ウェブブラウザと分子構造ビューアで 生体分子の立体構造を見る

PDBj & 創薬等PF情報拠点講習会 2016-03-15 大阪大学蛋白質研究所

鈴木博文 PDBj / 大阪大学蛋白質研究所



- ウェブブラウザの確認 Firefoxが望ましい 最新版であれば、IEでもOK

- Java実行環境のインストール(可能であれば)
 「万見」で利用

 (Javaがないと、動作が遅い)
- UCSF-Chimeraのインストール Chimeraは非営利的な利用のみフリー インストール済みのPCを用意しています

- ハードウェアの準備

マウスの準備(貸出用を用意しています) 電源(電力消費量が高い作業を実施します)





- 生体分子の「3次元構造を眺めること」を体験
 1.「万見(Yorodumi)」で基本的な構造観察
 2. UCSF-Chimeraを使って、少し高度な構造観察
- 知識取得・情報収集ではなく、構造を見て操作する体験
- インフルエンザウイルス由来のノイラミニダーゼを主題とする
- 想定する聴衆: 生体分子構造研究の経験がない、少ないかた

※ 講習会では時間の都合で、この資料のすべてを実施できない可能性があります。ご了承ください。



鈴木博文

- 蛋白質研究所 PDBj のスタッフ

- 以前は、電子顕微鏡による構造解析をやっていた
- 現在は電子顕微鏡構造のデータベースに関する仕事
- X線結晶学、ウイルス学、薬学は専門ではない
- 万見の開発・管理者
- UCSF-Chimeraのヘビーユーザー (以前の仕事でも、データベースの仕事でも)



タミフルの働きを見てみる (「万見」を使ってみる)

シナリオ:インフルエンザ治療薬、タミフルについて知りたくなった

→ Googleで「タミフル」を検索し、Wikipediaの「オセルタミビル」の

- ページから、以下の情報を得た
 - 成分の名称は「オセルタミビル」
 - 「ノイラミニダーゼ」というタンパク質を阻害する
- → タンパク質ならPDBということで・・・

手順:

- PDBjのページ(http://pdbj.org/)で 「オセルタミビル」を検索(入力ボックスにカタカ ナで入力)

→PDBに44件、ウェブページに1件のヒット

- まずは、「ウェブページ」タブの「113: インフル エンザ ノイラミニダーゼ・・・」項目をクリック →「今月の分子」のページへ



「オセルタミビル」と入力

「今月の分子」でノイラミニダーゼを調べる



読んで得た情報:

- ノイラミニダーゼは「糖鎖の末端を切断する」タンパク質

「ウイルスが細胞から離れるときに」「細胞表面にひっかかって しまわないように」

- オセルタミビルはその邪魔をする
- 4サブユニットからなる

PDB-3cl0 概要のページを見てみる

手順:

- ブラウザの戻るボタンで検索結果ページ に戻る
- 3cl0をクリック
- →3cl0の概要ページが表示される

チェック:

- 由来: A型インフルエンザウイルス由来
- N1型のノイラミニダーゼ

手順:(万見を開く) - ページ右下の「他のデータベース」ボック スの中の3つ目「Yorodumi」をクリック

FAQ	変換クエリ: (0	oseltamivir)		
お問い合わせ リンク集	4CPM	STRUCTU /60/200	JRE OF THE NEURAMINIDASE FROM THE B/BRISBANE 8 VIRUS IN COMPLEX WITH OSELTAMIVIR	22.75/IR
	👱 🖃	分子名称:	NEURAMINIDASE (E.C.3.2.1.18)	Auto-pager:
 データ登録 ヘルプ PDBへの登録 	1	若者	Vachieri, S.G., Collins, P.J., Escuret, V., Casalegno, J.S., Cattle, N., Ferraris, O., Sabatier, M., Frobert, E., Caro, V., Skehel, J.J., Gamblin, S.J., Valla, F., Valette, M., Ottmann, M., McCauley, J.W., Daniels, R.S., Lina, B.,	結果を夕う
ADIT-NMR 🖉	enter a	登録日	2014-02-07	
データ登録について		公開日	2014-05-14	
		最終更新日	2014-10-08	関連性か高い
ダウンロード		実験手法	X-RAY DIFFRACTION (2.75 Å)	PDBID
PDBアーカイブからの データダウンロード		引用文献	A Novel 1221 L Substitution in Neuraminidase Confers High Level Resistance to Oseltamivir in Influenza B Viruses. J.Infect.Dis., 210, 2014	PDBIDの降順 登録日 登録日の新しい
新7:	2010	N1 NEUR	AMINIDASE H274Y + OSELTAMIVIR	公開日の新しい
	JCLU	分子名称:	Neuraminidase (E.C.3.2.1.18)	分解能
77-79	2 3	若者	Collins, P., Haire, L.F., Lin, Y.P., Liu, J., Russell, R.J., Walker, P.A., Skehel, J.J., Martin, S.R., Hay, A.J., Gamblin, S.J.	
_	(Set	登録日	2008-03-18	

検索結果

概要 構造情報	実験情報 機能情報 相同蛋白質 ダウンロード	
3CL0		
N1 Neurami	nidase H274Y + oseltamivir	
3CL0 の概要		
関連構造のPDB ID	<u>3CKZ 3CL2</u>	
分子名称	Neuraminidase (E.C.3.2.1.18)	他のテータベース
機能のキーワード	N1, neuraminidase, H274Y, oseltamivir, Glycos Transmembrane, Virion, VIRAL PROTEIN,VIRA	; 1育¥0
由来する生物種	Influenza A virus	RCSB-PDB
ポリマー鎖の合計数	1	PDBe 🕝
分子量の合計	<u>42534.74</u>	Varadumi 2
		forodulli
30100	柳亜	CATH 🖉
	加好	ESSP 💋

ページ右下の

ボックス

万見で見るノイラミニダーゼ



マウス操作で 自由な方向に向けられる (マウスホイールで拡大縮小)

このページはいったい何?→右上の「ヘルプ」をクリック 「万見は、生体分子の3次元構造を気軽に眺めて、見て、動かして、回し て、学んで、楽しむためのウェブページです。」

手順:

- 右上パネルの「構成要素」ボタンを クリック
- →構成要素パネルが開く

チェック:

- 構成要素は4種類
 - ノイラミニダーゼ
 - G39 (これがオセルタミビル)
 - カルシウムイオン
 - 水



タミフルはどこ?



[G39-A-800]ボタンを押すと、左のパネルの中でオセルタミビルが 選択され光る マウスで見やすい方向に向ける

- G39は、このオセルタミビルの化合物ID (PDBによる管理ID)
- A-800は、A鎖の残基800という意味

集まって働くタンパク質

PDBに登録されているのは「非対称単位」という構造単位 実際に働くときの「生物学的単位」とは違う場合が多い



右上の「データ」ボタンをクリックすると「データ」パネルが現れる 生物学的単位の[1]ボタンを押すと、「生物学的単位」が見られる

表示スタイルを変えてみる

13

標準では、リボンモデル(カートゥーンリボンモデル)という 模式的なモデルで表示される

Yorodumi 万見	●データ ●開く 図構成要素 ●表示 ●スタイル ?ヘルプ +
PDB-3cl0 Jmol V	合種ハイルを表示するにののパタフです。ハイルはマリス操作で位置・ を変更できます。
	💈 スタイル 🛛 🗙 🗙
	構造データの色・表示方式などのスタイルを操作するパネルです。特定の部分のみスタイルを変更するには、あらかじめその部分を、トー選択状態にしてから操作してください。
	原子モデル 表面モデル
Carl Star & Star & Star Frank	、 小 リセット 、 小 光らせる 、 小 他を隠す 、 小 中心
	おまかせスタイ 小さい分子用 #1▼ 一般的なタンパク質用 #1▼
	- 29110000
	<mark>इ</mark> न-१
	このパネルには、現在表示しているデータエントリについての概要が表示されます。
Jmol_S	データベー ス・ID PDB-3cl0 ♪他のデータ

右上の「スタイル」ボタンをクリックすると「スタイル」パネルが現れる ボタンを押すと、それぞれの表示スタイルに切り替わる



「万見」とは?

「万見」ってなに?

- ・「3次元構造を見る」ことを主題としたウェブサイト
- 複雑な構造やそのデータの意味を、簡単な操作でわかりやすく、見たり知ったりできるページを目指した
- PDBとEMDBのほとんどの構造を見られる



PDBとEMDB

	PDB (Protein Data Bank)		EMDB (Electron Databank)	Microscopy)	
解析手法	種々の手法(主にX線約	吉晶学)	3次元電子顕微鏡		
主データ	原子モデル	3次元マップ			
特徴	結晶化しやすいものが中。 →部分構造が多い	心	低分解能な 複雑な分子 体構造など	データが多い 、大きな分子な	ぶどの全
万見での 表示例		重われ		E001	
万見での 表示例	George States St	重ねま	あわせ	5001	





万見があるとき・・・



「構造ビューア」と「付随情報」



- Jmol/JSmol
- jV(機能は限定的)

- 構造データに付随する情報

- スタイルの変更など

万見へのアクセス

"Yorodumi"か"万見"を検索

Google	yorodumi 検索
0	85件 (0.19秒) 検索オブシ
 オペて 動画 ▼ もっと見る 	<u>万見 (Yorodumi) - 生命のカラクリにさわろう</u> ☆ ヘルブ、万見 (Yorodumi) - 生命のカラクリにさわろう、万見は、生体分子の3次元構造を気軽に眺めて、見 て、動かして、回して、学んで、楽しむためのヴェブページです。Protein Data Bank (PDB) と EM Data Bank (EMDB) のデータを利用しています。
ウェブ全体から検索 日本語のページを検索 その他のツール	 www.pdbj.org/emnavi/view.php?id=1491⟨=ja - キャッシュ (poF) EM NavigatorとYorodumiで3次元構造を眺める - 「EM Navigator」と 会 ファイルタイブ: PDF/Adobe Acrobat - HTMLパージョン 「EM Navigator」と「万見 (Yorodumi)」というウェ、ブサイトの紹介. ・これらのウェブサイトを使って、生体分子・組織の「3次元.構造を眺めること」を体験. ・想定する聴衆: 生体分子構造研究の経験がない・少. ないユーザー www.pdbj.org/workshop/201008/Suzuki.pdf www.pdbj.org のその他の検索結果を表示する

あるいは、PDBjのトップページの 左メニューのリンクから

URL http://pdbj.org/yorodumi/





タミフルの結合部位を見てみる (より高度な利用)



- 現在のページを再読込(WindowsならF5キー)
 (別のデータを開いていたら、3cl0を開き直す)
 →表示が初期状態に戻る
- 左上の「万見」ロゴの右の「設定」ボタンを押し、「多機能モード」にチェック
 - →パネルの種類やボタンなどの数が増える (設定はブラウザに保存される)

Yorodumi J.	設定
バネルのレイアウトをリセット	
図各パネルの中に説明を表示	
多機能モード(表示項目が多い)	mercel
PDB-3d0	Jmol

- ビューアの表示が遅い場合は、「表示」パネル、「ビューア」行、 の「高画質(低速)」のチェックを外す

- 「機能部位」パネル、2行目(G39・・・) の「部位」ボタンを押す →オセルタミビルの結合部位が選択される

- 「スタイル」パネル、「原子」行、「棒」ボタン を押す

→結合部位の側鎖が表示される

- 「表示」パネルの、「ズーム」スライダーと「断 面」スライダーを調節し、結合部位がよく見え るようにする

(断面スライダーはツマミが2個、それぞれ手前と奥の断面の位置)



構造ビューアの基本

多くの分子構造ビューアでは、「選択」 →「操作」が主な作業のパターン

ワードプロセッサーで文字列を選択し、 太字にしたりする操作と似ている

万見では、「アイコンで、「選択」の ツールと状態を表現している



オセルタミビル結合部位

25

その他の操作

- ビューア内で構造要素をクリックすると、 「コマンド」パネルに原子名が表示される

- クリックした要素に該当する「構成要 素」パネルの選択ボタンの色が変わる

- ダブルクリックで任意の原子間の距離 を測定

- アミノ酸配列が表示されているボックス で文字列を選択すると、該当する部分 が選択状態になる



手順:

- 「構成要素」パネルの「L型ポリペプチド」列 の変異: [H247Y]というボタンを押す →変異残基が選択される 変異は His274 → Tyr 実はタミフル耐性の変異タンパク質
- 「スタイル」パネル、「原子」行、「球と棒」ボタ ンを押す
- →スタイルが変更される

(オセルタミビルと直接相互作用しているとはいいにくい位置にあることがわかる)



表面構造を見る



手順

- 「スタイル」パネル、「表面モデル」タブをクリック
- 「eF-site表面モデル」列の「リストを取得」ボタンをクリック
- 現れた「chain-A」のチェックボックスをクリック

注意:環境によっては、処理に時間を要します

- 「構成要素」パネルのG39の画像部分をクリックすると、化合物G39 のページが開かれる - この化合物の詳細情報、理論的構造、別のPDBデータ中での構造 などが見られる



Jmolは今後使いにくくなる

- 今年末までに、FirefoxでJavaアプレットが利用できなくなる
- Javaアプレットを利用しないJmolもあるが、動作が遅い

「万見」を、刷新する予定

- ユーザーインターフェースの改良、モバイル端末への対応など - 構造ビューアMolmilへの対応





「非対称単位」と「生物学的単位」

PDBに登録されているデータのほとんどは**結晶構造** 結晶構造は、**非対称単位 (Asymmetric unit)** が登録 されている



http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/Looking-at-Structures/bioassembly_tutorial.html

生物学的単位:

- 生体内での構造や溶液構造に近いと 考えられる構造単位を、結晶構造から 切り出したもの

- データ登録者が定義したものと、計算 によって見積もられたものが登録されてい る

- 非対称単位との関係(大きい・小さ い)は、データごとに異なる



いろいろな生物学的単位





「生物学的集合体」を見てみる

- 「万見」でPDB-3ixkを開く 「開く」パネル、「IDを指定」行の入力ボックスに 「3ixk」と入力し、Enterキーを押す →Beta-secretase 1 の構造が表示される

- 構成要素パネル・L型ポリペプチドを確認 →同じポリペプチド3本からなっていることが分かる
- データパネル・集合体の各ボタンを押してみる →表示される構造を確認 (クリックすると該当する構成要素のボタンの色が変化する)
- 同様のことを「3k0g」で試してみる

PDB-3k0gの場合





登録構造 =結晶学的非対称単位





単位格子

生物学的単位 #2

- 「万見」でPDB-3f7yを開く →カリウムチャネル KcsA の構造が表示される
- 構成要素パネルの確認、集合体を表示 →抗体Fabフラグメントが結合している
- 抗体の部分を隠す
 - 構成要素パネルでchain-Aを選択
 - 「スタイル」パネルで「選択したものを隠す」ボタンを押す
 - chain-Bも同様にして隠す
 - chain-Cを選択し「表示」パネルで、「中心-選択したもの」
 - 「表示」パネル「ズーム」で拡大
 - 「機能部位」パネルで、カリウムの結合部位や、膜貫通へリリックスを 確認



見たい「構造単位」に加工してみる





生物学的単位 抗体を隠した状態

登録構造 (非対称単位) KcsAと抗体



UCSF Chimeraを使ってみる

Q					UC	CSF Chimera
<u>F</u> ile	<u>S</u> elect	<u>A</u> ctions	<u>P</u> resets	<u>T</u> ools	Fa <u>v</u> orites	<u>H</u> elp

メニュー項目	おおまかな内容
File	一般的なソフトと同じ データを開く、終了など
Select	「選択」に関する項目
Action	「選択」している要素に対する「アクション」 色やスタイルの変更、計測など
Presets	表示スタイルのプリセット いくつかのおすすめスタイルが登録されている
Tools	その他のツール
Favorites	お気に入り デフォルトで開発者のおすすめ機能が入っている
Help	一般的なソフトと同じ

- Chimeraを起動
- メニュー[File]-[Fetch by ID...] →"FETCH structure by ID"パネルが出現
- [PDB]をクリックし、入力ボックスに"3cl0"を入力し、エンター →構造データがダウンロードされ、構造モデルが表示される

やり直すには:メニュー [File]-[Close session]



- マウスで構造を動かして見てみる (マウス操作は先程のJmolとよく似てい る。右ボタンのドラッグでズーム、中ボタンの ドラッグで平行移動ができる)

- オセルタミビルの結合部位の観察 (Chimeraはデフォルトで、構造データを 開くとリガンドとその結合部位の側鎖を表 示する仕様)

※背景はプレゼン資料として見やすいよう に白にしてある

- 背景色の変更は、メニュー[Favorite]-[Preference]-[Background]で



- [Select]-[Atom Specifier...] →"Select atom"パネルが出現
- 入力ボックスに":274"を入力し、エンター →残基番号274に含まれる原子が選択される
- [Actions]-[Atoms/Bonds]-[Show]
- [Actions]-[Atoms/Bonds]-[Ball & stick] →247に含まれる原子が表示され、「球と棒」の スタイルに

[Ok] と [Apply]の違い [Ok]実行したあとパネルが消える [Apply]実行するがパネルは残る

🔍 Select Atom 🗕 🗖 🗙
Atom specifier to select:
Include bonds
OK Apply Cancel Help



横から見てみる

44

手順

- [Favorites]-[Side View] →"Viewing"パネルのサイドビューウイ ンドウが出現

- 2本の黄色い線をマウスで移動させ、 見たい部分をよく見えるようにする



$\overline{\mathbf{Q}}$			Vie	ewing			- 🗆	×
<u>C</u> amera	Side View	<u>R</u> otation	<u>E</u> ffects	<u>L</u> ighting				
C]							
Clip		Surfac	e capping.		V	/iew All S	ide: rig	ht 💷
				Re	eset Restore	Save	Close	Help

サイドビュー 左の□:カメラの位置 赤い線:上下の視野 黄色い線:前後の切断面



複数の構造を重ねて比べる

構造データの種類

PDB-ID	変異	結合している化合物
3cl0	His274Tyr オセルタミビル耐性 ザナミビル感受性	オセルタミビル
3ckz	同上	ザナミビル
2hu4	野生型	オセルタミビル



手順: (以下は先と同じ操作で3ckzを開く)
-メニュー[File]-[Fetch by ID...]
- [PDB]をクリックし、入力ボックスに"3ckz"を入 力し、エンターを押す

→Chimeraは、「追加読み込み」がデフォルト →新しく開いたモデルは水色

- メニュー[Select]-[Atom Specifier...]で原子 選択パネルを開き、入力ボックスに":274"を入力 し、変異残基を選択

- [Action]-[Atoms/Bonds]-[Show]
- [Action]-[Atoms/Bonds]-[Ball & stick] →両データの変異残基の表示





ぴったり重ねる

2つのデータは同じ結晶系で解析された ため、ほぼ重なるが、わずかにずれている →比較するには厳密に重ねる必要があ る

手順:

- メニュー[Tools]-[Structure comparison]-[MatchMaker] →MatchMakerパネルが現れる

- [Reference structure]と [Structure(s) to match]をそれぞれ 選択し[Apply] →両データがぴったり重なる



リレンザなら大丈夫なわけ



ノイラミニダーゼの構造は、ほぼ同一 変異残基の近傍に位置する部位の構造が、 オセルタミビルとザナミビルでは違う

野生型と比較したいのだが・・・

50

手順: データをクリアし2hu4を開く - メニュー[File]-[Close session] →いったんデータをクリアする

- 先程と同様の操作で"2hu4"を開く
 →2hu4には4量体が2個入っていることが
 わかる

手順: A鎖以外を消す

- [Select]-[Chain]-[A]
- [Select]-[Invert (selected models)]
 - →A鎖以外が選択される
- [Action]-[Atoms/Bonds]-[delete] →A鎖以外が消える





手順: 先と同様に以下を実行

- 先程と同様の操作で"3cl0"を追加 読み込み
- MatchMakerで両者を重ねる - 変異残基274を表示させる
- 変異残基の近傍を観察
- 変異残茎の虹傍を観奈 →野生型データでは残基276が表示

されていない

- 残基276も表示させる



ベージュ:野生型

水色: 変異型

参考文献: Collins et al., (2008) Nature, 453, 1258-1261



53

リアル調

- 明暗で立体感を出す、光線の方向を工夫
- デプスキュー(遠くの物の色が薄くなる)効 果は、立体感を増す
- レイトレース(光線追跡)すると、影がつ いて、さらにリアルになる



アニメ調の場合

- 特殊なアルゴリズムで輪郭を描く
- 明暗による立体感の表現はしな い
- 条件によっては、こちらのほうがわ かりやすいことも



照明、効果などの設定

- "Viewing"パネル(Side viewで 使ったパネル) -[Lighting]タブ

- 各項目で照明の条件設定

画像の保存

- メニュー[File]–[Save Image...] →画像の保存パネルが現れる

- "Image Options"(右下ボックス) のImagingで"POV-Ray"を選択 →画像保存の際にレイトレース



55

照明、効果などの設定

- [Viewing]パネル [Lighting]タブ -[Intensity]の"mode"で"ambient" を選択
- →環境光のみになり、立体感がなくなる
- [Viewing]パネル [Effect]タブ -で、"depth cueing"をoff に、"silhouettes"をonなど →遠近の視覚効果がなくなり、輪郭線が 現れる

輪郭線は太めにするのがコッ

Q	Viewing	- □ >	
<u>C</u> amera <u>S</u> ide	View <u>R</u> otation	Effects Lightin	פו
Lighting Settin Chimera default	gs		•
Save	Save As	Delete	
Intensity —	·]		
mode: ambie	ent 💷	_	
brightness:			
1.16			
contrast:			
kev-fill ratio:	Q	Viewing	_ 🗆 🗙
5.88235	Camera Side V	/iew Rotation	Effects Lighting
	✓ depth cuei start: 0. end: 1. color: silhouettes color: width: 2.	ing	lity: normal parency isingle-layer flat nics quality subdivision: 1.5 multisample
	R	eset Restore	Save Close Help

構造データを利用する権利

- PDBデータはパブリック(人類の財産!)自由に使える

画像の著作権

- PDBデータを使ってあなたが作った絵の著作権は、あなたのもの

56

- PDBjの画像などを使った場合は、「日本蛋白質構造データバンク (PDBj)」 (日本語の場合)と表記することをお願いしている - 「今月の分子」の絵と文章はもう少し厳しい規約がある

科学者としてのマナー

- PDB-IDを明記

ソフトウェアの利用条件

- Chimeraなどは、ソフトウェア名を書く必要がある
- 引用する文献も決められている





万見(Yorodumi)の使い方~基本と連携~ 統合TV 制作:統合データベースセンター http://togotv.dbcls.jp/20100802.html

「万見画廊」ページ



過去の講習会から

ウイルスの細胞侵入の メカニズムを見る

ウイルスと受容体の構造解析







コクサッキーウイルスの例

62

手順

- PDB-1z7zをひらく
- 「データ」パネル、「集合体」行、「1:主鎖のみ」ボタンを押す →正20面体対称構造が表示される
- 「構成要素」パネル、「chain-I」の選択ボタンを押す →ウイルス受容体が選択状態になる
- ※ 球状のウイルスのまわりに、長い受容体分子が結合している



EMDBデータとの重ね合わせ

63

手順

-「データパネル」、「登録構造」ボタンを押す →もとの表示に戻る

-「データパネル」、「EMDBのマップデータ」の「表示」をチェック →対応するEMDBデータが、重ねて表示される

-「表示」パネルタの、「ズーム」と「断面」のスライダーを調節し、結合部 分を見やすくする

→重なり具合がよくわかるようになる

PDB-1z7z Jmol 🗸	ビューア全体の表示様式(見る方向や大きさなど)を操作するパネルです。構造データの表示 スタイルを操作するには、 業スタイルパネル を利用してください。
And a second	ビューア <- サイス ▼ -> 図高画質(低速) 背景: 20 0000000000000000000000000000000000
	中心 原子モデル 選択したもの EMRップデータ
	ズーム 小 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・
	手前 奥 町面 単 中心を固定 厚さを固定
	スケール ◎ Off ◎ 10A ◎ 50A ◎ 100A ◎ 500A ◎ 1000A
	保存 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
	- 表示様式のリセット
	Q 4