

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14642

研究課題名（和文）XFEL単粒子回折画像処理と三次元生体分子構造の復元

研究課題名（英文）Image processing of the diffraction patterns and 3D reconstruction of biomolecules by XFEL single particle experiment

研究代表者

中野 美紀 (Nakano, Miki)

国立研究開発法人理化学研究所・計算科学研究センター・研究員

研究者番号：40625894

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：XFEL単粒子照射回折像に反映される試料の向きとビーム強度を反復的に推定し、3次元強度分布を組み立てる計算アルゴリズム、スライスマッチング法を開発した。本手法を用いて、分子構造を高分解能で再構成するための実験条件の推定とピニングなどの画像処理や計算パラメータの最適化、および分子サイズによる解像度依存性をシミュレーションにより評価した。さらにSACLAで実際に取得された、常温常圧溶液に保持された約50nmサイズの金ナノ粒子の回折像解析を行った。回折像の選別、3次元強度分布の推定、ノイズの除去といった一連のデータ処理により、金ナノ粒子の3次元構造を復元することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理的条件下での生体高分子の3次元構造の取得は、生命現象の理解や創薬において重要な課題である。X線自由電子レーザー（XFEL）による単粒子立体構造解析は、結晶化が難しい生体分子や生体組織を自然に近い状態で観察できる新しい構造生物学的手法として期待されている。しかし、XFELの強いビームを用いても、単粒子の生体分子から得られる回折強度は極めて弱くSN比が小さいため、回折像の分別やノイズの除去が課題であった。本研究で開発した手法を用いて、常温常圧溶液中の金微粒子の3次元構造の復元を実現できた。本研究の成果は、次のステップである常温常圧状態での生体高分子の3次元構造取得に向けての重要な一歩となる。

研究成果の概要（英文）：I have developed a computational algorithm, slice matching method, to reconstruct a 3D intensity distribution by iteratively estimating the sample orientation and beam intensity captured on the diffraction patterns obtained by XFEL single-particle experiment. Using this method, we estimated the experimental conditions for high-resolution reconstruction of molecular structures, optimized computational parameters, and evaluated the resolution dependence of molecular size through simulations.

Furthermore, we performed the analysis of the diffraction patterns of gold nanoparticles with a size of about 50 nm retained in a normal temperature and pressure solution, which were actually obtained by the XFEL experiment performed at SACLA. We succeeded in reconstructing the 3D structure of gold nanoparticles by performing a series of data processing, such as diffraction pattern selection, angle and beam intensity estimation, and noise removal.

研究分野：計算構造生物学

キーワード：X線自由電子レーザー 単粒子解析 画像解析 コヒーレントX線イメージング 位相回復 構造生物学 生物物理 コンピューターシミュレーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

X線自由電子レーザー(XFEL)による単粒子立体構造解析は、膜タンパク質や巨大複合体など、結晶化が難しい生体分子や生体組織を自然に近い状態で観察できる新しい構造生物学的手法として期待されていた。しかし、本実験で得られる回折画像は、試料に対する入射ビーム方向と回折信号の位相情報が欠落している。代表者は、これらの情報を、数値計算により反復的に推定するスライスマッチングアルゴリズムの開発に携わってきた(図1)。本手法を用いて、シミュレーションにより作成した回折画像からリボソームのような巨大生体分子立体構造の復元が可能であることを示してきた。

しかし、実際に本実験で得られる回折画像のSN比は低く、装置形状による信号欠損領域など様々なアーティファクトを含む。さらに、単粒子解析では試料に対するビームの向きだけでなく照射位置の制御も不可能であるため、試料の中心にビームが当たるとは限らない。ビーム強度そのものも一定程度の変動を含むため、測定される回折強度にはばらつきがある。このような回折画像から信頼度の高い三次元分子構造を復元するには、合理的なアルゴリズムによる回折画像の修正法が求められていた。

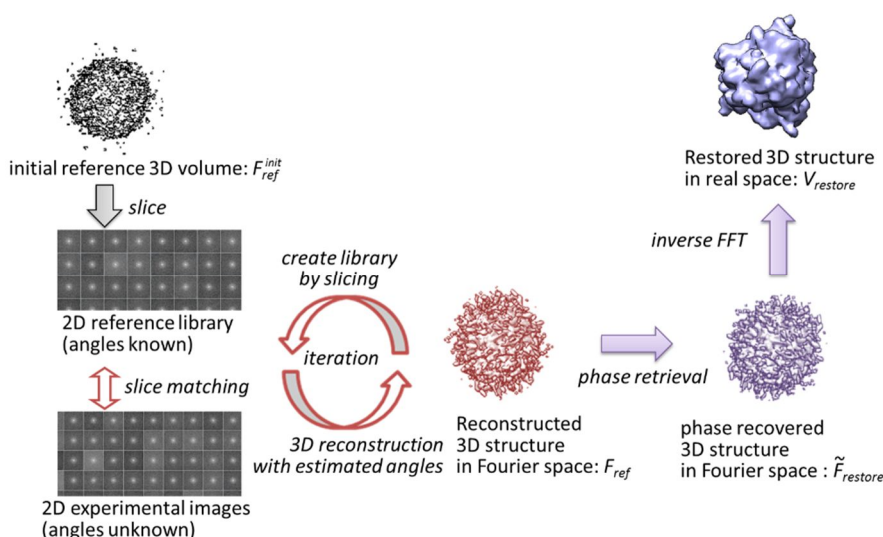


図1: スライスマッチングアルゴリズムの概要。2次元回折像を組み合わせて作成した参照3次元回折強度分布から一定の角度間隔で参照画像を切り出し、実験画像と比較する。最もパターンが一致した参照画像の角度を実験画像にあてはめ、3次元回折強度分布の構造を更新する。この手続きを反復的に繰り返すことで、尤もらしい3次元回折強度分布を作成する

## 2. 研究の目的

本研究では、ビーム強度の補正やノイズ除去を含むSN比の向上、信号欠損領域の画像の補間などにより、XFEL回折画像を処理する合理的なアルゴリズムの確立を目的とする。さらに実際にXFEL実験で得られた回折画像を用いて高解像度の生体分子立体構造の復元を目指す。

本研究では、的確なビーム入射角の推定を行うために、回折強度に注目して画像の“質”を揃え、フーリエ内挿とスライスマッチングの組み合わせにより、信号欠損領域の回折情報を回復する合理的なアルゴリズムの確立を目的とする。さらに、目的の解像度を達成するための実験条件の推定と、計算パラメータの最適化を行う。開発した技術を用いて、実際にXFEL実験で得られる回折画像より高解像度の分子立体構造復元を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) XFEL単粒子回折実験では、回折像のS/N比を高めるため、ビニングやクロッピングなどの前処理が行われる。しかし、検出器上で複数のピクセルをまとめるビニングは、波数空間内での解像度を粗くすることに相当し、ビニングによりまとめられたピクセル内の詳細情報が失われることになる。シミュレーションにより、復元構造の解像度におけるビニングの影響を確認し、最適なパラメータセットを提案する。

(2) XFEL 単粒子解析実験では、X線の強い透過力をいかして、巨大分子の内部構造を切片化などの処置なしにまるごと観察することが期待されている。本研究では、XFEL 単粒子解析により復元された構造の解像度が同じ実験条件で分子サイズにどのように依存するかを明らかにする。

(3) 実際の XFEL 単粒子実験で得られた回折データから、スライスマッチング法を用いて試料分子の3次元構造の復元を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) 復元構造の解像度におけるピニングの効果を知るため、シミュレーションにより作成したリボソームの二次元回折像から三次元回折強度分布を組み立てるための最適なパラメータセットの調査を行った。その結果、位相回復法によって復元された分子構造の解像度は、補間パラメータには敏感であるが、ピニングステップサイズによる影響は小さいことが判明した。波数空間内での三次元回折強度分布構築に最適なパラメータセットを使用すると、ピニングステップサイズは線形オーバーサンプリング比 4 に相当するサイズで十分であることを示した。ピニングは SN 比を高める有効な手段であるとともに、画像解析における計算時間の大幅な短縮にも貢献する。本成果により、実験と計算の負担をピニングにより軽減できることが示された。M. Nakano, O. Miyashita, and F. Tama, "Parameter optimization for 3D reconstruction from XFEL diffraction patterns based on Fourier slice matching," *Biophys. Physicobiol.* 16, 367-376 (2019)

(2) 非対称構造を持つ約 20nm から 120nm までのサイズの異なる 5 つの生体分子を選択し、XFEL 単粒子解析により復元された構造の解像度が同じ実験条件で分子サイズにどのように依存するかをシミュレーションを用いて検証した。その結果、大きな分子は小さい分子に比べ、分子サイズに対して相対的に高い解像度で分子構造を復元できるが、絶対的な高解像度の達成は困難であることが示された。

M. Nakano, O. Miyashita, and F. Tama, "Molecular size dependence on achievable resolution from XFEL single-particle 3D reconstruction," *Struct. Dyn.* 10, 024101 (2023)

(3) XFEL による溶液中の微小試料の3次元観察の実証を目指し、常温常圧の溶液中に保持された、約 50nm サイズの金ナノ粒子の構造解析に取り組んだ。XFEL 照射実験は、北海道大学西野吉則教授のグループによって SACLA で行われた。試料にビームが当たったパターンの選別、3次元強度分布の推定、試料以外からのノイズの除去といった一連のデータ処理により、金ナノ粒子の3次元構造を復元することに成功した(図2)。本研究は XFEL を用いた生理条件下での生体分子の3次元構造の観察に向けての重要な一歩と位置付けられる。

M. Nakano, O. Miyashita, and F. Tama, et al., "Three-dimensional structure determination of gold nanotriangles in solution using X-ray free-electron laser single-particle analysis," *Optica* 9, 776 (2022)

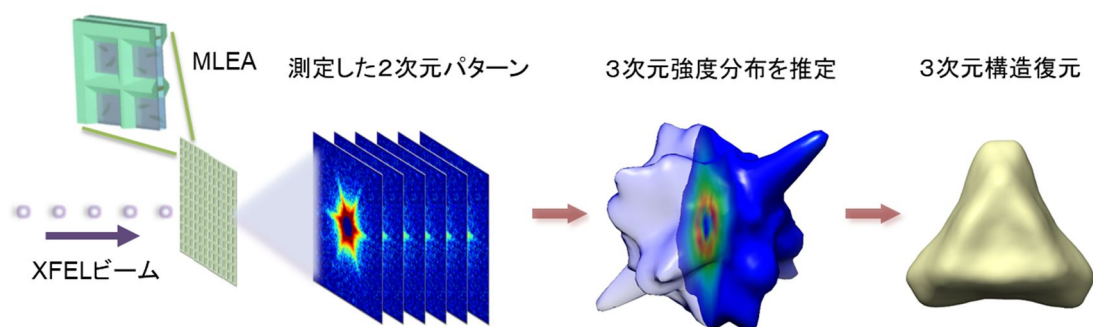


図2：金ナノ粒子の XFEL 測定データからの3次元構造復元プロセス

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita and Florence Tama	4. 巻 16
2. 論文標題 Parameter optimization for 3D-reconstruction from XFEL diffraction patterns based on Fourier slice matching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 367-376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.16.0_367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Yasumasa Joti, Akihiro Suzuki, Hideyuki Mitomo, Yoshiya Niida, Ying Yang, Hirokatsu Yumoto, Takahisa Koyama, Kensuke Tono, Haruhiko Ohashi, Makina Yabashi, Tetsuya Ishikawa, Yoshitaka Bessho, Kuniharu Ijiro, Yoshinori Nishino, and Florence Tama	4. 巻 9
2. 論文標題 Three-dimensional structure determination of gold nanotriangles in solution using X-ray free-electron laser single-particle analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optica	6. 最初と最後の頁 776-784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OPTICA.457352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita and Florence Tama	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular size dependence on achievable resolution from XFEL single-particle 3D reconstruction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 24101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/4.0000175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中野美紀, 宮下治, 城地保昌, 鈴木明大, 西野吉則, Florence Tama
2. 発表標題 X線自由電子レーザー単粒子解析を使用した 溶液中の金ナノ粒子の三次元構造決定
3. 学会等名 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita and Florence Tama
2. 発表標題 Molecular size effect on the single-particle 3D structure reconstruction analysis using X-ray free electron laser
3. 学会等名 The 4th R-CCS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miki Nakano, Tama Florence, Miyashita Osamu
2. 発表標題 Simulation study of three dimensional reconstruction of ribosome from X-ray free electron laser diffraction patterns
3. 学会等名 20th Annual Meeting of the Protein Society Meeting of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Nakano, Tama Florence, Miyashita Osamu
2. 発表標題 Requirement for 3D-reconstruction of biomolecule structure from single particle analysis using X-ray free electron laser diffraction images
3. 学会等名 The 3rd R-CCS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Florence Tama
2. 発表標題 Effect of binning size of XFEL diffraction patterns on the resolution of reconstructed 3D-molecular structure
3. 学会等名 Chem-Bio Informatics Society(CBI) Annual Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Florence Tama
2. 発表標題 シミュレーションデータによるX線自由電子レーザー回折像からの生体分子三次元構造の復元手法の検討
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Florence Tama
2. 発表標題 Simulation study of 3D-reconstruction of biomolecule structure from X-ray free electron laser diffraction images
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Florence Tama
2. 発表標題 XFEL単粒子解析による分子復元構造への回折パターンサイズの影響
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Slavica Jonic, and Florence Tama
2. 発表標題 Quantitative evaluation of the diffraction images for single particle analysis by X-ray free electron laser experiment
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Slavica Jonic, and Florence Tama
2. 発表標題 Simulation study of 3D-reconstruction of large biomolecule from the diffraction images obtained by X-ray free electron laser experiment
3. 学会等名 Chem-Bio Informatics Society(CBI) Annual Meeting 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Slavica Jonic, and Florence Tama
2. 発表標題 シミュレーションによるX線自由電子レーザー実験回折像からの巨大生体分子三次元構造再構築の定量的解析
3. 学会等名 第74回日本物理学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita, Florence Tama
2. 発表標題 Simulation study of tree dimensional reconstruction of ribosome from Xray free electron laser diffraction patterns
3. 学会等名 第20 回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Nakano, Osamu Miyashita and Florence Tama
2. 発表標題 Molecular size effect on the single-particle analysis using X-ray free electron laser
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野美紀, 宮下治, Florence Tama
2. 発表標題 XFELを用いた単粒子解析で復元された 分子構造の解像度における分サイズの影響
3. 学会等名 第36回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所計算科学研究センター 計算構造生物学研究チーム <a href="https://www.r-ccs.riken.jp/jp/overview/lab/csbru.html">https://www.r-ccs.riken.jp/jp/overview/lab/csbru.html</a> 計算構造生物学研究チーム   理化学研究所 計算科学研究センター (R-CCS) <a href="https://www.r-ccs.riken.jp/jp/overview/lab/csbru.html">https://www.r-ccs.riken.jp/jp/overview/lab/csbru.html</a> Computational Structural Biology Research Team <a href="https://www.r-ccs.riken.jp/en/overview/researchdiv/computational-structural-biology-research-team">https://www.r-ccs.riken.jp/en/overview/researchdiv/computational-structural-biology-research-team</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------