

# 1<sup>st</sup> ICSB Training Weekend

## on Single Particle Analysis

日時：2026年 5月29日（金）、30日（土）

場所：岡山大学津島キャンパス

共創イノベーションラボ棟（KIBIVOVE）

5階 コネクトスタジオ

内容：単粒子解析法のハンズオントレーニング



岡山大学異分野基礎科学研究所  
国際構造生物学研究センター

International Center for Structural Biology  
Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

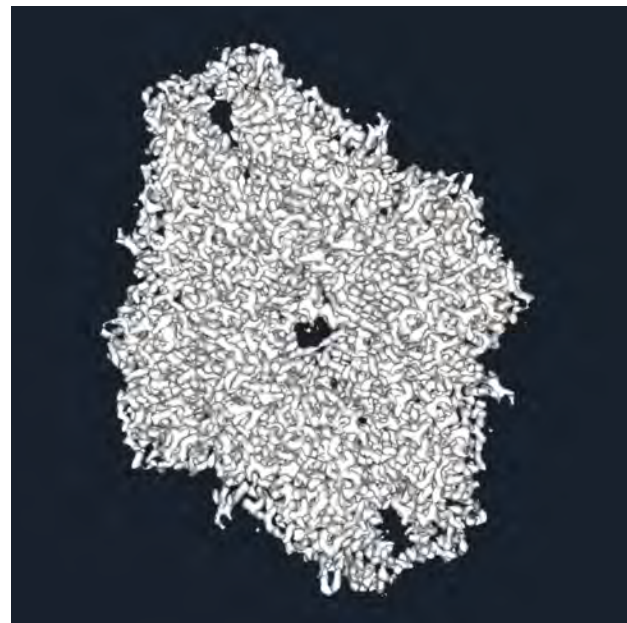
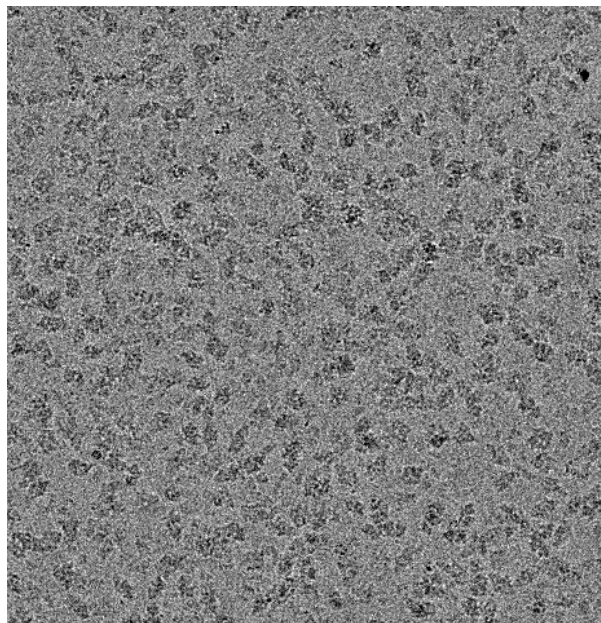


岡山大学  
OKAYAMA UNIVERSITY

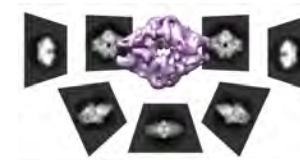
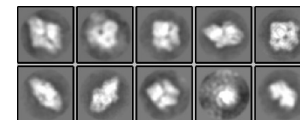
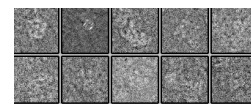
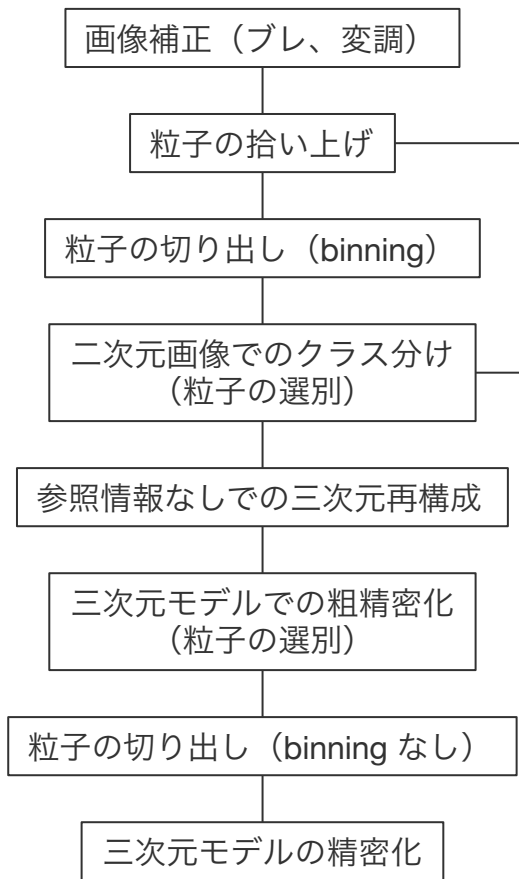
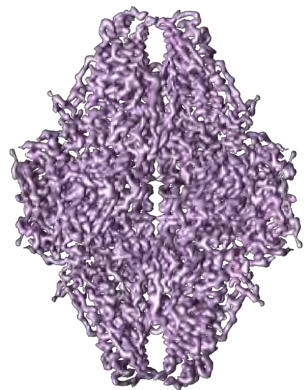
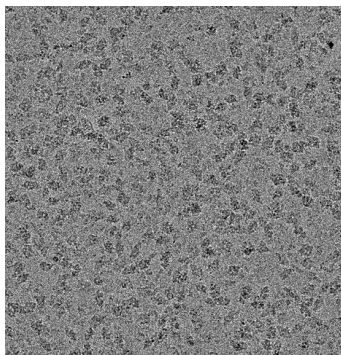
# 本トレーニングの目的

---

- 単粒子解析法を用いた構造解析技術を習得する



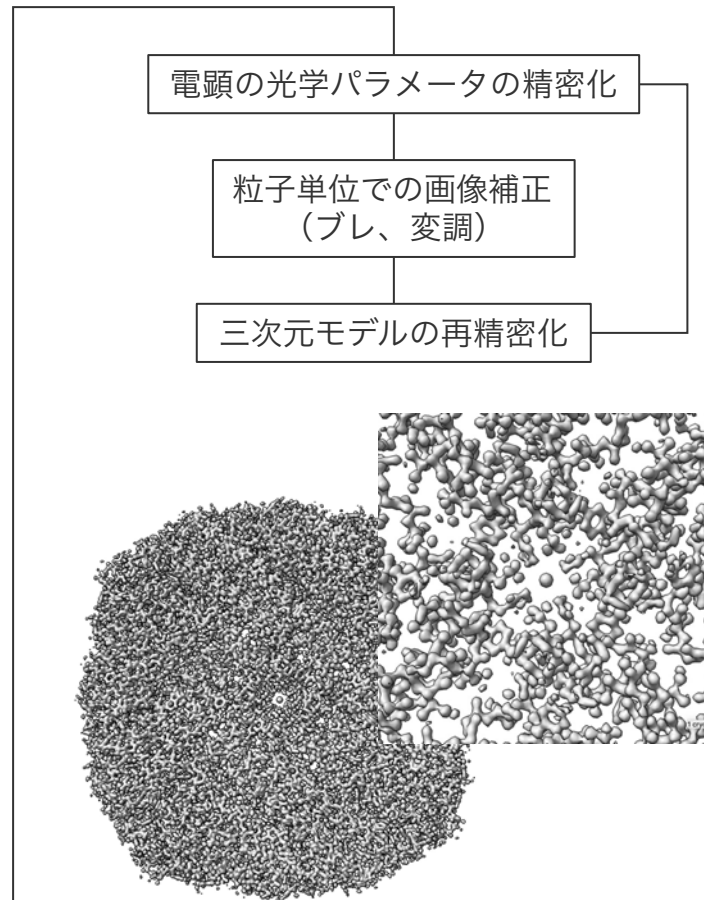
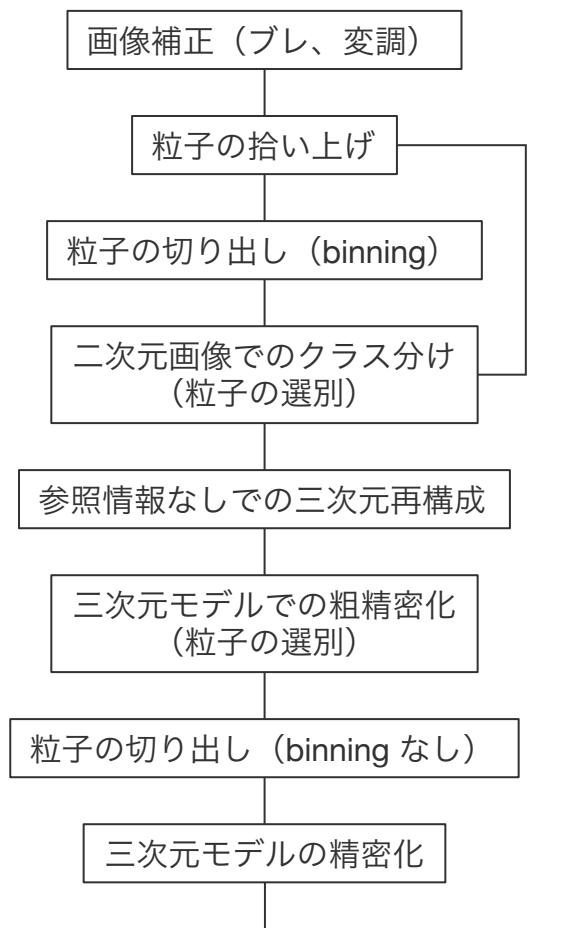
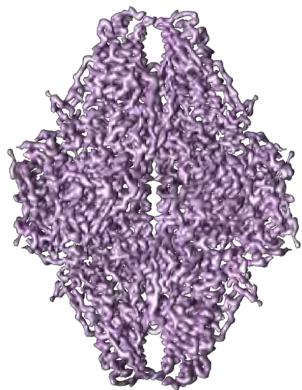
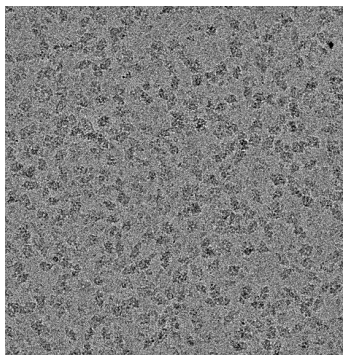
# 単粒子解析法のworkflow



ゴミを捨てる

三次元化

# 単粒子解析法のworkflow



# 国際構造生物学研究センター (ICSB)



岡山大学異分野基礎科学研究所  
国際構造生物学研究センター

International Center for Structural Biology  
Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

English

設備・料金

予約状況

マニュアル

スタッフ

アクセス

論文



国際構造生物学研究センターでは、クライオ電子顕微鏡 Thermo Scientific Krios G4 ならびにクライオプラズマFIB-SEM Thermo Scientific Arctis を設置し、本学のみならず学外にも広く開放し、共同利用を通して構造生物学関連研究の大きな発展を支援します。

# 構造生物学の目指すところ

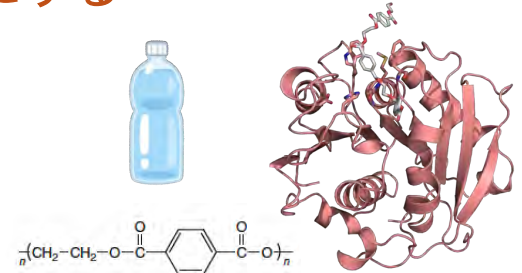
## タンパク質の構造から、機能の分子機構を明らかにする

創薬（薬剤分子の合理的設計、疾病機構の解明）

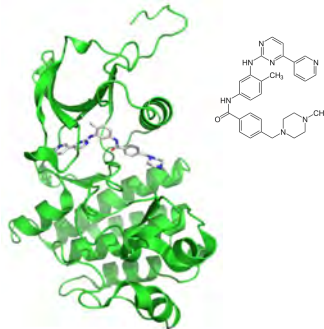
エネルギー問題の解決（人工光合成、水素産生）

食料問題の解決（生育速度改善、病害耐性）

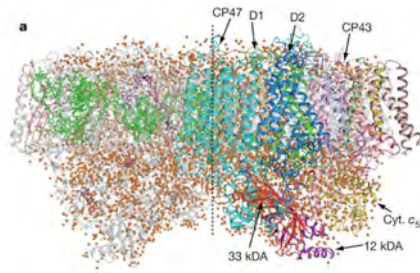
環境問題の解決（プラスチック分解酵素）



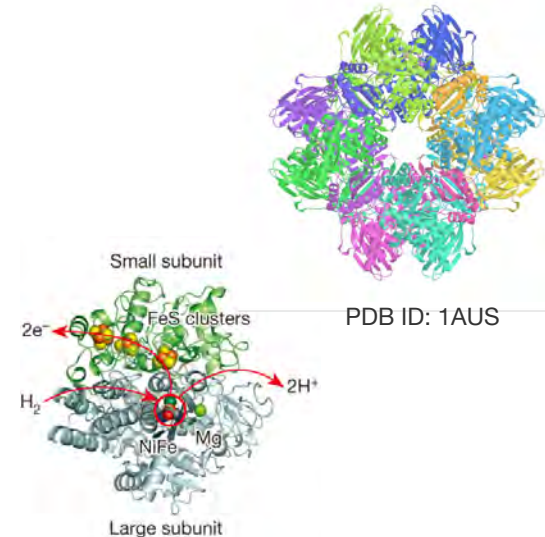
Numoto et al., *Int J Biol Macromol* **281**, 136597 (2024).



PDB ID: 1IEP



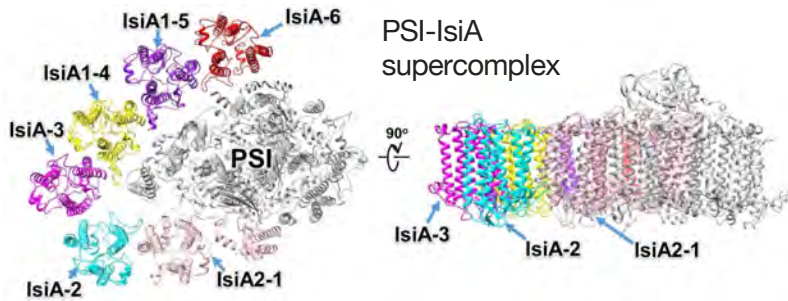
Umena et al. *Nature* **473**, 55-60 (2011)



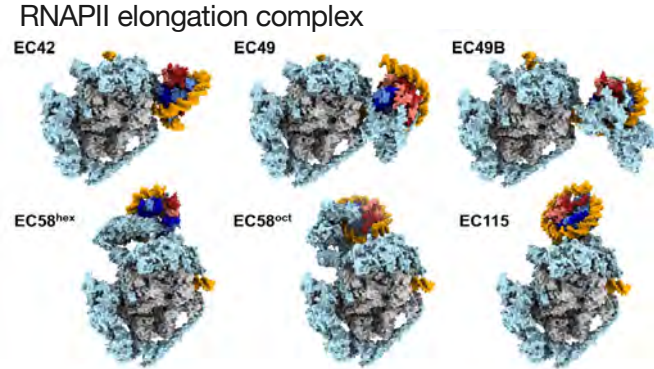
PDB ID: 1AUS

Ogata et al., *Nature* **520**, 571-574 (2015).

# クライオ電子顕微鏡によるタンパク質複合体構造解析

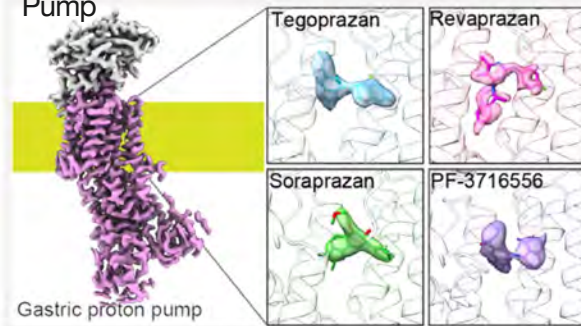


*Nature Communications* 14, Article number: 920 (2023)

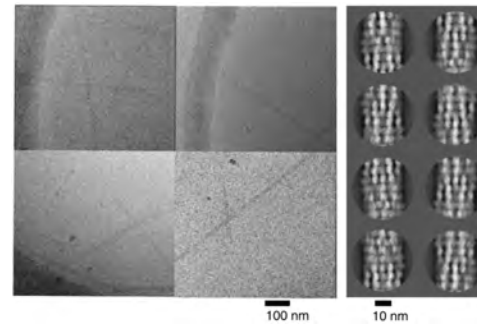


*SCIENCE* • 18 Aug 2022 • Vol 377, Issue 6611

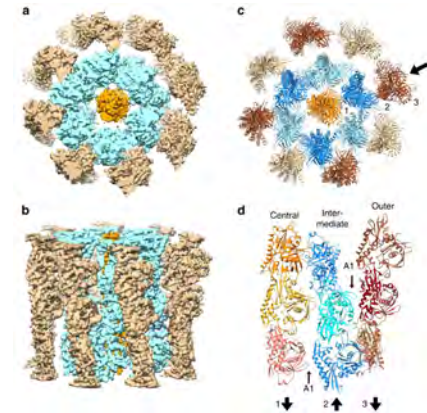
## Gastric Proton Pump



*J. Med. Chem.* 2022, 65, 7843–7853



*Nature Communications* 10, Article number: 2856 (2019)



# 解像度の限界を決める式

## ■ 虫眼鏡

- 100  $\mu\text{m}$



$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

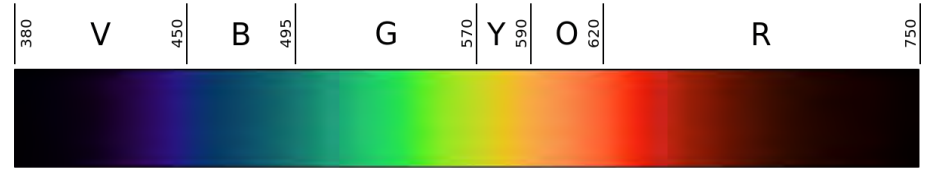
## ■ 顕微鏡

- 0.2  $\mu\text{m}$



$\lambda$ : 波長

NA: 開口数



可視光の波長 (nm)

500 nm (= 0.5  $\mu\text{m}$ )の波長を使用した場合、0.2  $\mu\text{m}$ 以下を見分けられない (1870年代)

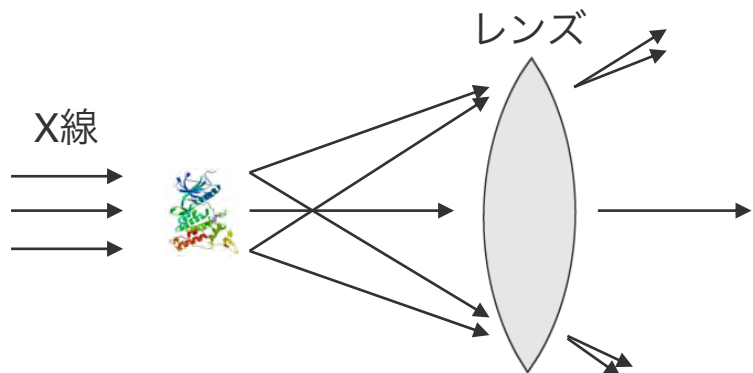
分子の原子間距離は0.1 nm (1  $\text{\AA}$ )のオーダー



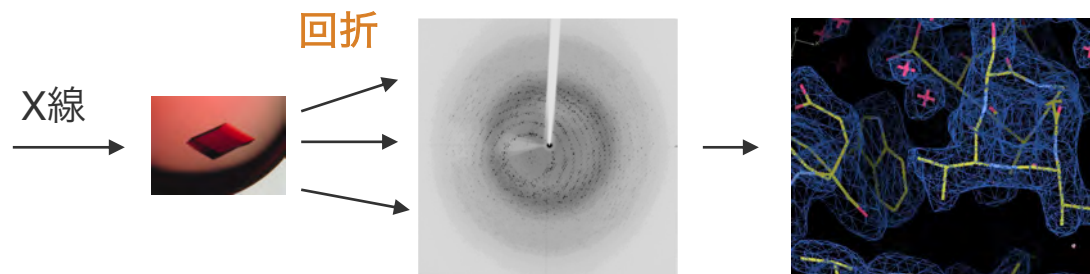
Wikipedia

Wilhelm Conrad Röntgen

# X線：レンズの代わりに結晶からの回折を使う



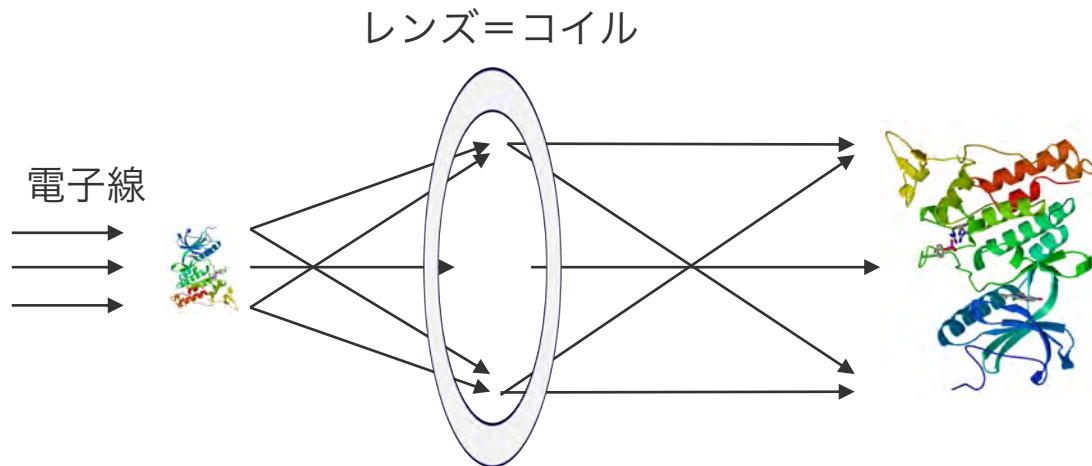
X線の屈折率は様々な物質に対し、ほとんど1  
=> レンズが作れない => 結像しない



フーリエ変換

$$\rho(x y z) = \frac{1}{V} \sum \sum \sum F(h k l) \exp\{-2\pi i(hx + ky + lz)\}$$

# 電子線のレンズはつくれる



電子線は電磁場（コイル）で自由に曲げられる

波長は十分短い？ => Yes! 300 kVで加速された電子の波長

0.00196 nm !

ドブロイ波長

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{(2mE)^{1/2}}$$

Louis Victor de Broglie



Wikipedia

# 電子顕微鏡の開発

---

## ■ 1931年 Max Knoll Ernst Ruska

- Ernst Ruska 1986年 ノーベル物理学賞
- 日本でも、1940年国産第一号

## ■ タンパク質の構造解析への適用は難しかった

- 真空中で観測しなくてはならない
- 電子線の高いエネルギーにタンパク質試料が耐えられない  
**X線との相互作用より10<sup>6</sup>倍大きい**
- 低照射量での撮影ゆえの低コントラスト



Figure 9-41 (part 2 of 2) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# 電子顕微鏡の開発

---

## ■ 1931年 Max Knoll

## Ernst Ruska

- Ernst Ruska 1986年 ノーベル物理学賞
- 日本でも、1940年国産第一号

## ■ タンパク質の構造解析への適用は難しかった

- 真空中で観測しなくてはならない
- 電子線の高いエネルギーにタンパク質試料が耐えられない  
**X線との相互作用より10<sup>6</sup>倍大きい**
- 低照射量での撮影ゆえの低コントラスト



Figure 9-41 (part 2 of 2) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# クライオ電子顕微鏡の開発

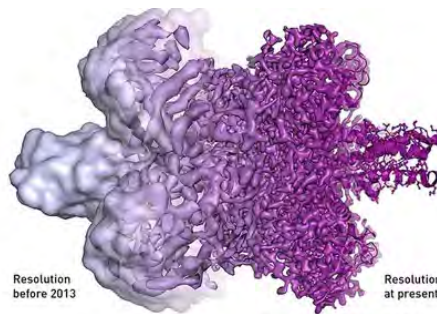
## ■ 1980年代から 藤吉好則

- 試料を極低温に冷却して、電子線からのダメージを軽減する  
X線結晶構造解析でも同様だが、電顕での利用のほうが早い？

## ■ 2013年ごろ 劇的な変化

- 検出器技術に革命 <- X線結晶構造解析で先に用いられていた  
「ブレ補正」ができるようになった
- 計算機性能（GPUの利用）の向上

Resolution revolution!



# クライオ電子顕微鏡の開発

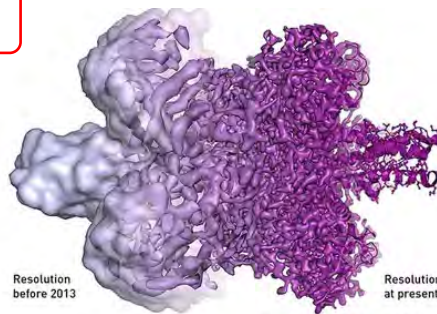
## ■ 1980年代から 藤吉好則

- 試料を極低温に冷却して、電子線からのダメージを軽減する  
X線結晶構造解析でも同様だが、電顕での利用のほうが早い？

## ■ 2013年ごろ 劇的な変化

- 検出器技術に革命 <- X線結晶構造解析で先に用いられていた  
「ブレ補正」ができるようになった
- 計算機性能（GPUの利用）の向上

Resolution revolution!



# 2017年ノーベル化学賞

## The Nobel Prize in Chemistry 2017



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Jacques Dubochet

Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Joachim Frank

Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Richard Henderson

Prize share: 1/3

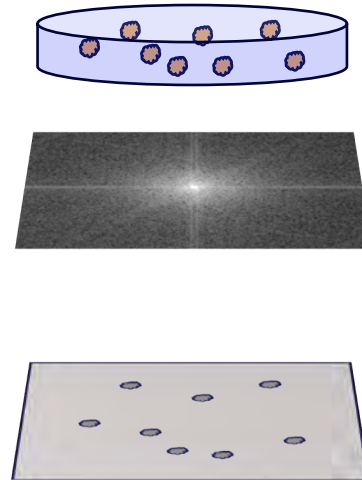
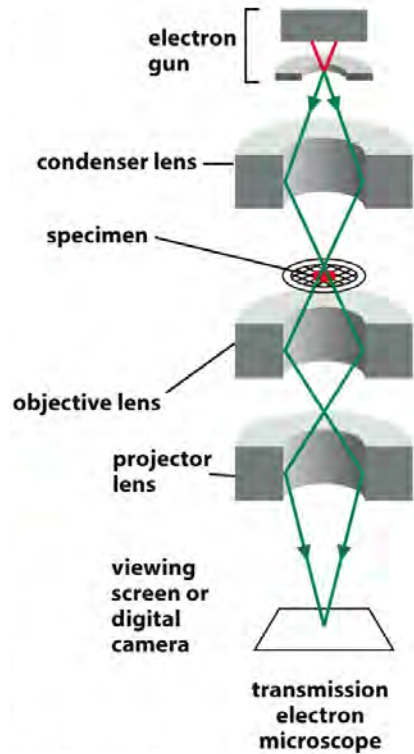
The Nobel Prize in Chemistry 2017 was awarded jointly to Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson "for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution."

Single particle analysis

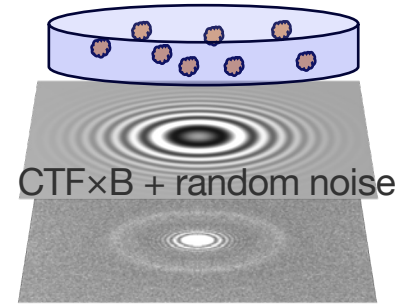
単粒子解析法

<https://www.nobelprize.org/>

# 透過型電子顯微鏡



FT



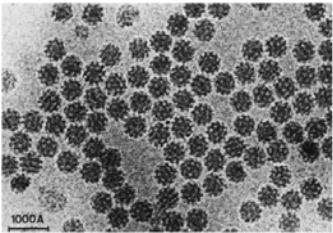
FT<sup>-1</sup>

Figure 9-41 (part 1 of 2) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

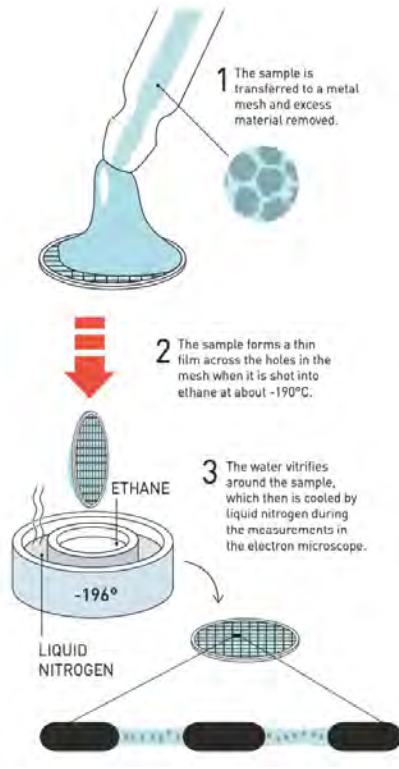
# Jacques Dubochet



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud  
Jacques Dubochet



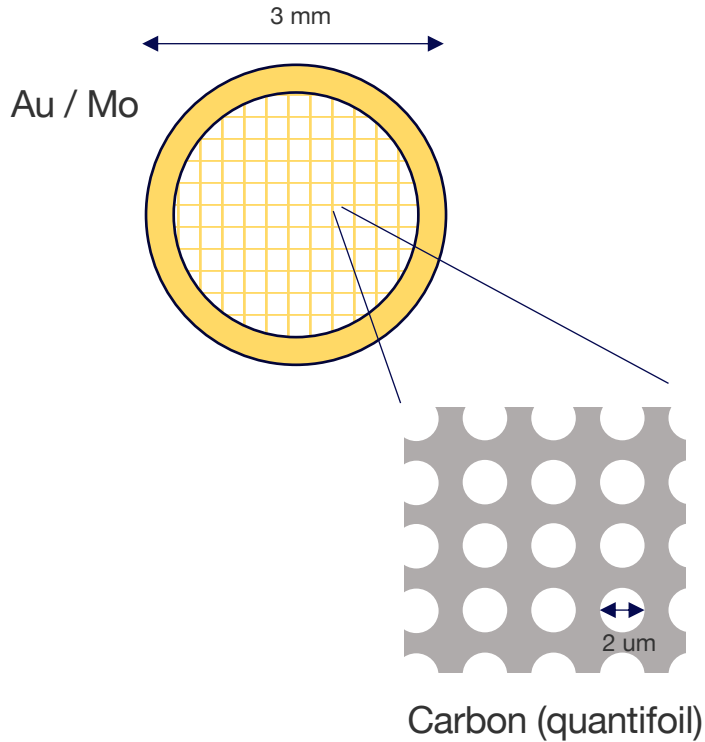
*Nature* 308, 32-36, 1984



<https://www.nobelprize.org/>

- 溶液中のタンパク質試料をいかにして構造を保ったまま凍結するか
- タンパク質を一層のみの厚さで保持する
- 汎用的な急速凍結法の開発

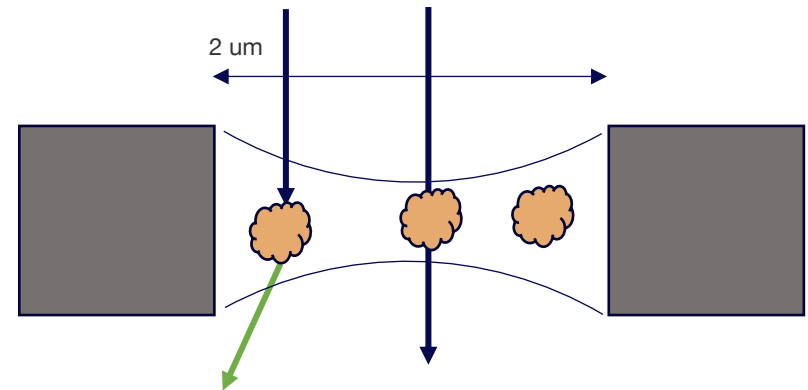
# 試料調製法 ～氷包埋法～



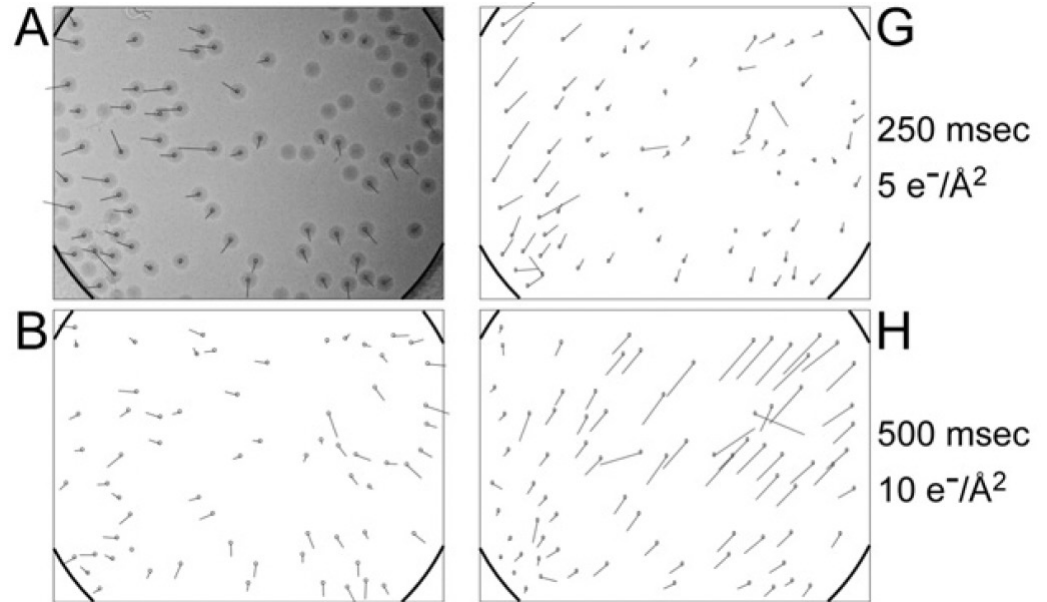
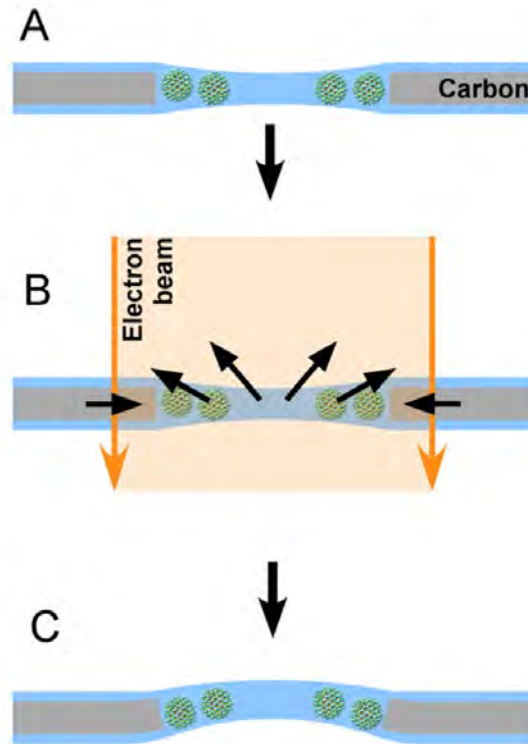
- 薄い（300 nm以下）氷中にタンパク質が保持されている

- 結晶はいらない！

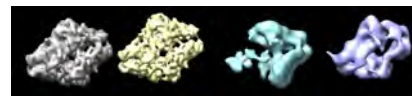
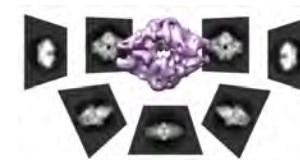
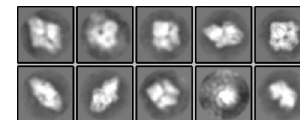
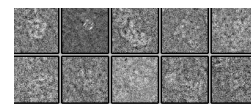
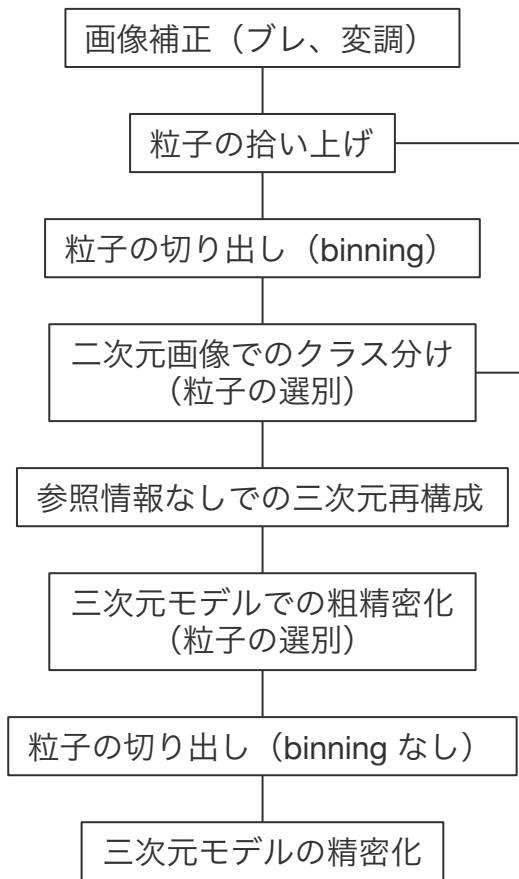
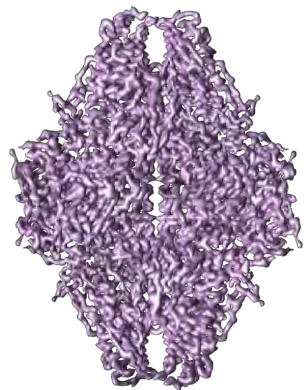
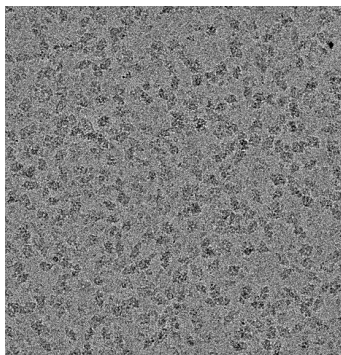
急速凍結したアモルファス状の緩衝液（氷）



# 検出器技術の革命



# 単粒子解析法のworkflow

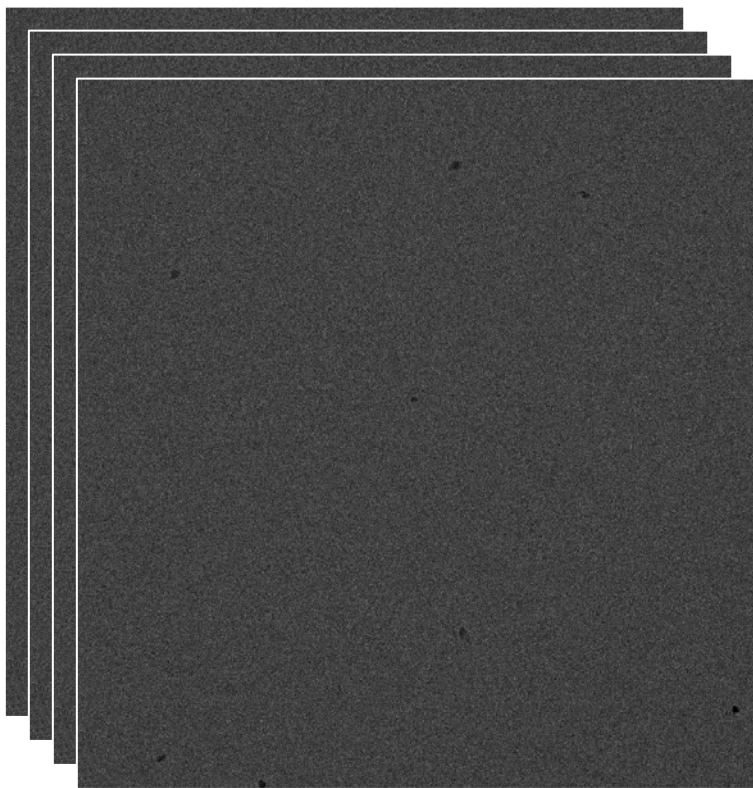


ゴミを捨てる

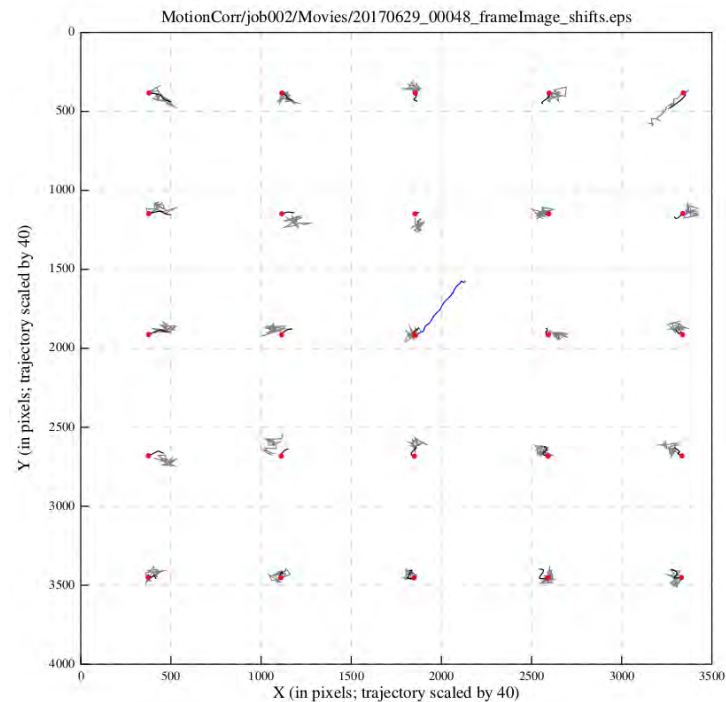
三次元化

# 単粒子解析の実際 ～画像データの取得とぶれ補正～

Image as movie stacks



補正されたたぶれの量



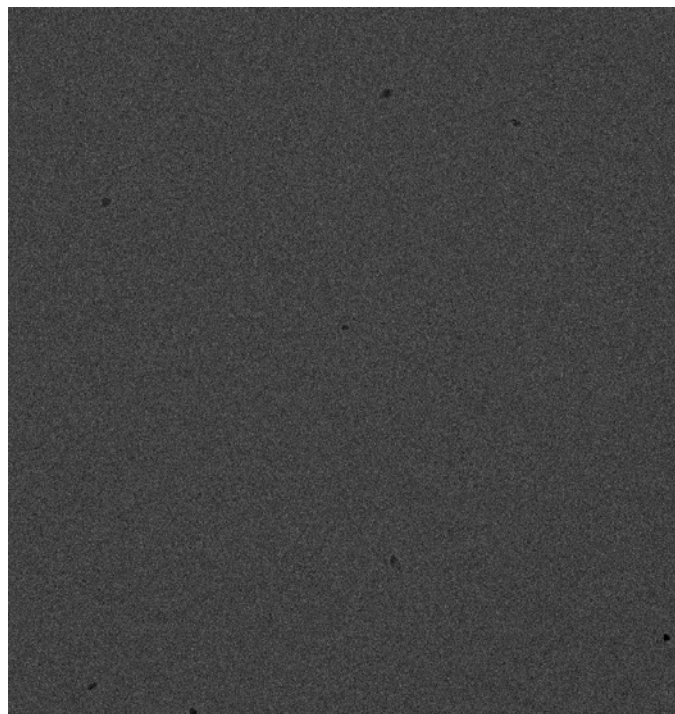
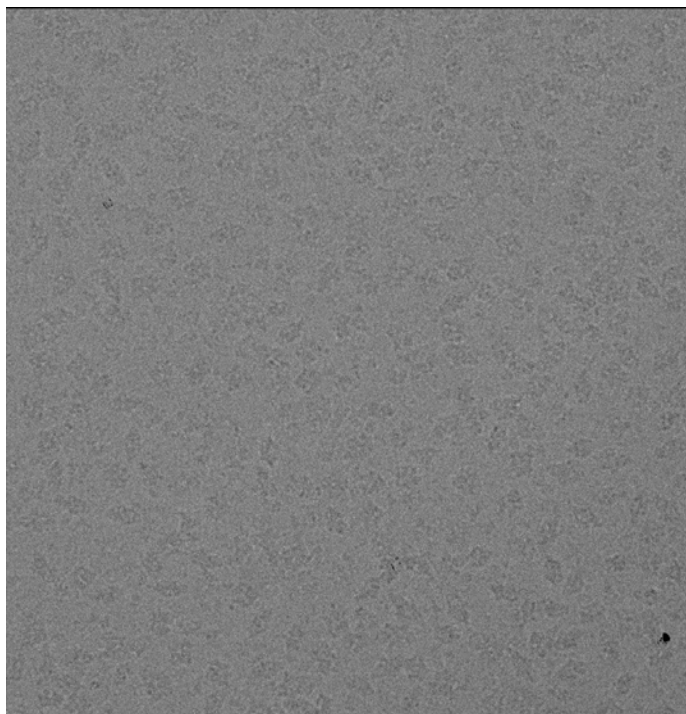
# 単粒子解析の実際 ～画像データの取得とぶれ補正～

---

Motion correction (手ぶれ補正) 後

1/24 frame

4K

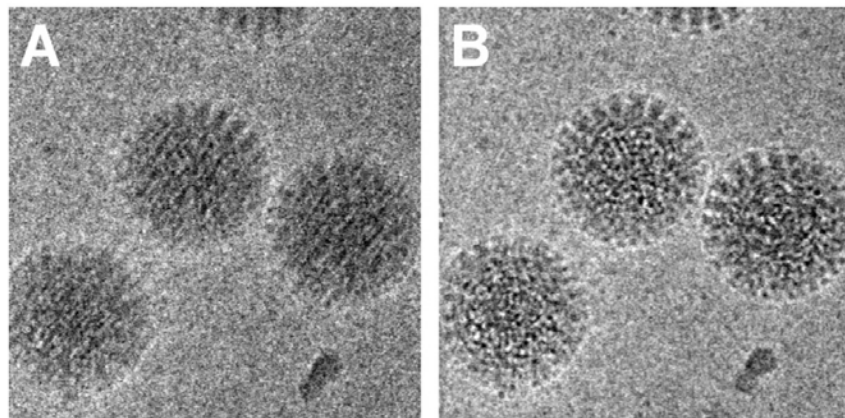


4K

# 検出器技術の革命

## ■ 2013年ごろ 劇的な変化

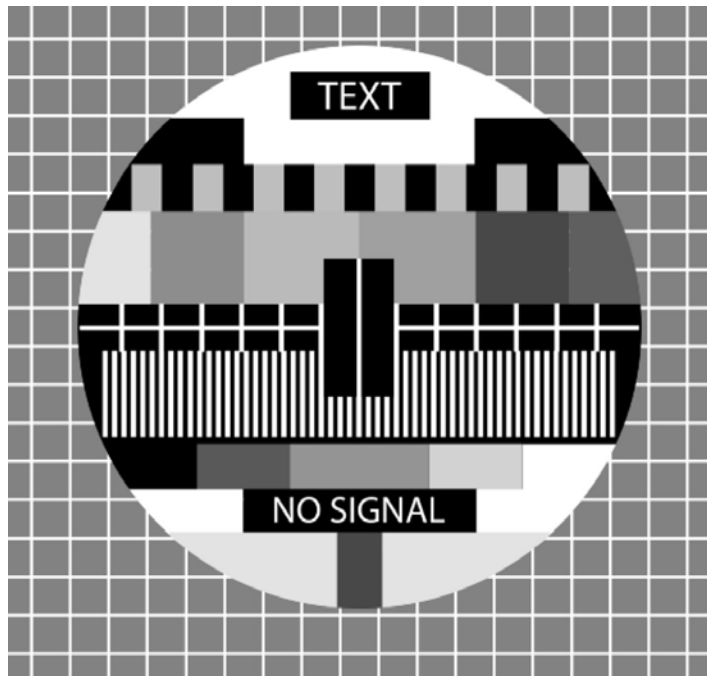
- 検出器技術に革命 <- X線結晶構造解析で先に用いられていた「ブレ補正」ができるようになった
- 計算機性能（GPUの利用）の向上 <-> AI ブーム



Brilot et al., *J. struct. Biol.*, 2012

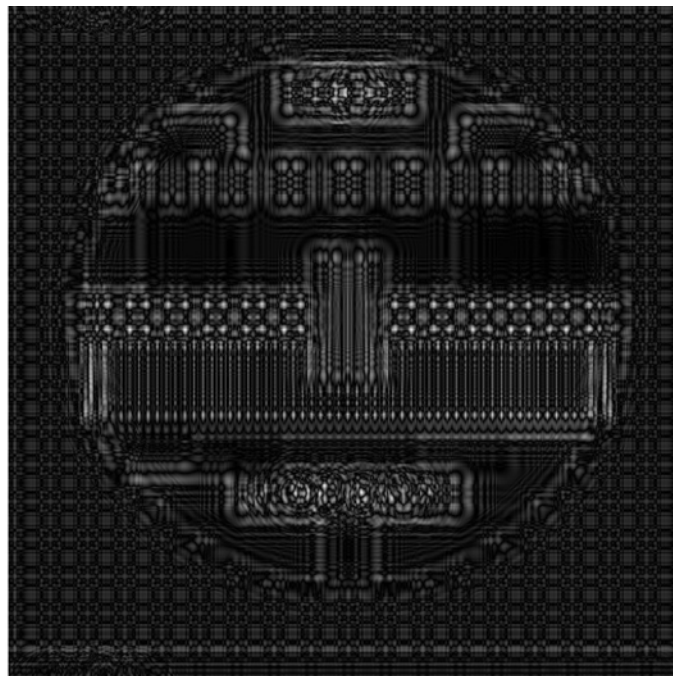


# CTFの影響



CTF

Defocus = 1  $\mu\text{m}$

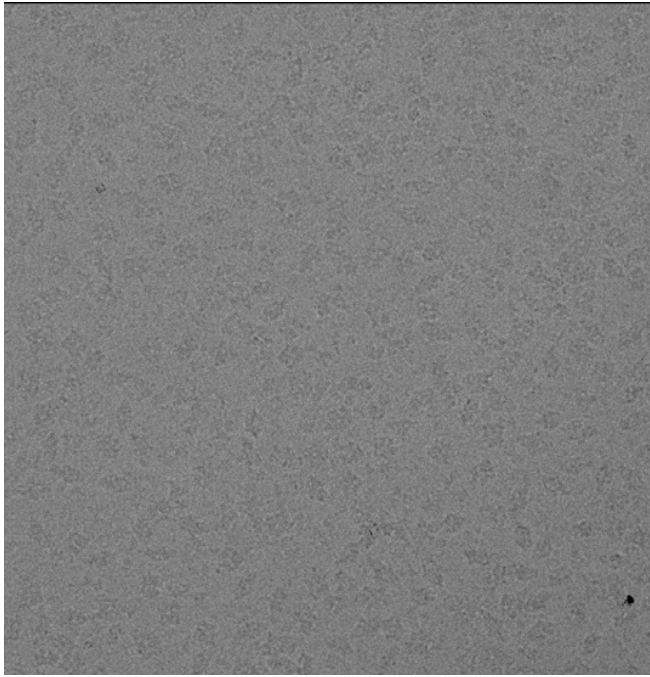


Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

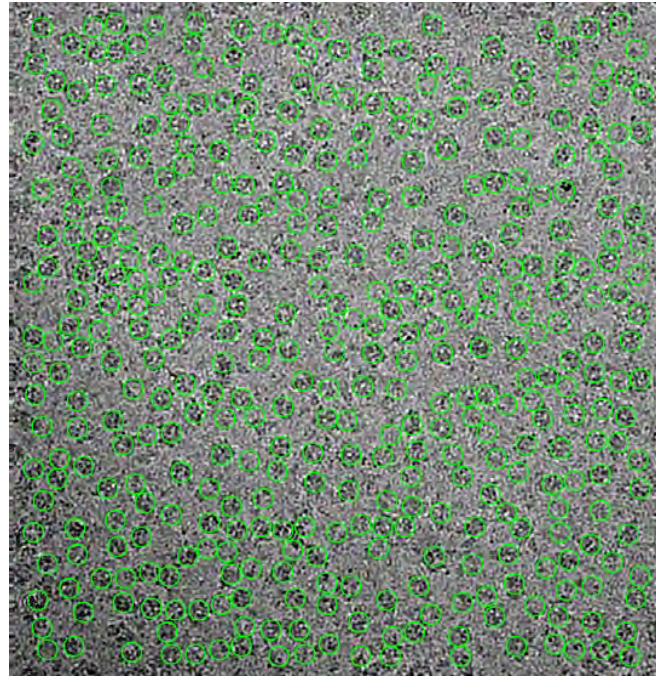
# 観察視野からのタンパク質粒子認識

---

Motion correction (手ぶれ補正) 後



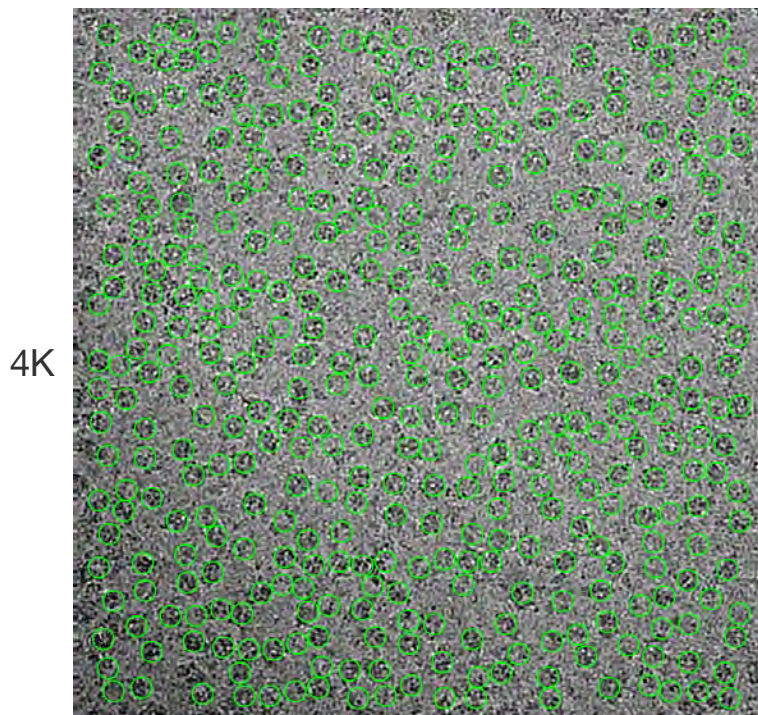
粒子の自動認識 – blob size based, template based, machine learning based…



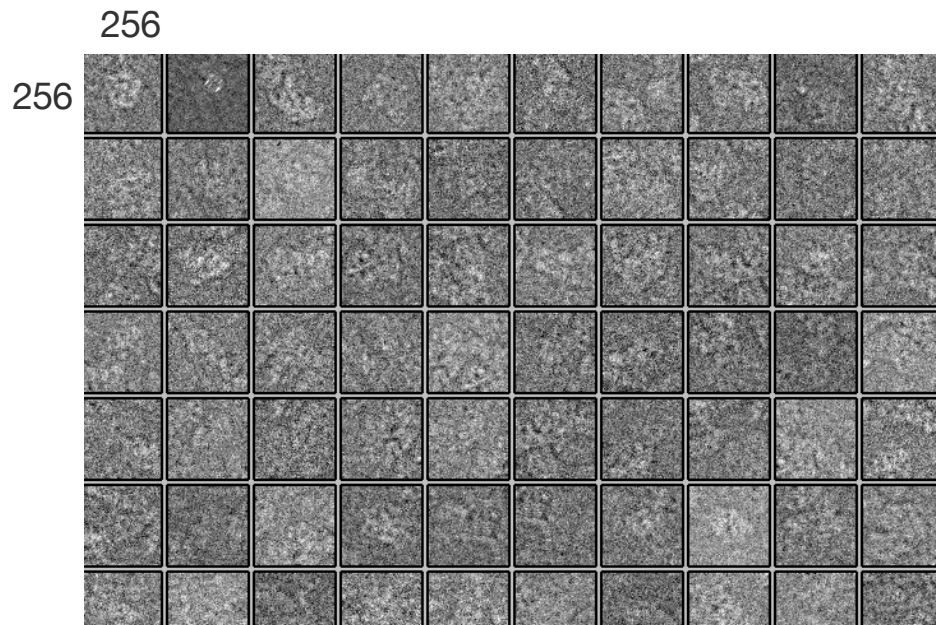
Lowpass filter によるコントラスト強調

# 粒子画像の切り出し

倍率: 6万倍



粒子の切り出し (白黒反転)

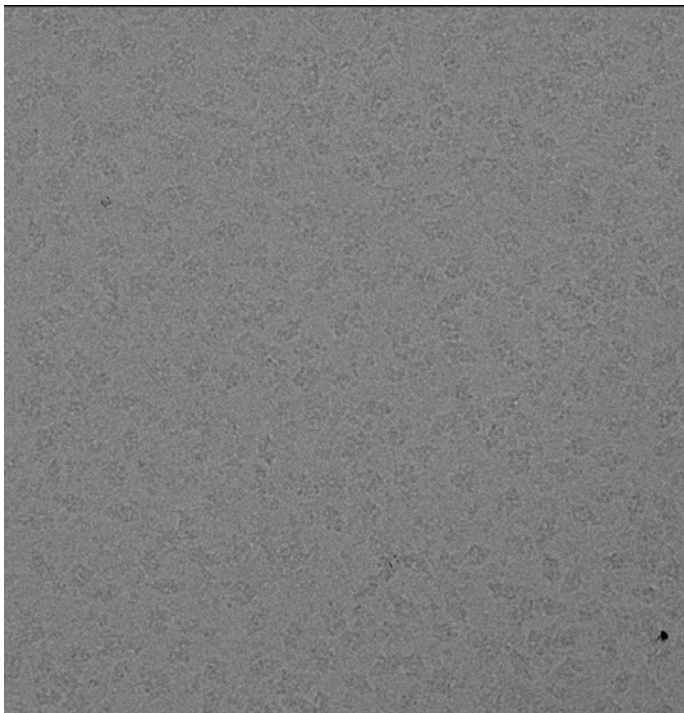


1 pix = 0.885 Å -> 1.77 Å resolution at max.

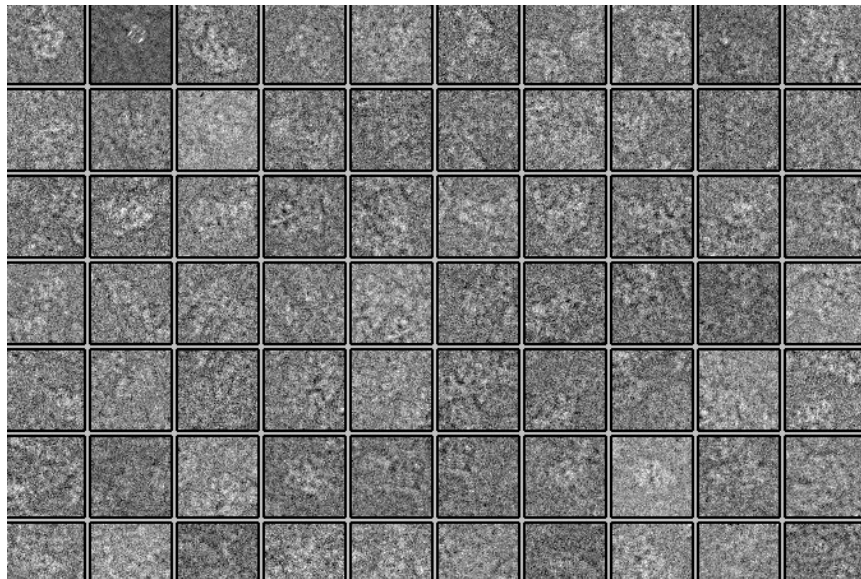
# 粒子画像の切り出し

---

元画像



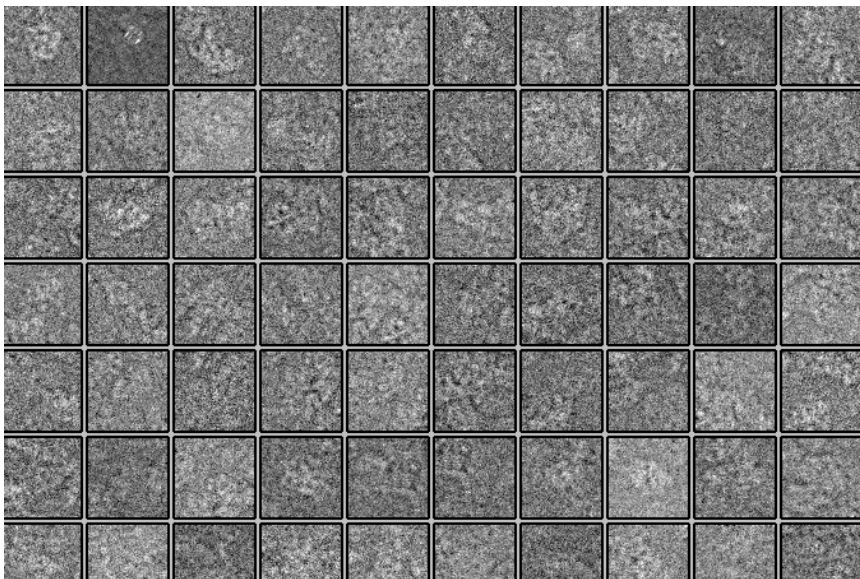
粒子の切り出し（白黒反転）



上からの像、横からの像、斜め…  
変性したもの、夾雑物、etc…

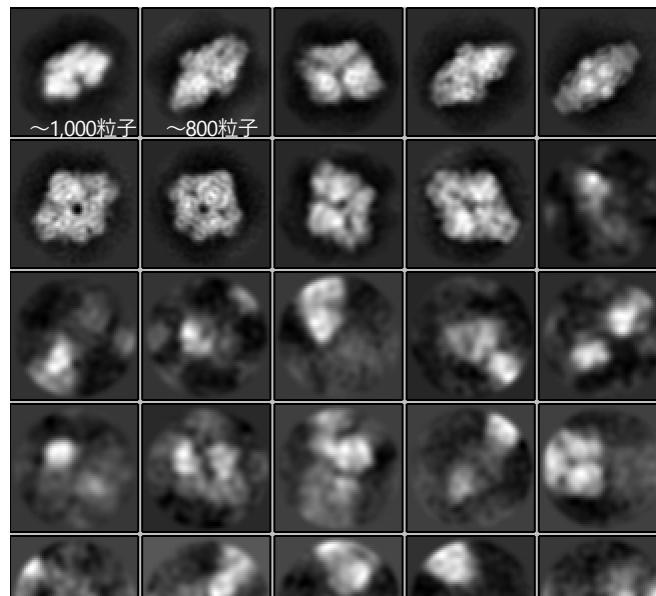
# 粒子の投影像の分類と平均像

切り出した粒子



上からの像、横からの像、斜め…  
変性したもの、夾雑物、etc….

クラス分けして方位を合わせて重ね合わせ  
→ 二次元投影像



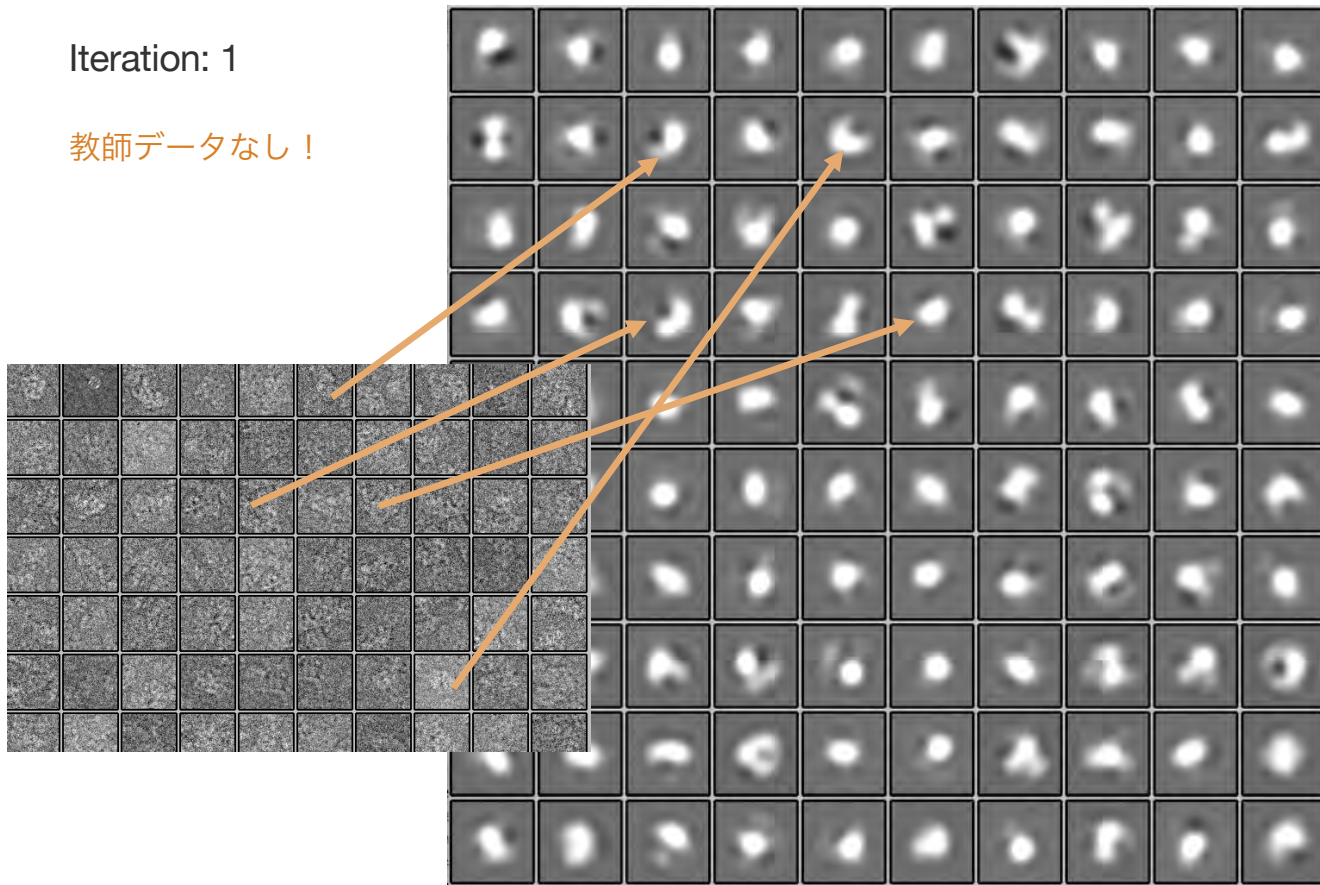
悪いクラスに属する粒子は解析に使わない。

# 2D classification –iterative improvement–

---

Iteration: 1

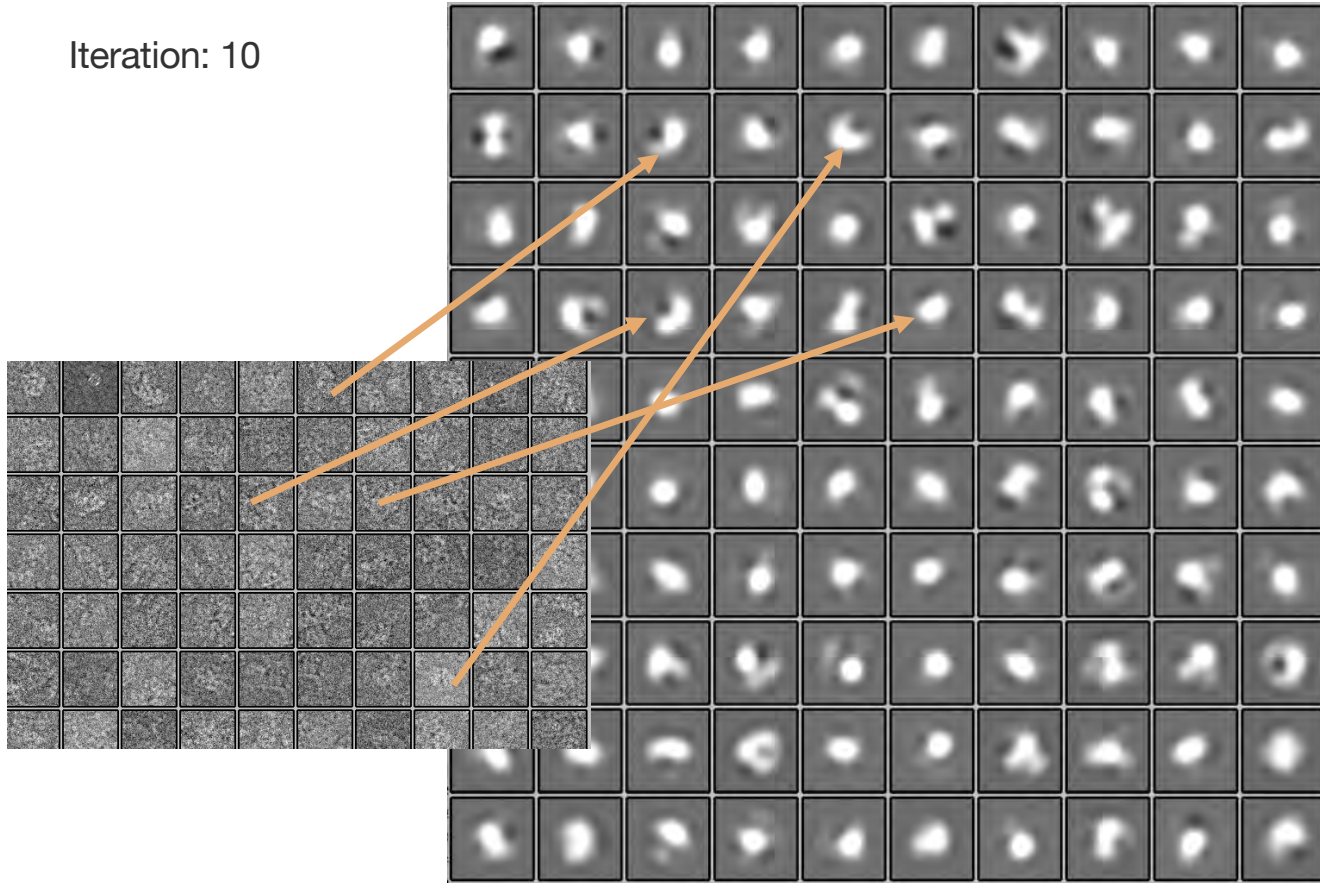
教師データなし！



# 2D classification –iterative improvement–

---

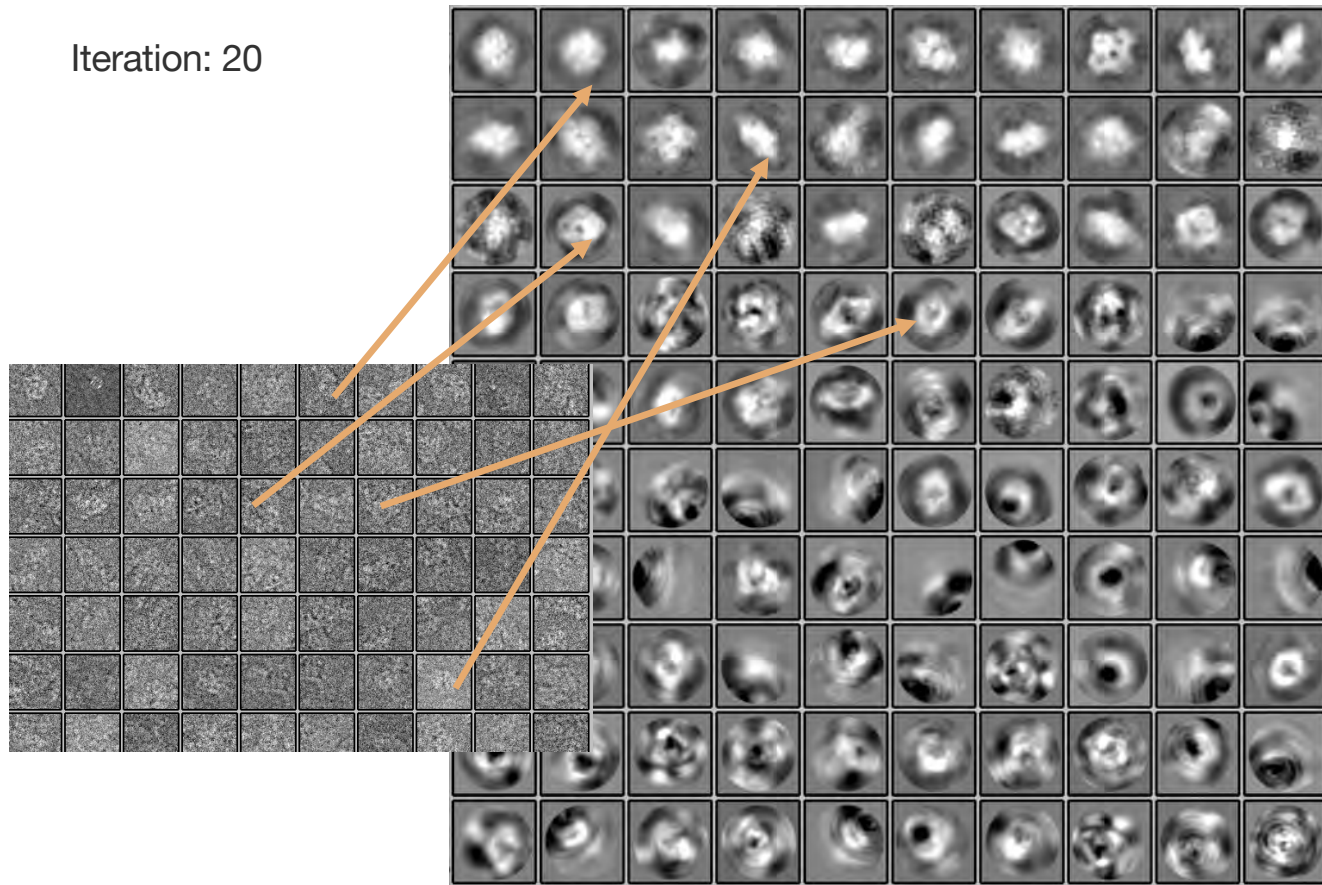
Iteration: 10



# 2D classification –iterative improvement–

---

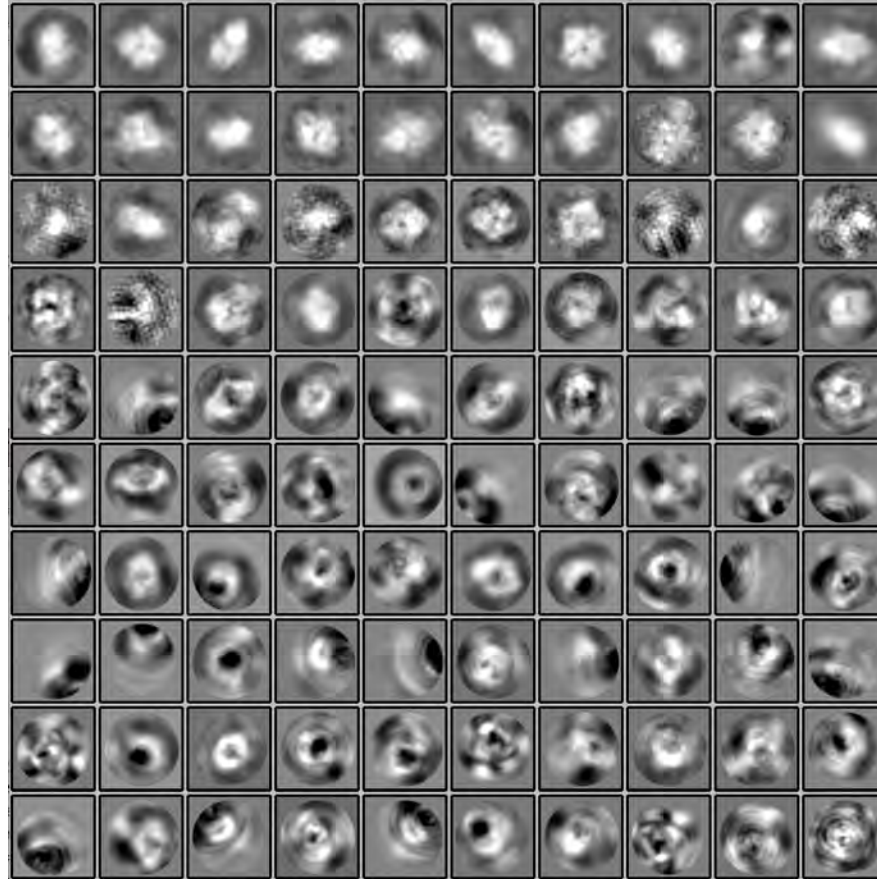
Iteration: 20



# 2D classification –iterative improvement–

---

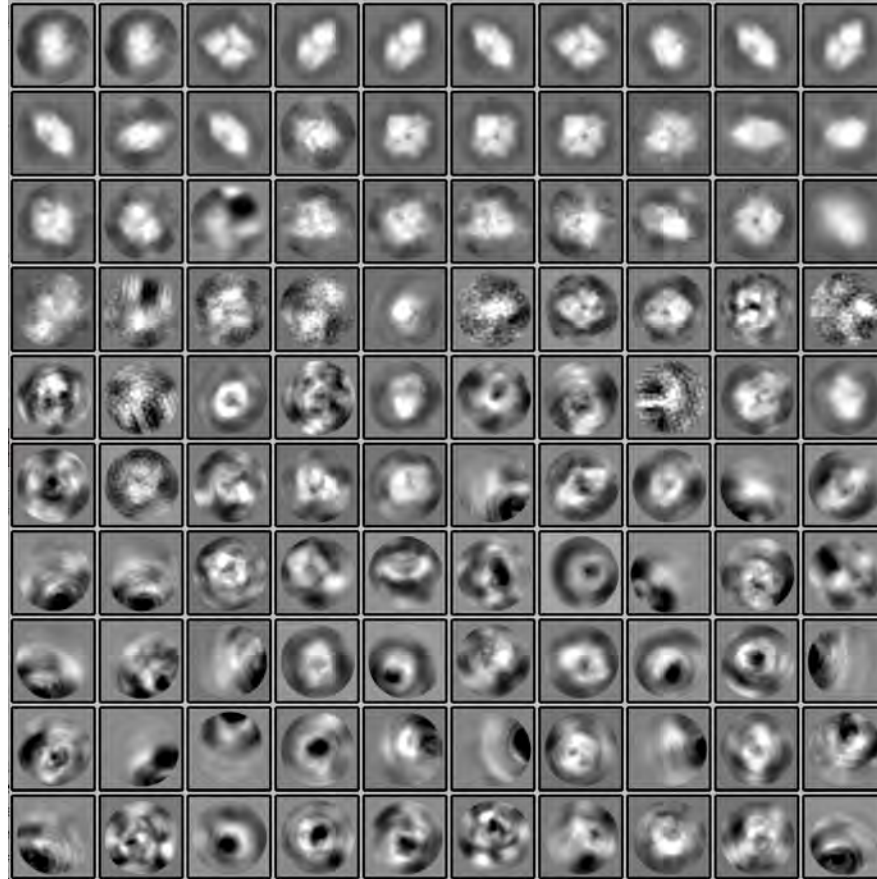
Iteration: 30



# 2D classification –iterative improvement–

---

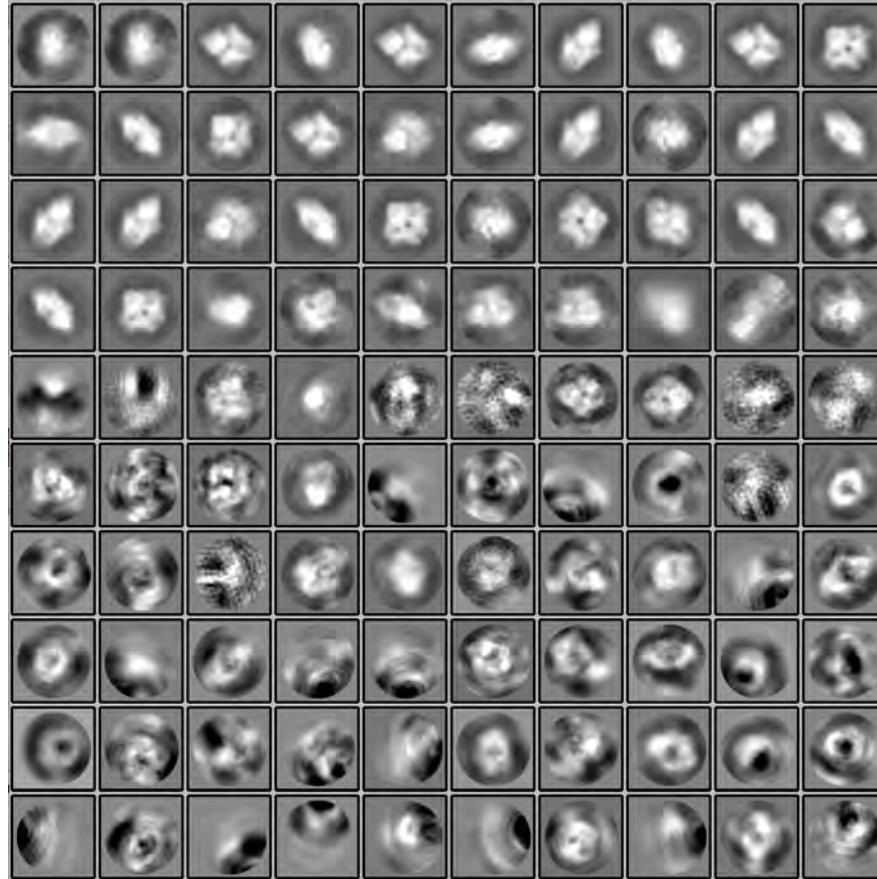
Iteration: 40



# 2D classification –iterative improvement–

---

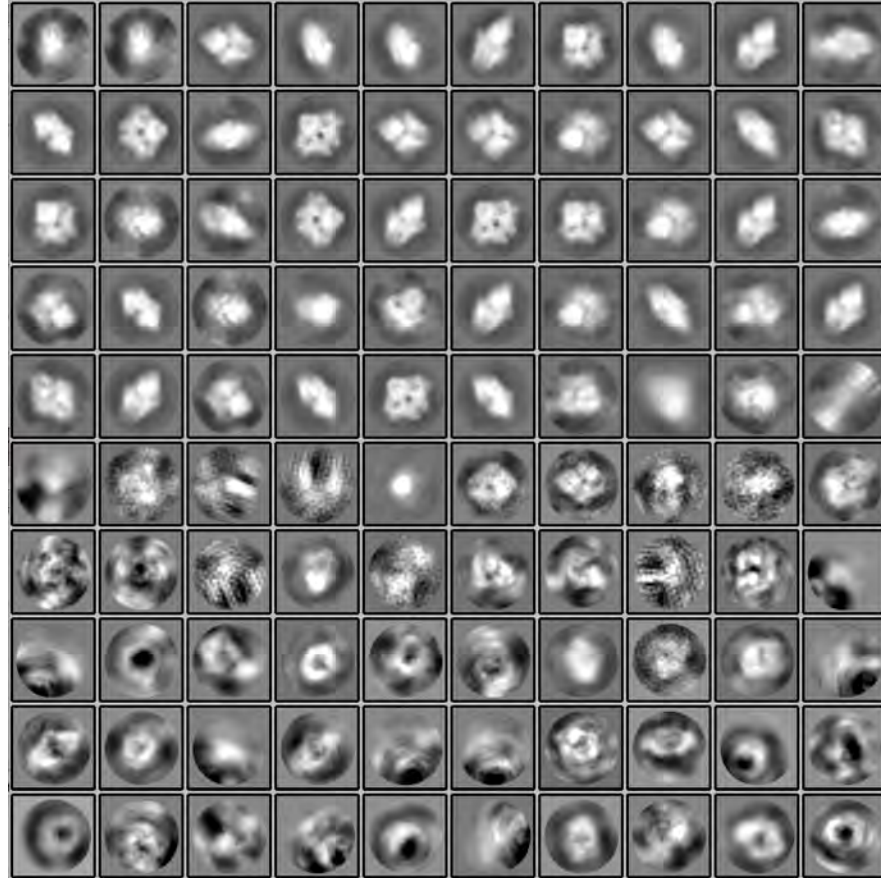
Iteration: 50



# 2D classification –iterative improvement–

---

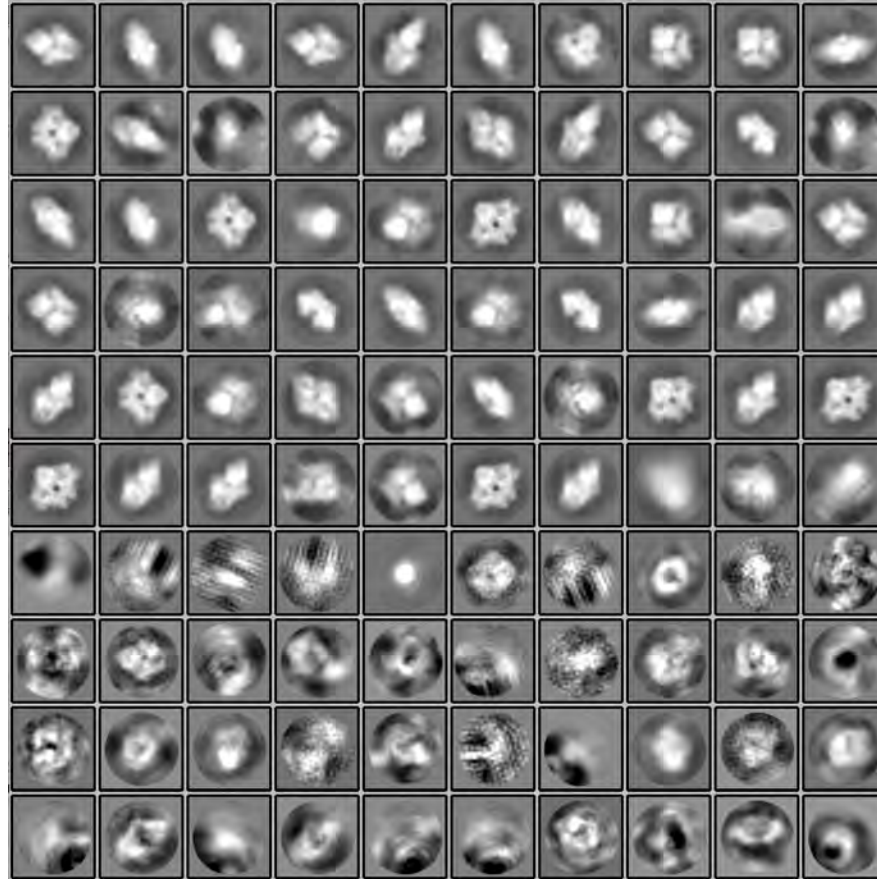
Iteration: 60



# 2D classification –iterative improvement–

---

Iteration: 70

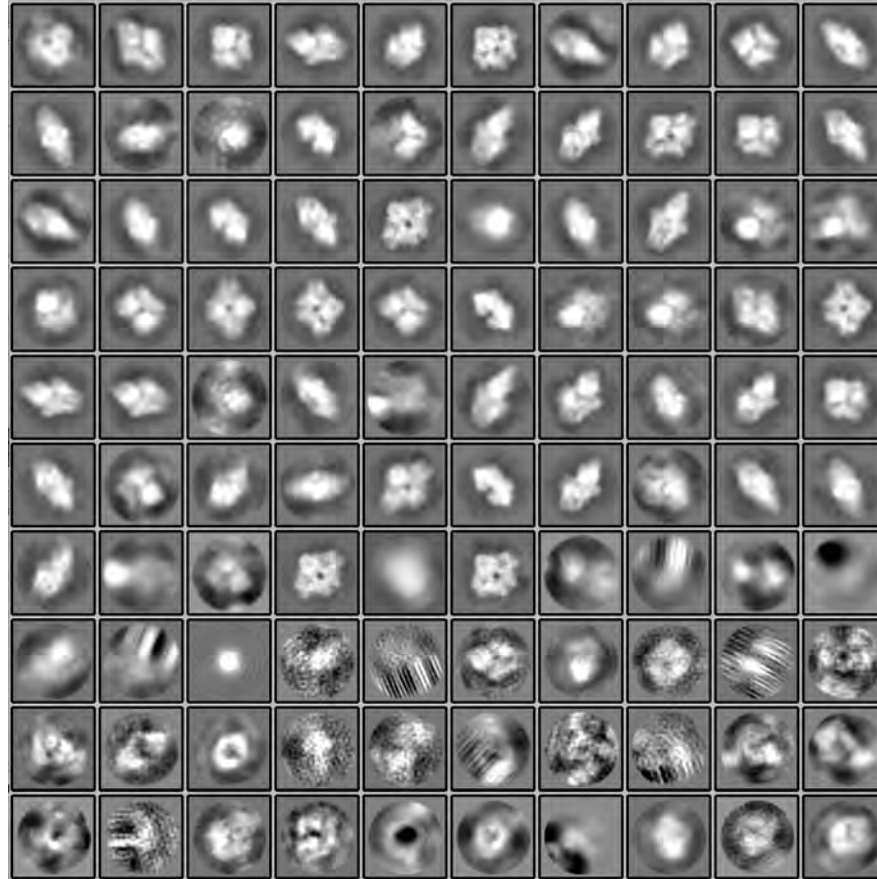




# 2D classification –iterative improvement–

---

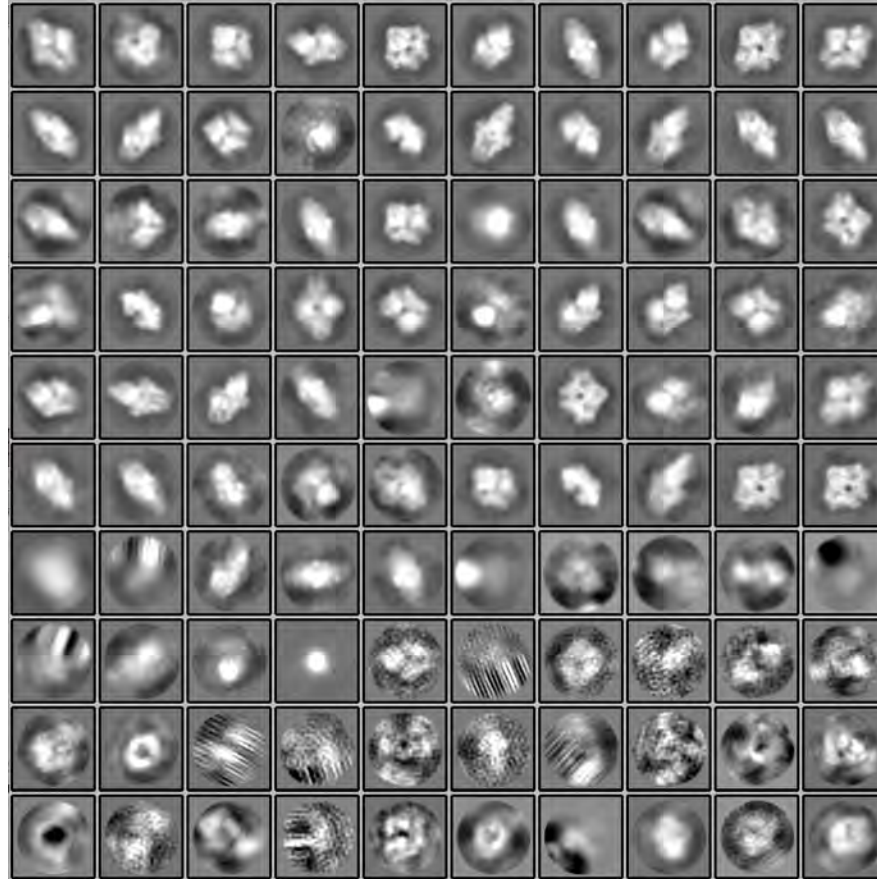
Iteration: 90



# 2D classification –iterative improvement–

---

Iteration: 100

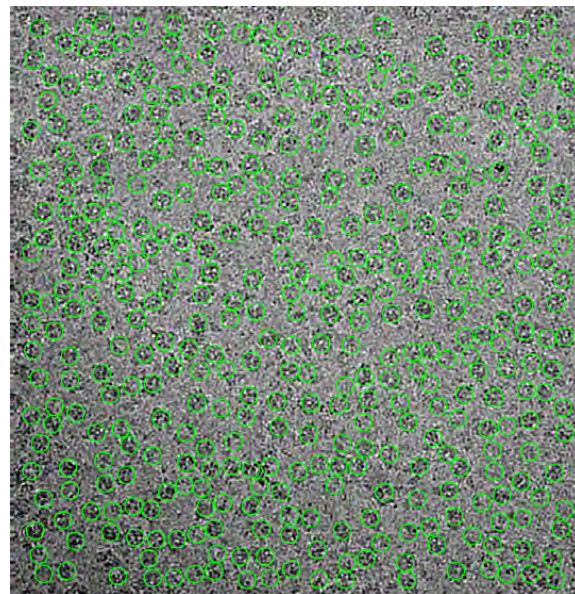


# 教師像ありでのタンパク質粒子認識

粒子の自動認識 -template based



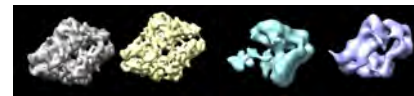
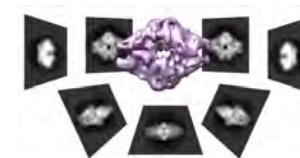
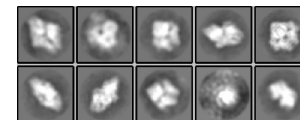
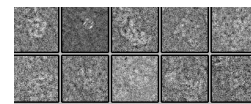
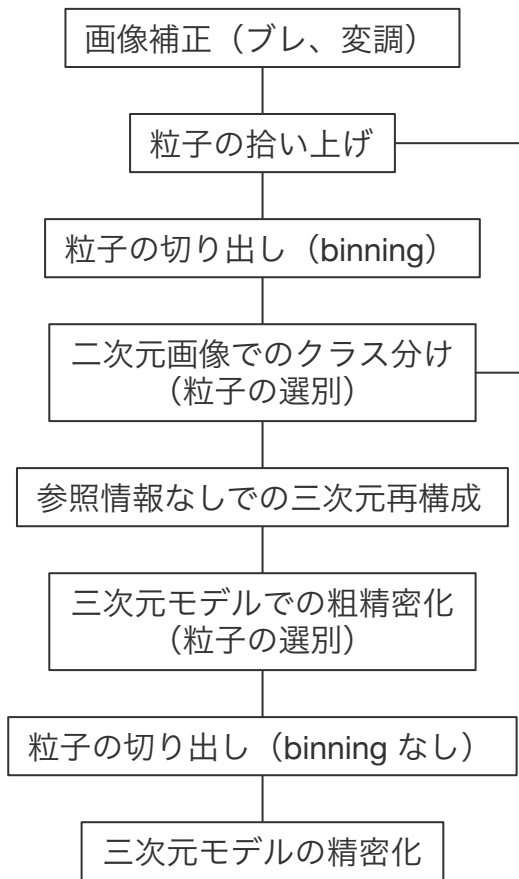
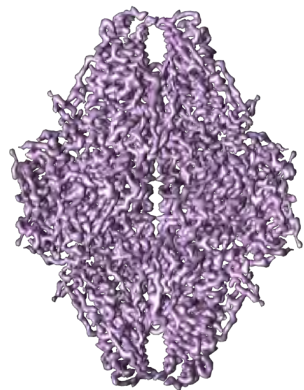
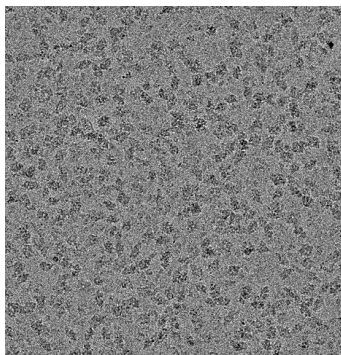
これらに似ているものを探せ！



↓  
粒子の切り出し (binning)

↓  
二次元画像でのクラス分け  
(粒子の選別の精度が向上)

# 単粒子解析法のworkflow

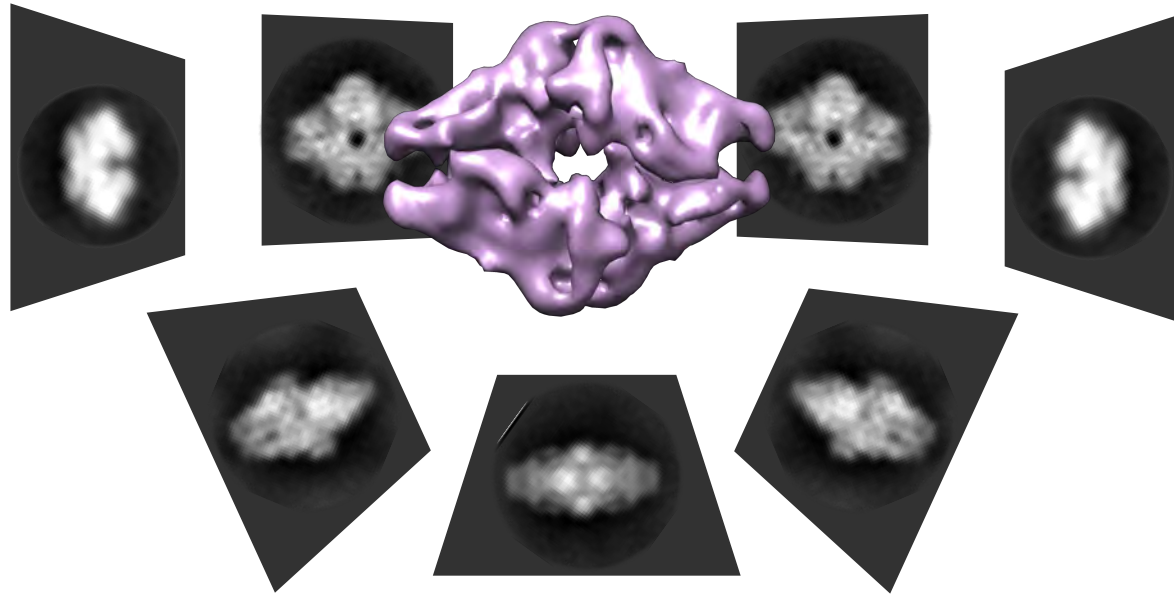


ゴミを捨てる

三次元化

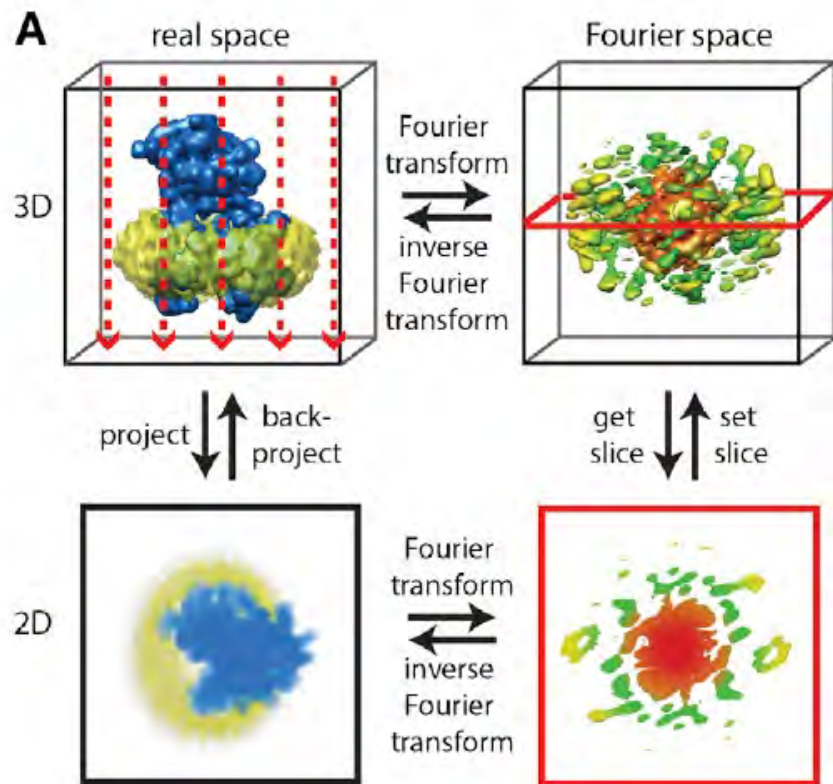
# 粒子の三次元再構成

---



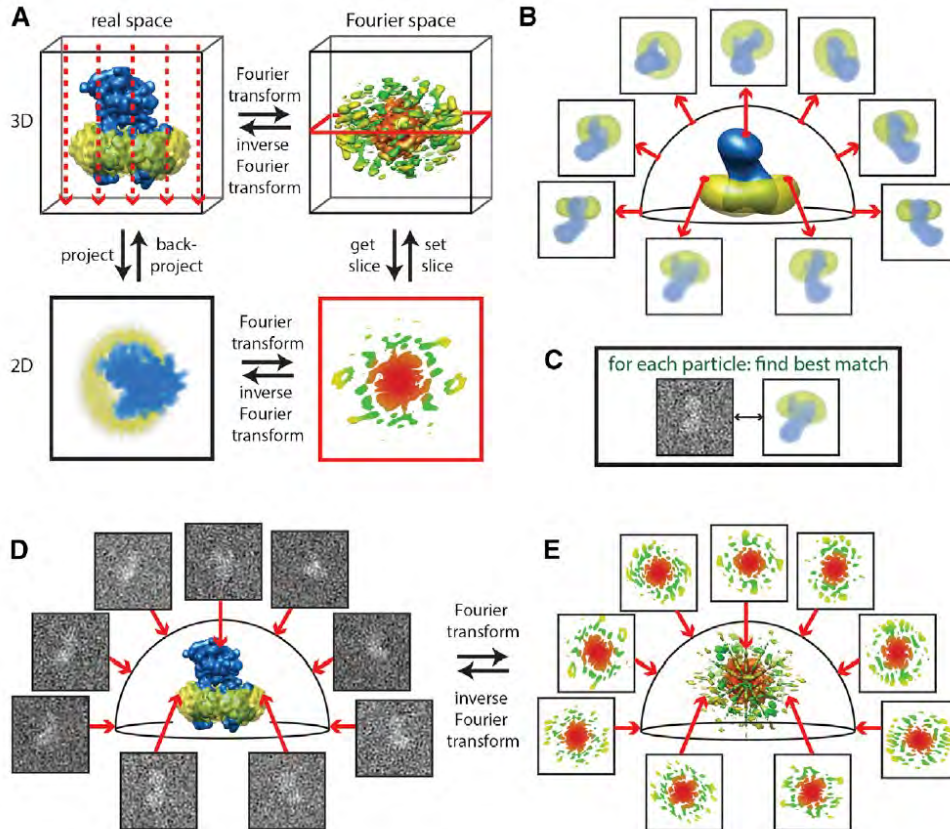
複数の方位からの投影像があれば、三次元構造が回復できる。

# 二次元投影像からの三次元再構成 —中央断面定理—



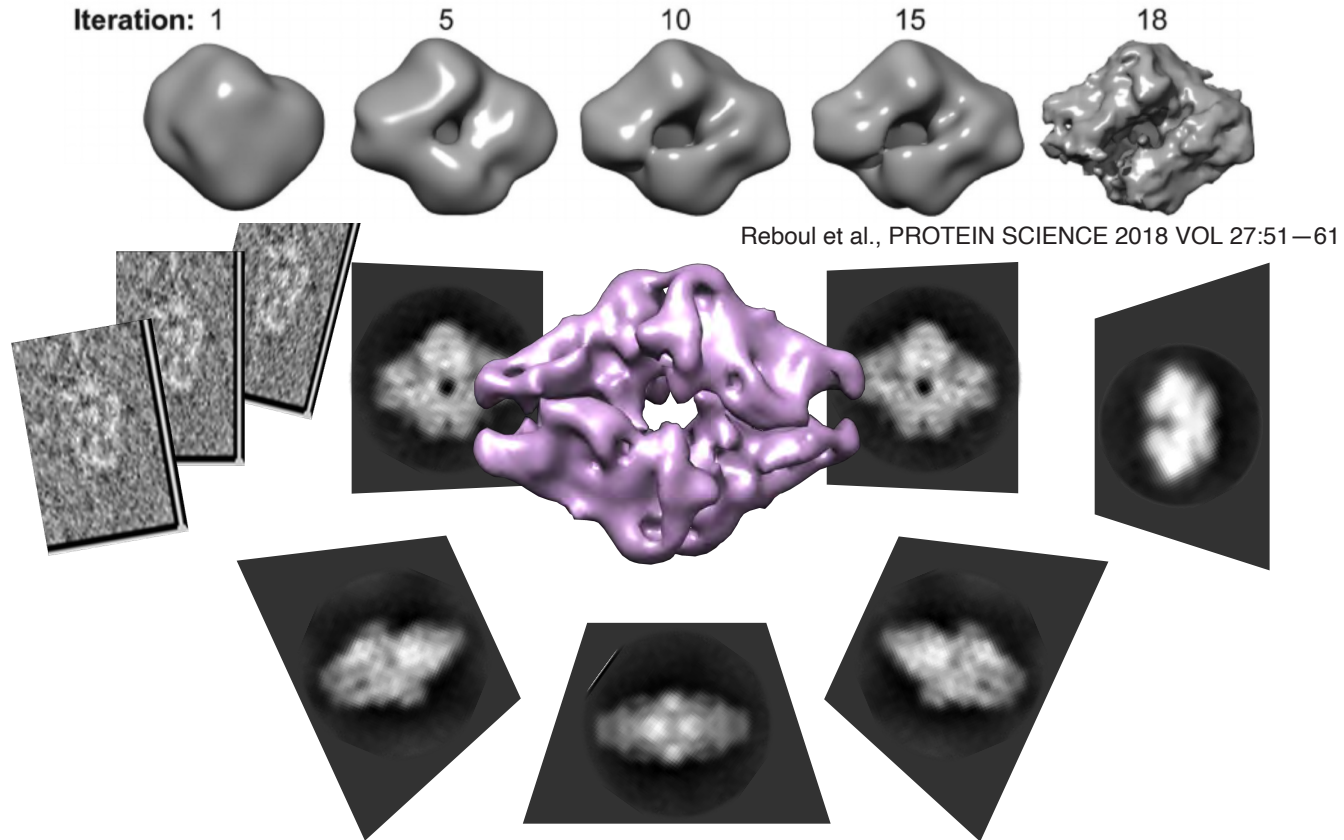
- 二次元**投影**像のフーリエ変換（下段）は、三次元密度マップのフーリエ変換（上段）の中心を通る**断面**。

# 二次元投影像からの三次元再構成



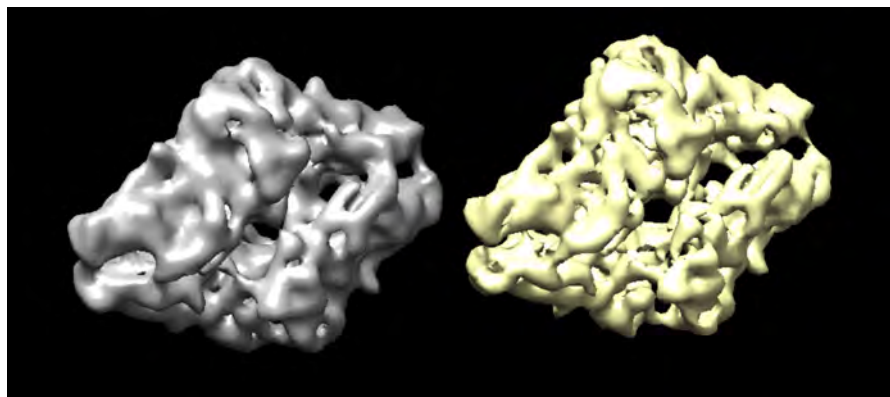
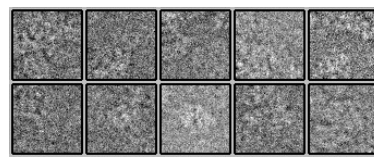
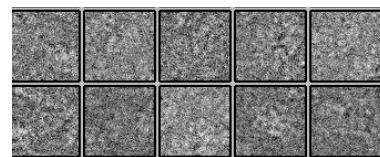
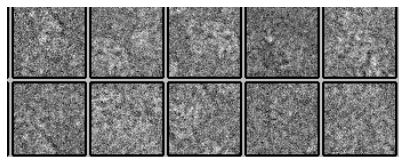
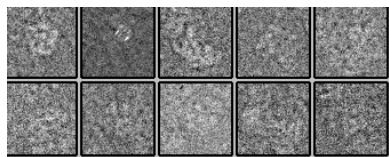
- Prepare a similar initial 3D structure and projections are calculated (B)
- Find best match for each extracted particle (C)
- directions of each particles for 3D structure are estimated (D)
- Each slices are placed and reconstruct the 3D Fourier space (E)
- Transform to new real 3D structure
- Improved 3D structure is used (B)

# 粒子の三次元再構成: 反復的に改善する



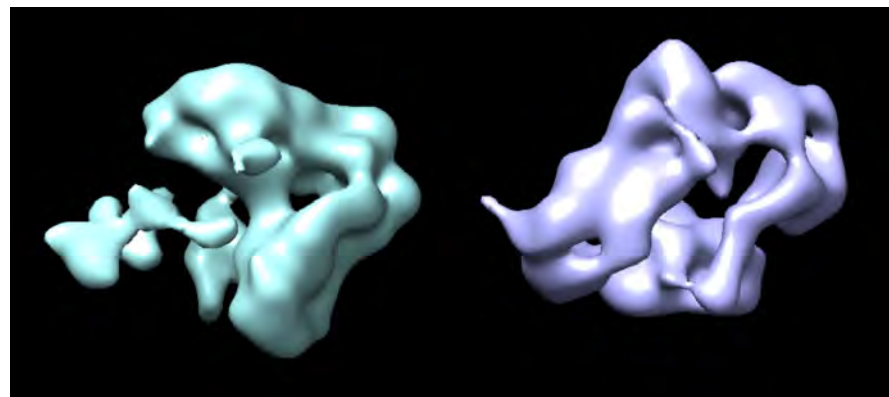
# 3D classification

---



45%

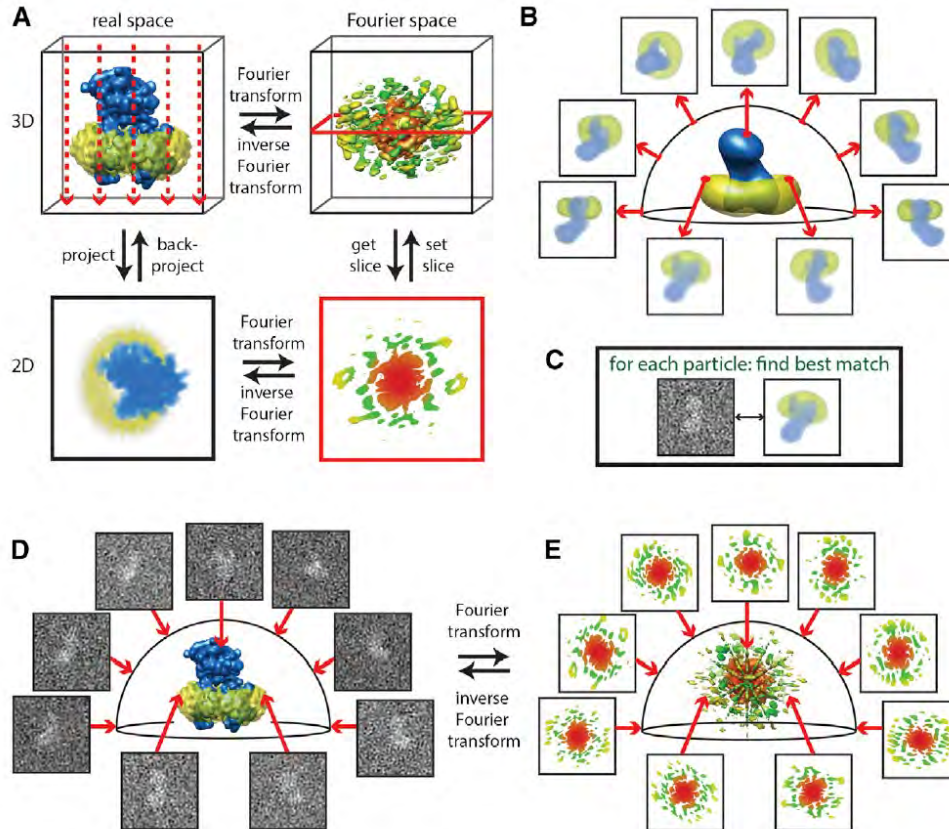
45%



5%

5%

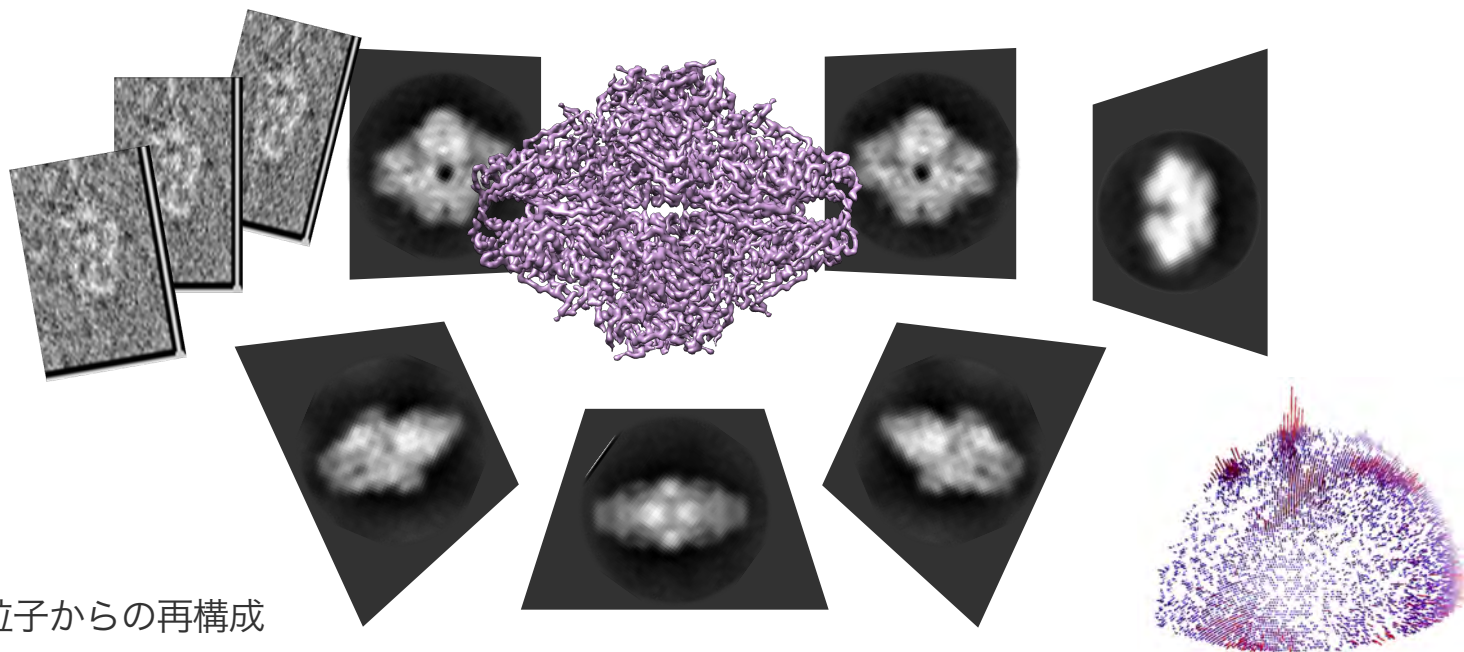
# 二次元投影像からの三次元再構成



- Prepare a similar initial 3D structure and projections are calculated (B)
- Find best match for each extracted particle (C)
- directions of each particles for 3D structure are estimated (D)
- Each slices are placed and reconstruct the 3D Fourier space (E)
- Transform to new real 3D structure
- Improved 3D structure is used (B)
- Angular search becomes more finer

# 三次元再構成マップの精密化

---

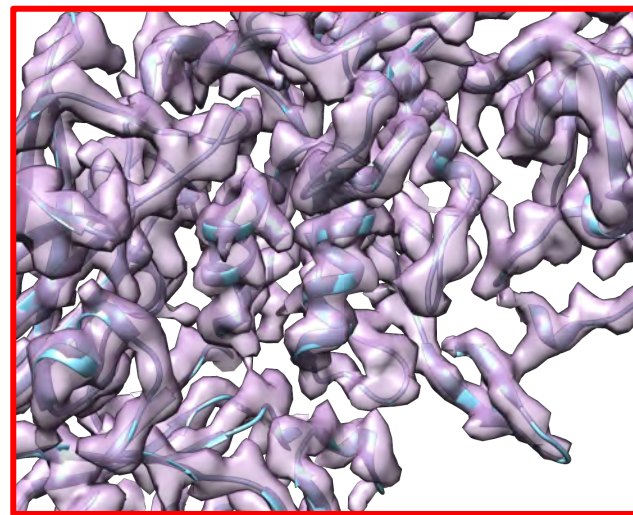
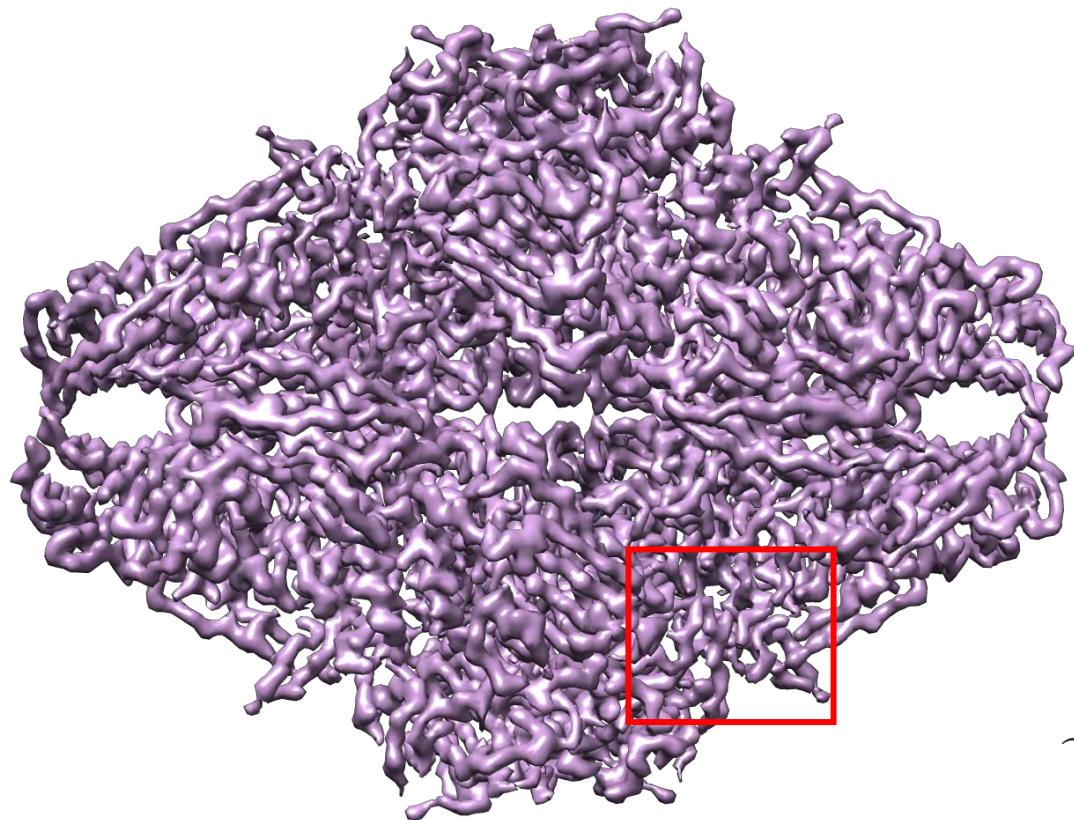


～5,000粒子からの再構成

全ての二次元投影像について、できる限り精密に方位を決定する

# 最終マップと分子モデルの重ね合わせ

---



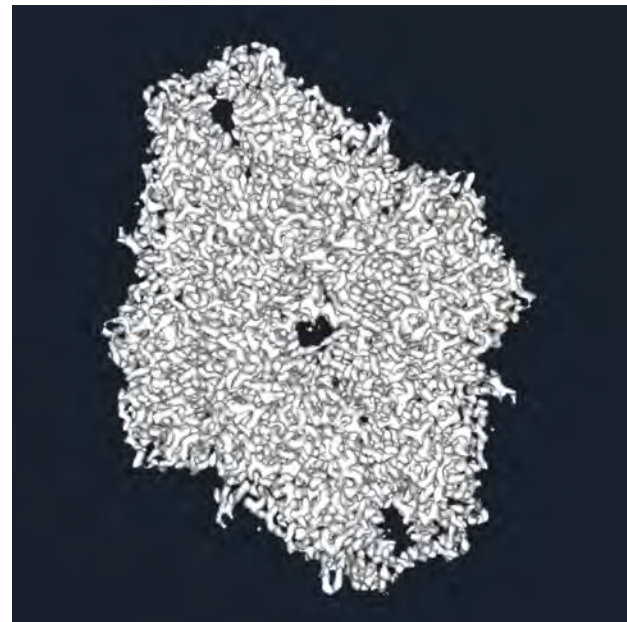
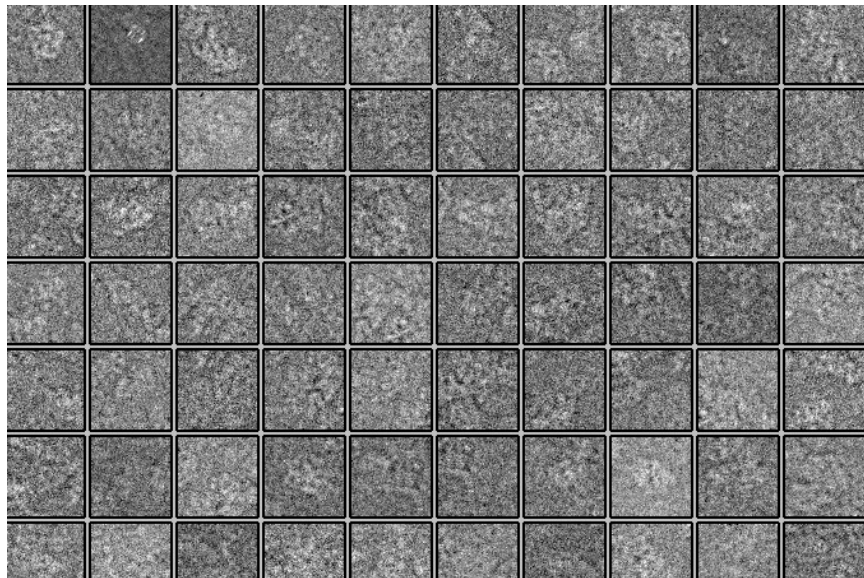
~3 Å分解能



# 粒子のab-initio三次元再構成

---

観測されたあらゆる方向からの粒子の投影像を、すべて説明できる立体構造は？



# 粒子のab-initio三次元再構成

---

## # 実装の詳細

*CryoSPARC* の ab initio 再構築アルゴリズムの完全な説明については、[添付の論文](#)をご参照ください。

単一粒子分析における体積生成の問題は、次のように大まかに述べることができます。入力画像の集合が与えられた場合、どの体積がそれらの画像を生成した可能性が最も高いですか？この質問はさらに2つの部分に細分化できます。

- ボリュームと画像のセットが与えられた場合、各画像におけるボリュームの最も可能性が高いポーズは何ですか？
- 画像のセットと向きのセットが与えられた場合、画像をより写しやすくするために、どのように音量を改善できますか？

<https://guide.cryosparc.com/processing-data/all-job-types-in-cryosparc/3d-reconstruction/job-ab-initio-reconstruction>  
より、自動翻訳

# 粒子のab-initio三次元再構成

---

## Implementation Details

*For a full description of CryoSPARC's ab initio reconstruction algorithm, see the [accompanying paper](#).*

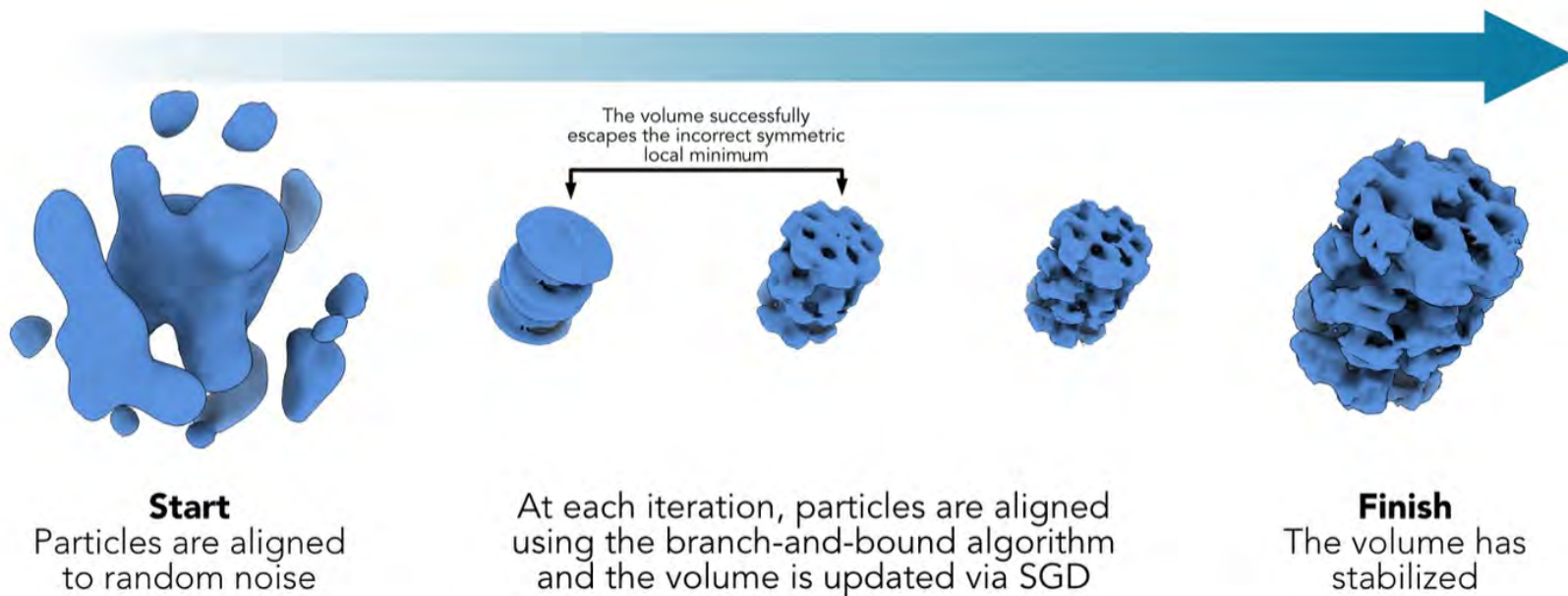
The problem of volume generation in single particle analysis can be stated in broad terms as follows: given a set of input images, what volume most likely produced those images? This question can be further subdivided into two parts:

- Given a volume and a set of images, what is the most likely pose of the volume in each image?
- Given a set of images and a set of orientations, how can we improve the volume to make the images more likely?

### ∨ What is a pose?

In cryoEM image processing, a pose is a set of five numbers: three describe the rotation of the volume in 3D space, and two describe the X- and Y-shifts of the volume (to account for imperfect centering of the extracted particle image). Searching for the correct pose is thus a 5D problem that needs to be solved for each particle image, and therefore can become very computationally expensive.

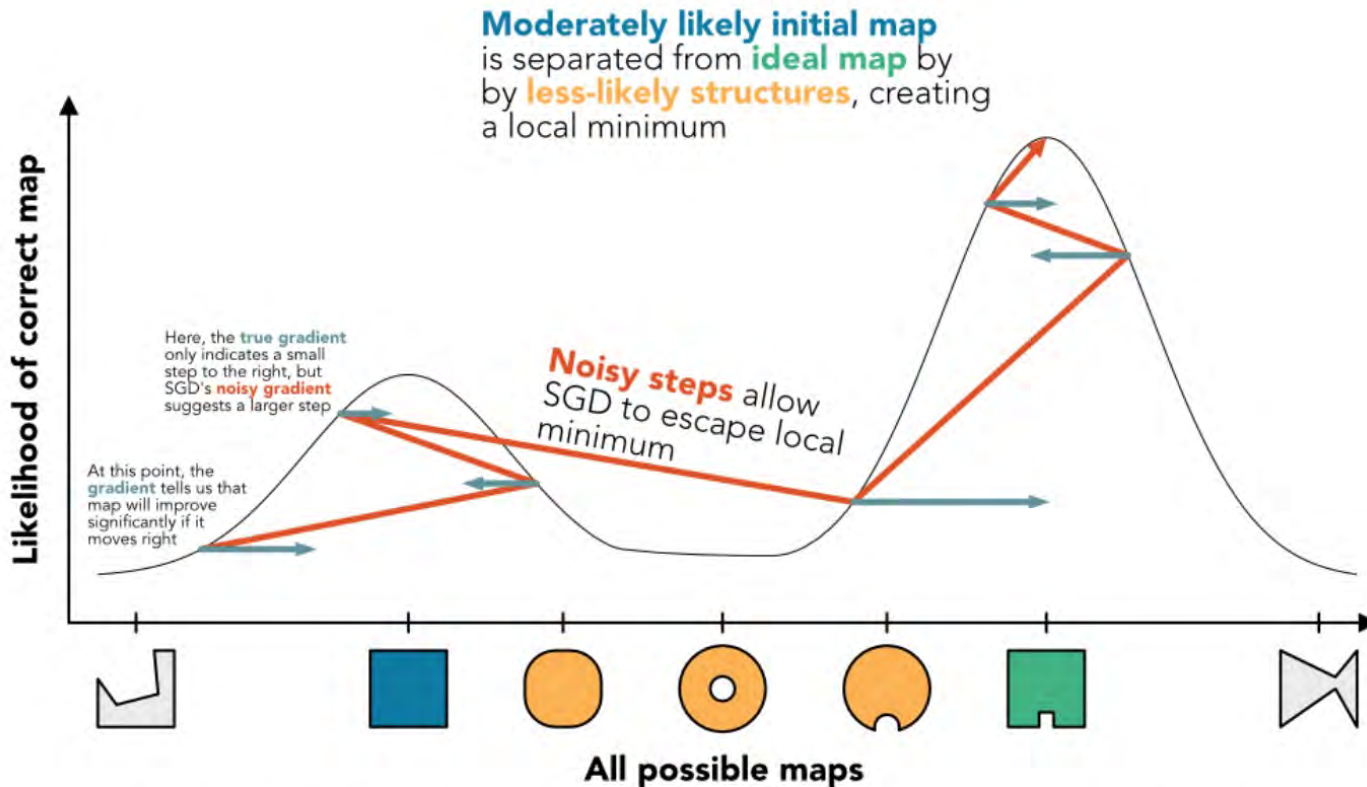
# 粒子のab-initio三次元再構成



The evolution of the volume during an *ab initio* reconstruction job.

# Local minimumをどう克服するか: SGD (確率的勾配降下)

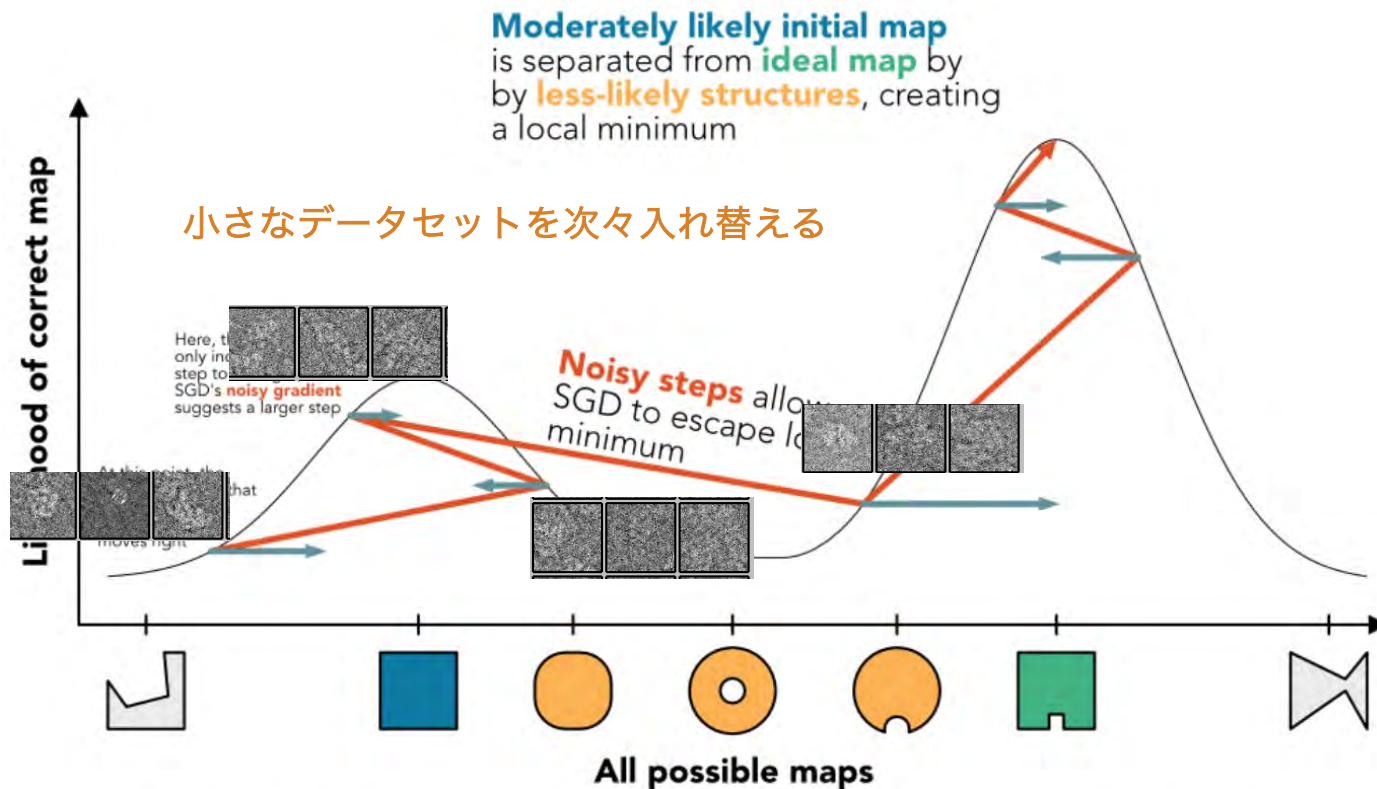
SGD: stochastic gradient descent \*機械学習とかの分野ではおなじみの手法らしい。



Stochastic gradient descent prevents *ab initio* reconstruction from becoming trapped in local minima.

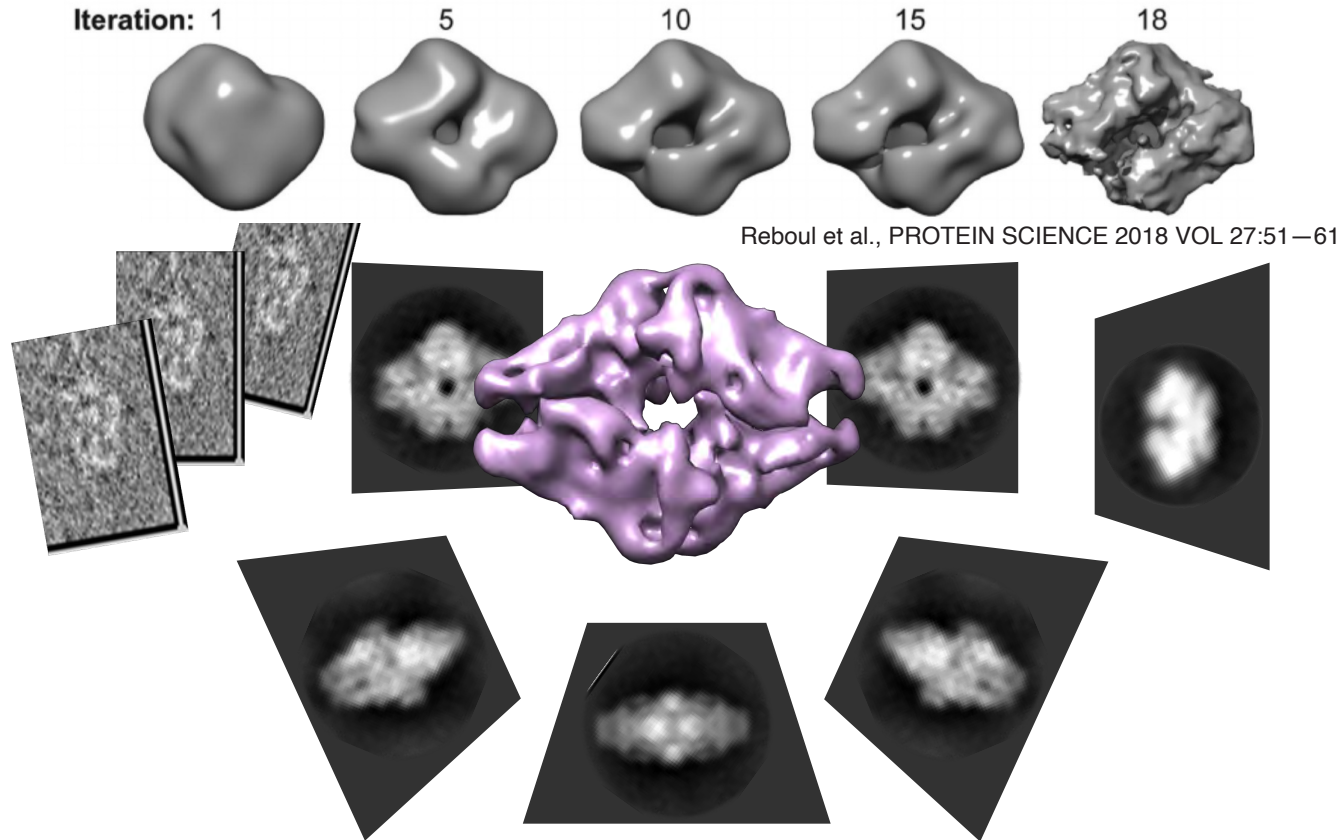
# Local minimumをどう克服するか: SGD (確率的勾配降下)

SGD: stochastic gradient descent



Stochastic gradient descent prevents *ab initio* reconstruction from becoming trapped in local minima.

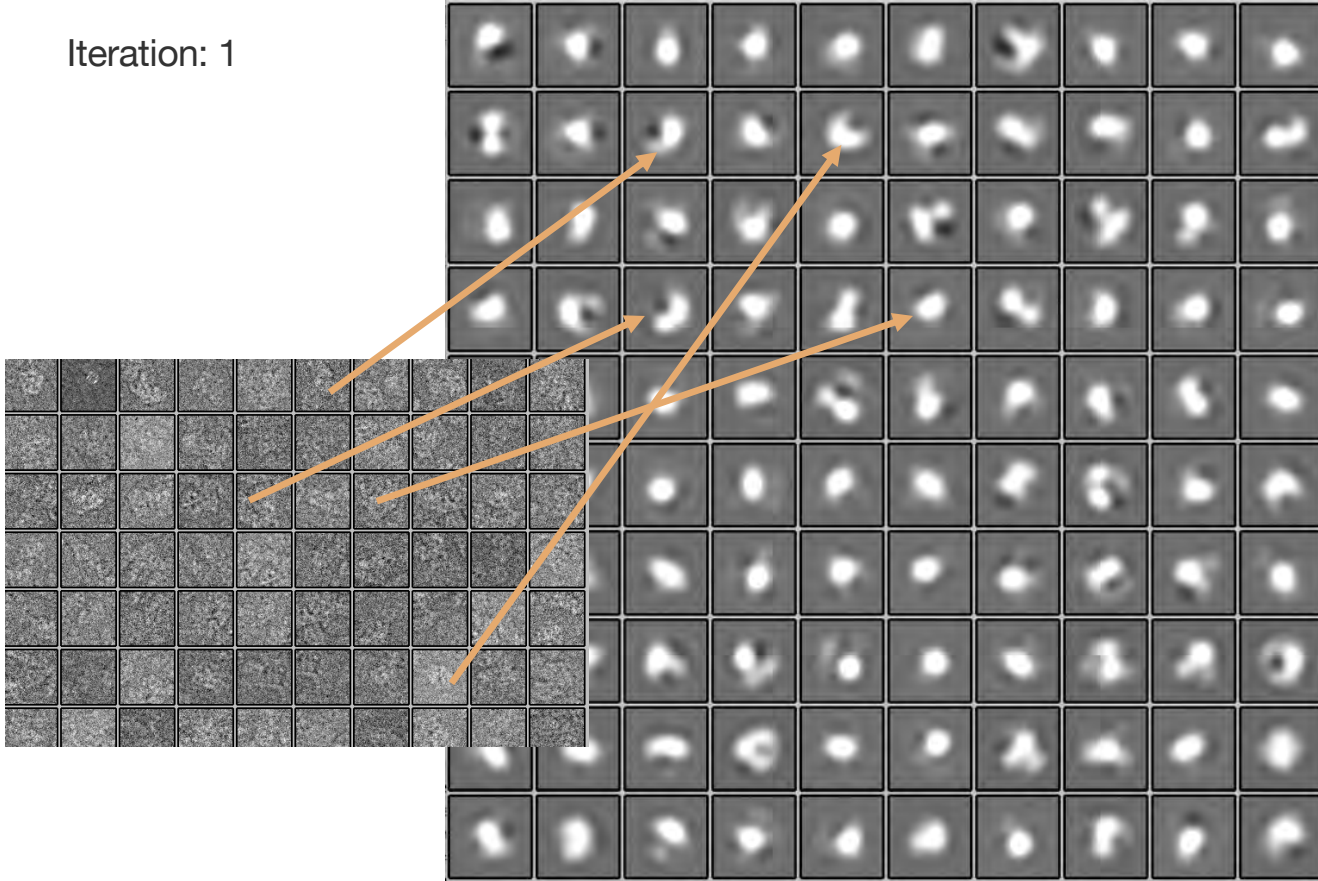
# 粒子の三次元再構成



# 2D classification –iterative improvement–

---

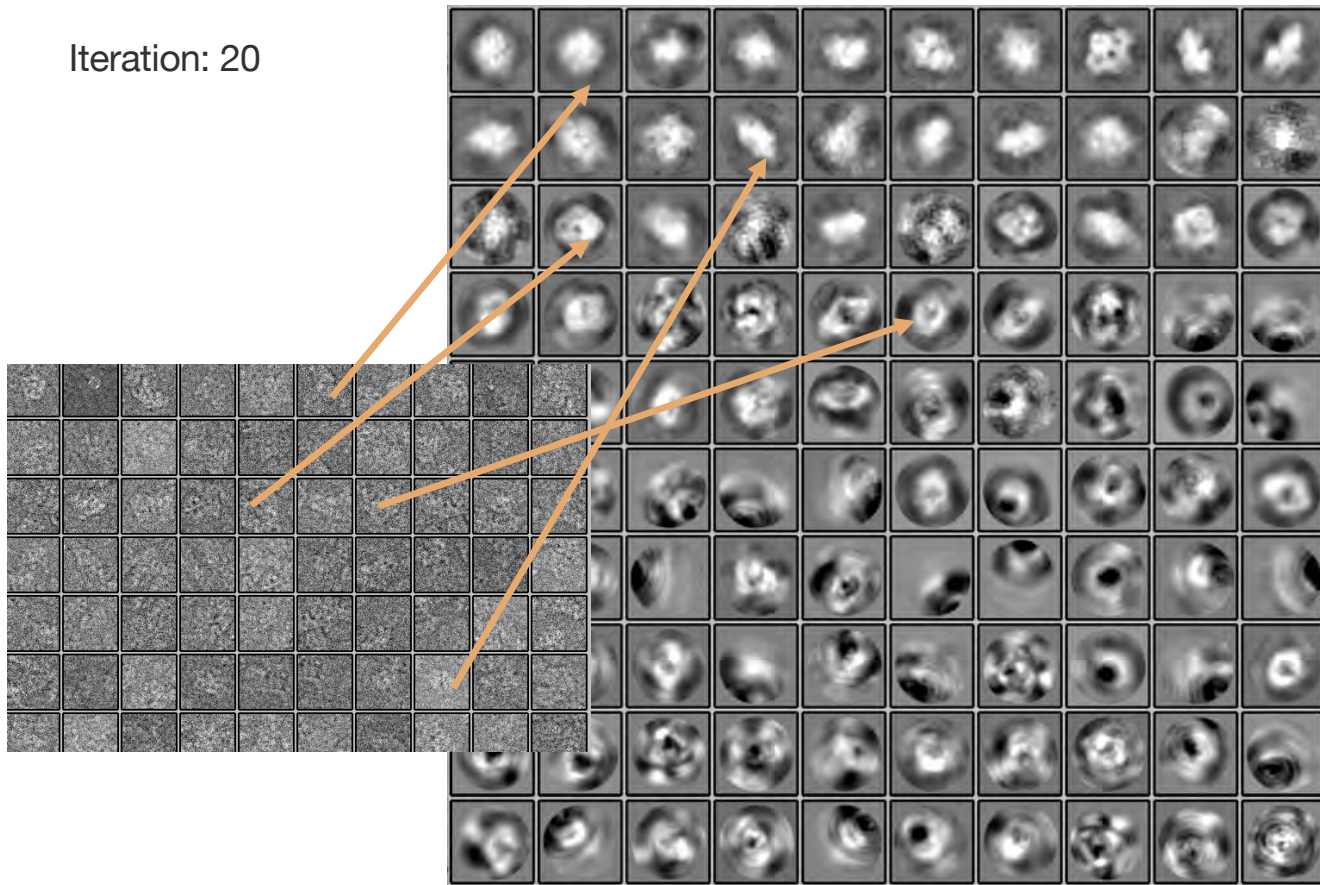
Iteration: 1



# 2D classification –iterative improvement–

---

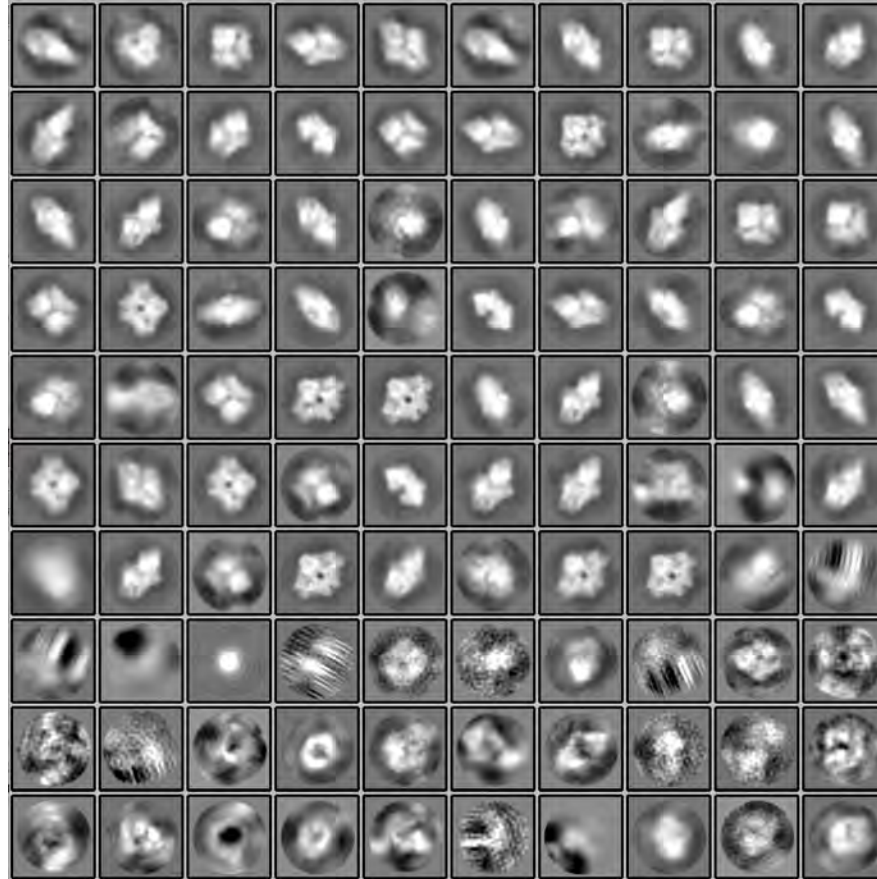
Iteration: 20



# 2D classification –iterative improvement–

---

Iteration: 80





# 電子線の散乱

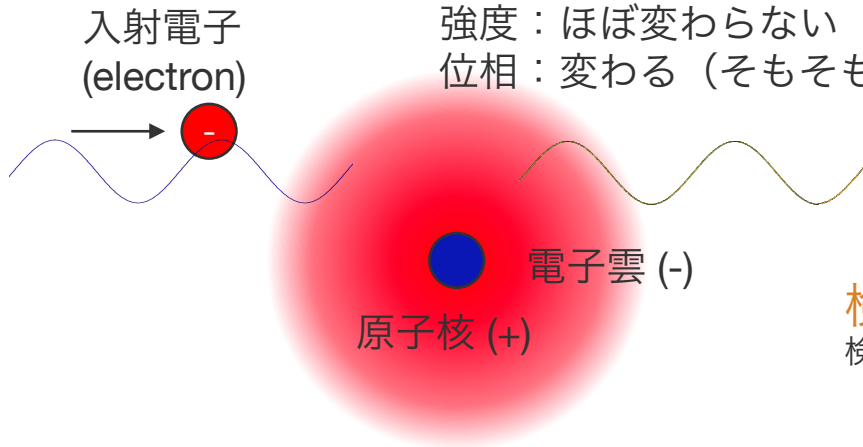
---

静電ポテンシャル  
による散乱

波長：変わらない

強度：ほぼ変わらない（軽原子では観測出来ないほど微弱）

位相：変わる（そもそも観測出来ない）



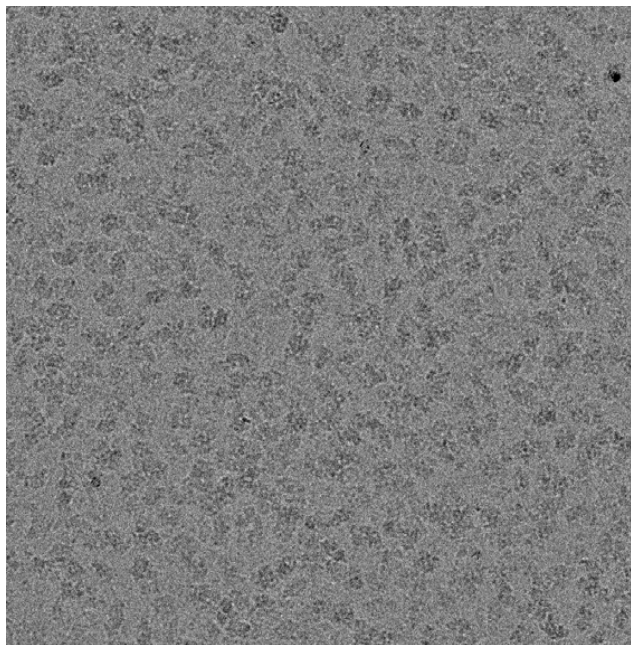
**検出器に何も映らない！**

検出器は電子の強度（飛んできた電子の数）を記録しているだけ。

# Contrast Transfer Function (CTF)

---

実際は映っている（映るようにしている）



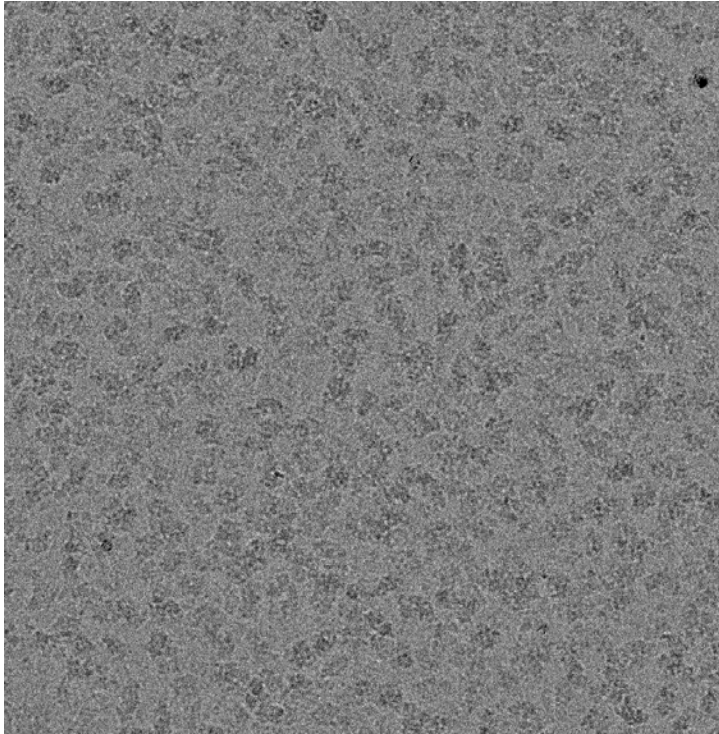
## ■ 位相の差が強度の差に変換されている

- 光学系の収差などによる
- フォーカスを外している (defocus)
- CTFとして表現される

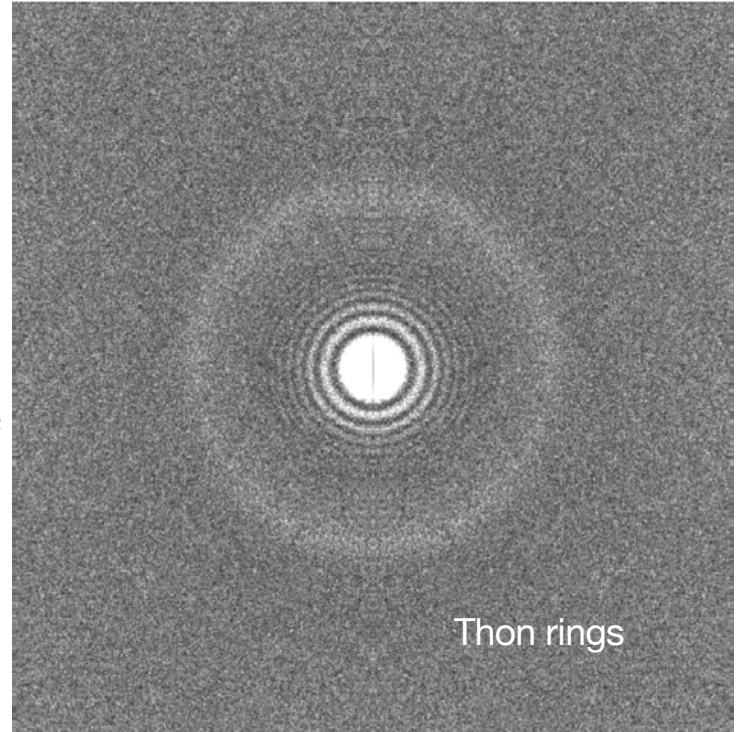
$$T(k) = -\sin \left[ \frac{\pi}{2} C_s \lambda^3 k^4 + \pi \Delta f \lambda k^2 \right]$$

# CTFの影響

---



→  
フーリエ変換



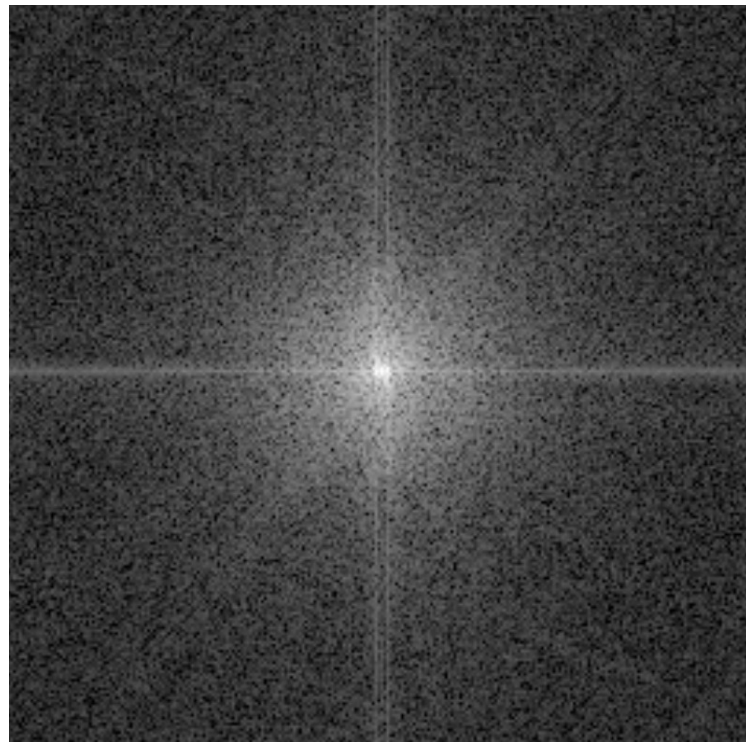
# 通常のカメラでとった写真

---



iPhone 12 mini

→  
フーリエ変換

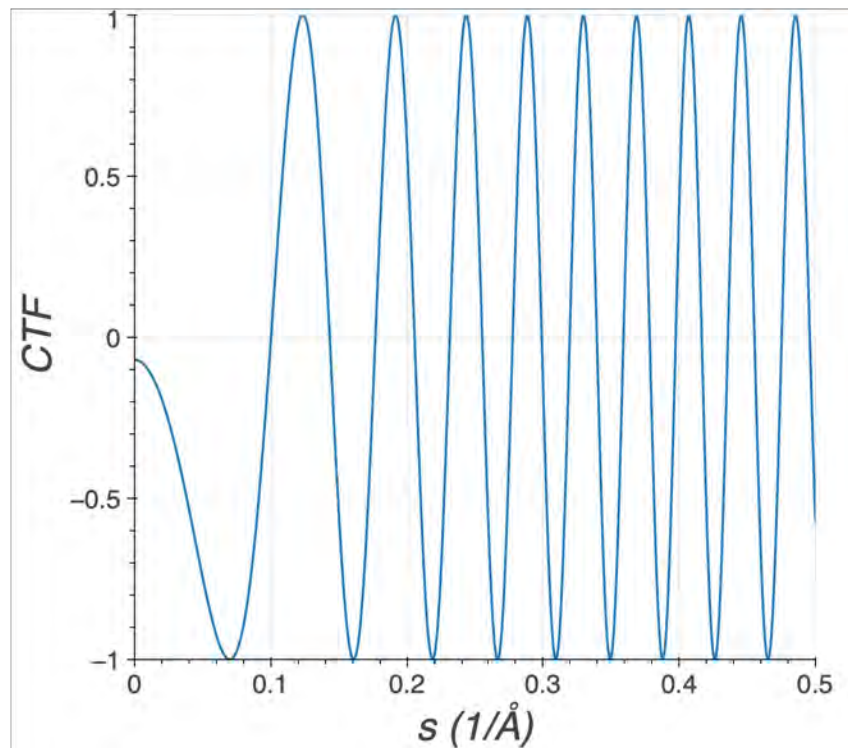


Calculated by  
<https://monman53.github.io/demos/2dff/>

# Contrast Transfer Function (CTF)

$$T(k) = -\sin\left[\frac{\pi}{2}C_S\lambda^3k^4 + \pi\Delta f\lambda k^2\right]$$

k: 空間周波数  
C<sub>S</sub>: レンズの球面収差  
λ: 周波数  
Δf: defocus量



Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

# Contrast Transfer Function (CTF)

---

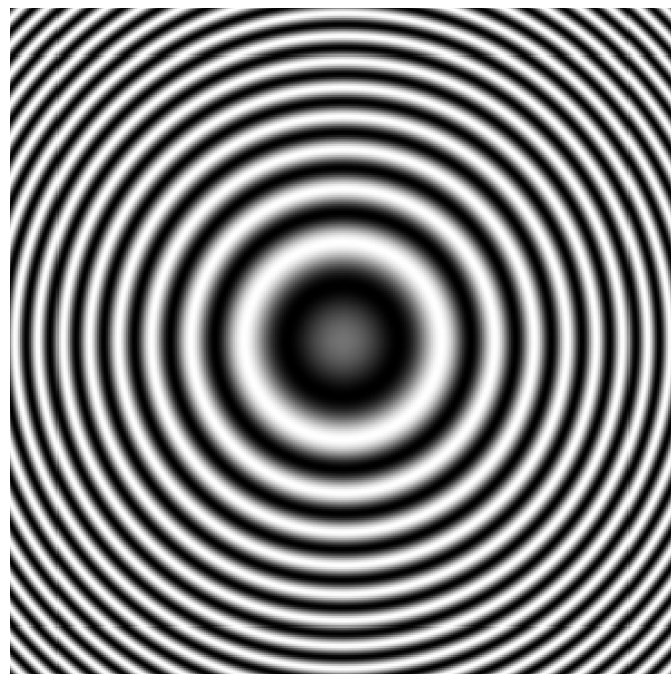
$$T(k) = -\sin\left[\frac{\pi}{2}C_S\lambda^3k^4 + \pi\Delta f\lambda k^2\right]$$

k: 空間周波数

$C_S$ : レンズの球面収差

$\lambda$ : 周波数

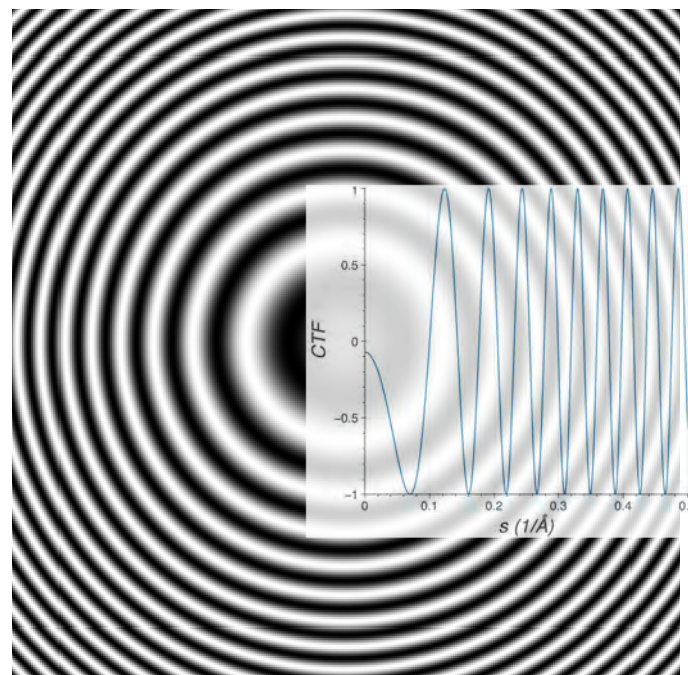
$\Delta f$ : defocus量



# Contrast Transfer Function (CTF)

$$T(k) = -\sin\left[\frac{\pi}{2}C_S\lambda^3k^4 + \pi\Delta f\lambda k^2\right]$$

k: 空間周波数  
C<sub>S</sub>: レンズの球面収差  
λ: 周波数  
Δf: defocus量

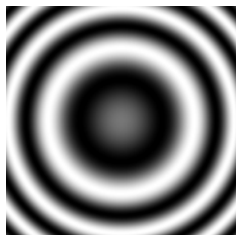
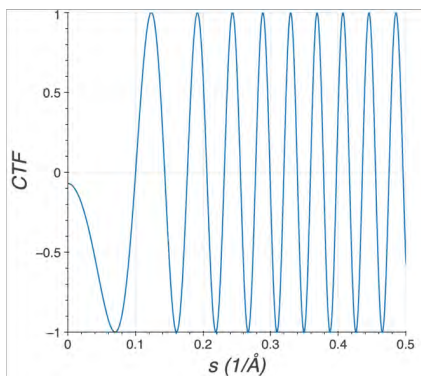


# Contrast Transfer Function (CTF)

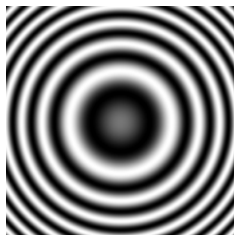
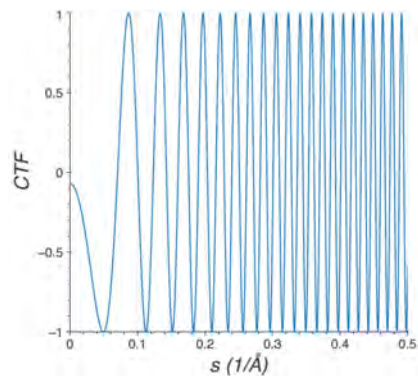
$$T(k) = -\sin\left[\frac{\pi}{2}C_S\lambda^3k^4 + \pi\Delta f\lambda k^2\right]$$

$\Delta f$ : defocus量

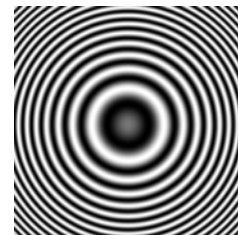
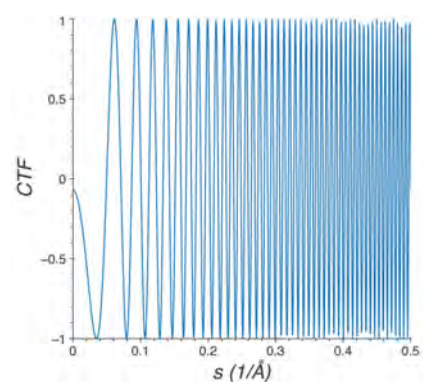
$\Delta f = 0.5 \mu\text{m}$



$\Delta f = 1 \mu\text{m}$



$\Delta f = 2 \mu\text{m}$



# Defocus量と画像のコントラスト

---

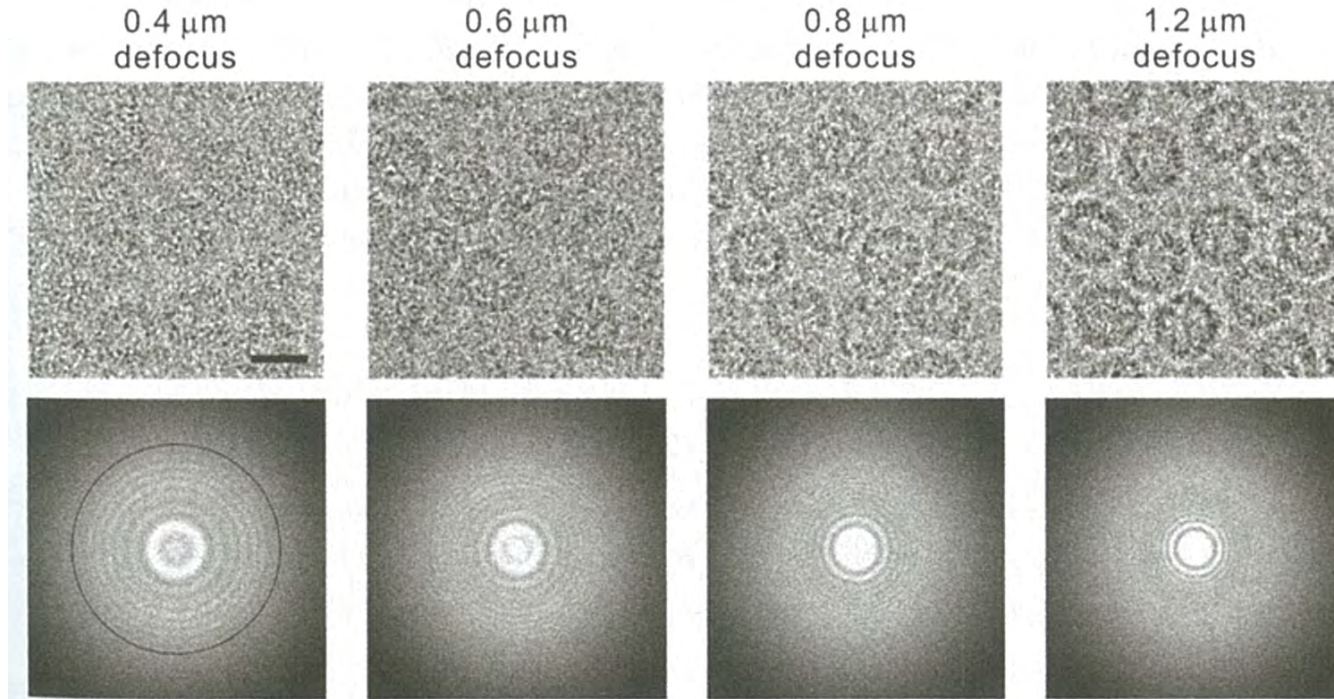
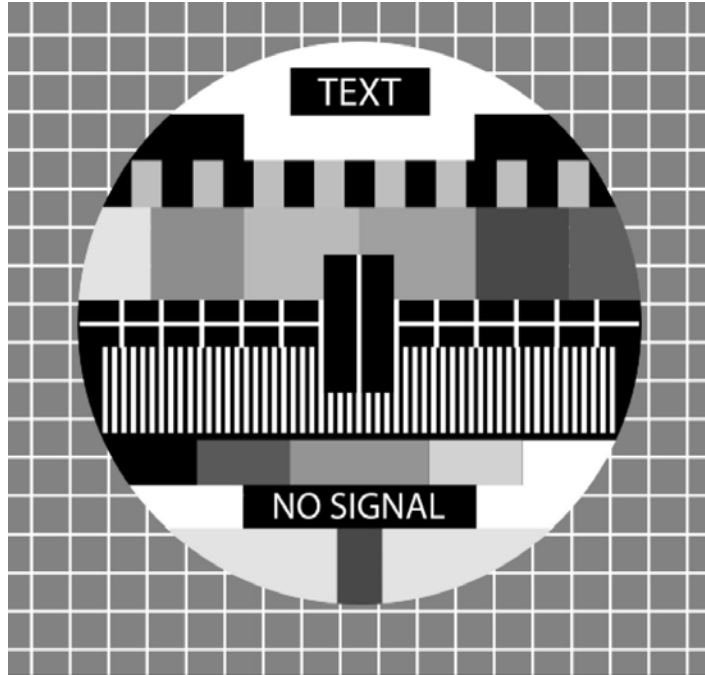


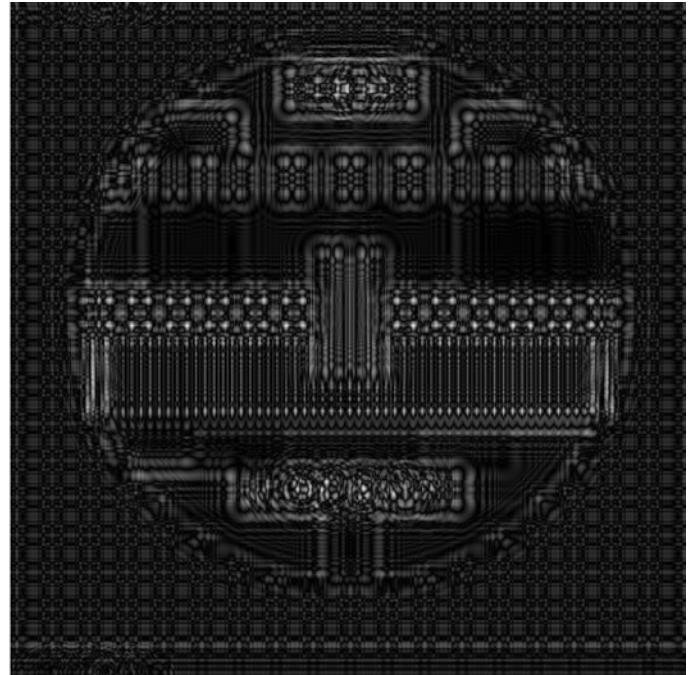
Figure 3.6. Single-particle Cryo-EM of Biological Macromolecules (Biophysical Society 2021)

# CTFの影響



CTF

Defocus = 1  $\mu\text{m}$

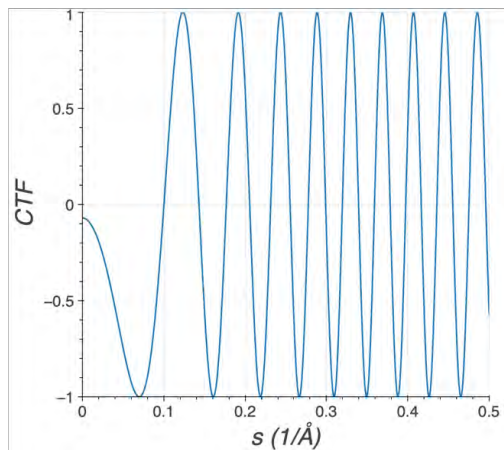


Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

# CTFと減衰関数 (envelop function)

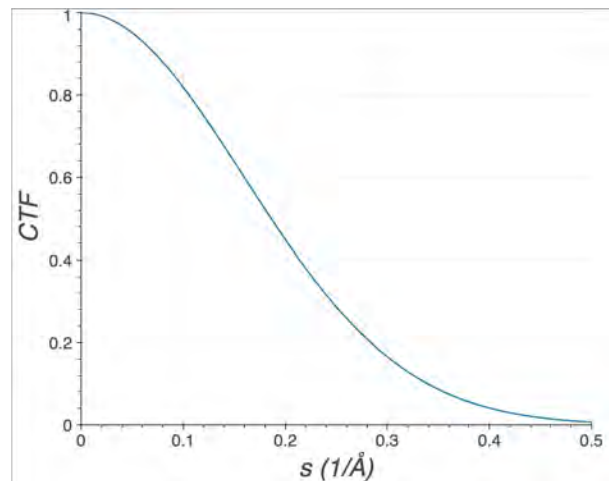
$$T(k) = -\sin\left[\frac{\pi}{2}C_S\lambda^3k^4 + \pi\Delta f\lambda k^2\right]$$

k: 空間周波数  
C<sub>S</sub>: レンズの球面収差  
λ: 周波数  
Δf: defocus量



$$E(k) = e^{-B}$$

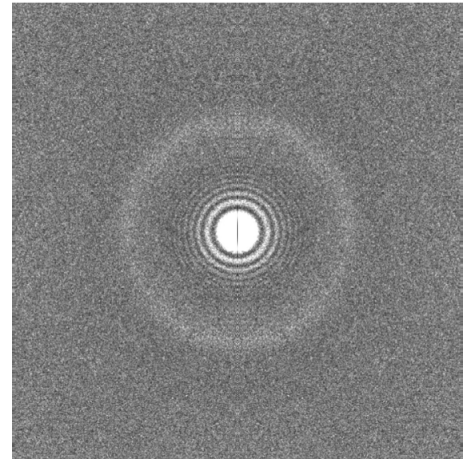
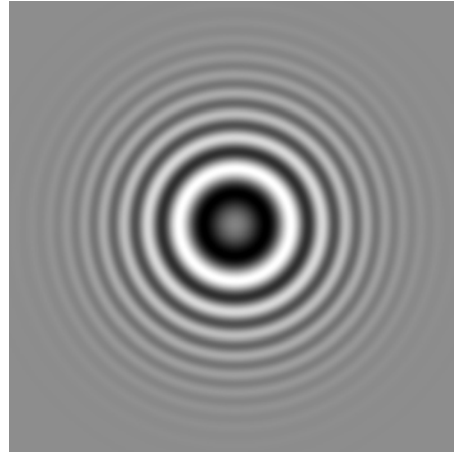
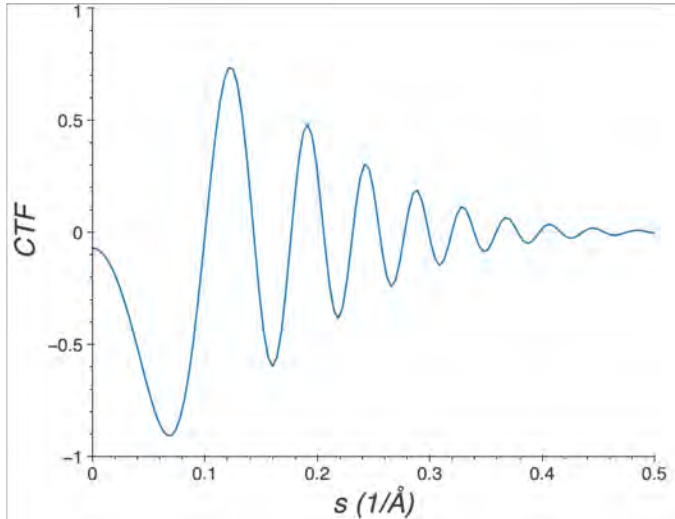
B: defocusに由来する減衰と  
電子線の干渉性由来の減衰



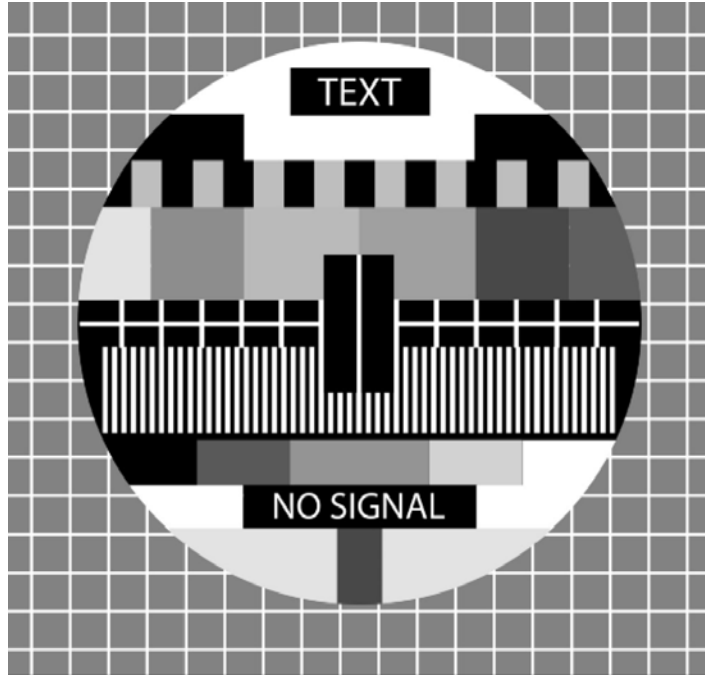
# CTFと減衰関数 (envelop function)

---

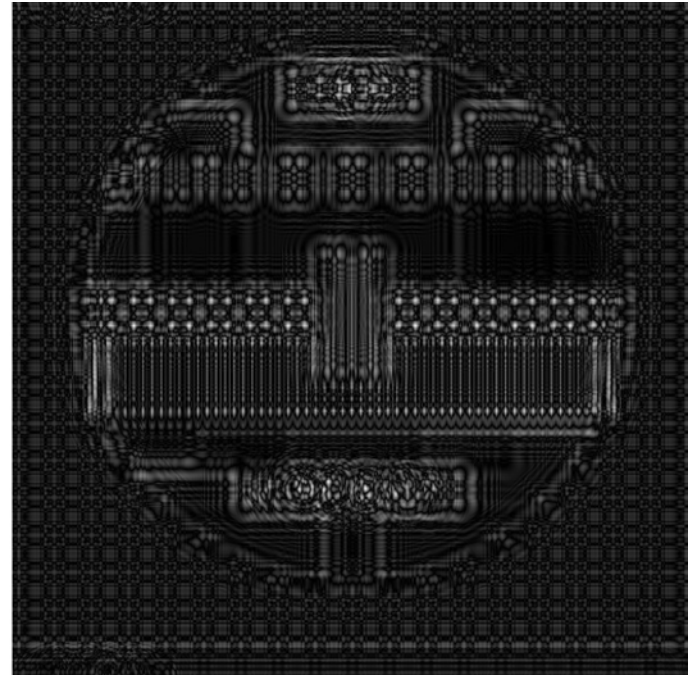
$$T(k)E(k) = -\sin\left[\frac{\pi}{2}C_S\lambda^3k^4 + \pi\Delta f\lambda k^2\right]e^{-B}$$



# CTFの影響

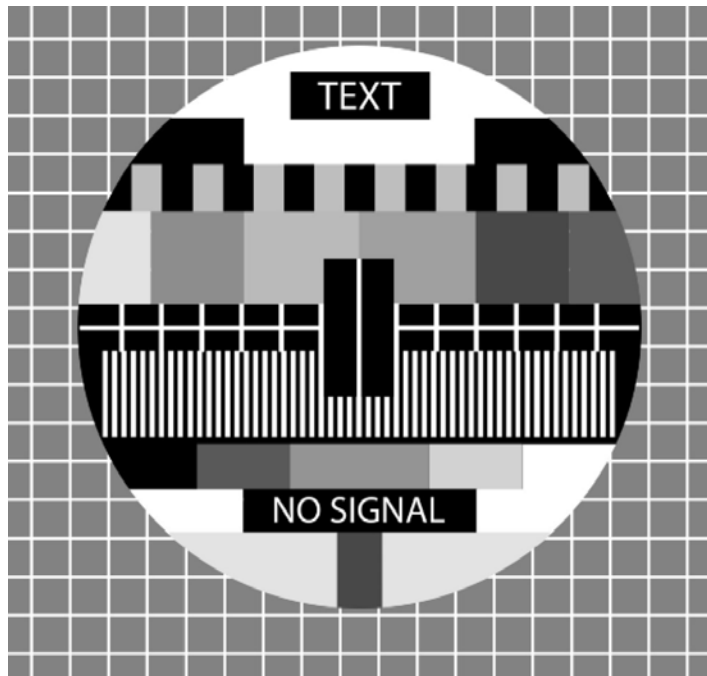


Defocus = 1  $\mu\text{m}$

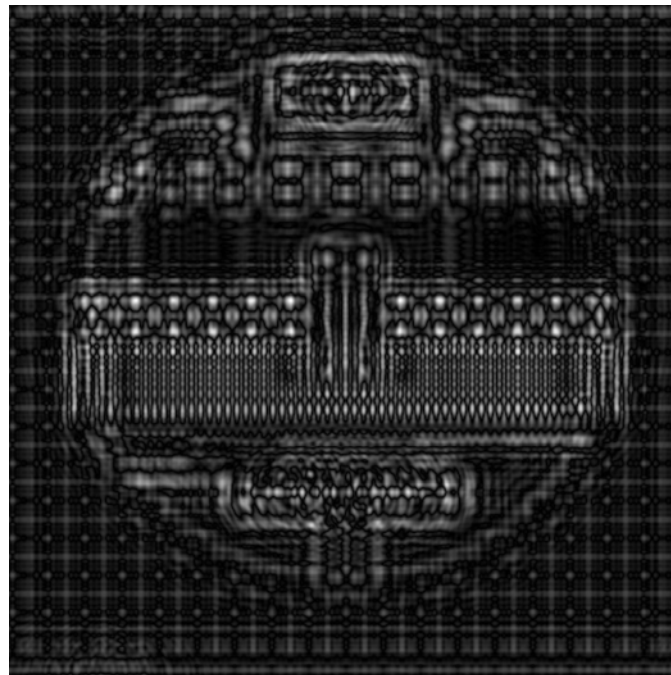


Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

# CTFと減衰関数の影響



Defocus = 1  $\mu\text{m}$ ,  $B = 80$

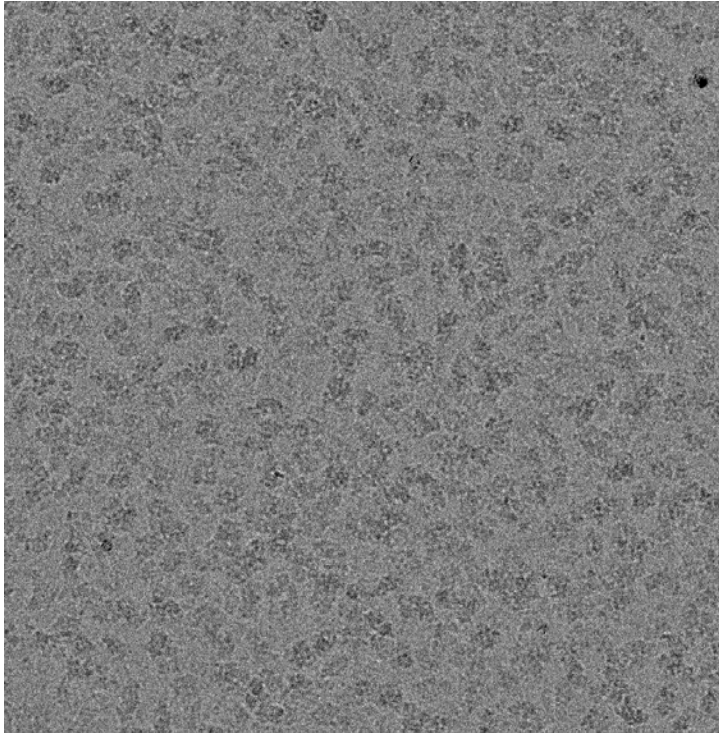


CTF  
envelop

Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

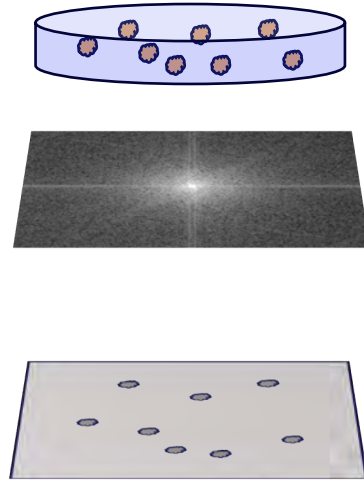
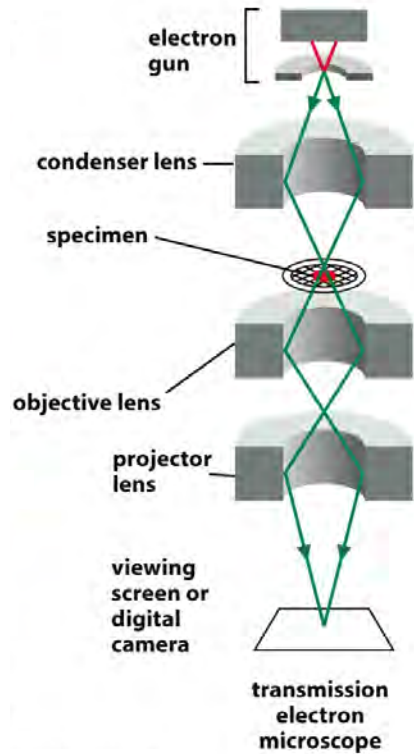
# 電顕像はCTFの影響で歪んだ像

---



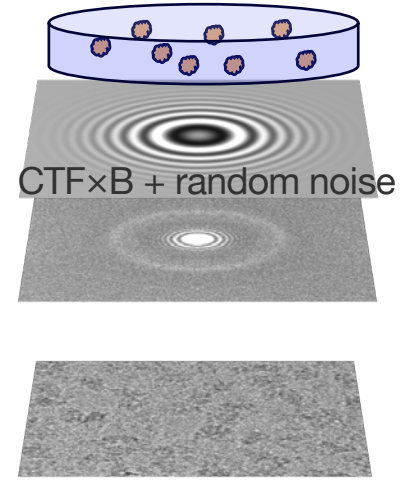
- コントラストが正しくない
  - そのおかげで粒子が見えている
- 高分解能側のコントラストほど不正確
  - CTFにより高分解能側を犠牲にして低分解能側を強調している
  - 高分解能側は減衰している

# 電顕像はCTFの影響で歪んだ像

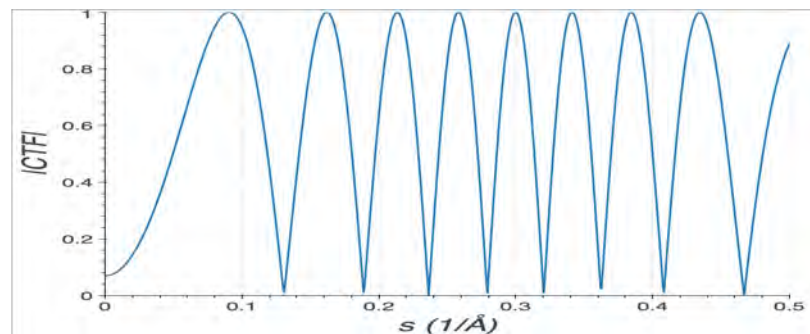
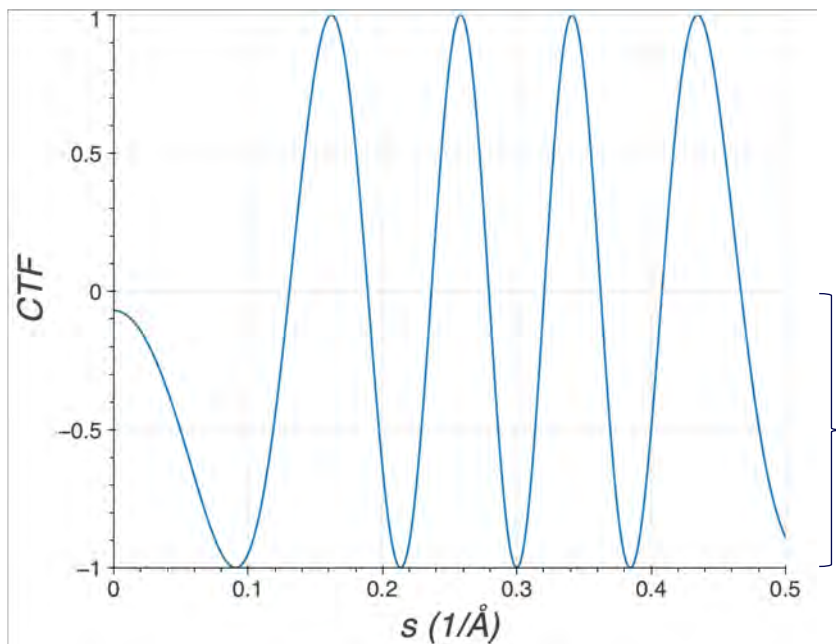


FT

FT<sup>-1</sup>

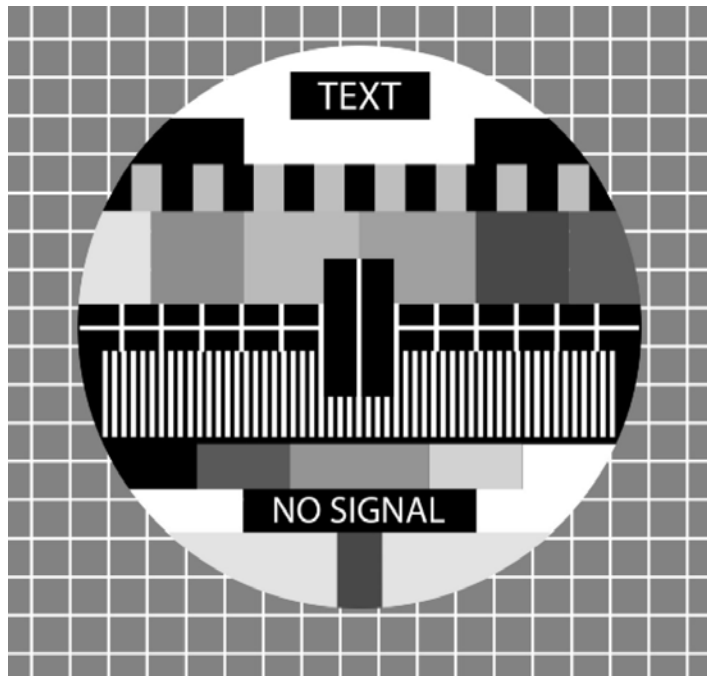


# CTFの補正：phase flip



負の値に-1をかけて反転  
(phase flip)

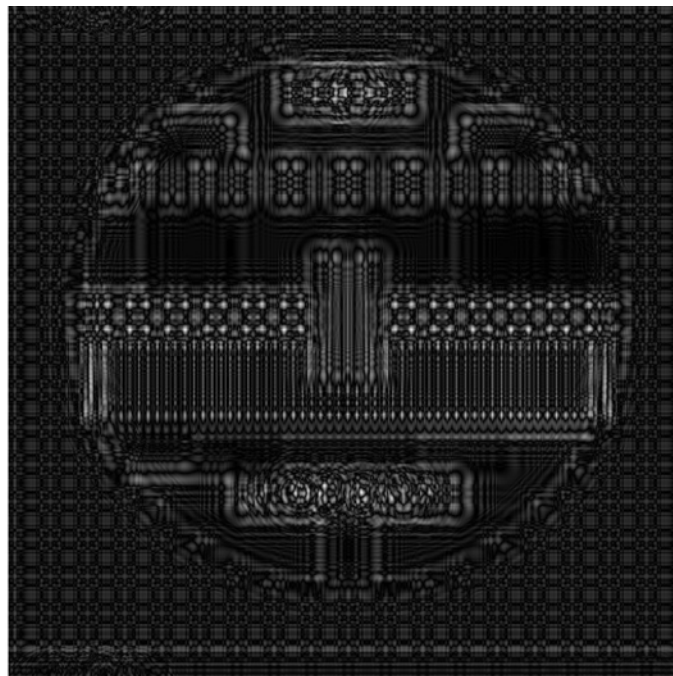
# CTFの補正：phase flip



CTF

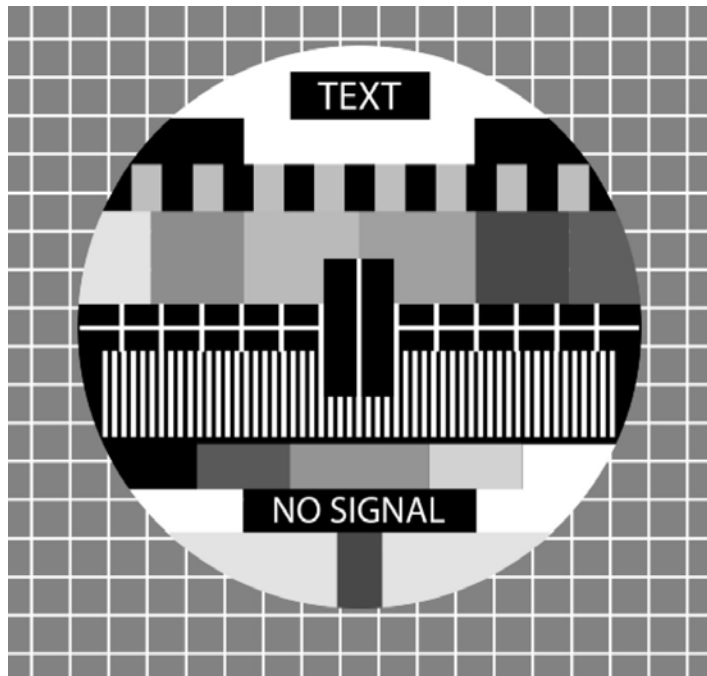
Defocus = 1  $\mu\text{m}$

補正前



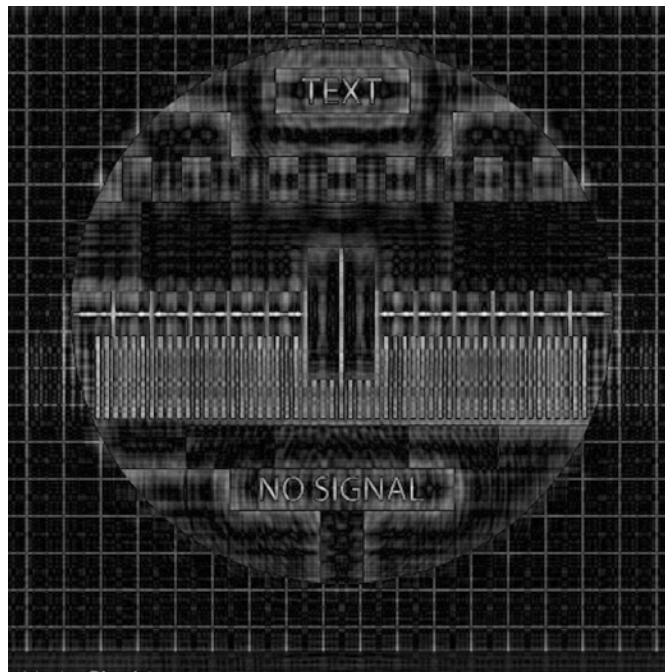
Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

# CTFの補正：phase flip



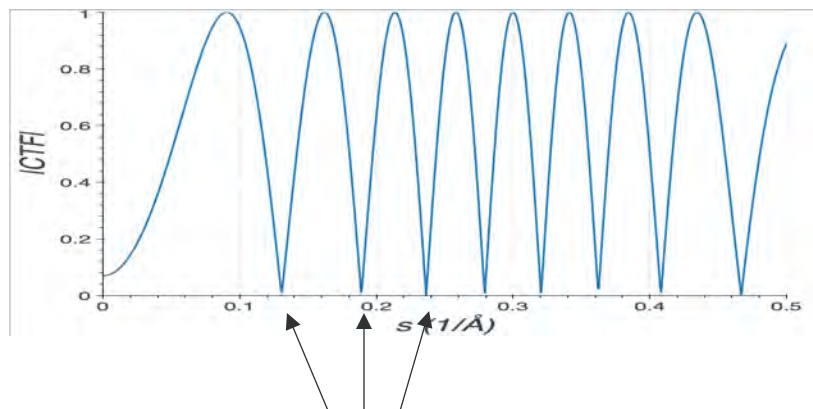
CTF

Defocus = 1  $\mu\text{m}$       補正 (phase flip) 後

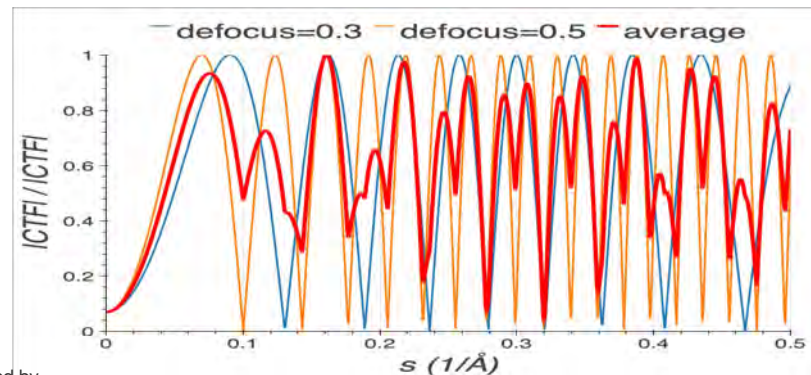
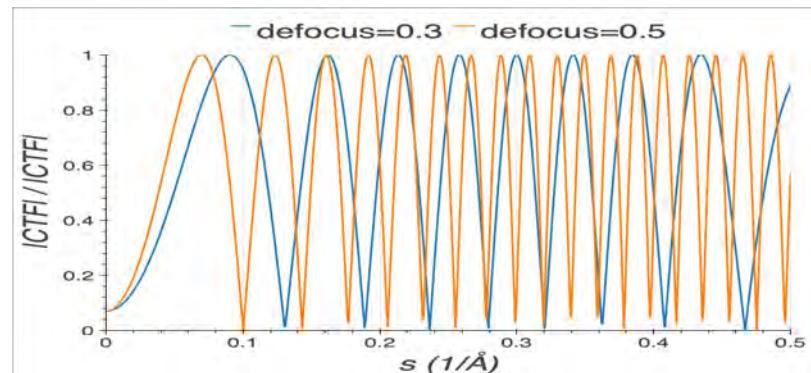


Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

# CTFの補正：異なるdefocus量

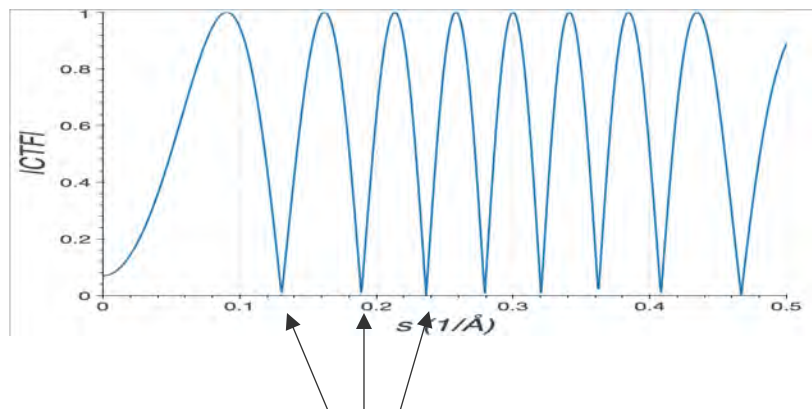


0の値が残る



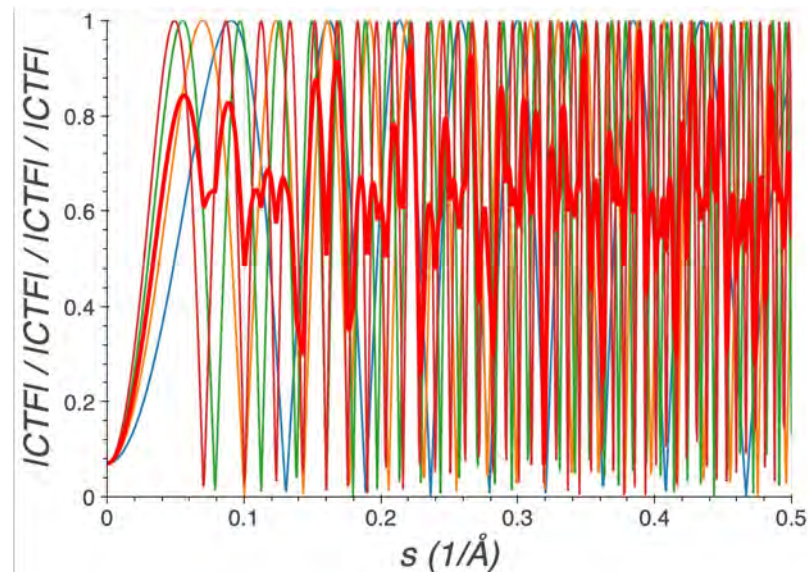
Calculated by  
<https://jianglab-ctfsimulation-streamlit-app-of60di.streamlitapp.com>

# CTFの補正：異なるdefocus量



0の値が残る

Defocus = 0.3, 0.5, 0.8, and 1  $\mu\text{m}$



Defocus量を変化させて撮影する

# CTFの補正：補足

減衰関数の効果も同時に考慮する

