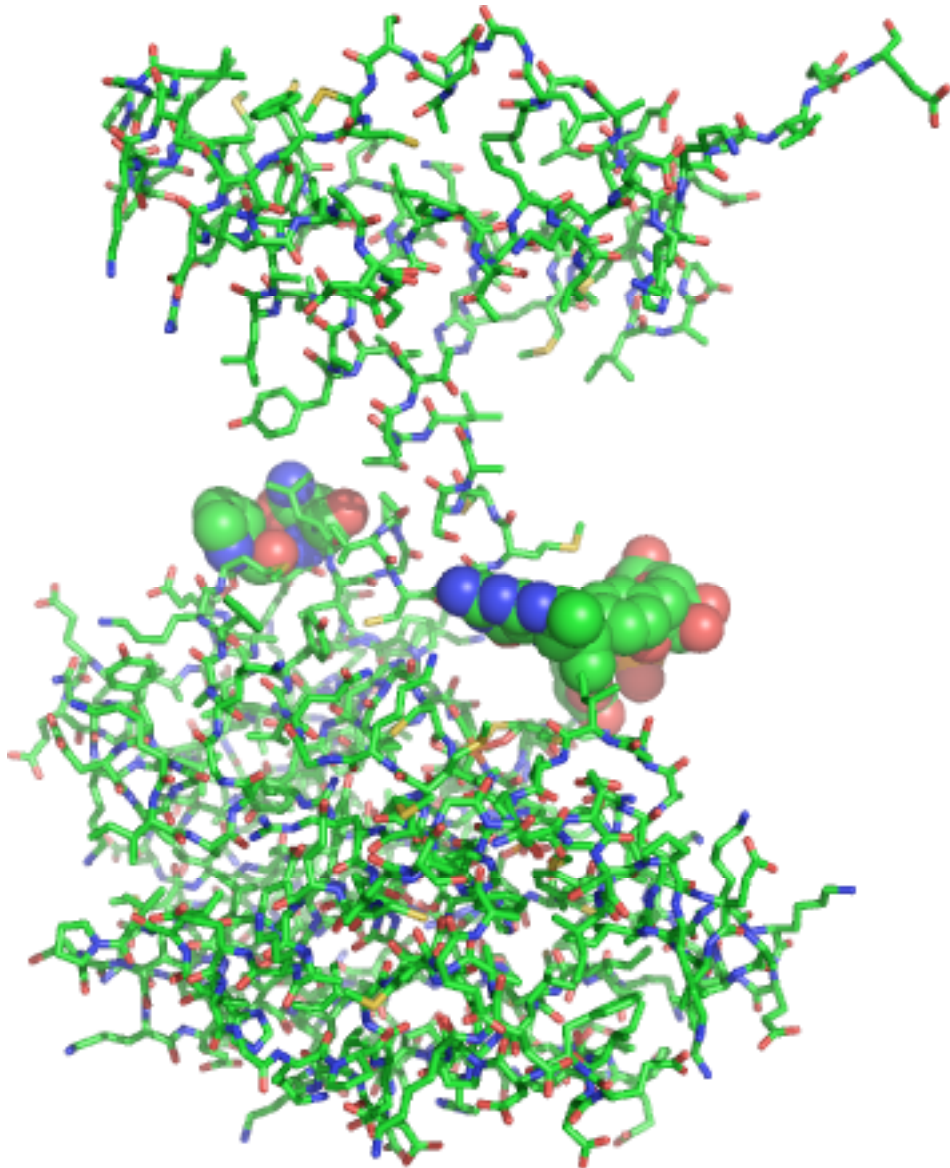


科学先取り岡山コース

コンピュータグラフィクスで蛋白質 に触れてみよう



Hydrogenase 3 の結晶構造解析

電子を受け取って水中のプロトン(H⁺)を還元して、水素ガス(H₂)を発生する。燃料電池の原料となる分子状水素(H₂)の生産に期待できる。

1. でんぷん分解酵素 α アミラーゼ

1-1. 酵素アミラーゼ(Amylase)の働き

アミラーゼは、ヒトでは膵液や唾液に含まれる消化酵素です。アミロースやアミロペクチンをグルコース、マルトースおよびオリゴ糖に加水分解します。 α -アミラーゼは α -1,4-結合をランダムに加水分解する酵素です。

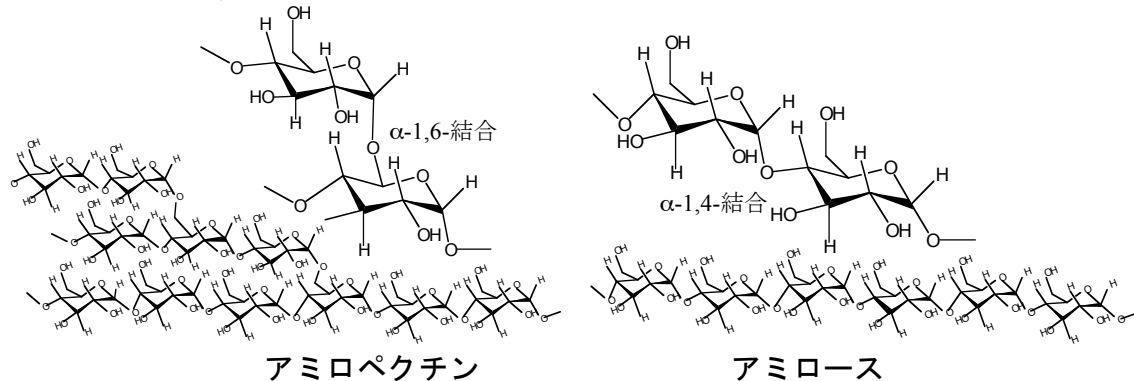


図1. でんぷんの構造

でんぷんは直鎖状のアミロースと枝分かれ構造を持つアミロペクチンの混合物

1-2. 好熱性細菌の耐熱性酵素

生育温度の至適条件が 45°C 以上の微生物を好熱菌と言います。好熱菌の中でも、 $45\sim 80^{\circ}\text{C}$ でよく生育する菌を好熱菌といい、 80°C 以上に至適生育温度を持つ菌は超好熱菌と呼ばれます。このような微生物は、高い温度でも変性しない耐熱性の蛋白質を持っています。温泉、浅海の熱水域、深海熱水鉱床、石油鉱床のほか人工的熱水環境からも好熱性細菌が見つかっています。

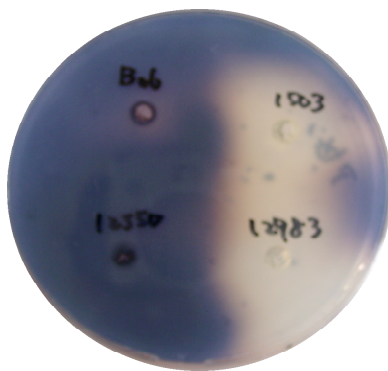


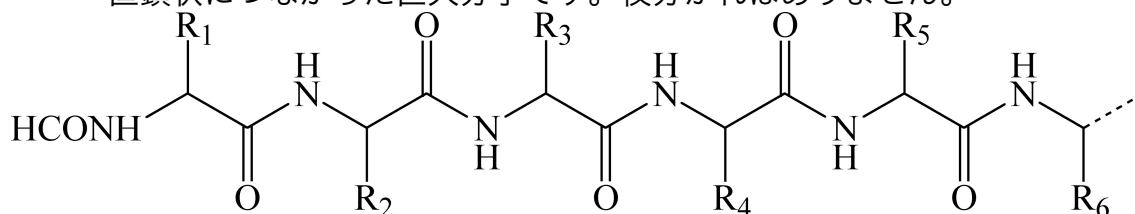
図2. でんぷんプレートのヨウ素反応

B. stearothermophilus 1503 株, 12983 株のアミラーゼ反応。
ヨウ素染色したプレートを裏から観察した写真。

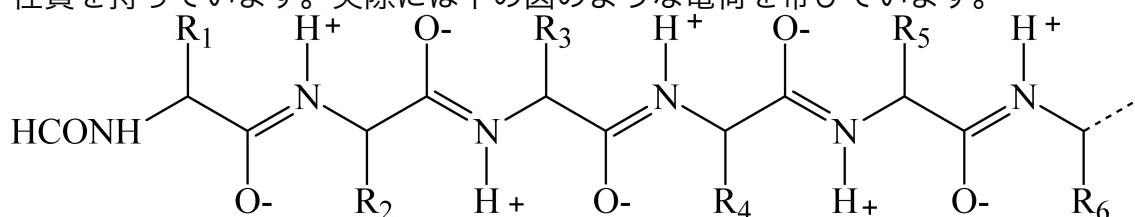
2. 蛋白質の立体構造解析入門

2-1. 蛋白質の立体構造

デンプンは、ブドウ糖がつながった巨大分子です。蛋白質はアミノ酸が直鎖状につながった巨大分子です。枝分かれはありません。

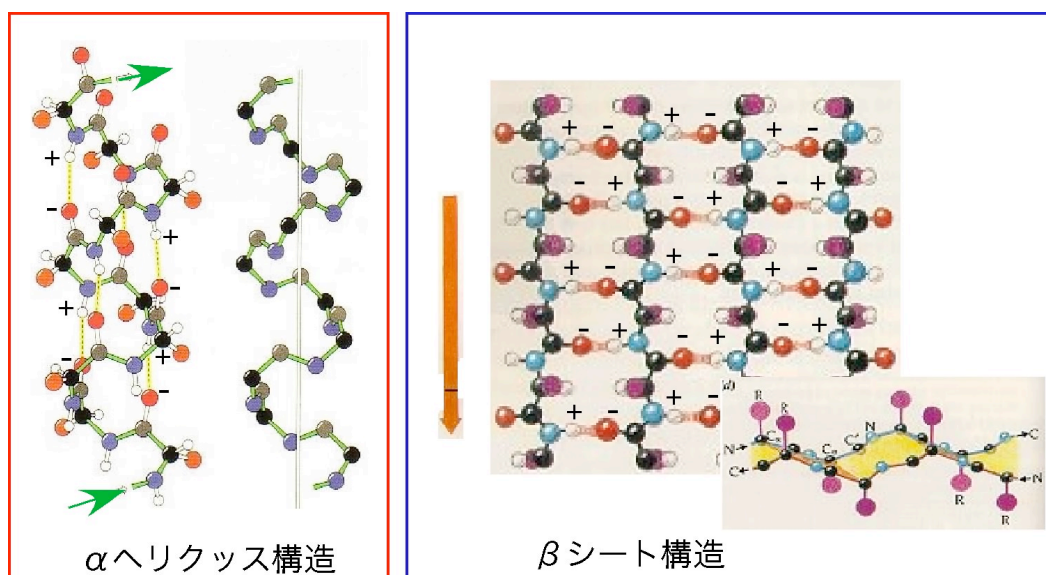


アミノ酸をつなぐペプチド結合は、プラスとマイナスに分極した二重結合的な性質を持っています。実際には下の図のような電荷を帯びています。



ここで困った問題が発生します。蛋白質は水に溶けている分子なので、電荷を帯びた部分は水分子と溶け合う傾向を持ち、分子の外側に出たがりです。一方、アミノ酸の側鎖と云われる $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4, \dots$ の半分以上は、電荷を持たず「水が嫌いな性質」を強く持ちます。隣り合う構造同志が「水と溶け合いたい」「水が嫌い」と大げんかになってしまいます。

2-2. α ヘリックス構造と β シート構造がその問題を解決します。



α ヘリックスでは、ポリペプチド鎖が「右巻きのらせん構造」をとってマイナス電荷を持つ酸素($C-O^-$)とプラス電荷を持つ水素($N-H^+$)が接近して互いに電荷を中和します。アミノ酸の側鎖 R1, R2, R3, R4...の部分はヘリックス柱の外側に突き出した形になります。

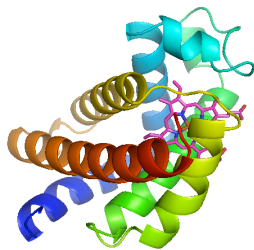
β シート構造では、ポリペプチド鎖が伸びた板のような形になります。隣り合う板同士で、マイナス電荷を持つ酸素($C-O^-$)とプラス電荷を持つ水素($N-H^+$)が接近して互いに電荷を中和します。「すのこ」のような形になります。

3. 蛋白質結晶構造を解明した M. Perutz & J. Kendrew

1962年 英国ケンブリッジ キャンベッシュ研究所の Max Perutz と John Kendrew は羊のヘモグロビン、マッコウクジラのアミオグロビンのエックス線結晶構造解析の業績によりノーベル化学賞を受賞した。



ミオグロビンの最初のモデル構造 (1957) 解像度 6 Å



現在のミオグロビンモデル 1A6M (1998) 解像度 1 Å



Max Perutz と John Kendrew



1962年のノーベル賞受賞者 (左より): Maurice Wilkins (医学・生理学), Max F. Perutz (化学), Francis Crick (医学・生理学), John Steinbeck (文学), James Watson (医学・生理学) そして John C. Kendrew (化学). Linus Pauling (平和) と Lev Landau (物理) は写っていない。

4. インターネットから蛋白質の構造データ(PDB データ)を取ってくる。

1. 「http://www.pdbj.org/index_j.html」にアクセスする。

The screenshot shows the PDBj homepage with several callouts:

- Top Left:** PDBj Protein Data Bank Japan logo.
- Top Right:** English language selector.
- Search Area:** A search box with "PDB ID" and "Keyword" tabs. The "Keyword" tab is selected with the text "Bacillus and stearot".
- Annotations:**
 - A yellow box points to the search box: "PDB IDが分かっている場合(1QHO)は、PDB IDを入力する。"
 - A blue box points to the search box: "キーワードで探す場合、Bacillus and stearothermophilus and amylase というようにandを使う。"
- Navigation:** Links for "Sequence-Navigator", "Structure-Navigator", "ASH / GASH", "jV version 3", and "eProtS".
- Footer:** Copyright information and contact details.

2. 検索結果を注意深く読む

B. stearothermophilus の α -アミラーゼマルトース、アカボースとの共結晶構造 1QHO, 1QHPのPDB ファイル名で登録されている。

The screenshot shows the search results page for the query "[Bacillus and stearothermophilus and amylase]".

Query: keyword : [Bacillus and stearothermophilus and amylase]

Results:

PDB ID	descriptor	title	authors	exp.method	deposition date	release date
1QHO	: ALPHA-AMYLASE (E.C.3.2.1.133)	: FIVE-DOMAIN ALPHA-AMYLASE FROM BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS, MALTOSYL-ACARBOSE COMPLEX	: Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S., Davies, G.J.,	: X-RAY DIFFRACTION	: 1999-05-25	: 2000-05-31
1QHP	: ALPHA-AMYLASE (E.C.3.2.1.133)	: FIVE-DOMAIN ALPHA-AMYLASE FROM BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS, MALTOSYL-ACARBOSE COMPLEX	: Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S., Davies, G.J.,	: X-RAY DIFFRACTION	: 1999-05-25	: 2000-05-31

xPSSS (xml-based Protein Structure Search Service)

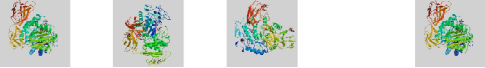
Summary Page

[Structural Details](#)
[Experimental Details](#)
[Functional Details](#)
[Sequence Neighbor](#)

[Download/Display](#)
[Link](#)

PDB ID : 1QHP
Descriptor : ALPHA-AMYLASE (E.C.3.2.1.133)
Title : FIVE-DOMAIN ALPHA-AMYLASE FROM BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS, MALTOSE COMPLEX
Functional Keywords : AMYLASE, GLYCOSIDE HYDROLASE, STARCH DEGRADATION
Biological source : BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS
Total number of polymer chains : 1
Total molecular weight : 76826.3 (the details in [Structural Details Page](#))
Authors : Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S., Davies, G.J. (deposition date: 1999 05 25, release date: 2000 05 31)
Primary citation : Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S., Davies, G.J. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from Bacillus stearothermophilus: maltose and acarbose complexes at 1.7Angstroms resolution. *Biochemistry*, 38:8385 - 8392, 1999 ([PubMed - 10387084](#))
Other Database Information : [CATH](#), [CE](#), [ESSP](#), [SCOP](#), [YAST](#), [eF-site](#), [KEGG \(EC.3.2.1.133\)](#), [GDB](#)

Structure Images



normal position rotated about x by 90° rotated about y by 90° viewer

[250X250](#) [500X500](#) [250X250](#) [500X500](#) [250X250](#) [500X500](#) [PDBjViewer jV version3](#)
PDBjViewer and jV version2 is used with Java(TM)Plug-in 1.4 and Java3D 1.3(PDBjViewer) or JOGL library 1.0(jV version3).

3. 1QHPをクリックすると、さらに詳しいデータの概要(*Summary Page*)が示される。とにかく構造座標データが欲しいので

Download / Display

の項目をクリックする。

xPSSS (xml-based Protein Structure Search Service)

[1QHP] Download Page

[Summary](#)
[Structural Details](#)
[Experimental Details](#)
[Functional Details](#)
[Sequence Neighbor](#)

[Link](#)

4. これをクリック

file format	file name	Display	Download
PDB format	all	pdb1qhp.ent.Z(146k)	display download
	header only	pdb1qhp.ent(562k)	display download
mmCIF	1qhp.ent.Z(6k)	display	download
XML	all	1qhp.cif.Z(216k)	display download
	no-atom	1qhp.xml.gz(253k)	display download
	ext-atom	1qhp-noatom.xml.gz(38k)	display download
Struct Factor	1qhp-extatom.xml.gz(148k)	display	download
	rlqhpsf.ent.Z(711k)	display	download

[\[Back\]](#) [\[Top\]](#) [\[PDBj Home\]](#)

概要のみ。構造を見ることは出来ない

5. PDBファイルをテキストデータ形式で自分のパソコンに保存する。拡張子を.txtから.pdbに変える。これによりSwiss PDB viewerが認識してファイルを開くことが出来る。



Swiss PDB Viewerはフリーウェアとしてダウンロードできます。
<http://au.exspasy.org/spdbv/text/getmac.htm>

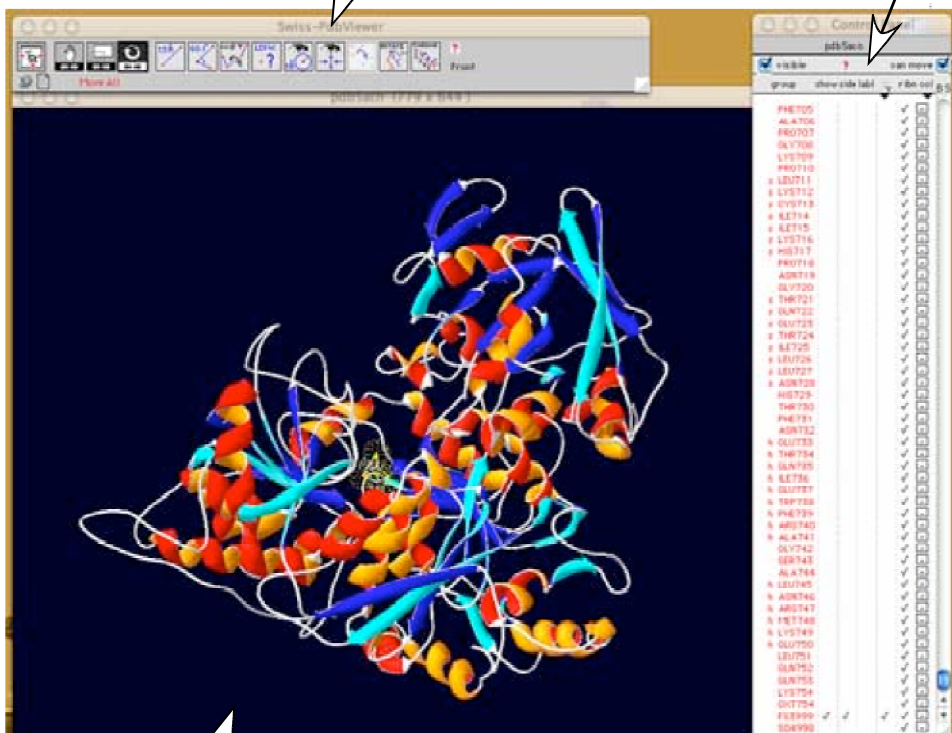
PDB Viewer について日本語解説サイトは多くはありませんが、
<http://www2.ncc.u-tokai.ac.jp/okamoto/info/SPDBV/>
 などがあります。

1. 起動画面

「File」メニューのOpen PDB File...から見たい蛋白質のPDBファイルを開く。

メインウィンド

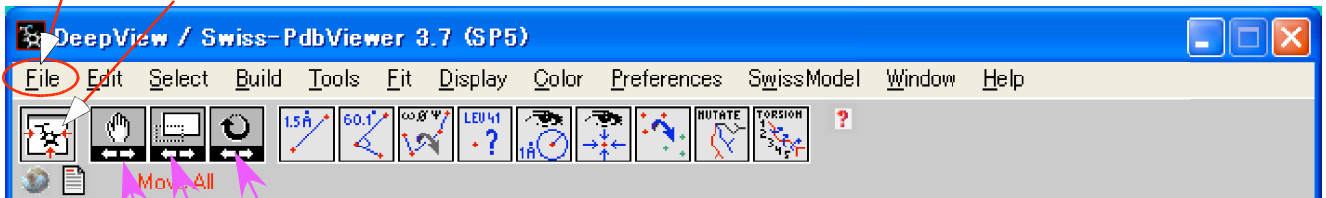
コントロールパネル



表示ウィンド

File→Open PDB file

分子の大きさを表示ウィンドに合わせる

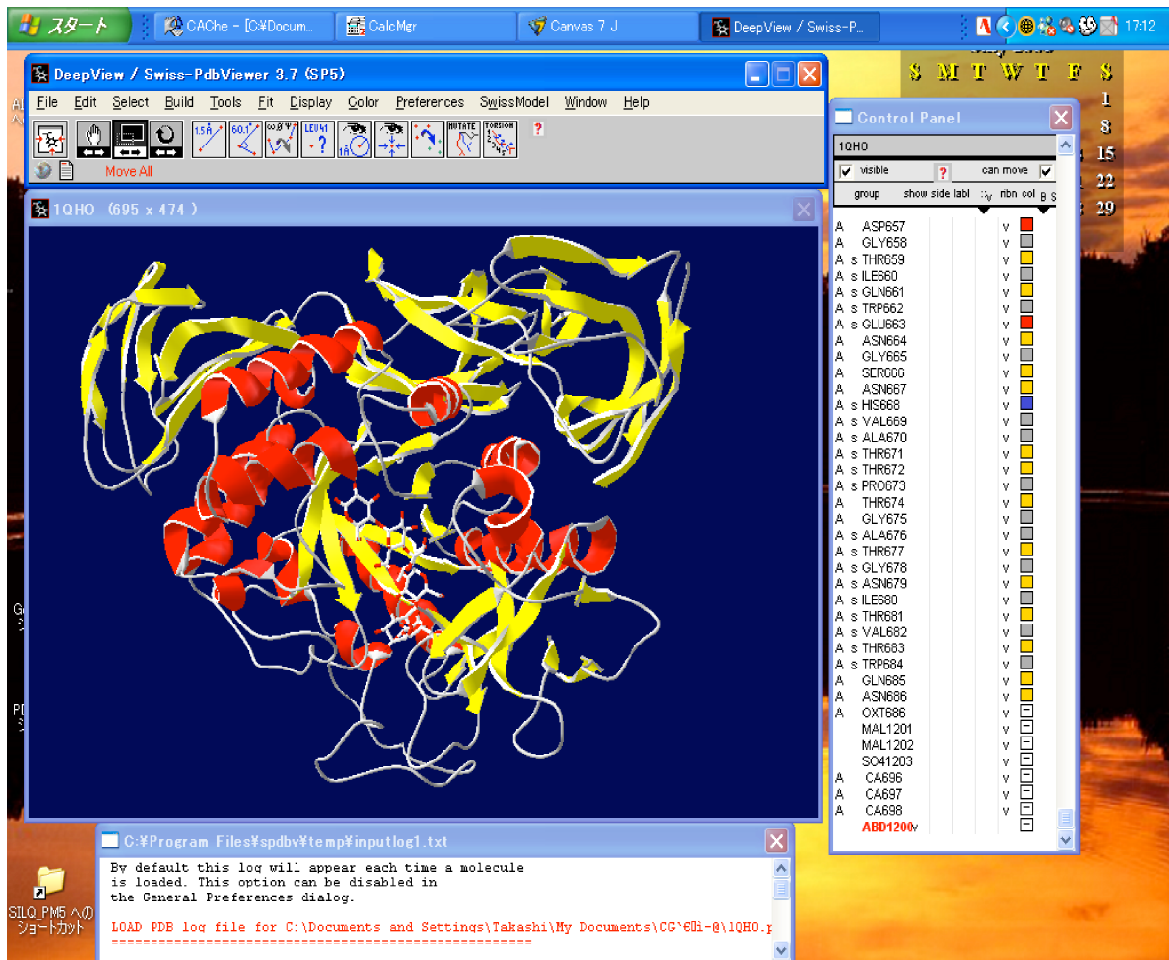


マウスで分子を回転する
 マウスで分子を拡大・縮小する
 マウスで分子を移動する

メインウィンドウには、よく使われる
 指令がアイコンとして並んでいます。

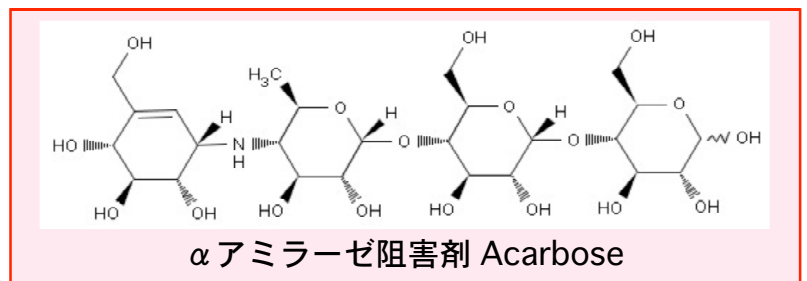
3. α アミラーゼ-Acarbose複合体を美しく表示してみよう。

完成品



1. Control Panel

ribn; 右クリックですべて表示。
side; 右クリックですべて消す。
show; 右クリックですべて消す。
labelと電子雲; 非表示のまま。



2. プルダウンメニュー; Color
Color→act on Ribbon
Color→by Secondary Structure

(今から色塗りするのはリボン表示の構造)
(ヘリクスとストランドで自動色分け)

3. プルダウンメニュー; Display
Display→Use OpenGL Rendering

(チェック有 → リボン構造のなめらか表示)

4. 再び, Control Panel

一番下にアカボース「ABD1200」がある。show 左クリックでABDだけ表示する。

5. プルダウンメニュー; Display

Display→Render in Solid 3D (チェック有 → 表示選択分子のなめらか表示)

α アミラーゼ分子内に結合したABDがはっきり見えるので, これを正面に置く。
拡大, 回転, 移動, 画面フィットなどを駆使して自分が納得のゆく配置にする。

5. PyMOL のインストール方法

PyMOL についての和文サイトにはつぎのようなものがあります。

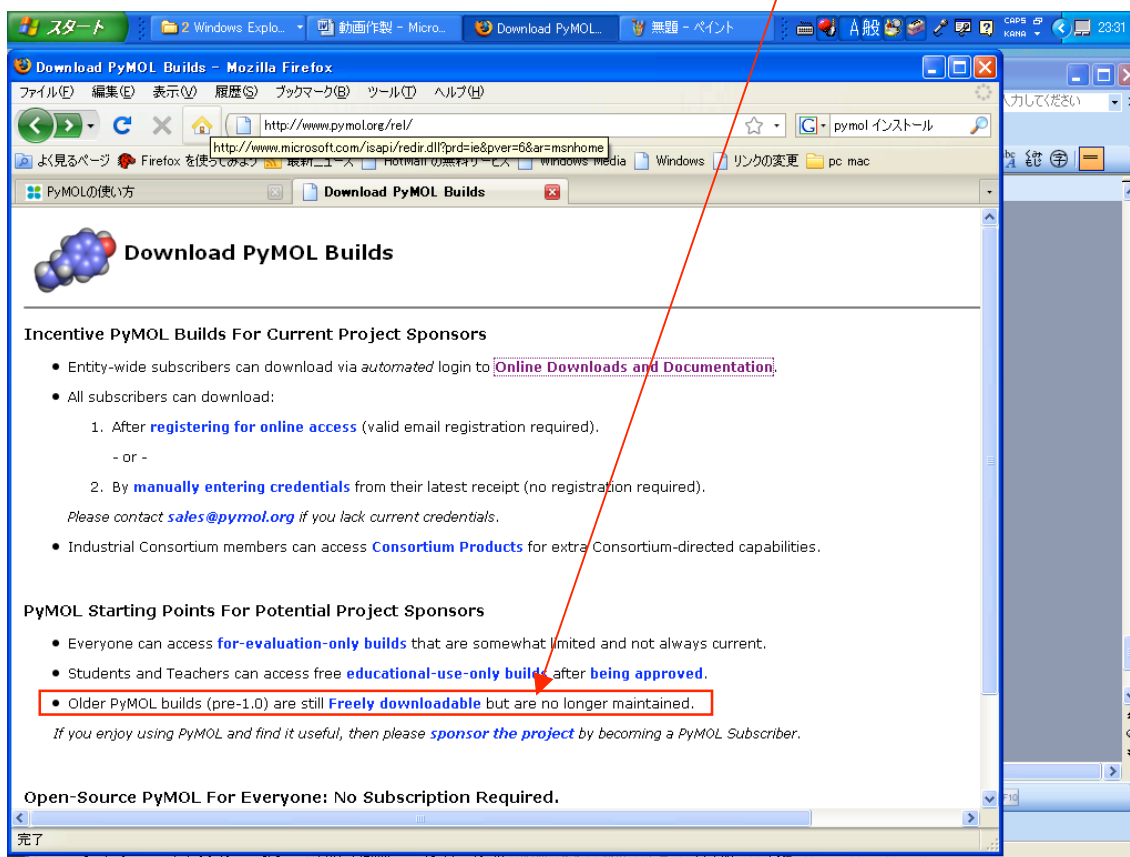
<http://popup8.tok2.com/home2/rafysta/lifestyle/pymol.html>

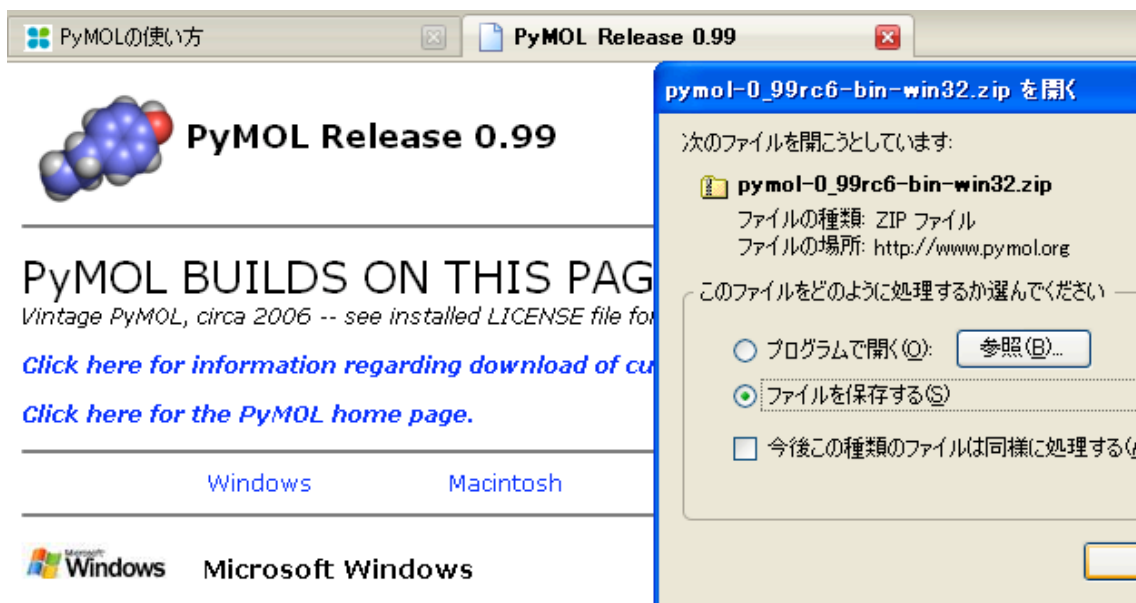
PyMOL のオリジナルサイトは、ここです。ただし英文です。

<http://www.pymol.org/>



Download をクリックします。フリーで使える旧バージョンを選択。

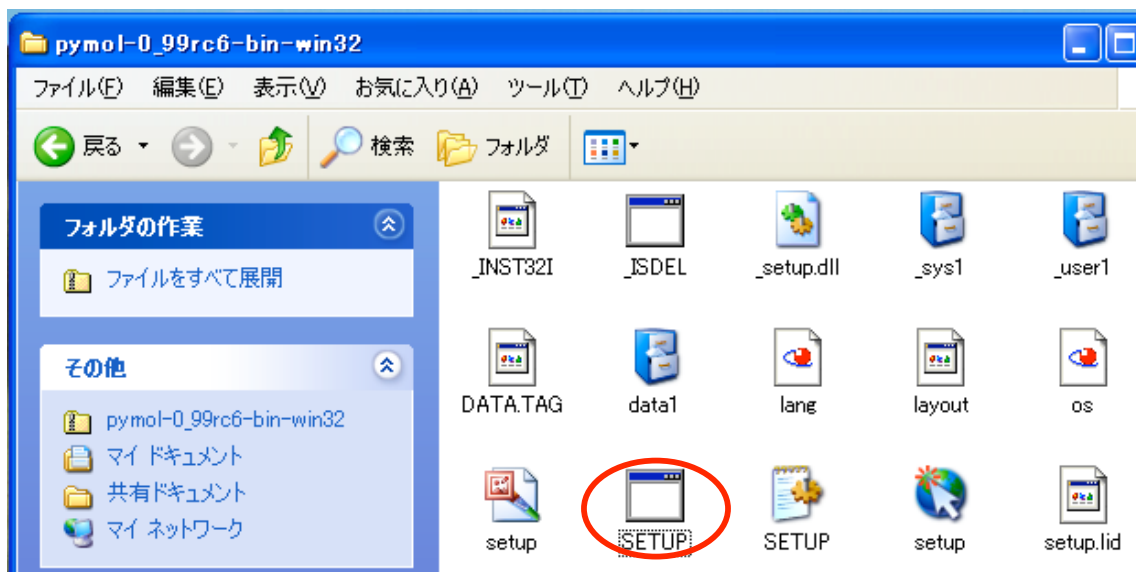




Standalone Executable. This build is easy to install and recommended for most users.

1. Download and unzip **pymol-0_99rc6-bin-win32.zip**
2. Install by double-clicking on "SETUP EXE"
3. Launch PyMOL via the Start Menu.
4. If you encounter problems with Win XP SP 2, please see [this link](#).

セットアップアイコンが3つもあるので紛らわしい。四角いアイコンでインストール。

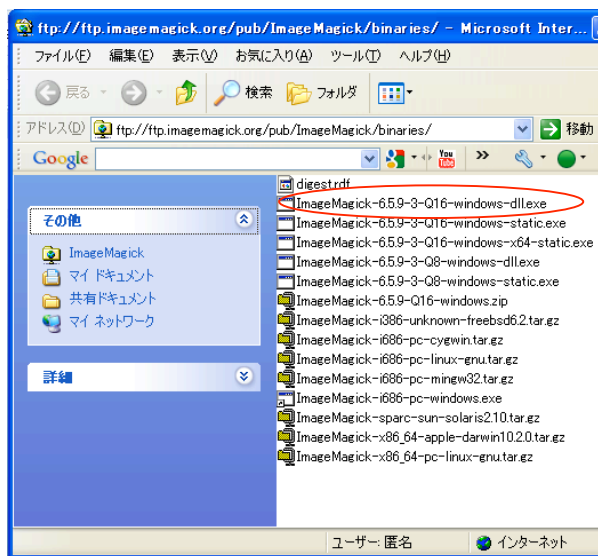


6 動画作製ソフト ImageMagick のインストール方法

以下の URL にアクセスして必要なソフトをダウンロードしましょう。

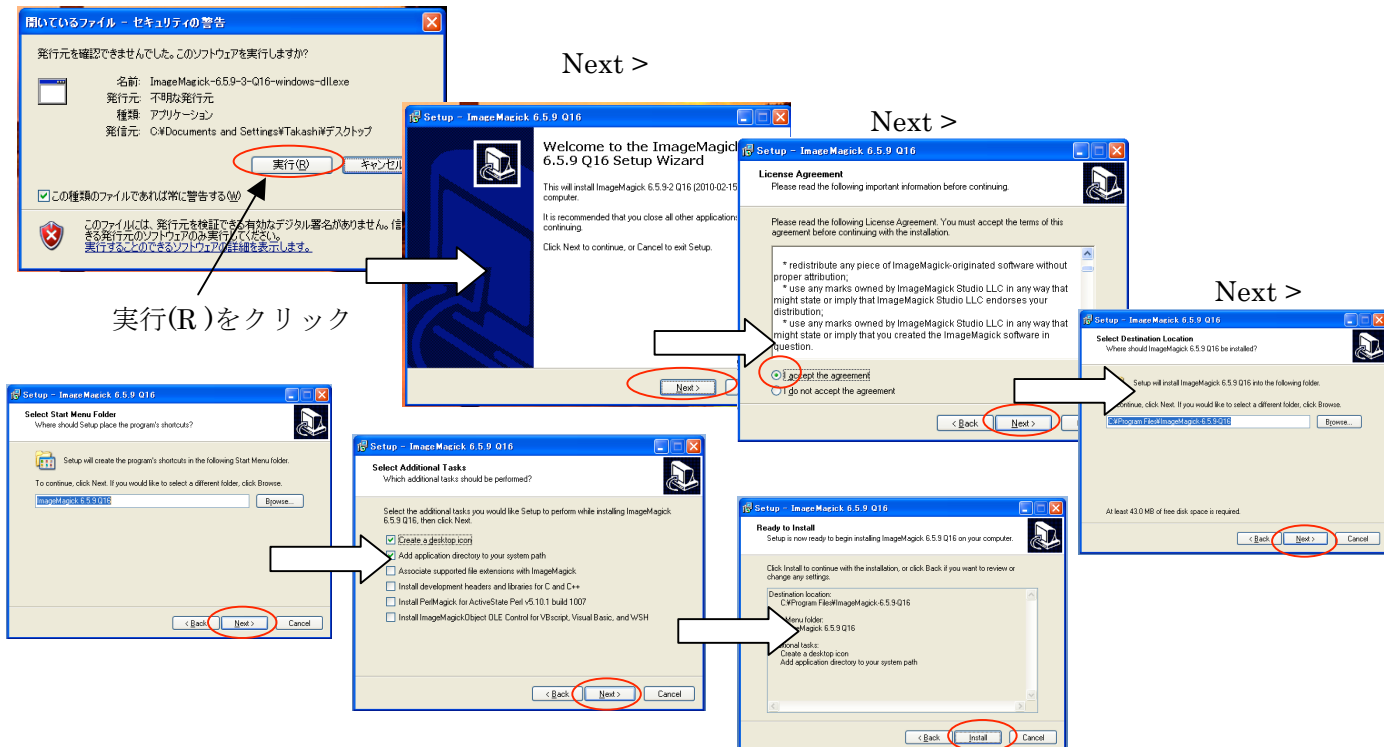
<ftp://ftp.imagemagick.org/pub/ImageMagick/binaries/>

→ ImageMagick-6.5.9-3-Q16-windows-dll



これをデスクトップに保存して、ダブルクリックして実行(R)を許可するとインストール手順が始まります。

ImageMagick インストール手順



実行(R)をクリック

スタート > すべてのプログラム > ImageMagick 6.5.9 Q16 が表示される。

実際にアニメーションを作るのは、コマンドプロンプトから操作する。

スタート > すべてのプログラム > アクセサリ > コマンドプロンプト

7. インターネット上の蛋白質構造データ (PDB ファイル) を取ってくる。

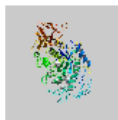
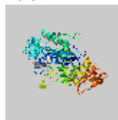
1. http://www.pdbj.org/index_j.html にアクセスする。

The screenshot shows the PDBj website interface. At the top, there are language options: English, Japanese, simplified Chinese, traditional Chinese, and Korean. Below this is a navigation menu with 'トップページ', 'データ登録 >>', and '検索 >>'. The search bar contains the text 'mylase and acarbose' and is circled in red. To the right of the search bar is a dropdown menu set to 'DB ID or Keyword' and a radio button for 'Accession number'. A yellow callout box with an arrow pointing to the search bar contains the following text:

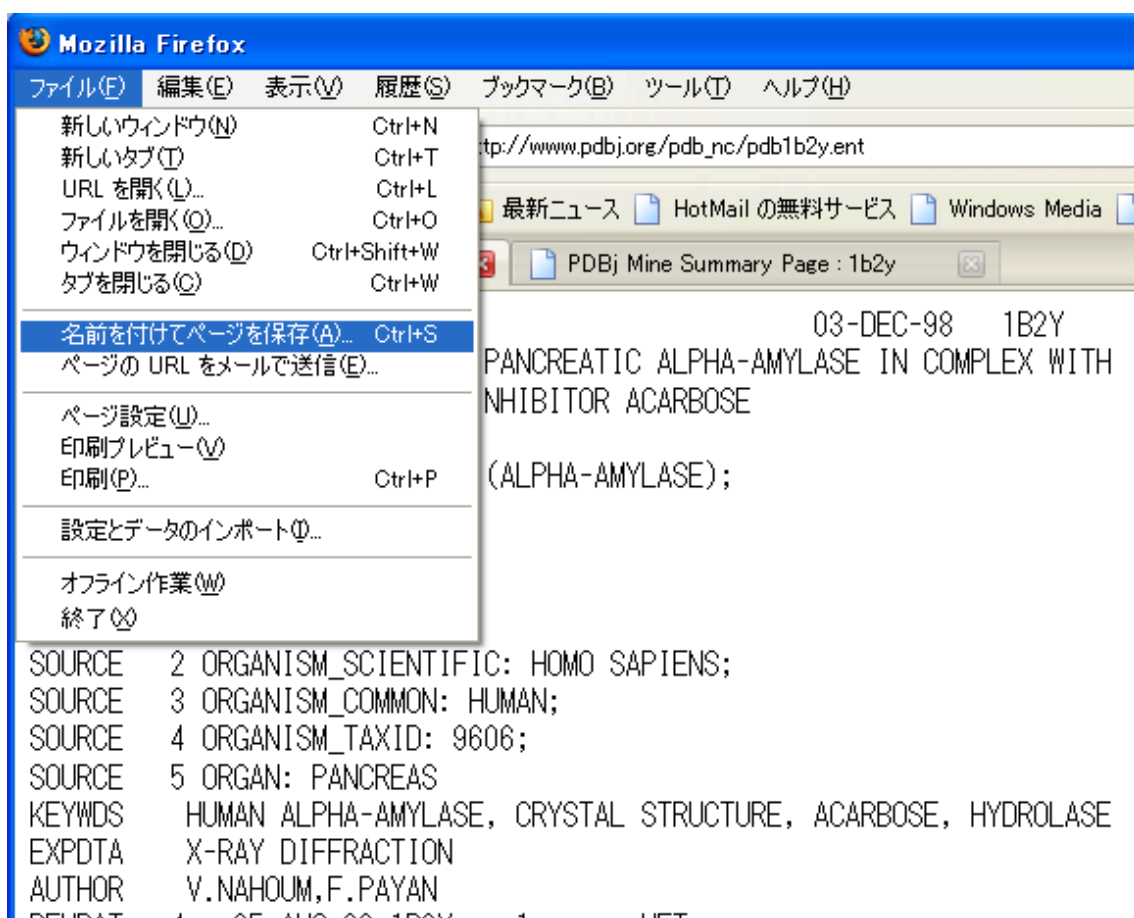
PDB が分かっている場合、1b2y を記入。
 キーワードで探すなら human
 Alpha-mylase and acarbose と入力。

2. 検索結果を確認してダウンロードしたいファイルを選択する。

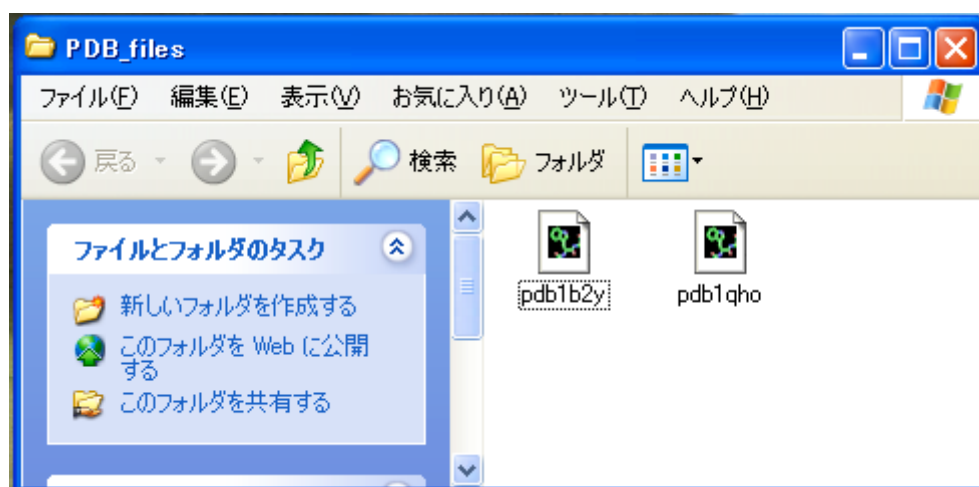
[Return to Advanced Page](#)

1b2y	descriptor	: STRUCTURE OF HUMAN PANCREATIC ALPHA-AMYLASE IN COMPLEX WITH THE CARBOHYDRATE INHIBITOR ACARBOSE (E.C.3.2.1.1)
	title	: STRUCTURE OF HUMAN PANCREATIC ALPHA-AMYLASE IN COMPLEX WITH THE CARBOHYDRATE INHIBITOR ACARBOSE
	authors	: Payan, F., Nahoum, V.,
	exp.method	: X-RAY DIFFRACTION
	deposition date	: 1998-12-03
download	release date	: 2000-02-16
1ppi	descriptor	: ALPHA AMYLASE (PPA) (E.C.3.2.1.1) COMPLEXED WITH ACARBOSE
	title	: THE ACTIVE CENTER OF A MAMMALIAN ALPHA-AMYLASE. THE STRUCTURE OF THE COMPLEX OF A PANCREATIC ALPHA-AMYLASE WITH A CARBOHYDRATE INHIBITOR REFINED TO 2.2 ANGSTROMS RESOLUTION
	authors	: Payan, F., Haser, R., Qian, M.,
	exp.method	: X-RAY DIFFRACTION
	deposition date	: 1994-02-22
download	release date	: 1995-05-24

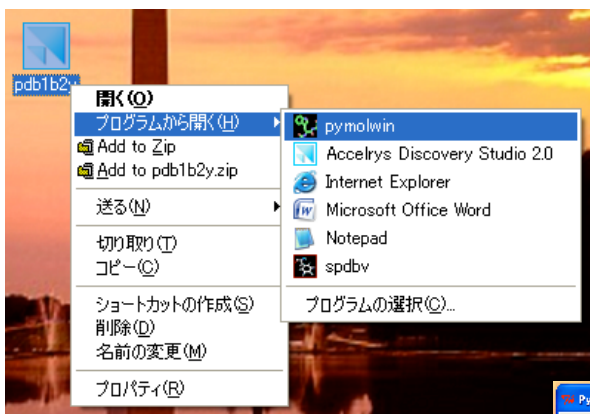
8. ファイルをデスクトップに保存する,



PDB ファイル, pdb1qho と pdb1b2y は CD の「PDB_files」のフォルダに入っています。今回は CD からデスクトップにコピーして使いましょう。



9. PyMOL 上でアニメーションのコマを作るまで。



1. Pymol の起動

スクトップの pdb1b2y ファイルにカーソルを当てて右クリック。

プログラムから開く(H) > pymolwin

2. モデル構造の調製

最初に現れるのは lines 表示なので、これをすべて消して cartoons (漫画) 表示にして α -ヘリックスや β ストランドにも色を塗り分けることにします。

all → H → Hide: everything

(ごちゃごちゃが消えて真っ暗に)

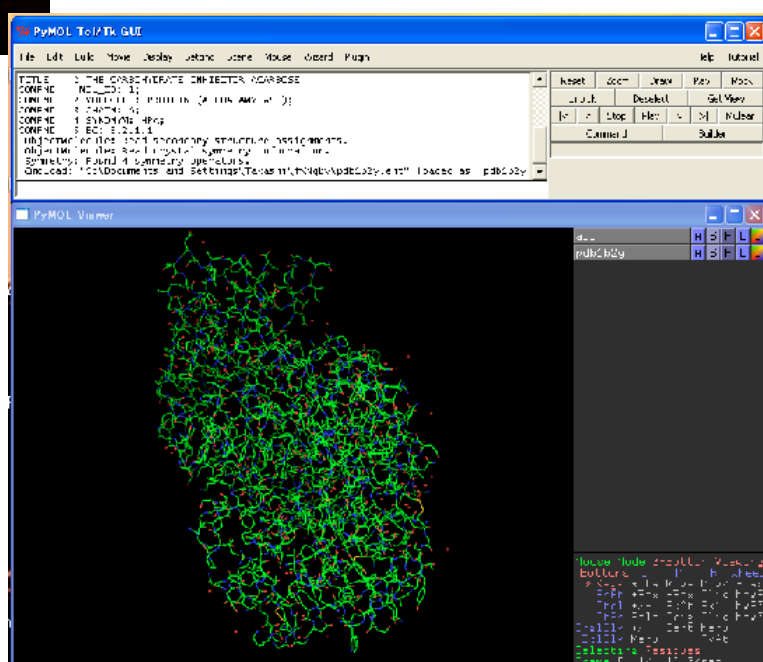
pdb1b2y → S → Show: as → As: cartoon

pdb1b2y → C → Color: by ss

→ As: Helix Sheet Loop

(さっきよりマシなりボンモデル。

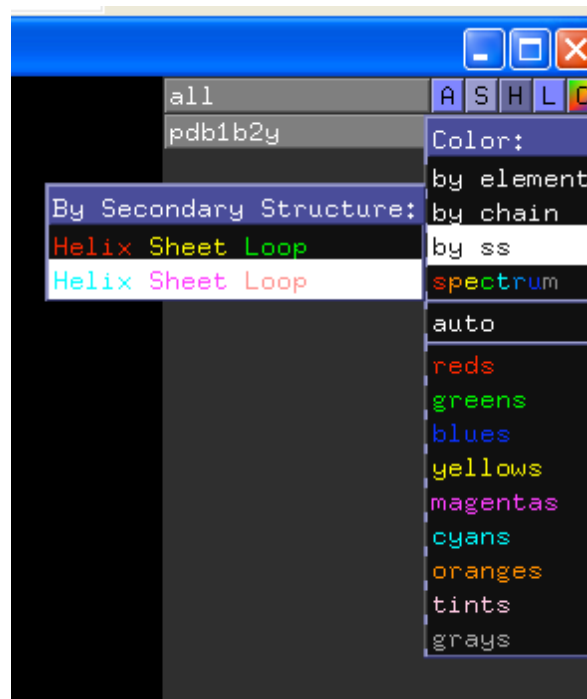
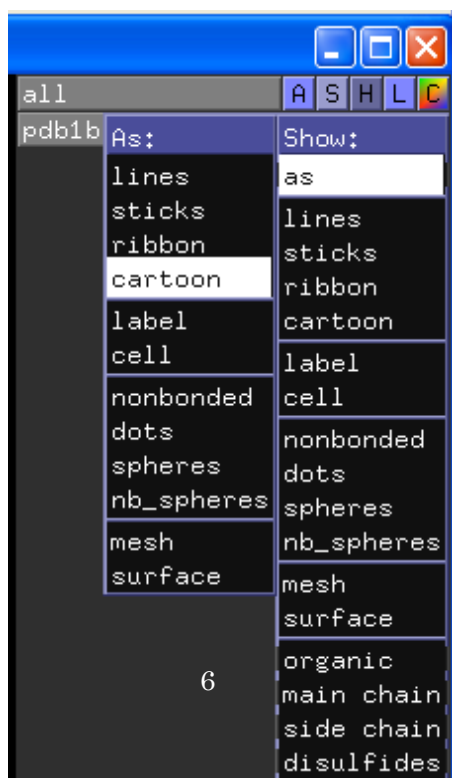
しかし、なんとなく暗い)



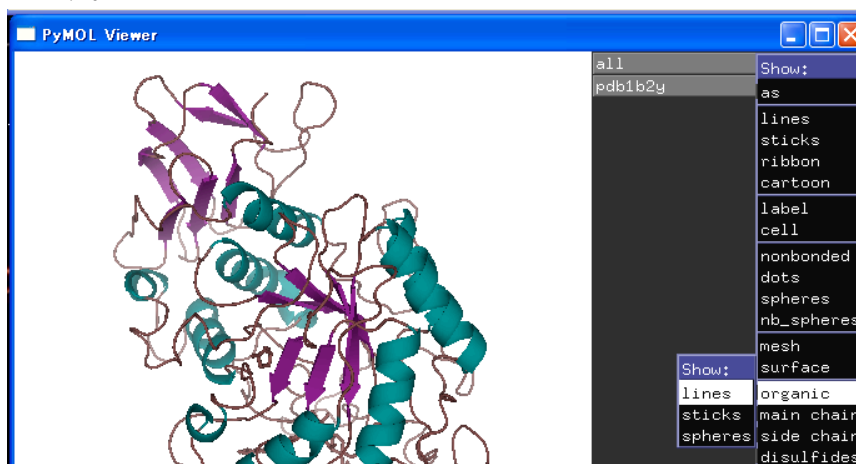
プルダウンメニュー

Display > Background > White

(これで背景が白くなり、やや救われた気分になる)



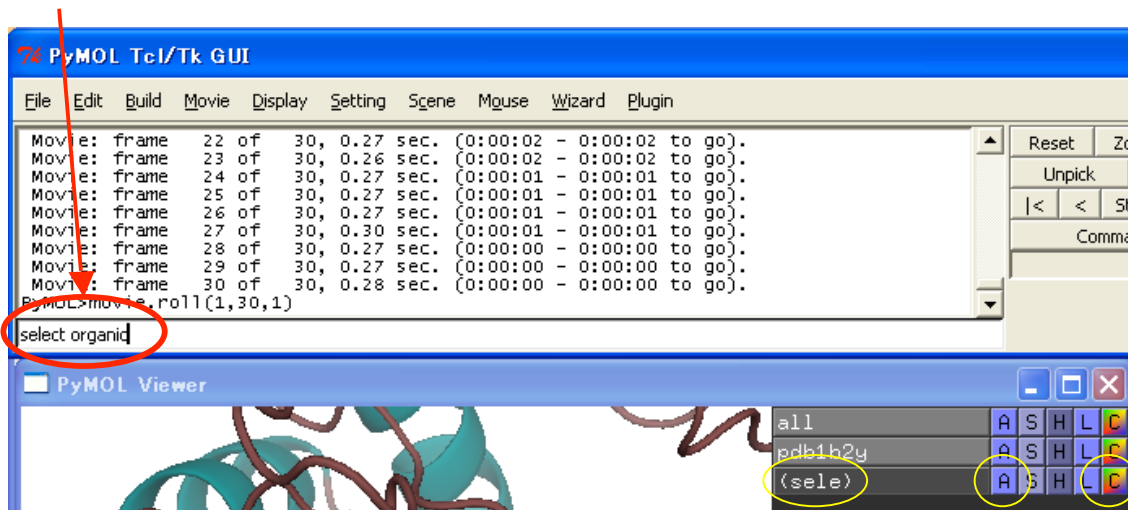
次にアミラーゼに結合しているアカルボースを選択して、やや太めの lines 表示とするまでの作業を説明します。



all → S → Show → organic → Show:Sticks

(酵素に結合している acarbose が現れる。左クリックで蛋白質分子を掴んで回し、アカルボース分子が見やすいように調整する。マウスで右クリックしたまま右下に引っ張れば拡大し、左上に押し上げると縮小する。)

蛋白質を回転させて acarbose 分子を真ん中に持ってくることは困難であると気づく。そこで acarbose 分子が全体の中心になるように変更をする。PyMOL Tcl/Tk GUI ウィンドウに select organic と入力して Enter キーを押す。



Acarbose 分子が選択されて (sele) バー「A」「S」「H」「L」「C」が用意される。
 (sele) → A → Actions → Center ----- Acarbose 分子がモデル構造の中心になる
 (sele) → C → Color → by element → 適当な配色組合せを選択する。ここで、Acarbose の構造がやや心もとないので「骨太」にする。また GUI ウィンドウを使って

Set Stick_radius=0.4 (Enter キー)と入力。周りの蛋白質に負けない構造になる。さて、モデル構造のお化粧は、これで準備 OK。これから蛋白質に踊って頂きます。ここからも PyMOL Tc/Tk GUI ウィンドウにただひたすらコマンドを打ち込む仕事。

ここから先の表記で `_` は半角スペースの意味です。

`mset_1_x30` (Enter)

----- 30 コマのアニメを作成します

`util.mrock(1, 30, 50, 0, 1)`

----- 1~30 コマを使って 50 角度でゆらゆら揺れます。0, 1 の意味はアニメのスタートと繰り返しのタイミング。変更不要。



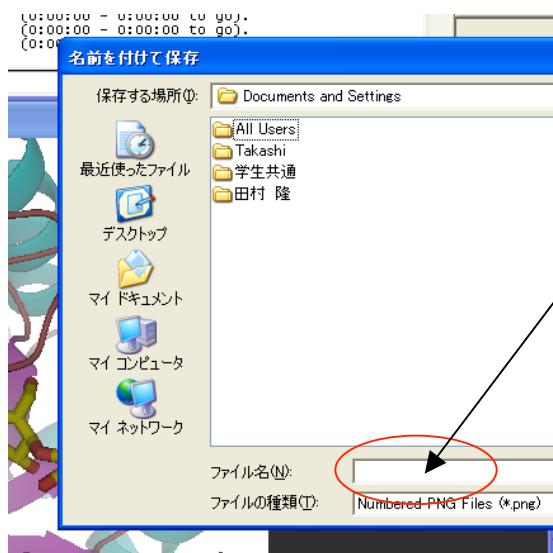
ここで何か起きることを期待して、待ってもじつは何も起きない。そこでプルダウンメニューから

File > Save Movie >

とするとアニメのコマをここに保存しますか。というフォルダ選択画面になる。ここで指定したフォルダーに 30 コマ分の PNG の連続ファイルが作られるのですが、注意すべき点が 1 つ。なんとそれは…

和名のフォルダーに保存しようとしても保存できない。

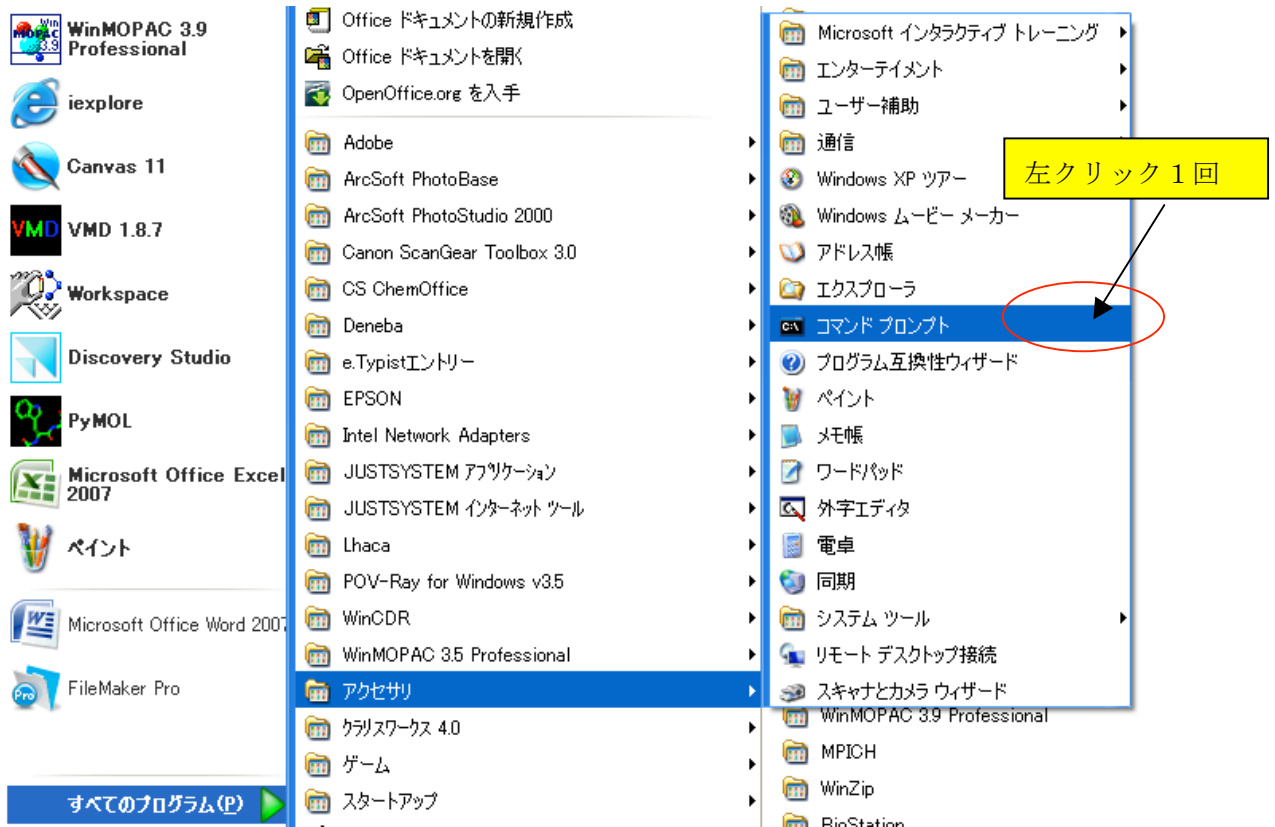
だから 30 コマを保存するフォルダーを変更する。この後 ImageMagik で変換作業をするのですが、フォルダーを見つけやすいように、マイコンピュータ→ローカルディスク (C:)→Documents and Settings まで移動してファイル名に「amy」など英文字を入力してコマの保存を開始。ゆらゆら揺れる様子も確認。



amy など覚えやすい英文字を入力する。あとで ImageMagik でアニメに編集するためのコマを作ります。

10. ImageMagik の使い方

1. スタート > すべてのプログラム > アクセサリ > コマンドプロンプト
を辿って「コマンドプロンプト」を呼び出します。



```
ca コマンド プロンプト
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.
C:\Documents and Settings\takashi>cd ..
C:\Documents and Settings\takashi>dir/w
ドライブ C のボリューム ラベルがありません。
ボリューム シリアル番号は D88D-A2FF です

C:\Documents and Settings\takashi のディレクトリ

[.]          [..]          [All Users]  amy0001.png  amy0002.png
amy0003.png  amy0004.png  amy0005.png  amy0006.png  amy0007.png
amy0008.png  amy0009.png  amy0010.png  amy0011.png  amy0012.png
amy0013.png  amy0014.png  amy0015.png  amy0016.png  amy0017.png
amy0018.png  amy0019.png  amy0020.png  amy0021.png  amy0022.png
amy0023.png  amy0024.png  amy0025.png  amy0026.png  amy0027.png
amy0028.png  amy0029.png  amy0030.png  [Takashi]    [学生共通]

[田村 隆]
      30 個のファイル          4,607,354 バイト
      6 個のディレクトリ      7,240,601,600 バイトの空き領域

C:\Documents and Settings\takashi>
```

次に `cd ..` (しい)(でい)(スペース)(ピリオド2回)Enterにより1つ上の階層に移動してください。

さらに `dir/w` (Enter)として、その階層にアニメのコマ 30 個が入っていることを確認してください。

amy0001.png から amy0030.png までのコマがあることを確認。

さて、いよいよマジック。プロンプトに対して

> convert_amy*.png_shake.gif

と入力してじっと辛抱して待ちます。つぎのプロンプト> がでるまで。

* は、番号のワイルドカード。Gif アニメのファイル名は紛らわしくないように amy 以外のものにします。上のコマンド入力で、下線部_はスペースの意味です。

```
C:\ コマンド プロンプト
C:¥Documents and Settings のディレクトリ

[.]          [..]          [All Users]  amy0001.png  amy0002.png
amy0003.png  amy0004.png  amy0005.png  amy0006.png  amy0007.png
amy0008.png  amy0009.png  amy0010.png  amy0011.png  amy0012.png
amy0013.png  amy0014.png  amy0015.png  amy0016.png  amy0017.png
amy0018.png  amy0019.png  amy0020.png  amy0021.png  amy0022.png
amy0023.png  amy0024.png  amy0025.png  amy0026.png  amy0027.png
amy0028.png  amy0029.png  amy0030.png  [Takashi]    [学生共通]
[田村 隆]

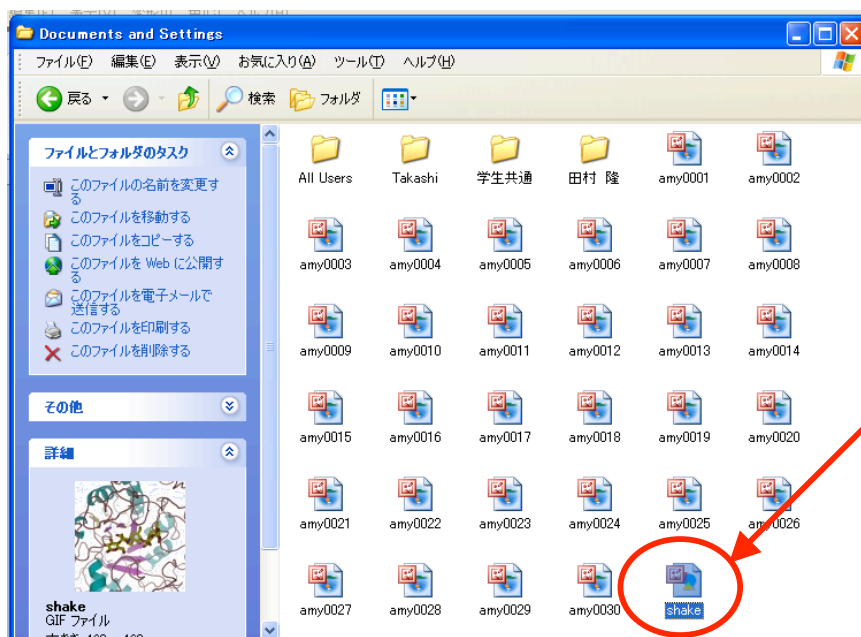
30 個のファイル          4,607,354 バイト
6 個のディレクトリ      7,240,601,600 バイトの空き領域

C:¥Documents and Settings>convert amy*.png shake.gif
C:¥Documents and Settings>
```

ここまでやれば、面倒くさいコマンドプロンプトはもう必要なし。バイバイ。

Documents and Setting のウィンドウに動画ファイルを拾いに行きます。

マイコンピュータ→ローカルディスク (C:)→Documents and Settings



この GIF アニメは、Windows Fax and Picture Viewer で開く動いて見えます。また PowerPoint に貼り付けても、ちゃんと動きます。

ただし、ここに置いておけば邪魔なので「マイ ピクチャ」に新たにフォルダを設けて、amy*.png ファイルと共に移しましょう。

「左右にゆ～らゆら」以外にも作れるアニメーション。

その1

揺れる方向が左右ではなくて、上下(?)になったアニメーション。

```
>mset_1_x30  
>util.mrock(1, 30, 60, 0, 1, ' x' )
```

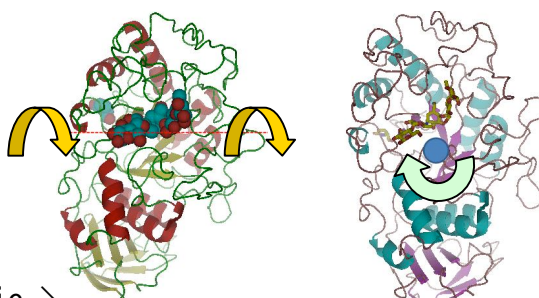
この後の手順は同様に、動画コマを作るためにプルダウンメニューから
File > Save Movie >
を選択して、C: Documents and Settings のフォルダにすると楽。

水平軸(X軸)に対して上下30°の幅で揺れるアニメーションになる。

その2

振り子のようなゆらゆら。

```
>mset_1_x30  
>util.mrock(1, 30, 60, 0, 1, ' z' )
```

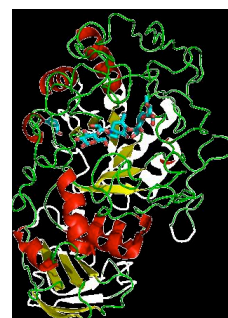
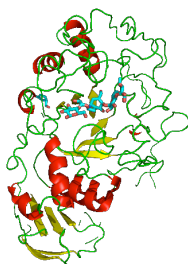


動画のコマは同様に File > Save Movie >
から C: Documents and Settings のフォルダに作成する。

その3

回転する動画の作成法

```
>mset_1_x30  
>util.mroll(1, 30, 1)
```



蛋白質構造を、よりきれいに、そこはかたなく影までつけるのがレンダーリング。プルダウンメニューの Movie を引き下げて Render Frames
を選択する。一枚、一枚きれいなコマを描く。

このようにして作成されたコマは背景が透明なので、アニメにすると映画マトリックスのようにスローモーション残像をつくるので訳が分からなくなります。

30 コマを一つ一つ背景を黒く塗りなおしたらアニメになる。ちょっと面倒。