

演習資料

この資料について

講習タイトル	クライオ電顕の密度マップと原子モデルの可視化
講習会	大阪大学蛋白研セミナー / PDBj & BINDS 合同講習会
URL	https://pdbj.org/news/20180105
日、会場	2018-02-20 大阪大学吹田キャンパス 銀杏会館
製作者	大阪大学蛋白質研究所/PDBj 鈴木博文
この資料のライセンス	パブリックドメイン
アイコンの意味	手のアイコン( <ul style="list-style-type: none"> 以下のデータをダウンロードしておく <ul style="list-style-type: none"> pdb6bcj.ent.gz pdb6bco.ent.gz emd_7081.map emd_7083.map map.gzファイルは圧縮されているので、展開する必要がある <ul style="list-style-type: none"> 任意のアーカイバソフトウェアで展開する 上述のリンクから展開済みのファイルを再ダウンロード

#1 はじめに

講習資料を参照

#2 EM Navigatorで電子顕微鏡データをブラウズ

EM Navigator

- 🖱️ PDBjの「サービスを探す」からEM Navigatorを開く
 - PDBjのトップページ(<https://pdbj.org>)の[必要なサービスを探す]ボックスを見つける
 - [電子顕微鏡] をクリック → 電子顕微鏡に関するサービス一覧が出現
 - その中の[EM Navigator]をクリック
 - EM Navigatorトップページ(<https://pdbj.org/emnavi/>)が開かれる



- EM Navigatorのトップページを確認
 - ページを眺める
 - 最近公開されたエントリなどの、構造エントリ画像アイコン
 - 構造エントリ画像のアイコン、ID以外の場所をクリック → ポップアップボックスが出現
 - データのタイトル、ビューアへのリンクなど
 - ID番号、ID文字列をクリックすると、そのエントリの詳細ページが開かれる
 - ページ右にメニュー
 - ページ内、サイト内のナビゲーターになっている



構造データの検索

- "trpm4"でキーワード検索
 1. EM Navigatorトップページに戻る
 2. ページ上部のキーワード入力ボックスに"trpm4"と入力し、[Enter]キー
 - 表示されるページはこちら
- 検索結果の確認
 - 14件ヒットするはず
 - PDB-xxxx というエントリと、EMDB-xxxx というエントリがある
- EM NavigatorでのIDの扱い
 - [データベース名]-[ID]と表記している
 - 例、PDB-a001、EMDB-1003
 - 公式には

- EMDBエントリのIDには、EMD-という接頭文字列が付随
- PDBは接頭文字列なし、論文には"PDB entry code a001"と書かれることが多い
- EM Navigatorでは省略



図: 検索結果

EMDBとPDBのビューアを起動してみる

- 各種ビューアを表示
 - 適当なエントリの[ムービー]のボタンをクリック → ムービービューアのウィンドウが出現
 - 適当なエントリの[構造ビューア]のボタンをクリック →
 - PDBエントリの場合、Molmilという構造ビューアが出現
 - EMDBエントリの場合、SurfViewというビューアが出現
- ムービービューアの操作
 - マウスポインタの動きに合わせて、ムービーのフレームが切り替わる（構造ビューアのような動き）
 - ムービー画面をクリック → 動画の再生・一時停止
 - ムービーのモーションは横回転、縦回転、断面図の順番
 - ウィンドウ下のプログレスバーのドラッグでもフレームの切り替えられる
 - 右上のメニューボタンをクリック → 上部にメニューが出現
 - ムービーの種類が切り替えられる、表面図のほか「当てはめた原子モデルとの重ね合わせ」などがある



図: ムービービューア

- 構造ビューアの操作

- マウスの左ボタンドラッグで回転、ホイール回転で拡大・縮小
- 右上にメニューボタンがある

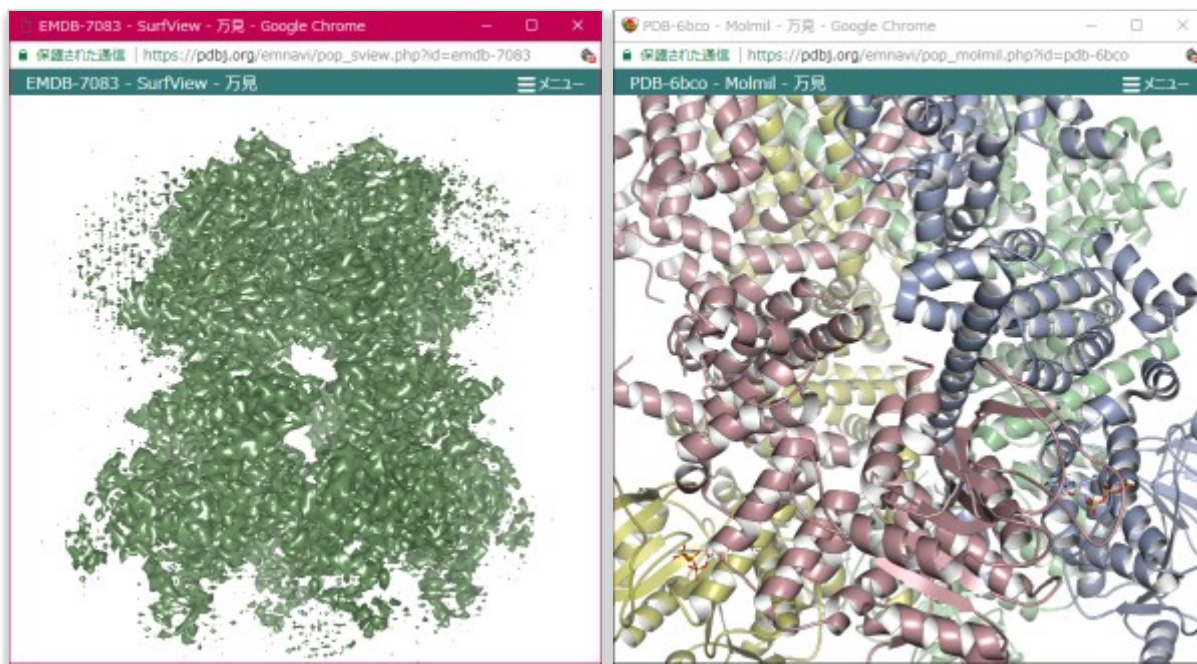


図: SurfViewとMolmil

詳細ページ(万見)を開いてみる

- 🖱️ EMDB-7083の詳細ページを開く
 1. 検索結果のEMDB-7083をクリック
 2. 出現した詳細ページを軽く眺める

万見 - EMDB-7083: cryo-EM structure of TRPM4 in ATP bound state with short coiled c...	
+ データを開く	
- 基本情報	
エントリ情報	データベース: EMDB / ID: 7083 構造の表示 ダウンロードとリンク
タイトル	cryo-EM structure of TRPM4 in ATP bound state with short coiled coil at 2.9 angstrom resolution
試料	homotetramer mouse TRPM4 詳細
由来	<i>Mus musculus</i> / 哺乳類 / ハツカネズミ, はつがねずみ
マップデータ	Structure of TRPM4 in ATP bound state with short coiled coil at 2.9 angstrom 詳細
手法	単粒子再構成法, 2.88 Å 分解能 詳細
データ登録者	Guo J / She J
引用	<i>Nature</i> , 2017, 552, 205-209 詳細
構造検証レポート	PDB-ID: 6bco

- 🖱️ PDB-6bcoの詳細ページを開く
 1. 検索結果のPDB-6bcoをクリック
 2. 出現した詳細ページを軽く眺める

万見 - PDB-6bco: cryo-EM structure of TRPM4 in ATP bound state with short coiled c...

+ データを開く

- 基本情報

エントリ情報

データベース: PDB / ID: 6bco

構造の表示 ダウンロードとリンク

タイトル cryo-EM structure of TRPM4 in ATP bound state with short coiled coil at 2.9 angstrom resolution

記述子 Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4

キーワード TRANSPORT PROTEIN / ion channel

試料の由来 *Mus musculus* / 哺乳類 / Mouse / ハツカネズミ, はつかねずみ

手法 電子顕微鏡 (2.88 Å 分解能 / Particle / 単粒子解析) 詳細

データ登録者 Guo, J. / She, J. / Chen, Q. / Bai, X. / Jiang, Y.

引用 Nature, 2017, 552, 205-209 詳細

構造検証レポート

#3 電子顕微鏡データとデータベース

講習資料を参照

#4 EM Navigatorと万見(Yorodumi)

講習資料を参照

#5 万見で詳細情報を確認

TRPM4について

- TRPM4
 - (英) Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4
 - (日) 一過性受容器電位チャネルサブタイプM4
- Wikipedia(<https://ja.wikipedia.org/wiki/TRPM4>)によると…
 - 心筋細胞の表面に発現しており、心筋の電気活動に関与している
 - このチャネルを薬物で阻害すると心筋梗塞の進行を抑制することが知られている
- 2017年末、最初の構造がNatureとScience誌上で3つのグループにより同時に発表
- 今回扱うデータ
 - 文献: Guo et al., Nature, 2017, 552, 205-209
 - 今回は下表の#3と#1を見ていく

-	#1	#2	#3	#4
PDB-ID	6bcj	6bcl	6bco	6bcq
EMDB-ID	7081	7082	7083	7085
ATP	-	-	+	+
チャネル中のナトリウム	+	+	-	-
コイルドコイル構造	-	+	-	+
分解能	3.1	3.5	2.9	3.3

EMDBデータを見てみる

- 👉 EMDB-7083のページを開いてみる
 1. 検索結果のページの[EMDB-7083]をクリック
- 🔗 ページの構成
 - データ概要
 - スライスビューア
 - 実験手法
 - 関連構造データ
 - など
- 🔗 スライスビューア
 - マウスポインタを画像に合わせると、別の角度の画像の切断位置などが表示される
 - [画像のコントロール]ボタンをクリック → スライス画像のコントローラーが出現
 - 画像のサイズ、コントラストなどを調節可能
 - 特に、背景や黒い部分に注目



図: スライスビューアと 画像コントローラー

- 悪いEMデータの例
 - 負の値が極端 (不十分なCTF補正、強引なハイパスフィルター)
 - 強引なマスク
 - 手作業で修正した形跡、不自然に一樣な球状の部位

PDBデータを見てみる

- 👉 EMDB-6bcoのページを開いてみる
 1. 検索結果のページの[PDB-6bco]をクリック
- 🔗 ページの構成
 - EMDBエントリーページと同様のレイアウト
 - 集合体、構成要素、などの項目
- 🔗 構成要素の確認
 - 指アイコン(👉)のついたボタンは、ビューア上でその要素を選択するボタン
 - チェーンや、化合物のボタンをクリック → 構造ビューア中でその要素が選択状態になり、フォーカスされる
 - 配列タブをクリック → 配列パネルが開く
 - ドラッグで配列を選択 → ビューア上で該当する部位があればフォーカスされる
 - 部位タブをクリック → 部位パネルが開く
 - 選択ボタンをクリック → ビューア上で該当する部位がフォーカスされる
 - 確認

■ ATP結合部位、膜貫通部位



図: チェーン選択ボタンと化合物選択ボタン

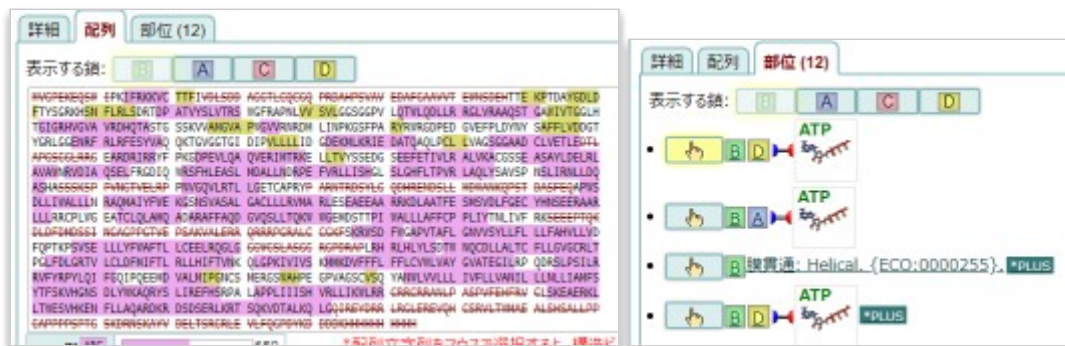


図: 配列タブと部位タブ



図: ATP結合部位を選択

#6 Chimeraでしてみる

データを開く

- 🖱 データを開く作業
 - UCSF Chimeraを起動
 - ファイルを用意している場合:
 1. メニュー [File] - [Open] → ファイルを開くダイアログが開く
 2. pdb6bco.ent.gzを開く
 3. 同様に、emd_7083.map.gzも開く
 - ファイルをダウンロードする場合 (普段はこちらが便利、EMDBとPDBを同時に読み込んでくれる)
 1. メニュー [File] - [Fetch by ID] → Fetch by IDダイアログが開く
 2. [EMDB & fit PDBs]をチェック、入力ボックスに"7083"を入力し、[Fetch]ボタンをクリック

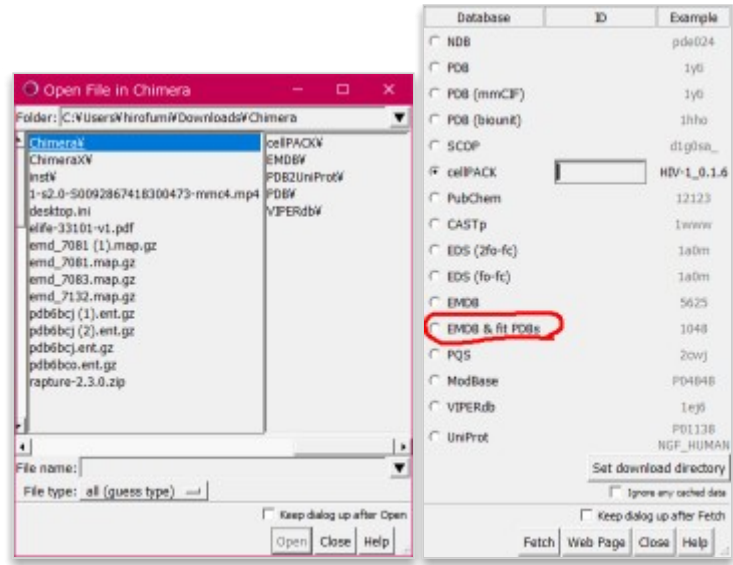


図: Open Fileダイアログと Fetch by IDダイアログ

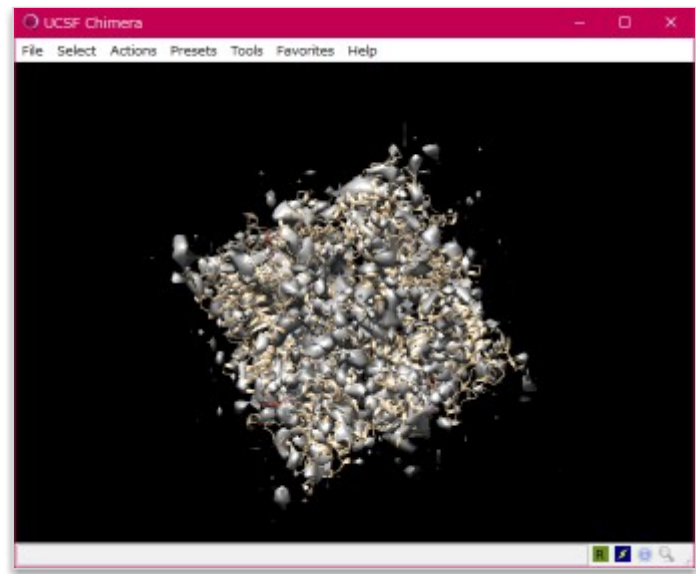


図: Chimera メインウインドウ

- ビューア上でのマウス操作

マウス	操作
回転	左ボタンのドラッグ
ズーム	ホイール回転 / 右ボタンのドラッグ
平行移動	ホイールボタンのドラッグ

UCSF Chimeraについて

- 電子顕微鏡コミュニティではデファクトスタンダードのビューア
 - フィルタ、マップフィッティングなどのツールが豊富
 - 参考: [Chimera Volume Visualization Tour](#)
- 基本的な作業手順として、「選択(Select)」して、「操作(Action)」というパターン
- メインウインドウのメニュー構成

メニュー項目	内容
--------	----

メニュー項目	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	その他の多数ツール
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、カスタマイズ可能
Help	一般的なソフトと同じ

- 今回使うツール

ツール名	用途
Volume Viewer	3次元分布データの表示操作、多機能
Side View	横からのビュー、インタラクティブに視野を切り出せる
Sequence	配列ビューア
Model Panel	複数モデルの管理、表示と固定のOn/Off、特定のモデルに対する操作など

Volume viewerをさわってみる

- マップデータを読み込むと自動的にVolume Viewerが出現
 - 手動で出す場合は、メインメニュー - [Tools] - [Volume Data] - [Volume Viewer]

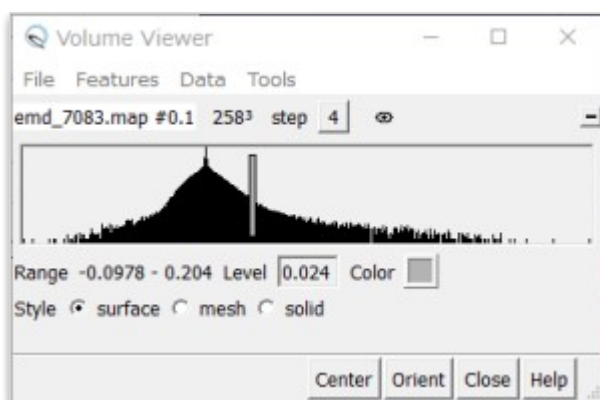






図: Volume Viewer

- 粗視化度
 - ファイル名の右、[step]のところの数値が粗視化度
 - 4だと、4³の64ボクセルを1ボクセルとして開いている状態
 - 大きなデータを表示しているときは扱いに注意
 - いきなり1にすると、フリーズしてしまう可能性がある
- 表示・非表示の着替え
 - 粗視化度の横の小さな楕円のクリックでマップの表示・非表示の切り替え

-  ヒストグラム
 - 密度分布のヒストグラム
 - バーをドラッグすると表面レベルを調節できる
-  表面図のスタイル変更
 - ヒストグラムの下、Styleのところのラジオボタンで、表面のスタイルを変更可能
 - 今回の用途には[mesh]が向いている
-  ツールを追加、削除
 - Volume viewerのメニュー: [Features]で各種のツールを追加可能
 - ツールの右上の[X]ボタンを押すと隠れる

Side viewをさわってみる

-  Side viewパネルを表示
 1. メインメニュー - [Favorites] - [Side View]
 - 実際にはViewingツールの中のタブのひとつ

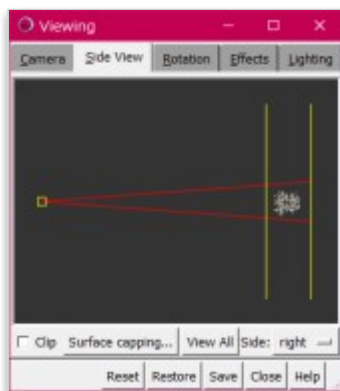




図: Side Viewツール

-  Side viewを使いこなす
 - Side Viewは文字通り、横から見た景色を表示している
 - 左の小さい四角が視点(カメラ)の位置
 - そこから伸びる2本の赤い線が上下の視野範囲
 - 黄色い線が、手前側と奥側の切断面、マウスで移動させられる
 - 下のボタン、[Surface capping]で切断面の塗りつぶしを設定可能、メッシュ表示のときはoffにしたほうが良い
 - 下のボタン、[View all]を押すと、モデル全体がちょうど視野に収まるように移動

配列ビューアでの操作

-  配列ビューアを表示
 1. メインメニュー [Favorites] - [Sequence]
 2. 現れたウィンドウで、[chain A]を選択し[Show] → 配列ビューアウィンドウが出現

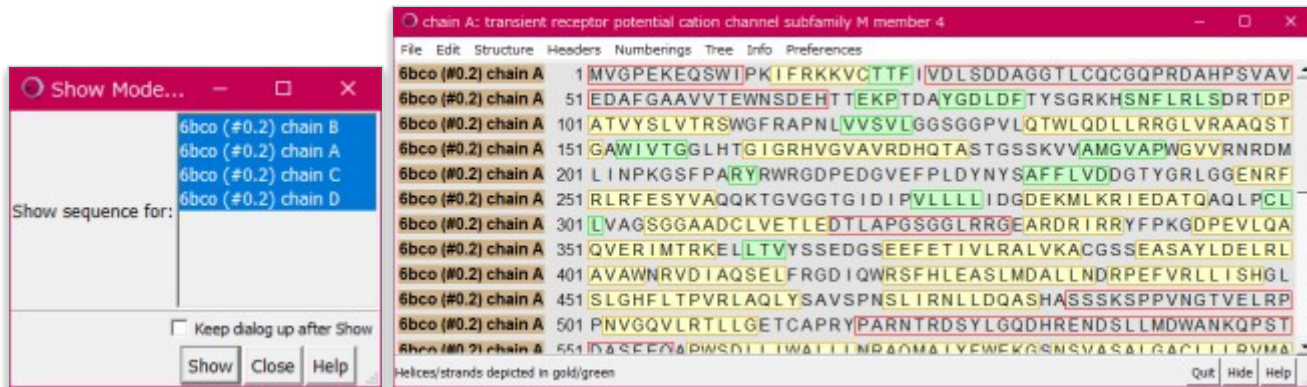



図: 配列選択ダイアログと 配列ビューア

-  配列ビューア

- 赤枠: unobserved / 黄: アルファ / 緑: ベータ
- 左ボタンドラッグで配列の「選択」(ビューア画面上で緑の輪郭)
 - 配列の「選択」と構造ビューア中での「選択」は、対応している
- 右クリックで、ビューア画面上でその残基にフォーカス

マップ-原子モデルの一致度の確認

- ☞ 選択した部分構造に側鎖を表示、
 1. 配列ビューアで適当な 2 次構造要素をマウスドラッグにより選択
 2. メインメニュー - [Action] - [Atoms/Bonds] - [show] → 側鎖表示
 3. メインメニュー - [Action] - [Focus] → 選択部分が見やすくなる
- ☞ その周りのマップのみ表示
 1. Volume Viewerのメニュー - [Features] - [Zone] → Zoneツールが追加される
 2. Volume Viewerのメニュー - [Features] - [Save default panel]を実行しておくと、次回から自動でZoneツールも出現する
 3. [Zone]ボタンをクリック → 選択部分から任意距離のマップのみが表示され、粗視度も下がる
 - 入力ボックスで選択原子からの距離を指定できる

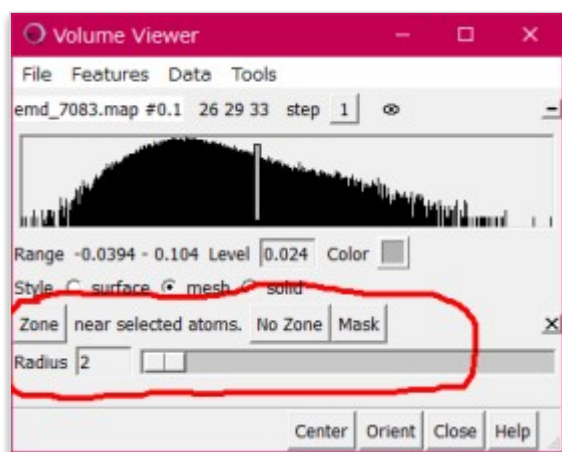


図: Volume Viewer の Zone ツール

- 🧐 微調整、確認
 - Volume Viewerのヒストグラムのバーで、表面レベルを変化させてみる
 - サイドビューツールで、前後の邪魔な部分を隠してみる
 - モデルを回転させ、いろいろな方向から見てみる
 - 主鎖のリボンが邪魔なときはリボンを消す
 - メインメニュー - [Action] - [Ribbon] - [hide]



図: アルファヘリックスの周囲のマップ表面図

ATPの周りを見てみる

- 🖱️ 1個のATPとその周囲の残基を「選択」する
 1. メインメニュー - [Select] - [Residue] - [ATP] → 4個すべてのATPが選択される
 2. メインメニュー - [Action] - [Focus]
 3. ATPの構成原子の一つを[Ctrl]キーを押しながらクリック → 1個の原子が選択される
 4. メインメニュー - [Select] - [Broaden] → 選択がATP分子に拡大
 - Broaden/Narrow: 原子 → 残基 → チェーン の階層
 - Broaden/Narrowはキーボードの上下キーでも可能
 5. メインメニュー - [Select] - [Zone] → ゾーン選択ツール
 6. デフォルトの5Å範囲のままで、[OK]をクリック → ATPから5Å以内の原子が追加選択される
 7. 上方向キー → 選択が残基レベルに拡大

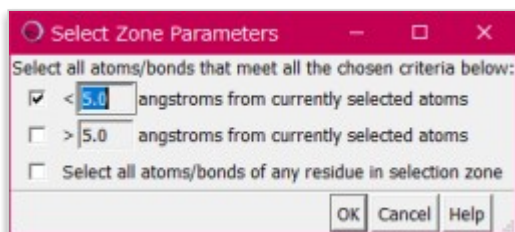


図: ゾーン選択ツール

- 🖱️ 先程と同様に側鎖表示、フォーカス、マップ表面表示
 1. メインメニュー - [Action] - [Atoms/Bonds] - [Show]
 2. メインメニュー - [Action] - [Focus]
 3. Volume Viewer - [Zone]
- 👁️ 微調整、確認
 - 先程と同様の操作
 - ATPはあまりうまく見えていないように見えると思う

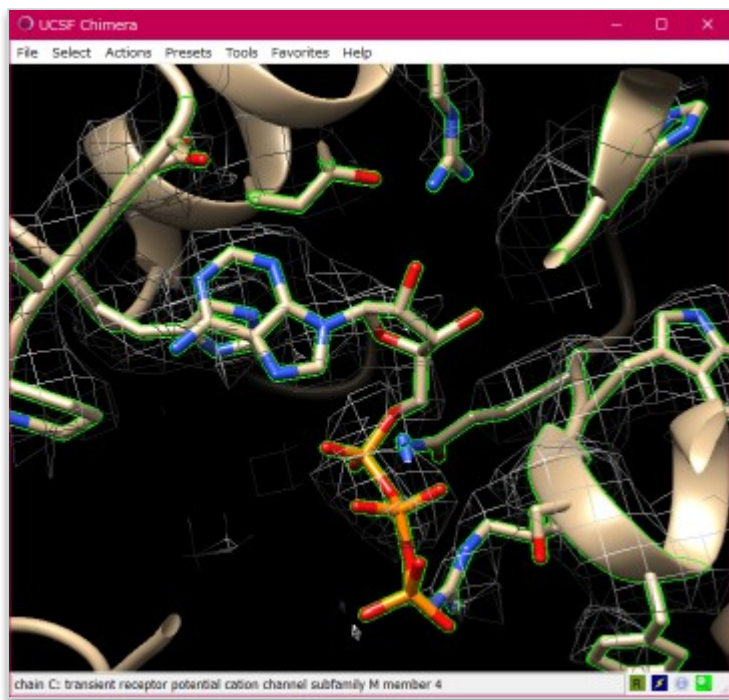


図: ATPとその周囲のマッブ

チャネルを通過するナトリウムイオンを試みる

- 🖱 セッションを保存して閉じる
 1. (保存するなら)メインメニュー [File] - [Save Session As]で名前をつけて("trpm4-atp"など)保存
 - 原子モデルはセッションファイル内に保存される
 - マップはファイルパスが保存される
 2. メインメニュー [File] - [Close Session]でデータを閉じる
- 🖱 先程と同様にファイルを開く
 1. 読み込むファイルは、[pdb6bcj.ent.gz](https://www.rcsb.org/structure/pdb6bcj) と [emd_7081.map.gz](https://www.rcsb.org/structure/emd_7081)
- 🖱 ナトリウムイオンとその周囲の残基を選択し、フォーカス、側鎖表示、マップ表示 (先程と同様の手順なので概要のみ)
 1. メインメニュー - [Select] - [Residue] - [NA]
 2. メインメニュー - [Select] - [Zone] → Zoneツールの[OK]ボタン
 3. 上方向キー → (選択が残基レベルに拡大)
 4. メインメニュー - [Action] - [Atoms/Bonds] - [Show]
 5. メインメニュー - [Action] - [Focus]
 6. Volume Viewer - [Zone]
- 👁 微調整、確認
 - 先ほどと同様の操作
 - ナトリウムイオンと配位水、割とうまく見えている

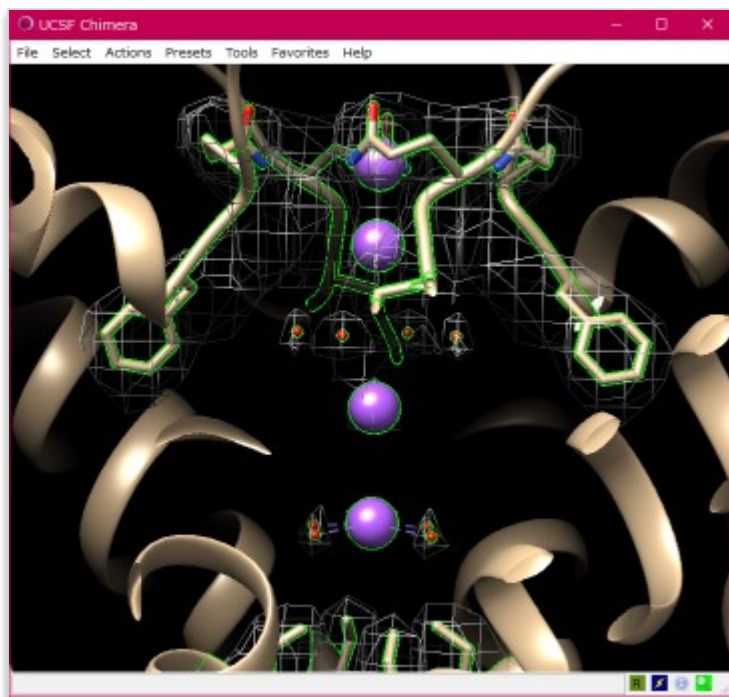


図: チャンネル中のナトリウムとその周囲のマッブ

モーフィングで構造変化を見る

- モーフィングアニメーション
 - Chimeraでは簡単にモーフィングアニメーションが作成できる
 - ATPの結合に伴うチャンネルの構造変化が見られる
 - 一般にモーフィングだと構造変化がわかりやすい (このデータに関しては、わかりにくい)
- 🖱 データの準備
 1. メインメニュー [File] - [Close Session]でデータを閉じる
 2. 2つのPDBデータを開く
 - 読み込むファイルは、pdb6bcj.ent.gz と pdb6bco.ent.gz
- 🖱 モデルを重ねる (今回のように、ほぼ重なってはいる場合は省略できる)
 1. メインメニュー - [Tools] - [Structure Comparison] - [MatchMaker] → MatchMakerウィンドウが出現
 2. [Reference structure]と[Structure(s) to match]を選択し[OK]を押す
 3. 数分から数十分待つ

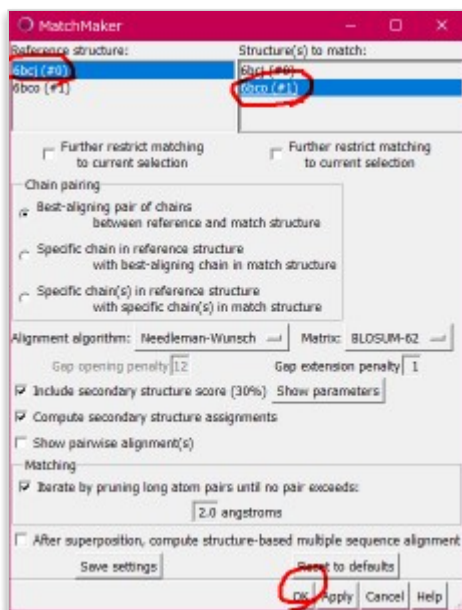



図: MatchMakerウィンドウ

-  モーフィングモデルの作成
 1. メインメニュー - [Tools] - [Structure Comparison] - [Morph Conformations] → モーフィングツールが出現
 2. [Add]ボタンを押し、モデル追加ダイアログを出し、ひとつずつ順番に追加
 3. [Create]ボタンを押し、数分から数十分待つ

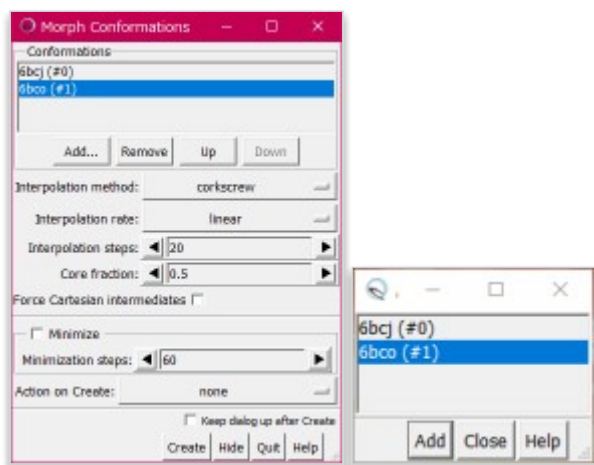



図: モーフィングツールと モデル追加ダイアログ

-  モーフィングの鑑賞
 1. 元のモデルを隠し、作成したMoprhモデルのみ表示されるようにする
 - 完了後に出現するModel Panelで6bcj 6bcoの[S]の列のチェックボックスのチェックを外す
 - Model Panelは、メインメニュー - [Favorites] - [Model Panel]で呼び出せる
 2. ムービーツールの再生ボタンをクリック

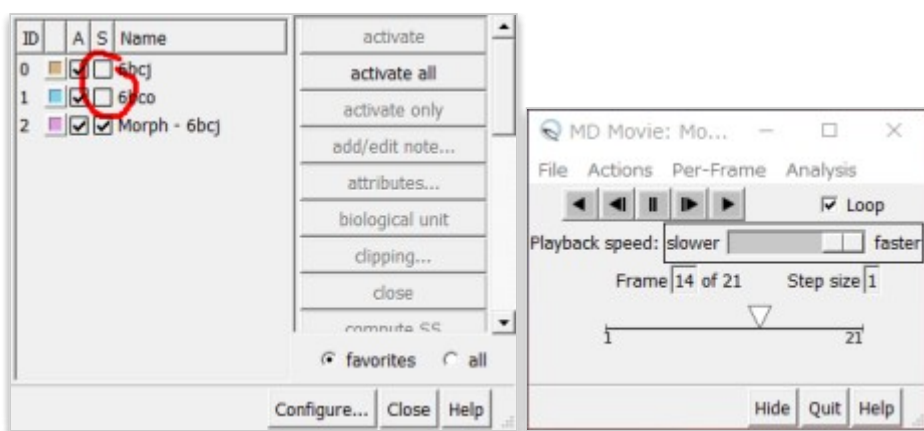


図: モデルパネルと ムービーツール

参考情報

- [今回の講習会ページ](#)
- [見てわかる構造生命科学 - 株式会社 化学同人](#)



- [UCSF Chimeraのページ](#)
- [PDBj - 過去の講習会ページ](#)
- [前回の初心者向け講習の資料](#)