

実践、Sparky での手動連鎖帰属

はじめに

本講座で使用する資料は、北海道大学 先端 NMR ファシリティの共用促進プログラムのなかで「装置実習コース 蛋白質・基礎」にて 2016 年から 2020 年の間に使用したものを手直しして流用している。そのため内容が少し古い。あらかじめ了承願いたい。

本資料では $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識された nfe11 を用いたスペクトルセットを使用している。サンプルは筆者が博士号を取得する際にお世話になった現北大理学部所属の津田栄先生に調整いただいた。NMR 測定は筆者がポスドクになってからお世話になった現石川県立大学の小椋賢治先生に実施いただいた。この場を借りて感謝申し上げる。

nfe11 は魚類からとれる不凍タンパク質の一種である。分子量が小さく（約 7 kDa）、そのわりに各アミノ酸が満遍なく含まれている。さらにスペクトルが綺麗で初心者にとっては解析が容易である。また構造解析を最終目標とした測定を実施しており、この資料においては側鎖帰属手順を含んだ解説になっている（構造解析部分についてはこの資料から除外した）。本講座では Sparky の基本的な操作方法および主鎖帰属チュートリアルを実施予定だが時間があれば側鎖帰属チュートリアルについても実施する。

1. Sparky について

Sparky は NMR スペクトルを描画し、解析するためのソフトウェアであり、非常に多くの溶液タンパク質 NMR 解析を行う研究者によって利用されている。無料で使用でき、使い勝手が良いのと拡張性が高いことが主な要因と思われる。

NMR スペクトルの解析操作には、信号の帰属（各原子の化学シフト値の決定）、ピーク強度の算出等がある。帰属や信号強度のデータは、その後に構造計算ソフトや計算ソフトに移行し、解析操作を進める。Sparky format の出力ファイルは、それら後続するソフトウェアにおいてよくサポートされている。

Sparky パッケージは、各種フォーマットのスペクトルファイルについて、Sparky フォーマットのスペクトルファイル（ucsf ファイル）に変換するスクリプトと ucsf ファイルを描画するためのプログラムファイル本体、各種のライブラリーファイルなどで構成されている。また、Sparky は Windows, MacOS, Linux 等の幅広い OS 上で動作し、それぞれの互換性も良い。

Sparky を使用し、研究論文等で発表する際には、

T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3,
University of California, San Francisco

として引用し、必要であれば、URL (<https://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>) を記載すること。

Sparky 本家の開発はすでに停止している。だが後継ソフトとして NMRFAM-SPARKY の開発が継続されている。NMRFAM-SPARKY は、基本的な操作方法是 Sparky と同じだが、便利な機能拡張が実施されている。また NMRFAM-SPARKY はアカデミックフリーであり、企業利用や商用利用は有償となっている。

Sparky 本家ウェブサイト

<https://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>

NMRFAM-SPARKY ウェブサイト

<https://nmrfam.wisc.edu/nmrfam-sparky-distribution/>

1-1. Sparky の起動とワークスペース

本講習では、Windows 11 にインストールした Sparky を用いる。

また、本講習範囲外ではあるが、以下についてインストールを推薦する。

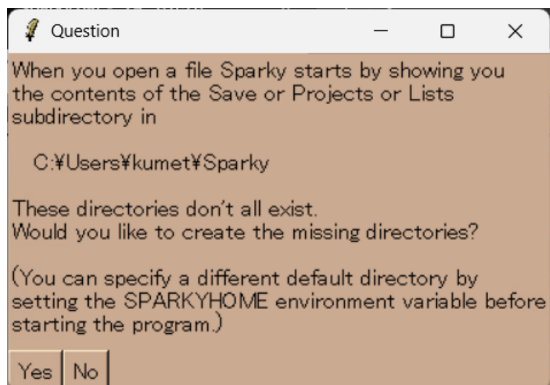
TopSpin for academic

bruk2ucsfGui

どちらも Bruker の装置にて測定したデータを Sparky で解析できるようにするために用いる。

Sparky の起動は sparky.bat から行う。

初めて Sparky を起動したときに、



と表示される。ここで Yes とすると、ユーザーディレクトリ（上記の C:\Users\kumet）に Sparky ディレクトリ（ワークスペース）が作成される、その下には、

Lists Projects Save

のサブディレクトリが作成される。

Sparky ワークスペースに ucsf ファイルをまとめて入れるためのディレクトリ、Spectra を作成する。

各サブディレクトリの役割などについては、以下のようになっている。

Lists	Sparky 上での操作により出力されたファイル等が入るディレクトリ 化学シフトファイルや画像出力ファイル（Postscript ファイル）がここに入る
Projects	複数のスペクトルをまとめて管理するときに使用する Project ファイルがここに入る。複数のスペクトル間での同期や重ね合わせ、複数スペクトルにまたがった化学シフトの統計値などは Project ファイルに記載されている 例えば、LC3.proj や LC3_Atg4B_Ctail1_titration.proj など
Save	ucsf ファイルに関する情報は ucsf ファイルとは別に Save ファイルとして、このディレクトリに保存される Save ファイルには ucsf ファイルの場所、描画情報（等高線の数や色など）や各信号のピーク情報（化学シフト値、オーナメント情報等）が記載されている Nhsqc.save や hnco.save など
Spectra	ucsf ファイルをまとめておくためのディレクトリ Nhsqc.ucsf や hnco.ucsf など

1-2. ucsf ファイル名

Sparky で取り扱う ucsf ファイルの名前は、基本そのまま Save ファイル名になる（Nhsqc.ucsf には Nhsqc.save）。主鎖帰属や滴定実験の解析作業では多くのスペクトルファイルを取り扱うため、互いに名称がかぶらないように工夫すること。また、スペクトルごとに個別にウィンドウが開く。

このとき、ウィンドウ上部に Save ファイル名が表示される。多数のウィンドウを並べて表示していると、このウィンドウ上部のファイル名表示が短くなる。そのため、短いウィンドウ幅でもスペクトル名が識別できるように、ファイル名はできるだけ短い名前にしておくことをお勧めする。

以下は、筆者が使用しているファイル名の例である（本講座では使用しないスペクトルも含まれている）。

スペクトル名	ucsf ファイル名	スペクトル名	ucsf ファイル名
[¹ H- ¹⁵ N] HSQC	Nhsqc	[¹ H- ¹³ C] HSQC Aliphatic	Chsqc
[¹ H- ¹³ C] HSQC Aromatic	ChsqcArom	HNCO	hnco
HN(CO)CA	hncoca	HNCA	hnca
CBCA(CO)NH	cbca	HNCACB	hncacb
HBHA(CO)NH	hbha	HN(CA)HA	hncaha
C(CO)NH	cconh	H(CCO)NH	hcconh
(HCA)CO(CA)NH	hcacocanh	¹⁵ N-NOESY	nnoe
¹³ C-NOESY Aliphatic	cnoe / cnoeA / cnoeB	¹³ C-NOESY Aromatic	cnoeArom
HCCH-TOCSY Aliphatic	hcch / hcchA / hcchB	CCH-TOCSY Aliphatic	cch / cchA / cchB
HCCH-TOCSY Aromatic	hcchArom	CCH-TOCSY Aromatic	cchArom
HbCbCgCdHd	CBHD	HbCbCgCdCeHe	CBHE
Steady State NOE (on/off)	ssNOEon / ssNOEoff	titration (0.0 - 3.0 eq)	tit_00... tit_30

¹³C-NOESY Aliphatic, HCCH-TOCSY Aliphatic, CCH-TOCSY Aliphatic は分解能向上のため、¹³C 軸について折り返し測定を行うことがある。Sparky 上での折り返した信号の解析には Fold Spectrum を使用することができる。Fold Spectrum はスペクトルの軸幅にて折り返しを行い、スペクトルを表示させることができる。しかし、Aliphatic 側鎖帰属の解析のときに HCCH-TOCSY スペクトルどうしにおいて、折り返し前のスペクトルと折り返し後のスペクトルを比較する必要がある。このとき Fold Spectrum の機能を使用するとスペクトルの比較ができない。そのため、これを使用せず全領域をカバーできるように nmrPipe の CS (circular shift) を使用してスペクトルファイルを2種類用意するようにしている。この2種類の同じスペクトルを基にした ucsf ファイルについては、hcchA, hcchB のようにしている。

2. フォーマット変換

Agilent (旧 Varian) の VNMR, Bruker の TopSpin など各装置付属のソフトウェア上で FT されたスペクトルファイルや nmrPipe で処理されたスペクトルファイルなどを Sparky フォーマットのスペクトルファイル (ucsf ファイル) に変換する. VNMR や nmrPipe で処理されたスペクトルファイルは Linux で変換できる. TopSpin で処理されたスペクトルは Linux または Windows で変換できる.

2-1. nmrPipe ファイルからのフォーマット変換 (Linux)

nmrPipe フォーマットのスペクトルファイルは大抵の場合, 2 次元は一つのファイル, 3 次元以上は複数のファイルに分かれている. ucsf ファイルを作成するときには, 複数に分かれているファイルは一つにまとめてから, フォーマット変換する必要がある.

2 次元の nmrPipe スペクトルファイルとして, $[^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}]$ HSQC を例とする.

nmrPipe による FT 済みの測定データディレクトリに移動し, pipe2ucsf を使用してフォーマットの変換を行う.

```
$ pipe2ucsf Nhsqc.ft2 ~/Sparky/Data/Nhsqc.ucsf
```

3 次元の nmrPipe スペクトルファイルとして, HNCO を例とする.

nmrPipe による FT 済みの測定データディレクトリに移動し, xyz2pipe での単一ファイルへの変換を行い, つづけて pipe2ucsf によるフォーマットの変換を行う.

```
$ xyz2pipe -in ft/test%03d.ft -x > hnco.pipe
```

```
$ pipe2ucsf -123 hnco.pipe ~/Sparky/Data/hnco.ucsf
```

pipe2ucsf コマンドのオプション, -123 は ucsf 化した際の軸の順番変更を指定している. -123 は順番を変更しない. 順番を変更しないのであれば, このオプションは省略できる. 一方で, HCCH-TOCSY は-132 のように X 軸と Y 軸を入れ替えた方が解析を行いやすい.

nmrPipe フォーマットのスペクトルファイルのヘッダー領域には測定の際の次元数が書かれている. 3 次元の測定について処理を行った際の途中のファイル (例えば HNCO での xy.ft2 や ft/test001.ft) を Sparky で確認するなどの場合,

```
$ pipe2ucsf xy.ft2 hnco_xyft2.ucsf
```

としても, xy.ft2 のファイルサイズが計算値より小さいため処理できない旨が表示され処理されない. そのためヘッダー領域を書き換える処理を行ってから, pipe2ucsf を行う.

```
$ sethdr xy.ft2 -ndim 2
```

```
$ pipe2ucsf xy.ft2 hnco_xyft2.ucsf
```

擬似的な 3 次元測定方法 (Qseudo3D) を採用している緩和測定 (T1 や T2, R2 dispersion など) にも同様の処理が必要となる.

2-2. VNMR からのフォーマット変換 (Linux)

VNMR からのフォーマット変換には VNMR が入っている PC (通常は NMR 測定を制御するための PC) に Sparky がインストールされていると便利である。装置管理者 (または PC 管理者) にインストールの許可をとるか、インストールしていただくことを推奨する。

VNMR 上でスペクトルを表示する途中に生成されるテンポラリーなファイルを使用して ucsf ファイルを作成する。そのため、VNMR 上で FT をしたあとスペクトル描画をさせないで ucsf ファイルを作成する。以下の手順で行う。

- VNMR 上にて、見栄えのよいスペクトルになるように位相補正等を行う。
- VNMR 上にて、FT のコマンドを実行する。

```
trace='f1' f full dcon1 flush
```

- この状態のまま、Terminal を開き、FT した exp ディレクトリに移動し、以下のコマンドによって ucsf ファイルを作成する。

```
$ cd ~/vnmrsys/exp3
```

```
$ vnmr2ucsf procpair datdir/phasefile Nhsqc.ucsf N H
```

vnmr2ucsf 行の最後にある、N、H は軸のラベルである。適宜指定すること。

もし VNMR が入っている PC に Sparky をインストールできない (または、させてもらえない) 場合には、この phasefile ができている状態 (trace コマンドの行の直後) で exp ディレクトリごと Sparky が入っている PC までコピーし vnmr2ucsf のコマンドによる処理を行う必要がある。

2-3. Bruker フォーマットからの変換 (Linux)

Bruker 装置での TopSpin 等のソフトウェア上で FT されたスペクトルファイルは、プロセス番号ディレクトリの下に保存されている。2次元スペクトルは 2rr、3次元スペクトルは 3rrr のように保存されている。プロセス番号を 1 としていたときには、以下のように処理する。

```
$ bruk2ucsf 1/pdata/1/2rr Nhsqc.ucsf
```

このとき、パラメータファイルとして、1/acqus ファイル等が読み込まれているので注意する。

2-4. Bruker フォーマットからの変換 (Windows)

Windows 上での Bruker フォーマットからの変換には bruk2ucsfGui を用いる。

もし bruk2ucsfGui を取得していないのであれば、以下のウェブサイトからダウンロードする。

<https://github.com/oodegard/Bruk2ucsfGui>

[<> Code] より Download ZIP を選択する。ダウンロードされたファイル (Bruk2ucsfGui-master.zip) について zip 解凍展開する。解凍後にできるフォルダ内には、

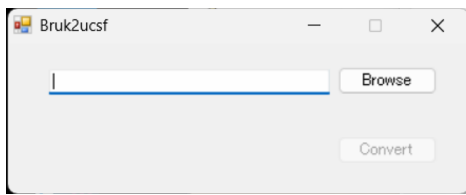
```
Bruk2ucsf/
```

```
bruk2ucsf.ext
```

```
bruk2ucsfGui.exe
```

```
README.md
```

がある。bruk2ucsfGui.exe を起動する。



Browse から、TopSpin で処理したスペクトルファイルを選択し、Convert する。

例えば 2 次元の $[^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}]$ HSQC であれば、2rr ファイルを選択し、Convert 後のファイル名は Nhsqc.ucsf とする。3 次元の HNCO であれば、3rrr ファイルを選択し、同様に hnco.ucsf とする。

2-5. ucsf ファイルヘッダーの編集 (Linux)

ucsf ファイルのヘッダー領域にはスペクトルの情報が記載されている。このヘッダー領域は元のスペクトルファイルから自動で読み込まれるが、FT 時のミス等や特殊な測定方法を行った場合には、ヘッダー領域を書き換える必要がある。例えば、Non-Linear Sampling 測定をし、rnmrtk による再構成を行った場合には軸ラベル情報が間違えられるため、

```
$ ucsfdata -a1 15N -a2 13C -a3 1H hncaS.ucsf
```

のように ucsfdata コマンドを使用して軸ラベルの修正を行う。

ヘッダー情報を確認するときには、

```
$ ucsfdata Nhsqc.ucsf
```

のようにする。

3. 基本的な操作方法

Sparky では、2 文字コンビネーションによるショートカットによる操作、ならびにマウスの各種ポインターモードによって解析を行う。本資料にて 2 文字ショートカットを使用する場合には、ダブルクォーテーション、"で囲んで表記する（例、"fo"）。pointer mode を変更するときには、割り当てられた Function キーとともに表記する（例、select (F1)）。

本講座では $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル nfe11 を用いて Agilent 600 MHz NMR で測定し、NMRPipe で処理をした以下のデータセットを用いる。

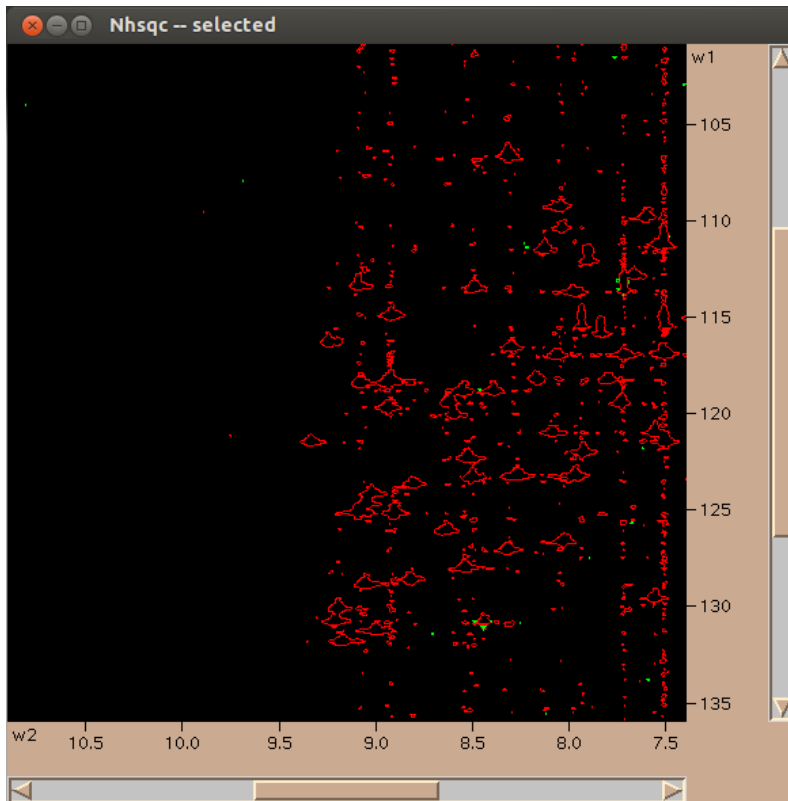
Nhsqc.ucsf	[^1H - ^{15}N] HSQC	hnco.ucsf	HNCO
hncoca.ucsf	HN(CO)CA	hnca.ucsf	HNCA
cbca.ucsf	CBCA(CO)NH	cconh.ucsf	C(CO)NH
hbha.ucsf	HBHA(CO)NH	nnoe.ucsf	^{15}N -NOESY
nnoe_arg.ucsf	^{15}N -NOESY (for Arg NE-HE)	Chsqc.ucsf	[^1H - ^{13}C] HSQC (Aliphatic)
hcch.ucsf	HCCH-TOCSY (Aliphatic)	cnoe.ucsf	^{13}C -NOESY (Aliphatic, 2D)
ChsqcArom.ucsf	[^1H - ^{13}C] HSQC (Aromatic)	cnoeArom2D.ucsf	^{13}C -NOESY (Aromatic, 2D)

nnoe_arg.ucsf は Arg の N_ϵ - H_ϵ 由来信号からの ^{15}N -NOESY 信号を参照するために nmrPipe で CS 処理し、高磁場側にシフトさせたスペクトルファイルである。

3-1. Sparky の終了と 2 次元ファイルの閲覧

Sparky を終了させるときには、"qt"とする。

"fo"にて Open File ダイアログを開く。最初に開いたときには Directory が Sparky ワークスペースの Save ディレクトリになっている。Spectra ディレクトリに移動し、Nhsqc.ucsf を Open する。



ノイズレベルの 5 倍の高さで等高線が 1 本ずつ正と負のそれぞれ赤と緑の線で表示されている。縦軸は w1 (15N の軸)、横軸は w2 (1H の軸) となっている。

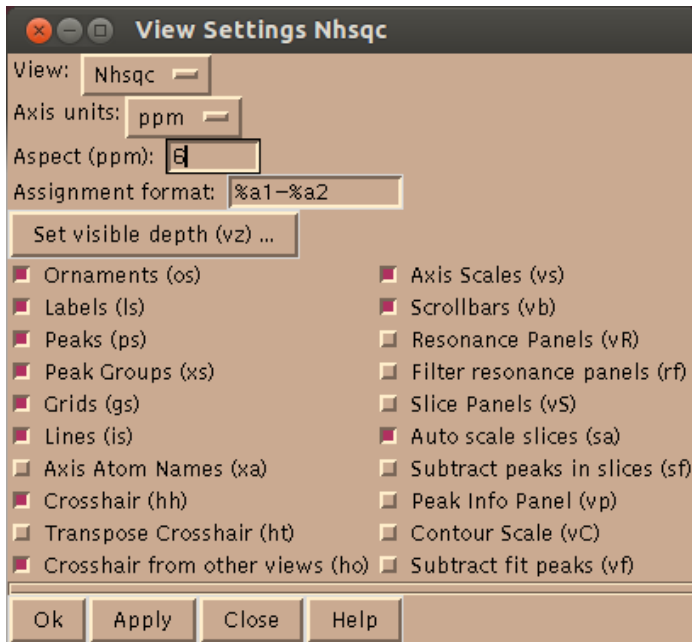
"ct"として Contour dialog を開き、適切な見栄えの良いスペクトルとする。



Positive, Negative の Lowest にそれぞれ 200000, -200000 (2e+05, -2e+05 としても同じ意味になる) を、Levels には両方 20 を入力し、Apply ボタンを押す。等高線が正負それぞれ 20 本ずつ表示される。等高線の間隔は前の高さの 1.4 倍位置に次の等高線を描画するように設定されている。

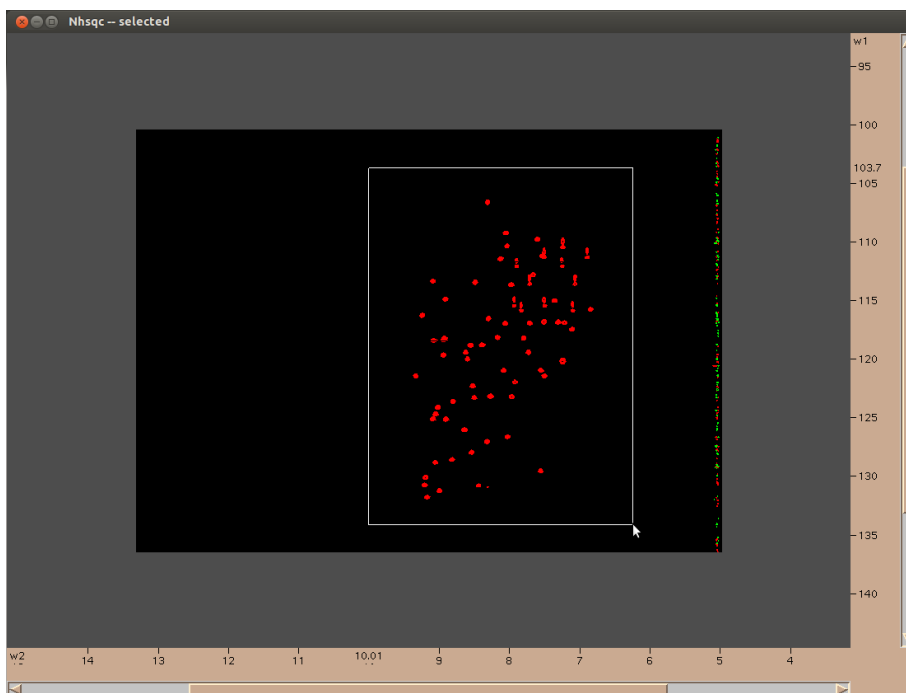
"vt"によって View Setting dialog を開き、Aspect (ppm)を 6.00 に変更する。

この View Setting ではその他に、スライス 1D を表示させたり ("vS"), 帰属済みの原子について表示させたり ("vR") できる。

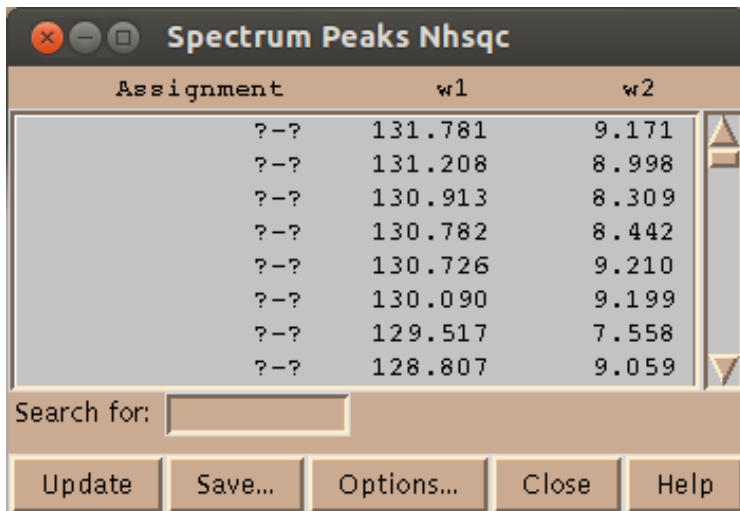


"zi", "zo"でズームイン、ズームアウトができる。ウインドウ右端や下端にあるスライダーで表示されているスペクトルの移動ができる。

Pointer Mode を find/add peak (F8) に変更し、ピークがある領域を取り囲むとピークピックされる。また囲まずに特定の位置をクリックしたときには、その場所がピークピックされる。

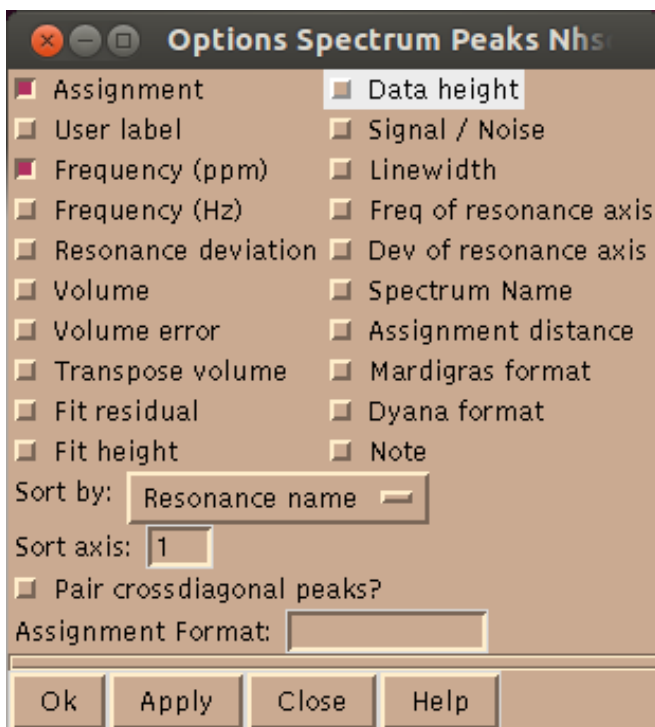


ピークピックされた情報は、"lt"で表示される Spectrum Peaks ウィンドウで確認ができる。



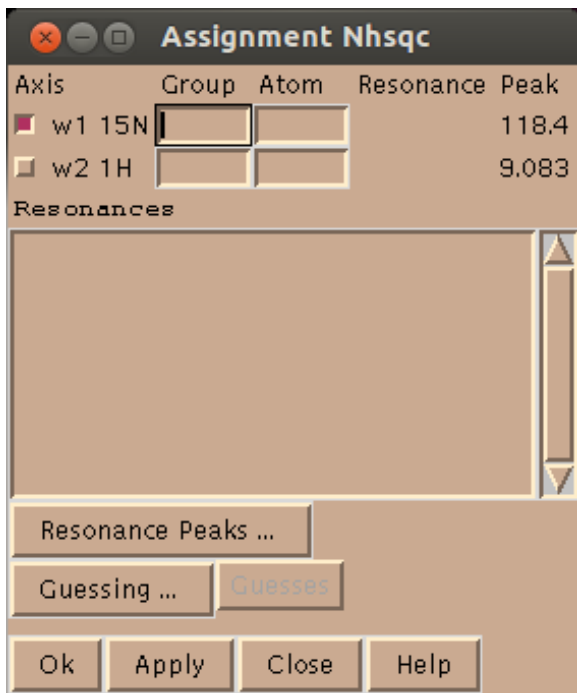
Assignment	w1	w2
?-?	131.781	9.171
?-?	131.208	8.998
?-?	130.913	8.309
?-?	130.782	8.442
?-?	130.726	9.210
?-?	130.090	9.199
?-?	129.517	7.558
?-?	128.807	9.059

帰属の情報（帰属していないので？-？で表示される）および w1 の軸（¹⁵N の軸）と w2 の軸（¹H の軸）ごとの化学シフト情報が表示されている．Options をクリックすることで表示について変更ができる．



例えば、ピーク強度の表示 (Data height や Volume) や帰属情報の表示順番の変更 (Sort by:), 表示フォーマットの変更 (Assignment Format:) ができる．

各信号について帰属を行うためには"at"として Assignment dialog を開く．

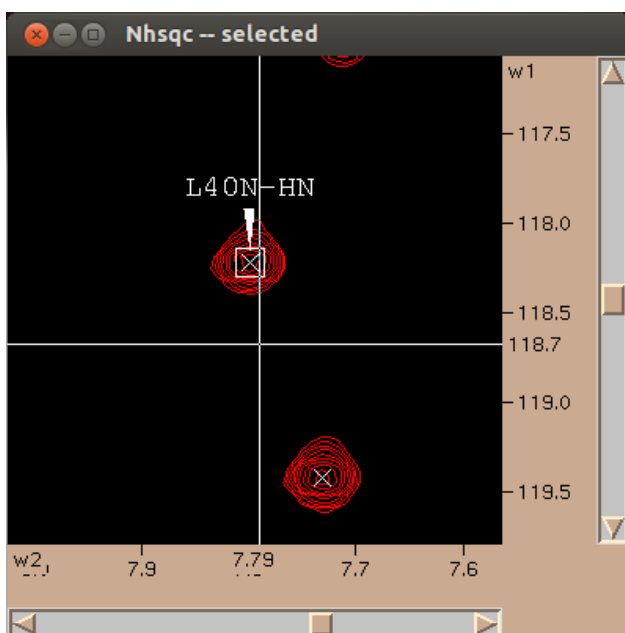


w1, w2 の軸それぞれに, Group 名と Atom 名をつけることができる. Group 名を一文字表記のアミノ酸と残基番号, Atom 名は CYANA 書式の原子名とする. 例えば, N=118.217, H=7.799 にある信号が Leu40 の主鎖アミドであれば, Pointer mode を select (F1)とし, その信号をクリックまたは囲むことで選択した状態にする (そのピークピックのみが四角で囲まれている状態).

Assignment dialog に,

Axis		Group	Atom
w1	15N	L40	N
w2	1H	L40	HN

と入力する. Atom 名は CYANA 書式とする. N は主鎖アミドの窒素原子, HN は主鎖アミドの水素原子を意味する. Apply を押す. するとスペクトル上に,



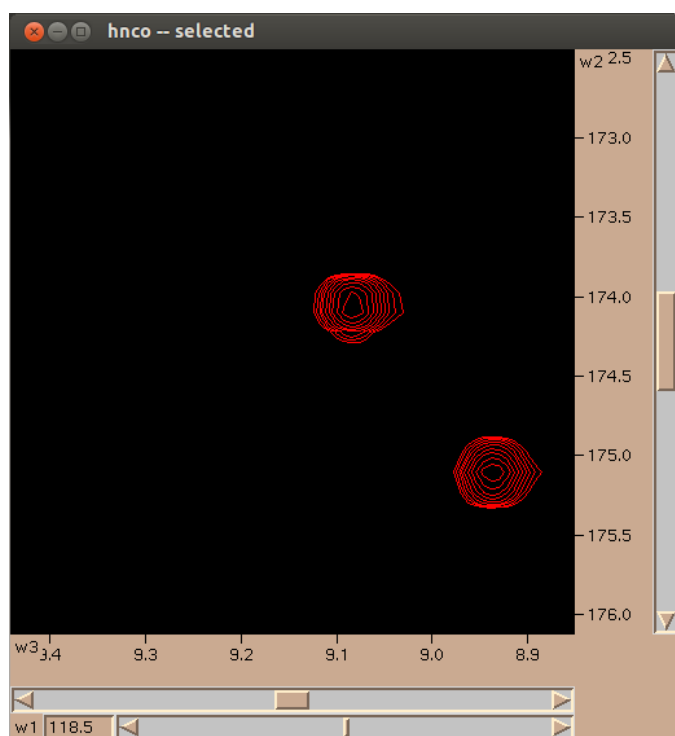
のように表示される．このスペクトル上に表示されている L40N-HN のことをオーナメント (ornament) と呼ぶ．

このオーナメントは Pointer Mode を select (F1)とした状態でのマウสดラッグにより自由に移動させることができる．オーナメント以外にも、ピークピックや grid 線 (add grid horz (F4)などで追加できる線)なども同じく Pointer Mode を select (F1)として移動させることができる．オーナメントは, "ot"として Ornament Properties dialog によって色や大きさを変更することができる．表示のフォーマットは"vt"の View Settings dialog の Assignment format:で指定ができる．

オーナメント, ピークピック, grid 線などは選択したのちに Del キーによって消去することができる．直前の操作についてやり直しをする場合には, "eu"とする．ただし, この"eu"は一つ前の操作のみやり直しすることができる．二つより前の操作については戻すことができないので注意が必要である．

3-2. 3次元スペクトルの閲覧と重ね合わせ/Nhsqc とのシンクロ

"fo"から hnco.ucsf を開く．"ct"や"vt"により, 見栄えの良いスペクトルにする．

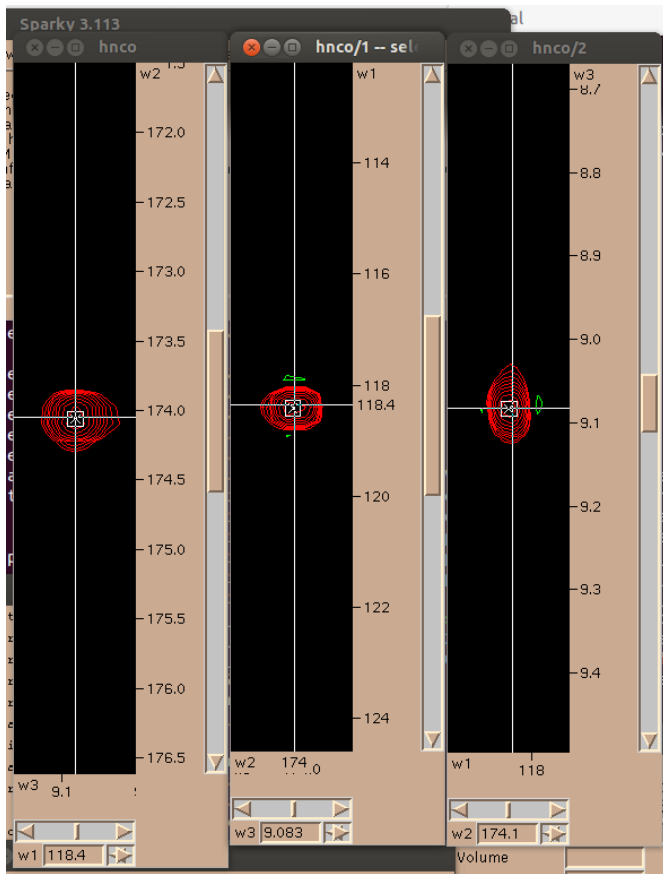


ここでは Lowest は $1\text{e}+06 / -1\text{e}+06$, Levels はどちらも 20 とし, Aspect (ppm)は 6.00 とした．

hnco のスペクトルは, w2 (13C の軸), w3 (1H の軸) の平面が w1 (15N の軸) ごとに表示されるようになっている．ウィンドウ下端に表示している平面の w1 化学シフト値, さらに移動のためのスライダーが表示されている．このスライダーを移動させる以外にも, ウィンドウ左下の w1 の横にある欄に化学シフト値を直接入力することでその平面へと移動できる．また, "zd", "zu"によって一枚下または一枚上の平面へ移動することができる．

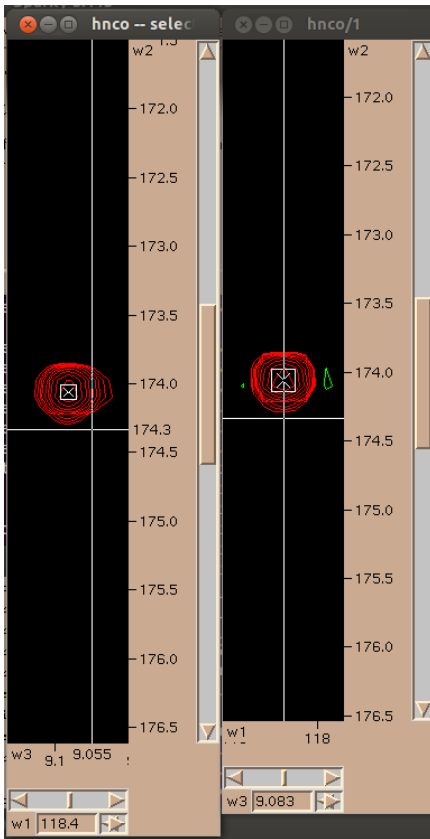
hnco で表示されている平面 (w3/w2 平面) 以外を表示させる．

Pointer Mode を find/add peaks (F8) とし、hnco 上で一つの信号を囲む。"lt" として Spectrum Peaks ウィンドウにて hnco スペクトル上で一つの信号だけが選択されていることを確認する。"ov" によって hnco/1, hnco/2 を表示させる。



hnco/2 はウィンドウのバツ印を押して閉じる。

hnco/1 上で"xx"とする。 hnco/1 上で"vt"として Aspect を 0.6 とする。



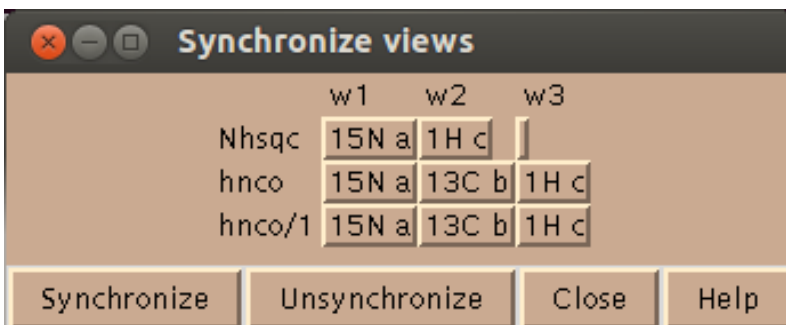
"ov"は、3次元以上のスペクトルについて、軸の交換を行う。"ov"コマンド直後には、
 hnco は縦軸 w2 (13C の軸)、横軸 w3 (1H の軸)、奥行き w1 (15N の軸) で表示されていた。
 hnco/1 は縦軸 w1 (15N の軸)、横軸 w2 (13C の軸)、奥行き w3 (1H の軸) で表示されていた。
 hnco/2 は縦軸 w3 (1H の軸)、横軸 w1 (15N の軸)、奥行き w2 (13C の軸) で表示されていた。

"xx"コマンドは、表示されているスペクトルの縦軸と横軸を交換する。そのため、上記一連の操作を行うと、

hnco は縦軸 w2 (13C の軸)、横軸 w3 (1H の軸)、奥行き w1 (15N の軸) と

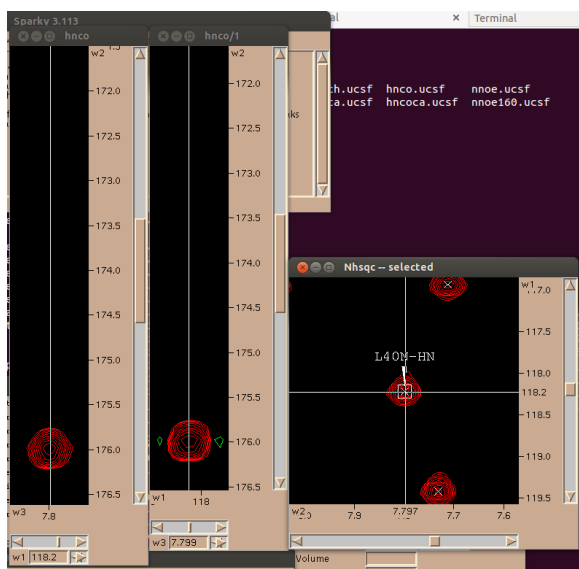
hnco/1 は縦軸 w2 (13C の軸)、横軸 w1 (15N の軸)、奥行き w3 (1H の軸) になる。

"yt"として Synchronize views dialog を開く。Nhsqc の 15N と hnco の 15N a を選択し、Synchronize ボタンを押す。続けて、Nhsqc の 1H と hnco の 1H c を選択し、Synchronize ボタンを押す。



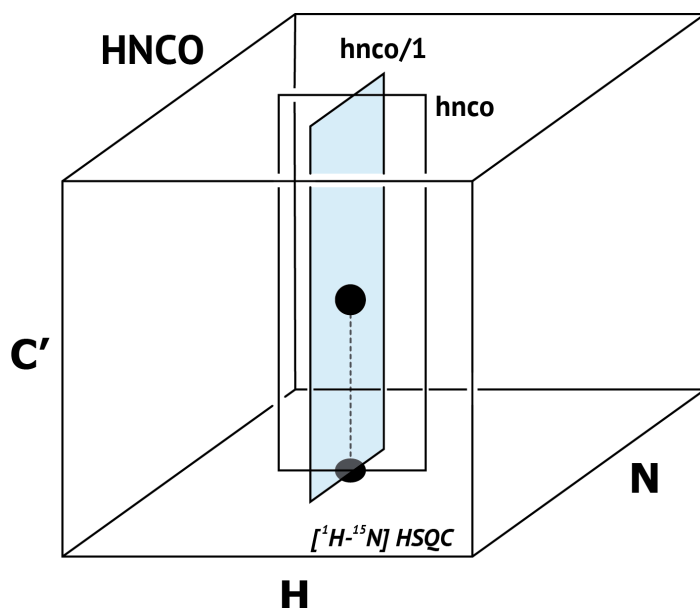
Synchronize ボタンを押した後、Nhsqc の 15N が 15N a に、1H が 1H c になる。小文字の a～c はそれぞれシンクロさせている軸を表している。シンクロを解除したい時には、解除したい軸が選択されている状態で Unsyncronize ボタンを押す。

Nhsqc 上で"lt"により、ピークリストを表示させる。そのうちの一つについてダブルクリックする。ここでは先ほどの L40N-HN をダブルクリックする。

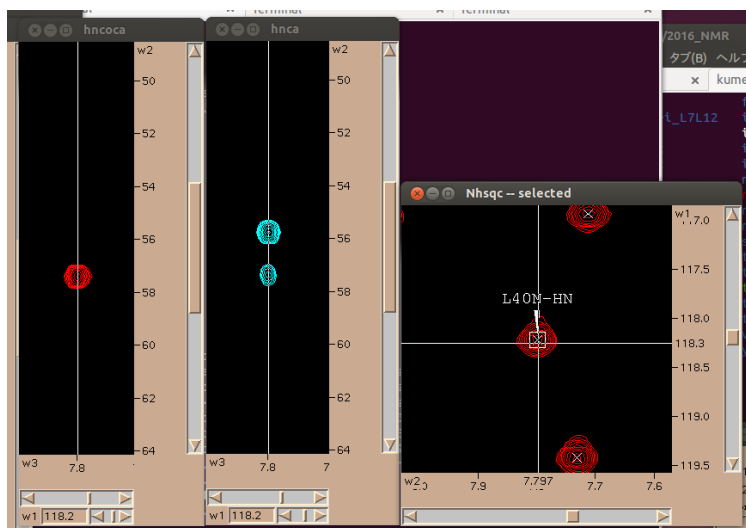


L40N-HN の信号とシンクロした hnco および hnco/1 上に 3 次元信号が一つ観測されている。このとき、Nhsqc 上の信号付近にカーソルをあわせると hnco や hnco/1 上に縦線が表示される。それぞれの軸についてカーソル位置と同じ化学シフト値に縦線が引かれる。これをクロスヘア (crosshair) と呼ぶ。

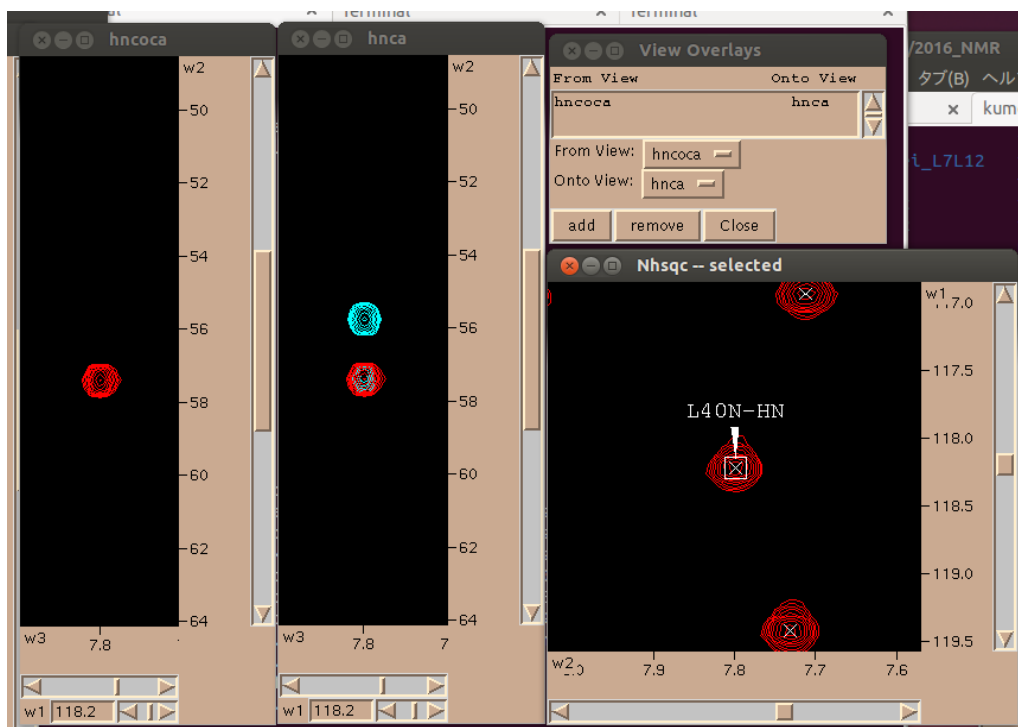
ここまでの操作によって、Nhsqc の信号一つに対して、hnco, hnco/1 によってそれぞれ、HN-C のスライス平面 (w3/w2 平面) および N-C' のスライス平面 (w1/w2 平面) によって 3 次元スペクトルが確認できる状態になっている。



hnco と同様に "fo" によって hncoca と hnca を開く. "ct" によって, どちらのスペクトルとも lowest を $5e+05/-5e+05$ とし, levels はすべて 20 とする. "vt" によって Aspect を 12.0 とする. hnca については Positive の Color を Cyan とする. "yt" で Nhsqc とのシンクロを行う. このとき hncoca と hnca の ^{13}C の軸もシンクロを行う (hnco の ^{13}C 軸とはシンクロさせない). L40N-HN について表示させる.



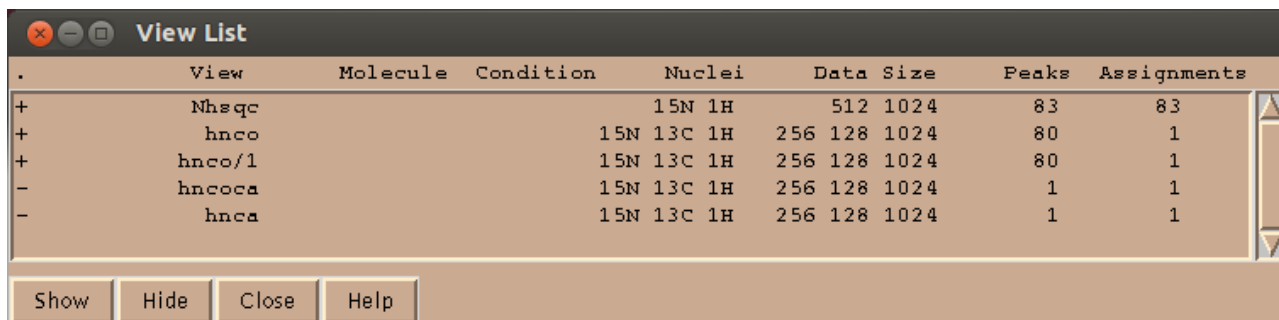
hncoca では Nhsqc 上の主鎖アミド信号から一つ前の残基の $\text{C}\alpha$ 由来の信号が観測される. hnca では同じ残基内の $\text{C}\alpha$ 信号が観測されるが, 一つ前の残基についても $\text{C}\alpha$ 信号が観測される (残基内 $\text{C}\alpha$ より弱い信号). "ol" によって View Overlays dialog を開く. From View: を hncoca とし, Onto View: を hnca として add ボタンを押す. hnca に hncoca が重ねられた状態で表示される (スペクトルの重ね合わせ).



重ねられているスペクトルは描画のみであり, Pointer Mode を add/find peak (F8) としてもピー

クピックされない（ただし上記の場合にはその下にある hnca の信号（cyan）がピークピックされる）。

複数のスペクトルを開いた状態では、帰属操作がやりづらい場合がある。そのため、解析に使用しないスペクトルを非表示にしておくとうまいだろう。"pv"にて View List dialog を表示させ、非表示にしたいスペクトルを選択し、Hide ボタンを押す。



View	Molecule	Condition	Nuclei	Data Size	Peaks	Assignments
+	Nhsqc		15N 1H	512 1024	83	83
+	hnco		15N 13C 1H	256 128 1024	80	1
+	hnco/l		15N 13C 1H	256 128 1024	80	1
-	hncoca		15N 13C 1H	256 128 1024	1	1
-	hnca		15N 13C 1H	256 128 1024	1	1

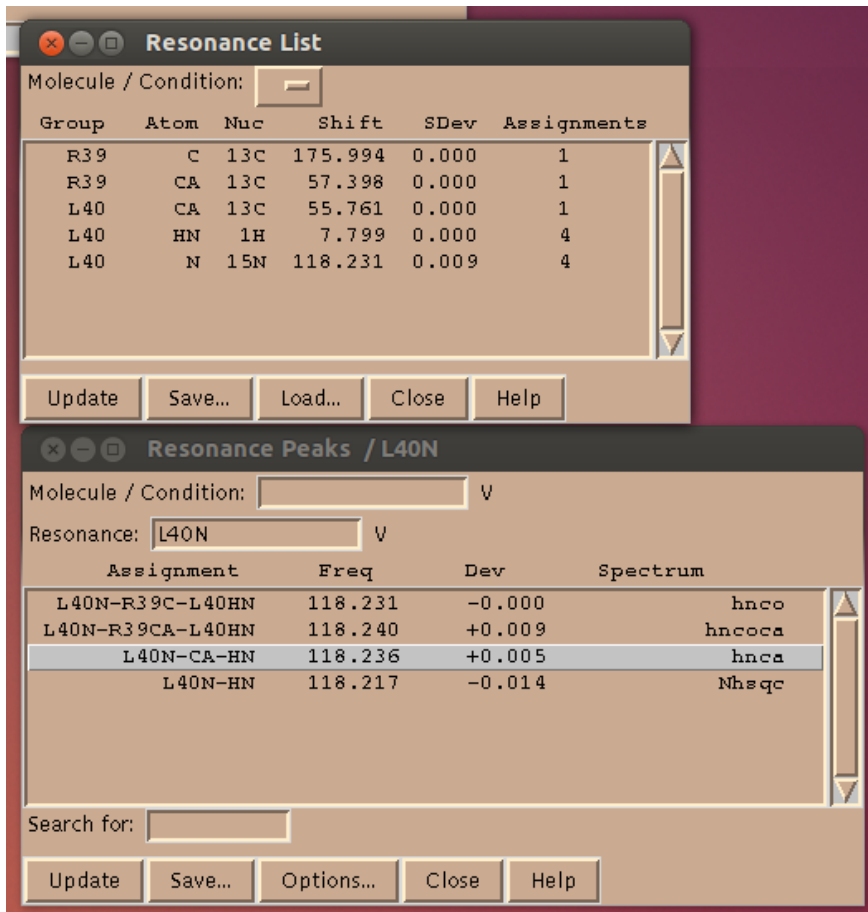
行頭にプラス記号がついているものが表示中、マイナス記号が非表示中を示している。

この View List には Peaks や Assignment として帰属状況が確認できる。Peaks はピークピックした数であり、Assignments は以降の仮帰属を含め"at"から名前をつけた数である。

3-3. Project の保存、読み込み

それぞれのスペクトルファイルについて、ピークピックの情報を保存するときには、Save ファイルが作成される。"fs"で保存、または"fa"で名前をつけて保存となる。通常の解析時には複数のスペクトルが同時に開かれており、それらをまとめて保存する。このときには Project ファイルを使用する。"js"または"ja"として保存する。この Project 保存では、シンクロや重ね合わせの情報および帰属の統計値が保存される。ただし、最初に Project 保存するとき、"js"では Project Save 名が noname.proj になっており、これは保存されない。そのため"ja"として名前をつけて保存する。主鎖帰属や構造解析ではタンパク質名.proj, titration 等ではタンパク質名_Ligand 名.proj が良いだろう（ただし今回、あらかじめ配布した Sparky_NMR_lesson_AFP_nfe11_02_quick_start.tgz の中には nfe11.proj があるため別名にて保存する）。

Project ファイルの中には、化学シフト値の情報が記載されている。Sparky 上にて、この化学シフト値を確認するためには、"rl"として Resonance List ウィンドウを表示させる。また、この Resonance List ウィンドウ上の一つをクリックすると Resonance Peaks ウィンドウが開かれ、帰属に使用しているスペクトルのリストが表示される。



画像では Resonance List や Resonance Peaks の表示をわかりやすくするために R39 の C, CA, L40 の CA についても帰属を追加した状態で表示している（帰属に使用したスペクトルは Resonance Peaks の Spectrum 欄に表示されている）。Resonance List では帰属に使用された数が Assignment として表示され、その標準偏差値が SDev として表示される。Resonance List にて L40 の N を選択すると、Resonance Peaks にて L40N の帰属に使用されたピークピック情報の一覧が表示される。表示された一覧から一つを選択し、ダブルクリックすると、その信号を中心としてスペクトルが表示される。

Resonance List の下部に Load のボタンがある。これは外部より化学シフト値情報を読み込むためのボタンであり、BMRB などから入手した化学シフト値情報を Sparky format に変換してから読み込むことができる。読み込んだ化学シフト値はまだ帰属されていない原子は Assignment が 0 として登録される。すでに帰属されている原子については読み込みが無視される。

Sparky を終了したあとに Project を再開するには、"jo"として Project file を読み込む。

4. 主鎖帰属チュートリアル

主鎖帰属では、Nhsqc 上に観測された主鎖アミド信号についてどの残基に由来するのかを決定する。Nhsqc では側鎖アミド信号も観測されるため、それを除外して解析する必要がある。

帰属手順は、4-1) Nhsqc に通し番号をつける (仮帰属)。4-2) hnco の解析をしつつ、側鎖由来信号を見分ける。4-3, 4-4) 2 残基連鎖を多数作成する。4-5) 2 残基連鎖から連鎖クラスターを構築して、アミノ酸配列との一致領域を探し、通し番号から正しい名前に変更する。すべての Nhsqc 信号について帰属できるまで繰り返す。から構成される。

今回チュートリアルに使用する nfe11 のアミノ酸配列情報は以下の通り。

seq name:nfe11

M
 NQESVVA AVL IPINTAL TVG MMTTRVVSPT
 GIPAE DIPRL ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV
 KGYAPA

Gly(G):	4	Ala(A):	6	Val(V):	10
Leu(L):	4	Ile(I):	5	Met(M):	7
Cys(C):	0				

Asn(N):	3	Gln(Q):	3
Asp(D):	2	Glu(E):	2

Pro(P):	7	Ser(S):	3	Thr(T):	7
---------	---	---------	---	---------	---

Phe(F):	0	Tyr(Y):	1
Trp(W):	0	His(H):	0

Lys(K):	1	Arg(R):	2
---------	---	---------	---

M
 NQESVVA AVL IPINTAL TVG MMTTRVVSPT
 GIPAE DIPRL ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV
 KGYAPA

M
 NQESVVA AVL IPINTAL TVG MMTTRVVSPT
 GIPAE DIPRL ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV
 KGYAPA

N 末端の Met 残基はクローニングアーティファクト配列であり、この残基番号は 0 とする。このコンストラクトは全 67 残基であり、内 Pro が 7 残基含まれている。Nhsqc では N 末端主鎖アミドは交換が速く観測されないため、理論上、67-7-1 の 59 個の主鎖アミド由来信号が観測されるはずである。

主鎖帰属や構造解析に用いる溶液タンパク質サンプルにおいて、残基数、Pro 残基の数、Asn/Gln の数等は、とても重要な要素であるので、あらかじめ準備しておく（できれば測定を開始する前から）。

4-1. Nhsqc 信号に通し番号をつける

まず Nhsqc にて、すべての信号をピークピックする。"ct"の lowest が 2e+05/2e+05 であれば、83 個のピークピックが行われるはずである。ピークピック後、"js"にて Project を保存する。保存名は nfe11.proj とする。

すべての信号について仮帰属を行う。仮帰属には通し番号をつける。Nhsqc で観測される信号の大部分は主鎖のアミド由来であるため、以下のようにつける。

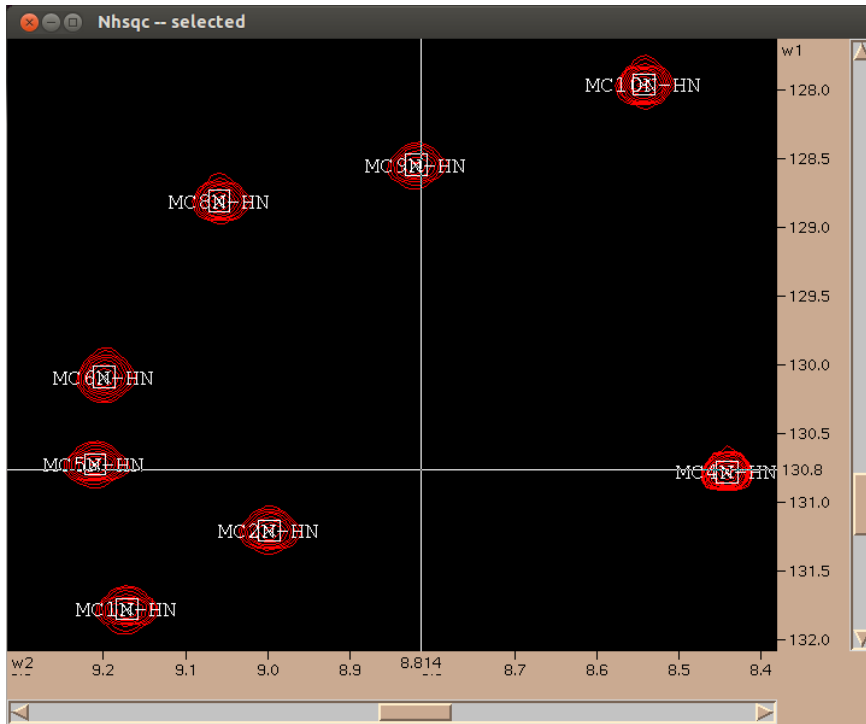
Axis		Group	Atom
w1	15N	MC1	N
w2	1H	MC1	HN

MC は主鎖 (main chain) を意味している。MC のうしろにある数字が通し番号である。同じ残基に由来する場合、Group 名は同じとする。主鎖アミドの原子名はそれぞれ N と HN とする。

Nhsqc で観測される信号には主鎖アミド以外も観測される。Asn/Gln の側鎖信号であれば SC を用いる。アミノ酸の種類だけ特定できた場合には三文字表記のアミノ酸と通し番号により仮帰属する。Arg であれば、Arg1, Arg2 のように仮帰属する。最終的にどの残基に由来した主鎖アミドの信号であるのかが確定したときには、一文字表記のアミノ酸と残基番号にて帰属する。例えば、Asn1 であれば N1 とする。これらについては後のセクションにて適宜使用する。ここでは全てを MC として仮帰属する。

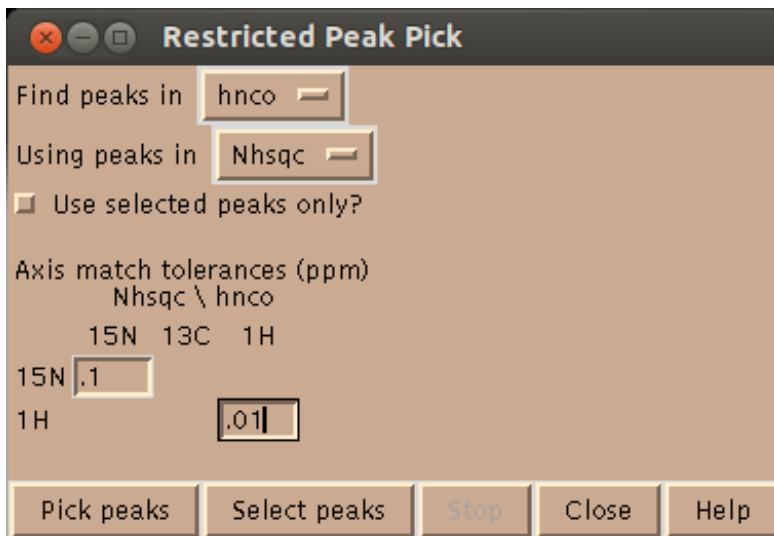
ここではすでに仮帰属した状態からチュートリアルを開始する。

"jo"として nfe11.proj を開く。



4-2. hnco の仮帰属と SC 判断

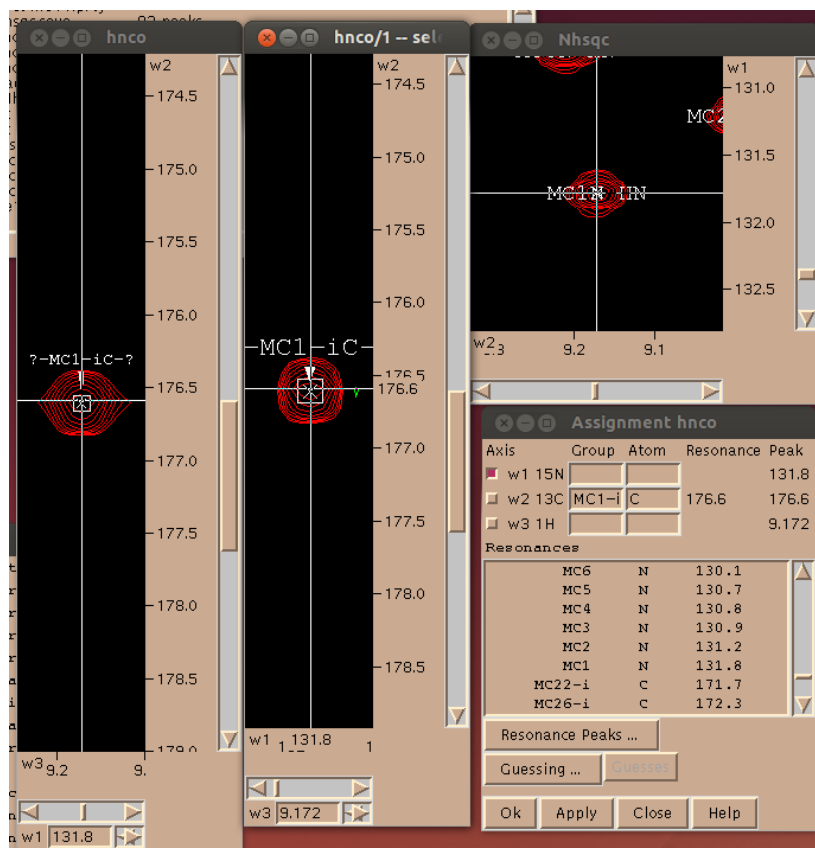
"kr" (Restricted peak pick) を使用して hnco 上のピークピックを行う。



"kr"で表示される Restricted Peak Pick dialog にて、Find peaks in を hnco に、Using peaks in を Nhsqc として、Axis match tolerances (ppm)は 15N を.1 に 1H を.01 に設定し、Pick peaks ボタンを押す。hnco の"ct"にて Lowest がそれぞれ $1e+06/-1e+06$ であれば合計 80 個の信号がピークピックされる。hnco で"lt"として Spectrum Peaks hnco を表示し、それぞれについて通し番号に従った名前をつけていく。

MC3 の信号は、MC4 の Multi form 由来信号なので、Nhsqc, hnco の信号を消去しておく。

また、hnco 上で小さな負の信号にピークピックされていることがある。これは近くにある大きな信号由来のリップルノイズなので、これも消去しておく。



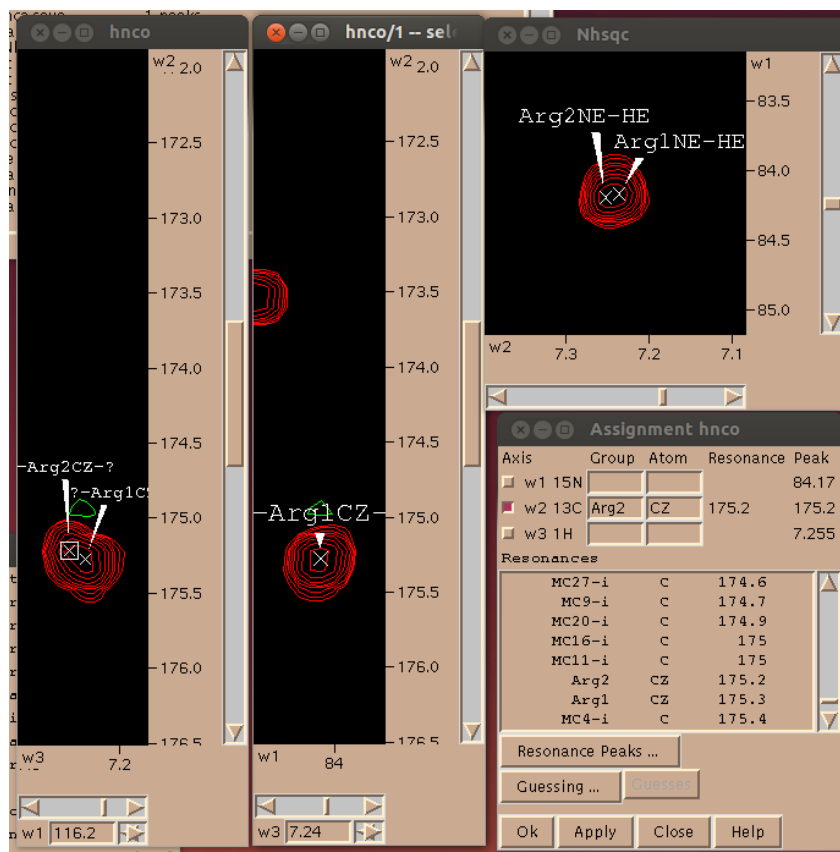
hncq では主鎖アミドの N や H に対して、直前の残基由来の C'原子が観測されるので、MCx の一つ前の残基を MCx-i として仮帰属する。CYANA 書式の主鎖カルボニル炭素原子は C なので

Axis		Group	Atom
w1	15N	MC1	N
w2	13C	MC1-i	C
w3	1H	MC1	HN

とする。15N や 1H の軸については仮帰属情報を入力しなくても良い（画像中では入力していない）。

MC28N-HN については hncq 上に信号が観測されない。この信号は Arg 側鎖 $N\epsilon-H\epsilon$ 由来信号 2 個が重なった信号である。Arg 側鎖 $N\epsilon$ は、80～90 ppm に化学シフト値を持っている。Nhsqc を測定したときに 15N 軸を 100～136 ppm の幅で測定をしたため折り返した位置に信号が観測されている。hncq は少し幅を狭めて 102.5～134.5 ppm で測定したため、異なる位置に折り返して観測されている。

Nhsqc 上で"F1"（F1 キーではない）として 15N 軸を高磁場側に Fold させる。hncq も同様に"F1"とする。Nhsqc の w1 軸スライダーを上方向に移動させて、84 ppm 付近を表示させる。MC28N-HN の信号を選択し一度消去する。改めてピークピックを行うが、これは重なった 2 つの Arg 側鎖 $N\epsilon-H\epsilon$ 由来信号が重なっているため、手動で 2 つピークピックする（pointer mode を find/add peaks (F8) としてピークのないところでピックをし、移動させて二つとする）。同様に hncq 上でも 2 つピークピックする。



Arg 側鎖 $N_{\epsilon}-H_{\epsilon}$ から hnco 上に同じ残基内の C ζ (CZ)が観測される. Nhsqc 上の Arg 側鎖 $N_{\epsilon}-H_{\epsilon}$ は

Axis		Group	Atom
w1	15N	Arg1	NE
w2	1H	Arg1	HE

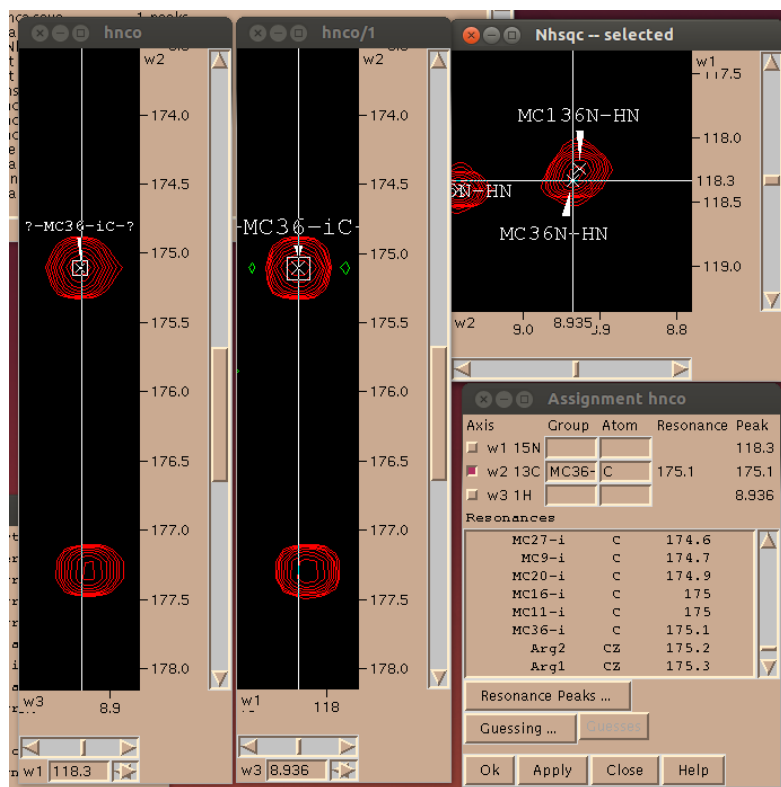
のように、仮帰属する. hnco では、

Axis		Group	Atom
w1	15N	Arg1	NE
w2	13C	Arg1	CZ
w3	1H	Arg1	HE

とする.

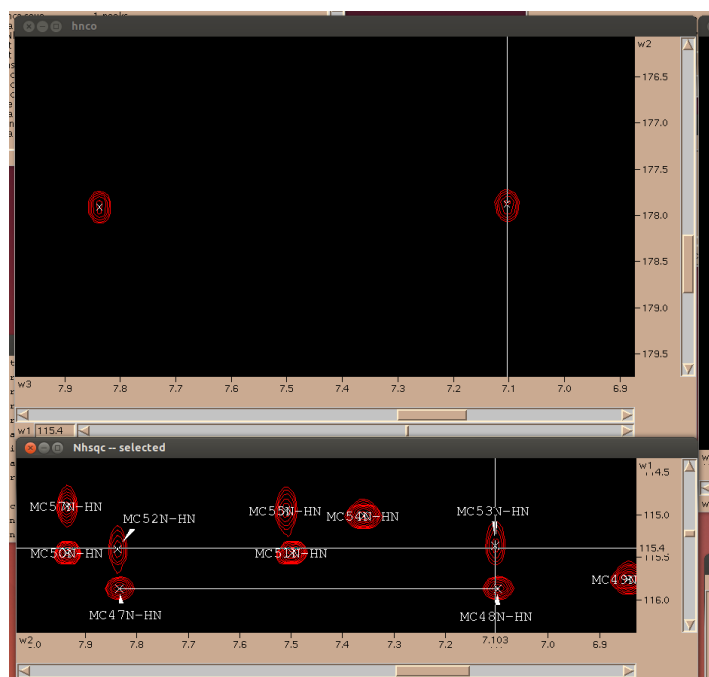
Arg 側鎖 $N_{\epsilon}-H_{\epsilon}$ の信号仮帰属が終了したら、Nhsqc, hnco とともに"f1"として 15N 軸を低磁場側に Fold させて元に戻す.

MC36 は Nhsqc 上にて二つの主鎖アミド由来信号が重なっている. Nhsqc 上に 2 つピークピックを行い、Nhsqc 上信号の左下側を MC36N-HN, 右上側を MC136N-HN とする. それぞれについて hnco 上で仮帰属する.

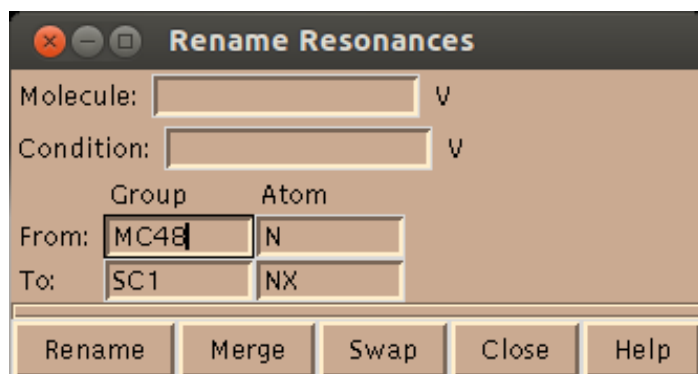


画面には表示されていないが, hnco の w2 の軸で 177.0 から 177.5 ppm の間にある信号が MC136N-HN 由来の信号として帰属した. crosshair を確認しながら仮帰属すること.

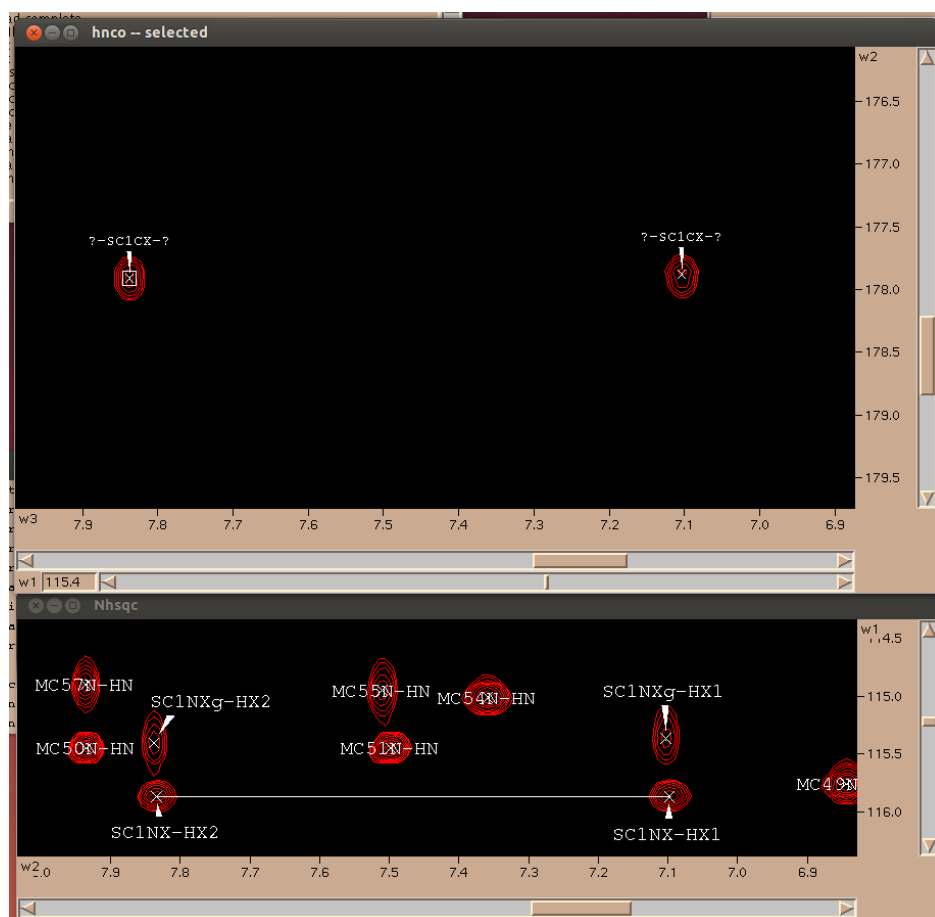
MC47, MC48, MC52, MC53 は Asn または Gln の側鎖由来の信号である. Asn/Gln の側鎖は NH₂ であり, MC47, MC48 は H が両方ともプロトン (N¹H¹H) の状態, MC52, MC53 は片方のプロトンが溶媒中の ²D₂O と交換し, N²D¹H の状態である. ²D と結合している N は高磁場シフトする. また, hnco を含む大部分の 3 次元スペクトルは ¹⁵N¹H¹H では観測されず, ¹⁵N²D¹H のときに観測される.



同じ残基内の側鎖由来信号であるため、SC1 として仮帰属名の付け直しを行う。このとき、"rr" による Rename Resonances dialog を使用する。



From に変更前、To に変更後の Group や Atom をそれぞれ入力し、Rename ボタンを押すと仮帰属名の付け直しができる。"at"による Assignment dialog でも同じような操作ができるが、変更前の MC が Assignments 0 として残ってしまう。Assignments 0 の帰属情報は後々の操作で邪魔になるので、消しておくことが望ましい。"rl"にて Resonance List を確認し、Assignments が 0 の MC が無いことを確認せよ。消去するときは"rr"にて From の Group 名に対象とする MC を入力し、他を空欄として Rename ボタンを押す。



SC は Asn または Gln の側鎖由来を意味する (side-chain)。この時点で Asn と Gln の区別がついていないため、原子の名前も不明となる。ここでは不明な原子として NX および HX1, HX2 を

使用することにする。また、NDH のときの N は他の 3 次元スペクトル解析の便宜上、NXg とする。同様に hnco で観測される信号も原子が不明なので CX とする。よって、Nhsqc 上では、

Axis		Group	Atom
w1	15N	SC1	NXg
w2	1H	SC1	HX1

Axis		Group	Atom
w1	15N	SC1	NXg
w2	1H	SC1	HX2

Axis		Group	Atom
w1	15N	SC1	NX
w2	1H	SC1	HX1

Axis		Group	Atom
w1	15N	SC1	NX
w2	1H	SC1	HX2

となり、hnco 上では、

Axis		Group	Atom
w1	15N	SC1	NXg
w2	1H	SC1	CX
w3	1H	SC1	HX1

Axis		Group	Atom
w1	15N	SC1	NXg
w2	1C	SC1	CX
w3	1H	SC1	HX2

となる。HX1 と HX2 については高磁場側を HX1 とした。

nfe11 には Asn 3 残基、Gln 3 残基があり、合計で 6 組の SC ができる。

SC1	MC47,48,52,53	SC2	MC50,51,55,57
SC3	MC59,60,65,66	SC4	MC68,69,70,71
SC5	MC73,74,76,77	SC6	MC78,MC80

SC6 は NH₂ の 2 つの ¹H が同じ化学シフト値を持つため、1H 軸は Pseudoatom (QX) として仮帰属する。

ここまでの操作によって Nhsqc 上には 82 個の信号が仮帰属されている (MC: 58, SC: 22, Arg: 2)。58 個の MC とつけた信号について、以下の操作を行う。

4-3. hncoca と hbha を使用して Chsqc 上に MCx-i の CA-HA 仮帰属

"fo"により、まだ開いていないスペクトル (cbca.ucsf, cconh.ucsf, hbha.ucsf, nnoe.ucsf, nnoe_arg.ucsf, Chsqc.ucsf, hcch.ucsf, cnoe.ucsf, ChsqcArom, cnoeArom2D) を順に開く。"pv"で確認する。

.	View	Molecule	Condition	Nuclei	Data Size	Peaks	Assignments
+	Nhsqc			15N 1H	512 1024	82	82
+	hnco			15N 13C 1H	256 128 1024	71	71
+	hnco/1			15N 13C 1H	256 128 1024	71	71
-	hncoca			15N 13C 1H	256 128 1024	1	1
-	hnca			15N 13C 1H	256 128 1024	1	1
-	cbca			15N 13C 1H	256 128 1024	0	0
-	cconh			15N 13C 1H	256 128 1024	0	0
-	hbha			15N 1H 1H	256 128 1024	0	0
-	nnoe			15N 1H 1H	128 512 1024	0	0
-	nnoe_arg			15N 1H 1H	128 512 1024	0	0
-	Chsqc			13C 1H	2048 2048	0	0
-	hcch			13C 1H 1H	256 2048 128	0	0
-	cnoe			13C 1H 1H	128 512 2048	0	0
-	ChsqcArom			13C 1H	256 1024	0	0
-	cnoeArom2D			1H 1H	512 1024	0	0

Show Hide Close Help

"yt"によってシンクロの設定を行う。ここでは以下のように設定した。

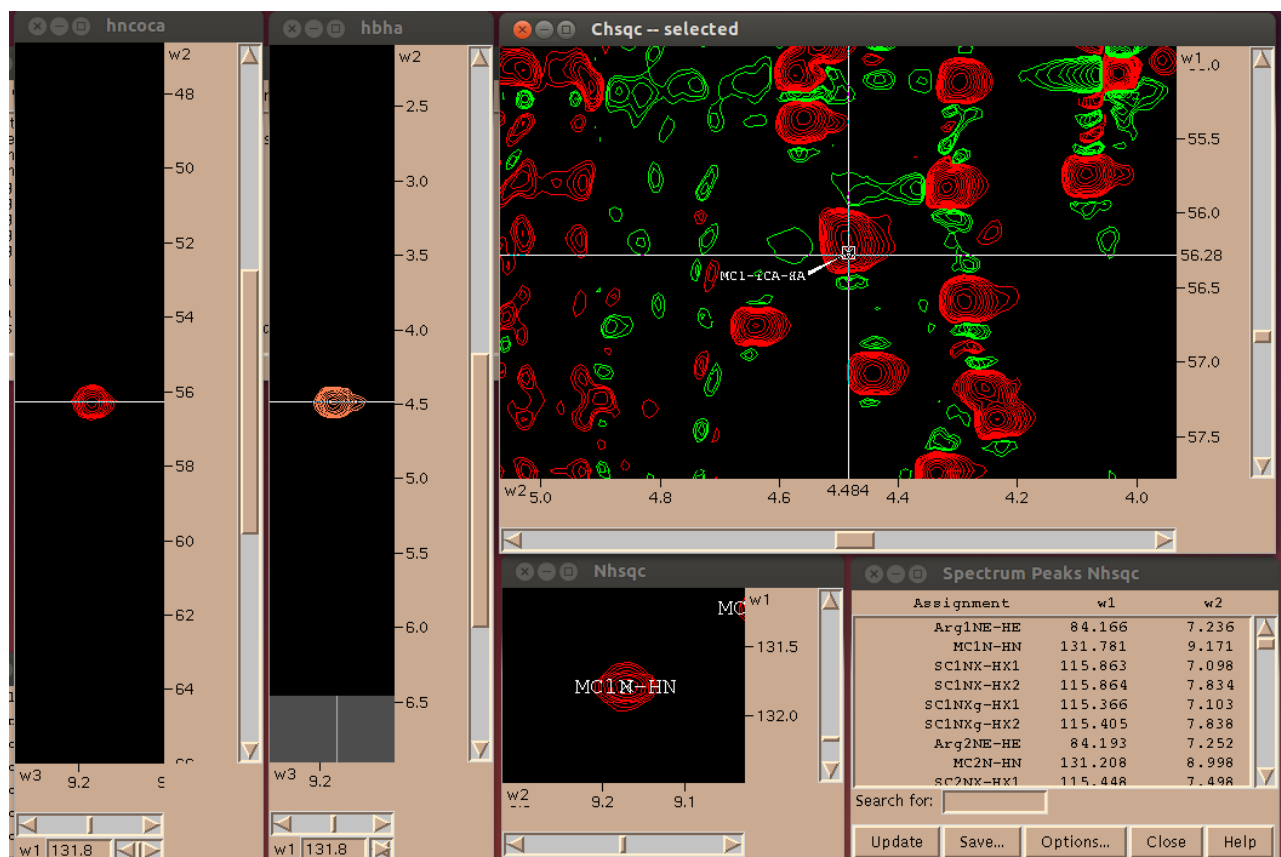
	w1	w2	w3
Nhsqc	15N a	1H c	
hnco	15N a	13C b	1H c
hnco/1	15N a	13C b	1H c
hncoca	15N a	13C d	1H c
hnca	15N a	13C d	1H c
cbca	15N a	13C e	1H c
cconh	15N a	13C e	1H c
hbha	15N a	1H g	1H c
nnoe	15N a	1H g	1H c
nnoe_arg	15N a	1H g	1H c
Chsqc	13C d	1H g	
hcch	13C d	1H	1H g
cnoe	13C d	1H c	1H g
ChsqcArom	13C	1H f	
cnoeArom2D	1H	1H f	

Synchronize Unsynchronize Close Help

各スペクトルについて適宜, "ct"から等高線の高さ等, "vt"から Aspect: を調整し, 見栄えの良いスペクトルとした。

"pv"から, Nhsqc, hncoca, hbha, Chsqc のみ表示させる。Nhsqc 上で"lt"として Spectrum Peaks

Nhsqc を表示させ、MC1N-HN をダブルクリックする．hncoca と hbha が MC1N-HN 由来の信号を表示するので、それぞれのスペクトル上の $C\alpha$ または $H\alpha$ の信号について、w2 軸のスライダーを使用して表示の中心に移動させる．



Chsqa の w1 の軸が hncoca の w2 の軸と、Chsqa の w2 の軸が hbha の w2 の軸とそれぞれシンクロしているので、Chsqa スペクトルの中心に、MC1 の一つ前の残基にある $C\alpha$ - $H\alpha$ の信号が表示される．画面では MC1-i CA-HA が近くにある信号と重なりあっているため、hncoca と hbha に表示されている crosshair を確認しながら、ピーク中心をとる位置に手でピークピックをする．

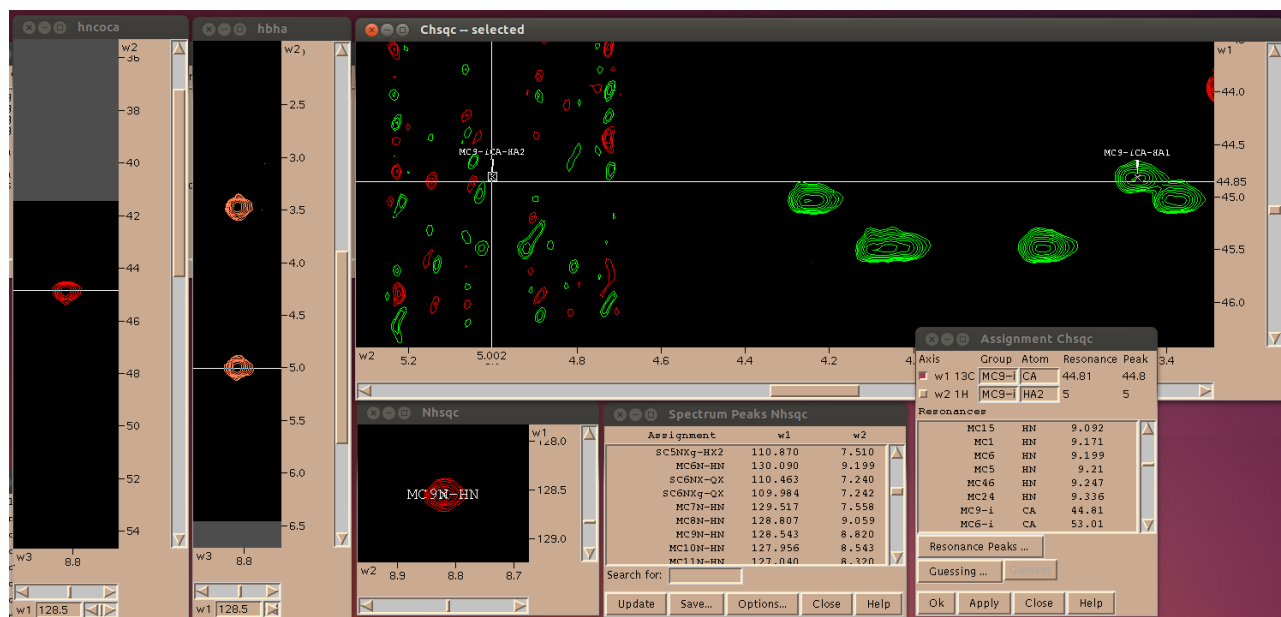
hbha は一つ前の残基の $H\alpha$ と $H\beta$ の信号が観測される． $H\alpha$ は一般に $H\beta$ よりも低磁場側 (ppm の大きい方) に観測される．また、hbha では $H\beta$ よりも $H\alpha$ が強く観測される．迷ったときには hbha 上で "vS" としてスライスを表示させてシグナル強度を確認すると良いだろう．

ピークピックした信号について、

Axis		Group	Atom
w1	13C	MC1-i	CA
w2	1H	MC1-i	HA

として仮帰属する．これを全ての MC について行う．

MC9-i は $C\alpha$ の化学シフト値が 44.8 ppm であり、Gly となる．Gly は α 位がメチレン (CH_2) であるため、1H の軸の原子名 (Atom) は HA1 と HA2 となる．また、HA2 が Chsqa 上の水由来信号の下に隠れている．この場合は、Chsqa 上の何もないところにピークピックを行い、仮帰属する．



同様に、MC25-i CA-HA, MC35-i CA-HA も水信号に隠れるため、Chsqc スペクトル上の何もないところに仮帰属する。いずれの場合も hncoca と hbha に表示される crosshair に従ってピークピックすること。

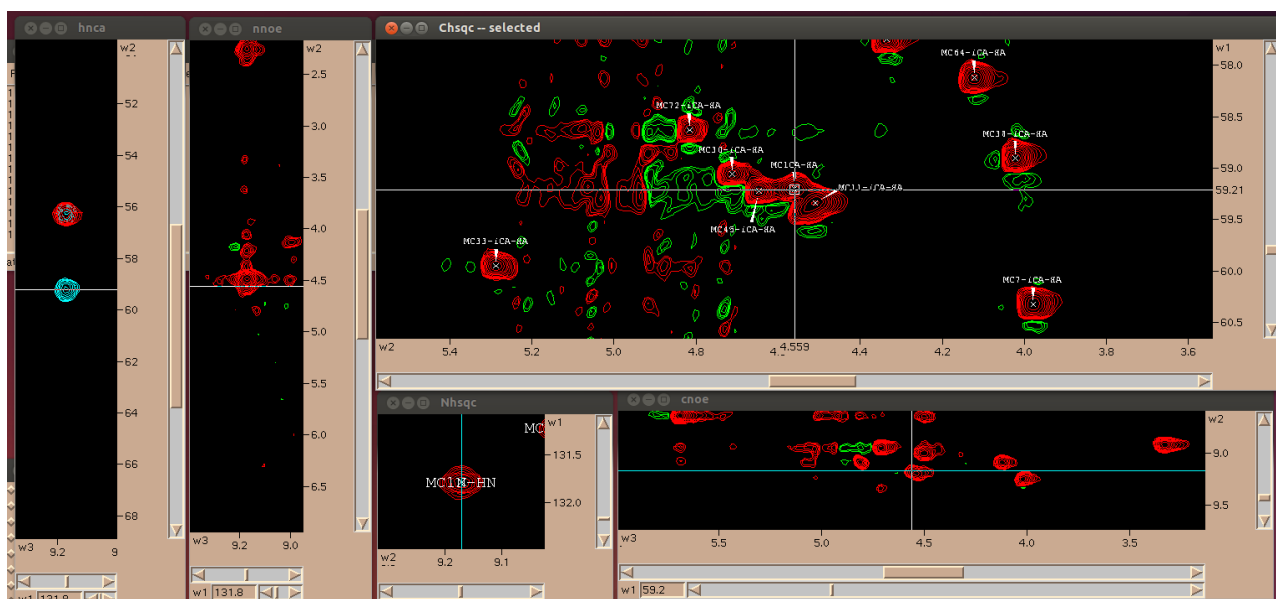
MC27-i, MC31-i, MC41-i も Gly であるため HA1, HA2 を使用し仮帰属する。

ここまでで、Chsqc 上に 62 個が仮帰属された状態となる。"pv"で個数を確認せよ。また、"lt"で名前の付け間違いがないことを確認すること（特に Gly ではない残基について HA1 や HA2 にて仮帰属したり、その逆の間違いが多い）。

MC2-i CA-HA, MC14-i CA-HA, MC13-i CA-HA はほぼ同じ位置に信号が観測される。crosshair で hncoca と hbha を確認しながら注意深くピークピックすること。

4-4. hnca と nnoe, cnoe を使用して MCx の CA-HA 仮帰属と 2 残基連鎖

今回の測定セットには HN(CA)HA が含まれていない。そのため、MC について残基内の H_{α} 信号の化学シフト値が直接にはわからない。hnca を用いて C_{α} を定め、nnoe 上の信号がある位置にて H_{α} の目星をつけてから Chsqc 上にて探す。nnoe は H_N に近接するプロトン信号を観測する測定であり、残基内 H_{α} はほぼ間違いなく観測される。CA-HA 仮帰属候補が見つかったら、その位置からの cnoe にて MC の HN が観測されていることを確認する。cnoe は HC に近接するプロトン信号を観測するため、 H_{α} から H_N が観測されていることを確認できる。

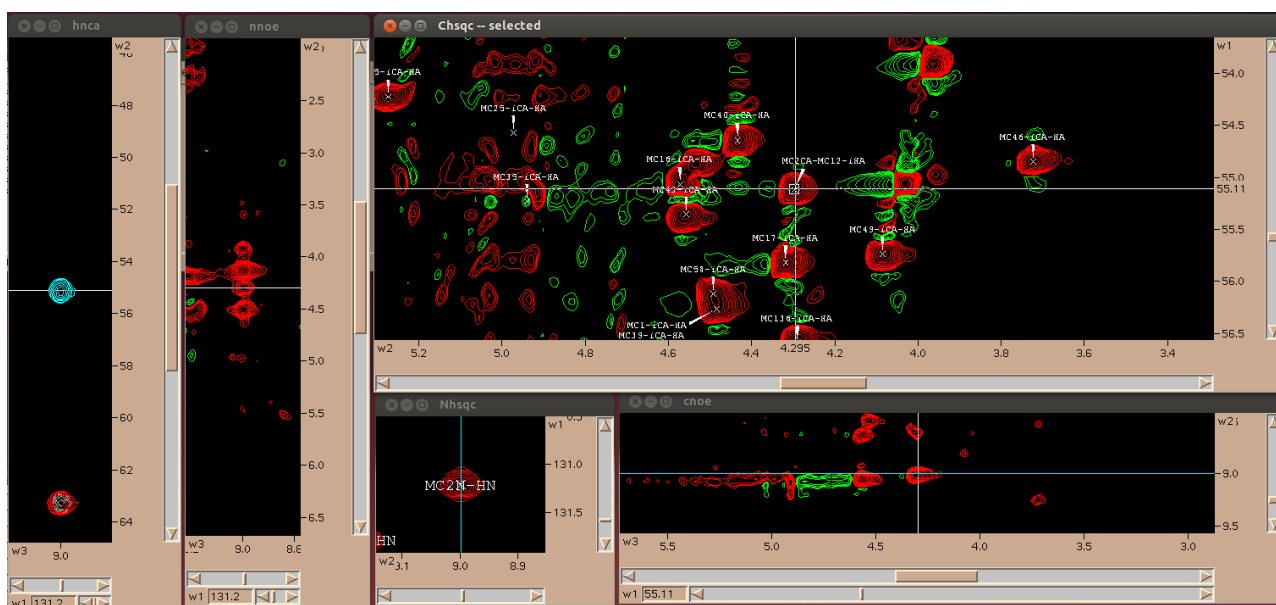


画像では MC1 の HN 化学シフト値について Nhsqc 上に縦線を, cnoe 上に横線を引いている (cyan). これを全ての MC について繰り返す.

MC2 にて, MC12-i CA-HA と同じ信号位置に MC2 CA-HA が仮帰属される. このとき, 仮帰属を,

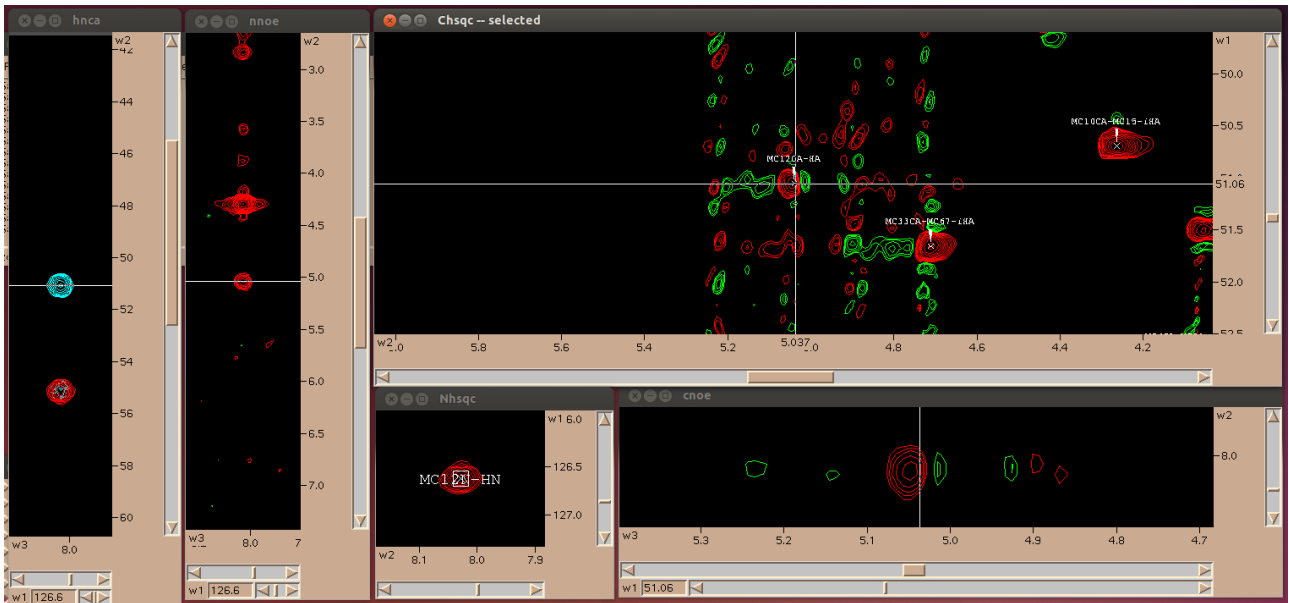
Axis		Group	Atom
w1	13C	MC2	CA
w2	1H	MC12-i	HA

とする.

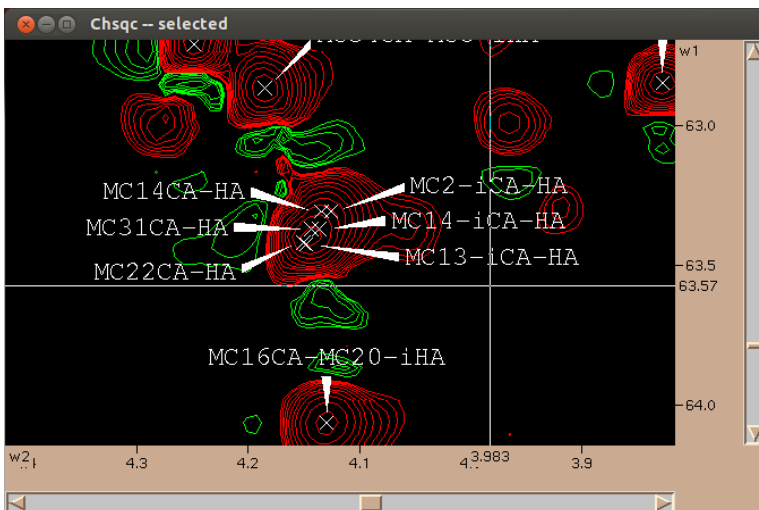


この一つの信号について 2 つの MC 由来の仮帰属を行う操作が 2 残基連鎖である. 今回の測定セットには含まれていないが hncacb がある場合, cbca と hncacb を駆使して C β の化学シフト値が一致していることを確認すること. hnco と hcacocanh がある場合も同様とする.

MC12 の CA-HA は、水信号の近くにあるため Chsqc も cnoe も確認しづらい．Chsqc 上にカーソルを合わせ、hnca と nnoe で信号の中心にくるように手動でピークピックする．

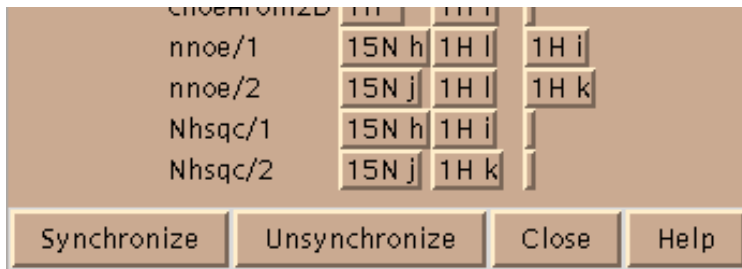


MC2-i CA-HA, MC14-i CA-HA, MC13-i CA-HA はほぼ同じ位置に信号が観測されている．同じ位置に MC14 CA-HA, MC22 CA-HA, MC31 CA-HA が来るため 2 残基連鎖を作成するのが難しい．とりあえず、その位置に信号が集中していることを示すためすべてを別々の信号としてピークピックする．

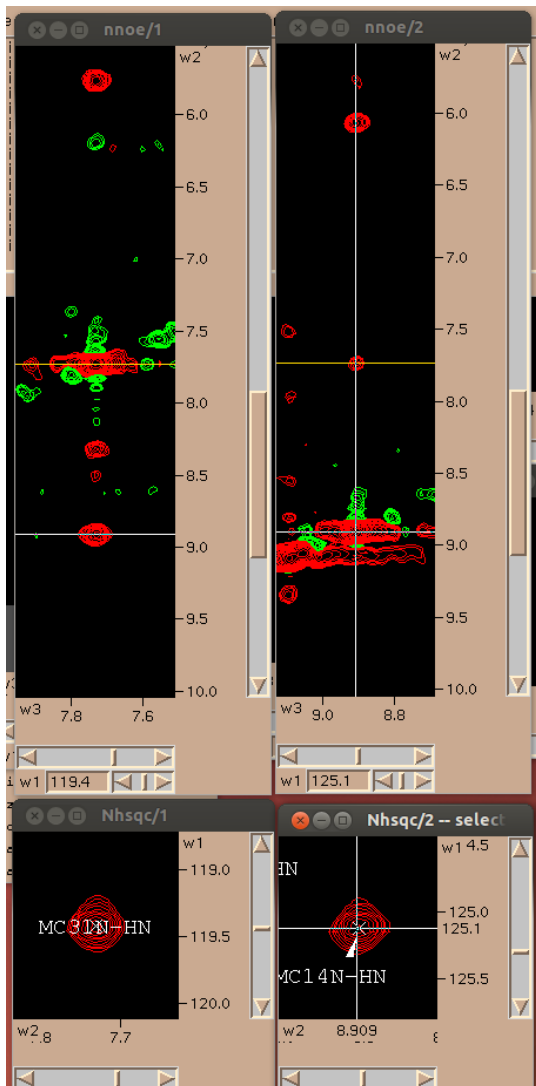


それぞれの MC N-HN からの nnoe を比較して、2 残基連鎖を行う．

Nhsqc 上で"vd" (View Duplicate)によって Nhsqc/1 と Nhsqc/2 を作成し、nnoe 上でも同様に"vd"によって nnoe/1 と nnoe/2 を作成する．Nhsqc/1 と nnoe/1, Nhsqc/2 と nnoe/2 がそれぞれシンクロするように設定する ("yt")．



Nhsqc/1 上で MC31 を表示させた状態とし、Nhsqc/2 上で MC2, MC13, MC14 をそれぞれ表示させて、nnoe/1 と nnoe/2 の比較を行う。



MC31 の nnoe (nnoe/1) 上に、MC14 HN の位置に信号があり、MC14 の nnoe (nnoe/2) 上に、MC31 HN の位置に信号があることがわかる。MC2 や MC13 ではこのような相互に信号は観測されなかった。連鎖する 2 残基はそれぞれの N_H が近いため、それぞれの nnoe 上でお互いの信号が観測されることが多い。よって MC31 と MC14 は MC31-MC14 の順番で連鎖することがわかったので、Chsqc 上で二つを一つに減らして上で MC31 CA- MC14-i HA となるように仮帰属する。

同様に nnoe を用いて他の組み合わせも検証する。MC14, MC22 のそれぞれと MC2, MC13 は互いの HN は判別できなかったため、このままとする。

判別が難しい領域についての `noe` 比較が終了したら、`Nhsqc/1`, `Nhsqc/2`, `noe/1`, `noe/2` は不要なので、ウインドウを閉じる。

4-5. 連鎖クラスターの作成と連鎖帰属

`Chsqc` 上に作成した 2 残基連鎖の情報をもとに連鎖クラスターを作成する。`Chsqc` 上で `"lt"` として `Spectrum Peaks` を表示し、`Save` ボタンによってファイル（ファイル名：`Chsqc.list`）として保存する。

Assignment	w1	w2
MC1CA-HA	59.206	4.560
MC2CA-MC12-iHA	55.115	4.297
MC2-iCA-HA	63.306	4.125
MC4CA-HA	53.915	3.964
MC4-iCA-HA	62.708	4.248
MC5CA-HA	59.399	4.531
MC6CA-MC81-iHA	52.767	4.094
MC7CA-HA	49.461	4.426
MC8CA-MC64-iHA	58.118	4.122
MC9CA-HA	61.220	3.964
MC10CA-MC15-iHA	50.696	4.264
MC11CA-MC6-iHA	53.011	4.439
MC12CA-HA	51.056	5.040
MC13CA-MC11-iHA	59.337	4.510
MC13-iCA-HA	63.424	4.148

のように記載されている。ここから長めのクラスターを探す。`MC13-i CA-HA` のように `MCx-i` のみで構成されるところから始めるのが良いだろう。

MC	-i	MC13	MC11	MC6	MC81	MC26	MC1
CA/CB							
Group							

`cbca` と `cconh` を使用し、アミノ酸の種類または $C\alpha/C\beta$ の化学シフト値を書き出す。

MC	-i	MC13	MC11	MC6	MC81	MC26	MC1
CA/CB	V	VL	A	A	VL	VL	59/-
Group							

アミノ酸配列中で、上記の配列が当てはまる部分を探す。特に AA の並びは特徴的なので見つけやすいだろう。V5～I11 だけがこれに相当する。

MC	-i	MC13	MC11	MC6	MC81	MC26	MC1
CA/CB	V	VL	A	A	VL	VL	59/-
Group	V5	V6	A7	A8	V9	L10	I11

"rr"によって仮帰属を本帰属に名前の変更をする。このとき MC13-i など、MCx-i についても忘れずに変更する (MC13-i は V5, MC11-i は V6...のように変更する)。

今回の nfe11 では cconh にて信号が分離／強度ともに良好に観測されたため、上記の例でアミノ酸種類まで特定できているが、大概の場合ここまでの特定はできない。その場合は $C\alpha$, $C\beta$ (場合によっては $C\alpha$ のみ) の化学シフト値を記入すること。

同様に他のクラスターについても化学シフトまたはアミノ酸種の特定、ならびに名前の変更を行う。

MC	-i	MC19	MC56	MC31	MC14
CA/CB	P	EQM	G	T	63.3/-
Group	P50	M51	G52	T53	T54

MC	-i	MC21	MC46	MC38	MC25
CA/CB	P	A	EQ	DNFY	63.4/-
Group	P33	A34	E35	D36	I37

MC	-i	MC23	MC44	MC43	MC10	MC15	MC58	MC30	MC83
CA/CB	P	I	DNFY	T	A	L	T	V	G
Group	P12	I13	N14	T15	A16	L17	T18	V19	G20
MC	MC41	MC42	MC35	MC72	MC32	MC16	MC20	MC45	
CA/CB	MHW	MEQ	ST	T	R	V	V	54.8/-	
Group	M21	M22	T23	T24	R25	V26	V27	S28	

MC	-i	MC29	MC17	MC136	MC22
CA/CB	DNFY	EQ	EQ	ST	63.4/-
Group	N1	Q2	E3	S4	V5

MC	-i	MC54	MC37	MC49	MC24	MC18	MC36	MC75	MC33
CA/CB	P	R	L	I	S	EQM	EQM	VL	DNFY
Group	P38	R39	L40	I41	S42	M43	Q44	V45	N46
MC	MC67	MC34	MC5						
CA/CB	EQMHW	V	59.4/-						
Group	Q47	V48	V49						

MC	-i	MC61	MC82	MC9
CA/CB	P	T	G	61.2/-
Group	P29	T30	G31	I32

MC	-i	MC79	MC40	MC39	MC8	MC64	MC27	MC7
CA/CB	P	DNFY	EQM	LV	K	G	DNFY	49.5/-
Group	P57	D58	M59	V60	K61	G62	Y63	A64

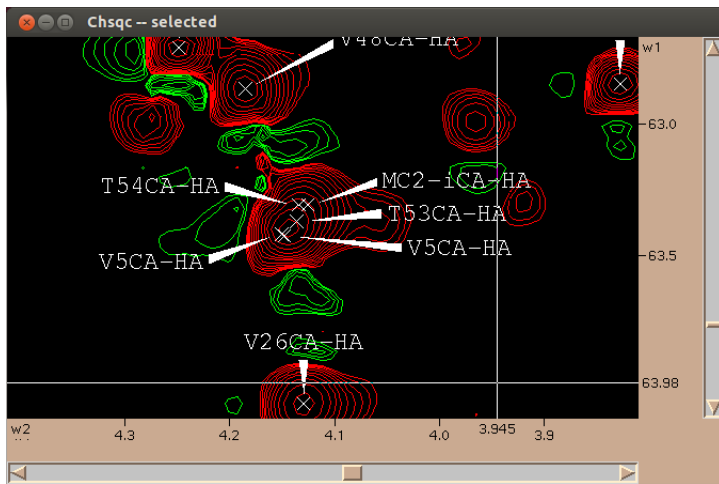
ここまで終了した時点で、残る MC は MC2, MC4, MC12 であり、MC2-MC12 は連鎖している。
アミノ酸配列上に、Nhsqc 上で帰属できた残基についてマーキングする。

M

NQESVVAVL IPINTALTVG MMTTRVVSPT
GIPAEDIPRL ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV
KGYAPA

MC4 は cconh から手前の残基が Pro である。上記のうち未帰属で手前が Pro であるのは Ala66 のみである。また MC4 の CA が 53.9 であり Ala の C α 範囲に収まるので、MC4 を A66 と名前の変更を行う (MC4-i は P65 とする)。

MC2 は MC12N-HN からの cconh で Leu である。2 残基連続して帰属されていない領域は Leu55-Met56 である。また MC2-i CA-HA は 2 残基連鎖を保留した信号でもある。T54 CA-HA の信号について Chsqc 上で確認する。



T54 CA-HA の信号と MC2-i CA-HA がほぼ同じ位置に観測されており,他の候補が存在しない。
よって, MC2-i は T54, MC2 および MC12-i は L55, MC12 は M56 として名前の変更を行う。

Chsqc 上で V5 CA-HA と T54 CA-HA がそれぞれ二つピークピックされた状態となっているので, どちらか一方を消去する (V5 CA-HA, T54 CA-HA がそれぞれ一つずつになるようにする)。

ここまでで Nhsqc 上の主鎖アミド由来信号すべてについて帰属が完了した。Asn1 の主鎖アミドは観測できていなかったことがわかる。

5. 側鎖帰属チュートリアル

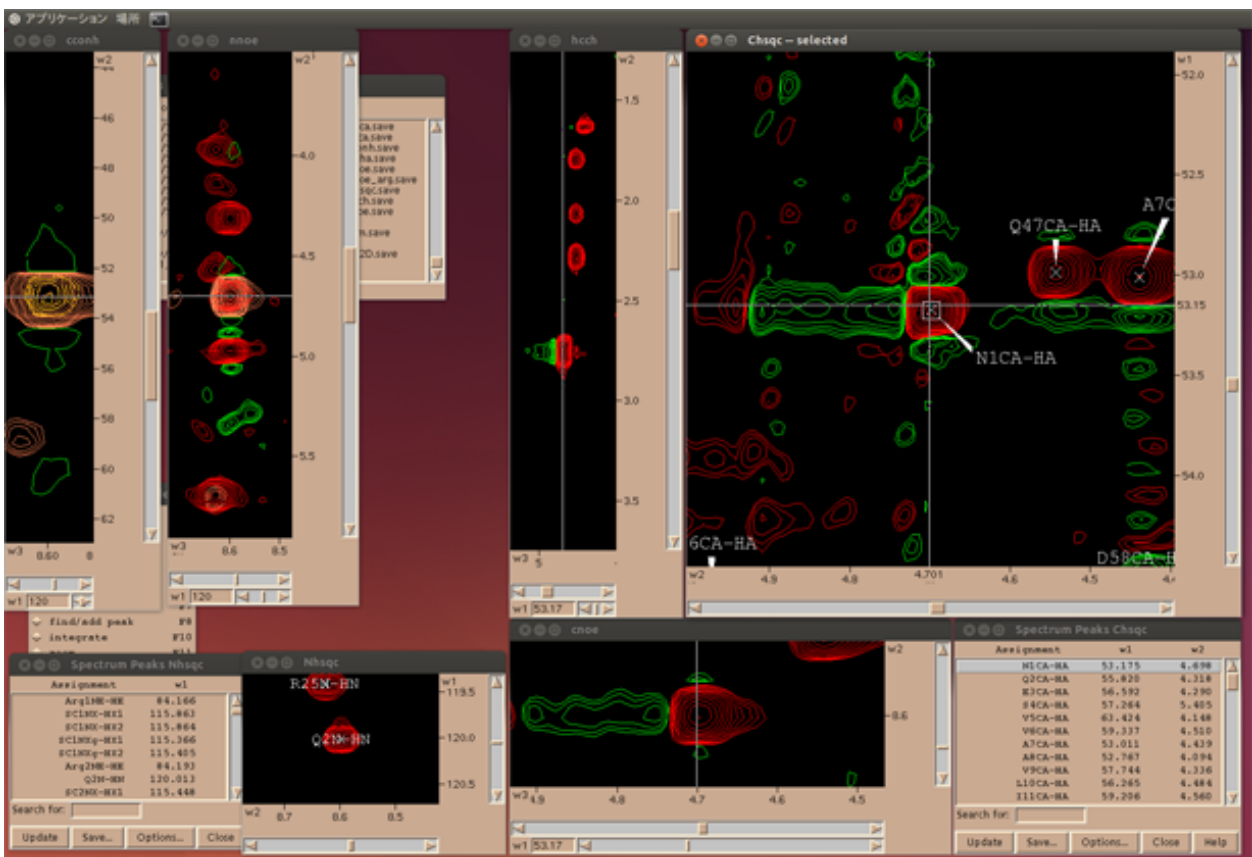
側鎖帰属では、Chsqc 上に観測された CH の交差信号を主として、観測可能な全ての信号について帰属を行う。

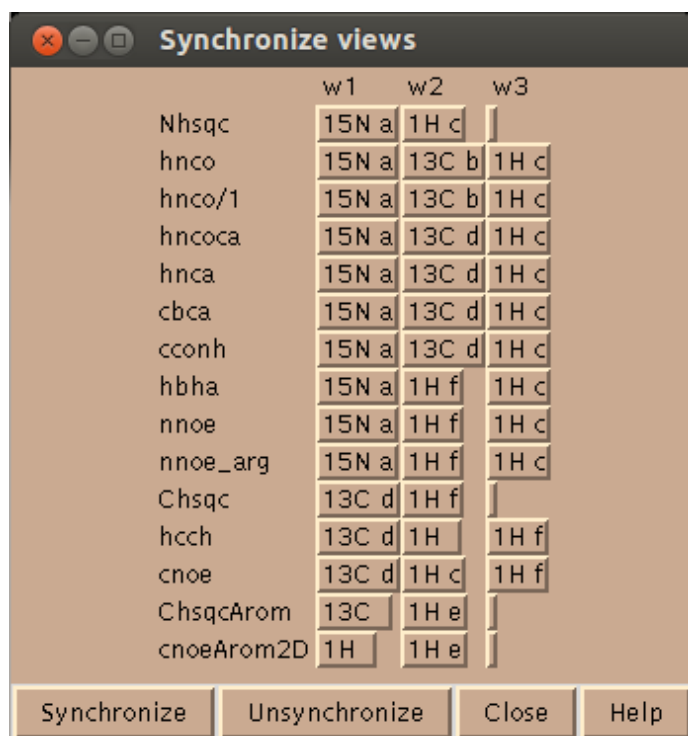
まずは脂肪族側鎖（Aliphatic 側鎖）について帰属する。前項の主鎖帰属チュートリアルが終了した時点で、Chsqc 上には、CA-HA の帰属がほぼ全て入っている状態から始まる。クローニングアーティファクトである M0 は主鎖および側鎖が一つも帰属できていないが、これは Aliphatic 帰属が終了してから CH について帰属する。

この作業を行う際に、別紙の Alipatic カーボンの化学シフト値はかなりの頻度で使用する。作業する画面の近くに貼り出す等、すぐに参照できる状態にしておくことをお勧めする。

5-1. 閲覧するスペクトルの整理

側鎖帰属操作では閲覧すべきスペクトルがかなり多くなるため、帰属操作を始める前に使用するスペクトルを整理しておく雑多な画面にならず良いだろう。主鎖帰属で使用した HN-detect のスペクトルについて C 情報をまとめたスペクトルと H 情報をまとめたスペクトルをそれぞれ用意する。具体的には、cconh に cbca を重ね cconh のみを表示、nnoe に hbha を重ね nnoe のみを表示させる。同時に、Chsqc について hcch と cnoe とシンクロさせる。また、HN-detect の C 軸と間接観測軸側 H 軸を Chsqc の C 軸、H 軸とシンクロさせておく解析が楽になる。





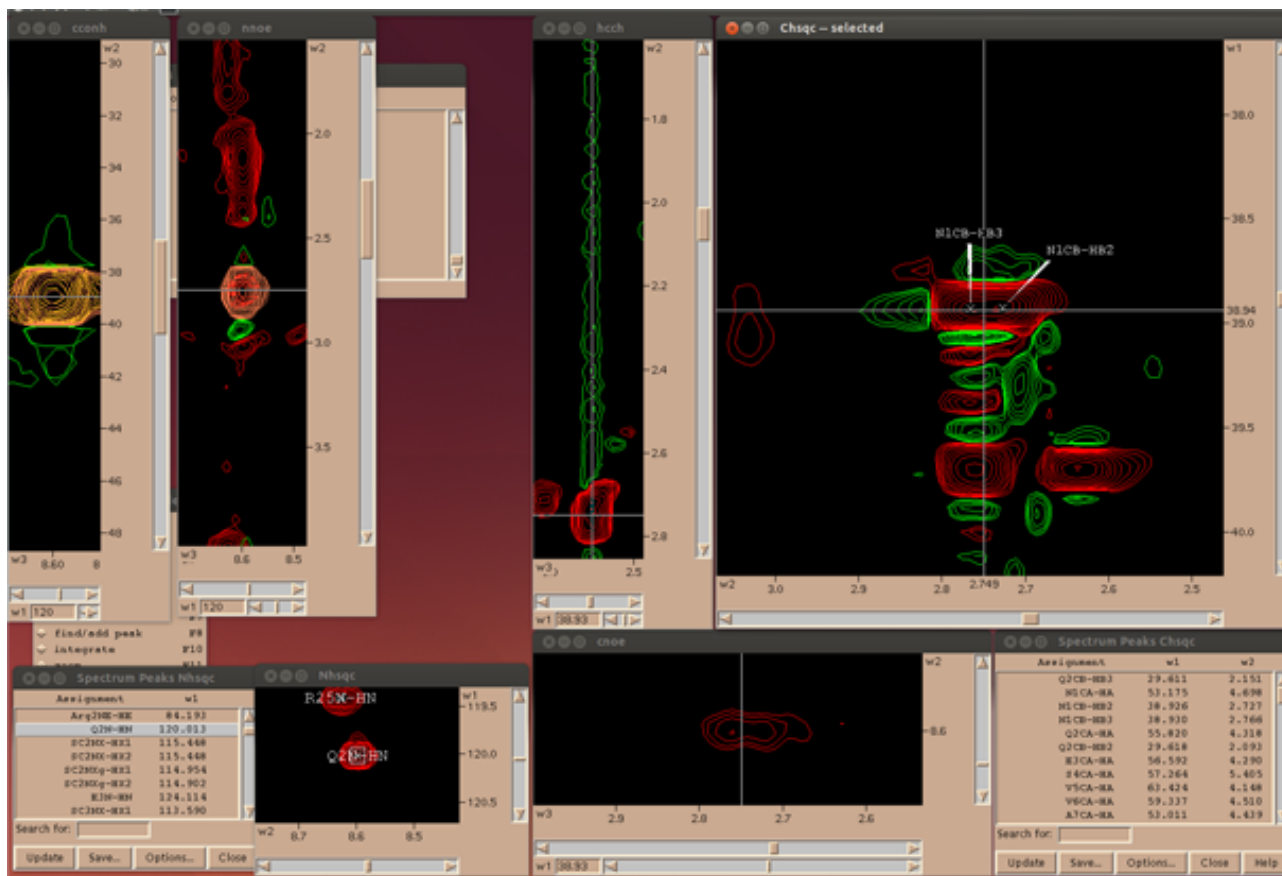
5-2. CB-HB,HB2,HB3,QB の帰属

cconh と nnoe を使用して CB-HB,HB2,HB3,QB の帰属を行っていく。N 末端側から始めるものとする。

Nhsqc で Q2N-HN を，Chsqc で N1CA-HA をそれぞれ表示させる ("lt"からダブルクリックで選択する)。cconh では N1 の CA が，nnoe では N1 の HA がスペクトル中心に表示されている。

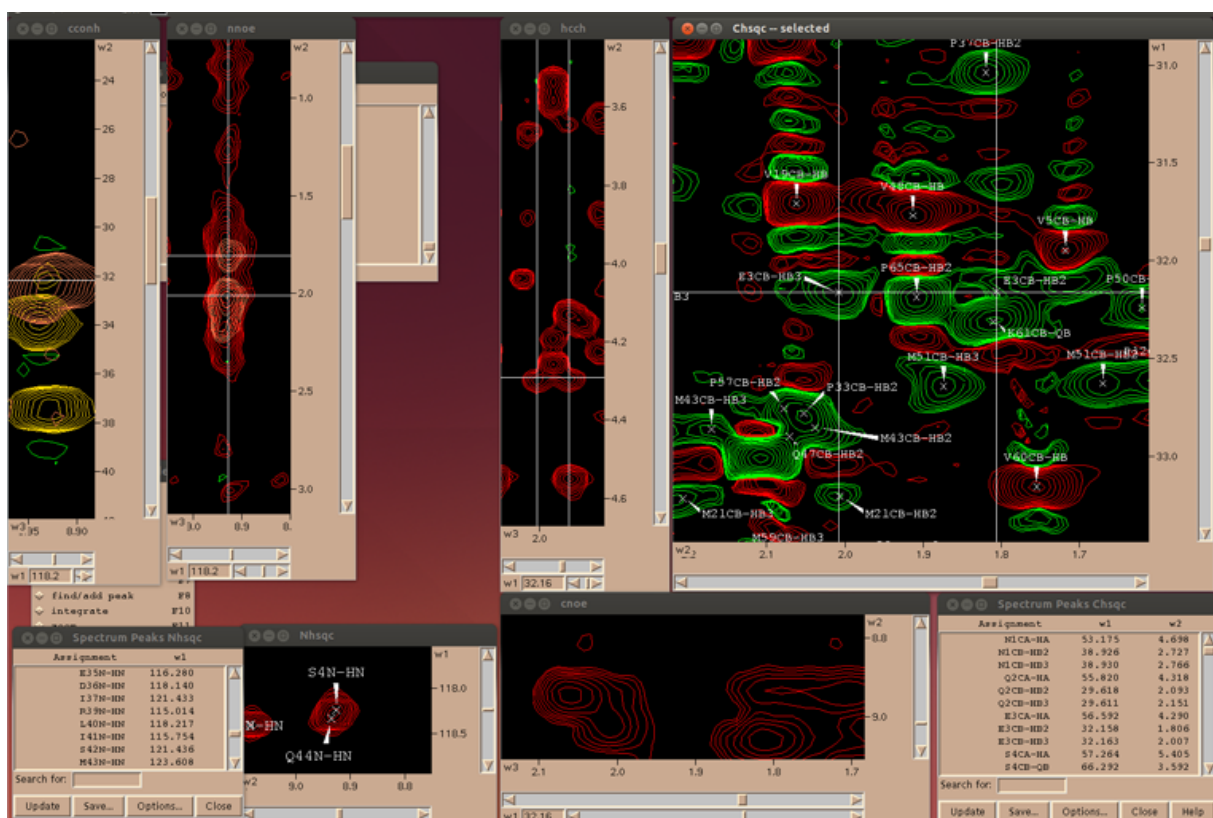
cconh と nnoe を縦に移動し，それぞれ N1 の CB，HB（HB2,3 か QB）が表示されているスペクトルの中央になるようにする。シンクロによって Chsqc の画面中央に N1 CB-HB が正の信号として観測されるはずである。

Chsqc 上で横に少し延びた正の信号が観測されている。cnoe を見ると少し横に split しているので，強引に二つの信号にわけて，N1 CB-HB2, N1 CB-HB3 として帰属する。プロトンが高磁場側にある信号を HB2，もう一方を HB3 とした。

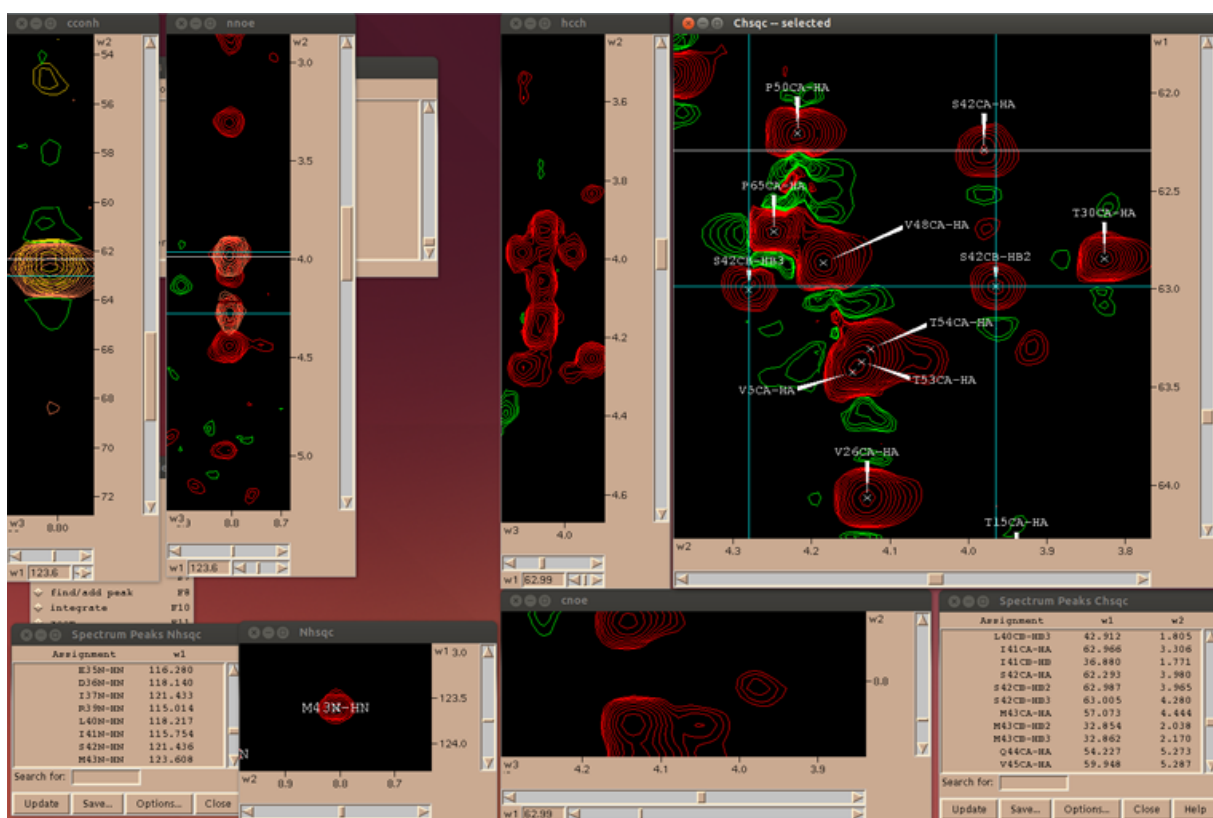


これを Nhsqc で帰属できた主鎖 HN から帰属できる全ての CB-HB, HB2, HB3, QB について繰り返す。Chsqc での信号の正負および原子の名前には十分に注意すること (N1 CB-HB や A7 CB-HB2 は正しい名前としては存在しない)。各アミノ酸の側鎖の形、名前の付け方、およその C 化学シフト値が頭に入っていないのであれば、N 末端側から順番にではなく、アミノ酸の種類ごとに帰属を進めた方が良くかもしれない。特に CB までで Aliphatic 側鎖の帰属が終了する、Ala (A), Cys (C), Asn (N), Asp (D), Ser (S) は解析が簡単だろう。Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), His (H) も Aliphatic 側鎖が CB までなので簡単な部類だが、Chsqc 上での信号が出ないことがあるので hcch や cnoe で確認しながら帰属する。

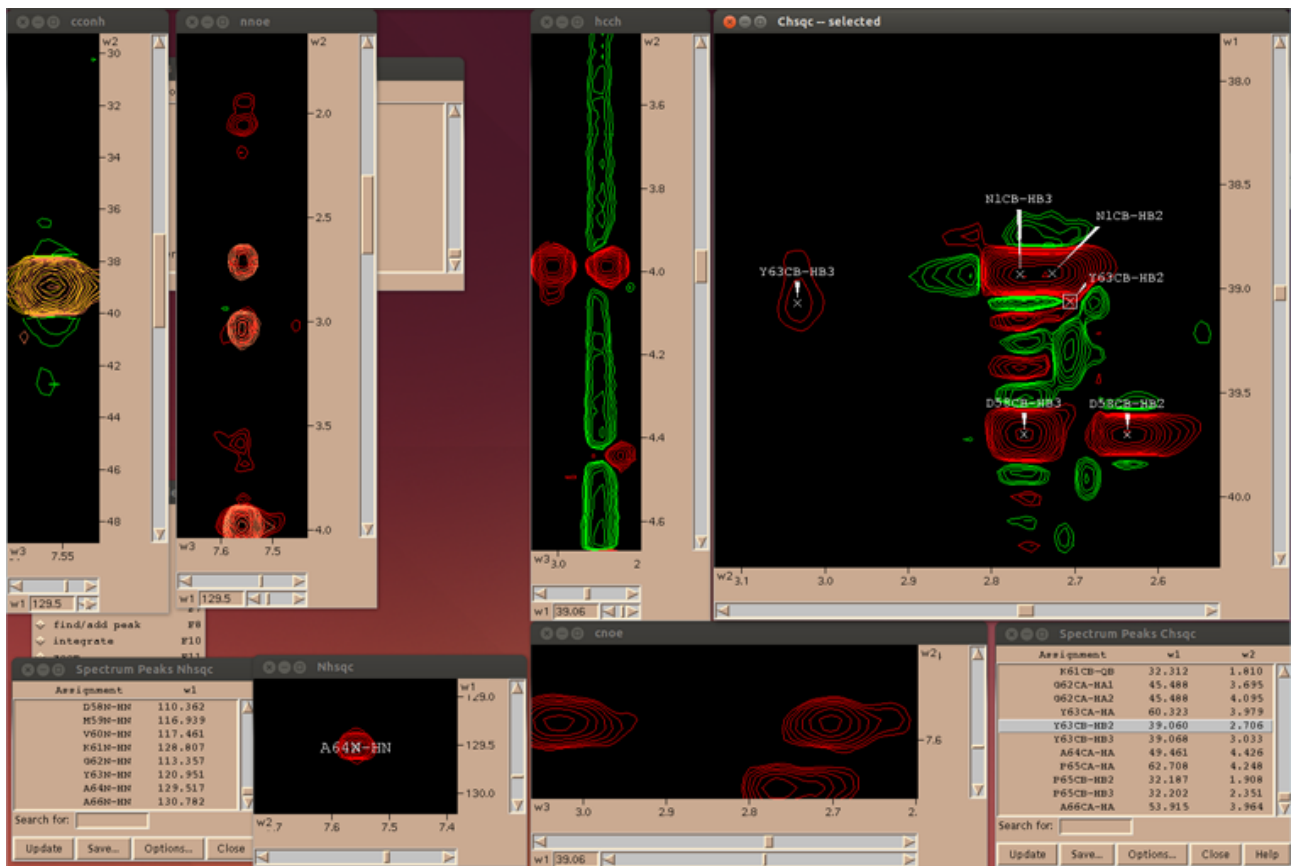
S4 N-HN, Q44 N-HN は Nhsqc 上で重なった信号であるため HN-detect 系での E3 および M43 の CB や HB がわかりづらい。E3 の CB-HB2,3 からは HA の信号が hcch で観測されるはずなので、そこから探す。Chsqc 上で E3 の CB 付近に移動し、hcch の縦軸を E3 の HA (4.290 ppm) 付近が表示されるようにする。E3 の HA が観測されている箇所を E3 CB-HB2, E3 CB-HB3 として帰属する。同様に M43 CB-HB2, M43 CB-HB3 を M43 の HA (4.444 ppm) が hcch 上で観測されていることを指標として帰属する。



M43 N-HN から観測される S42 の CB は CA と化学シフト値が近く cconh で分離できていない。hbha でも HB の一方が HA と同じ化学シフト値のためわかりづらい。注意して Chsqc や hcch, cnoe を使用しながら、S42 CB-HB2, S43 CB-HB3 を帰属する。

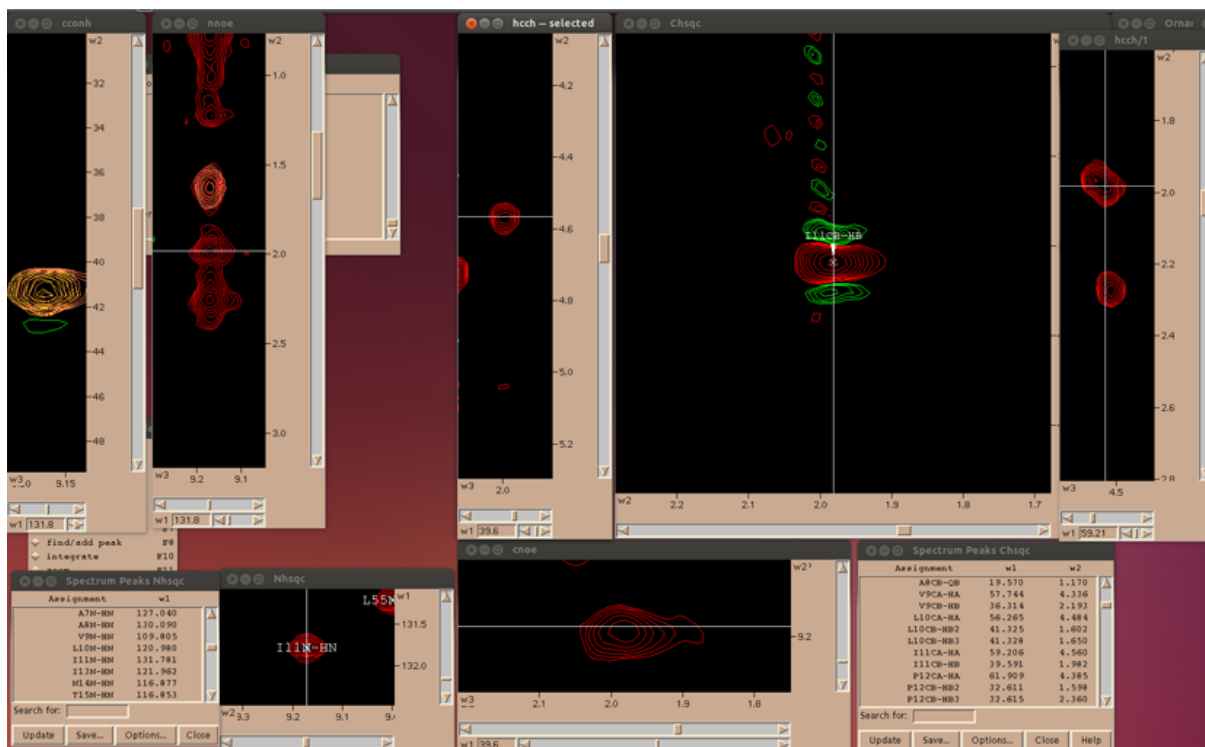


Y63 CB-HB2,3 は Chsqc 上での信号強度がかなり低い．hcch や cnoe を使用しながら帰属する．



Pro の直前にある残基 (I11, S28, I32, I37, V49, M56, A64) や C 末端 (A66) については, cconh が参考にならない．hncacb があれば CB の化学シフト値が使用できるが, 今回のデータセットには含まれていない．それぞれの Chsqc 上の CA-HA からの hcch を参照し CB-HB を探す．

Nhsqc の I11 N-HN および Chsqc の I11 CA-HA をスペクトルの中心に表示させる．hcch を "vd" として, duplicate させる (hcch/1)．hcch/1 上で 1.98 ppm 付近に信号が観測されている．nnoe を参照し, 1.98 ppm に信号が観測されていることを確認する．Chsqc 上の ^1H 軸の 1.98 ppm 付近に縦線を引き, Ile の CB が観測される C 領域 (35~42 ppm) で正の信号で観測されている信号を探す．C: 39.591, H: 1.982 に信号がある．そこから cnoe を確認し I11 の HN (9.171 ppm) が観測されていること, hcch で I11 の HA (4.560 ppm) が観測されていることを確認し, I11 CB-HB を帰属する．帰属できたら duplicate させた hcch/1 は邪魔なので x 印で消去する．

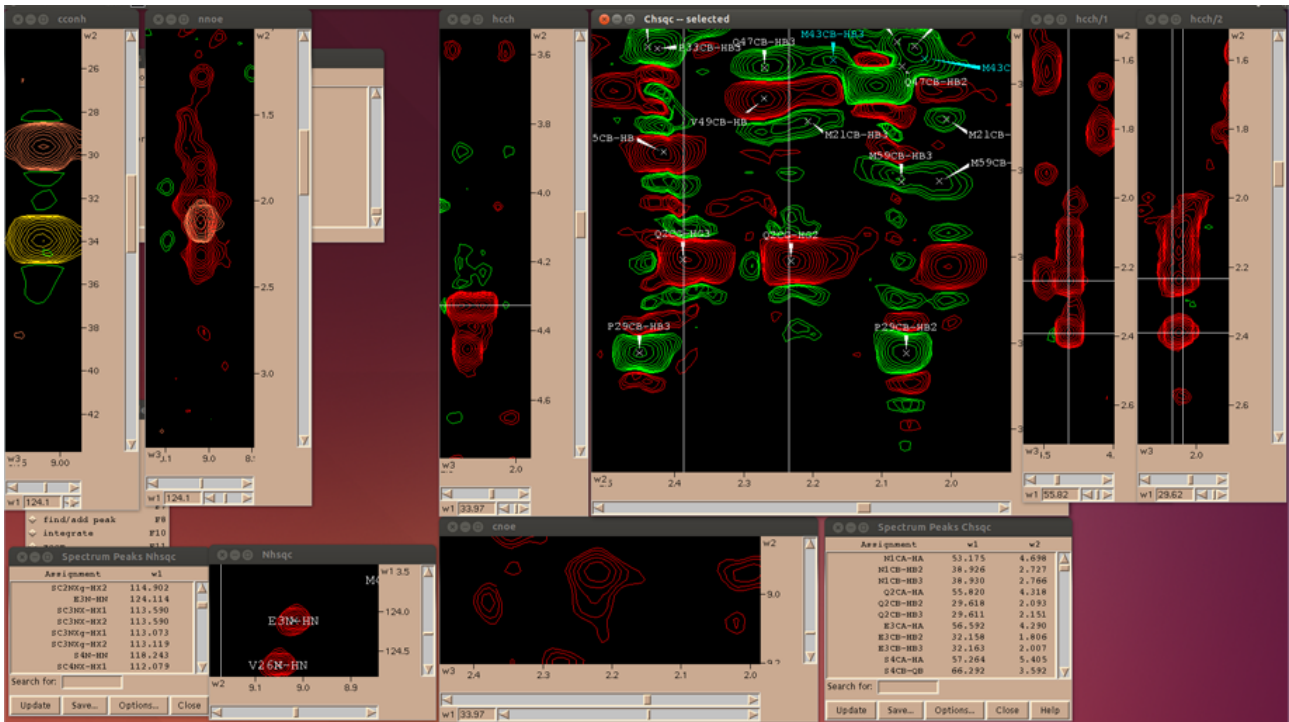


I11, I32, V49, M56 は HB 以外にも Aliphatic のプロトンがあるので, hcch 上で HB 以外の信号も観測される. C の化学シフト値や Chsqc 上での正負に注意して CB-HB を帰属する必要がある. また CB-HB からも HA や HB 以外の Aliphatic プロトンが観測されるので, CA-HA からの hcch (hcch/1) と CB-HB からの hcch のプロトンパターンは一致するはずなので, それらを指標にすることもできる.

5-3. Aliphatic CG 以降の帰属

Val (V), Leu (L), Ile (I), Met (M), Gln (Q), Glu (E), Pro (P), Thr (T), Lys (K), Arg (R)には CG 以降の Aliphatic C-H (CG, CD, CE 等) がある. 側鎖の形状によって原子の名前が違うので十分に注意すること.

Nhsqc で E3 N-HN, Chsqc で Q2 CA-HA をそれぞれ表示させる. CA-HA からの hcch を”vd”する (hcch/1). 続けて Chsqc で Q2 CB-HB2 を表示させて, CB-HB2, CB-HB3 からの hcch を”vd”する (hcch/2). hcch/1 と hcch/2 で 2.23 ppm, 2.39 ppm に信号が確認できる. cconh で CG の信号がスペクトルの中央になるようにする. Chsqc のプロトン軸で 2.23 ppm, 2.39 ppm, cconh での CG 化学シフト値に一致する位置の信号がある. hcch を確認し, Q2 の HA (4.318 ppm) が観測されていることを確認し, Q2 CG-HG2, Q2 CG-HG3 の帰属を行う. また, Q2 CG-HG2, Q2 CG-HG3 からの hcch が Q2 CA-HA や Q2 CB-HB2, Q2 CB-HB3 の hcch (hcch/1 と hcch/2) とプロトンパターンが一致することも確認しておく. 帰属ができれば, duplicate の hcch (hcch/1 と hcch/2) は消去する.



これを繰り返し行う。

Pro の直前にある残基 (I11, I32, I37, V49, M56) や C 末端残基は CB-HB のときと同様に hcch や cnoe を使用して帰属をする。

ここまで hcch で観測された信号は帰属していない。信号数が多く重なっている箇所も多いため、それぞれに帰属を入れることは他のスペクトルに帰属を追加するよりも非常に手間を要する。スペクトル上に表示されている crosshair を使用して確認をおこなうのみとし、帰属は Chsqc 上に行う。これは例えば帰属の間違いなどがあったときに、修正が容易に行えるようにする意味合いもある。

Val (V) や Leu (L) には、メチル基が二つある。それぞれ CG1-QG1, CG2-QG2 や CD1-QD1, CD2-QD2 で帰属するが、数字は一致していること (Val で CG1-QG2 は NG)。また、便宜上プロトンの化学シフト値が小さい方を CG1-QG1 または CD1-QD1 とした。

Leu (L) や Ile (I) には側鎖の先端部分にメチル基がありその手前にはメチン (CH) やメチレン (CH₂) がある。メチル基はプロトン 3 個が磁氣的に等価に存在するなどの理由から、Chsqc や hcch で強度よく観測される。Aliphatic 側鎖の帰属では主鎖に近い側から帰属 (CA, CB, CG... の順) する必要はないので、先にメチル基を帰属すると進めやすいかもしれない。同様に、メチレン側鎖の Arg (R) と Pro (P) の C δ , Lys の C ϵ (場合によっては C γ も) は、他の残基と異なる C の化学シフト値であり、hcch のスペクトルがすっきりしていて解析が簡単なことがある。先にそれらのプロトン化学シフト値を求め、側鎖途中にある原子からの hcch 上でそれらのプロトンを見つければ帰属がやりやすくなるかもしれない (例えば、Arg (R) の CG を帰属するまえに、CD-HD2, CD-HD3 の帰属を行い、その HD2, HD3 の化学シフト位置に hcch 信号をもつ CG-HG2, CG-HG3

を探す)。帰属の状況やタンパク質中に含まれている残基の個数によっては、側鎖の先端から帰属を始めることすら可能である。もっとも、サンプルの純度やスペクトルの質が十分に高いことが前提ではあるが。

ここまで帰属が終了したら、一度、帰属のミスがないかを確認しておくといいだろう。"rl"にて、化学シフト値情報を表示し、そこで確認する。Linux であれば確認用の perl スクリプトを使用できる。[Save...]によって化学シフトテーブルファイルを~/Sparky/Lists にファイル名：shifts として作成する。ターミナルを開き、

```
$ cd ~/Sparky/Lists
```

```
$ spx_assign_check.pl shifts
```

で、帰属について確認をする。もし間違いがあればエラーが表示される。エラーは、ピークピックの無い帰属情報があった場合、帰属の標準偏差 (SDev) が大きい場合、同じ残基番号で異なるアミノ酸表記があった場合は画面に表示される。特に、同じ残基番号で異なるアミノ酸表記があった場合は画面に表示されるときは、確認の途中で終了する。修正作業を行い、shifts ファイルのアップデート、spx_assign_check.pl でのチェックにてエラーが出なくなるようにする。また、原子名だけの間違いは spx_assign_check.pl を実行したあとに作成される check.list にて確認ができる。

この perl スクリプトは構造計算ソフト CYANA で使用する化学シフトテーブルを作成するためのもので、CYANA 用の化学シフトテーブルは cyana.plot として自動作成／上書き保存される。このとき、check.list で==>で表示されている誤った原子名での帰属は cyana.plot には含まれない。3文字で表記したアミノ酸や通し番号用の MC や SC は無視されるようになっている。

5-4. 側鎖 NH の帰属

Nhsqc 上で仮の帰属としていた、SC1~6 や Arg (R)の帰属を行う。今回のサンプル中には含まれていないが Trp の NE1-HE1 や His の ND2-HD2, NE1-HE1 は Aromatic 帰属の過程で帰属する。

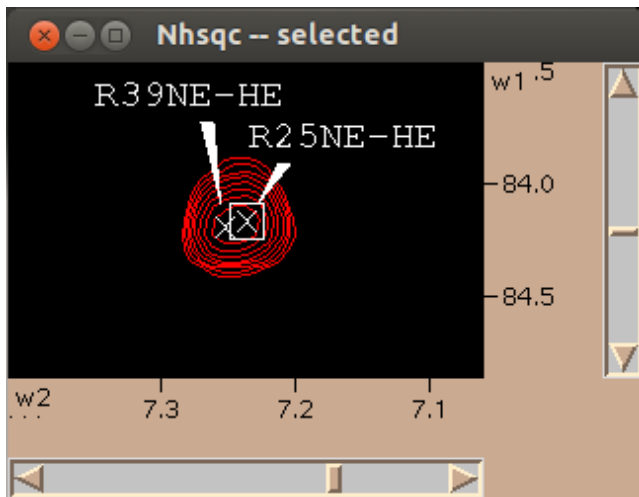
SC1~6 について、Asn (N) / Gln (Q)の判定を行う。Nhsqc 上の各 SC の NXg から cbca を確認し判定する。Asn (N)の場合には CB と CA が、Gln (Q)の場合には CG と CB が観測されるため容易に判定できる。また同時に SC の NXg からの hbha や NX からの nnoe を用いて、どの残基なのかを特定する。

SC1 は NXg からの cbca によって Asn (N)であり、NXg の hbha や NX の nnoe によって N14 であることがわかる。"rr"によって SC1 を N14 の側鎖であるように名前を修正する。

SC1	NXg	N14	ND2g
	NX		ND2
	HX1		HD21
	HX2		HD22
	CX		CG

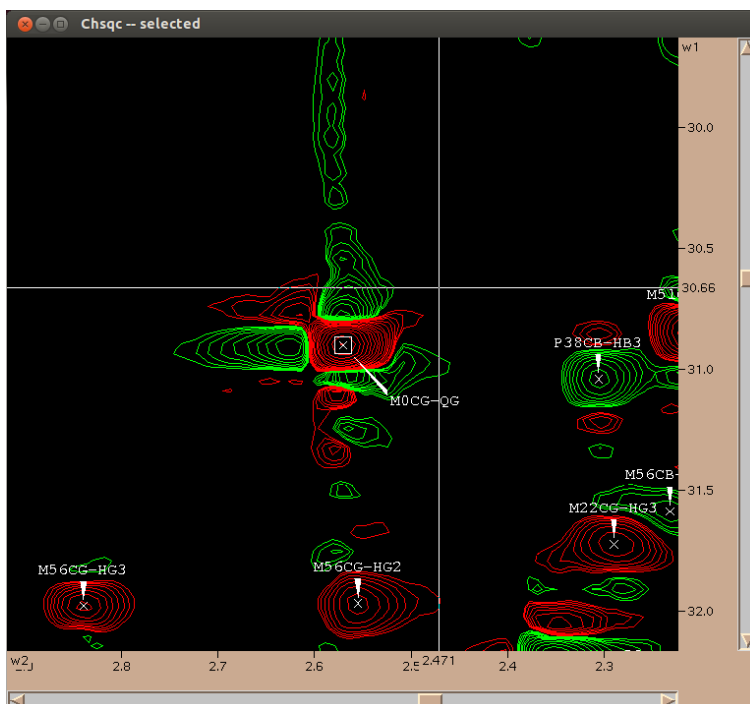
同様に SC2=Q2, SC3=N1, SC4=Q47, SC5=Q44, SC6=N46 となる. Asn (N)と Gln (Q)で側鎖 NH の名前が違うことに注意して"rr"を行う.

Arg1, Arg2 の NE-HE は, hnca での CD の化学シフト値や nnoe で観測できる HD2,3 の化学シフト値から決定する. このサンプルには Arg (R)残基は 2 個あり, Nhsqc 上で仮帰属した Arg (R) の NE-HE は 2 つあることから, すべての NE-HE 信号が観測されていることになる. hnca や nnoe から Arg1=R25, Arg2=R39 であることがわかる.



5-5. M0 の帰属

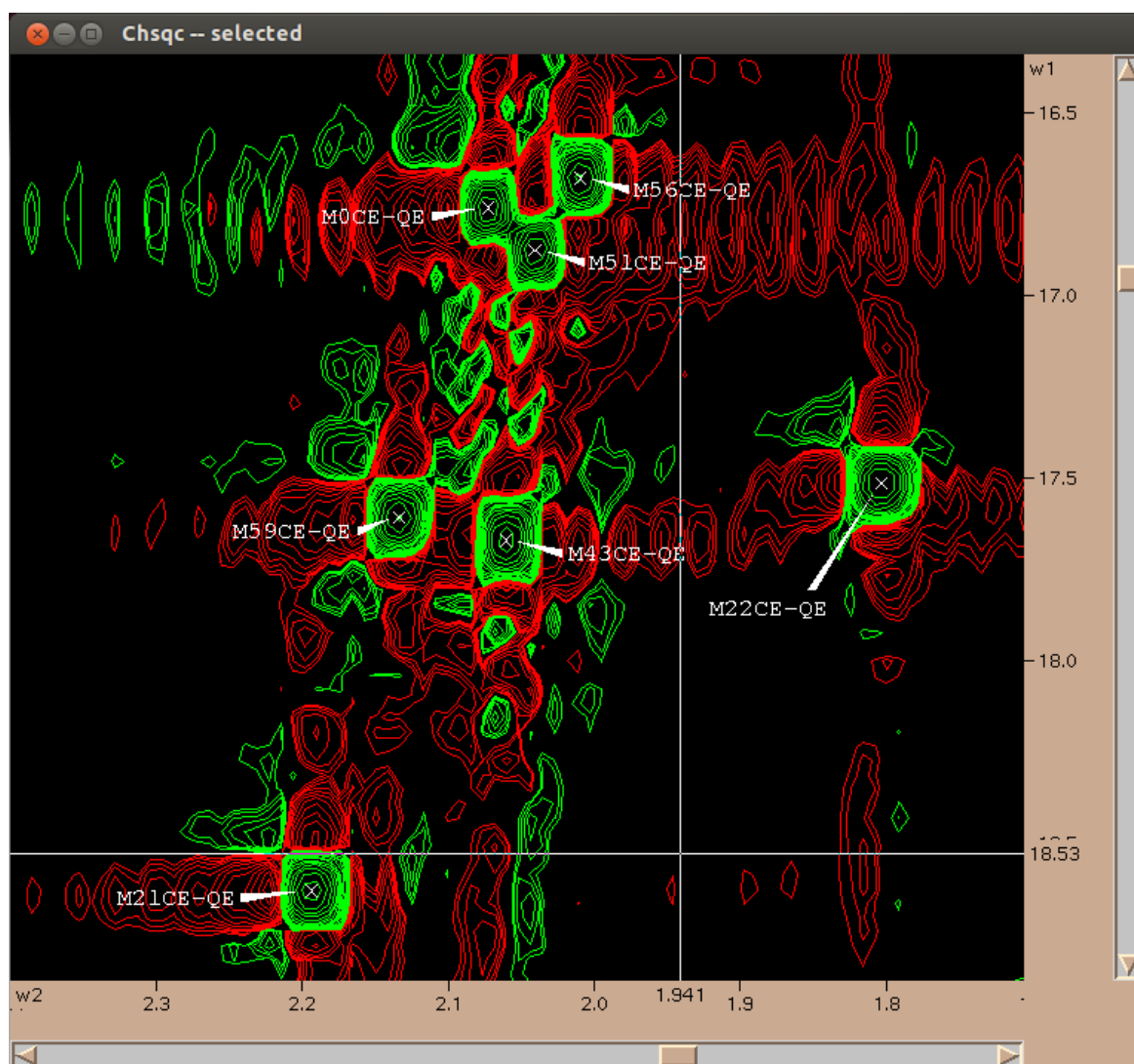
クローニングアーティファクトの M0 は Chsqc 上の CG-QG からが探しやすい. M56 CG-HG2,3 の近くに, 未帰属で信号強度の高い正の信号があり, これが M0 CG-QG となる. hcch を使用し, CB-QB, CA-HA を探す.



5-6. Met CE-QE の帰属

Met (M)の CE-QE は, Chsqc 上で負のメチル基信号として観測される. CG と CE の間に SD (硫黄原子) があるため運動性が高いことが多く, その信号強度は高い場合が多い. Chsqc 上の C: 17 ppm 付近, H: 2 ppm 付近の負の信号を Met の残基数分 (7 個) 見つけ, 通し番号をつける (Met1 CE-QE~Met7 CE-QE). 帰属はそれぞれの CE-QE の NOESY から行う. N 末端などの運動性の高い領域を除き, Met の CE-QE の NOESY からは残基内の HG2,3, HB2,3, HA, HN などが観測される.

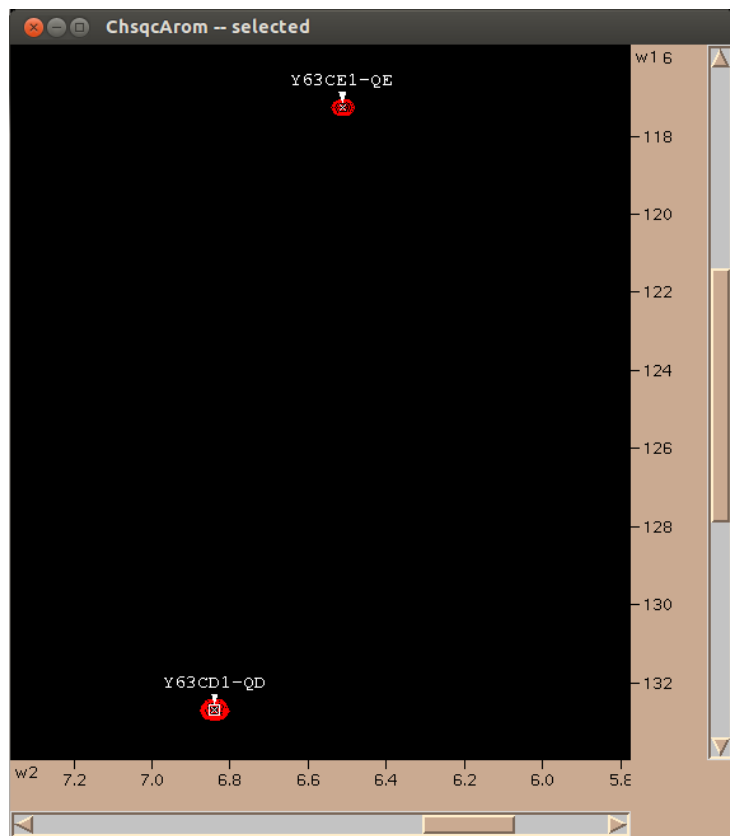
M21, M22, M43 のそれぞれの CE-QE は容易に見つけることができる. M56, M59 は残基内 HA の信号から帰属ができる. M0 と M51 の帰属となる二つの信号はそれぞれ NOESY 上に信号がほとんど観測できず帰属が難しい. 構造計算の結果や構造既知からわかることだが, どちらの残基も分子表面に側鎖が露出しているため運動性が高く NOESY 信号が観測されないことが推測できる. M51 CE-QE の NOESY からわずかに HA (3.332 ppm), HB2 (1.670 ppm) が観測されているので, それに従い帰属する.



5-7. Aromatic 側鎖の帰属

このサンプルには Aromatic 側鎖を持つアミノ酸が Y63 しかない。したがって, ct-[^1H - ^{13}C] HSQC (Aromatic)を測定するだけで帰属が完了する。HbCbCgCdHd (CBHD), HbCbCgCdCeHe (CBHE)や HCCH-TOCSY (Aromatic)は測定する必要がない。

ct-[^1H - ^{13}C] HSQC (Aromatic)での信号観測位置から Y63 CD1-QD, Y63 CE1-QE を帰属する。



5-8. 帰属の最終確認 (Linux)

ここまでで、ほぼ全ての帰属が完了した（構造精密化の過程でのみ NOESY 上に帰属できる原子が実は残っている）。構造計算に進む場合には化学シフトテーブルに間違いがないか、最終確認をする。

"rl"にて、化学シフト値情報を表示し、[Save...]によって化学シフトテーブルファイルを ~/Sparky/Lists にファイル名：shifts として作成する。ターミナルを開き、

```
$ cd ~/Sparky/Lists
```

```
$ spx_assign_check.pl shifts
```

エラーが出ないことを確認したのち、check.list を確認する。

check.list 中で、Asn (N) / Gln (Q)の ND2g や NE2g の行頭に==>がついている。この化学シフト値は、側鎖の NH₂ が NDH となっているときの N の化学シフト値で構造計算等には使用しないためコメントアウトしている。

6. Tips

6-1. Ornament の書式を指定する

[^1H - ^{15}N] HSQC を論文等で図示する際に、帰属情報を付与することがある。特に主鎖帰属の証拠となるので、構造解析論文等では必須の図となる。

"vt"で View Setting ダイアログを開き、Assignment format: %a1-%a2 となっているところを、%g1 とする。

6-2. ピック（バツ印）と選択（四角）の間隔を小さく調整する

[^1H - ^{13}C] HSQC, HCCH-TOCSY や ^{13}C -edited NOESY など多くの信号が観測されている場合、ピークピックの記号と選択されていることを示す四角記号が大きく、ピックを増やしたり操作したりする。バツ印のサイズやオーナメントのサイズは"oz"で表示される Ornament Sizes dialog で編集ができる。しかし、一定値以下に設定した場合、ピックのバツ印に対する選択の四角が大きく、ピークピックやオーナメントの移動操作等の障害となることがある。これを変更するためには Save ファイルを直接編集する必要がある。

```
ornament.selectsize 0.500000
```

```
ornament.pointersize 0.500000
```

```
ornament.lineendsize 0.500000
```

を、それぞれ 0.1 に設定する。直接 Save ファイルを編集するため、バックアップを作成してから実施するのが良いだろう。

6-3. スペクトルの Strip 表示

連鎖帰属ができているかの確認の際に、スペクトルの Strip plot が使用できる。"sp"として Strip Plot を開き、Show から Select strip spectra を選択する。hncoca を選択してから hnca を選択する。このとき、選択する順番が残基ごとの表示順になっているので注意する。OK を押す。Show から All assigned strips を選択すると帰属済みのスペクトルが strip になって残基ごとに表示される。ただし w1 の軸に使用した残基番号（数字部分）に従って並ぶため、w1 に帰属が入っていることが必要である。

6-4. 帰属 0 の帰属情報について消去する

帰属操作のミス（残基番号を間違えた、原子名を間違えたなど）によって、"rl"で表示される化学シフト値情報に間違えた情報が残ることがある。スペクトル上でピークピックの情報を消去しても、Assignment 0 として"rl"の Resonance List に残る。

数個程度であれば、"rr"を用いて消去できる。"rr"で開いた Rename Resonance dialog で From の Group 名を消去したい情報の Group 名、To の Group 名を空欄として Rename を行う。

あまりに多くの消去対象がある場合には、Project ファイルを編集して消去するのが良いかもし

れない。Project ファイルを編集するため、この操作を行うためには、Sparky を終了させた状態で行うこと。

Project ファイル中、各原子の化学シフト値の情報は<resonances>から<end resonances>の間に記録されている。この<resonances>から<end resonances>の間にある行をすべて消去し（<resonances>や<end resonances>は消去しない）、再度 Project ファイルを Sparky 上で開く。Project ファイルの対象となっている Save ファイル中に登場するすべての帰属情報が再度、Resonance List ("rl") に集計されるので、Assignment 0 の情報は消去される。Project ファイルを直接編集するため、この操作は熟練者のみが行うほうが良いだろう。

この Resonance List における Assignment 0 の情報は帰属操作のミスによるゴミが原因でも発生するが、例えば、すでに化学シフト値情報が BMRB などに登録されているなど、外部から読み込んだときにも発生する。外部からの読み込みのときは、Sparky のフォーマットに変換した化学シフト値情報ファイルを Resonance List の Load ボタンによって行う。このときもスペクトル上に帰属はないため、Assignment は 0 となる。

6-5. ピーク強度情報を付与した Peak List の出力

交差飽和系の実験（CS, TCS）や Steady State NOE 実験などでピーク強度比を算出する場合には、Volume や Data height を付加した Peak List の出力が必要となる。

"lt"で表示した Peak List から Options を選択し、Volume や Data height のチェックを入れて Apply ボタンを押すことで、それぞれの値を表示させることができる。Volume は各信号を積分して算出する。積分させたい信号について Pointer Mode を integrate (F10 キー) として取り囲むことで積分が行われる。しかし、重なり合っている信号では正しく積分がなされないため、重なりが多いスペクトルについて強度比を求めるときには、Data height を代用することが多い。

また、Data height の信頼性はそのスペクトルにおけるシグナル強度比に依存する。スペクトルのノイズレベルは"st"として表示される Spectrum dialog に Estimated noise として表示される。また、"lt"のオプションにおいて Signal/Noise のチェックがある。これを入れることで、S/N 比を含んだ状態の Peak List を出力することができる。特に強度比を算出する際にはエラーバーが不可欠であり、多くは S/N から算出する。また、シグナルかどうかの基準について「ノイズレベルの 3 倍以上を信号とした」とすることも多い。

7. コマンドリファレンス

これまでにでてきたショートカットについて、登場順に書き出しておく。

qt	Sparky の終了
fo	スペクトルファイル (ucsf フォーマット) や Save file を開く。
ct	Contour dialog を表示する。等高線の最低位の高さ設定、色、本数などを変更する。
vt	View Setting dialog を表示する。スペクトルの縦横比 (ppm 単位で指定) や、オーナメント、スライスなどの表示／非表示、オーナメントの書式等が設定できる。
vS	スライスを表示／非表示する。
vR	Resonance (化学シフト値の位置に原子名) を表示する。範囲外も fold にて表示する。
zi / zo	zoom in / zoom out 見えているスペクトル平面を拡大縮小する。
lt	Spectrum Peaks (スペクトルのピークリスト) を表示する。Options で Data Height 等を追加したリストの出力ができる。
at	Assignment dialog を表示する。ピックされた信号について軸ごとに Group および Atom の情報を入力できる。
eu	Edit Undo. 直前の操作を取り消す。
zu / zd	Up plane と Down plane. 3次元スペクトルの奥行き方向への移動。
ov	3次元スペクトルにおいて、横軸 w3, 縦軸 w2, 奥行き w1 で表示されているスペクトルについて、横軸 w2, 縦軸 w1, 奥行き w3 と横軸 w1, 縦軸 w3, 奥行き w2 でスペクトルを表示させるコマンド。次の xx コマンドと併用して、3次元スペクトルの異なる面からのスペクトル形状を表示させるために使用する。
xx	描画されている2次元の横軸と縦軸を入れ替えるコマンド。
yt	Synchronize views を表示する。軸移動のシンクロを設定できる。
ol	スペクトルの重ね合わせ。オーナメントは重ね合わせない。
pv	View List を表示する。各スペクトルのピークピック数、帰属数がわかる。それぞれ表示／非表示を設定できる。
fs / fa	Save ファイルの保存 (fs) または名前をつけて保存(fa)。
js / ja	Project ファイルの保存 (js) または名前をつけて保存 (ja)。
rl	化学シフト値の統計情報を表示する。それぞれの化学シフト値から算出元になったスペクトルまで辿ることができる。
jo	Project ファイルの読み込み。
pa	Select all peaks. スペクトル上のすべての信号を選択する。
oc	Ornament copy. オーナメントをコピーする。
op	Ornament paste. オーナメントをペーストする。

kr	Restricted peak pick. 短冊上にピークピックするなどに使用する. 範囲を指定したピークピックができる.
F1, F2..	Substract w1 (w2) sweepwidth. w1 (w2) 軸について観測幅分を減少する方向へと fold させる. (例: 100-136 ppm -> 64-100 ppm とする)
f1, f2..	Substract w1 (w2) sweepwidth. w1 (w2) 軸について観測幅分を増加する方向へと fold させる. (例: 100-136 ppm -> 100-136 ppm とする)
rr	Rename Resonance dialog を表示する. 仮の帰属名を正規な帰属名に変更したり, 未帰属な原子の化学シフト情報について消去するのに使用する.
vd	View duplicate. いま表示されているスペクトルを分割表示する. 新しい分割表示スペクトルはシンクロおよび重ね合わせが無い状態になる.
oz	Ornament Sizes dialog. オーナメントのサイズ等を変更できる. "ot"は Ornament properties dialog で色などを変更できる.
sp	Strip plot. 3次元以上のスペクトルについて短冊表示ができる.