クライオ電顕の密度マップと原子モデルの可視化

大阪大学蛋白研セミナー/
PDBj & BINDS 合同講習会
「生命科学のための立体構造データの使い方入門」
2018-02-20 大阪大学吹田キャンパス

鈴木博文
PDBj / 大阪大学蛋白質研究所

＃1
はじめに

実習の準備

- **ハードウェアの準備**
  - マウスの準備（貸出用を用意する予定）
  - 電源（電力消費量が高い作業を実施する）
- **ウェブブラウザの確認**
  - 最新版、こだわりがなければGoogle Chrome
- **データの準備**
  - USBメモリも用意する予定
  - 全員同時のダウンロードは問題が生じるかもしれない
- **UCSF-Chimeraのインストール**
  - Chimeraは非営利的な利用のみフリー
  - インストール方法は講習会のページを参照

自己紹介

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
- EM Navigator/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)

この講習について

- **電子顕微鏡のデータを実際に触ってみる体験**
  - すぐに使える知識・技能というよりは…
  - 今後の共同研究の方針決定、動向調査の参考

- **想定する聴衆**
  - 生体分子構造研究の初心者
  - X線結晶学なら経験があるが、電子顕微鏡は未経験

- **このコースは今回が初めて**
  - 可能なところまで実施して終了する予定

- **TRPM4というカチオンチャネルを主題にする**
  - 高インパクト論文、電子顕微鏡構造らしいデータ
    - それなりに大きい、それなりに高分解能
    - 膜タンパク質、リガンドがついている

#2
EM Navigatorで
電子顕微鏡データをブラウズ

(演習資料を参照)

#3
電子顕微鏡データと
データベース

電子顕微鏡の３次元再構成

- いくつかの方法がある、ここでは「単粒子解析」と「サブトモグラム平均化」をのみあつかう

- **３次元再構成のまともな評価基準がない**
  - FSCによる「分解能」は単なる「自己一貫性」

- **密度マップを見ることが大事**
  - おかしなフィルタをかけていないか、強すぎるフィルタなど
    - 背景が汚い
  - 不十分なCTF補正
    - マイナスの密度の部分が広範囲
  - 不適切な溶媒（背景）処理
    - 分子の部分のギリギリまでフラットな背景
    - マニュアル操作で塗りつぶしたあとがある
  - 原子モデルとの一致度

Difference in methods

		Crystallography	3DEM
Raw data	Aligned?	Yes	No
	Phase?	No	Yes
↓		Initial model/phase required	Initial map can help
	Density map	Refine	Refine
↓			Initial model required for low-res. data
	Atomic model	Refine	Refine

電子顕微鏡のマップデータ

- **「電子」密度ではない**
  - X線(電磁波)で見えるのは電子
  - 電子線で見えるのは「クーロンポテンシャル」
  - でも、「電子密度」と言ってしまう人が多い（専門家も）

- **表面レベル**
  - 統計値は無意味（結晶の電子密度マップでは3σなど、統計値で表面レベルを表現する）
  - 大部分が背景、マップのサイズは任意
  - EMDBのエントリには推奨される表面レベルが記載されているが、それもあまり意味はない

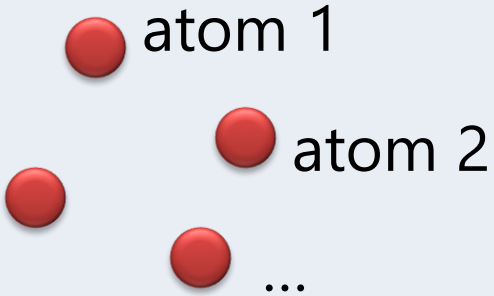
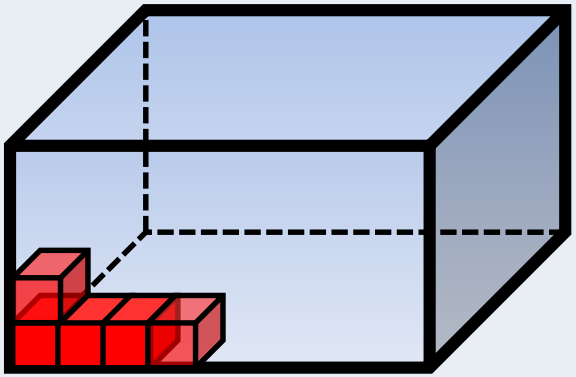
- **マップと原子モデル**
  - 1対１ではない、複数のマップを使ったモデリング、同じマップから複数の構造もあり得る
  - マップと原子モデルの一致度は、マップ・モデルの評価に有効

Databanks for both methods

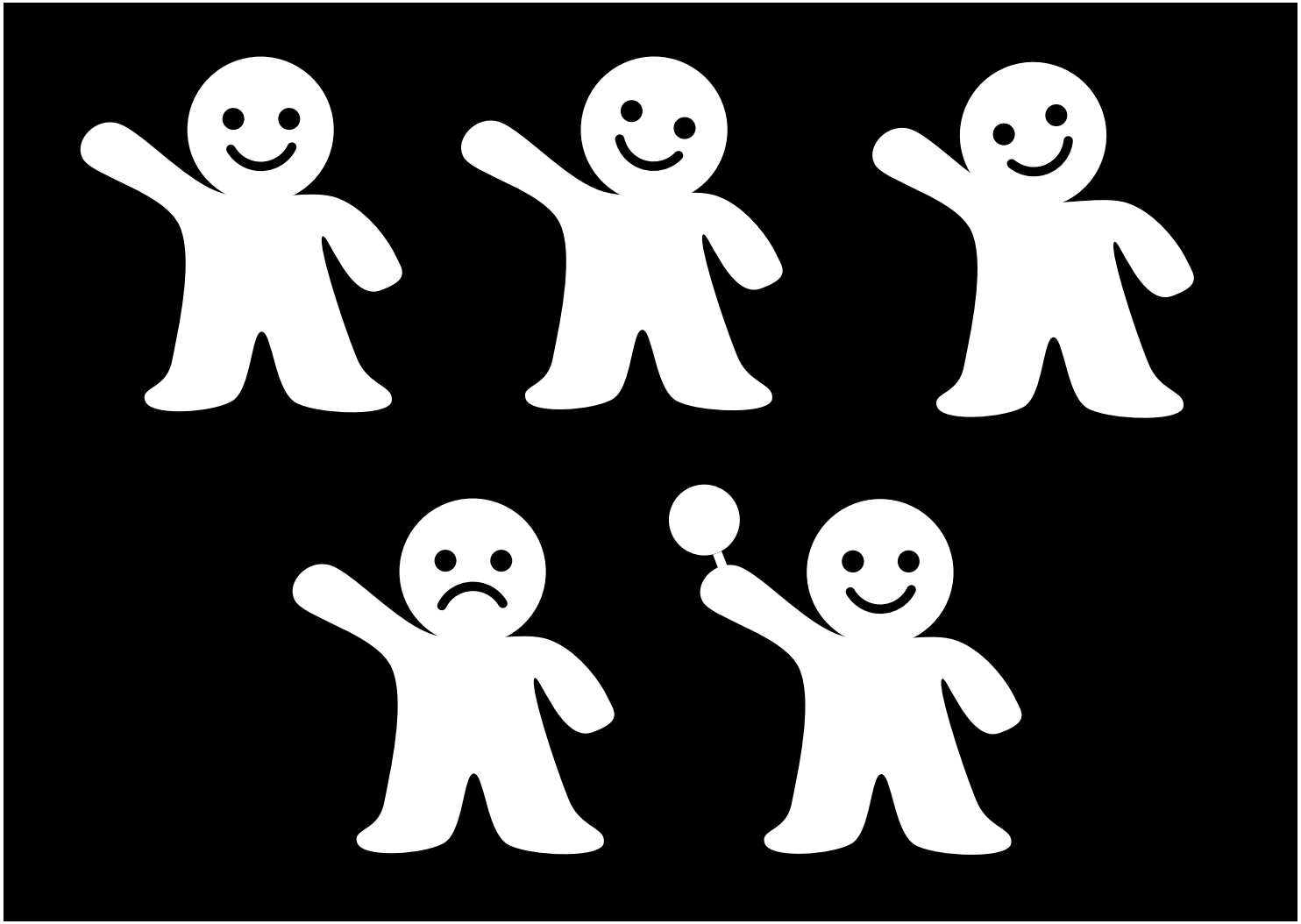
	Crystallography	3DEM (incl. electron crystallography)
Raw data	-	**EMPIAR**
Density map	**PDB** (structure factor)	**EMDB**
Atomic model	**PDB**	

EM Navigator

PDB vs. EMDB

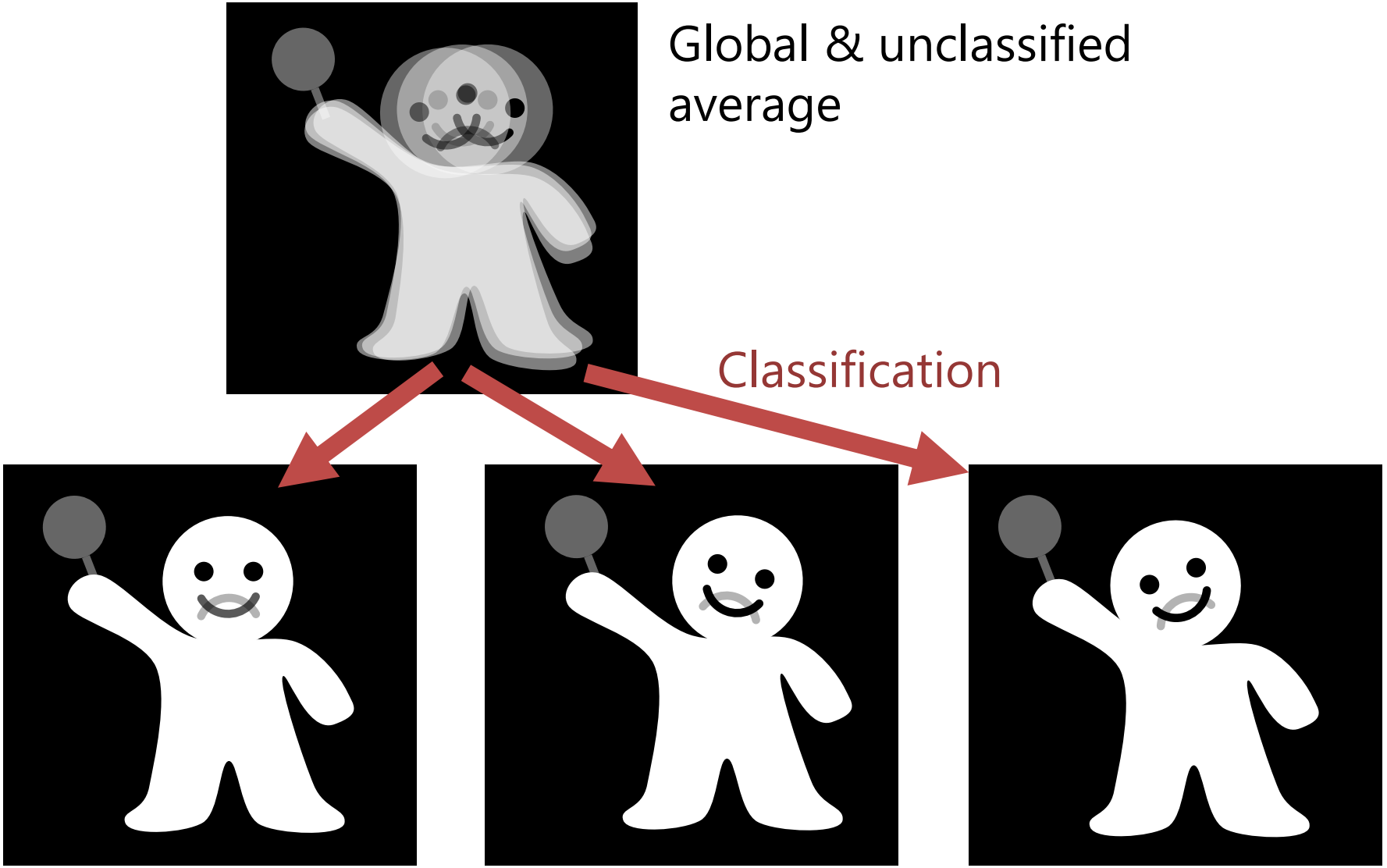
	PDB	EMDB
method	various	EM
main data	atomic model  	3D map（≒ED map）  voxels 1,2,3…
num. of entries	~136,000	~5,700

Flexibility in biomolecule

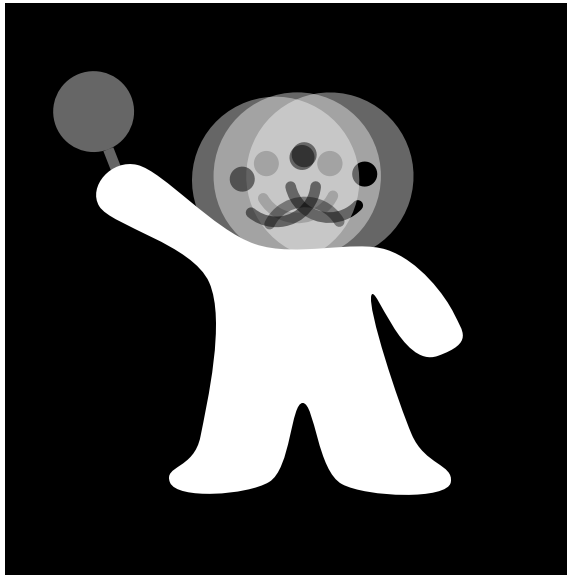


flexibility, heterogeneity & inoccupancy
in molecular assembly

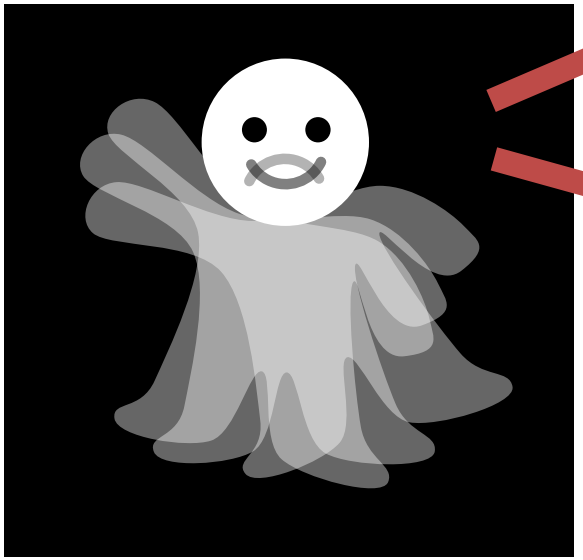
Classification



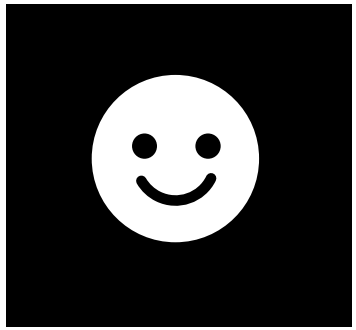
Local averaging & classification



Local (masked) average



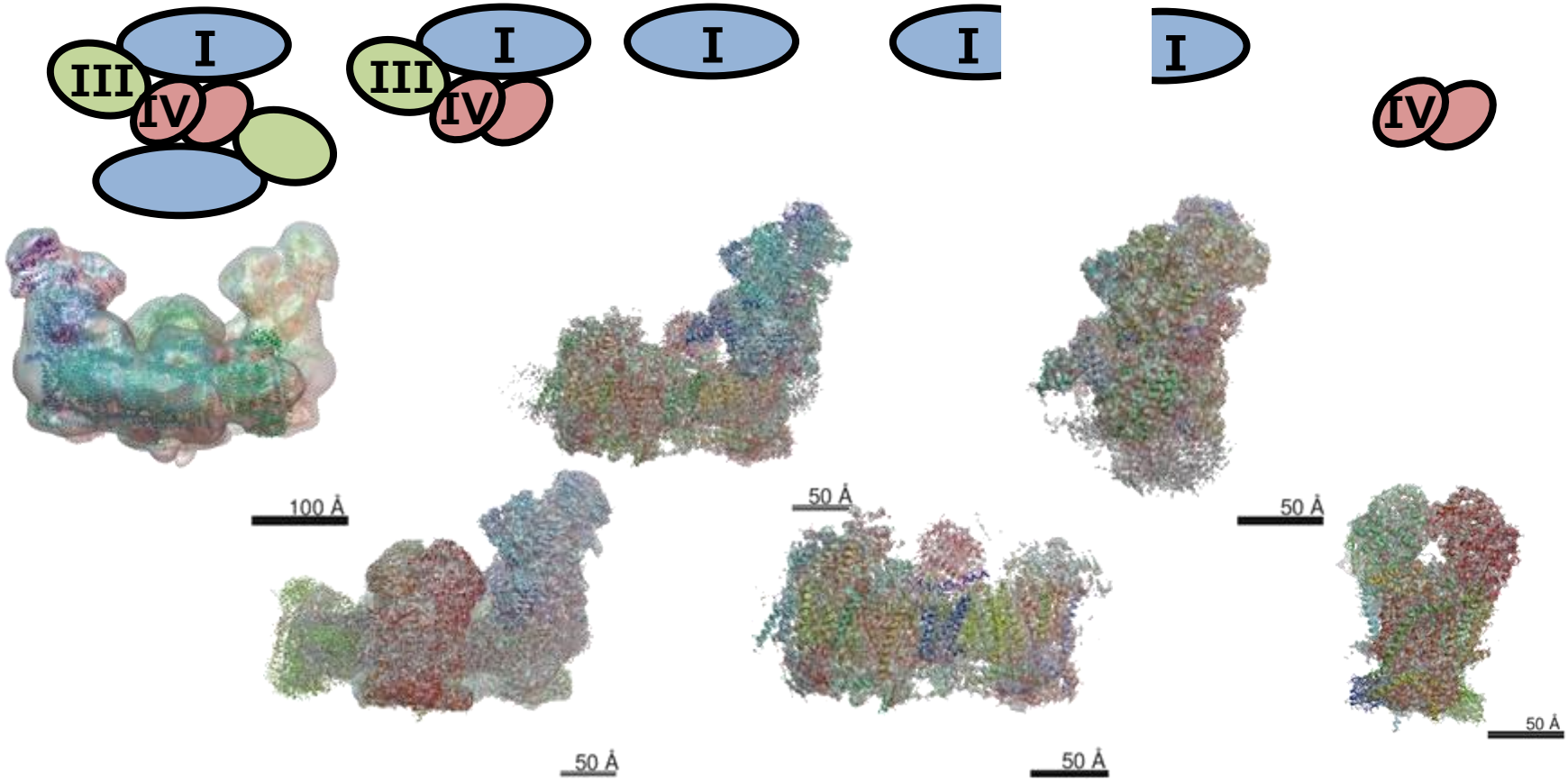
Classification



Local (masked) classification

Respiratory "megacomplex"

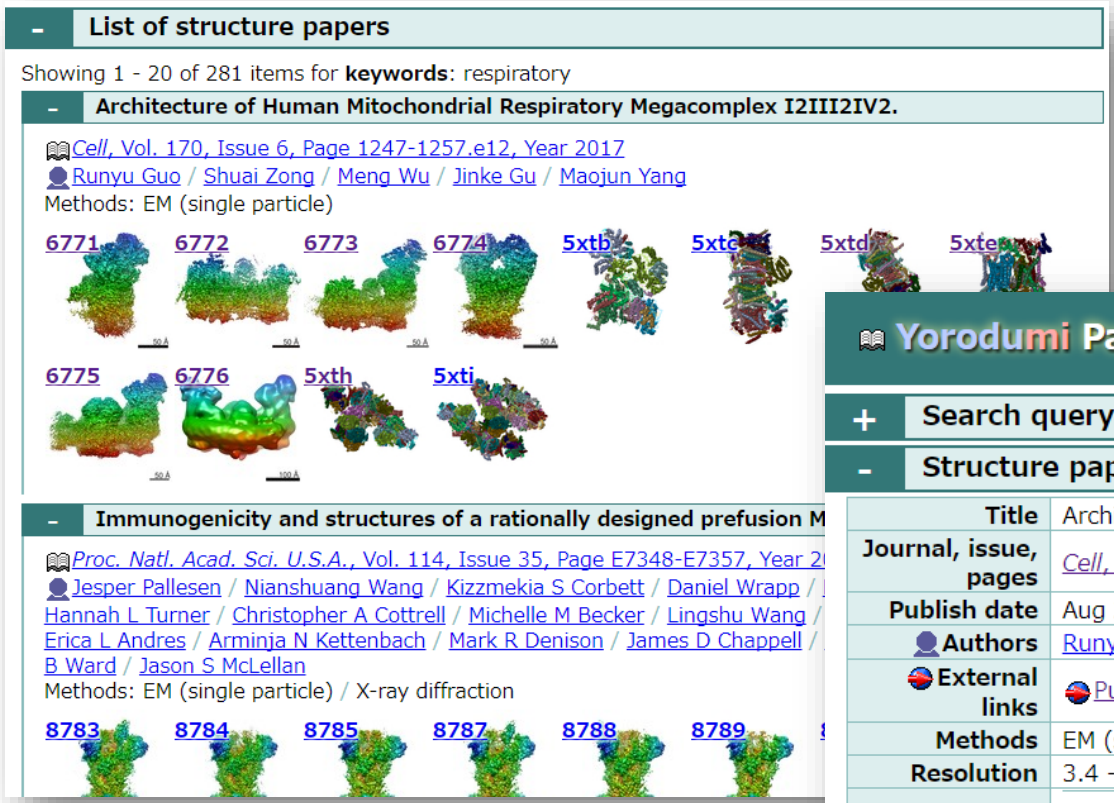
EMDB	6776	6776	6773	6772	6771	6774
PDB	5xti	5xth	5xtd	5xtc	5xtb	5xte
res. (Å)	17.4	3.9	3.7	3.7	3.4	3.4

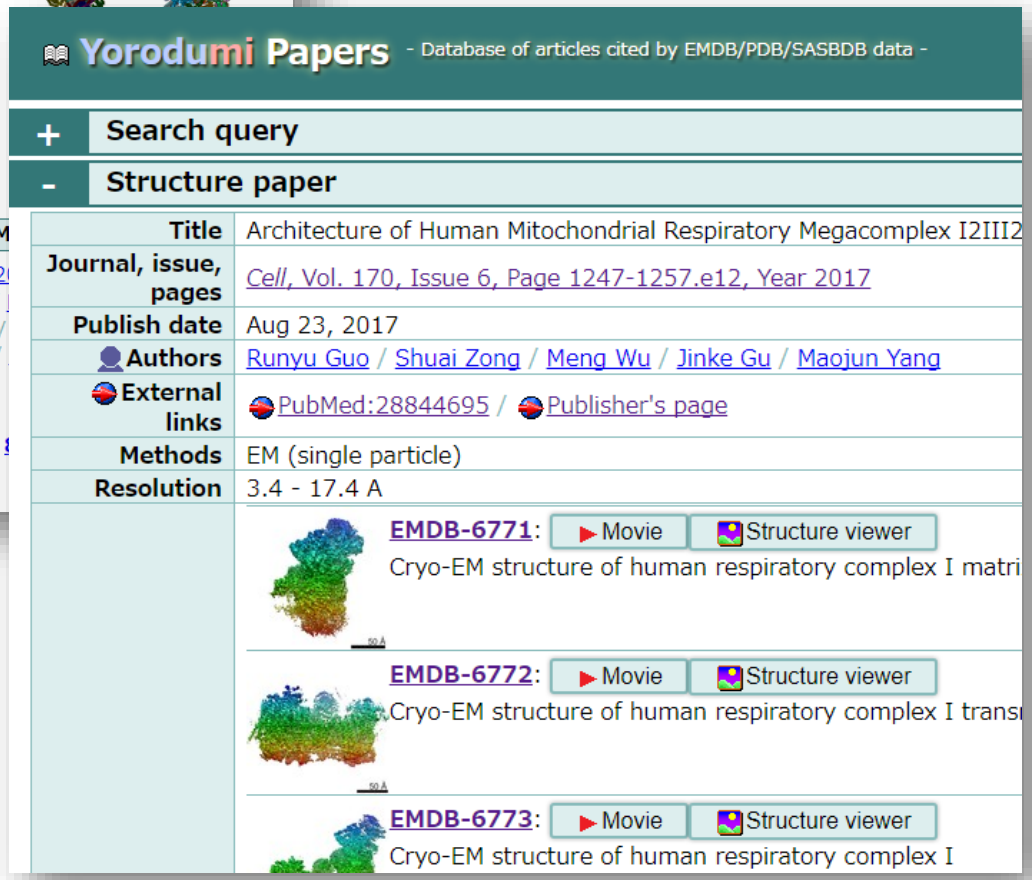


Yorodumi Papers (万見文献)

Database of citation of structure data

Search result

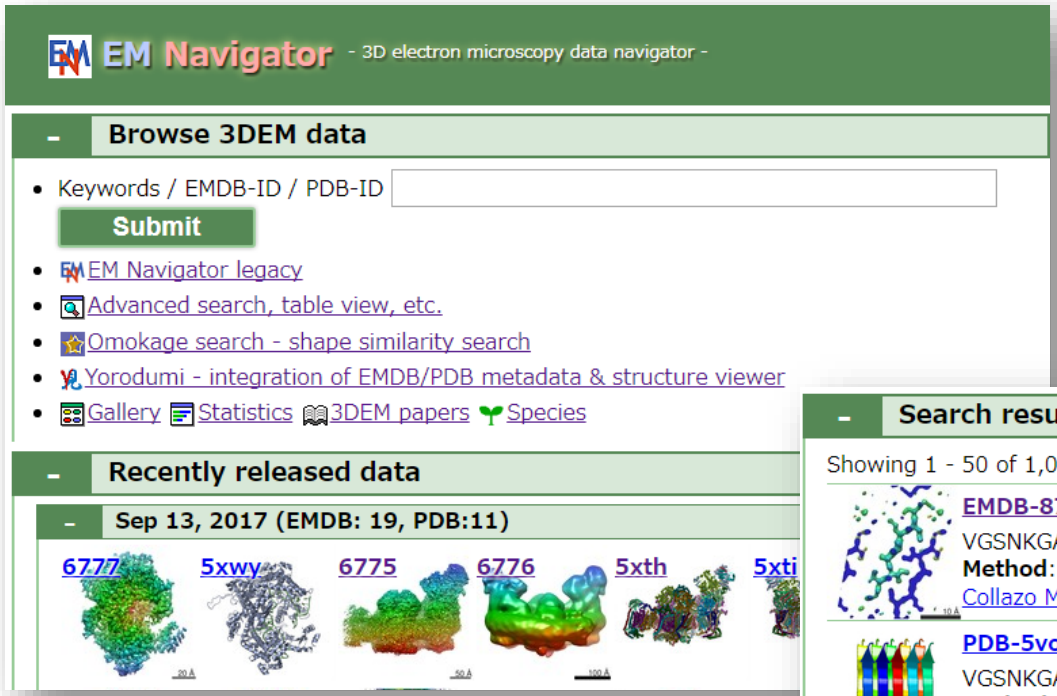




Details of data entries

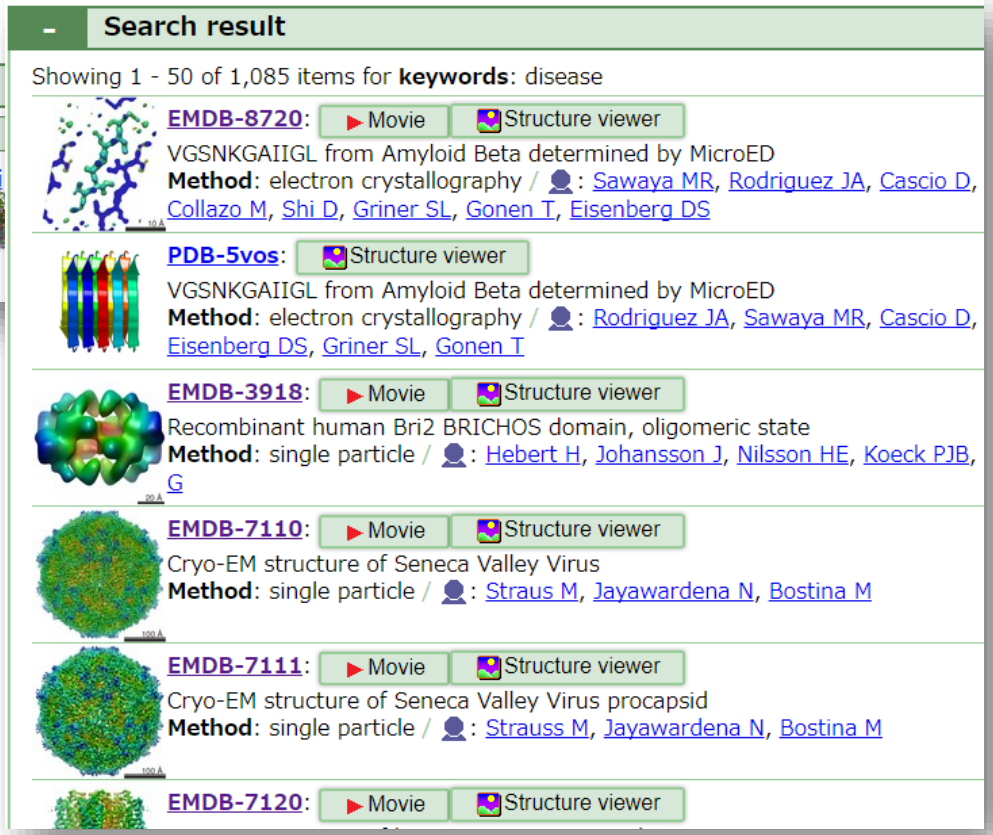
#4
EM Navigatorと
万見(Yorodumi)

EM Navigator



EM Navigator top page

https://pdbj.org/emnavi/



Keyword search

Yearly statistics of EMDB & PDB deposition

Resolution

Year

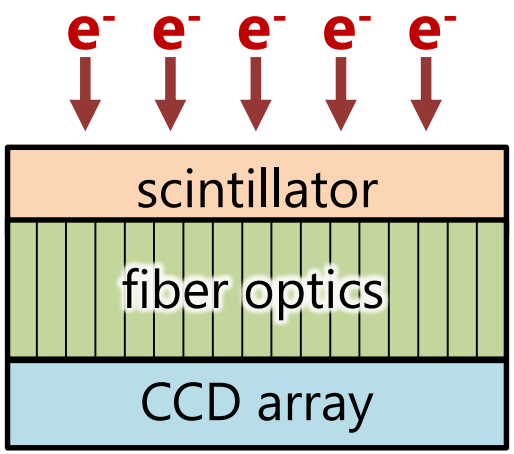
Submission Year	~ 2 Å	~ 3 Å	~ 5 Å	~ 7 Å	~ 10 Å	~ 15 Å	~ 23 Å	~ 34 Å	~ 51 Å	~ 77 Å	~ 115 Å	Total
2017	1	24	433	122	106	38	46	69	19	5	1	900
2016	20	34	668	210	235	90	153	100	46	3	8	1597
2015	4	21	333	70	127	81	128	83	43	7	3	973
2014	1	4	105	55	145	71	143	139	57	76	2	817
2013		1	45	41	107	94	144	96	70	19		653
2012			18	31	87	63	121	75	58	9		493
2011			10	11	80	78	89	46	13	9	3	355
2010		1	23	23	59	69	53	54	16		3	327
2009		1	16	13	43	46	43	21	5			198
2008			8	8	39	36	52	36	15	1		214
2007			3	3	46	37	40	26	12	1		175
2006			1		23	37	44	38	7	2		156
2005	1		1		20	26	34	20	1	2		106
2004		1	2	3	11	23	16	3			1	60
2003			3	1	9	21	10	26	3			75
2002					4	18	7	3	1	11		45

Number: EMDB & PDB entries

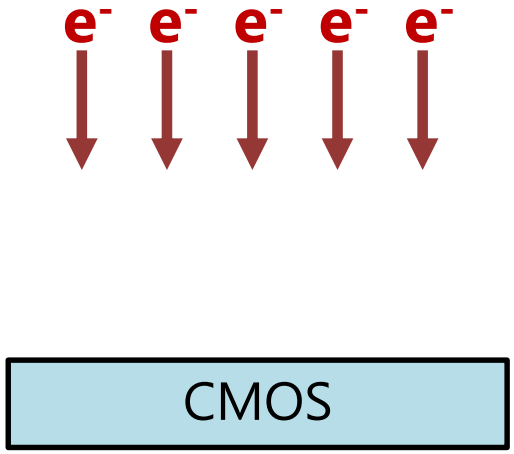
EM Navigator statistics

https://pdbj.org/emnavi/

Direct electron detector

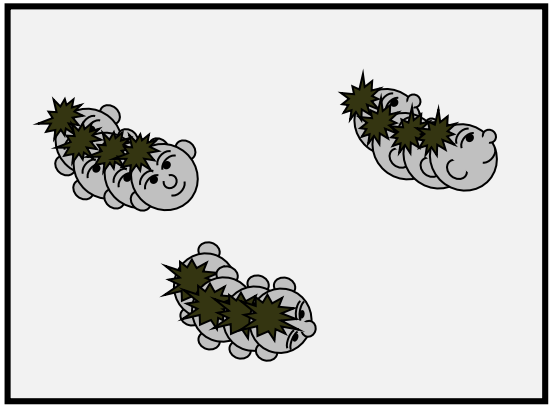


Legacy CCD camera

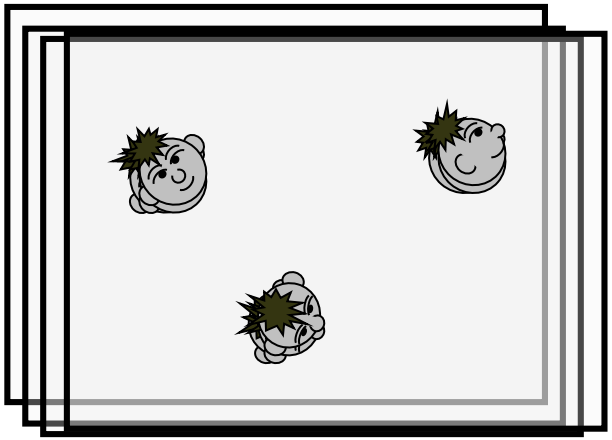


Direct electron detector

➔ Resolution, sensitivity, & speed improved



Micrographs as movie



motion correction

High resolution detectors

Resolution

Camera model

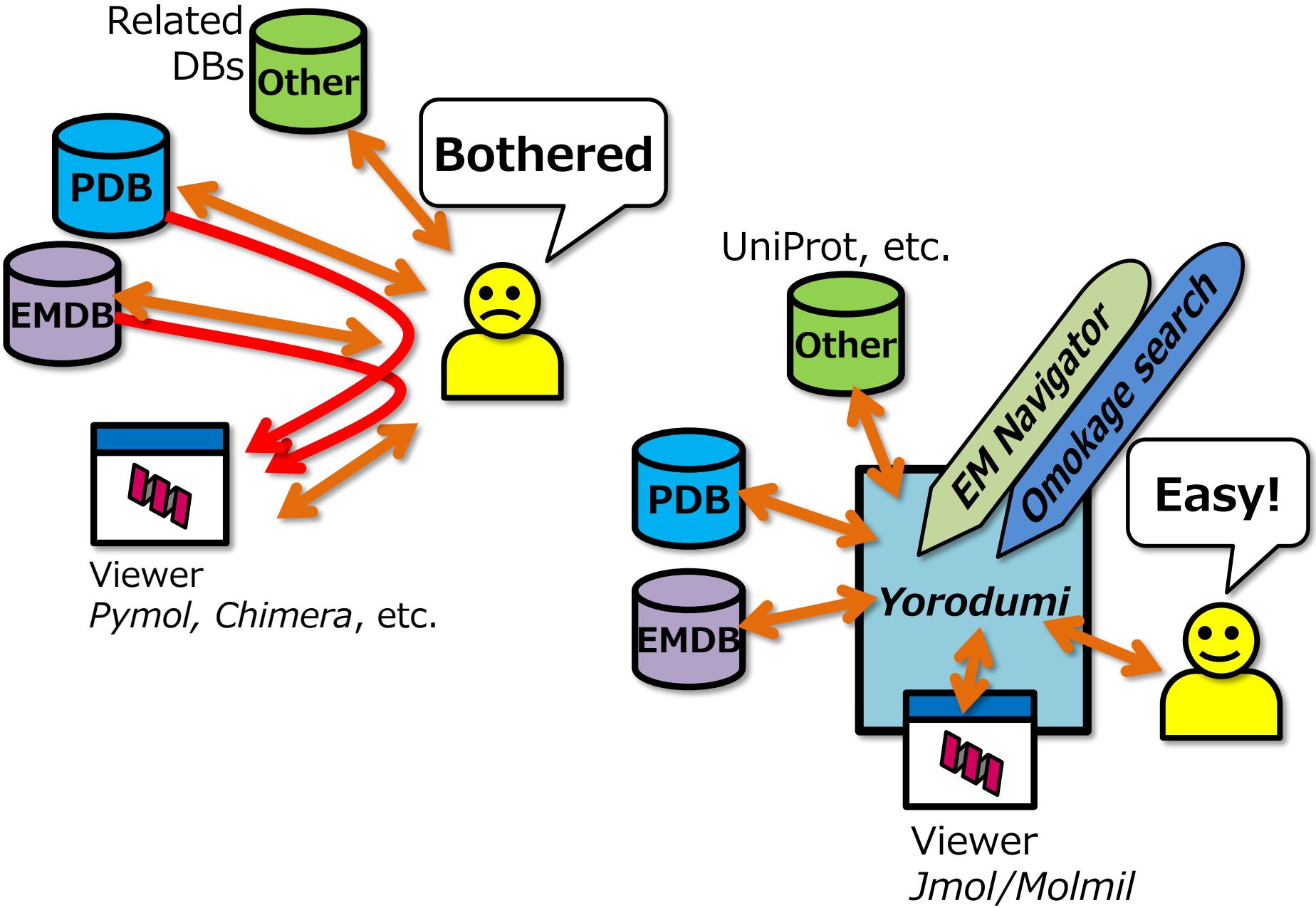
Detector	~ 2 A	~ 3 A	~ 5 A	~ 7 A	~ 10 A	~ 15 A	~ 23 A	~ 34 A	~ 51 A
GATAN K2		27	507	160	171	36	21	34	35
FEI FALCON II		9	493	130	96	58	43	20	5
GATAN K2 SUMMIT		14	372	89	82	22	12	13	3
KODAK SO163 FILM		4	98	76	367	353	318	204	36
GATAN K2 QUANTUM	2	3	45	8	53	4	10	6	2
OTHER		6	43	9	20	10	6	20	4
GATAN ULTRASCAN 4000			31	37	112	133	241	116	60
DIRECT ELECTRON DE-12			12	6	7		2	1	1
GATAN GENERIC	1	3	12	7	26	33	56	38	16
FEI FALCON I		2	10	18	14	6	5	2	9
n/a	1		10	3	38	36	82	50	32
GENERIC FILM			8	2	6	4	17	4	
DIRECT ELECTRON DE-20		4	6		2	1	2	2	
GENERIC CCD		2	5	4	6	18	32	37	18
TIETZ TEMCAM F415			5	7	30	28	38	40	22

Number: EMDB & PDB entries

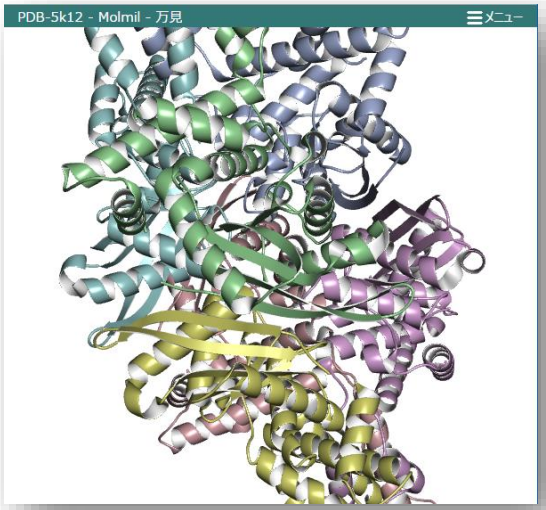
EM Navigator statistics

https://pdbj.org/emnavi/

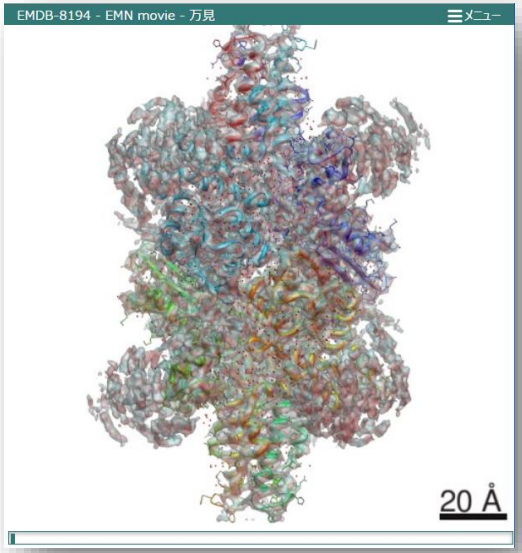
Make viewing easy



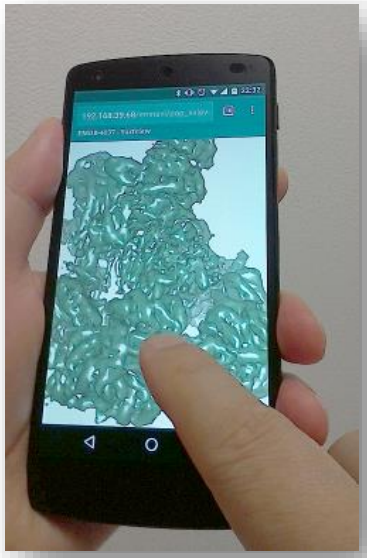
Viewers in *Yorodumi*



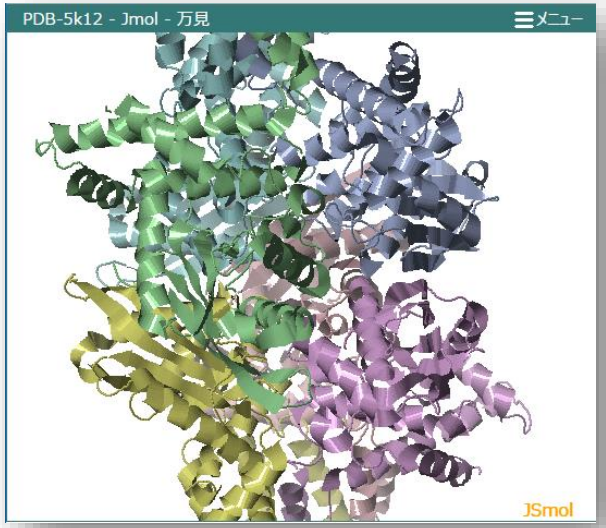
Molmil WebGL molecular viewer G. Bekker



movie

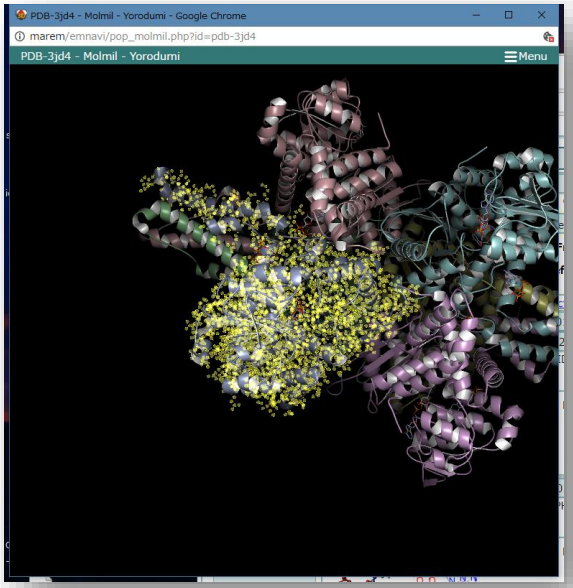


SurfView

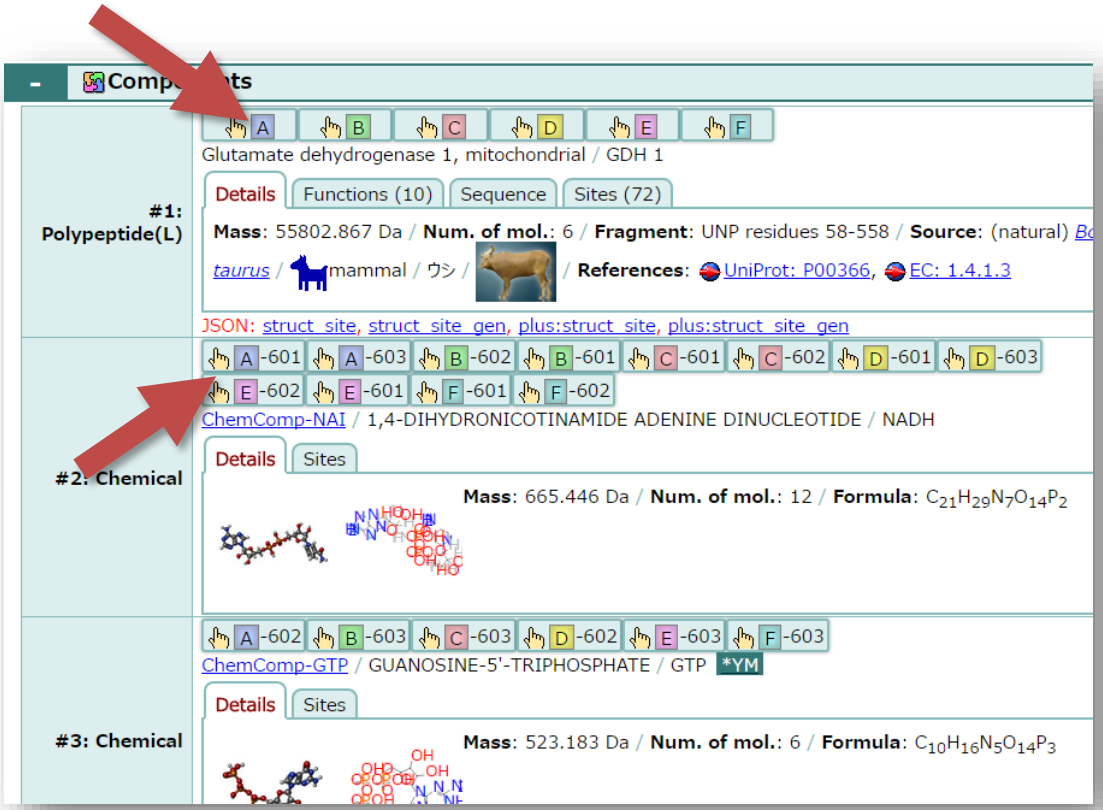


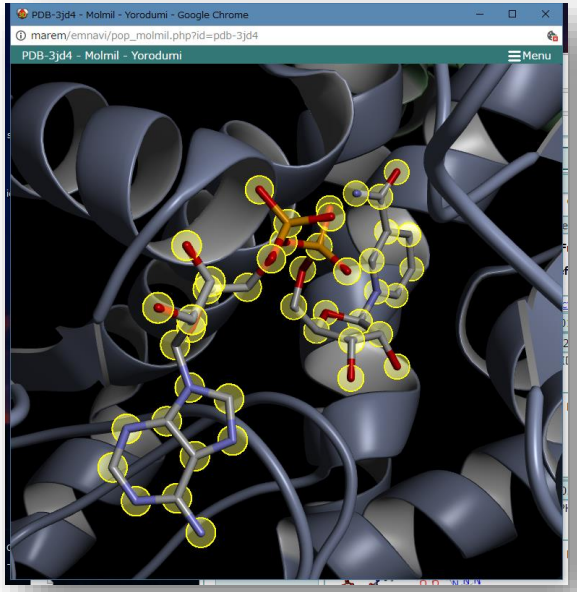
JSmol

Yorodumi-Molmil integration



Focusing on specific chain

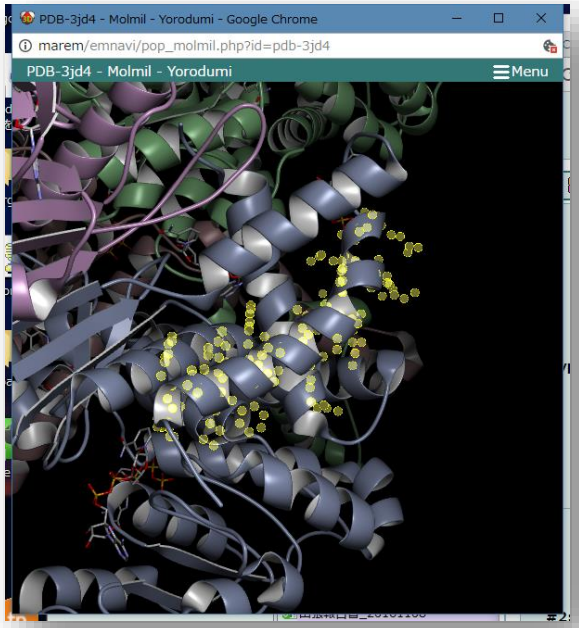




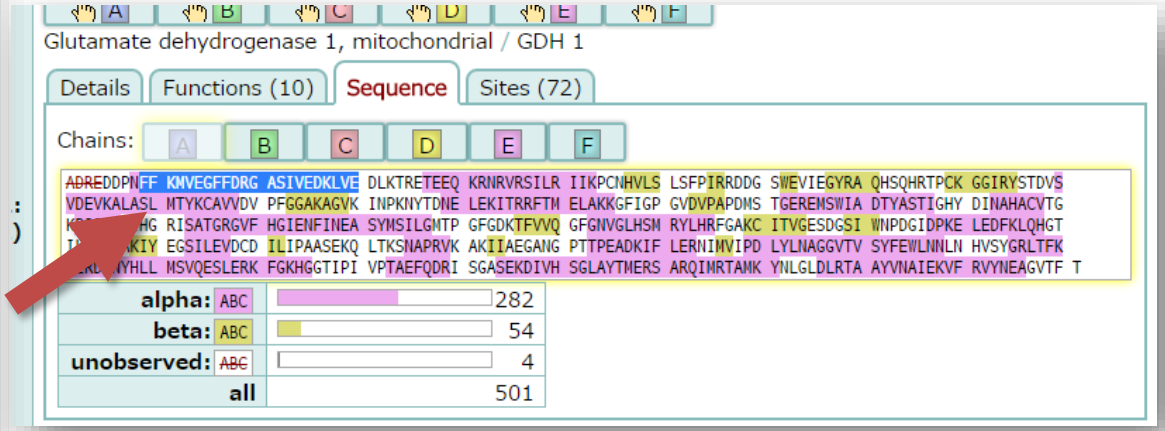
Ligand

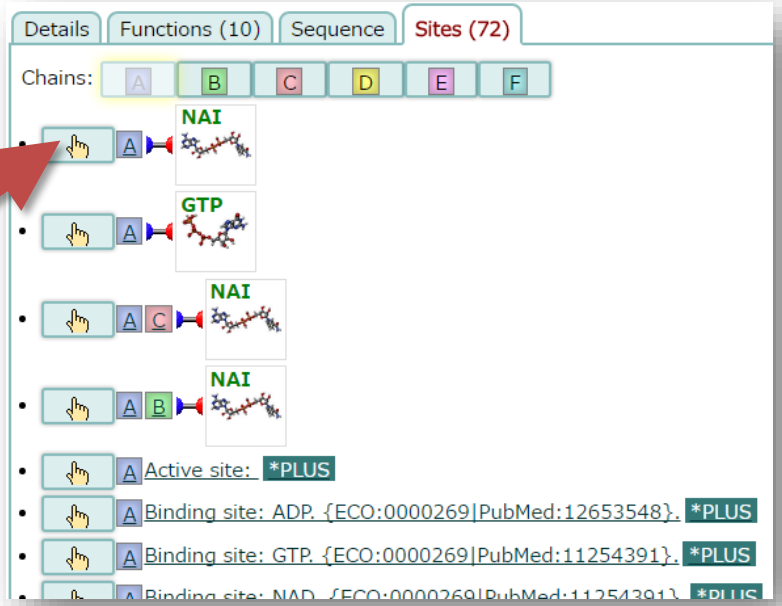
http://pdbj.org/yorodumi/

Yorodumi-Molmil integration



sequence





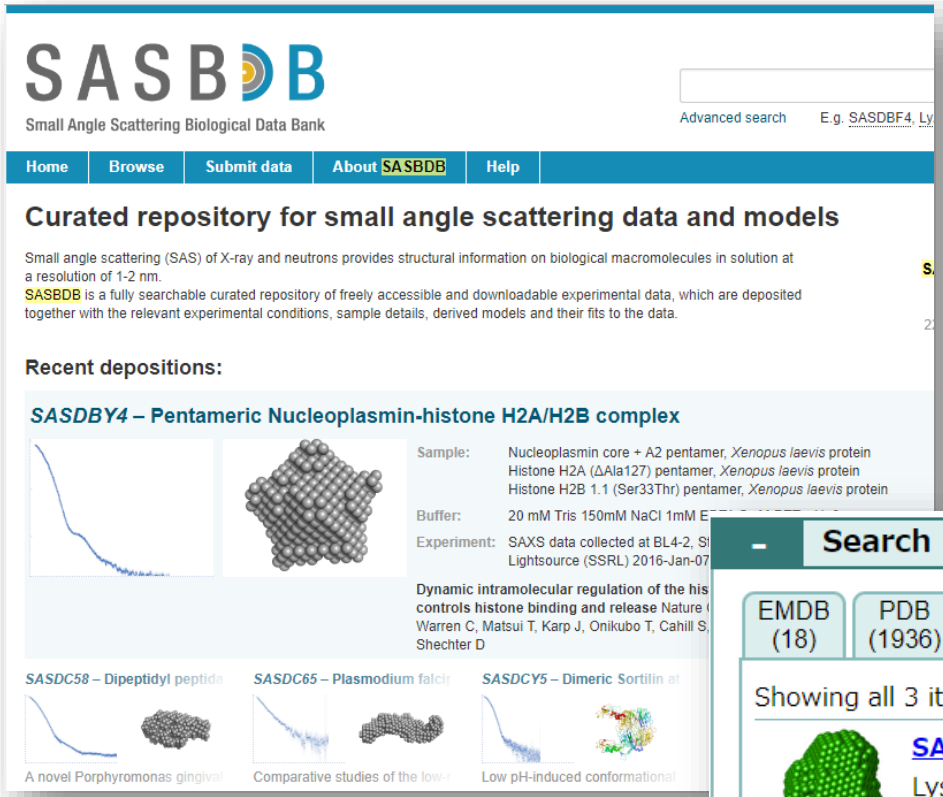
sites

binding sites

active sites

etc.

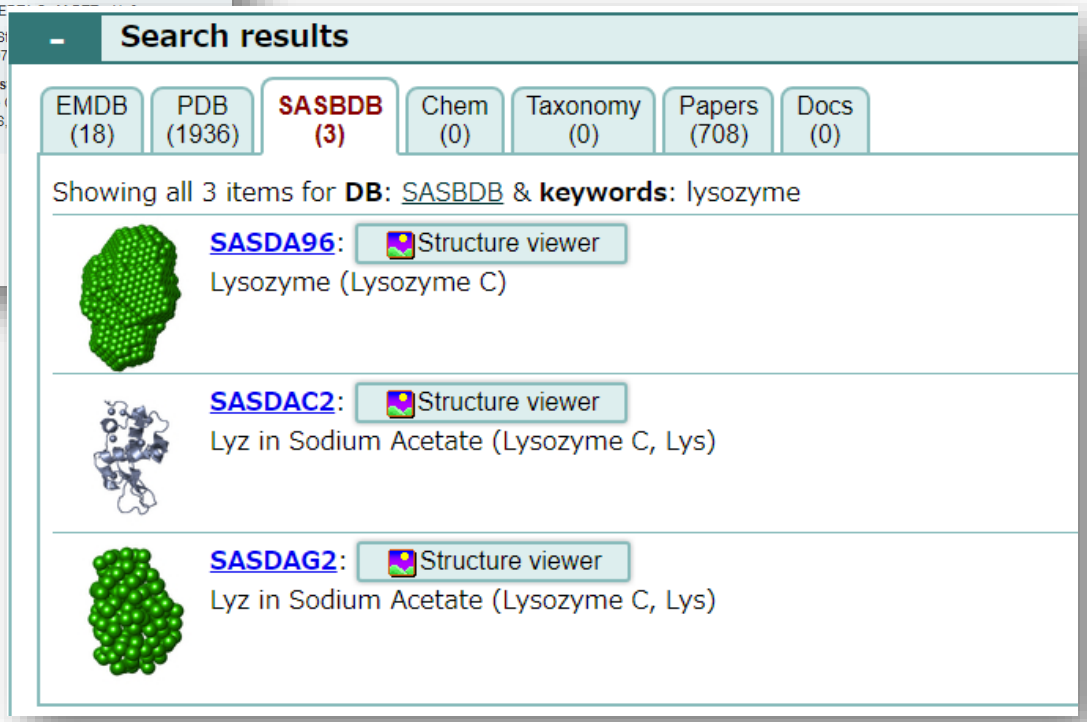
SASBDB



SASBDB

Small angle scattering Biological Data Bank

https://www.sasbdb.org/



Yorodumi search

cross search

New PDB data in Yorodumi

Buffer solution	pH: 8
Buffer component	

ID	Conc.	Units	Name	Formula	Buffer ID
1	150	mM	sodium chloride	NaCl	1
2	20	mM	Tris	C4H11NO3	1
3	0.1	% w/v	digitonin	digitonin	1

Buffer solution details

EM software

ID	Name	Category	Imaging ID	Fitting ID	Image processing ID
2	SerialEM	IMAGE ACQUISITION	1		
7	COOT	MODEL FITTING		1	
8	Chimera	MODEL FITTING		1	
11	PHENIX	MODEL REFINEMENT		1	
15	Relion	RECONSTRUCTION			1

Software details

PDB-5vot

#5
万見で詳細情報を確認

(演習資料を参照)

#6
UCSF-Chimeraで
電子顕微鏡構造を見る

(演習資料を参照)