立体構造データベースとその利用

東京大学大学院農学生命科学研究科
アグリバイオインフォマティクス
教育研究ユニット
寺田　透

講義の予定

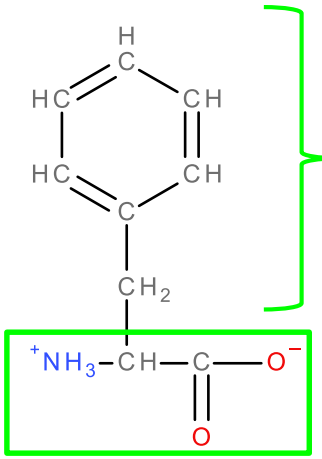
1. 4月19日（火）
   担当：寺田　透
   内容：立体構造データベースの利用と立体構造データの可視化
2. 4月26日（火）
   担当：永田宏次
   内容：X線結晶構造解析による立体構造決定のインフォマティクス
3. 5月10日（火）
   担当：寺田　透
   内容：立体構造からの情報抽出
4. 5月17日（火）
   担当：清水謙多郎
   内容：立体構造のモデリング

本日の講義内容

- タンパク質立体構造データベース
  - 検索
  - データのダウンロード
- 立体構造データの可視化
- 立体構造データフォーマット
- 配列データベースとの連携
- 実習

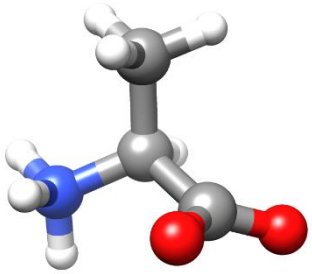
タンパク質の構造（1）

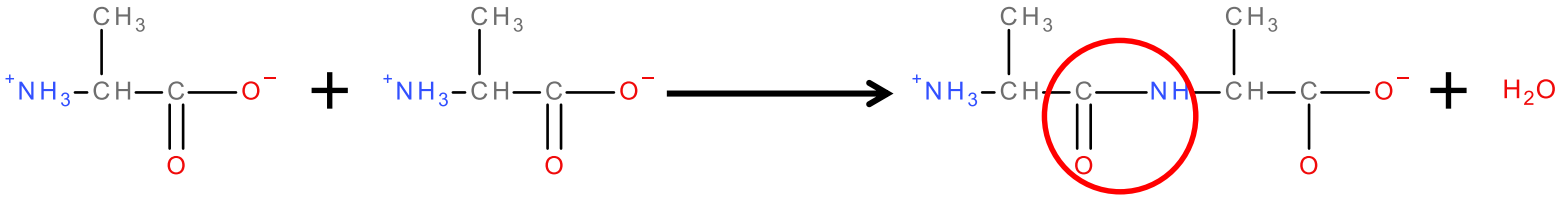
- アミノ酸
  - 主鎖と側鎖
  - 20種類の標準アミノ酸
  - L型のみ
- ポリペプチド
  - アミノ酸がペプチド結合を介して重合したもの



側鎖

主鎖

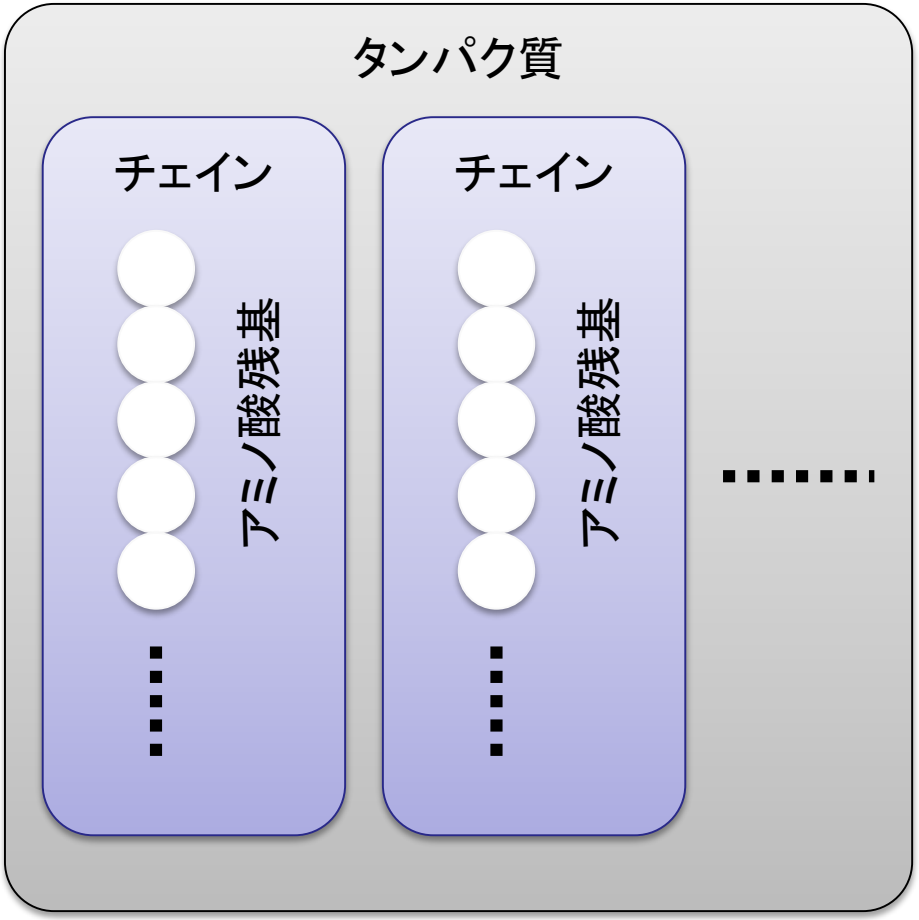




ペプチド結合

タンパク質の構造(2)

- 単量体
  - 1本のポリペプチド鎖(チェイン)からなる
- 多量体
  - 複数のポリペプチド鎖からなる
- 特定の立体構造をとる
  - 部分的に特定の立体構造をとらない領域を持つ場合もある

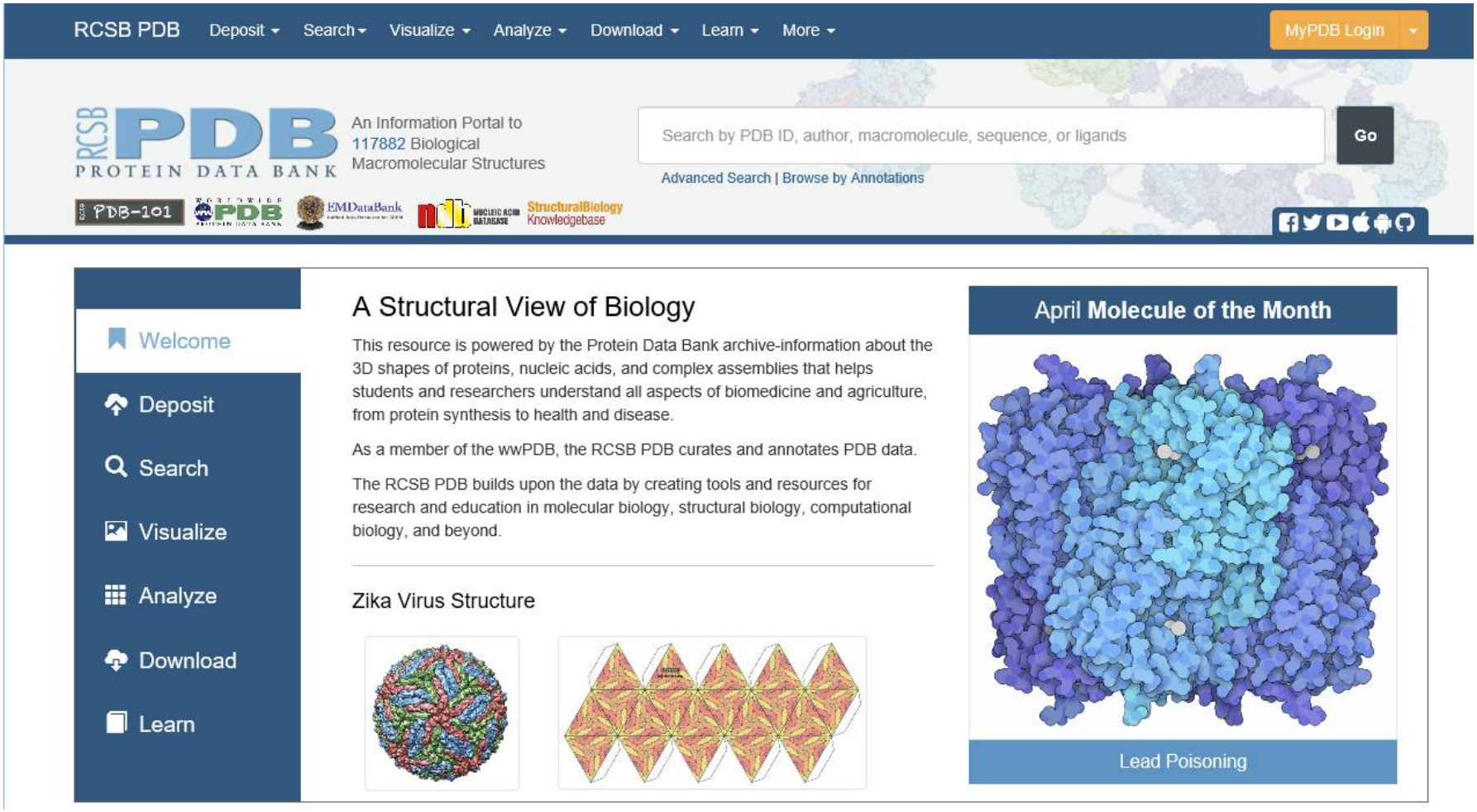


立体構造データベース

- Protein Data Bank (PDB)
- タンパク質、核酸などの生体高分子の立体構造を収集、公開している世界で唯一のデータベース
- 2016年4月時点でのエントリ数は約12万
- 主なWebサイト
  - 米国：http://www.rcsb.org/
  - 欧州：http://www.ebi.ac.uk/pdbe/
  - 日本：http://www.pdbj.org/

データベースへのアクセス

- RCSBのサイト（http://www.rcsb.org/）

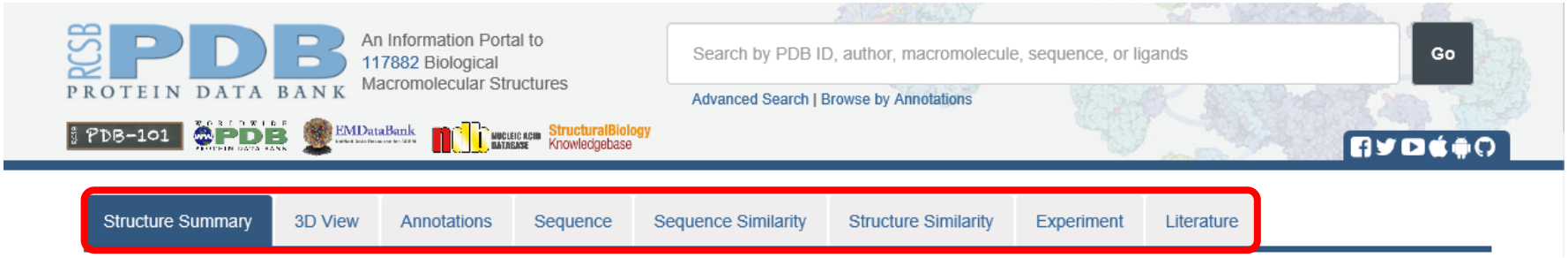


検索

- 立体構造データに対するテキスト検索
  - 例：“HIV Protease”, “Green Fluorescent Protein”, etc.
- PDB IDを直接指定することも可能
  - PDB ID：数字1文字と英数字3文字からなる、各立体構造データに固有のID
  - 例：1HVR, 1J4N, etc.

検索結果の表示

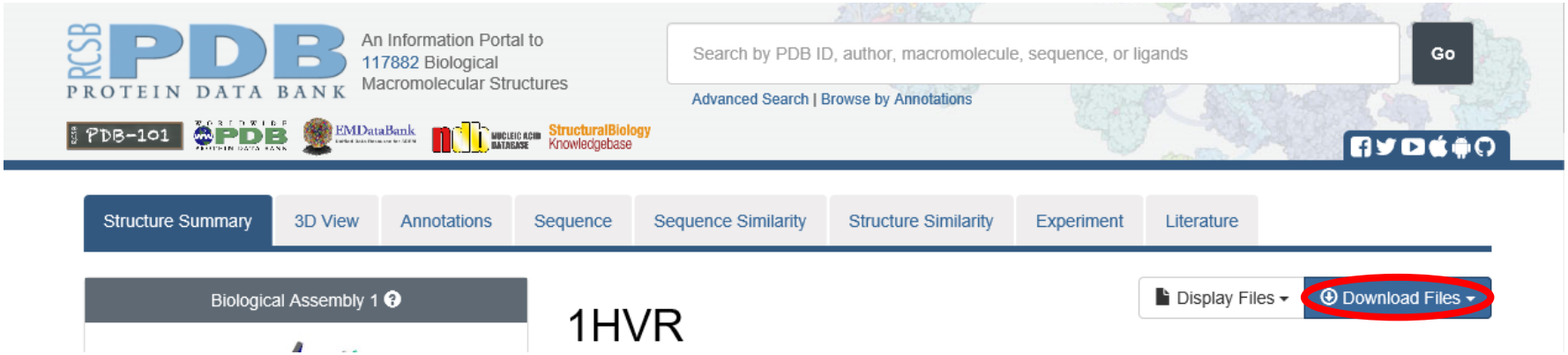
- 上部のタブをクリックして表示を切り替える



  - Structure Summary：概要（文献、組成）
  - Annotations：立体構造分類、ファミリー分類
  - Sequence：アミノ酸配列、2次構造
  - Experiment：立体構造決定法

データのダウンロード

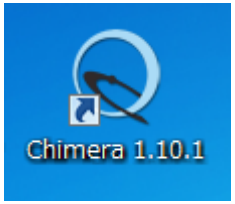
- 右上の「Download Files」から立体構造データをダウンロードできる

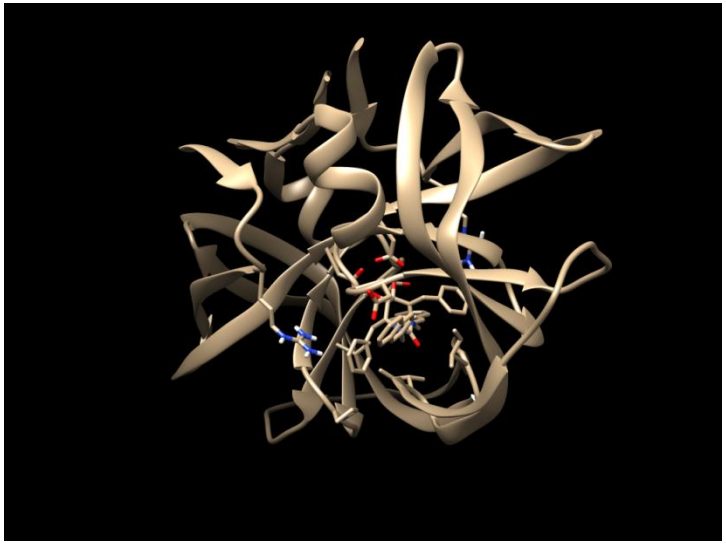


- 「PDB Format」を右クリックし、「対象をファイルに保存」を選び、デスクトップに保存

立体構造データの可視化

1. PDB ID「1HVR」を検索し表示
2. ファイルをダウンロードし、デスクトップに保存
3. Chimera 1.10.1のアイコンをダブルクリックし起動
4. メニューの「File」→「Open」で1HVR.pdbを開く





UCSF Chimeraの操作（1）

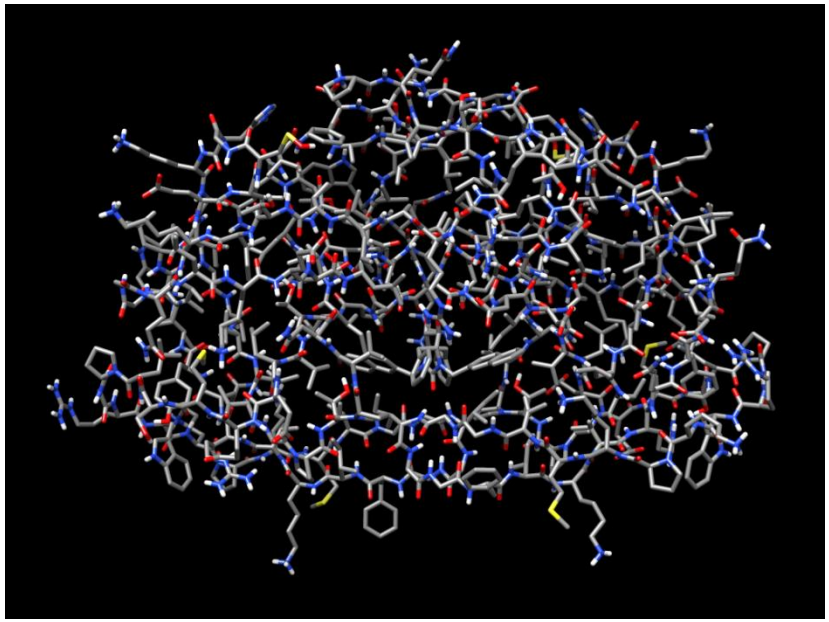
- 回転
  - マウスの左ボタンを押しながらドラッグ
- 並進
  - マウスのホイールを押しながらドラッグ
- ズーム
  - マウスの右ボタンを押しながらドラッグ
  - マウスのホイールを回転

UCSF Chimeraの操作（2）

- 選択（selection）
  - 「Ctrl」キーを押しながら左クリック
  - 選択を追加する時は、「Ctrl」と「Shift」キーを押しながら左クリック
  - 何もないところを「Ctrl」キーを押しながら左クリックすると解除
  - 「↑」キーで、選択範囲を原子→残基→チェイン→分子の順に拡大
- フォーカス
  - メニューの「Actions」→「Focus」で選択された原子を拡大表示する

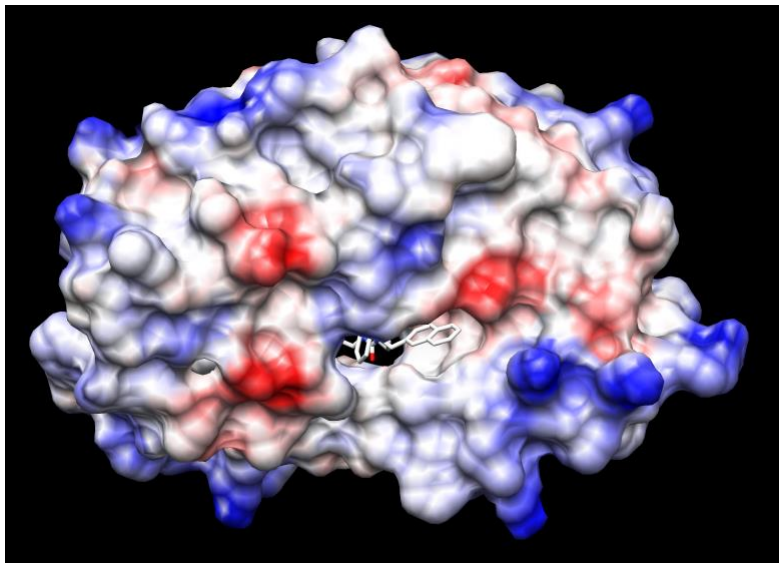
表示の変更（1）

- メニューの「Actions」を用いる
  1. 「Actions」→「Atoms/Bonds」→「show」
  2. 「Actions」→「Ribbon」→「hide」
  3. 「Actions」→「Color」→「by element」
- 選択している場合は、選択された原子の表示が変わる



表示の変更(2)

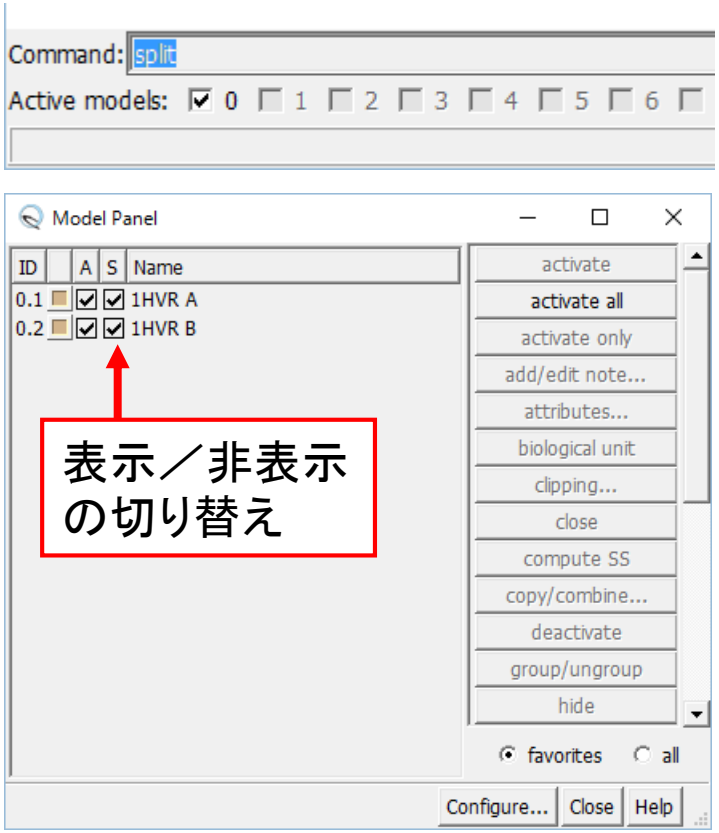
- 「Actions」→「Surface」→「show」で分子表面を表示
- 「Tools」→「Surface/Binding Analysis」→「Coulombic Surface Coloring」で静電ポテンシャルで色分け（少し時間がかかる）



青：正に帯電
赤：負に帯電

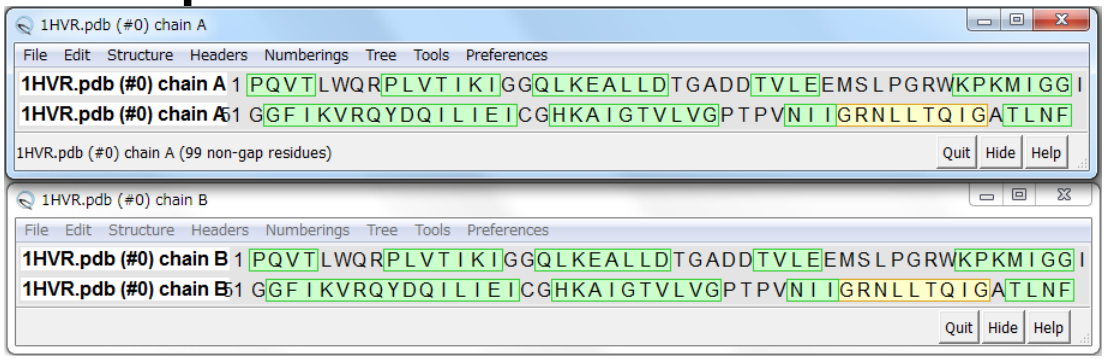
チェインの分割

- 「Favorites」→「Command Line」でコマンド入力用のフィールドを表示
- 「split」を入力しEnter
- 「Favorites」→「Model Panel」を選択
- Model Panelでは「S」のカラムのチェックをオフにすると対応するモデルを非表示にできる



配列の表示

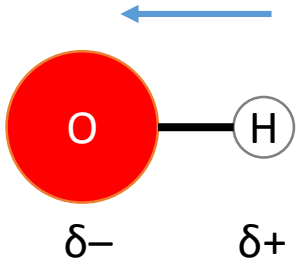
- メニューの「Tools」→「Sequence」→「Sequence」



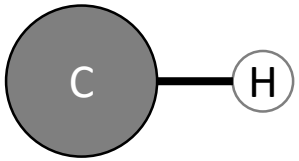
- アミノ酸を選択すると、立体構造上でも選択される
  - マウスの左ドラッグで領域を選択
  - 「Shift」キーを押しながら左ドラッグで追加

参考：水素結合

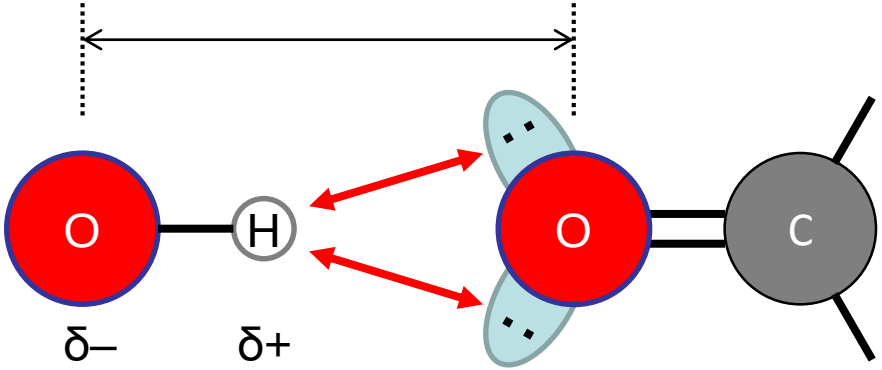
酸素：電気陰性度大（3.4）
水素：電気陰性度小（2.2）
水素原子の電子が酸素
原子に引き付けられる



炭素：電気陰性度小（2.6）
水素：電気陰性度小（2.2）
電子の偏りは生じない



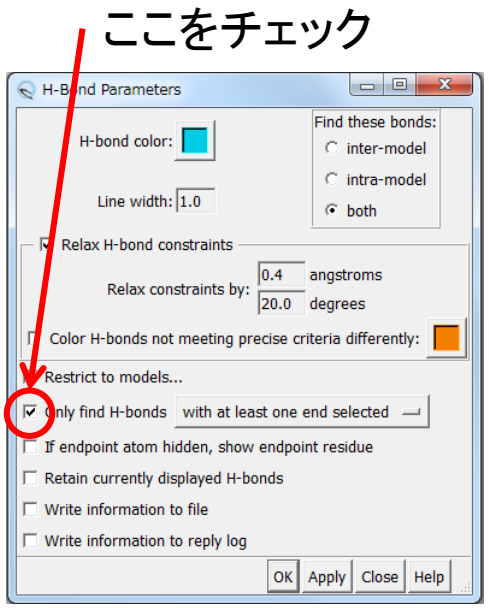
水素結合距離（2.8～3.3 Å）



電気陰性度の高い原子に結合した
水素と電気陰性度の高い原子の
非共有電子対の間の相互作用

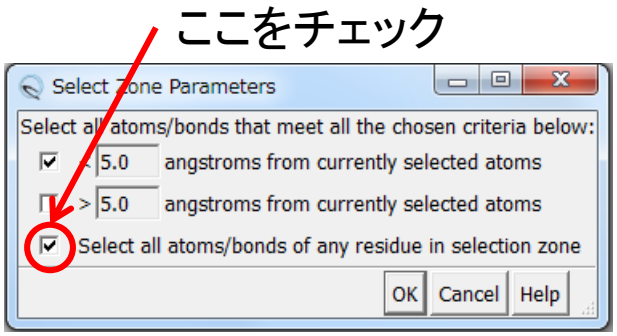
相互作用の検出（1）

- 水素結合の検出
  - X線結晶構造解析から得られた構造には水素原子の座標が含まれていないことが多いため、重原子間の距離で判定する
  - 水素結合を形成する重原子（窒素や酸素）間の距離は概ね2.8 Å～ 3.5 Å
- メニューの「Select」→「Residue」→「XK2」でリガンドを選択
- メニューの「Tools」→「Structure Analysis」→「FindHBond」を選択し右のように設定
  →水素結合が青色の線で表示される



相互作用の検出（2）

- 疎水性相互作用は原子間距離で検出
- リガンドXK2を選択
- メニューの「Select」→「Zone」を選択し、右のように設定し「OK」→リガンドから5 Åにある残基が選択される



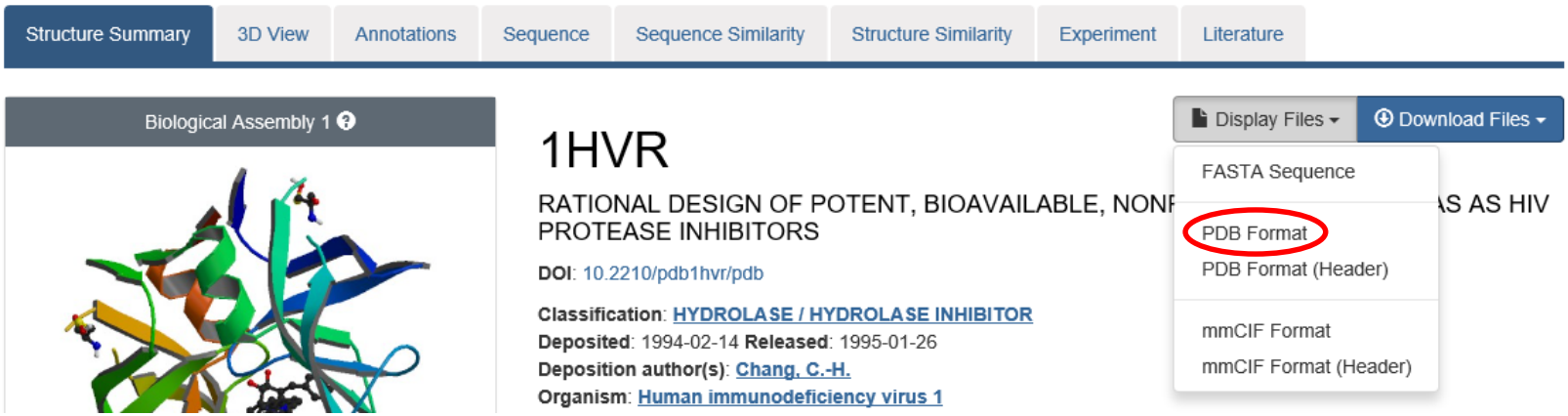
- 「Select」→「Name Selection」で選択範囲を保存して後で呼び出すことができる

データの保存

- メニューの「File」→「Save Session As」で作業状態を保存できる
- 保存した作業状態は、「File」→「Restore Session」で呼び出すことができる
- 画像は「File」→「Save Image」で保存できる

- 「File」→「Close Session」で立体構造データは閉じられ、初期状態に戻る

PDBフォーマット（1）



- PDBファイルには、座標データを含む様々な情報が記載されている
- 「Display Files」→「PDB Format」で中身を表示することができる

PDBフォーマット(2)

- 冒頭部分には、生体高分子の名前や由来、文献等のデータが記載されている

```
HEADER    HYDROLASE(ACID PROTEINASE)                14-FEB-94   1HVR
TITLE     RATIONAL DESIGN OF POTENT, BIOAVAILABLE, NONPEPTIDE CYCLIC
TITLE    2 UREAS AS HIV PROTEASE INHIBITORS
COMPND    MOL_ID: 1;
COMPND   2 MOLECULE: HIV-1 PROTEASE;
COMPND   3 CHAIN: A, B;
COMPND   4 ENGINEERED: YES
SOURCE    MOL_ID: 1;
SOURCE   2 ORGANISM_SCIENTIFIC: HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 1;
SOURCE   3 ORGANISM_TAXID: 11676;
SOURCE   4 EXPRESSION_SYSTEM: ESCHERICHIA COLI;
SOURCE   5 EXPRESSION_SYSTEM_TAXID: 562
KEYWDS    HYDROLASE(ACID PROTEINASE)
EXPDTA    X-RAY DIFFRACTION
AUTHOR    C.-H.CHANG
```

PDBフォーマット（3）

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	
ATOM	1	N	PRO	A	1	-12.735	38.918	31.287	1.00	39.83	N
ATOM	2	CA	PRO	A	1	-12.709	39.097	29.830	1.00	39.29	C
ATOM	3	C	PRO	A	1	-13.575	38.051	29.162	1.00	39.78	C
ATOM	4	O	PRO	A	1	-14.097	37.126	29.753	1.00	38.67	O
ATOM	5	CB	PRO	A	1	-11.243	39.010	29.398	1.00	37.79	C
ATOM	6	CG	PRO	A	1	-10.636	38.128	30.469	1.00	38.69	C
ATOM	7	CD	PRO	A	1	-11.368	38.593	31.729	1.00	37.10	C
ATOM	8	H2	PRO	A	1	-13.142	39.756	31.758	0.00	15.00	H
ATOM	9	H3	PRO	A	1	-13.429	38.158	31.502	0.00	15.00	H
ATOM	10	N	GLN	A	2	-13.682	38.255	27.876	1.00	41.01	N

①レコード名（標準アミノ酸はATOM、非標準はHETATM）
②原子番号
③原子名（主鎖アミド窒素：N、α炭素：CA、β炭素：CBなど）
④残基名（3文字表記）
⑤Chain ID
⑥残基番号（配列データベース中の番号に一致させる）
⑦⑧⑨それぞれ原子のx, y, z座標 [Å]
⑩occupancy（その原子の重み因子、通常は1.00）
⑪温度因子B [Å^2]（X線結晶解析で決定されている場合のみ意味がある）

参考 : 可視化ソフトウェア入手先

- Discovery Studio Visualizer（http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization-download.php）
- PyMol（http://www.pymol.org/）
- RasMol（http://www.openrasmol.org/）
- Swiss-PdbViewer（http://spdbv.vital-it.ch/）
- UCSF Chimera（http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/）

実習課題1（1）

1. RCSBのサイトで「Green Fluorescent Protein」を検索する
2. たくさんヒットするので、PDB ID「1GFL」で改めて検索し、Structure Summaryを表示する
3. PDBファイルをダウンロードしてデスクトップに保存
4. Chimeraでこのファイルを開く
5. メニューから「Select」→「Chain」→「B」でB鎖を選択した後、「Actions」→「Atoms/Bonds」→「delete」でB鎖を削除する（splitしてからB鎖をcloseしても良い）
6. 「Actions」→「Focus」で位置と大きさをウインドウに合わせる

実習課題1（2）

このタンパク質は、紫外線を受け取って緑色の蛍光を発する。
発色団はSer65-Tyr66-Gly67が自発的に環化してできる。

7. 「Tools」→「Sequence」→「Sequence」で配列を表示し、Ser65-Tyr66-Gly67を選択
8. 「Actions」→「Atoms/Bonds」→「show」でこれらの残基を表示
9. 「Actions」→「Ribbon」→「hide」でこれらの残基のリボン表示を消去（環化部分を確認せよ）
10. 選択を解除し、「File」→「Save Image」で画像を保存

立体構造決定法

立体構造決定法	エントリ数	割合
X線結晶構造解析	105259	89.3
核磁気共鳴（NMR）	11341	9.6
電子顕微鏡	993	0.8
その他	289	0.2
合計	**117882**	**100.0**

- 全エントリ中9割近くがX線結晶構造解析法により、立体構造が決定されている。
- 残りの大部分は核磁気共鳴法
- X線結晶構造解析法については、次回解説

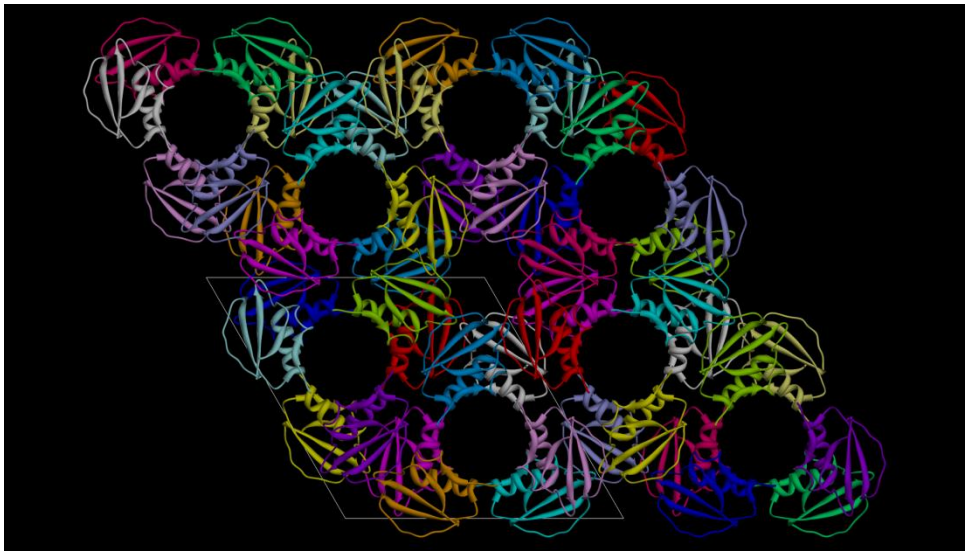
座標データに表れる違い

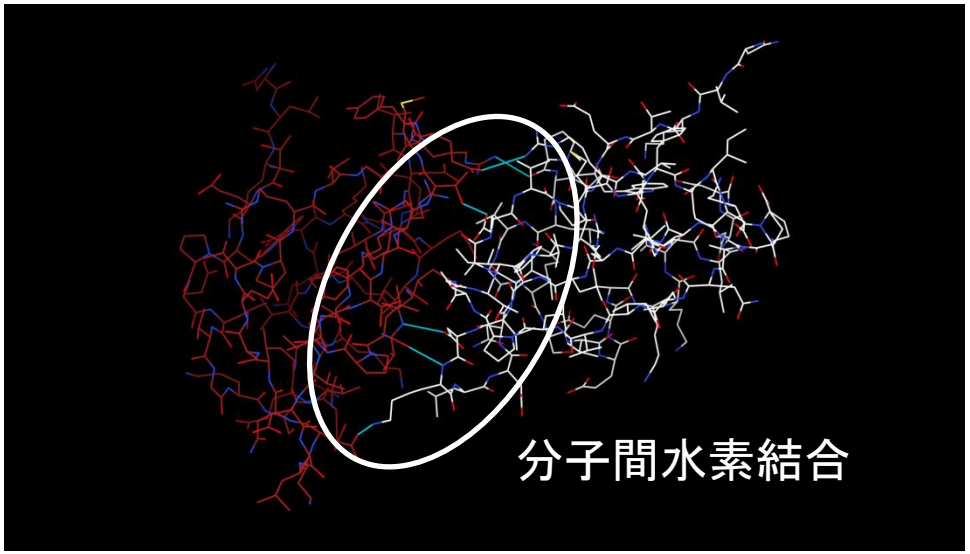
	X線結晶構造解析法	核磁気共鳴法
サンプルの状態	結晶（分子間接触あり）	溶液
分子量の上限	なし	200残基程度まで
水素原子	座標データに含まれない	座標データに含まれる
欠失原子	あり	通常なし
モデル数	通常1つ（部分的に複数）	複数
精度の指標	分解能[注]	モデル構造のばらつき
原子の分布	温度因子	モデル構造のばらつき

注：X線結晶構造解析法ではどれだけ回折像を用いたかによって決まる分解能（resolution）が全体の精度の指標。2.0～2.5 Åが普通、1.5 Å以下だと高分解能。

結晶構造の再現(1)

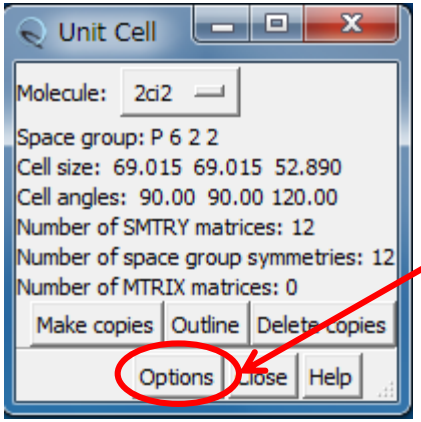
- 結晶中では、タンパク質分子が規則正しく並んでいる
- PDBに登録されている座標は、繰り返しの最小単位(asymmetric unit;非対称単位)
- 隣接したタンパク質分子間で相互作用していることがわかる



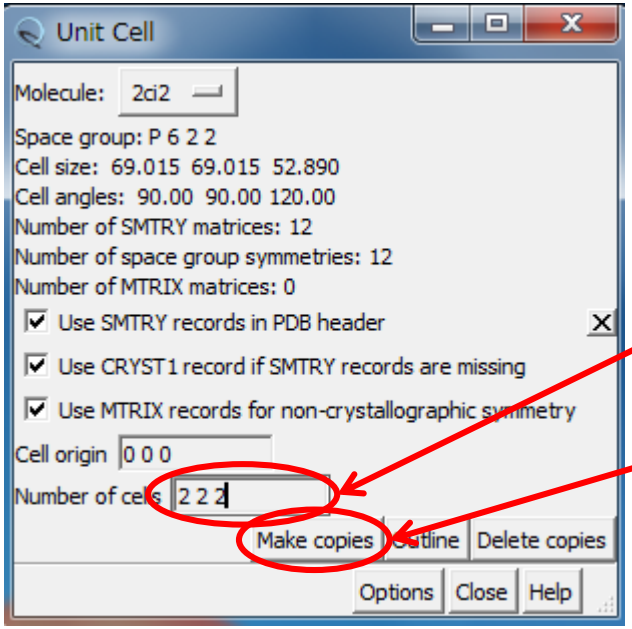


結晶構造の再現(2)

- メニューの「File」→「Fetch by ID」を選択し、PDB IDに2CI2を指定して「Fetch」
- 結晶構造の再現には、「Tools」→「High-Order Structure」→「Unit Cell」で右図のように指定する



ここをクリックし以下の表示にする

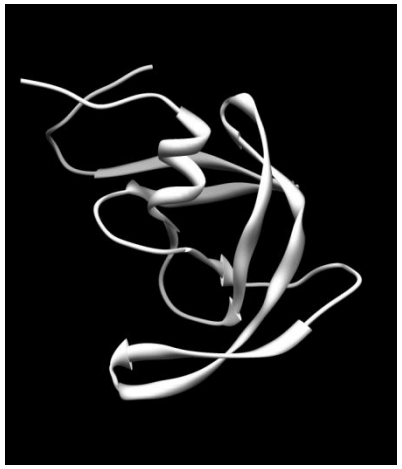


変更

ここをクリック

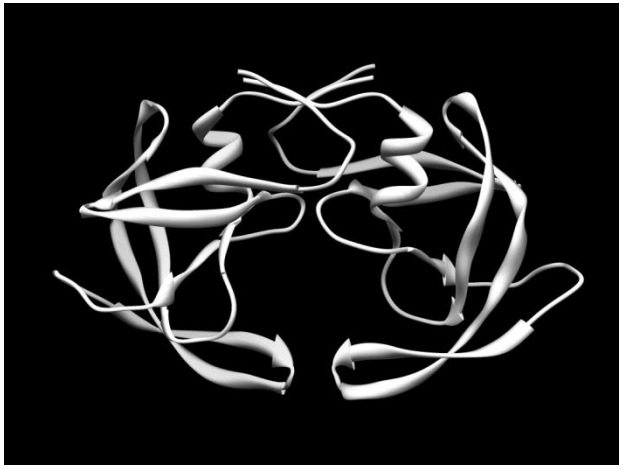
Biological assembly (unit)（1）

- 生物学的に機能しうる最小限の分子構成をbiological assembly (unit)と呼ぶ
- 分子の対称性が、結晶の対称性と偶然一致すると、非対称単位には多量体の一部しか含まれない場合がある
- RCSBのサイトではbiological assemblyの座標がダウンロードできる



3PHVに登録されている座標

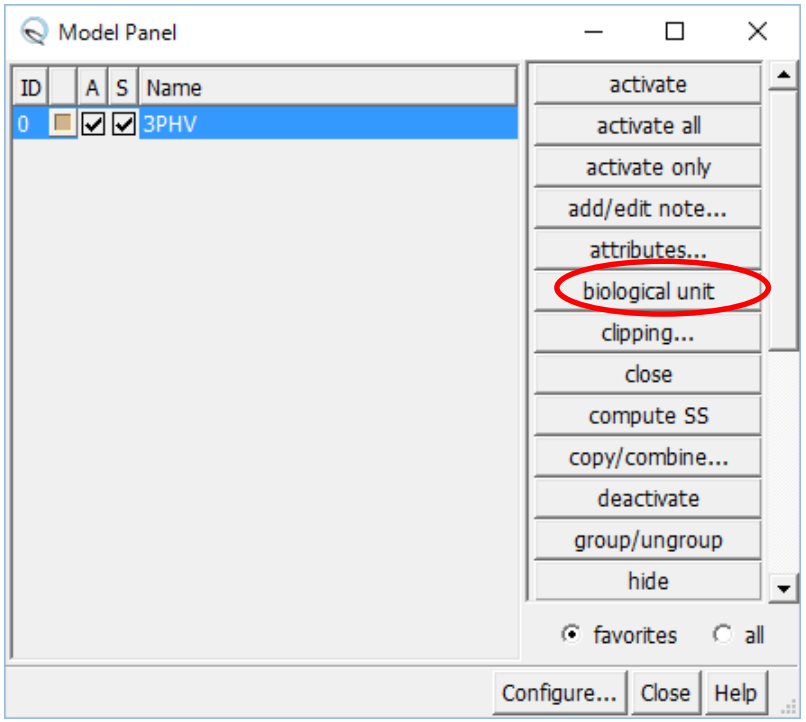
Biological assemblyの座標



Biological assembly (unit)（2）

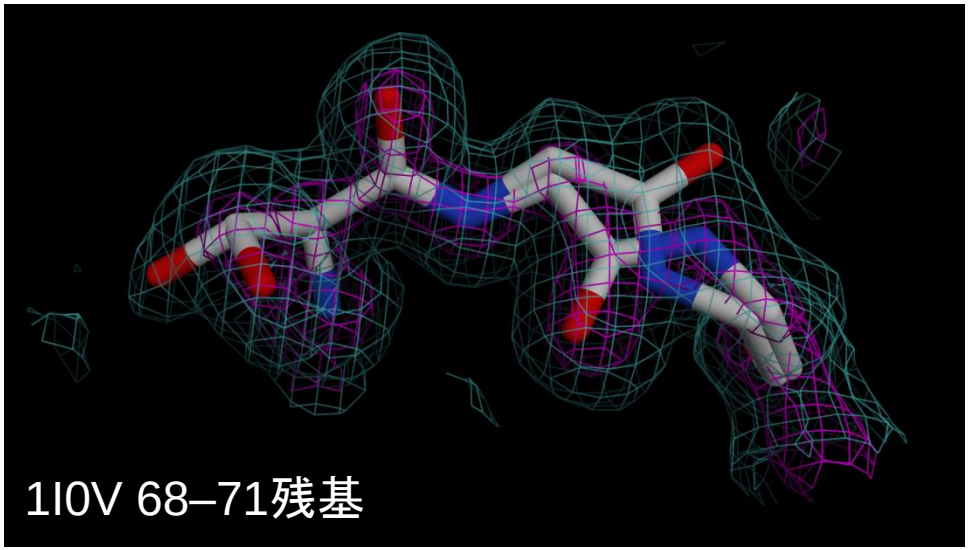
- Chimeraでの操作法

1. メニューの「File」→「Fetch by ID」を選択し、PDB IDに3PHVを指定して「Fetch」
2. 「Favorites」→「Model Panel」を選択
3. 「biological unit」をクリック



Alternative conformation

- 結晶には異なるコンフォメーションを持つ複数の構造が含まれる可能性がある
- このような場合、X線回折データから得られる電子密度図では、それらの構造が存在割合に応じて複数見えることになる
- PDBファイルでは、occupancyに1より小さい重みを与え、同じ名前の原子を複数の座標で表す
- この時、原子名の残基名の間（17文字目）に、コンフォメーションを区別するIDを記入する



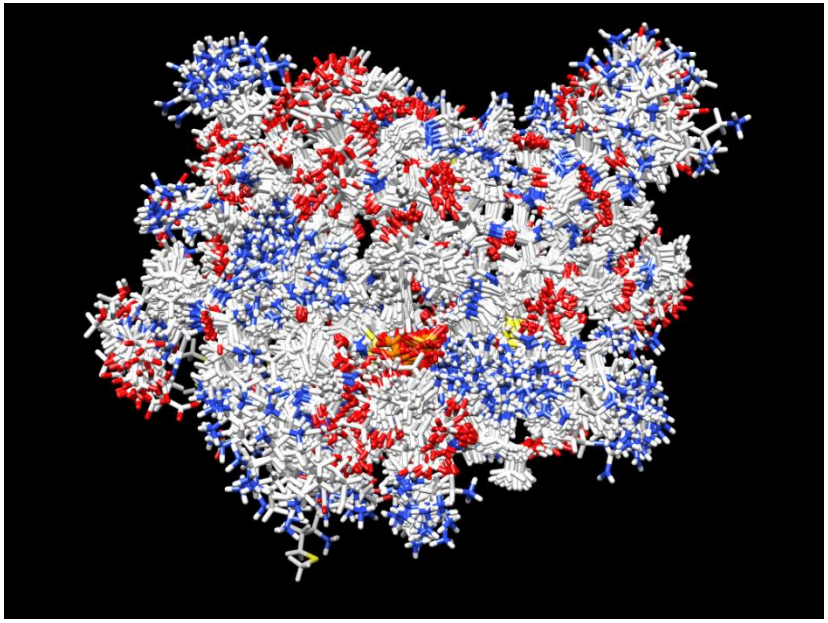

```
ATOM    548  N  AGLY A  70       8.699  28.734  14.638  0.75 16.18
ATOM    549  N  BGLY A  70       8.755  28.829  14.563  0.25 15.67
ATOM    550  CA AGLY A  70       9.857  29.561  14.390  0.75 16.18
ATOM    551  CA BGLY A  70       9.772  29.792  14.136  0.25 18.27
ATOM    552  C  AGLY A  70      10.666  29.621  15.667  0.75 11.67
ATOM    553  C  BGLY A  70      11.119  30.042  14.811  0.25 15.91
ATOM    554  O  AGLY A  70      10.224  29.152  16.720  0.75 15.70
ATOM    555  O  BGLY A  70      12.083  30.400  14.131  0.25 22.24
```

Alternate location indicator

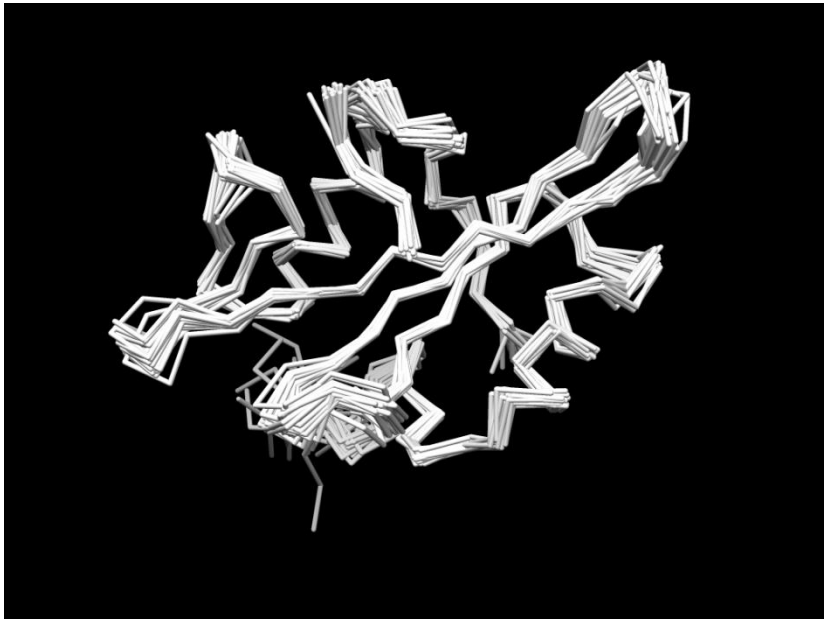
Occupancy

NMR構造

- ヒトSrc SH2ドメインと基質ペプチドの複合体の立体構造、1HCTを開く



「Actions」→「Atoms/Bonds」→「show」
「Actions」→「Ribbon」→「hide」



「Actions」→「Atoms/Bonds」→
「backbone only」→「chain trace」

NMR構造の特徴

- 立体構造が複数のモデルの重ね合わせで表現される
- モデル構造のばらつきを精度の指標とする
  - モデル構造の平均構造からのばらつき
    RMSD (root-mean-square deviation)

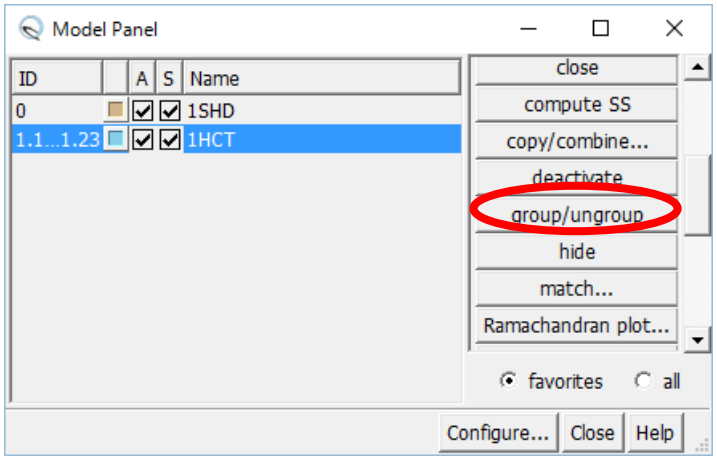
$$\mathrm{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left|\mathbf{r}_i - \left\langle \mathbf{r}_i \right\rangle\right|^2}$$

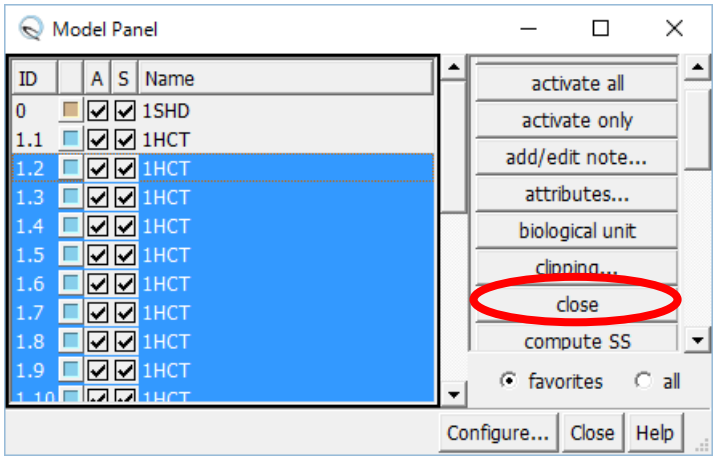
$\mathbf{r}_i$: 原子iの座標
$\langle \mathbf{r}_i \rangle$: 平均構造の原子$i$の座標

構造の比較（1）

- ヒトSrc SH2ドメインと基質ペプチドの複合体についてX線構造とNMR構造を比較する

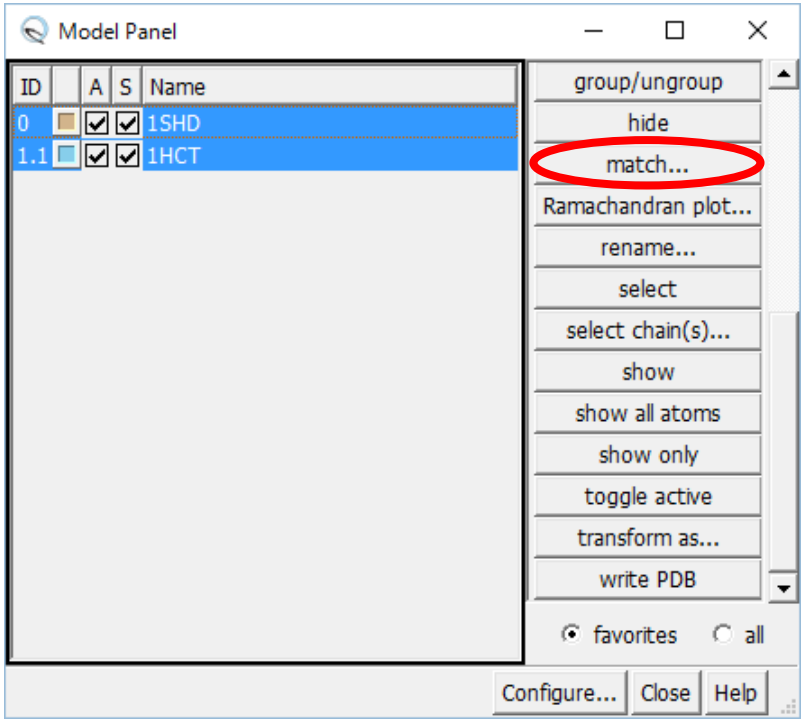
1. 「File」→「Fetch by ID」で1SHDを開く
2. 同様に1HCTを開く
3. 「Favorite」→「Model Panel」を開く
4. 右上図のように、1HCTの行をクリックして選択したのち、「group/ungroup」をクリックして展開
5. 右下図のようにID 1.2の行をクリックして選択したのち、「Shift」キーを押しながらID 1.23をクリック
6. 「close」をクリックしてこれらの構造を閉じる



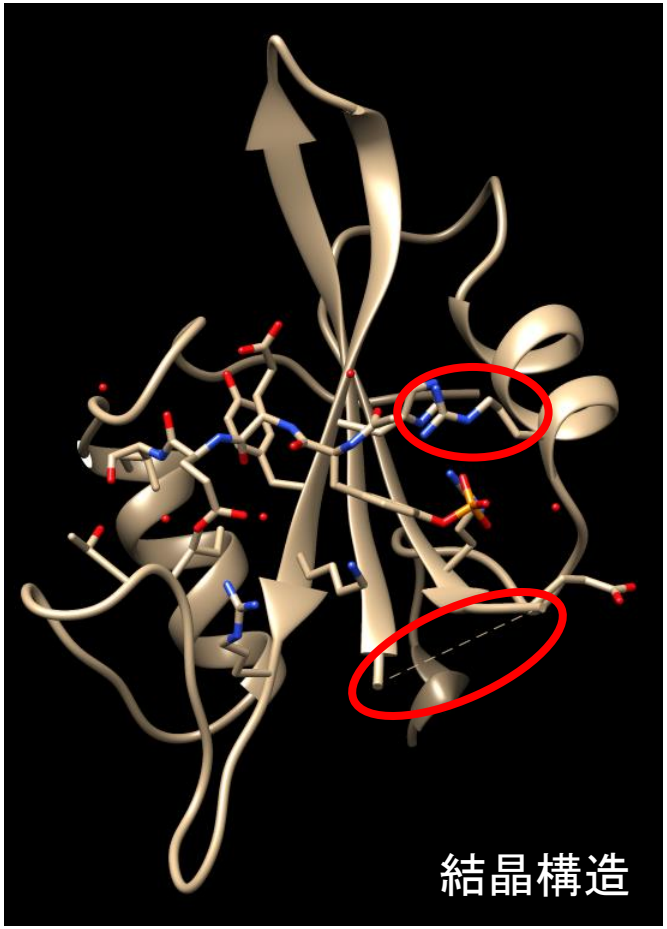


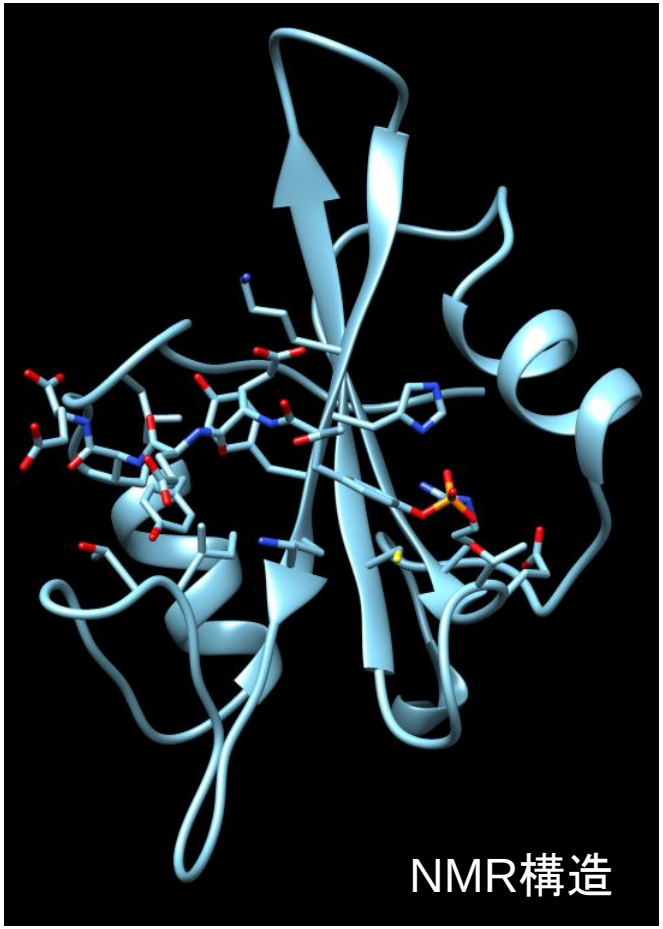
構造の比較（2）

7. 1SHDと1HCTを選択し「match」をクリック
8. 現れたウィンドウで「OK」
9. ChimeraのWindowの下部に重ね合わせに使われた残基数（90残基）とRMSD（0.933 Å）が表示される



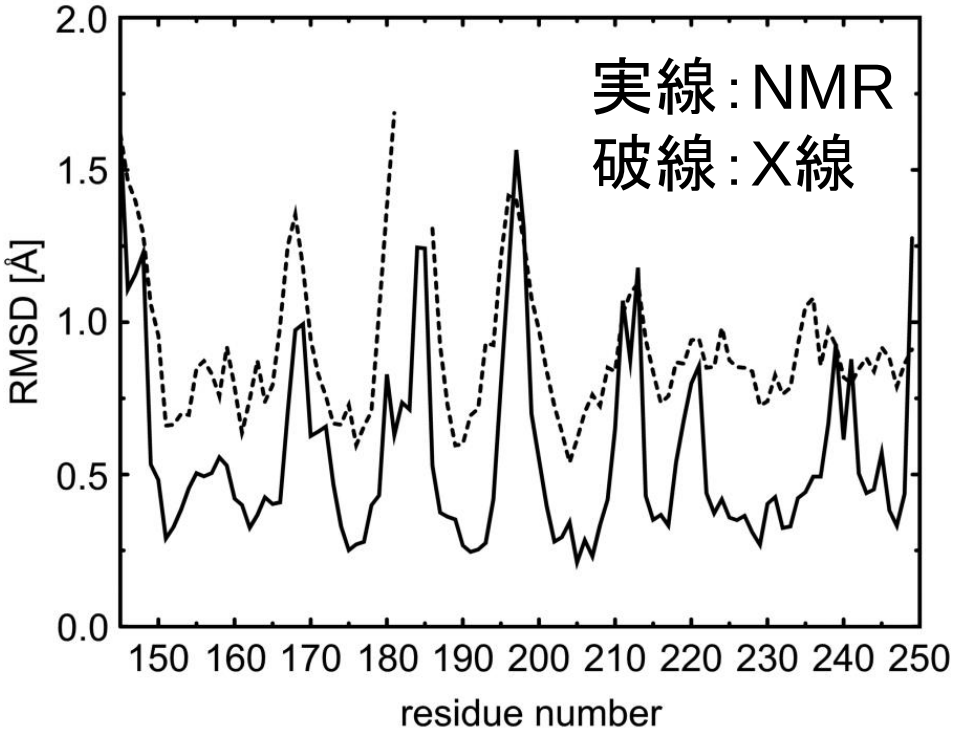
構造の比較(3)





構造の比較(4)

- NMR構造については、各モデルのCα原子の平均構造からのずれの平均値(RMSD)
- X線構造では温度因子から換算
  - $B = 8\pi^2/3\ (\Delta r)^2$
  - $B = 30$で$\Delta r = 1.07$ Å
- 温度因子が大きい残基は、NMRでも構造のばらつきが大きい傾向



配列データベースとの連携

- 配列データベースへのリンク
  - RCSBの検索結果のSequenceタブ
- 配列データベースからのリンク
- 配列からの検索

配列データベースからのリンク

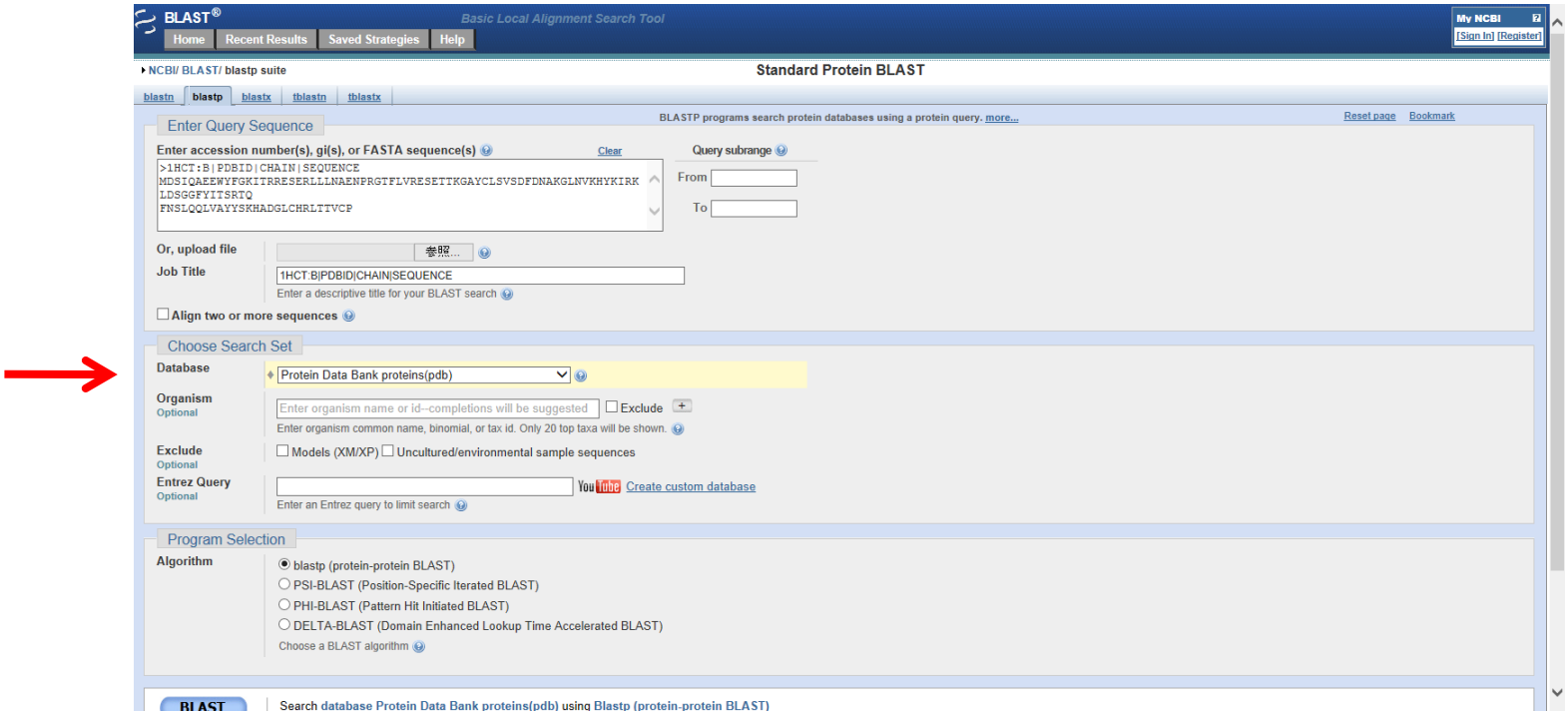
1. タンパク質配列データベースUniProt（http://www.uniprot.org/）を開く
2. QueryにSRC_HUMANと入力し「Search」
3. 検索結果の下のほうに、“3D structure databases”のセクションがあり、1HCTや1SHDが現れていることを確認すること

配列からの検索（1）

1. NCBI BLASTのサイトにアクセス（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）
2. Basic Blastにある「protein blast」をクリック
3. 講義のページで1HCT_B.fastaをクリック
4. 右クリックして、「すべて選択」を選んだあと、再び右クリックして、「コピー」
5. BLASTのページの「Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)」のテキストエリアの中で右クリックし、「貼り付け」

配列からの検索（2）

6. Choose Search SetのDatabaseを「Protein Data Bank proteins (pdb)」に設定
7. BLASTをクリック



実習課題2

1. 講義のページで、kadai.fastaを表示し、この配列をもつタンパク質の立体構造データを検索せよ
2. 配列一致度100%のヒットのPDB IDを用いてRCSBのサイトで検索せよ
   - タンパク質名、立体構造決定の方法を確認する
3. PDBファイルをChimeraで開き表示せよ
4. Biological assemblyの全体像をPNG形式で保存せよ
   - Biological assemblyが複数ある場合は1つのみ表示し、残りは非表示にすること（splitコマンド利用）

課題の提出

- 課題1で保存した画像をPowerPointのスライドに貼り付け、発色団の位置を赤いマルで囲んで示せ
- 同じPowerPointファイルの別のスライドに課題2の全体像を貼り付け、PDB IDとタンパク質名、立体構造決定の方法を記入せよ
- PowerPointファイルはメールに添付して寺田宛（tterada@iu.a.u-tokyo.ac.jp）に送ること
- その際、件名は「構造実習」とし、本文に氏名と学生証番号を必ず明記すること