対称マトリックスを”map to model”を用いた自動モデル構築に用いる。

## Phenix

プログラム“Map to model”を用いた自動モデル構築

① Select Map to Model

② Input a mapfile  
EM\_koushuukai/EM\_map/emd\_9973.map

③ Input high resolution limit determined by FSC  
3.6

④ Input sequence file (FASTA format)  
EM\_koushuukai/SEQ/6KFH.fasta

⑤ Input symmetry file

⑥ Click Run

## Phenix

プログラム“Map to model”を用いた自動モデル構築

① Select Map to Model

② Input a mapfile  
EM\_koushuukai/EM\_map/emd\_9973.map

③ Input high resolution limit determined by FSC  
3.6

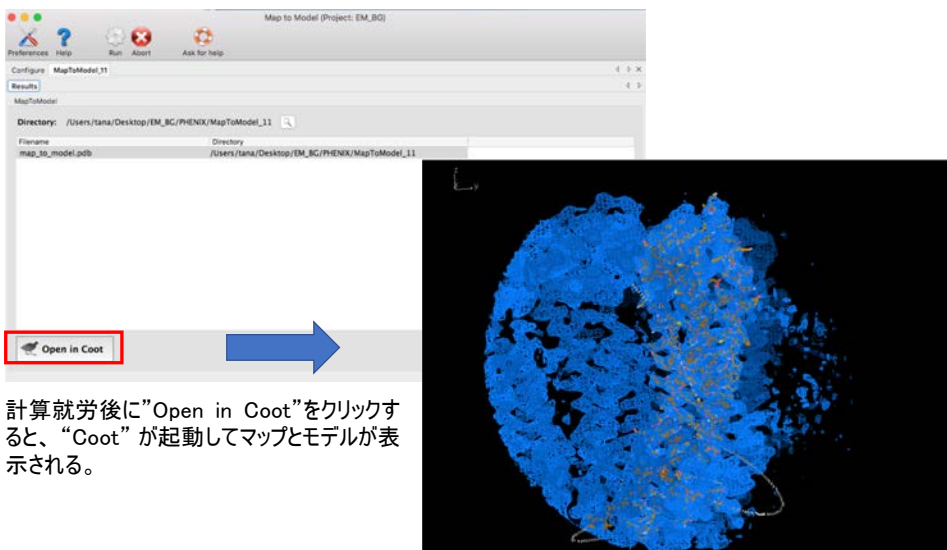
④ Input sequence file (FASTA format)  
EM\_koushuukai/SEQ/6KFH.fasta

⑤ Click find symmetry

⑥ click Run

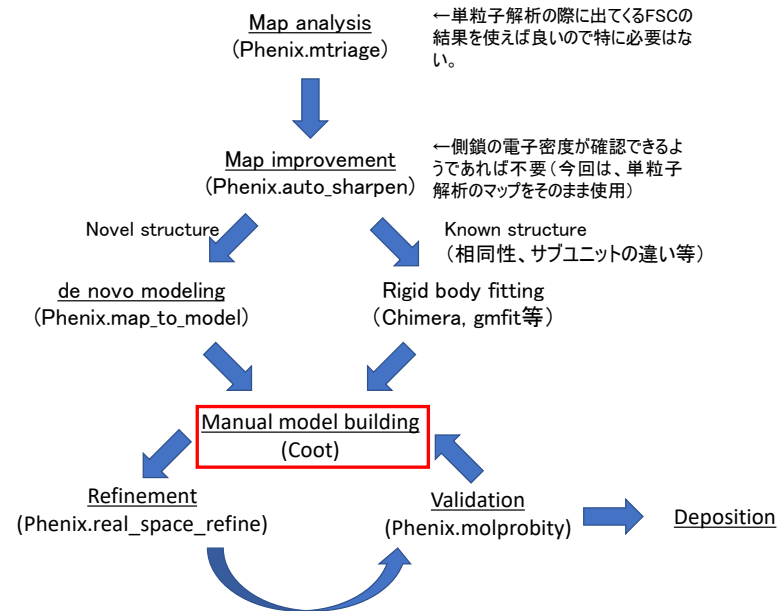
# Phenix

プログラム “Map to model”を用いた自動モデル構築



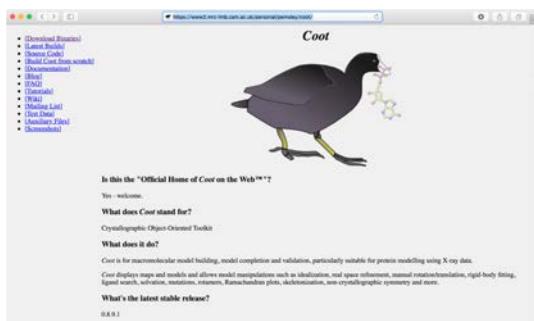
計算就労後に“Open in Coot”をクリックすると、“Coot”が起動してマップとモデルが表示される。

# モデル構築の流れ



# Coot

- Paul Emsley氏によって開発されたモデル構築ソフトでX線結晶構造解析でのモデル構築では最もよく使われています。
- ダウンロードやインストールについては下記URLを参照して下さい。
- Linux版の他にWindows版、OSX版もあります。

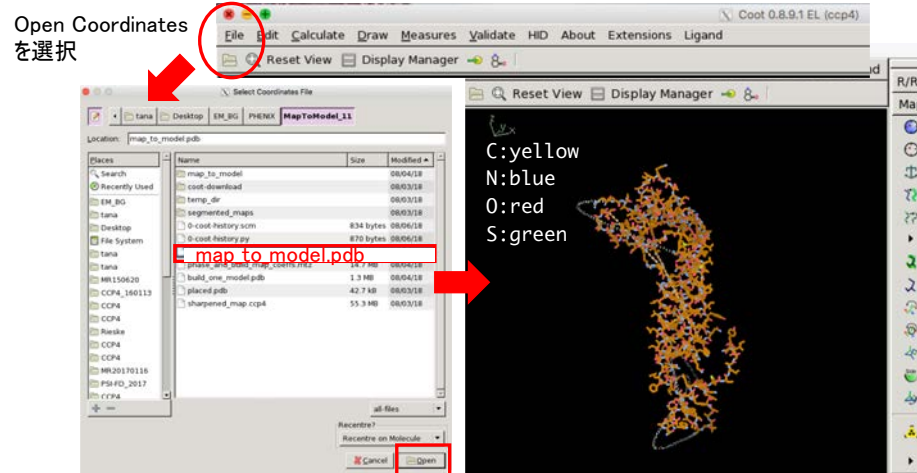


<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>

# Coot

PHENIXで自動構築したモデルやマップの表示方法

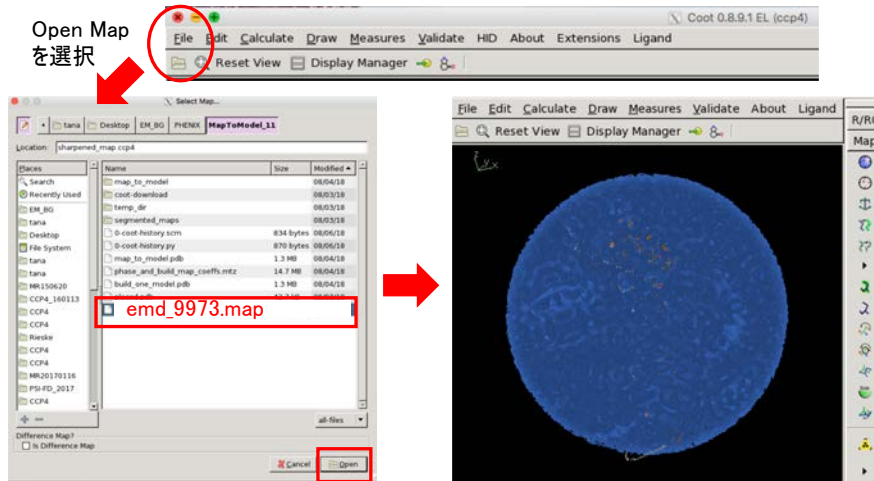
- 1) Coot を起動します。(ターミナルで“coot”と打つ)とメインウィンドウが表示されます。
- 2) メインウィンドウの“File”→“Open Coordinates”→をクリックすると選択ウィンドウが開くので、目的のpdbファイル(EM\_koushuukai/MapToModel/map\_to\_model.pdb)を選択してOK



## Coot

### PHENIXで自動構築したモデルやマップの表示方法

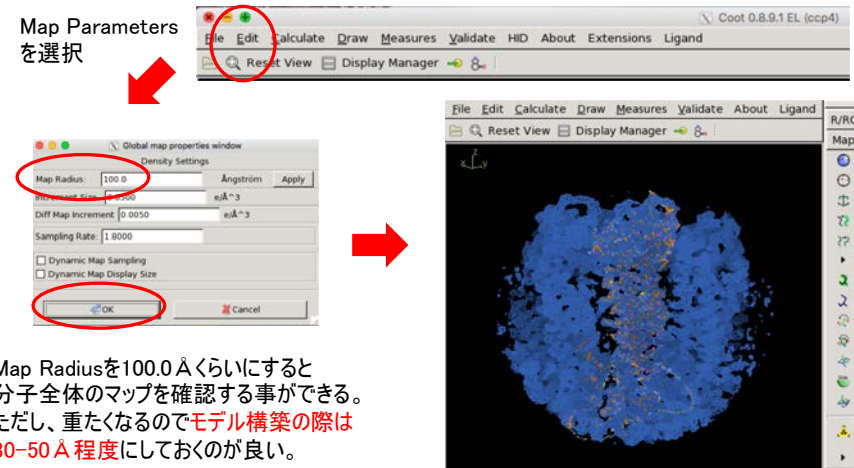
4) メインウィンドウの”Edit”→”Open Map”→をクリックすると選択ウィンドウが開くので、目的のmapファイル(EM\_koushuukai/EM\_MAP/emd\_9973.map)を選択してOKをクリックします。



## Coot

### Mapの表示範囲を広げてみる

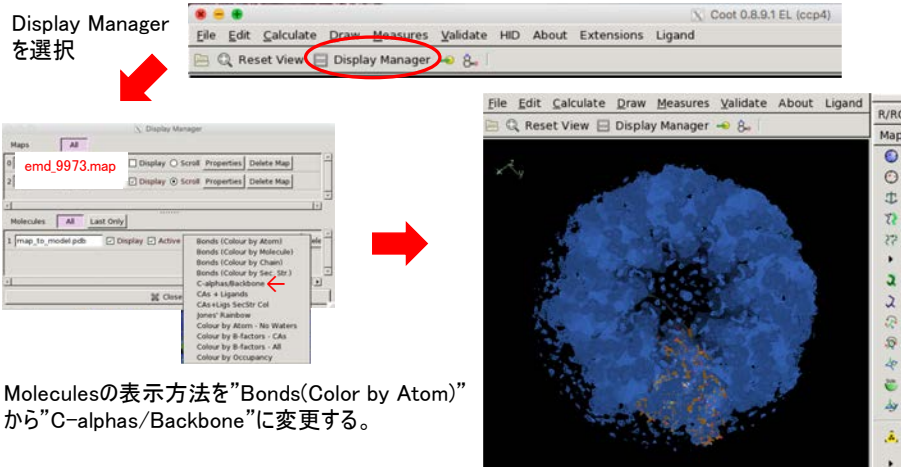
3) メインウィンドウの”File”→”Map Parameters”→をクリックすると選択ウィンドウが開くので、目的のmapファイルを選択してOKをクリックします。



## Coot

### PDBをCαで表示してみる

3) メインウィンドウの”File”→”Map Parameters”→をクリックすると選択ウィンドウが開くので、目的のmapファイルを選択してOKをクリックします。



## Coot

### マウスの操作方法

- 1) 左クリックを押しながらマウスを動かすと分子が回転する。
- 2) 中クリックで原子を選択すると、その原子が画面の中心になる。
- 3) 右クリックを押しながらマウスを動かすと分子が拡大、縮小される。
- 4) Ctrl + 左クリックでマウスを動かすと分子が並進移動する。
- 5) Ctrl + 右クリックでマウスを動かすと画面の奥行きが変わる。
- 6) ホイールを回転させると電子密度のレベルが変わる。
- 7) 原子をダブルクリックすると、残基番号、残基の種類が表示される。  
例えば、Chain Aの残基番号1番のアラニンのCα原子だと  
→ CA/1 ALA/A

## Coot

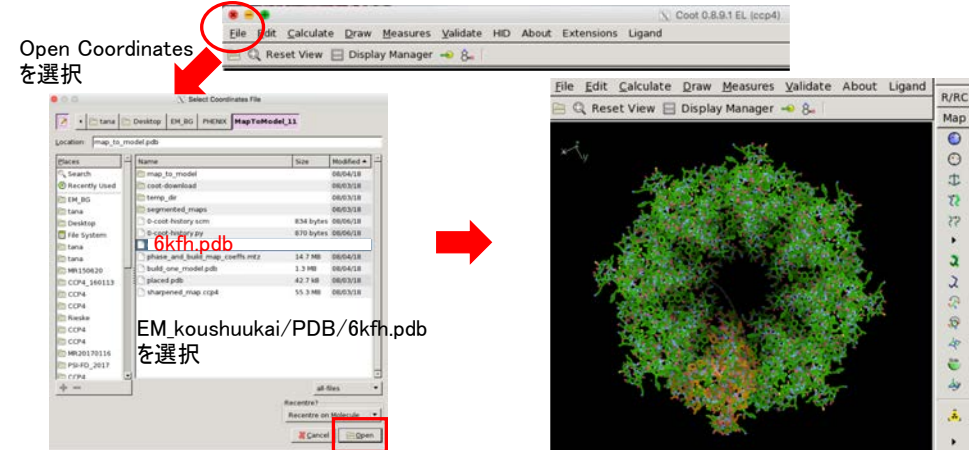
### Cootによるモデル構築の流れ

- 1) INX-6のモデルを見て、今見ている電子密度がINX-6分子のどの部分に相当するのかを電子密度を元に考えて正しいアミノ酸残基に置換する。
- 2) 正しいアミノ酸残基番号に置換する。  
\* 低分解能で自動構築したモデルでは側鎖のアサインが難しく、アミノ酸残基番号も正しくない場合が多い。
- 3) ループなど、主鎖が途中で切れている場合は、アミノ酸残基を挿入して繋げていく。
- 4)  $\alpha$ -helixや $\beta$ -シートと思われる電子密度にモデルがない場合は、Cootの自動で二次構造を配置する機能を利用する(Place Helix Here等)。
- 5) モデルを配置したら、Real Space Refineの機能を使って精密化する。  
\* マップの分解能が低く、Refinementをすると二次構造が崩れてしまう場合は、Ramachandran Restraintsで制限を掛けながら行う方がよい。また、モデル構築の際は常にCootのRamachandran Plotを確認しながら作業を進める。

## Coot

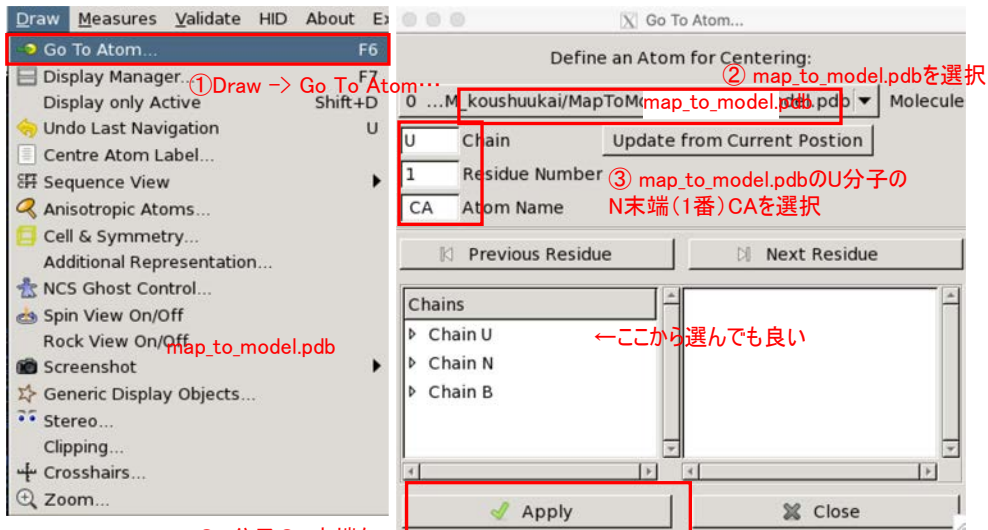
### アミノ酸残基の置換

- 1) まずは、電子密度の形状から、電子密度がINX-6分子のどの部分に相当するのかを判断する。
- 2) 判断が難しい場合で、他の似た分子がPDBに登録されている場合は、それを重ね合わせて表示させてみる(Chimeraやgmfitでフィットさせたモデルを使用する)。



## Coot

### アミノ酸残基の置換

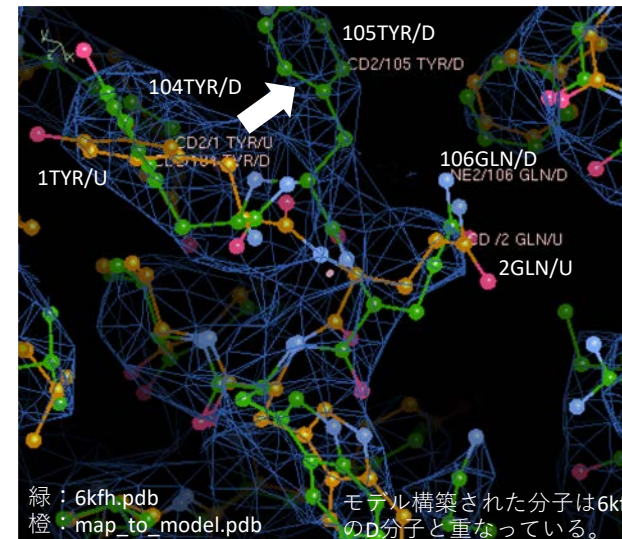


map\_to\_model.pdbのU分子のN末端を画面のセンターに表示

④ Applyをクリック

## Coot

### アミノ酸残基の置換



1TYR/U = 105TYR/D

Real space refinementで1TYR/Uを選択して挿んで修正する。

以降27番目の残基までは配列も合っているのでreal space refinementを使って修正していく。

側鎖が合いにくい場合はRotamersで側鎖の位置を合わせる(高分解能のMapではAuto fit rotamerが便利)。

Realspace refinementで修正できない場合は削除してモデル構築し直す。

## Coot

### Real Space Refinement

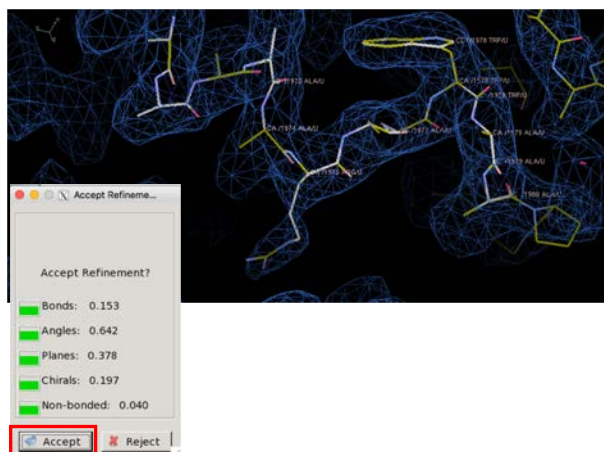
① Real Space Refine Zone をクリック



② カーソルが十字になるので Refine したい領域 (10 残基程度) を選択するとフィッティングされる。



上手く精密化されると全て緑表示になる。  
↓  
Accept をクリック

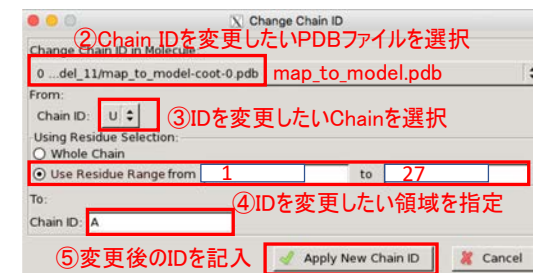
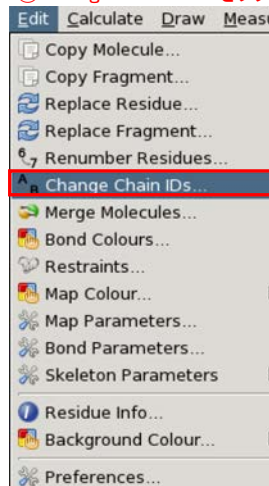


大抵はこれでフィッティングされるが、されない場合はアクティブになった残基 (白色) をマウスで電子密度にドラッグすればフィッティングされる。  
まずは chain U の 1 番から 27 番までを修正してみる。

## Coot

### Chain ID の変更

① Change Chain IDs をクリック



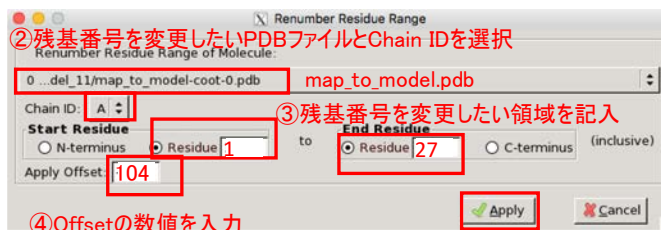
⑥ Apply New Chain ID をクリック

chain U の 1 番から 27 番までは chain ID が A に変更される。

## Coot

### 残基番号の変更

① Renumber Residues をクリック



⑤ Apply をクリック

1TYR/U = 105TYR/D だったので、+104 すれば正しい残基番号になる。

これで修正したモデルは chain ID が A で残基番号が 105 ~ 131 となった。

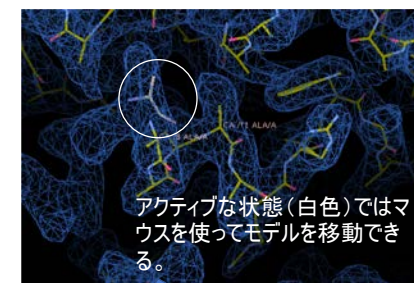
## Coot

### アミノ酸残基の追加

① Add residue をクリック



② カーソルが十字になるので末端の残基を選択するとアミノ酸 (Ala) が足される。



アクティブな状態 (白色) ではマウスを使ってモデルを移動できる。



配置後に Real Space refine すると電子密度にフィットする

Chain A Ala131 より C 末側はモデルが構築されたいないので、アミノ酸残基を 3 残基足して Real Space refine してみましょう。

まずはポリアラニンモデルを作って、その後アミノ酸残基を置換します。

## Coot

### アミノ酸残基の置換

Chain A 132-134: AAA → YAY

① Simple mutate

② 置換したい残基を左クリックで選択するとsub windowが開く

③ 残基を左クリック

134TYR/A

133Ala/A

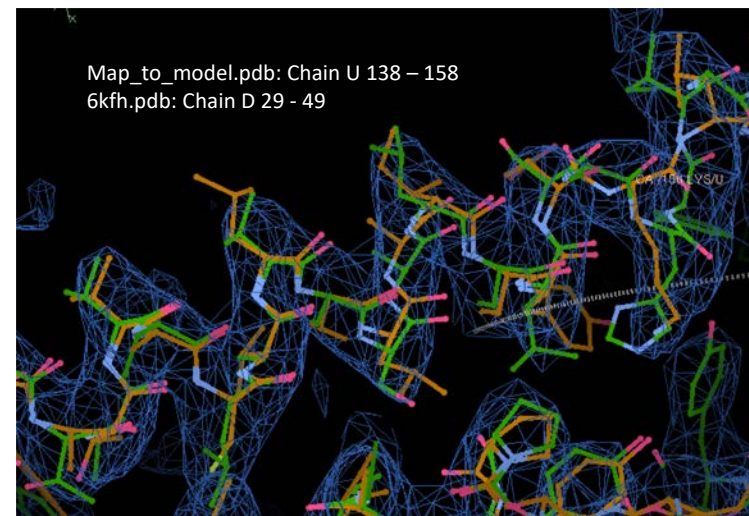
132TYR/A

このようにかさ高いアミノ酸残基を目印にしてどの領域にどの残基が当てはまるのかを考えます。

## Coot

### アミノ酸残基の置換

Chain U 138 - 158: 主鎖は合っているが側鎖が合っていない。



## Coot

### アミノ酸残基の置換

領域を指定してまとめて置換する機能もある

① Mutate Residue Rangeを選択

① Mutate Residue Rangeを選択

Mutate Molecule: map\_to\_model.pdb

Chain ID: U

Residue numbers: 138 to 158 (inclusive)

to (single letter) sequence: RLNSRVTVVILAVSSALLSS

② 置換したいResidue numberを入力

③ 指定した領域のアミノ酸配列を入力

Autofit ...

④ Mutateをクリック

をチェックしておくで置換後に側鎖を電子密度に合わせてくれる(今回くらいの分解能では不向きかも)

→置換後にReal space refinement

## Coot

### Ramachandran Plotの確認

① Ramachandran Plotをクリック

① Ramachandran Plotをクリック

② 修正中のモデルを選択

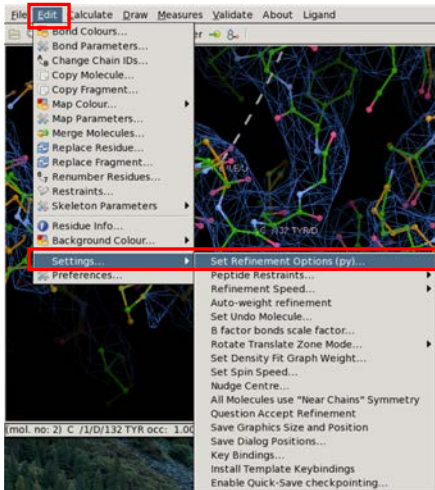
In Preferred Regions: 2598 (84.49%)  
In Allowed Regions: 460 (14.96%)  
Outliers: 17 (0.55%)

Real Space Refinementの際にこの数値が悪くならないように注意する → Preferred Region + Allowed Region = 100%になることが望ましい。



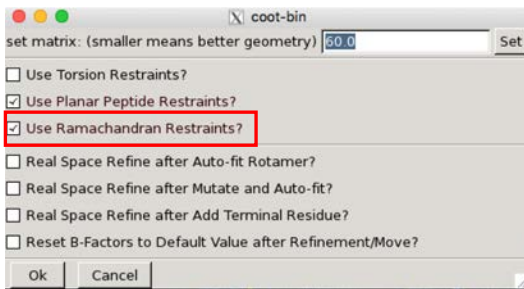
# Coot

## Real Space Refinement



分解能が低くてreal space refinementの際に二次構造が崩れてしまう場合、

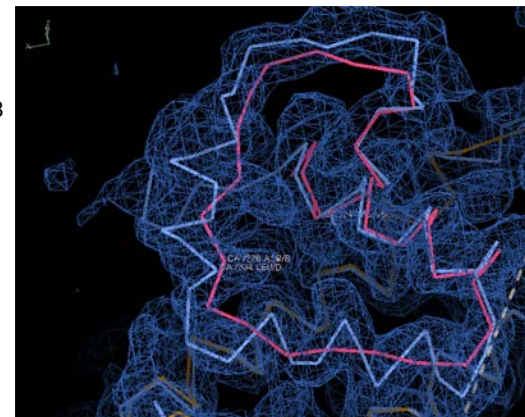
- Edit
- > Settings
- > Set Refinement Options
- > Use Ramachandran Restraints
- をチェックしてOKしておく
- \*mapの質が良い場合は使わない方がよい



# Coot

Place helix here

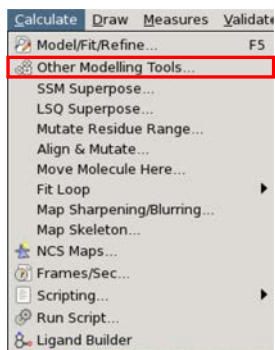
## モデル構築(その他の機能)



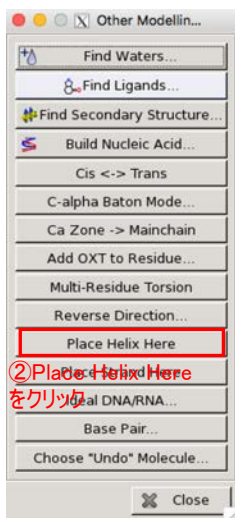
Go to atomで  
Chain ID: B  
Residue number: 228  
に移動します。

この周辺は短い $\alpha$ -helixがありますがmap\_to\_modelでは上手く構築できていません。

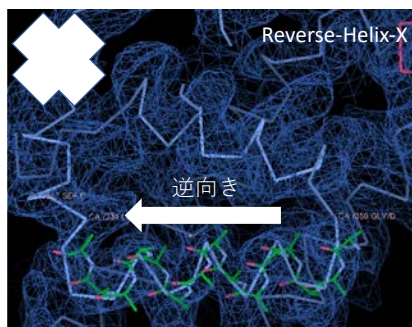
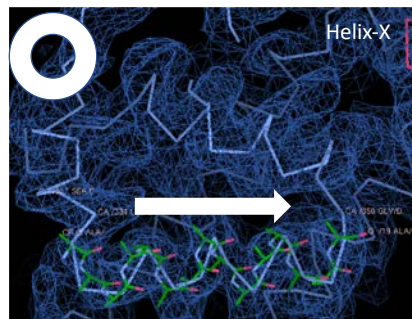
もし、mapの分解能が低く、ここにhelixが置かれていない場合、  
Calculate -> Other modeling tool -> Place helix here を使えば  
容易に $\alpha$ -helixを置くことができます。



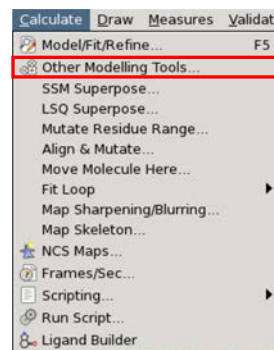
①Other Modelling Tools  
をクリック



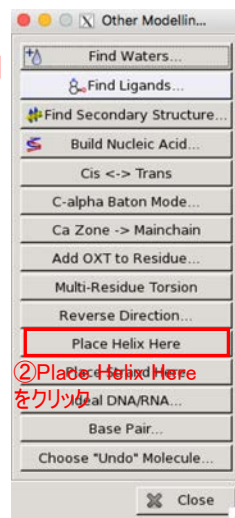
②Place Helix Here  
をクリック



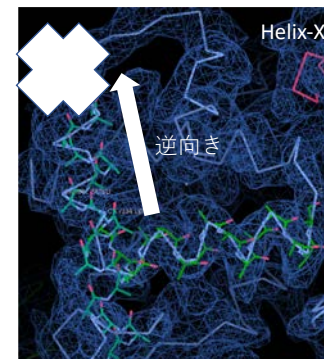
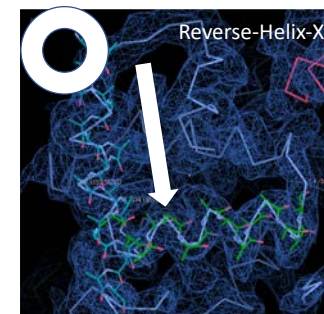
逆向きのhelixも表示される場合があるが、不要な方は  
Display manager から削除しておく。正しい方はReal  
space refinement ->アミノ酸残基を置換-> 再度Real  
space refinement



①Other Modelling Tools  
をクリック

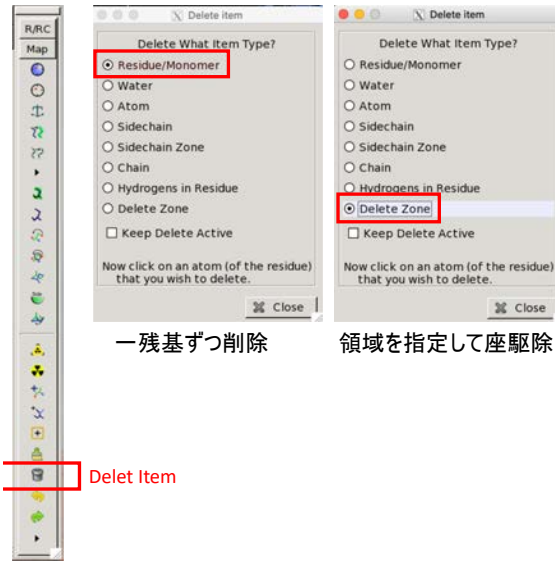


②Place Helix Here  
をクリック

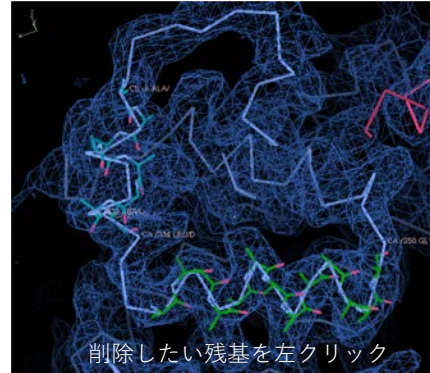


逆向きのhelixも表示される場合があるが、不要な方は  
Display manager から削除しておく。正しい方はReal  
space refinement ->アミノ酸残基を置換-> 再度Real  
space refinement

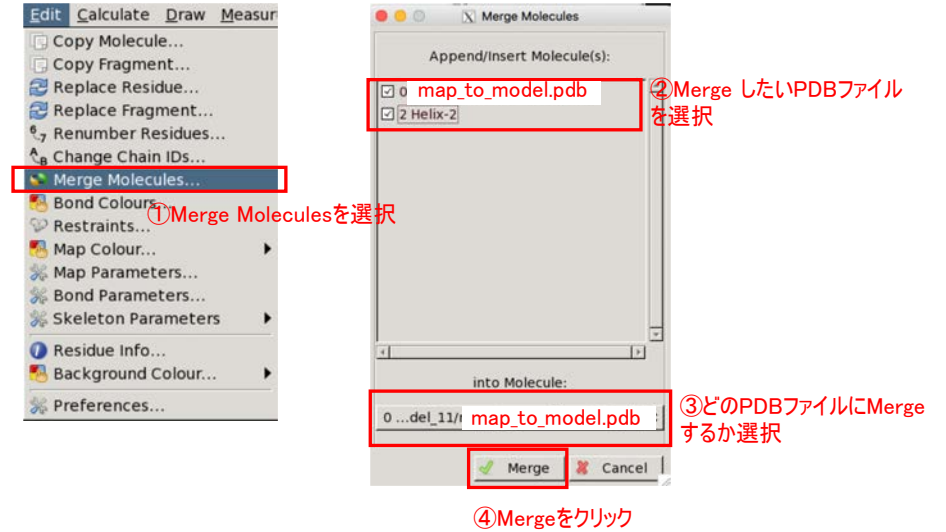
## 不要な残基を削除する



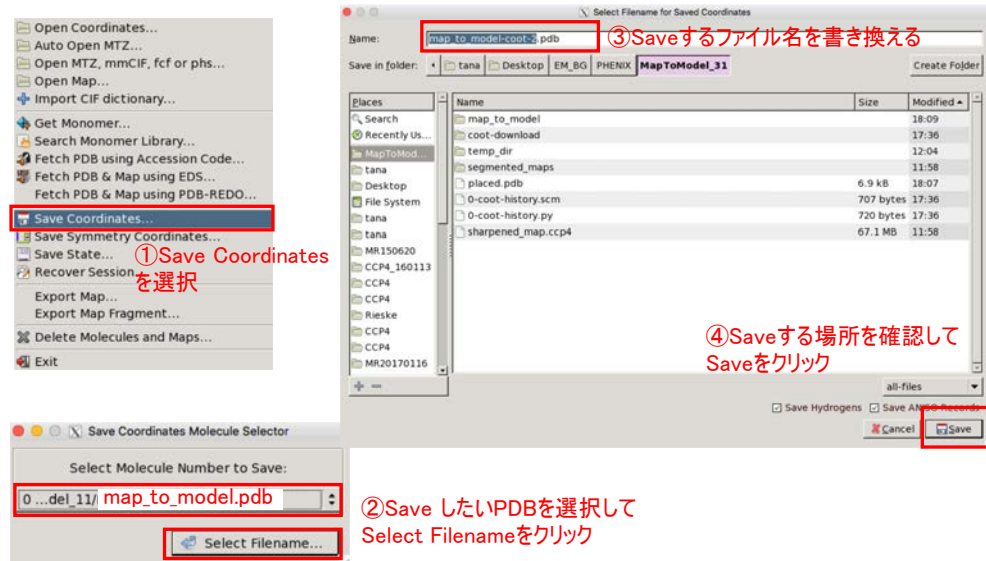
重複していれば領域やマップからはみ出した領域を削除



## Coot モデルのマージ

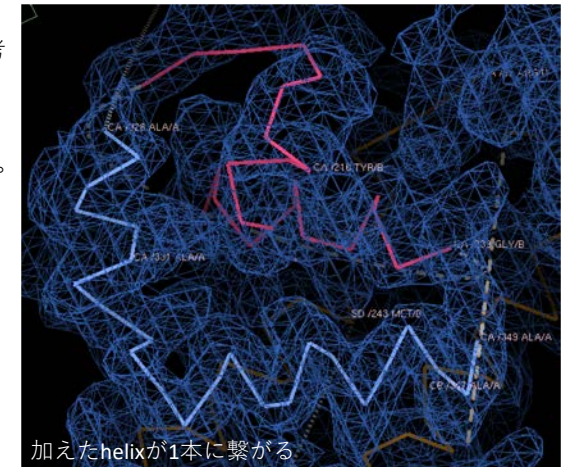


## Coot モデルの保存



## Coot Place helix hereで加えたhelixモデルのchain ID等を修正

1. HelixのChain IDをAに変える
2. 残基番号を変える (6kfh.pdbを参考に)
3. 2つのhelix間の空いているマップに残基を追加する。
4. Chain Uの重複する部分は削除する。



これらの作業を繰り返して“chain A”を完成させる。

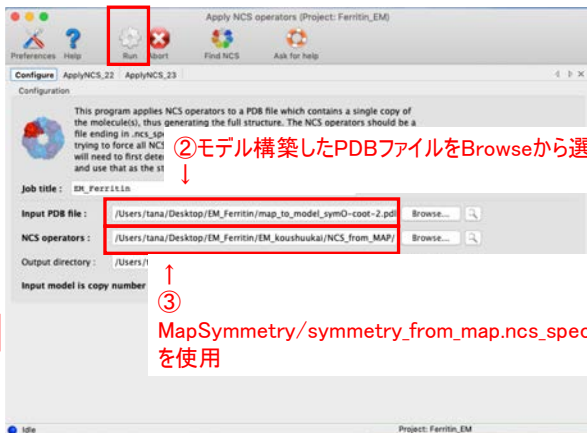
# Phenix

Apply NCS operators

対称操作でモノマーを8個発生させる。



① Apply NCS operatorsを選択



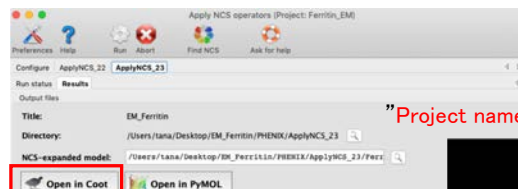
④ Runをクリック

② モデル構築したPDBファイルをBrowseから選択

③ MapSymmetry/symmetry\_from\_map.ncs\_specを使用

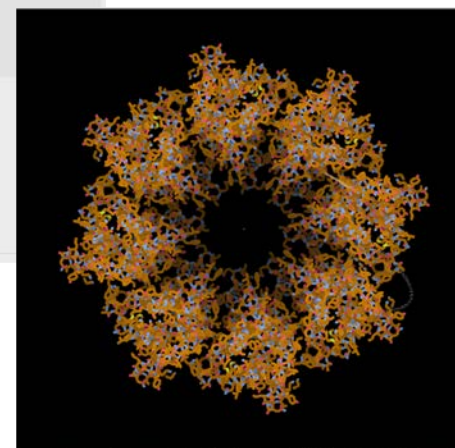
# Phenix

Apply NCS operators



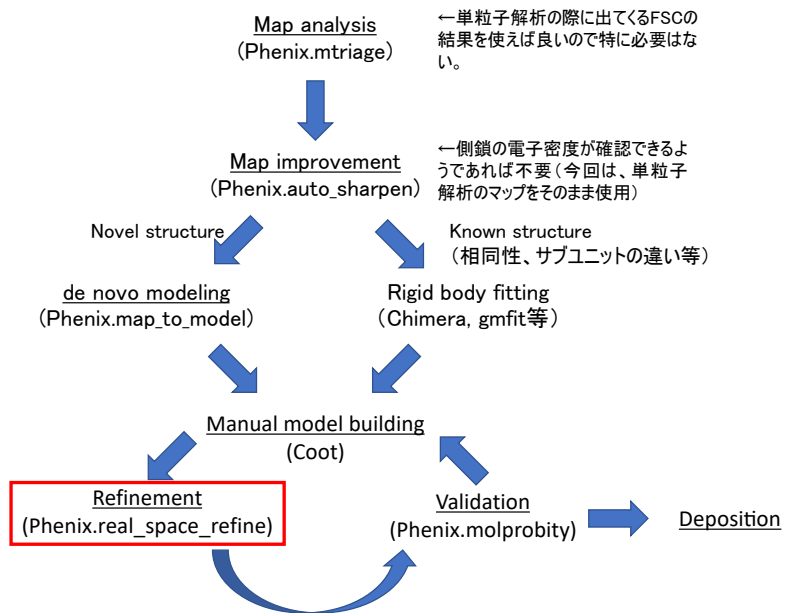
”Project name\_apply\_ncs\_job\_number.pdb”というPDB が出る

Cootをクリック



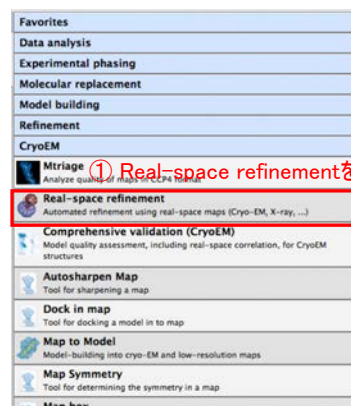
このモデルを使って Real Space Refinement を行う。

## モデル構築の流れ

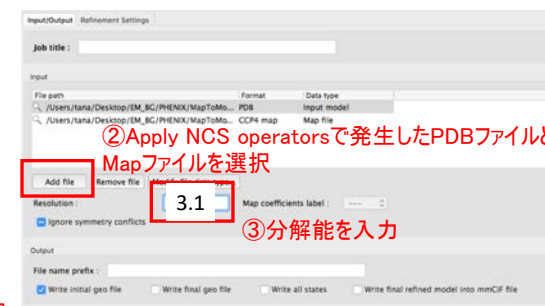


# Phenix

Real-space refinement



① Real-space refinementを選択



② Apply NCS operatorsで発生したPDBファイルとMapファイルを選択

3.1 ③ 分解能を入力

④ 二次構造が崩れやすい場合はチェック(今回はしなくても良い)

# Phenix

Real-space refinement

計算終了後にValidationをクリックするとRamachandran plotなどの結果を見ることができる。

Export Table 1

Export Table 1をクリックすると以下の内容がテキストファイルに保存される。

これらの値が収束するまでモデル修正とreal space refinementを繰り返す

Model	Value	Goal
MolProbity	1.51	
Clash score	2.81	
Rotamer outliers (%)	0.00	<= 1%
CB outliers	0	0
CaBLAM	1.91	<= 1%
Disfavored (%)	5.10	<= 5%
Ca outliers (%)	0.00	<= 0.5%

Geometry Restraints	Value
Bond	32568
# of outliers (> 4σ)	0
mean RMSD (Å)	0.007
max RMSD (Å)	0.046
min RMSD (Å)	0.000

Angle	Value
# of restraints	41800
# of outliers (> 4σ)	48
mean RMSD (°)	1.065
max RMSD (°)	9.872
min RMSD (°)	0.000

Dihedral	Value
# of restraints	19632
# of outliers (> 4σ)	24
mean RMSD (°)	9.337
max RMSD (°)	73.189
min RMSD (°)	0.000

Chirality	Value
# of restraints	4632
mean RMSD	0.053
max RMSD	0.202
min RMSD	0.000

Planarity	Value
# of restraints	5688
mean RMSD (°)	0.005
max RMSD (°)	0.030
min RMSD (°)	0.000

Parallely	Value
# of restraints	0
mean RMSD	0.000
max RMSD	0.000
min RMSD	0.000

Nonbonded	Value
# of restraints	283987
mean (Å)	4.133
max (Å)	4.900
min (Å)	2.283

# Phenix

Real-space refinement

計算終了後にResultsをクリックするとOutput fileを見ることができる。

↓  
Cootをクリックすると精密化されたPDBを表示することができる。

↓  
Cootを使ってモデル修正を行う。

\* この作業を繰り返して収束してきたらValidationを行う

Open in Coot

# Phenix

Real-space refinement後のPDBを修正する。

Cootを起動してPDBとMAPを表示する。

↓  
CaBLAMのところをクリックすると修正すべき残基のリストが表示される。

Open in Coot

Model	Value	Goal
MolProbity	1.51	
Clash score	2.81	
Rotamer outliers (%)	0.00	<= 1%
CB outliers	0	0
CaBLAM	1.91	<= 1%
Disfavored (%)	5.10	<= 5%
Ca outliers (%)	0.00	<= 0.5%

Geometry Restraints	Value
Bond	32568
# of outliers (> 4σ)	0
mean RMSD (Å)	0.007
max RMSD (Å)	0.046
min RMSD (Å)	0.000

Angle	Value
# of restraints	41800
# of outliers (> 4σ)	48
mean RMSD (°)	1.065
max RMSD (°)	9.872
min RMSD (°)	0.000

Dihedral	Value
# of restraints	19632
# of outliers (> 4σ)	24
mean RMSD (°)	9.337
max RMSD (°)	73.189
min RMSD (°)	0.000

Chirality	Value
# of restraints	4632
mean RMSD	0.053
max RMSD	0.202
min RMSD	0.000

Planarity	Value
# of restraints	5688
mean RMSD (°)	0.005
max RMSD (°)	0.030
min RMSD (°)	0.000

Parallely	Value
# of restraints	0
mean RMSD	0.000
max RMSD	0.000
min RMSD	0.000

Nonbonded	Value
# of restraints	283987
mean (Å)	4.133
max (Å)	4.900
min (Å)	2.283

# Phenix

Real-space refinement後のPDBを修正する。

Cootを起動してPDBとMAPを表示する。

↓  
CaBLAMのところをクリックすると修正すべき残基のリストが表示される。

Open in Coot

Chain	Residues	Residue type	omega	conformation
A	135 87 to PRO 88	proline	-143.14	Twisted
B	135 87 to PRO 88	proline	-143.11	Twisted
C	135 87 to PRO 88	proline	-143.12	Twisted
D	135 87 to PRO 88	proline	-143.14	Twisted
E	135 87 to PRO 88	proline	-143.13	Twisted

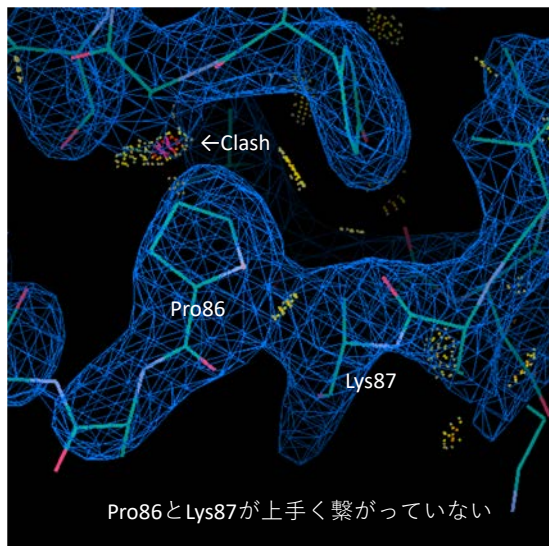
# Phenix

Real-space refinement後のPDBを修正する。

Cootを起動してPDBとMAPを表示する。

↓  
CaBLAMのところをクリックすると修正すべき残基のリストが表示される。

他、ClashやRamachandran等についても同様

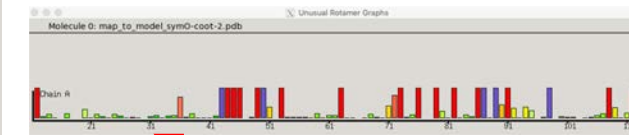
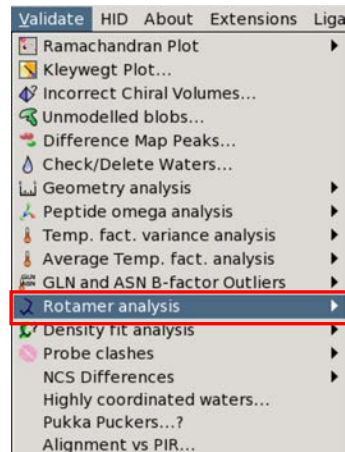


Regularize Zone と Real Space Refine Zoneを使って修正する。

# その他

## Rotamer Outliersを修正するには便利な機能(Coot)

Coot



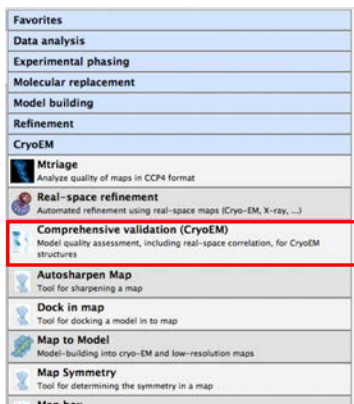
PDBを選択

修正すべき残基が赤、紫、オレンジ、黄色で表示される。  
↓  
修正したい残基をクリックするとcoot画面上にセンター表示される。  
↓  
Real Space Refine Zone や Regularize Zoneで修正する。

# その他

## Phenix

Comprehensive validation (Cryo EM)



Validationを行うだけならこれも使えます。