

## プログラム QUANTA を用いた Model Building —X-BUILD を使ってみて—

北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻  
博士後期課程 2 年 鈴木章夫

昨年 11 月中旬より約 1 ヶ月間、ビームラインアシスタントを務めさせて頂きました。この期間中に、私の持参したキュウリ (*Cucumis sativas L.*) 種子由来リボヌクレアーゼの 1.75Å 分解能のデータが得られ、分子置換法による構造解析を行うことが出来ました。この蛋白質は、キュウリ種子から抽出されたもので、そのアミノ酸配列は現在のところ N 末端の 25 残基しか分かっていません。したがって、Model building を行っていく上でアミノ酸を適確に当てはめて行くためには、現れた電子密度から側鎖を判断して行かなくてはなりません。そんな折、坂部先生ご夫妻の御好意によりプログラム QUANTA を使用させて頂くという好機に恵まれました。そこで、本蛋白質の Model building には QUANTA を使用させて頂くことにしました。

ここでは、Model building を行った際に使用した、QUANTA の一般的な使い方および QUANTA X-ray Tools の一つである X-BUILD の使用方法について簡単ではありますが紹介させて頂きます。

### プログラム QUANTA について

QUANTA は、低分子から高分子まで幅広くモデリングを行うための機能を合わせ持った統合形グラフィクス解析プログラムです。モデリングのためのツールとしては、X-AUTOFIT (C $\alpha$  tracing), X-BUILD (分子モデルの構築), X-POWERFIT (MAD, MIR および SIR 後の電子密度マップからの二次構造決定), X-LIGAND (リガンド分子の fitting) および X-SOLVATE (水分子の挿入) などがあります。また、CNS 1.0 と X-PLOR 98.1 が融合した CNX 2002 を QUANTA と組み合わせることで、よりスムーズにかつ強力に分子構造の解析が出来ます。

今回、私はこれらの内 X-BUILD という分子モデル構築のためのツールを使用しました。X-BUILD は、アミノ酸の付加や置換だけでなく、real space refinement, rigid body refinement および manual editing などを簡単に行うことが出来ます。したがって、このツールを使用することにより、構造の精密化をより迅速に進めることができるでしょう。

以下では、QUANTA の使い方の手引きとして、QUANTA (X-BUILD) を用いた分子モデル構築の方法について示します。

## QUANTA の使い方の手引き

### 1. QUANTA の起動

QUANTA の起動は、適当な terminal window 上で行います。terminal window を開き、任意の作業ディレクトリを作成した後、

```
%quanta
```

と入力すると、プログラムが起動します。そのとき、QUANTA を起動したディレクトリにいくつかの startup file をコピーするかどうか聞いてくるので、Yes をクリックするかまたは enter キーを押します。その後、暫くすると図 1 に示すようないくつかの Window が現れます。

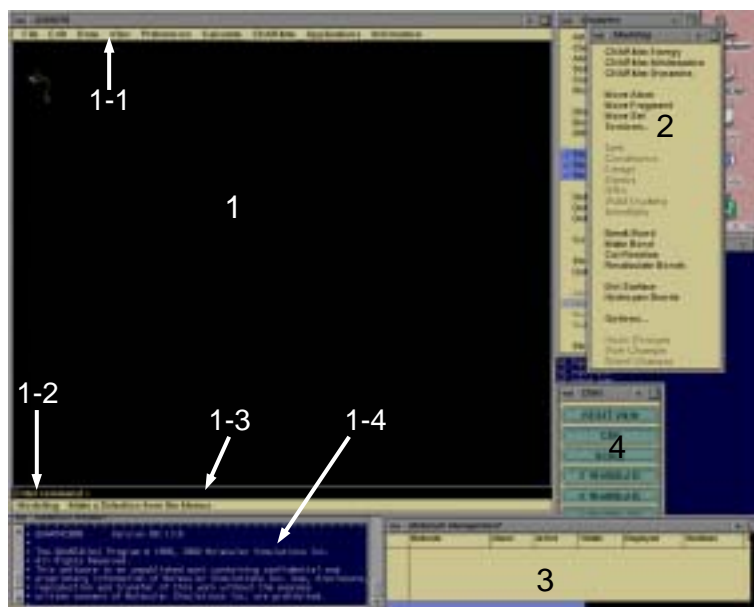


図 1 . QUANTA 起動時に現れる Window

これらの Window は以下のものから成り立っています。

QUANTA Viewing Window ( 図中 1 ):

分子構造やマップなどがエリア内に表示されます。この Window は以下に示す 4 つの部分から構成されています。

- ・ Menu Bar ( 1-1 ): QUANTA の機能および関連するプログラムにより、9 つのメニューが存在します。ほとんど全ての操作はこのメニューから選択することになります。

- ・ Command Prompt ( 1-2 ): ここに QUANTA コマンドを直接入力することができます .
- ・ Message Area ( 1-3 ): Command Prompt の下にあります . QUANTA のオペレーションの間 , このエリアには , プログラムからの指示やエラーメッセージが表示されます .
- ・ Textport ( 1-4 ): このエリア ( Viewing area の下にある Window ) により , QUANTA のオペレーションに関するメッセージおよび表示しているモデル構造に関する情報が得られます ( どのような処理が行われているのかが分かります ) .

Geometry and Modeling Palette ( 図中 2 ):

Geometry および Modeling の 2 つの Palette があります . ここにあるコマンドをクリックすることで , コマンドを実行することができます .

Molecule Management Table ( 図中 3 ):

読み込んだ構造の状態の一覧が表示されます . この Window では , 構造表示のオン・オフおよび表示した構造の削除ができます .

Dial Emulator ( 図中 4 ):

この Window にあるボタンおよびダイヤルを操作することで , 分子構造の回転 , 並進および拡大・縮小などができます . Model building の際にもこの Dial を使用します .

## 2. 分子構造を読み込む

QUANTA が起動できたら , 次に分子構造を読み込みます . 実際には , 上述の QUANTA Viewing Window の Menu Bar にある File より , Import Single Structure または Import Multiple Structure を選択します . すると , 図 2 に示すような画面が現れ ( 図は Import Multiple Structure の場合 ) QUANTA を起動したディレクトリ上に存在する読み込み可能なファイルがリストととして表示されます . このリストの中から読み込みたい PDB ファイルを選択します . 読み込みたいファイルが別のディレクトリにある場合は , 画面右側のボタンをクリックすることで , ディレクトリを移動し , 目的のファイルが存在する場所へ移動します . ここでは , /save/galaxy/sukket/MR/FFT の下にある junk\_build.pdb という名前のファイルを選択します ( 図 3 ) .

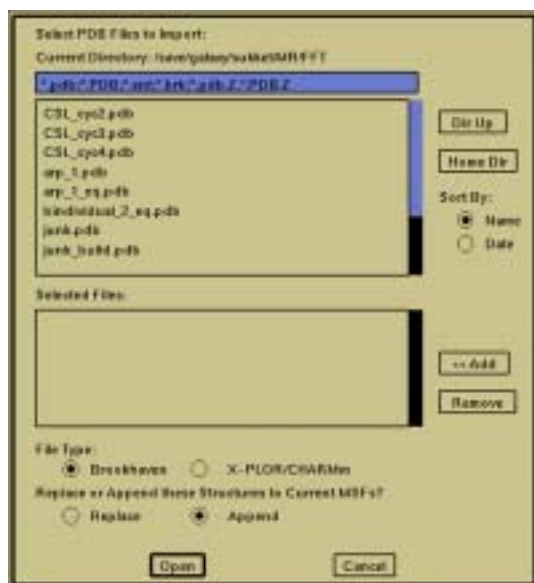


図 2 . PDB ファイルの選択画面



図 3 . Junk\_build.pdb を選択

全て良ければ、画面下にある“ Open ”をクリックします。暫くすると、図 4 のように画面に読み込まれた分子構造が表示されます。読み込み後は、上述の Molecule Management Table に、読み込んだファイルの名前とファイルに含まれる原子数、その他読み込んだ構造の状態がリストアップされます。構造を削除したい場合にも、この Molecule Management Table を使用します。

QUANTA では、PDB から読み込んだ構造を MSF 形式で蓄積します。したがって構造を読み込んだ後は、作業ディレクトリに“ filename ”.msf というファイルが作られます。この msf ファイルは Menu Bar の File/Open で読み込むことができます。

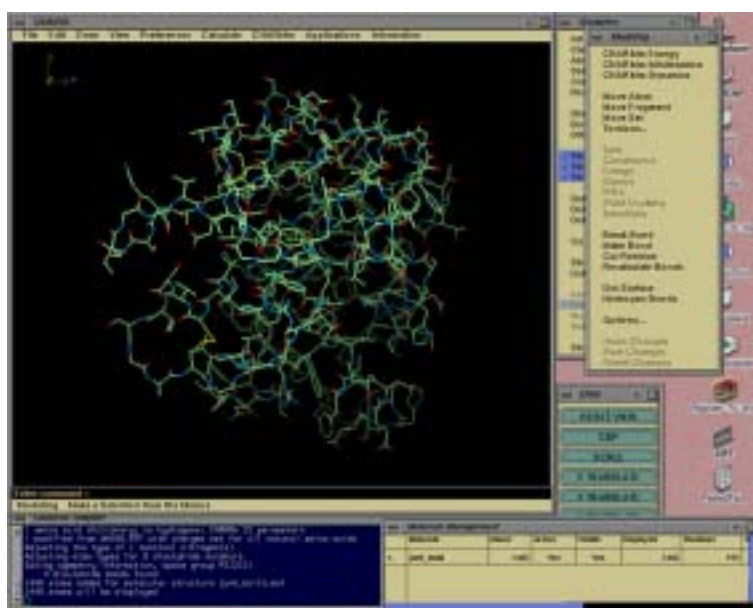


図 4 . 読み込まれた分子構造

表示された構造を，回転，並進および拡大・縮小する際には，Dial Emulator を使用すると先に述べましたが，shift キーとマウスを使っても移動させることができます．表 1 に，マウスを使用した場合の操作について簡単に示します．

right button : 原子の選択
middle button : X , Y 軸周りの回転
left button : Z 軸周りの回転
shift+ right button : Dial Emulator の CLIP
shift+ middle button : X , Y 軸方向への並進
shift+left button : Z 軸方向への並進
shit キーのみ : Zoom In/Out

表 1 . マウスによる操作

### 3. 電子密度マップの読み込み

電子密度を読み込むには，Menu Bar の Draw から Map Table を選択します．すると，図 5 に示した Map Management という Window が現れます．前述の Molecule Management Table と同様に，読み込んだマップに関する情報が表示されます（Contour Level 等）．また，マップの読み込みもこの Map Management Table から行います．

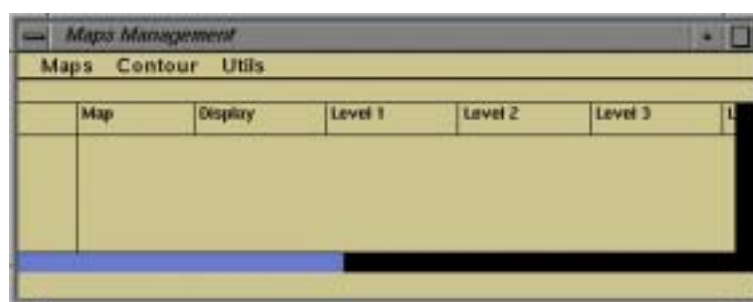


図 5 . Map Management Table

マップの読み込みは Map Management Table の Maps/Add a Map メニューから行います．しかし，QUANTA では，読み込めるマップのタイプは “.mbk” と決まっています．したがって，CCP4 や X-PLOR フォーマットのマップは一度 Import して “.mbk” で保存し直してから読み込む必要があります．

Import する場合も，Map Management Table の Maps から行うことができます．プルダウンメニューより，読み込みたいマップのフォーマットを選択すると，図 6 に示すような画面が現れます（ここでは，CNS の 2fo-fc マップを読み込むことにします）．

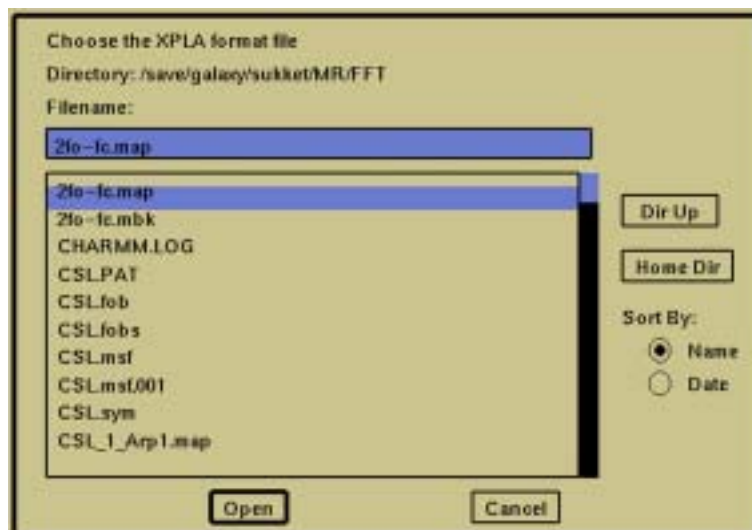


図 6 . Import するマップを選択しているところ

マップを選択すると、画面が図 7 のようになるので、mbk フォーマットで保存するための名前を入力します(ここでは 2fo-fc.mbk と付けます)。良ければ画面下の“ Save ”をクリックします。

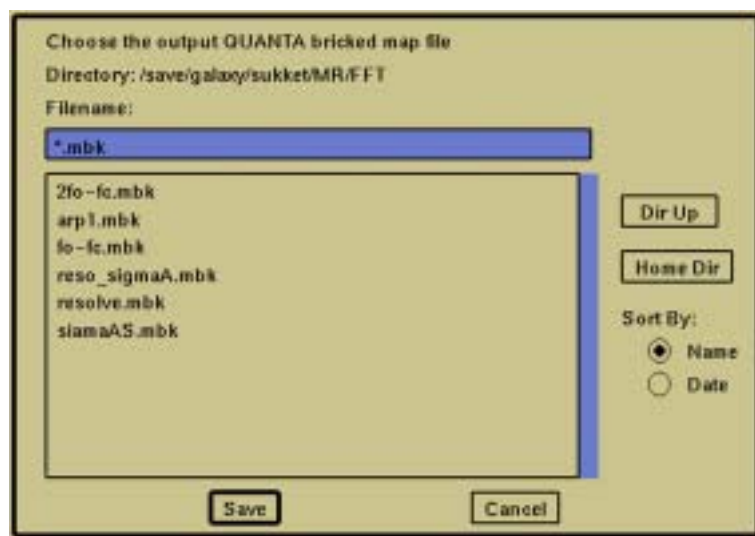


図 7 . Output のために名前を入力する

Save をクリックすると、画面が図 8 のように変わります。ここでは、マップ表示のための Contour Level などの各種設定をします。Contour Level は一つのマップにつき、6 種類まで選択することが出来ます。

設定後、“ OK ” をクリックすれば、マップが読み込まれ図 5 の Map Management Table に情報が表示されます(図 9)。





図 8 . Contour Level 等の設定画面

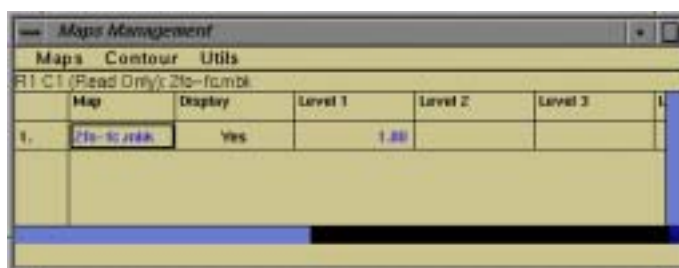


図 9 .マップ読み込み後の Map Management Table

この時点では、Viewing Window にマップは表示されません。表示させるには、Contour メニューから表示させるか、または Map Management Table に表示されているマップ名をクリックします。以下では、後者の場合について紹介します。マップ名をクリックすると、Viewing Window に図 10 のようなマップに関するオプション画面が現れます。

この画面では、マップの追加、削除など、多くのことを行うことができます。ここでは、先ほど設定したマップを Viewing Window に描きたいので、マップオプション画面のリストの下から 2 番目にある Contour Maps を選択します。選択後、OK をクリックすると、図 11、1-4 の Textport にメッセージが流れ、暫くすると（かなり時間がかかります）、Viewing Window に表示されている領域にマップが表示されます。マップが表示された直後の画面を図 11 に示します（このマップは、キュウリ由来リボヌクレアーゼの 2fo-fc マップを Contour Level 1.80σ で設定したものです）。



図 10 . Map Option 画面

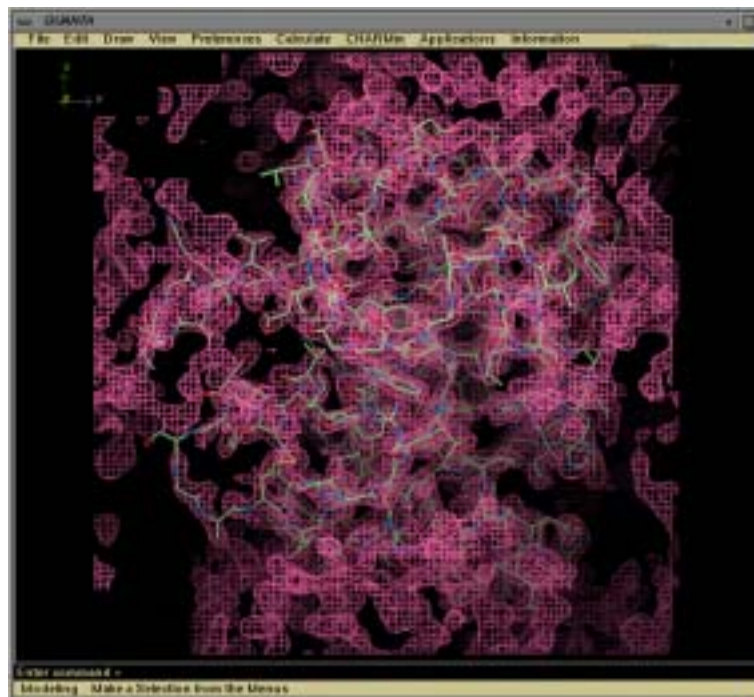


図 1 1 . マップが表示された直後の画面  
キュウリ由来リボヌクレアーゼの 2fo-fc マップ  
( Contour Level 1.80 $\sigma$  )

#### 4. X-BUILD による Model building

分子構造と電子密度マップを読み込むことが出来たら , X-BUILD による Model building を行うための準備が整ったこととなります . 先ずは X-BUILD を起動します . X-BUILD は Menu Bar の Applications/X-AUTOFIT を選択すれば立ち上がり , これまで Modeling Palette があつた場所に , 図 1 2 に示した X-AUTOFIT X-BUILD という Palette がいくつかの Window を伴って現れます .

これ以後は , Geometry Palette と X-AUTOFIT X-BUILD Palette という 2 種類の Palette を主に使用することになります .

さて , では早速 Model building にかかりたいところですが , X-BUILD での処理を行

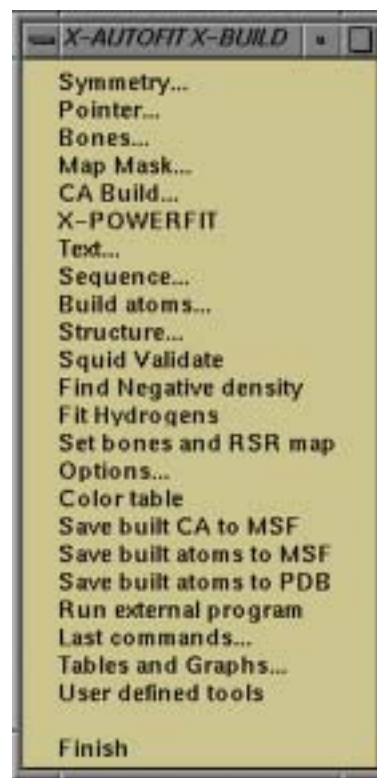


図 1 2 . X-AUTOFIT X-BUILD Palette  
うためには , X-BUILD 起動時に Palette と一緒に現れた Object Management に 3D



trace を表示させておく必要があるようです．そのためには，X-AUTOFIT X-BUILD Palette の CA build をクリックし，現れた CA build という Palette より (図 1 3 a)，Load CA coordinates をクリックします．すると，Object Management (図 1 3 b) に 3D TRACE と 3D SYM の 2 つのオブジェクトが加えられ，読み込まれた CA trace が Viewing Window に表示されます (図 1 3 c)．

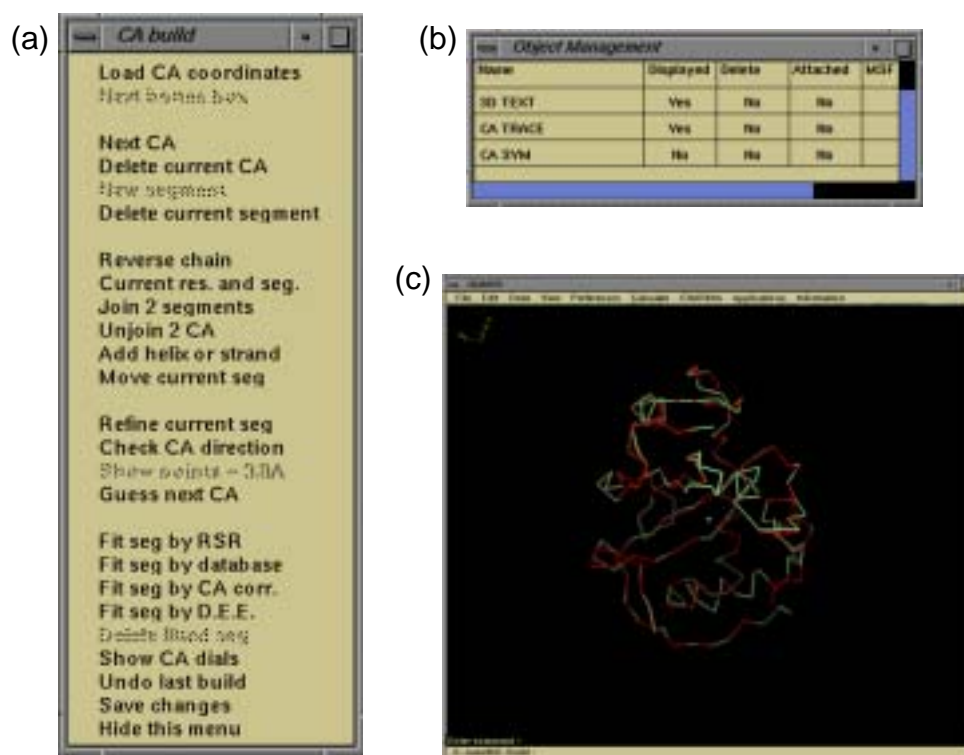


図 1 3 . CA build Palette (a), Object Management (b), および Viewing Window に表示された CA trace(c)

以上で Model building のための準備は整いました．これ以降は，今回行った Model building を例にしながら，その使用法を紹介します．

#### 4-1 末端へのアミノ酸の付加

今回私が構造解析したのは、冒頭にも述べました通り、キュウリ (*Cucumis sativas* L.) 種子由来リボヌクレアーゼです。分子置換法のサーチモデルには、ニガウリ (*Momordoca charantia*) 種子由来の 190 アミノ酸残基、分子量 21,222Da のリボヌクレアーゼ、RNase MC1 を用いました。キュウリ由来リボヌクレアーゼは、キュウリ種子から抽出されたもので、そのアミノ酸配列は現在のところ N 末端の 25 残基しか分かっていません。また、そのアミノ酸残基数および分子量も正確には分かっていませんでした。しかし現状では、アミノ酸残基数は、MC1 のそれより長い 192 残基である可能性が高くなりました。今回行った Model building において、N 末端にアミノ酸を付加することが出来ました。

図 1 4 に、Model building 途中における N 末端を示します。図には、3 種類のマップが読み込んであります。赤色のマップは Arp/wArp 後のデータから計算したものです。これを見ると、N 末端にもう一残基追加できそうです。こんな場合にも QUANTA を用いると簡単にアミノ酸を追加することができます。

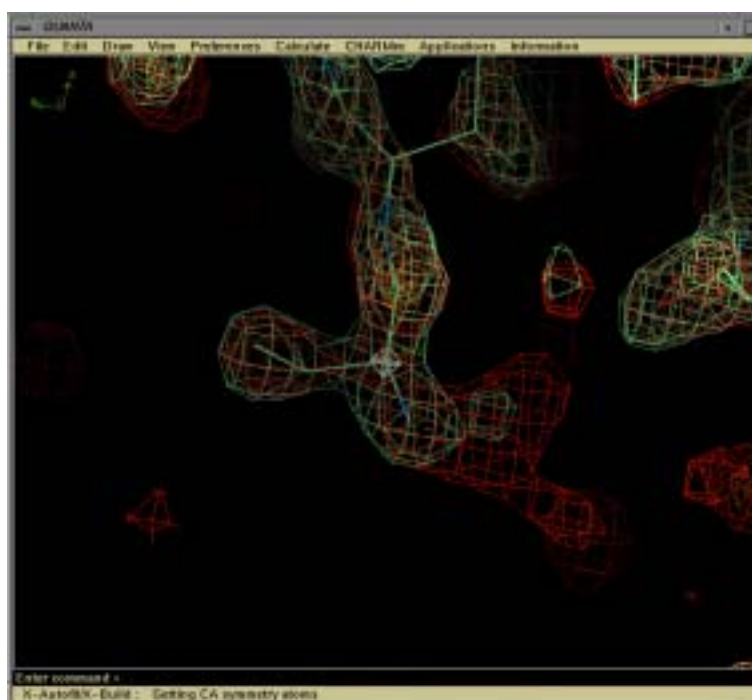


図 1 4 . Model building 途中における N 末端

このような場合には、X-AUTOFIT X-BUILD Palette の Build atoms をクリックします。すると、図 1 5 a に示すような Build atoms Palette が現れます。この Build atoms Palette から Add-delete...をクリックし、Add-delete Palette (図 1 5 b)を開きます。

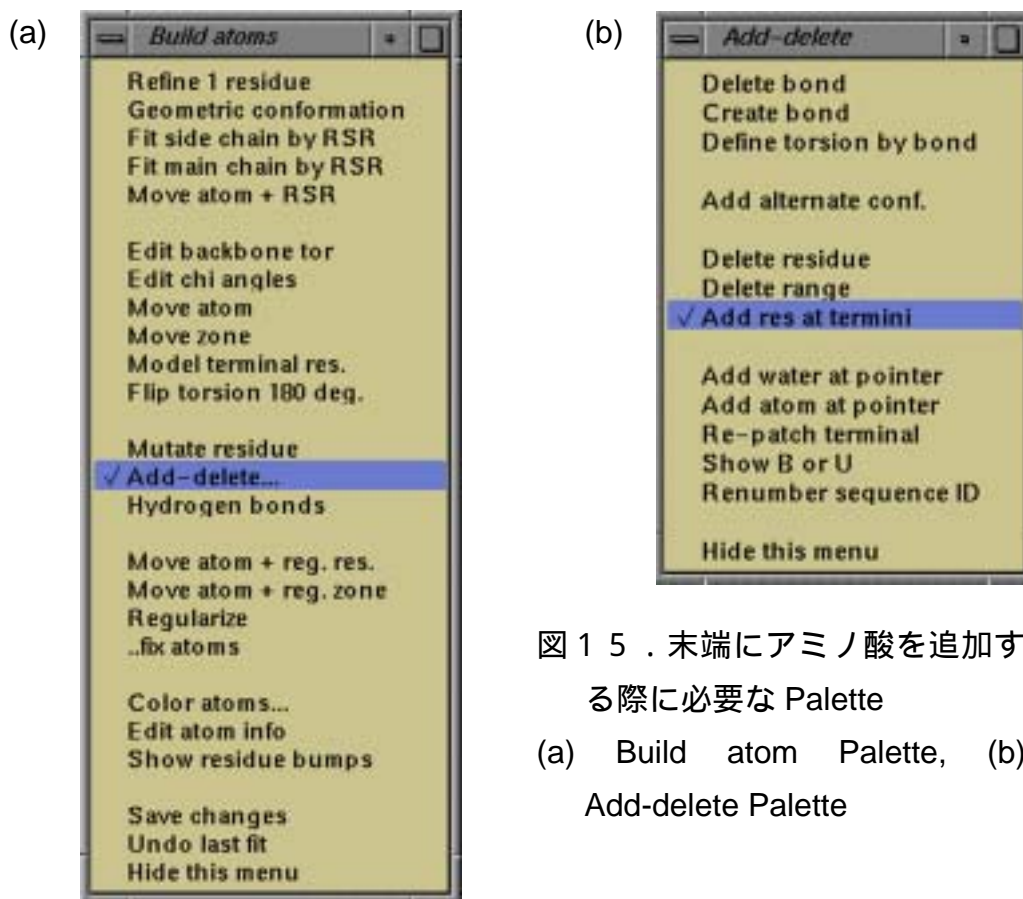


図 1 5 . 末端にアミノ酸を追加する際に必要な Palette  
(a) Build atom Palette, (b) Add-delete Palette

現れた Add-delete Palette より, Add res at termini をクリックし, Viewing Window からアミノ酸を付加したいペプチド末端を選択します. すると, どのアミノ酸を追加するのかを選択する Palette が現れるので (図 1 6), 相応しいアミノ酸を選択します. ここでは側鎖が見えていないので Glycine を選択しました. 挿入後の画像を図 1 7 に示します.

変更後は, 不慮の事故に備え, 出来るだけ素早く保存することをお勧めします. 保存の仕方は 3 種類あります.

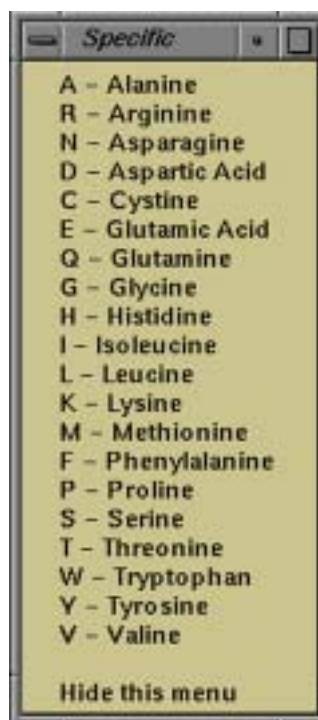


図 1 6 . アミノ酸選択 Palette

## X-AUTOFIT

X-BUILD Palette  
の下程にある,  
Save build CA to  
MSF, Save build  
atoms to MSF お  
よび Save build  
atoms to PDB を  
クリックするこ  
とでそれぞれ保  
存が出来ます.

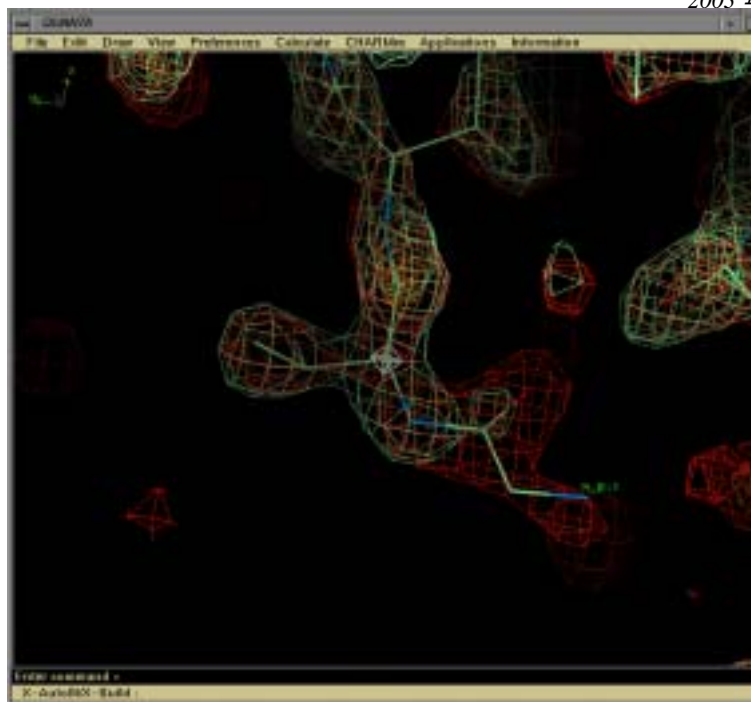


図 1 7 . N 末端に Glycine を付加した直後

## 4-2 アミノ酸の当てはめ

今回解析した蛋白質は,  
キュウリ種子から抽出さ  
れており, そのアミノ酸  
配列は現在のところ N 末  
端の 2 5 残基しか分かっ  
ていません. したがって,  
多くのアミノ酸は, 現れ  
た電子密度から側鎖を判  
断して行く必要があります.  
ここでは, 電子密度  
にアミノ酸を当てはめる  
ためにアミノ酸を置換す  
る方法について紹介しま  
す.

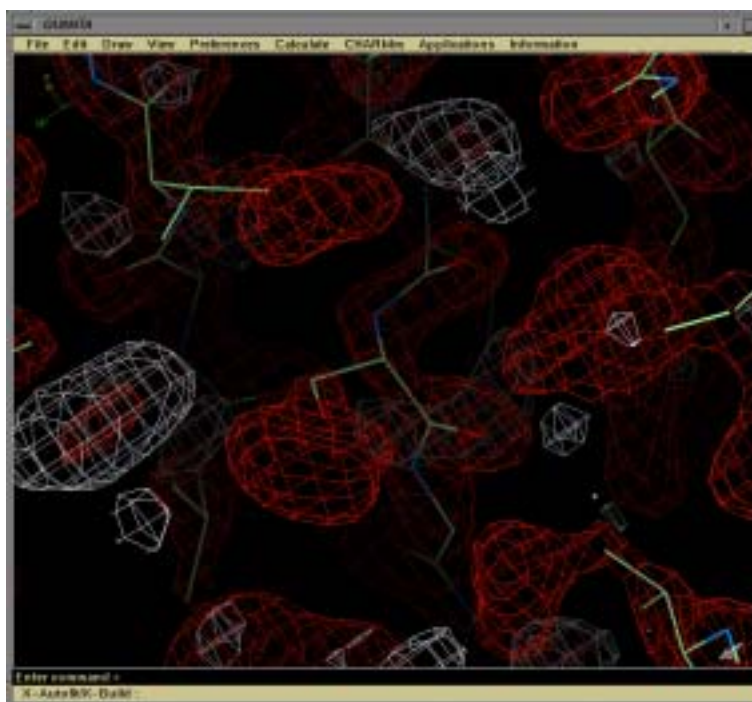


図 1 8 . キュウリ由来リボヌクレアーゼの活性部位

図 1 8 に本蛋白質の活性部位付近を示します. 図中の電子密度マップは, 赤色が fo-fc マップ, 白色が 2fo-fc マップです. この段階では, 側鎖は全アミノ酸残基が Ser, Val または Gly から成り立っており, 表示されている側鎖は正しくありません. しかし, fo-fc マップには活性部位に必須であるヒスチジンがはっきりと現れていることが分かります.



アミノ酸の置換を行う際には、X-AUTOFIT X-BUILD Palette の Build atoms をクリックし、Build atoms Palette の Mutate residue をクリックします。その後置き換えたいアミノ酸の C $\alpha$  原子(図 18 では画面中央の Ser を His に置換します)を Viewing Window から選択します。選択後、先ほどの末端へのアミノ酸付加の場合と同様のアミノ酸選択 Palette (図 19) が現れるので、目的のアミノ酸を選びます(ここでは His)。その結果、図 18 では Ser であったアミノ酸残基を His に置換することができます。置換の結果を図 20 に示します。

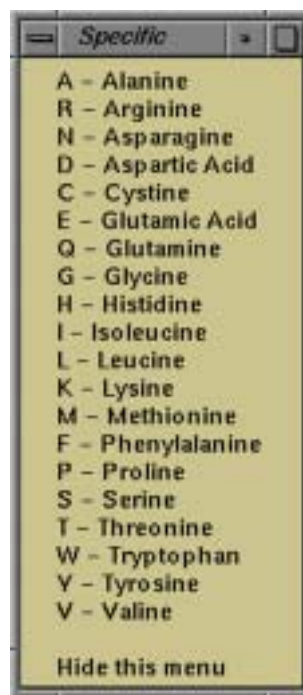


図 19 . アミノ酸選択 Palette

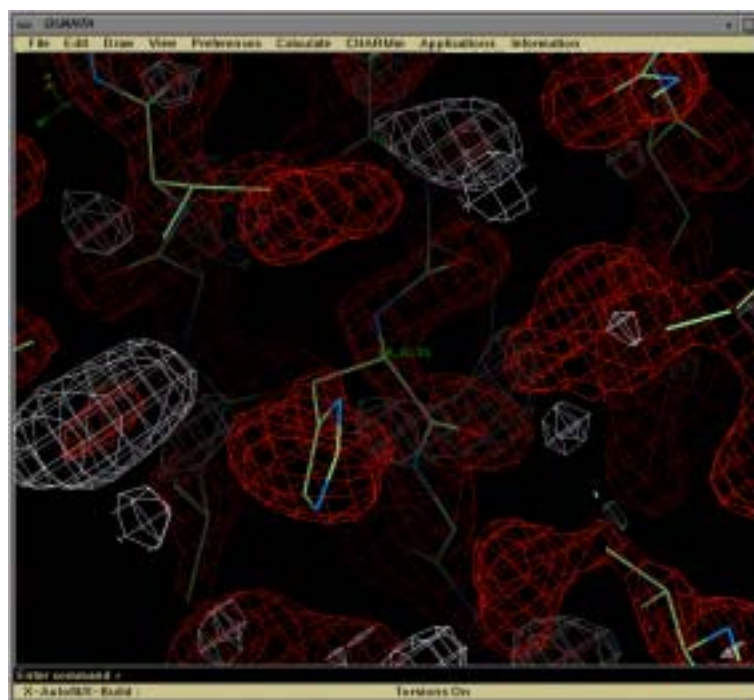


図 20 . アミノ酸をヒスチジンに置換した直後

アミノ酸を置換する場合、マップに合わせるように自動的に置換してくれるようですが、必ずしも正確に、マップに合って置換されるとは限りません。そこで、自動的に Fitting するためのツールとして Real Space Refinement (RSR) が存在します。このツールは側鎖と主鎖を別々に取

り扱うことができます。実際には Build atoms Palette の上から 3 または 4 番目にある Fit side chain by RSR または Fit main chain by RSR をクリックし、側鎖の場合は、目的のアミノ酸の C $\alpha$  原子を、主鎖の場合は N 原子をクリックします。側鎖の場合は、選択した原子より先の原子のみを Fitting するようです。したがって、場合によっては選択する原子を変更した方が良くかもしれません（私の経験上この操作を行った結果、側鎖がマップから大きく外れてしまうことが多かったです）。

もう一つの Fitting のための方法として、Edit backbone tor. と Edit chi angle が存在します。それぞれ主鎖および側鎖の torsion angle を調整するためのツールです。ここでは、Edit chi angle の使用について示します。Edit chi angle は、Build atoms Palette の 7 番目にあります。選択後、chi angle を調節したいアミノ酸残基の側鎖を Viewing Window よりクリックします（ここではヒスチジン側鎖の chi angle を調節します）。すると、Dial Emulator（通常は図 2 1 a）が図 2 1 b のように変化します。ただし、この Dial Emulator の下の数字をクリックすることで簡単に元に戻すことができます。

側鎖回転中は、各原子の回りにある原子で、3.0Å 以内にある原子との距離が表示されます（図 2 2）。これにより、不適当な原子同士の接近を防ぐための目安とすることができます。

Window 上のボタンをクリックし、右または左にドラッグすることで、側鎖を回転

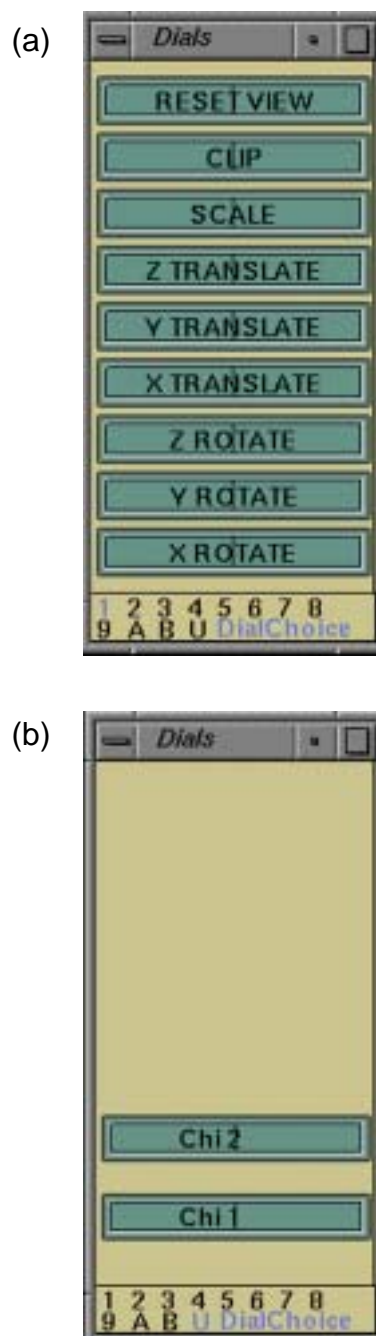


図 2 1 . Dial Emulator の変化  
(a) 初期画面，(b) Edit chi angle



させることができます ( 図 2 2 ) . 終了後 , Accept すれば変更が適用され , Quit すれば元に戻ります . また , Build atoms Palette の Undo last fit を選択することで , 直前に行った処理を取り消すことができます .

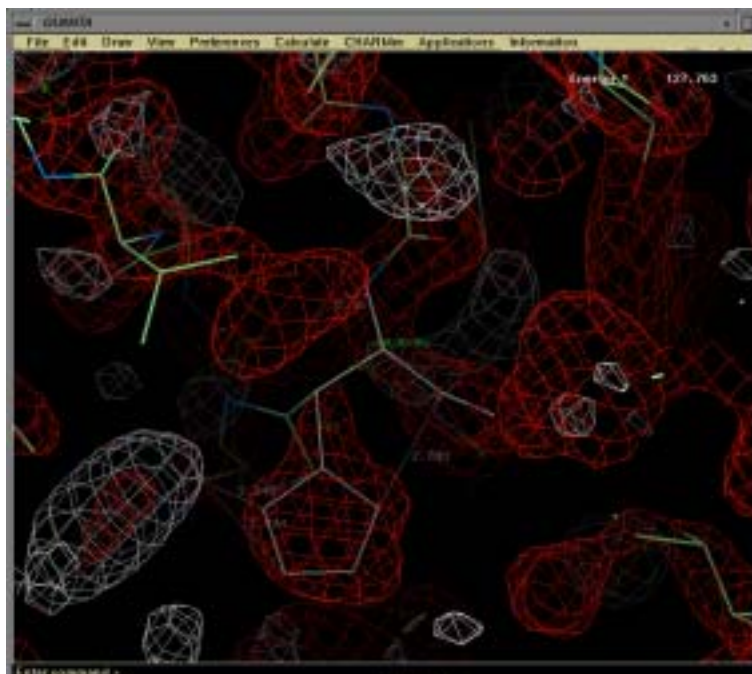


図 2 2 . 側鎖回転の様子

さらに別のアミノ酸を Fitting したい場合は , そのアミノ酸に中心を変更した方が都合の良い場合があります . こんなときには , Geometry Palette から Set Origin をクリックし , 中心に持てきたいアミノ酸の  $C\alpha$  原子などを選択すれば中心が変更されます . そして , Build atoms Palette の Mutate residue を選択し , アミノ酸の置換を行い , Fit side chain by RSR と Fit main chain by RSR または Edit backbone tor. と Edit chi angle による fitting を行います .

以上の操作を繰り返し , 活性部位のアミノ酸残基を全て置換した結果を , 図 2 3 に示します . この結果 , キュウリ由来リボヌクレアーゼの活性部位のアミノ酸はニガウリ由来 MC1 のそれと完全に一致していることが明らかになりました .

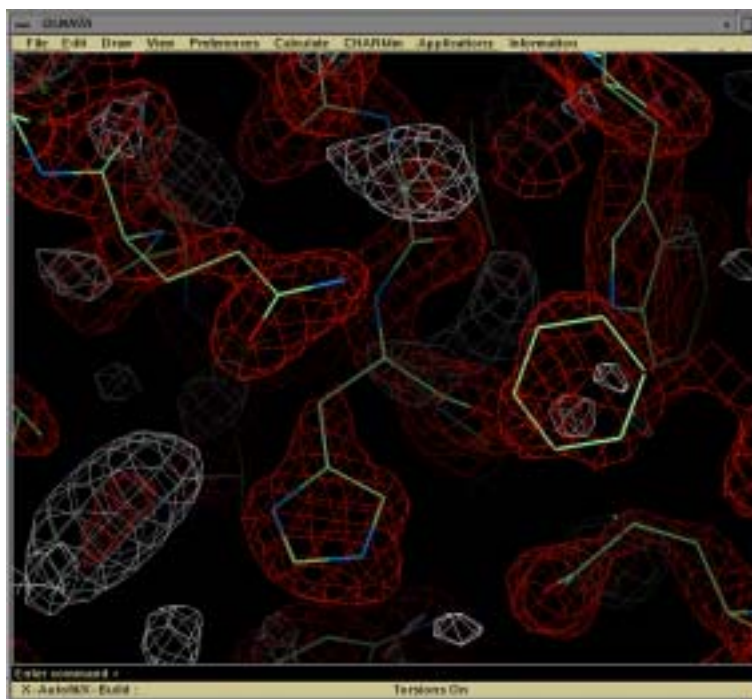


図 2 3 . 完全に置換されたキュウリ由来リボヌクレアーゼの活性部位

### **終わりに**

今回、ここで紹介した事柄は、私がつくば滞在中の最後の一週間の間にキュウリ由来リボヌクレアーゼの Model building を通じて知り得た、プログラム QUANTA の全機能の内の極一部にしか過ぎません。この他に Drawing ツールなど、試してみたい機能は多くあります。また、今回時間の都合により、BL6B で測定したデータを使用することが出来ませんでした。将来、このような解析システムをビームライン導入しようとした場合、位相計算とその後の解析との間に複雑な手続きを必要とせず、かつ構造振幅計算後のデータのやり取りにも手間がかからず、解析自体が自動的かつ迅速に行なうことが出来るのであれば、ビームタイム終了までに構造解析が終了していると言うことも可能なのではないかと思います。今後、皆様の使用により、これらの事柄が明確になり、この手引きがより完全なマニュアルへと進化して行くことを願って止みません。最後になりましたが、今回このような貴重な経験をさせて下さいました、坂部先生ご夫妻、構造解析の過程において適確なご助言を下さいました鈴木守氏に厚く御礼申し上げ、この文章を締めくくりたいと思います。