

「アグリバイオインフォマティクス教育研究プログラム」
6/11（金） 17:15 – 20:30 (18:45 – 19:00 休憩)

電子顕微鏡による構造決定と インフォマティクス

光岡 薫（産総研・バイオメディシナル情報研究センター）

E-mail: kaorum@ni.aist.go.jp



電子顕微鏡を用いた立体構造解析法と分解能

電子線結晶構造解析

原子モデル

らせん再構成

二次構造から原子モデル

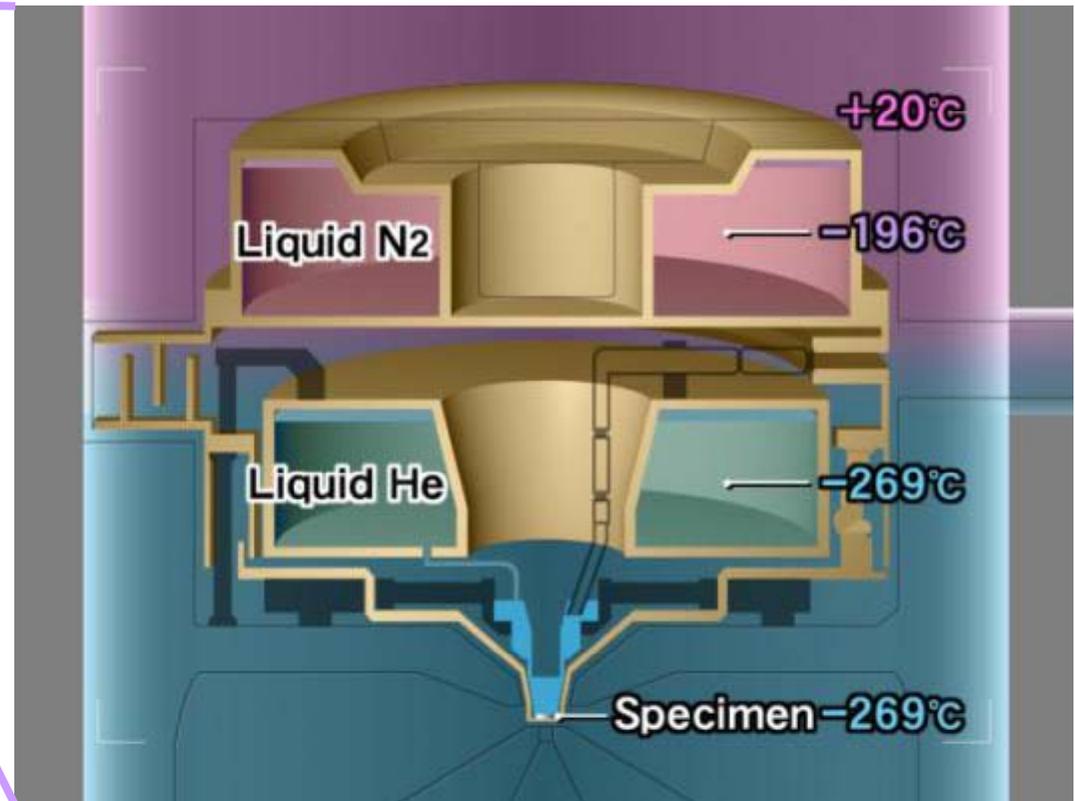
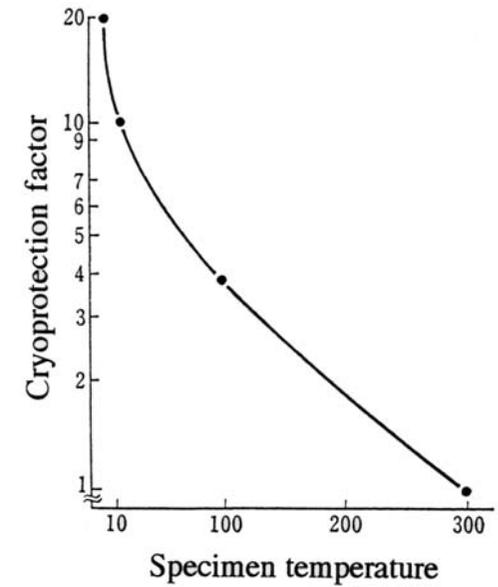
単粒子解析

二次構造から原子モデル

電子線トモグラフィー

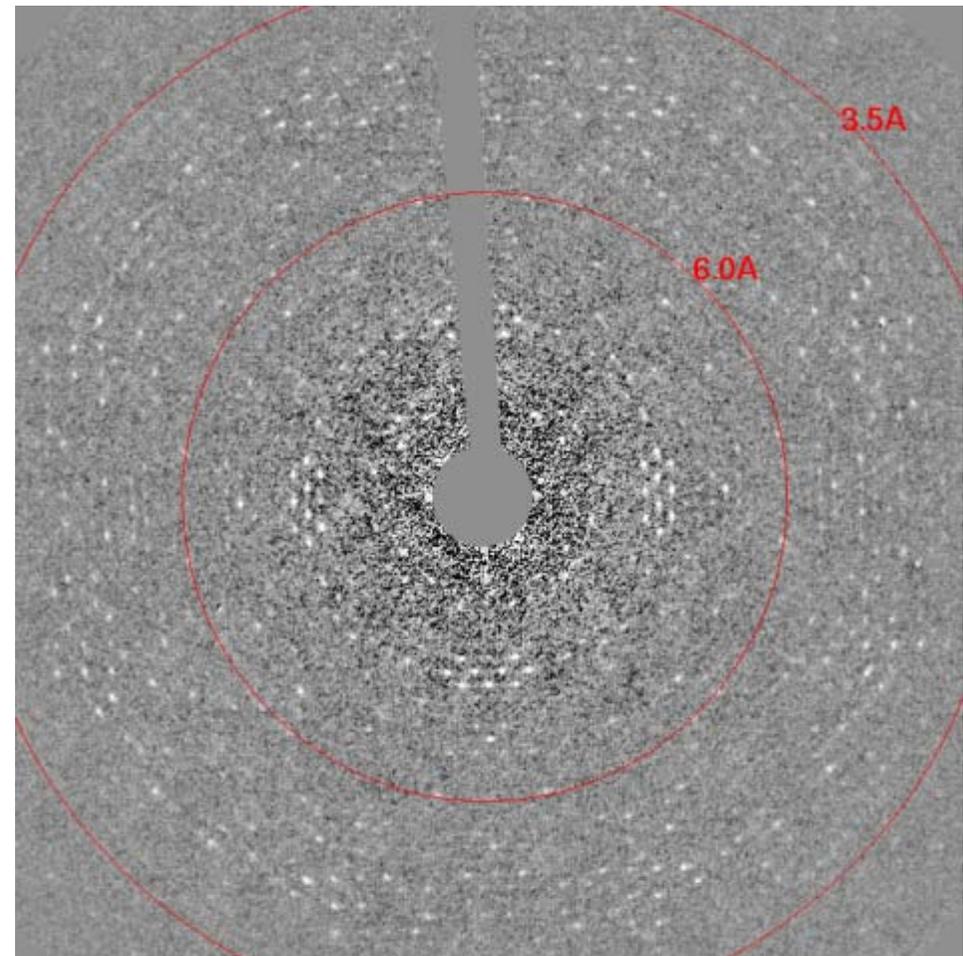
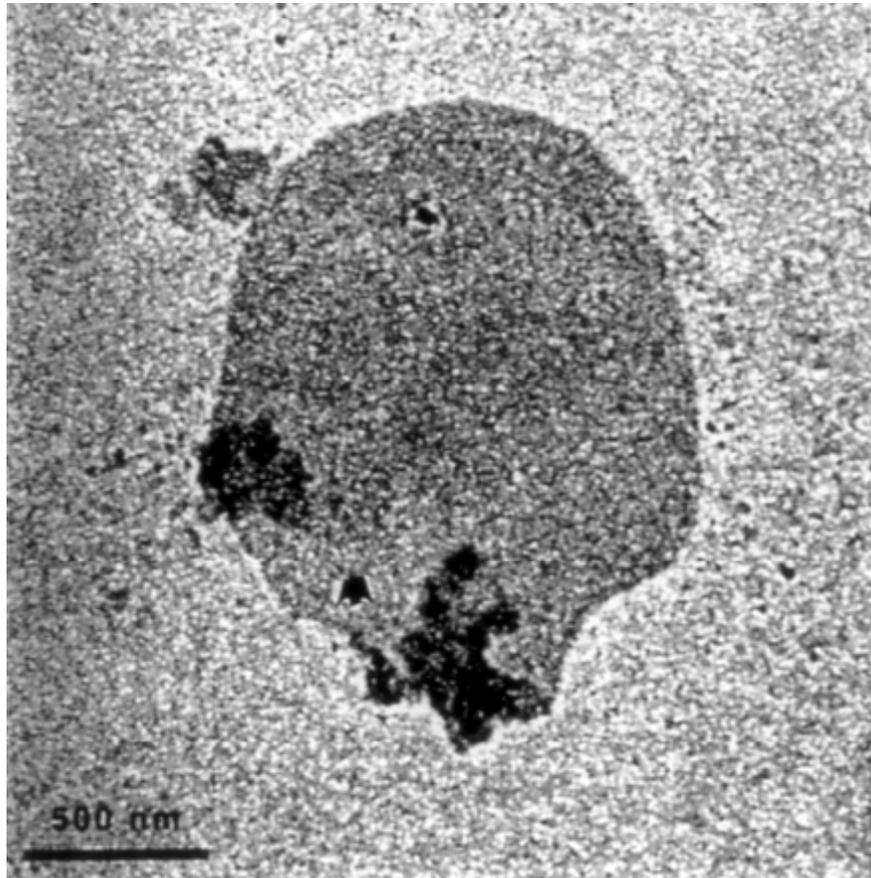
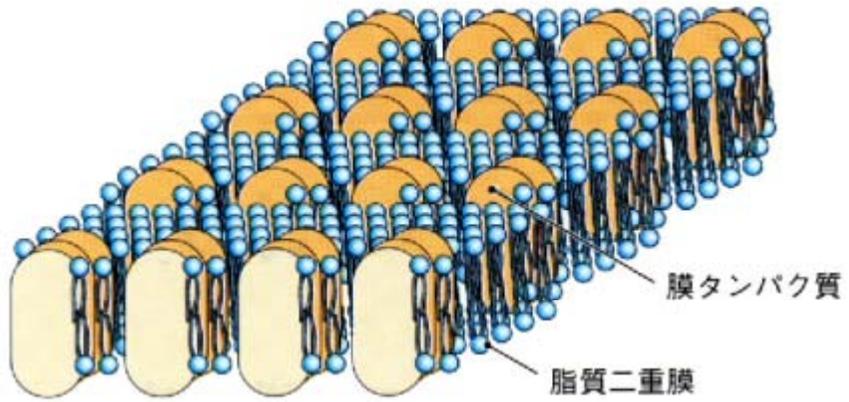
複合体の同定

低温電子顕微鏡法

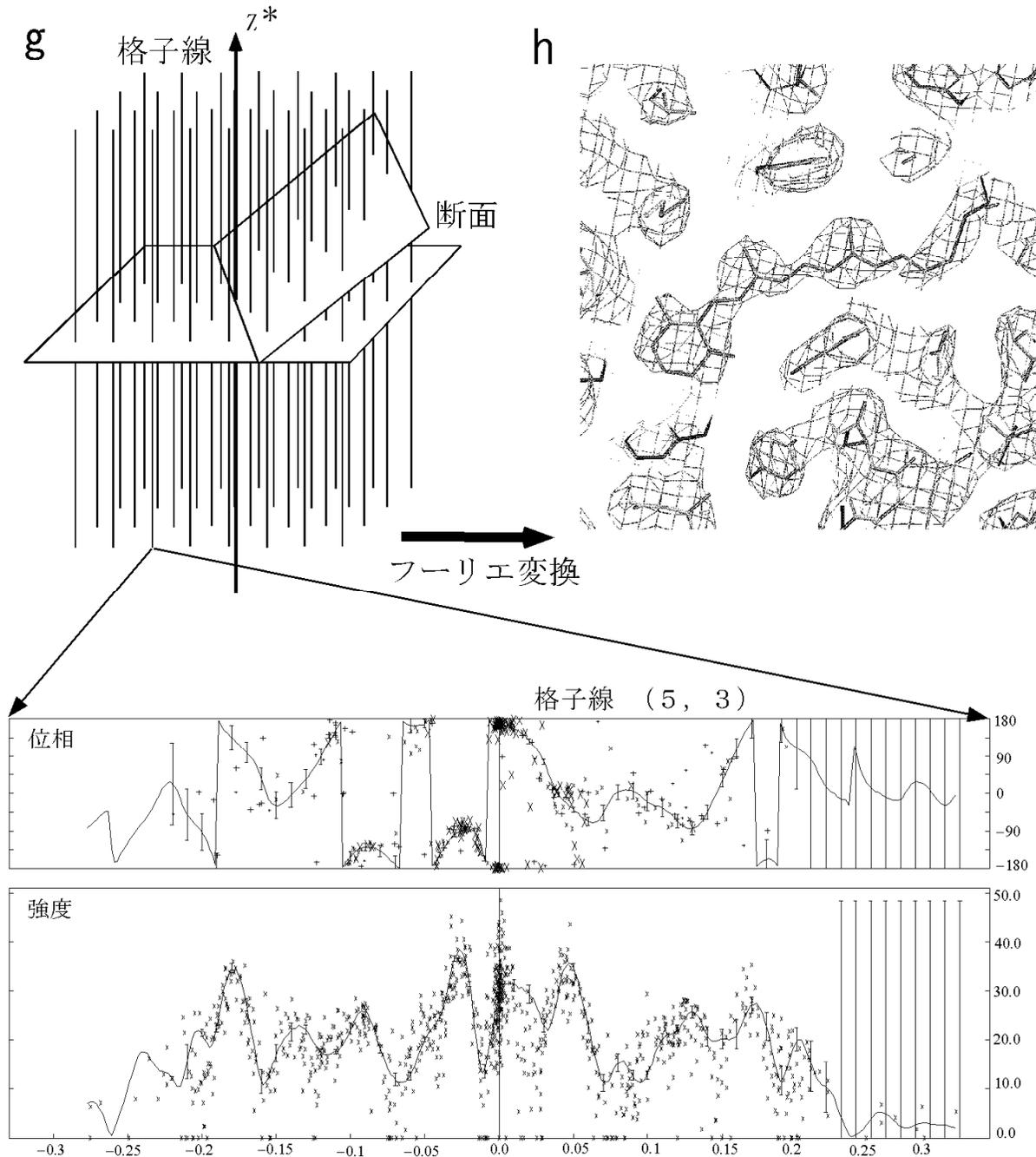


電界放射型電子銃
電子線用CCDカメラ

二次元結晶と電子回折図形



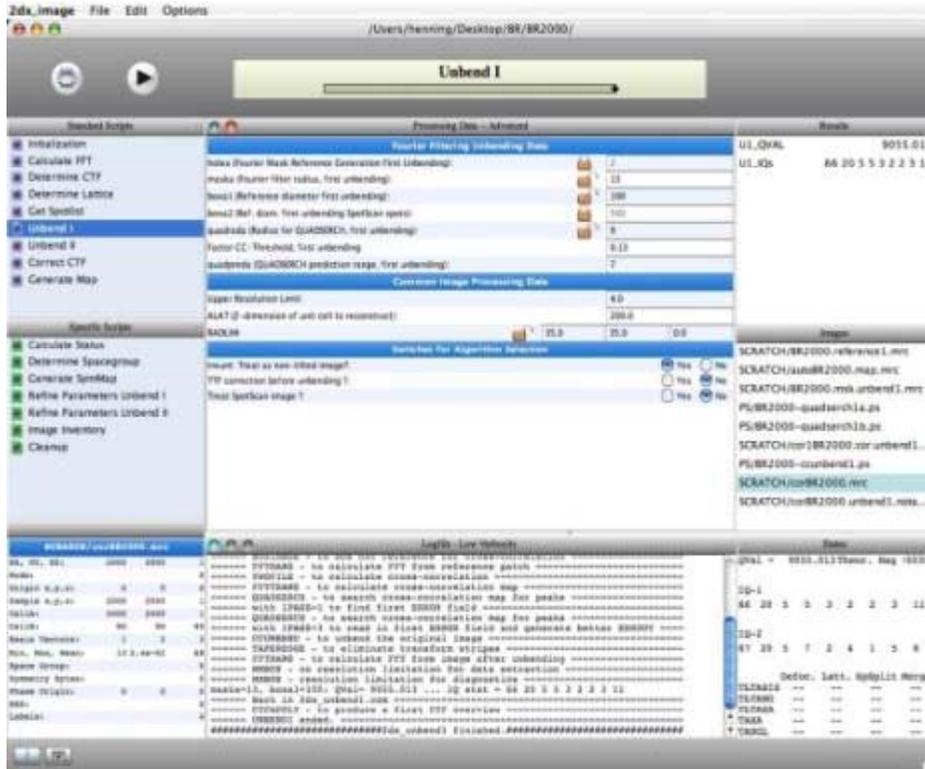
フーリエ変換と 中央断面定理



$$\begin{aligned}
 F[f(x)] &= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int f(x) e^{-ixX} dx \\
 &= F(X)
 \end{aligned}$$

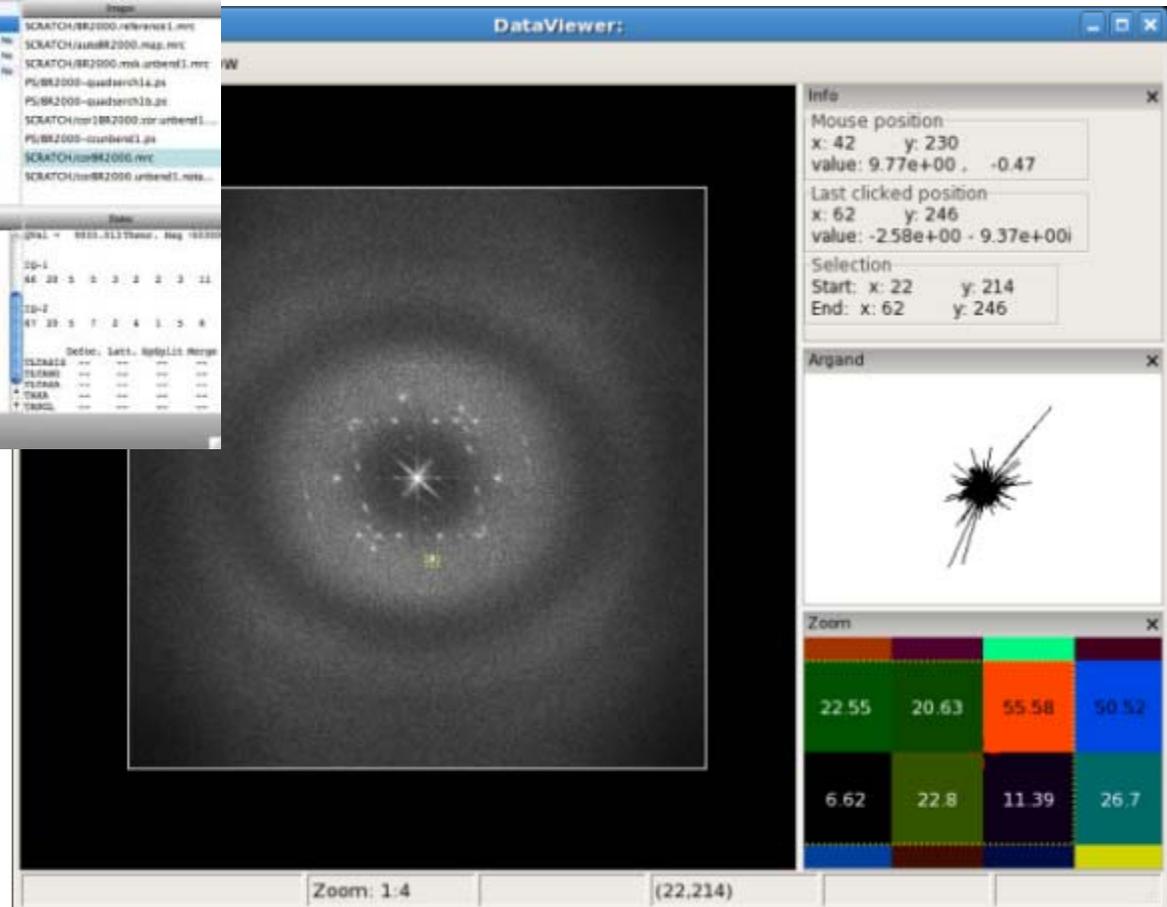
$$\begin{aligned}
 F\left[\int f(x, y, z) dz\right] \\
 = F(X, Y, 0)
 \end{aligned}$$

電子線結晶構造解析のためのプログラム



Philippsen, A., Schenk, A. D., Signorell, G. A., Mariani, V., Berneche, S., Engel, A.. (2007) *J. Struct. Biol.* **157**, 28-37.

Iplt (www.iplt.org)

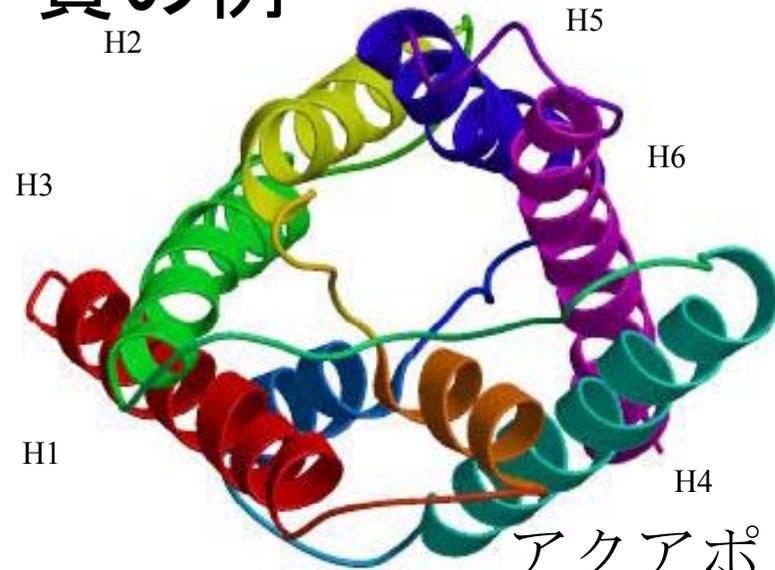
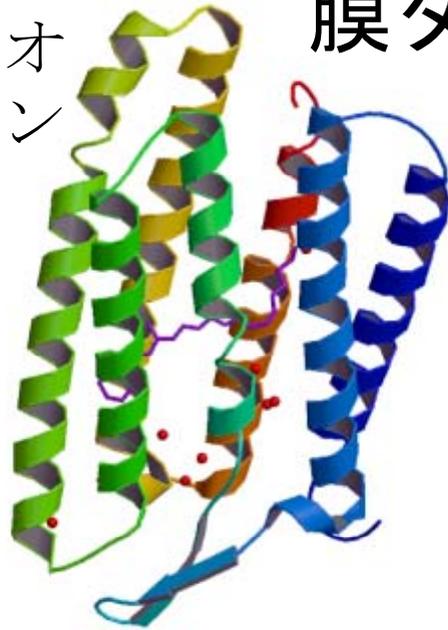


2dx (2dx.org)

Gipson, B., Zeng, X., Zhang, Z. Y., Stahlberg, H. (2007) *J. Struct. Biol.* **157**, 64-72

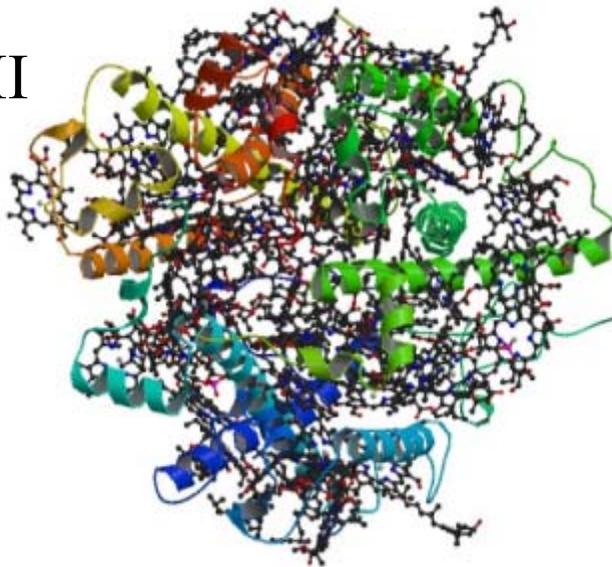
電子線結晶構造解析で原子モデルが決定された 膜タンパク質の例

バクテリオ
ロドプシン

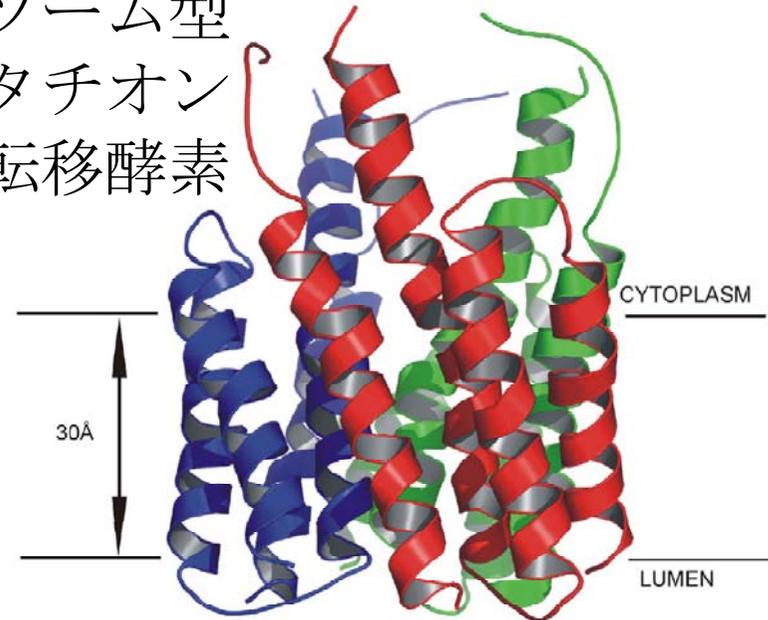


アクアポリン

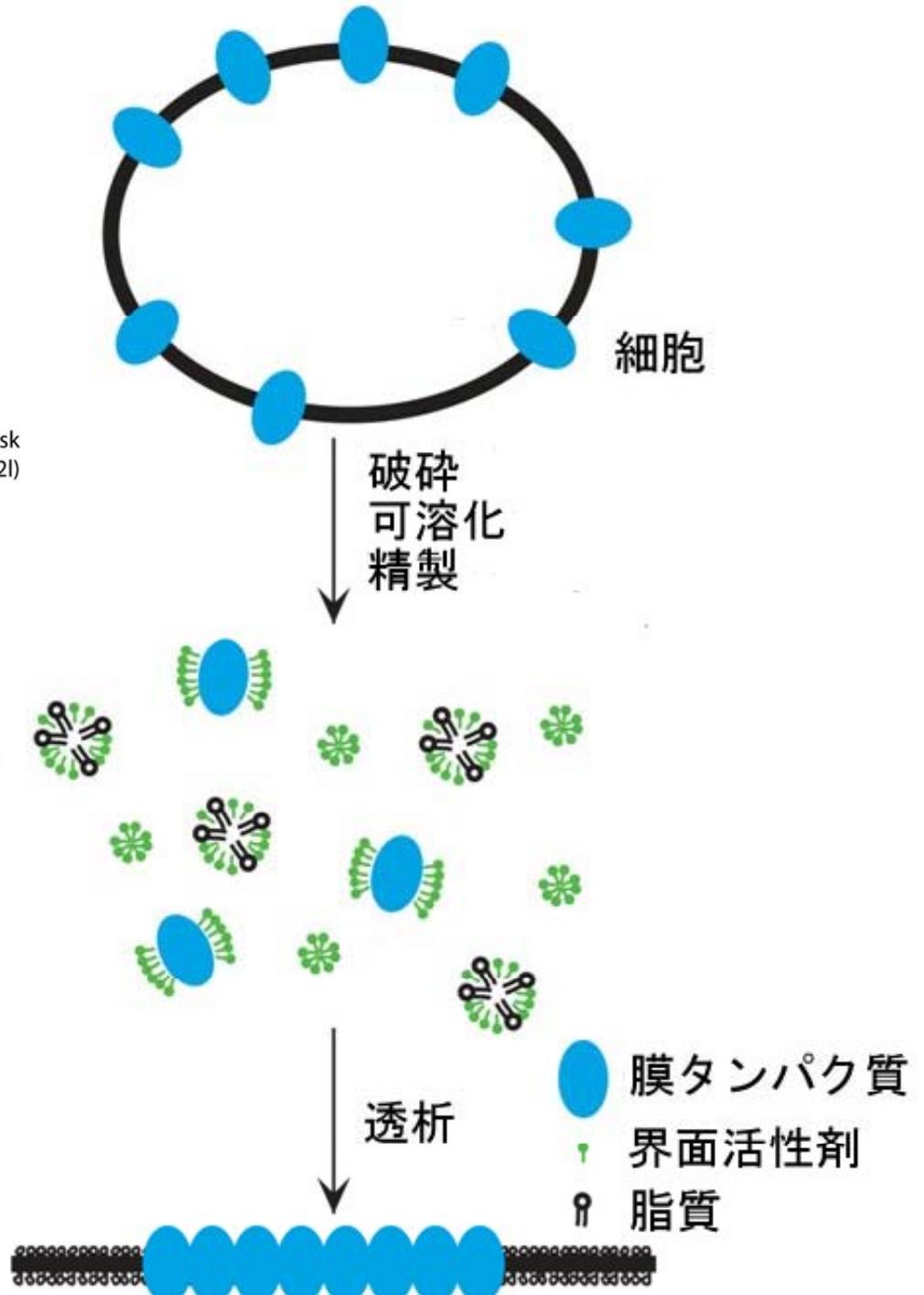
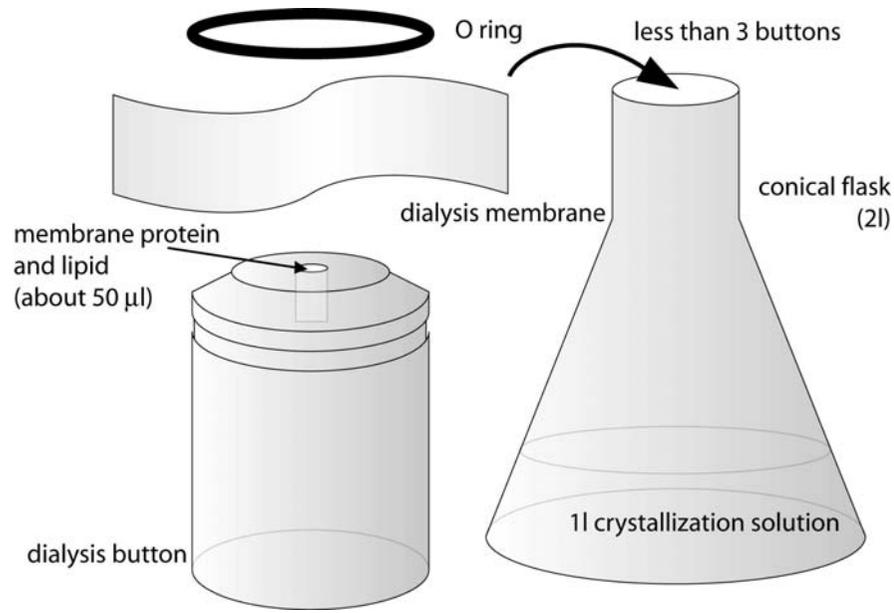
LHC-II

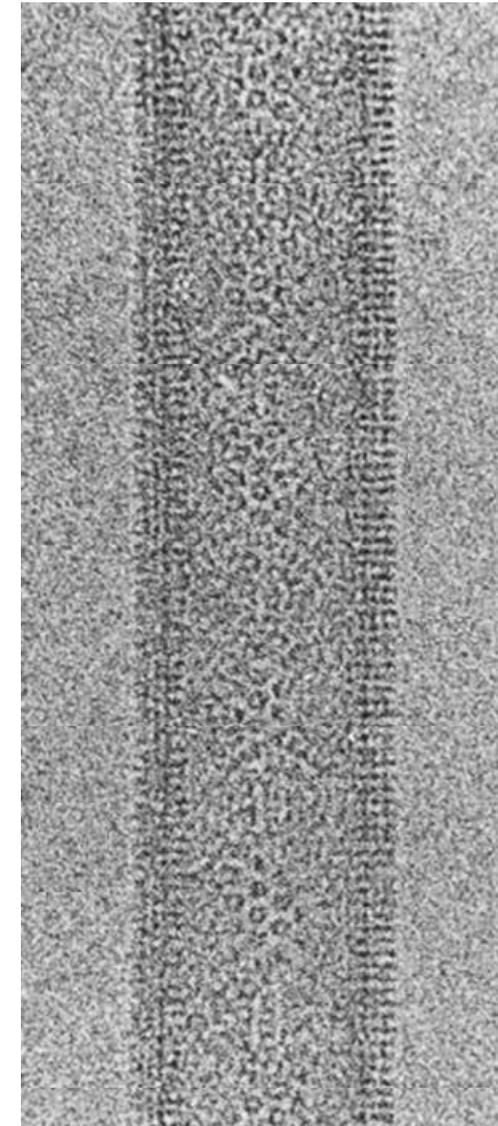
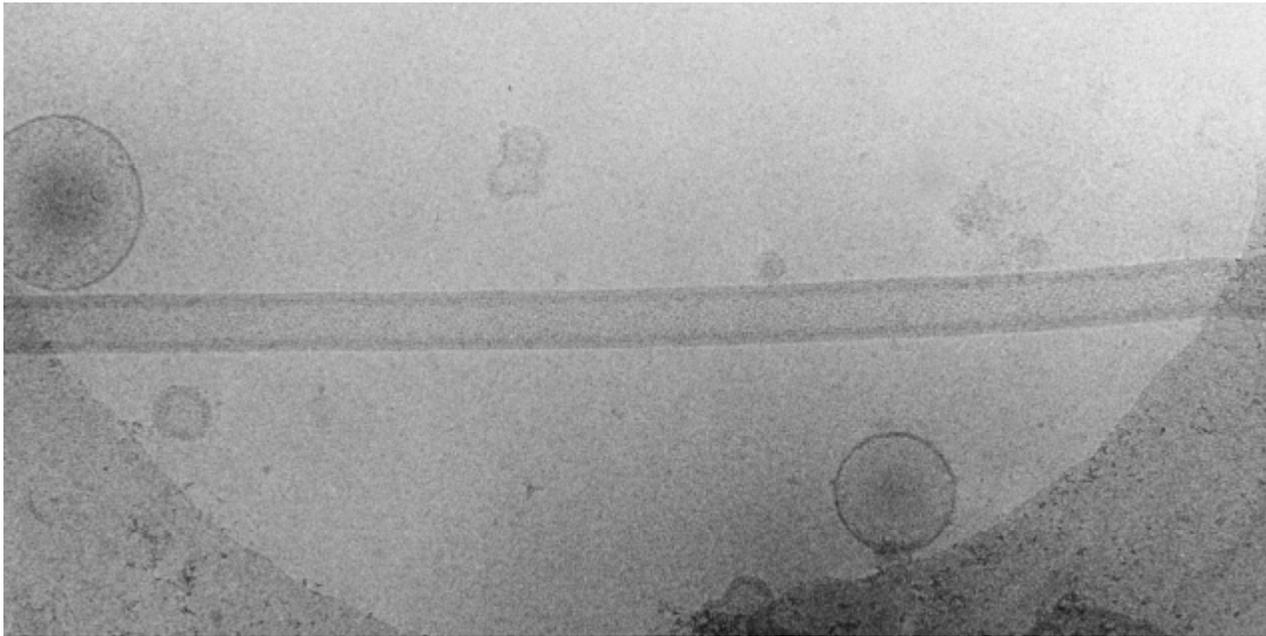


ミクロソーム型
グルタチオン
転移酵素



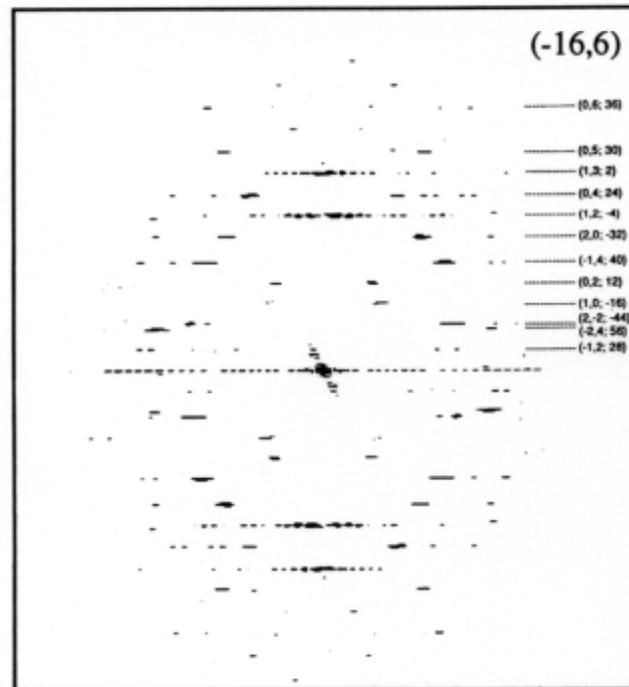
二次元結晶の作製法



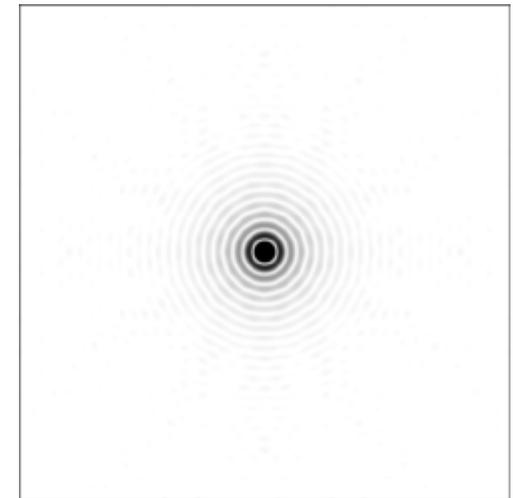
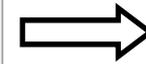
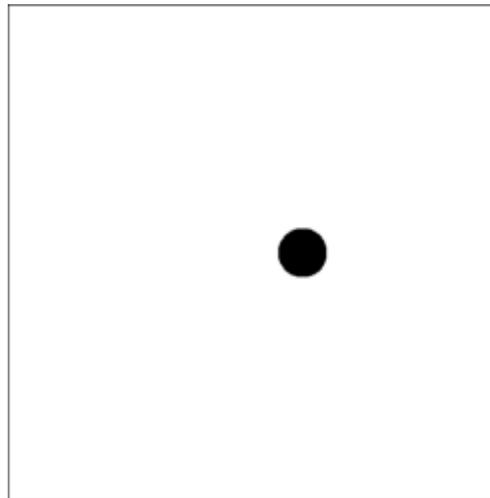
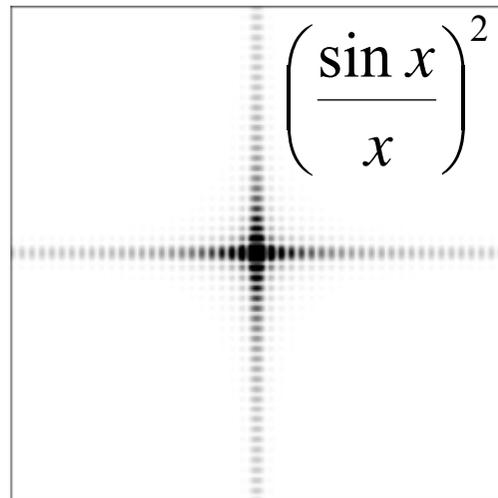
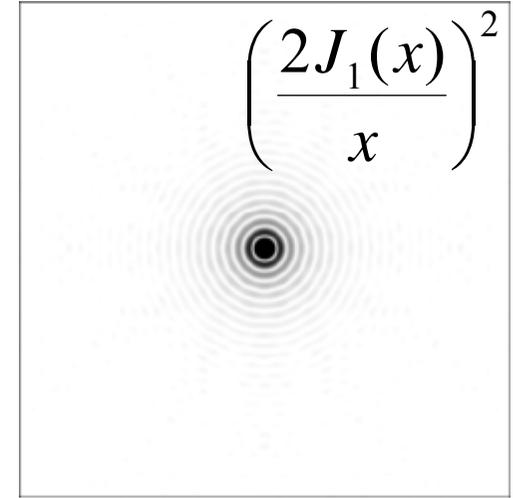
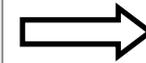
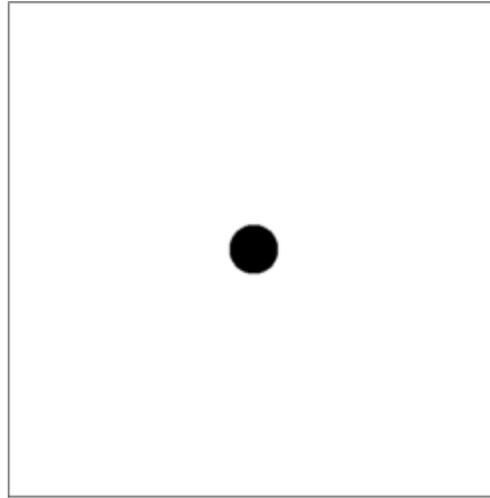
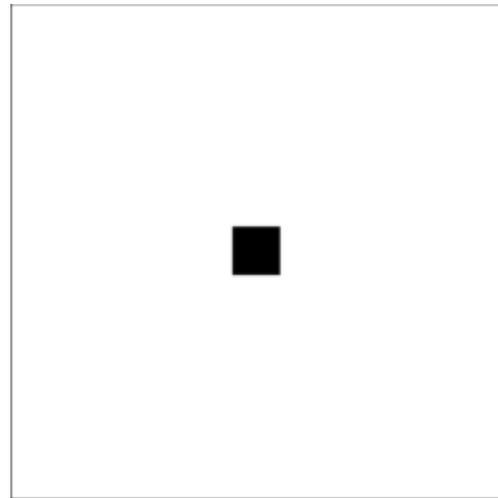


Miyazawa, A. et al. (1999)
J. Mol. Biol. **288**, 765-786.

チューブ状結晶



構造因子の強度と位相の意味



位置を変えると
位相が変化

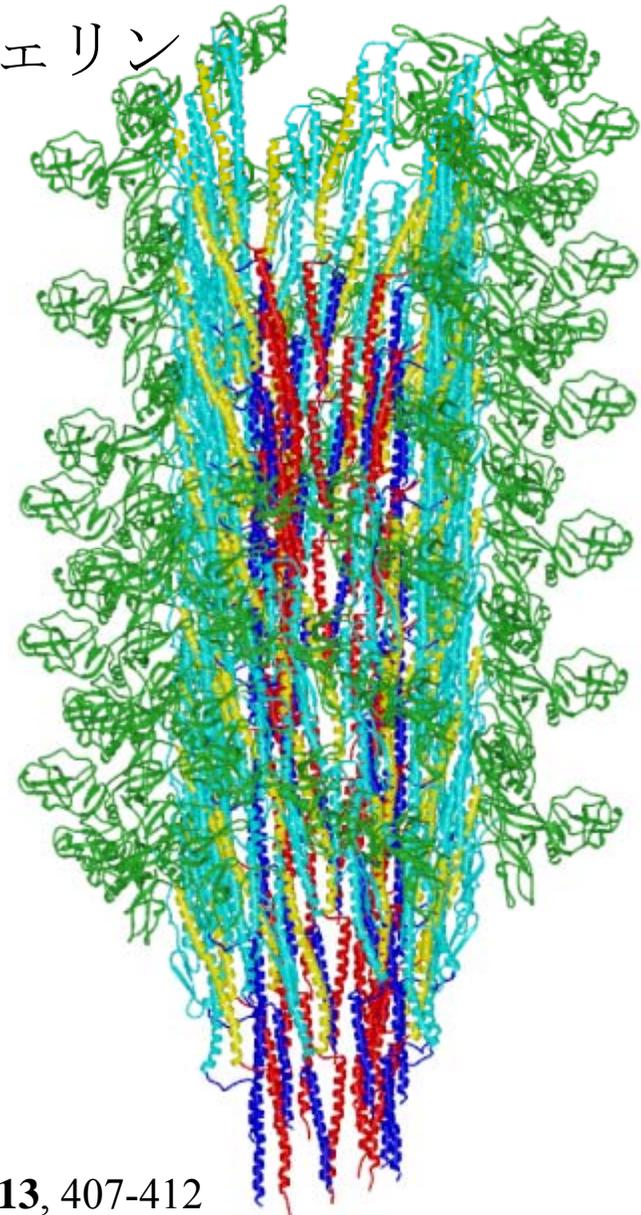
らせん再構成で原子モデルが決定された例

アセチルコリン受容体

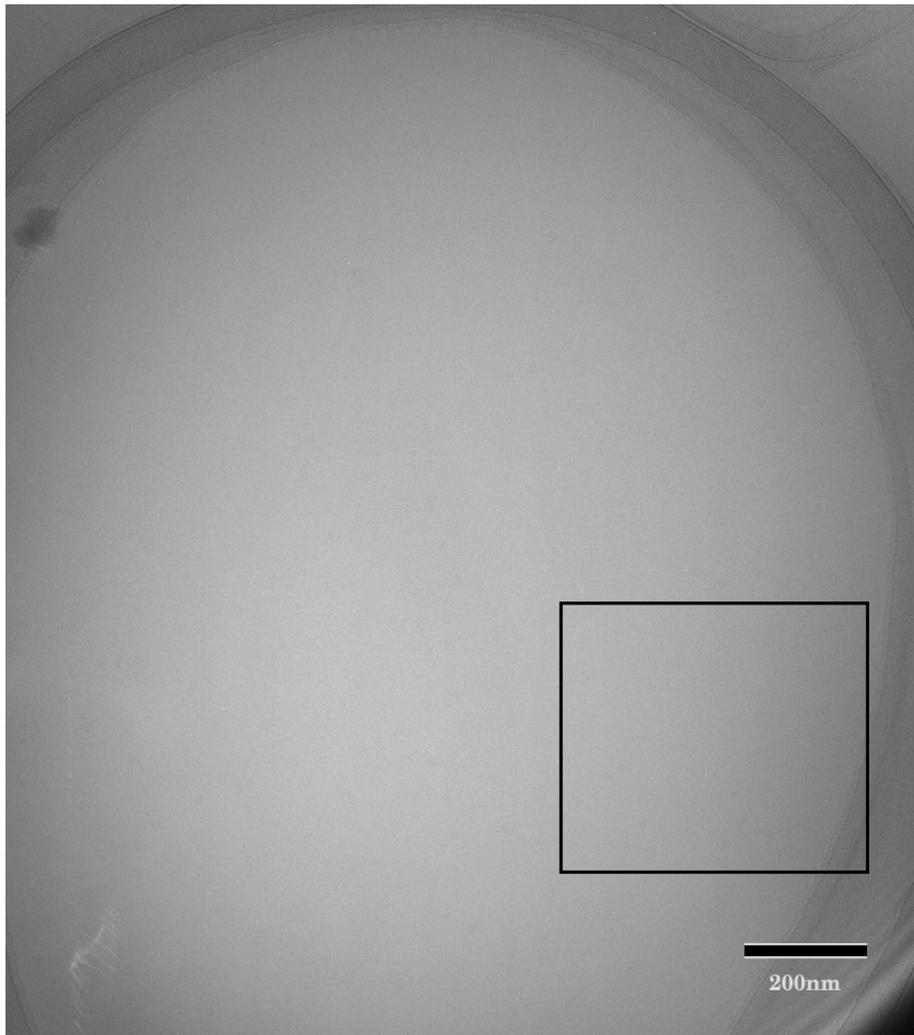
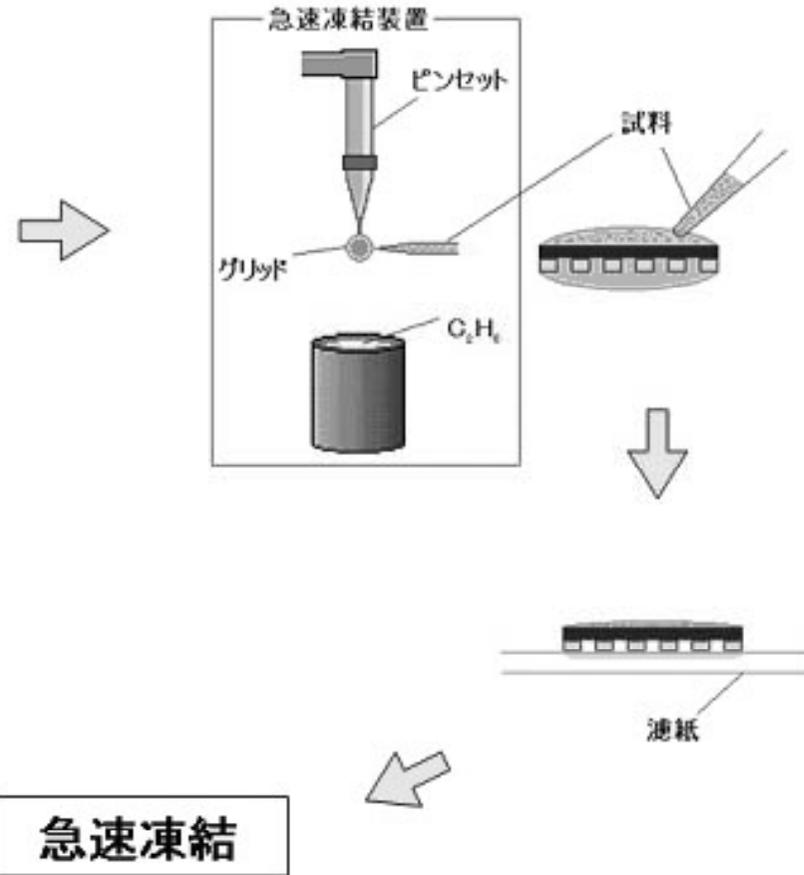


Miyazawa, A. et al. (2003) *Nature* **423**, 949-955

フラジェリン

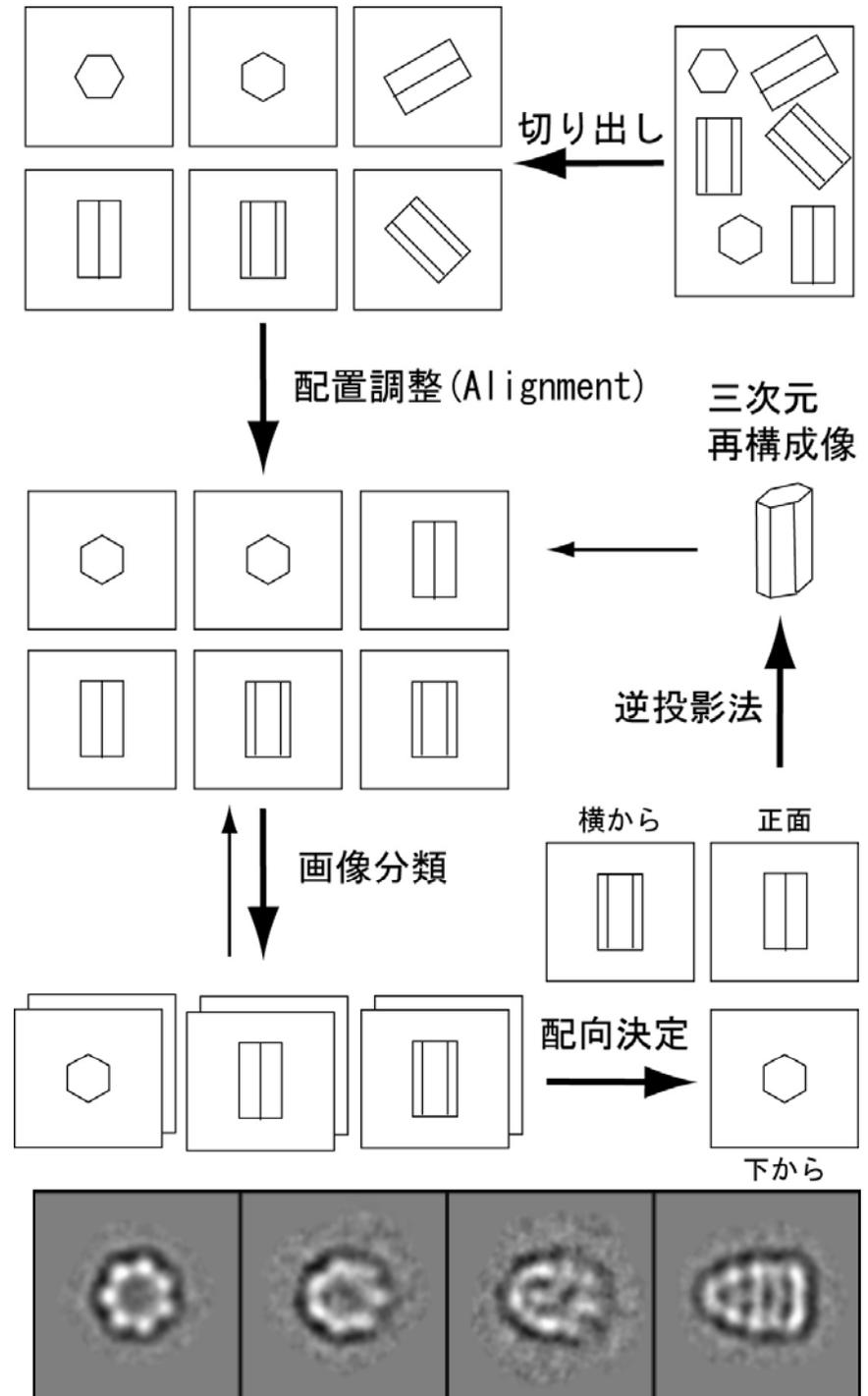
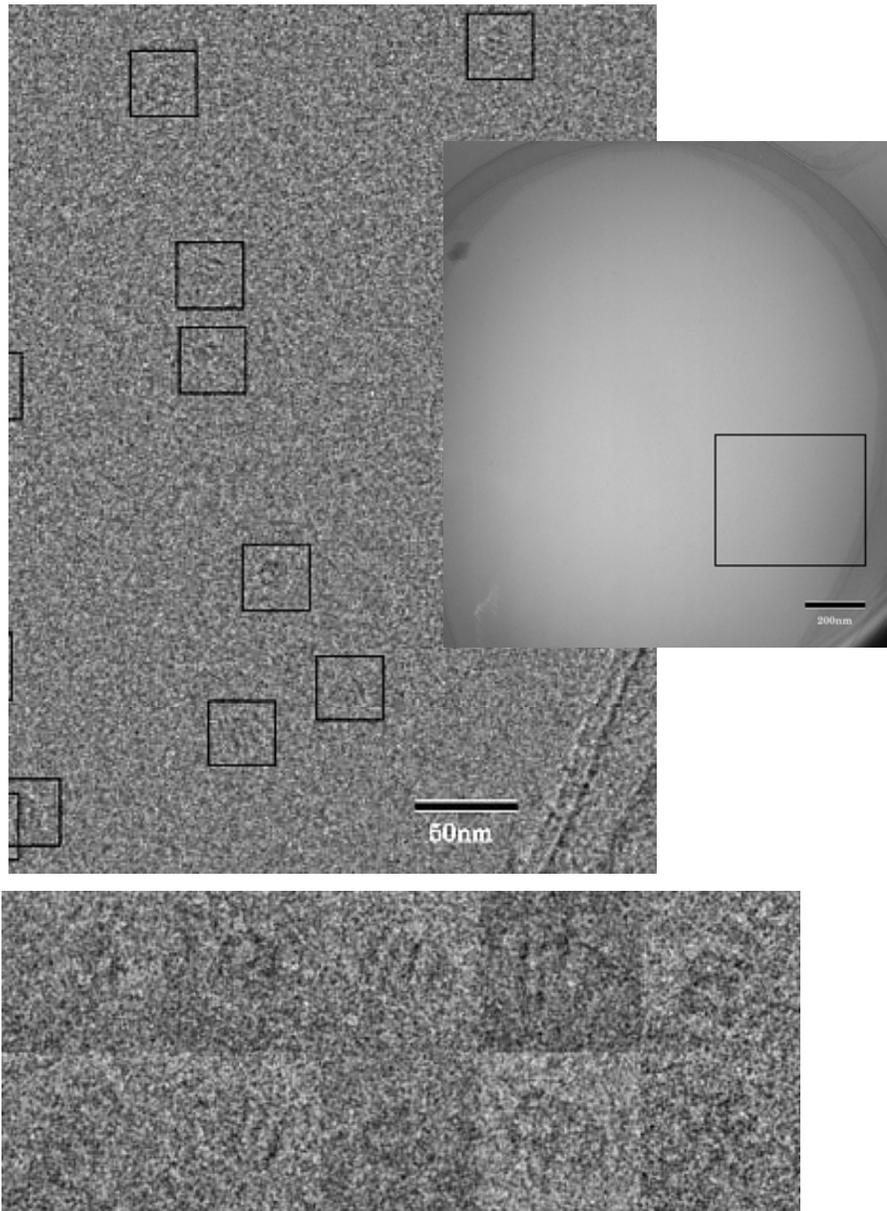


Yonekura, K. et al. (2005) *Structure* **13**, 407-412

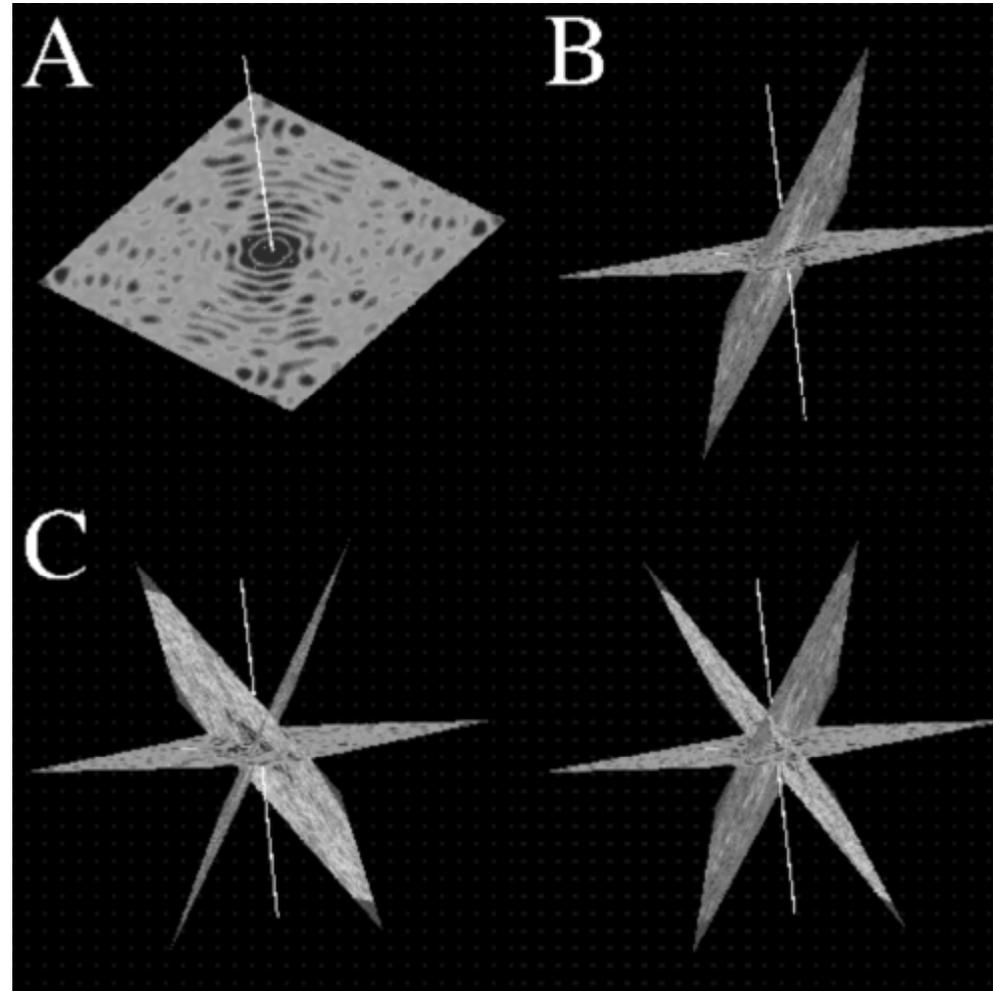
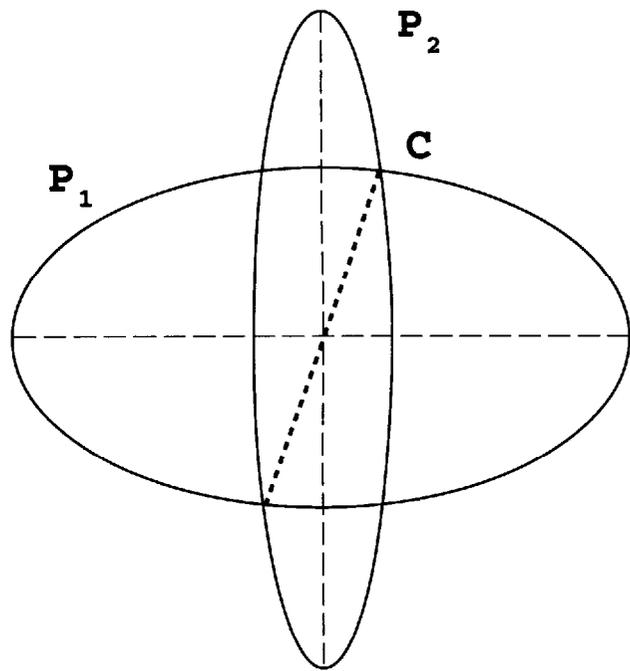


クライオグリッド ド作製

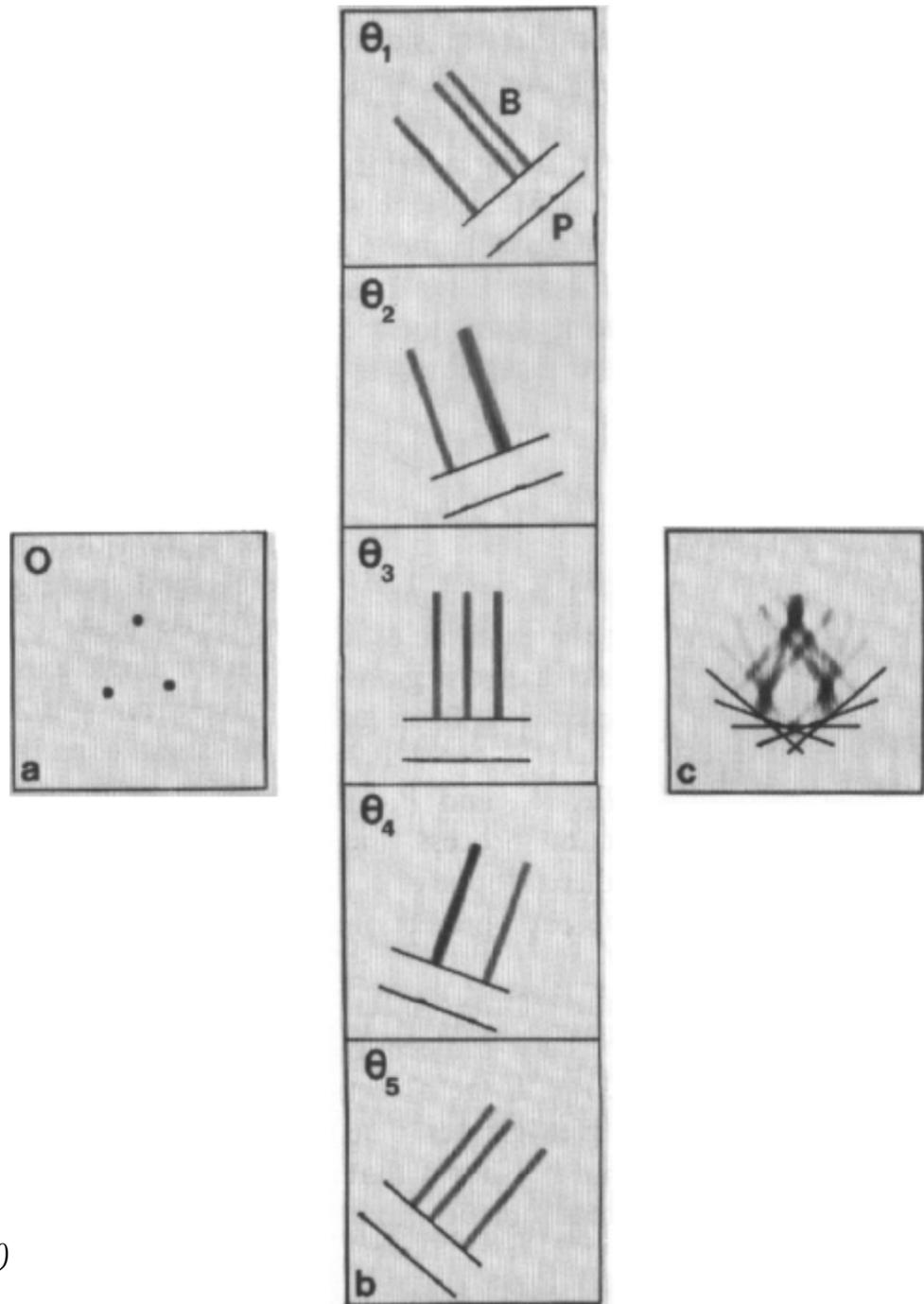
単粒子解析法



共通線検索 (Common Line Search)

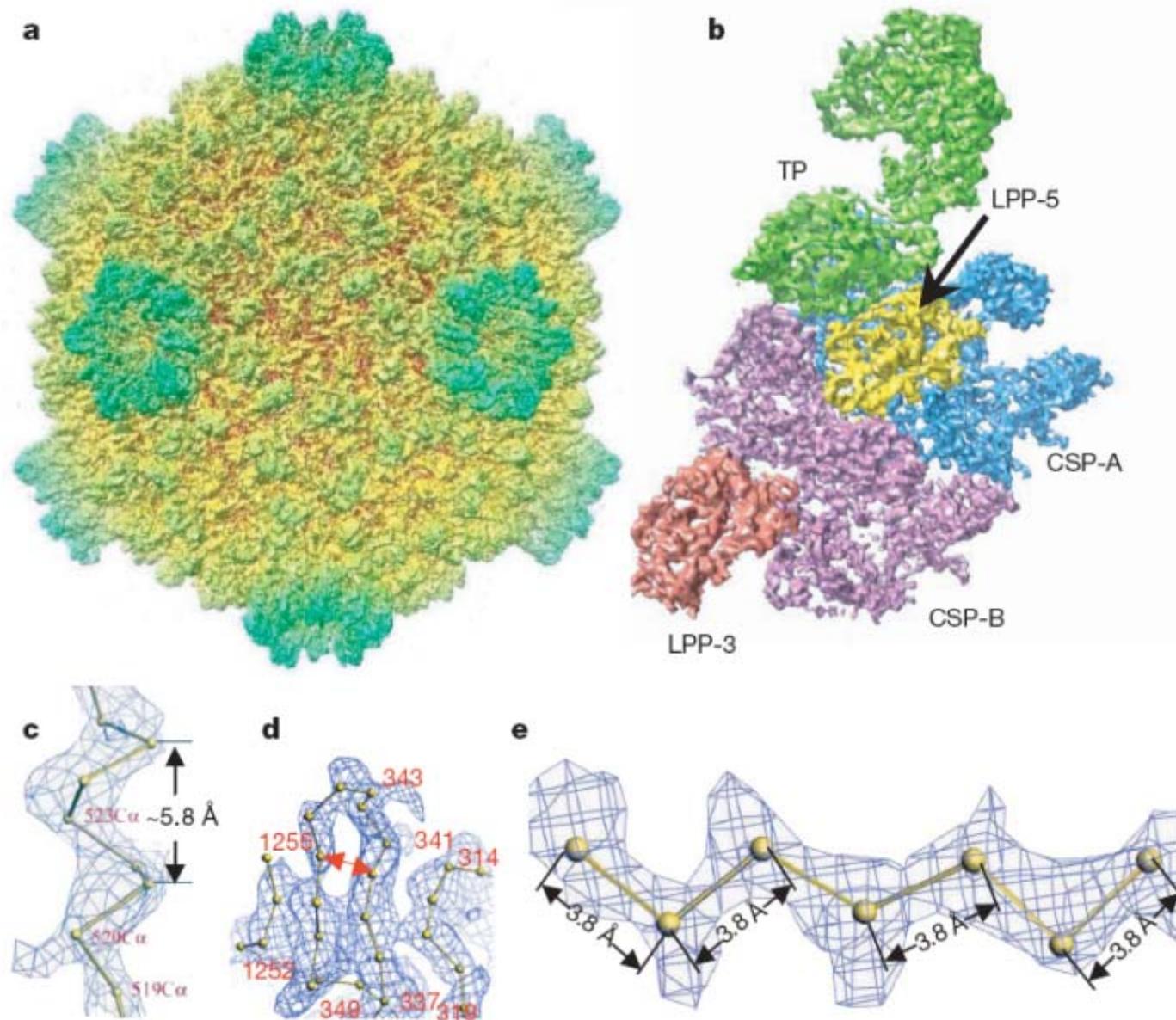


逆投影法による 三次元再構成



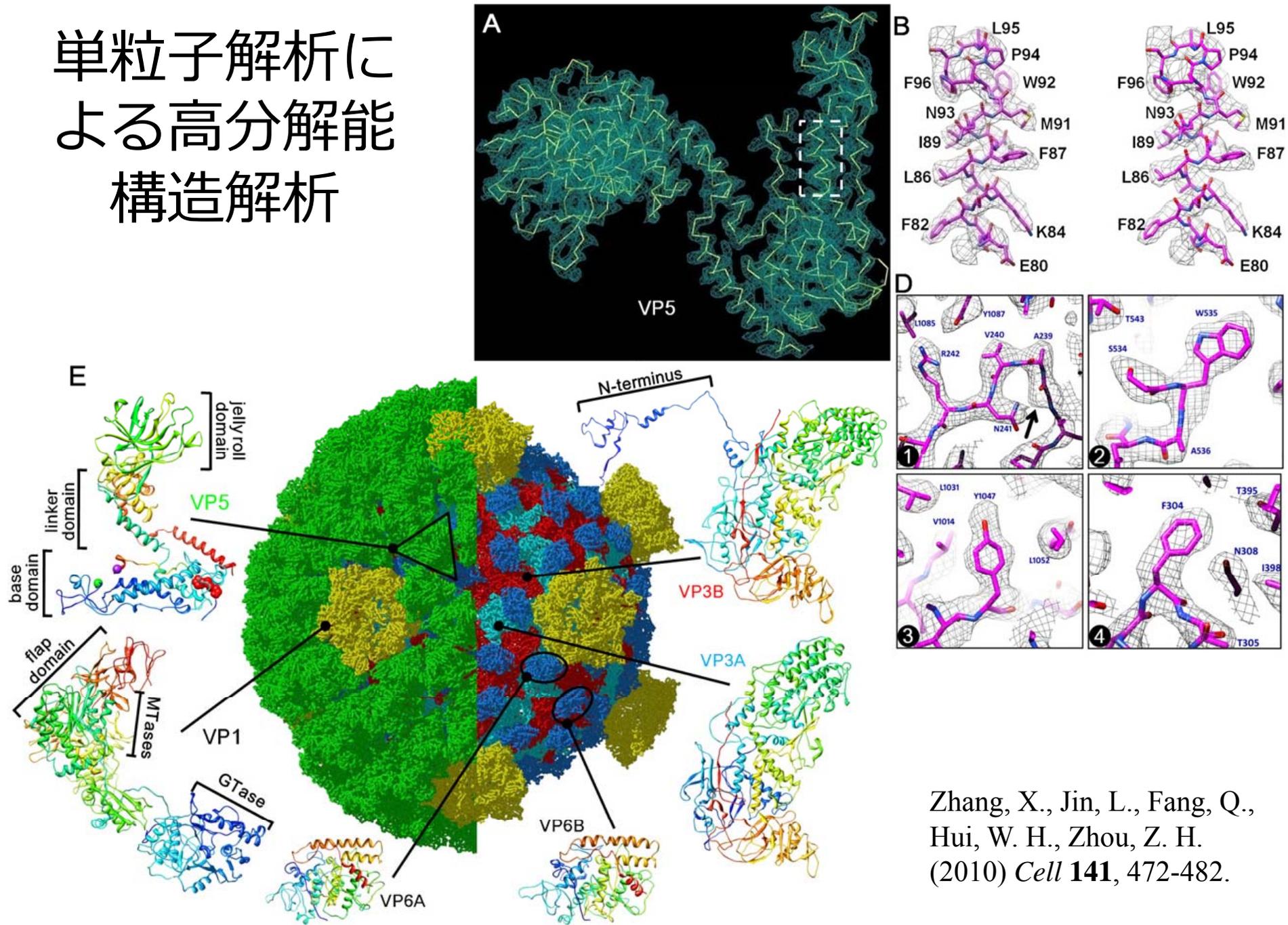
“Electron Tomography” edited by J. Frank より

単粒子解析による高分解能構造解析



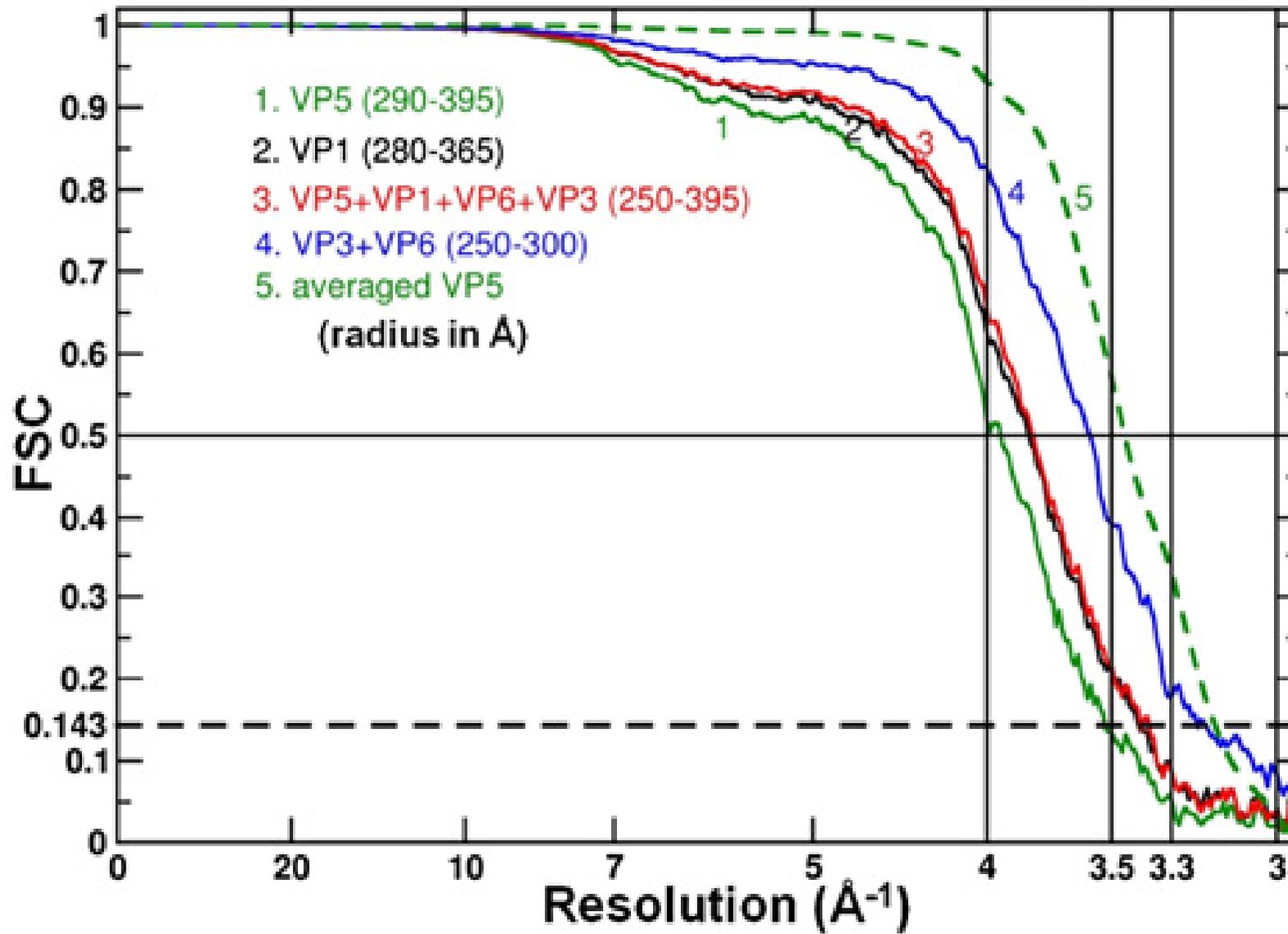
Yu, X., Jin, L., Zhou, Z. H. (2008) *Nature* 453, 415-9.

単粒子解析による高分解能構造解析

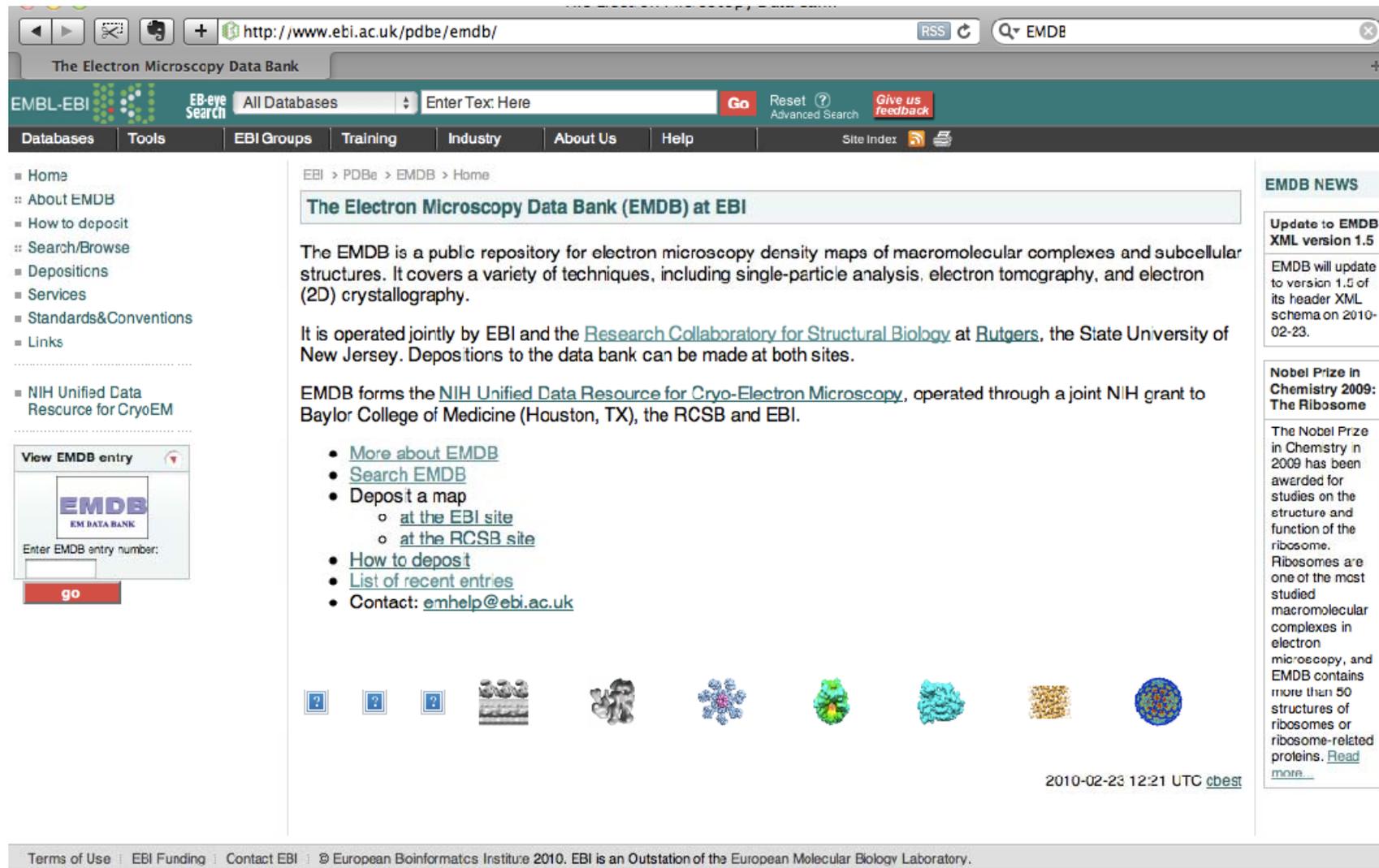


Zhang, X., Jin, L., Fang, Q., Hui, W. H., Zhou, Z. H. (2010) *Cell* **141**, 472-482.

FSC



EMデータベース



The screenshot shows the homepage of the Electron Microscopy Data Bank (EMDB) at EBI. The browser address bar shows the URL <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>. The page features a navigation menu with categories like Databases, Tools, EBI Groups, Training, Industry, About Us, and Help. A search bar is prominently displayed with the text "Enter Text: Here" and a "Go" button. The main content area is titled "The Electron Microscopy Data Bank (EMDB) at EBI" and provides a brief description of the database as a public repository for electron microscopy density maps. It also mentions that the database is operated jointly by EBI and the Research Collaboratory for Structural Biology at Rutgers. A sidebar on the left contains a "View EMDB entry" form with a search box and a "go" button. The right sidebar contains news items, including an update to EMDB XML version 1.5 and the Nobel Prize in Chemistry 2009. The footer contains terms of use, funding information, and contact details for EBI.

http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/

The Electron Microscopy Data Bank

EMBL-EBI EB-eye Search All Databases Enter Text: Here Go Reset ? Advanced Search Give us feedback

Databases Tools EBI Groups Training Industry About Us Help Site Index

Home
About EMDB
How to deposit
Search/Browse
Depositions
Services
Standards&Conventions
Links

NIH Unified Data Resource for CryoEM

View EMDB entry

EMDB EM DATA BANK

Enter EMDB entry number:

go

EBI > PDBe > EMDB > Home

The Electron Microscopy Data Bank (EMDB) at EBI

The EMDB is a public repository for electron microscopy density maps of macromolecular complexes and subcellular structures. It covers a variety of techniques, including single-particle analysis, electron tomography, and electron (2D) crystallography.

It is operated jointly by EBI and the [Research Collaboratory for Structural Biology at Rutgers](#), the State University of New Jersey. Depositions to the data bank can be made at both sites.

EMDB forms the [NIH Unified Data Resource for Cryo-Electron Microscopy](#), operated through a joint NIH grant to Baylor College of Medicine (Houston, TX), the RCSB and EBI.

- [More about EMDB](#)
- [Search EMDB](#)
- Deposit a map
 - [at the EBI site](#)
 - [at the RCSB site](#)
- [How to deposit](#)
- [List of recent entries](#)
- Contact: emhelp@ebi.ac.uk

2010-02-23 12:21 UTC [cbest](#)

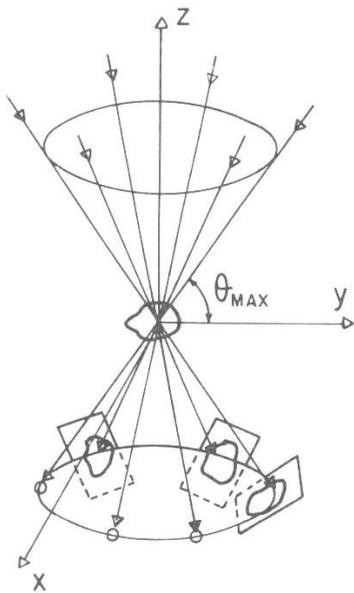
Terms of Use | EBI Funding | Contact EBI | © European Bioinformatics Institute 2010. EBI is an Outstation of the European Molecular Biology Laboratory.

単粒子解析の利点

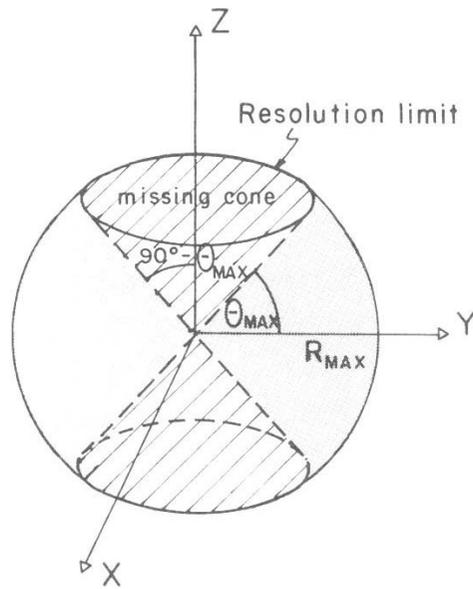
- いろいろな条件での構造を容易に得ることができる。
- あまり安定でない中間体などの構造を得ることができる。
- 構造解析の自動化に適している可能性がある。

電子線トモグラフィ とミッシングコーン

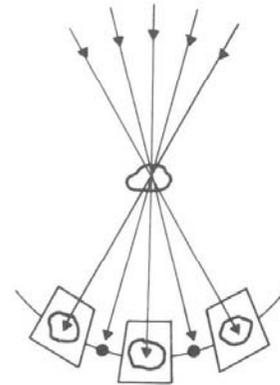
(a) Real Space



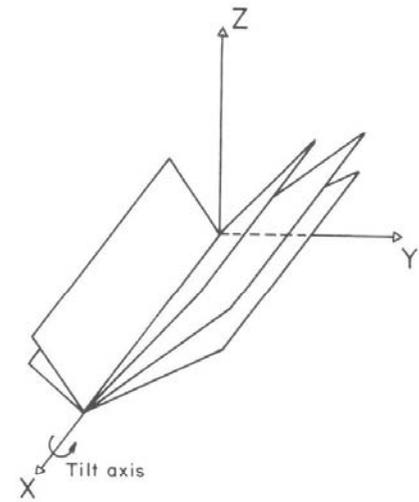
(b) Fourier Space



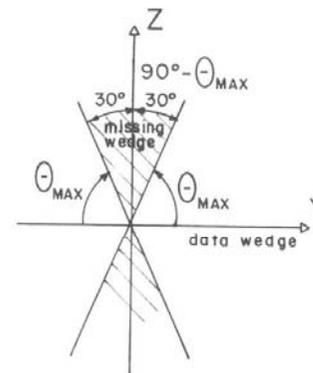
(a) Real Space



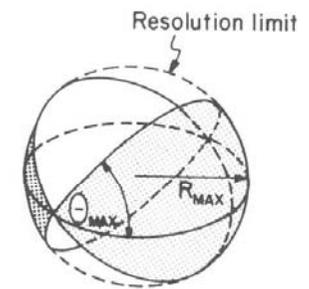
(b) Fourier Space



(c) Fourier Space



(d) Fourier Space



“Electron Tomography” edited by J. Frank より

厚さと分解能

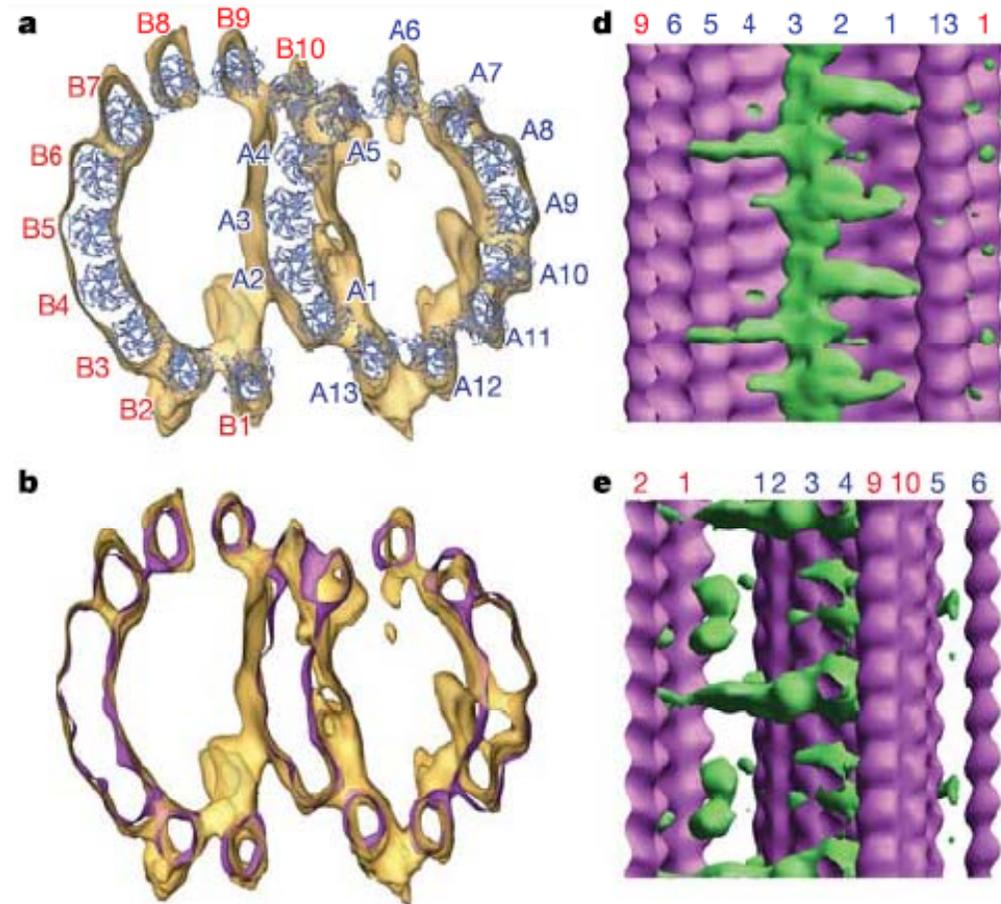
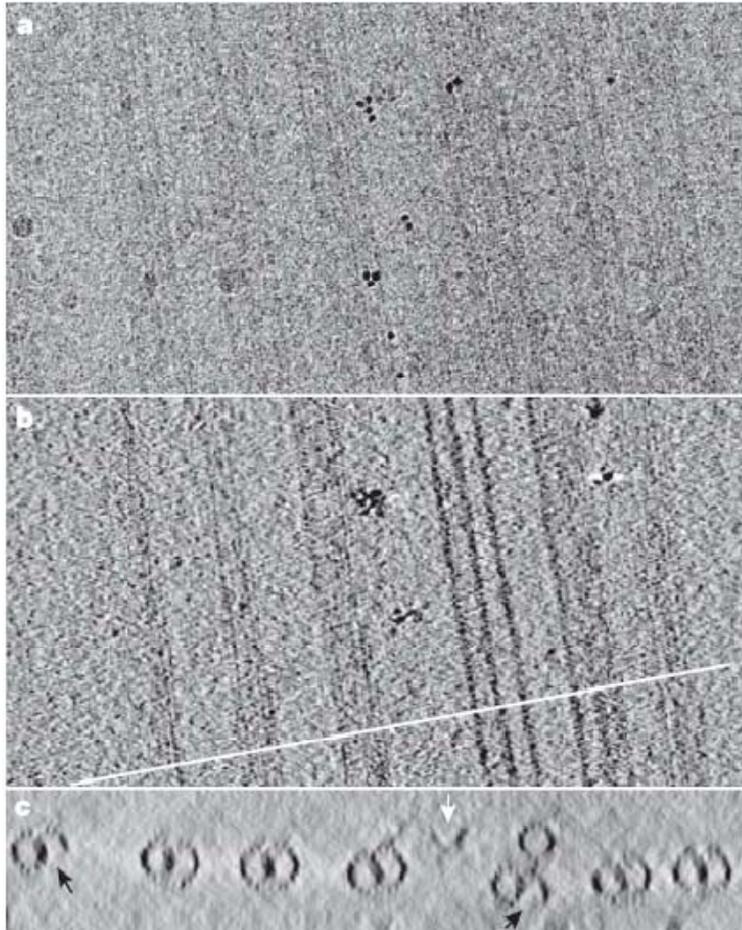
$$d = \pi \times D / N$$

Or

$$d = D \Delta\theta$$

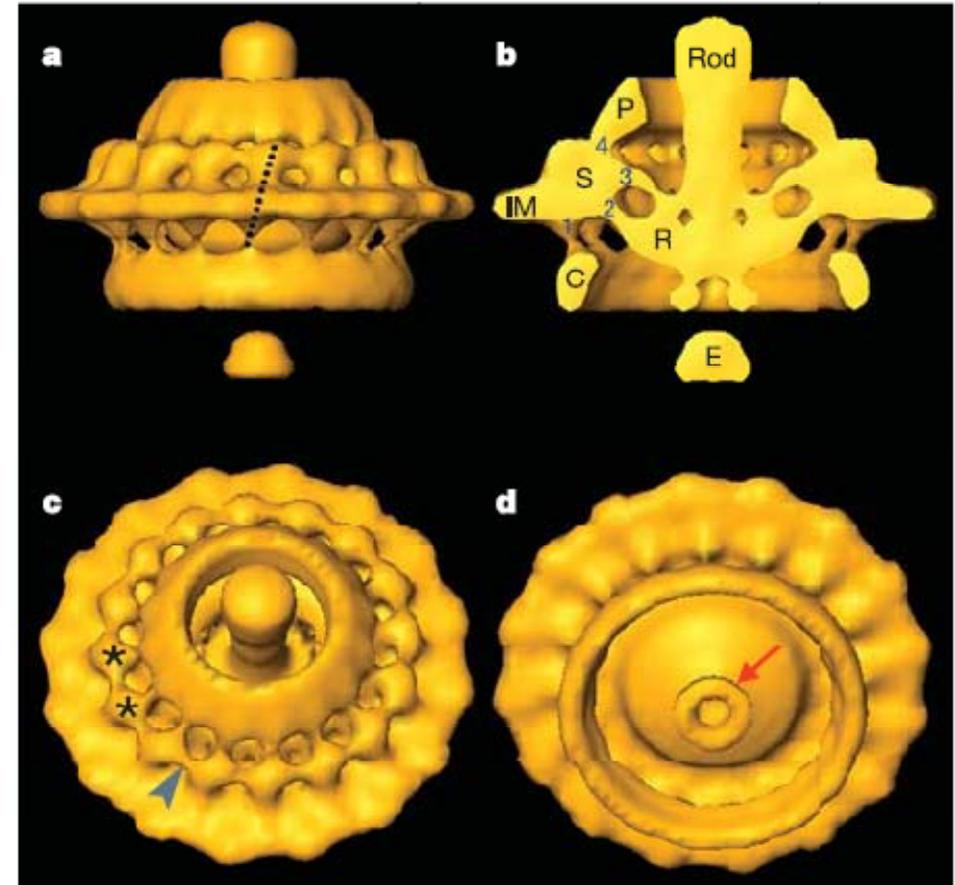
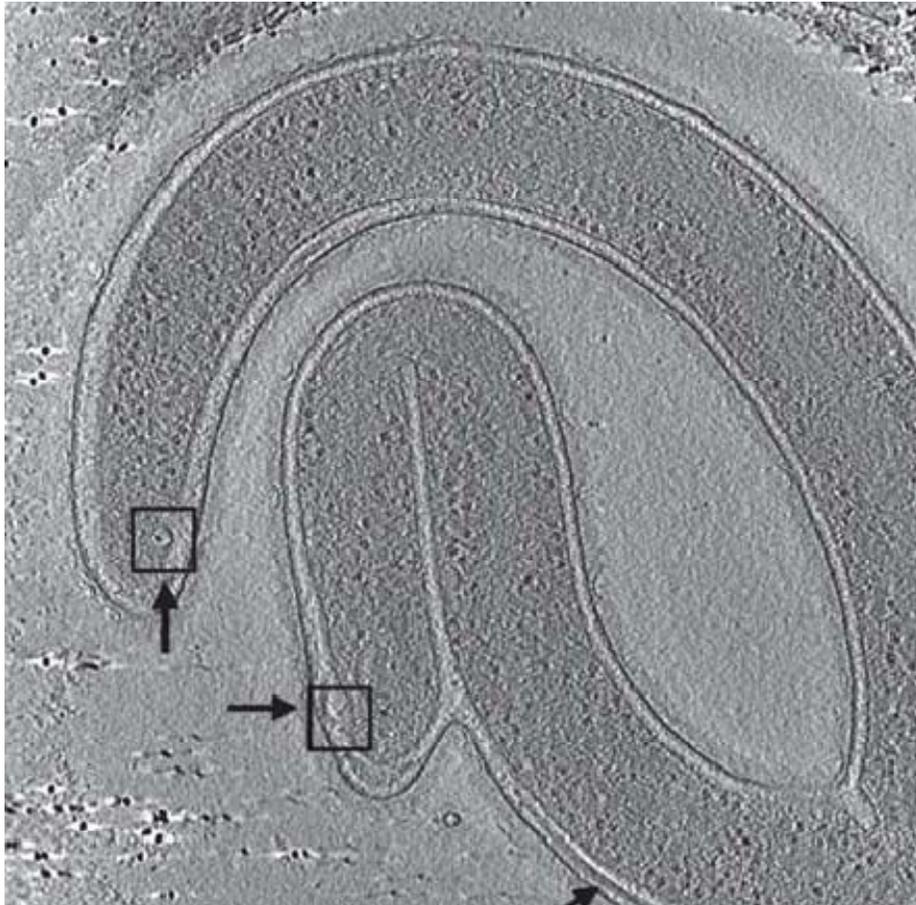
つまり、厚いと分解能が低くなる。

電子線トモグラフィーの例(1)



Sui, H., Downing, K. H. (2006) Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography *Nature* **442**, 475-478.

電子線トモグラフィーの例(2)



Murphy, G. E, Leadbetter, J. R, Jensen, G. J. (2006) In situ structure of the complete *Treponema primitia* flagellar motor. *Nature* **442**, 1062-1064.

電子線トモグラフィの利点

- 細胞中での複合体の中分解能の構造を得ることができる。
- 寿命の短い複合体などの構造も得ることができる可能性がある。
- 平均化を行わないので、構造の多様性などについても検討できる。

1. 電子線結晶構造解析による高分解能像の観察

電子線結晶構造解析により得られた rat 由来の水チャネル AQP4 の原子モデルとマップを観察し、X 線結晶構造解析で得られた bovine 由来の水チャネル AQP1 の原子モデルと比較してみる。

- ・ AQP4 の原子モデル (PDB:2ZZ9) を File / Fetch by ID... でダウンロードする。分子の中央に水が通る経路があることを確認する。また、タンパク質以外に脂質が存在することを確認する。
- ・ 次に、その 2fo- σ マップを File / Fetch by ID... で EDS からダウンロードして (ID は小文字で入力)、表示する。
- ・ 原子モデルの表示を Actions から stick モデルとして、Tools / Volume Data / Volume Viewer で適当な閾値を設定する。

課題 透過経路にある水について、そのモデルとマップが表示された図を作成し、それを File / Save Image で保存しなさい。必要なら、Favorites / Side View を利用しなさい。

- ・ 次に AQP1 の原子モデル (PDB:1J4N) をダウンロードする。必要なら Favorites / Model Panel の focus でダウンロードしたモデルを表示する。これは、三次元結晶なので、脂質でなく界面活性剤に囲まれていることを確認する。
- ・ Tools / Structure Comparison / MatchMaker を用いて、二つの原子モデルを重ね合わせて表示する。
- ・ Select / Chain と Actions / Color を用いて、二つのモデルを色分けして表示する。先ほど観察した透過経路の水の配置に違いがあるか確認する。
- ・ Tools / Sequence / Match -> Align で、二つの一次配列を比較する。そして、Favorites / Model Panel / render by attribute を用いて、異なるアミノ酸残基になっているかどうかで色分けして表示する。

課題 水透過経路に面した残基で、AQP1 と AQP4 で変化したものがあれば、その残基を列挙せよ。そして、水分子の配置と二つの水チャネルの構造について議論せよ。

2. 電子線トモグラフィーで得られたマップへの原子モデルの当てはめ

電子線トモグラフィー法で得られた HIV の spike に CD4 受容体と FAB 17b が結合したマップに、その結晶構造を当てはめてみる。

- ・ まず、File / Fetch by ID... を用いて、The Electron Microscopy Data Bank (EMDB) に登録されている spike と CD4 受容体、FAB 17b のマップ (emd_5020.map) とその脂質二重層のマップ (emd_5022.map) を表示する。
- ・ 次に、spike と CD4 受容体、FAB 17b に対応する原子モデル (PDB:1GC1) を同様に読み込み、Model Panel で原子モデルのみを Active にして、マップに合うように配置する。
- ・ Model Panel で全体を Active にして、いろいろな方向から確認しながら、原子モデル

を当てはめる。Favorites / Command Line で rainbow chain と入力すると、原子モデルを分子ごとに色分けできる。

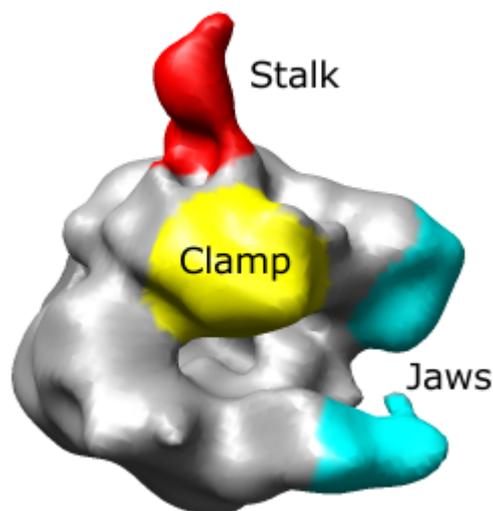
- ・ だいたい一致したら、Tools / Volume Data / Fit in Map で Fit ボタンを押して、マップに合うように原子モデルを動かす。何度か Fit ボタンを押して、それ以上、向上しないことを確認する。

課題：Fit in Map の Options を開いて、適当な分解能を設定して、原子モデルからマップを計算させて、トモグラフィーの分解能を議論せよ。また、その際の相関の値を調べよ。

3. 単粒子解析で得られた二つの立体構造の比較

単粒子解析法により得られた RNA ポリメラーゼ II の開いた構造と閉じた構造を比較して、その変化を可視化するムービーを作成する。

- ・ まず、ヒト RNA ポリメラーゼ II のマップ (emd_1283.map) を File / Fetch by ID ... を用いて表示する。
- ・ 次に、全体の構造を把握するため、右図のように、Stalk, Clamp, Jaws の部分を、それぞれ赤、黄、水色で色分けする。
- ・ この際、Volume Viewer で図のように閾値を調整する。また、向きを同じになるようにし、Volume Viewer で mesh 表示に変更する。
- ・ 色を塗りたい場所に、Tools / Volume Data / Volume Tracer で、色を決めて、マーカーを置いていく。この際、Mouse / Link new marker to selected marker をオフにしておく。Volume Tracer で Actions / Delete Markers でマーカーを取り除くこともできる。
- ・ Volume Viewer で surface 表示に戻して、Tools / Volume Data / Color Zone により、適当な範囲に色を付ける。
- ・ 次に、もう一つのマップ (emd_1284.map) を表示する。一方のマップを mesh 表示、もう一方を surface 表示にして、同程度の体積になるように閾値を変える。体積は、Tools / Volume Data / Measure Volume and Area で確認できる。
- ・ Tools / Volume Data / Morph Map を用いて、二つのマップを比較する。上で決めた二つの閾値から、Multiplier for second map の比率を計算して、play ボタンを押すと、構造が変化するムービーを作成できる。そのムービーから変化している場所を同定する。



課題 このマップに yeast の RNA ポリメラーゼ II の原子モデル (1Y1V) を重ねて、開いた構造と閉じた構造での変化について議論せよ。