

X線自由電子レーザーによる
生体高分子の
高分解能構造解析法にむけて

理研・播磨
基礎科学特別研究員
徳久 淳師

謝辞

➤ 構造解析アルゴリズムの開発

郷信広 名誉教授(京大)、河野秀俊 博士(原子力機構)

➤ 京への実装

初井宇記 博士(理研)、城地保昌 博士(JASRI)、石川裕 教授(東大)、
新井淳也 氏(東大)、堀敦史 博士(理研)、亀山豊博士(理研)、
大野善之(理研)、畑中正行博士(理研)、山本啓二博士(理研)、
ゲローフィ・バリ博士(理研)、黒川 原佳博士(理研)、
庄司文由 博士(理研)、 島田明男博士(理研)

➤ 放射線損傷の評価

甲斐健師 博士(原子力機構)、森林健悟 博士(原子力機構)

謹んで感謝いたします

アウトライン

- **高分解能単粒子構造解析の概要**
 - コヒーレントイメージングの1手法
- **開発したアルゴリズムの説明**
 - 回折像の分類・平均法(S/N比の向上)
 - 回折像の相対位置の決定法(3次元強度関数の構築)
- **達成可能な分解能の見積もり**
 - 適した実験条件を考えるための指標
 - 原子分解能の達成が視野
- **大量の回折像を分類するための取り組み**
 - 回折像類似度の自動判定法→感度も向上
 - 京コンピュータへのアルゴリズムの実装
- **放射線損傷の影響**
 - 解析法へ与える影響
 - 損傷を抑えるための実験条件

数値シミュレーションによるアプローチ

X線自由電子レーザー(XFEL)



フェムト秒X線パルスレーザーを発振する

- 高い空間コヒーレンス
- 短パルス幅(SPring-8の1,000分の1, ~10fs)
 - 高ピーク輝度(SPring-8の 10^9 倍,
設計値 = 5×10^{11} [photons/pulse])

Ishikawa, T. et al. *Nature Photon.* 6, 540-544 (2012)

SACLAにおける集光強度の現状

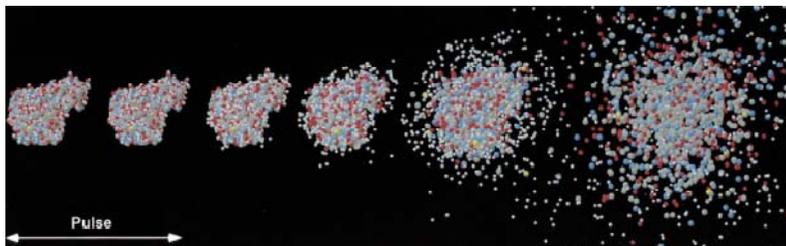
K-Bミラー集光光学系

- 50nm集光装置が設置されコミッショニング中
- 集光強度 $\sim 8 \times 10^{19} [\text{W}/\text{cm}^2]$
(10keV, $5 \times 10^{18} [\text{photons}/\text{pulse}/\text{mm}^2]$)
- X線の取りこぼしをなくせばさらにひと桁向上する見込み

1 μm 集光 : Yamauchi, K. et al. *Nature Photon.*306, PUBLISHED ONLINE (2012)

高分解能単粒子構造解析

“probe-before-destroy”



R. Neutze et al.: *Nature* 406(2000)752

$$\text{散乱強度} : s(\mathbf{k}) = I_i r_c^2 \omega |F(\mathbf{k})|^2$$

Powerful
X-ray laser



生体単粒子

散乱強度が弱い

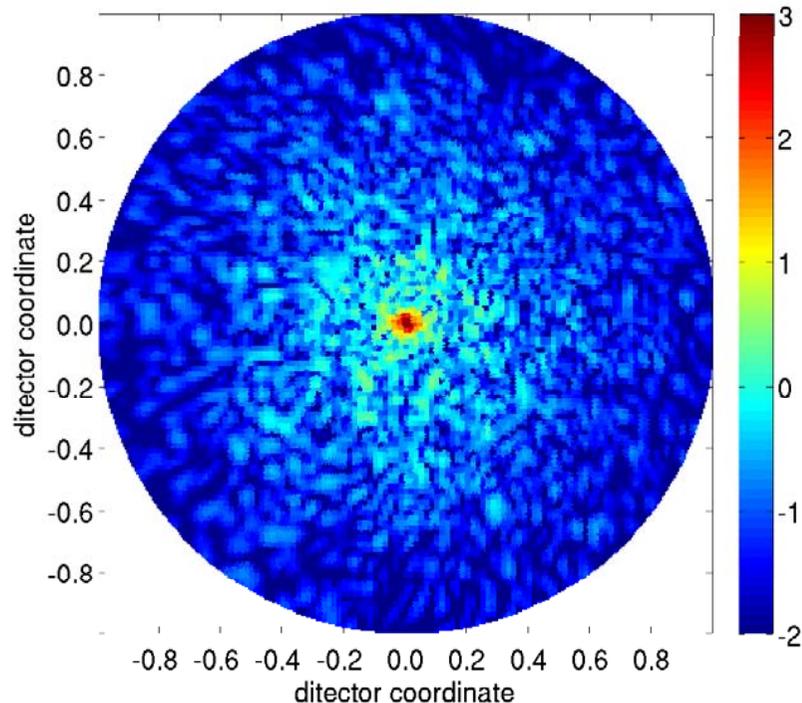
推奨する実験系
分子飛翔法

e.g. Kassemeyer, S., et al., *Opt. Exp.*
Vol. 20, Issue 4, pp. 4149-4158 (2012)

- 分子が壊れる前に測定を終える
- 分子方位は未知
- 散乱能が低い → 散乱強度が弱い
- 位相情報は測定からは得られない
- 多数回の測定が必要

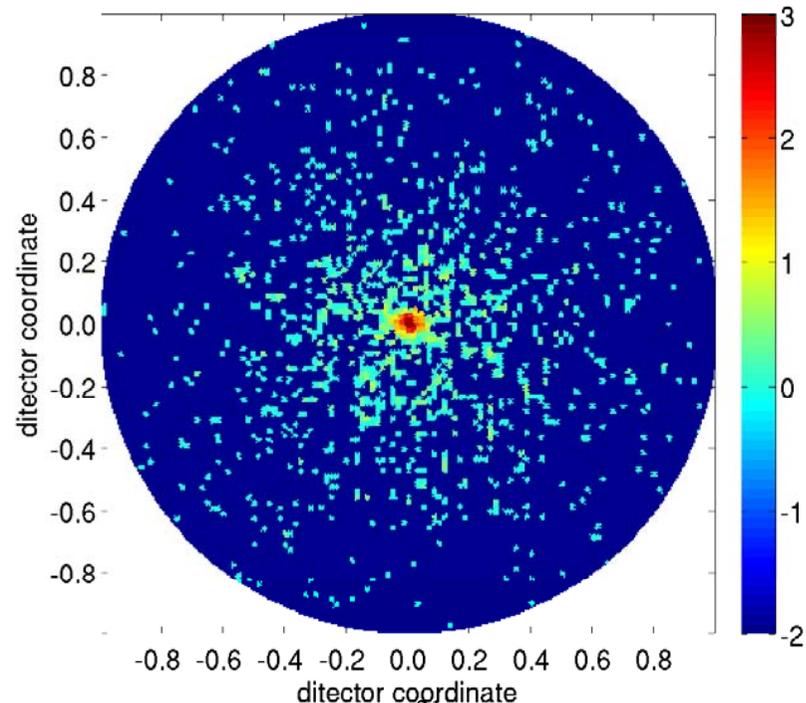
量子雑音(ショットノイズ)

量子雑音なし



スペckルパターン

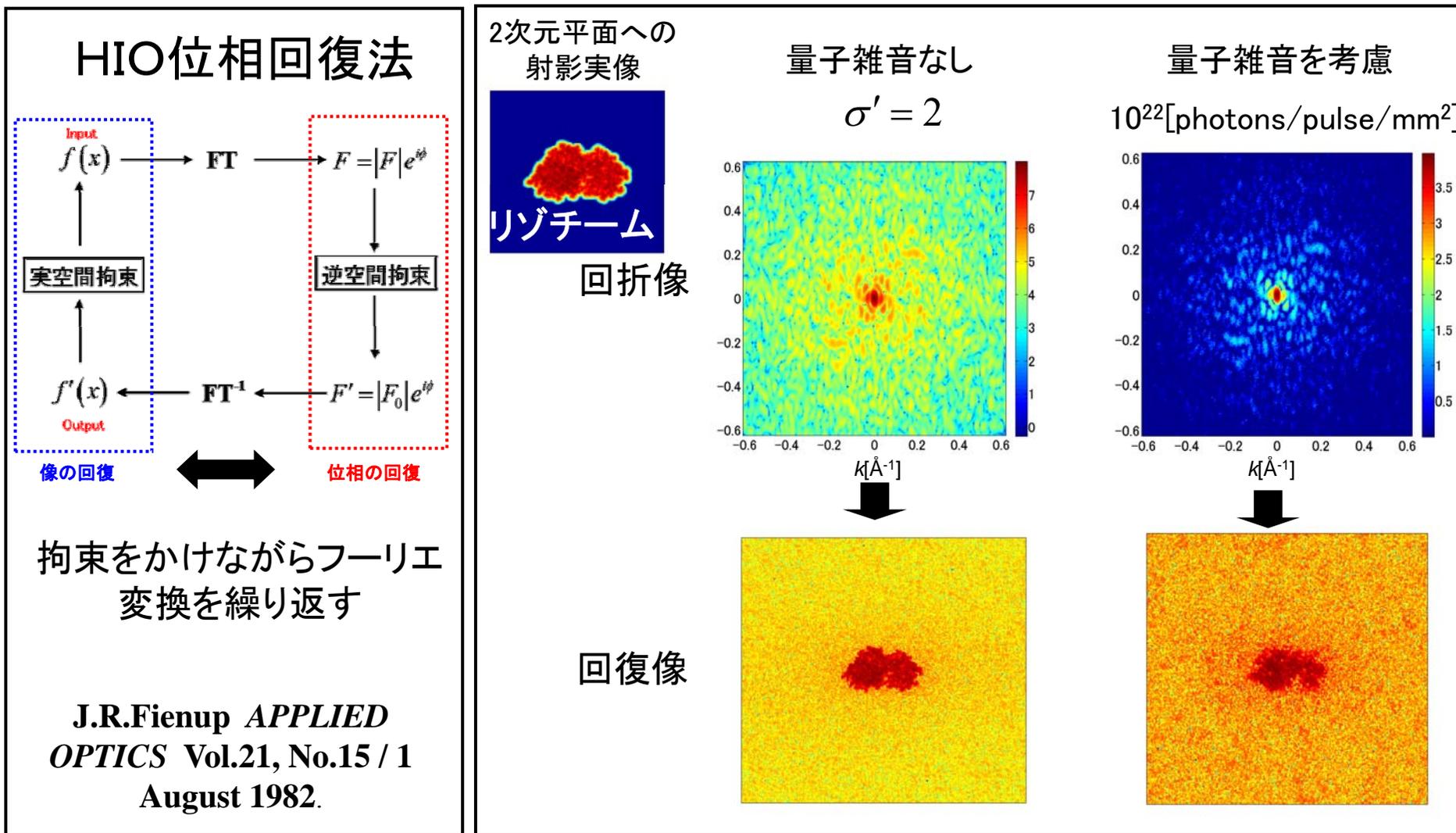
量子雑音あり



Lysozyme, $I_i = 5 \times 10^{21}$ [photons / pulse / mm²]

- 量子雑音は観測光子数の統計的変動由来の雑音
- 生体分子単粒子試料からの散乱強度は弱い
→ 強い量子雑音を伴った像が観測される

オーバーサンプリング法と位相回復アルゴリズム 8



- 散乱強度が十分強い場合欠落した位相情報を回復できる
- 量子雑音により位相回復が難しくなる

高分解能単粒子構造解析 解決すべき問題点

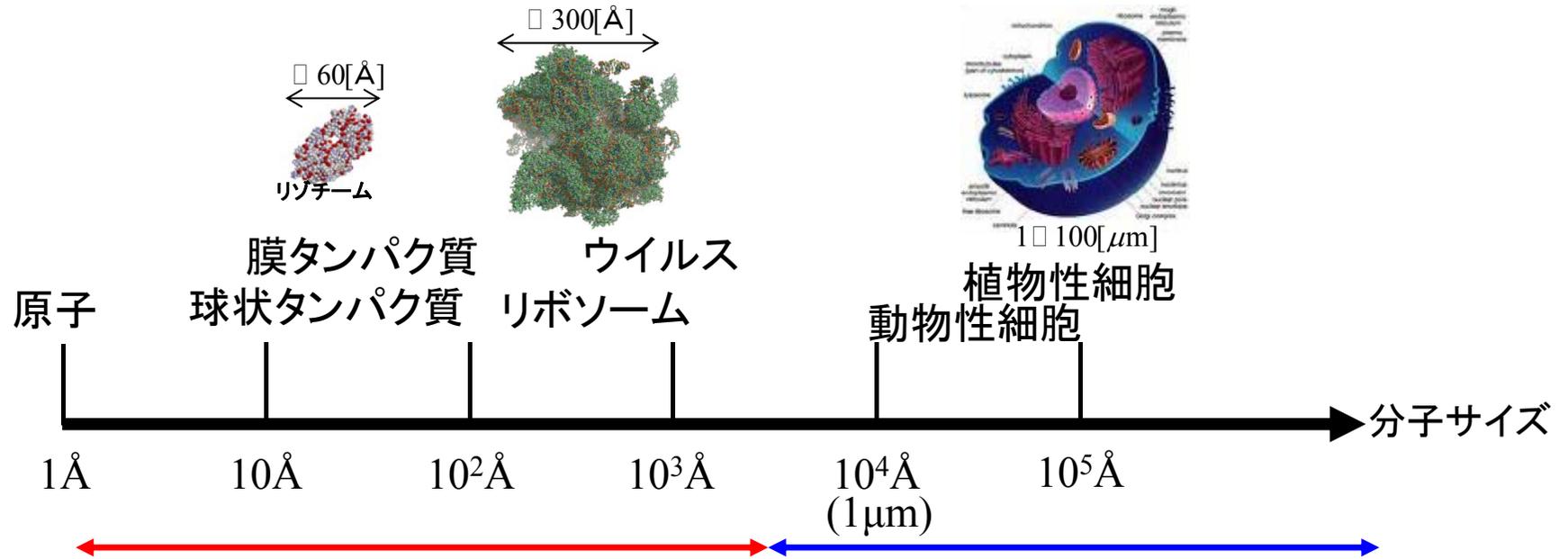
- 位相情報の欠落
- 散乱強度が弱い(S/N比が悪い)
→強度不足の1枚の回折像に対しては位相回復が困難
- 測定時の入射光に対する分子方位が未知
- 3次元情報を得るには多数の回折像が必要
→波数空間での相対位置を決める方法が必要
- フェムト秒パルス幅では放射線損傷は無視できない

問題点を考慮した構造解析法が必要

アウトライン

- 高分解能単粒子構造解析の概要
 - コヒーレントイメージングの1手法
- **開発したアルゴリズムの説明**
 - 回折像の分類・平均法(S/N比の向上)
 - 回折像の相対位置の決定法(3次元強度関数の構築)
- 達成可能な分解能の見積もり
 - 適した実験条件を考えるための指標
 - 原子分解能の達成が視野
- 大量の回折像を分類するための取り組み
 - 回折像類似度の自動判定法→感度も向上
 - 京コンピュータへのアルゴリズムの実装
- 放射線損傷の影響
 - 解析法へ与える影響
 - 損傷を抑えるための実験条件

立体構造構築への道筋



道筋 A

2次元回折像の**分類**

同一グループの像を**平均**して精度向上

↓

平均化後の像の交円を求めて**相互配置**

3次元回折像を構築

↓

3次元回折像に対して位相回復

↓

フーリエ変換で3次元分子構造を得る

道筋 B

個々の2次元回折像にオーバーサンプリング法を用いて位相回復

↓

フーリエ変換で2次元実像を得る

近似的に射影像

↓

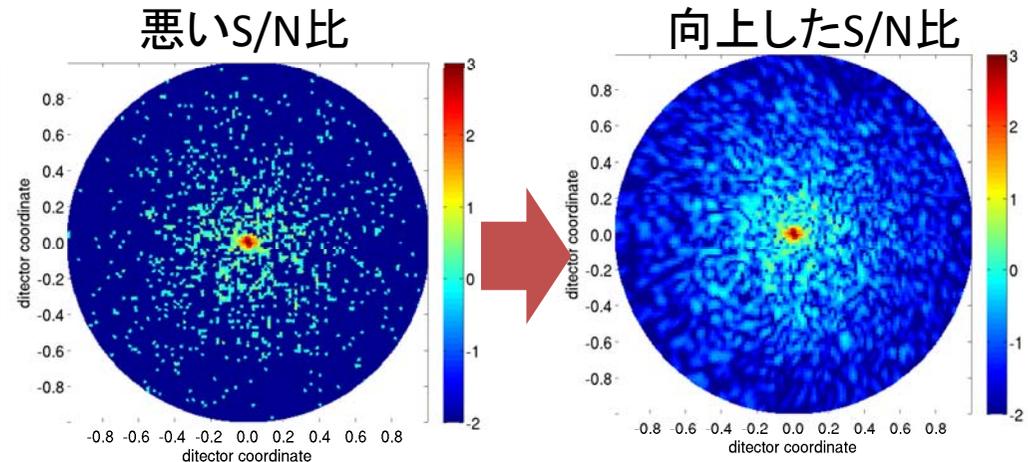
Tomographyにより立体構造をえる

高分解能単粒子構造解析の手順

1st STEP: 図柄により2次元回折像を分類・平均しS/N比を向上

雑音に強い回折像の
分類法を開発した
→高い分解能を達成可能

Tokuhisa, A., Taka, J., Kono, H., & Go, N.
Acta. Cryst. A 68, 366 (2012)



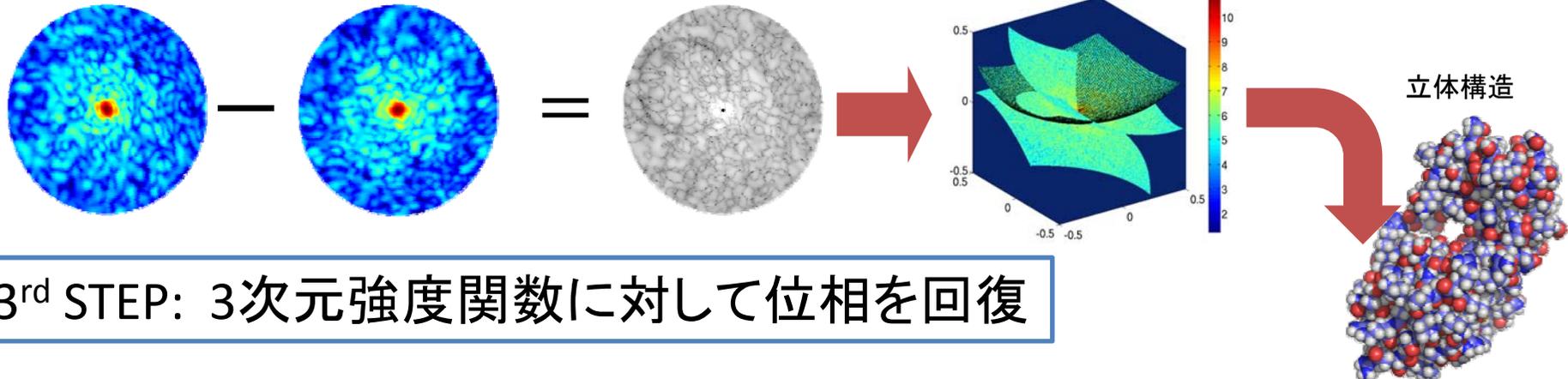
2nd STEP: 波数空間での相対位置をもとめ3次元強度関数を構築

2次元回折像その1

2次元回折像その2

共通交円

3次元回折像

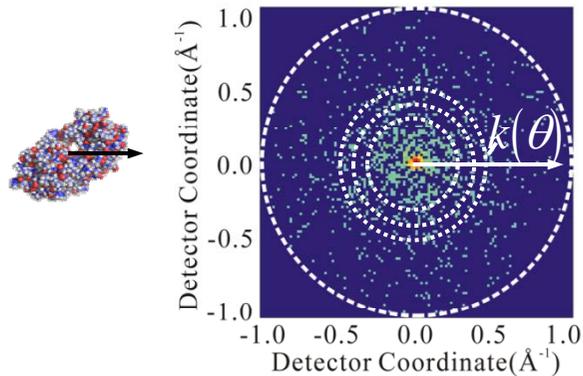


3rd STEP: 3次元強度関数に対して位相を回復

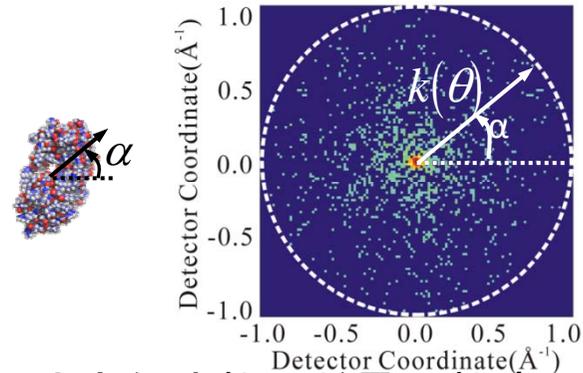
手順の基本概念: Huldt, G., Szoeké, A., & Hajdu, J. J. *Str. Biol.* 144, 219-227 (2003)

1st Step:雑音に強い回折像の分類・平均法

1対の回折像

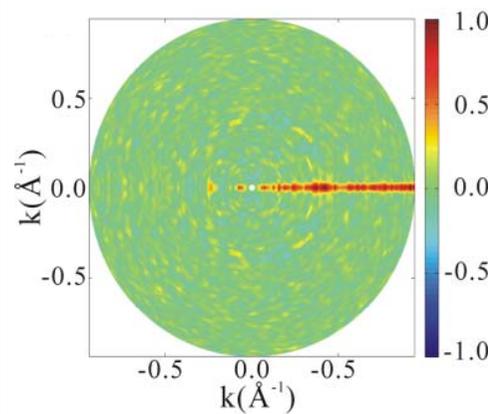


1. 分子が入射光軸に対して α 回転すれば回折像も α 回転する

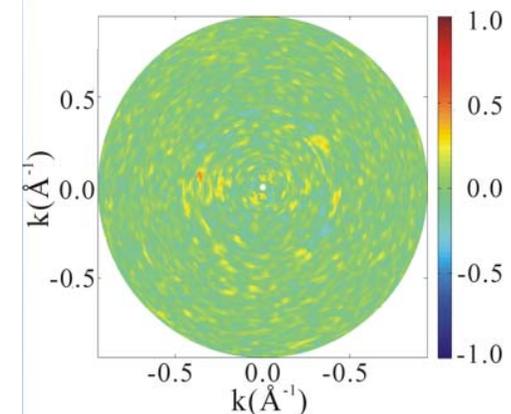


2. 大きな波数ほど量子雑音は顕著

相関図



図柄が似ている場合



似ていない場合

波数と回転角 α の関数として定義

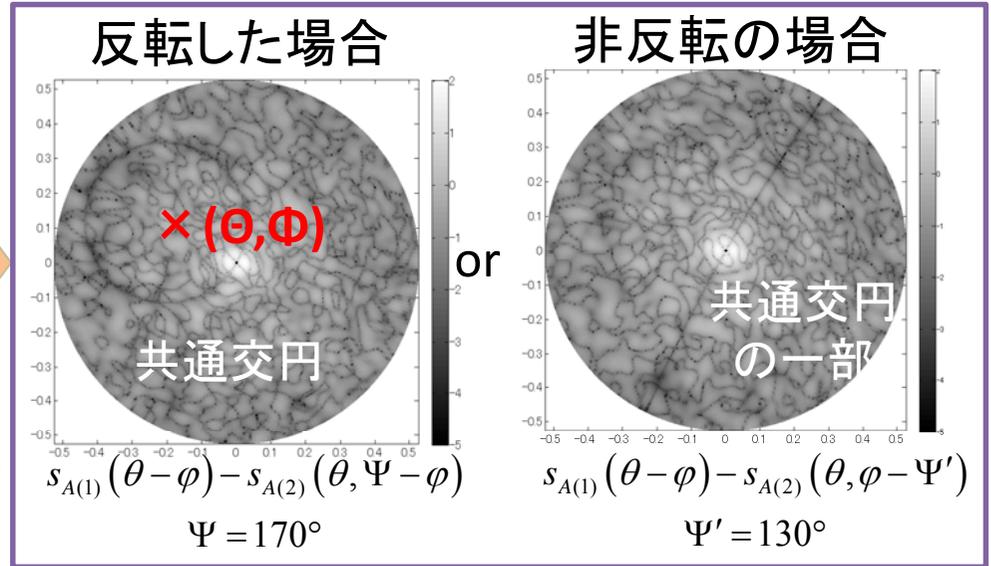
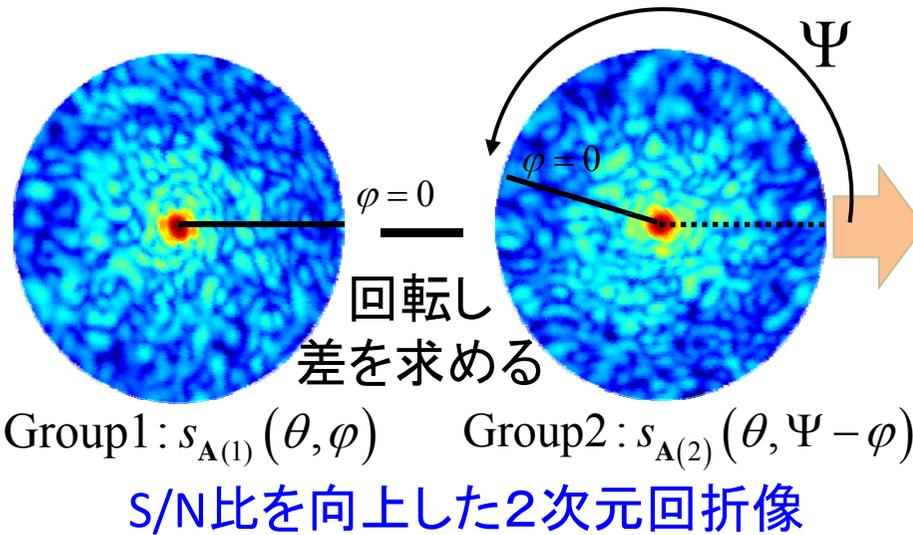
$$c_{ij}(\theta, \alpha) = \frac{1}{N_\theta} \sum_{l=0}^{N_\theta-1} \left(\tilde{s}_Q \left(i; \theta, \frac{2\pi l}{N_\theta} \right) - 1 \right) \left(\tilde{s}_Q \left(j; \theta, \frac{2\pi l}{N_\theta} + \alpha \right) - 1 \right)$$

$$\tilde{s}_Q \left(i; \theta, \frac{2\pi l}{N_\theta} \right) = s_Q \left(i; \theta, \frac{2\pi l}{N_\theta} \right) / \bar{s}_Q(i; \theta)$$

$$\bar{s}_Q(i; \theta) = \frac{1}{N_\theta} \sum_{l=0}^{N_\theta-1} s_Q \left(i; \theta, \frac{2\pi l}{N_\theta} \right)$$

- 量子雑音に強い回折像の分類法を開発
 - 有効画素あたり光子数が1/20の場合も有効信号として扱える
- 図柄が似ている場合相関線が現れる→同じグループに分類
- グループ内で回折像を平均することによりS/N比を向上

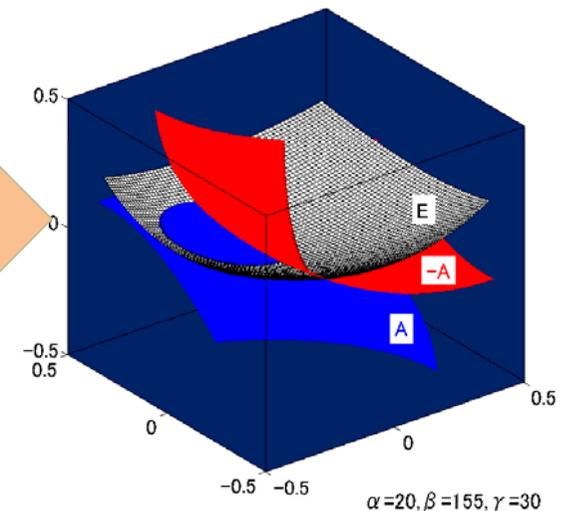
2nd step: 3次元散乱強度関数の構築



相対的な分子方位(α, β, γ)は Ψ, Θ, Φ から決まる

$$\begin{cases} \alpha = \Psi - \Phi = \Phi' - \Psi' - \pi \\ \beta = \pi - 2\Theta = 2\Theta' \\ \gamma = \pi - \Phi = -\Phi' \end{cases}$$

(α, β, γ): 一対の回折像の相対的オイラー角
 Ψ : 共通交円が現れる回転角
 (Θ, Φ): 共通交円の極座標



➤ 1対の回折像の差像より相対的な位置を求めることができる

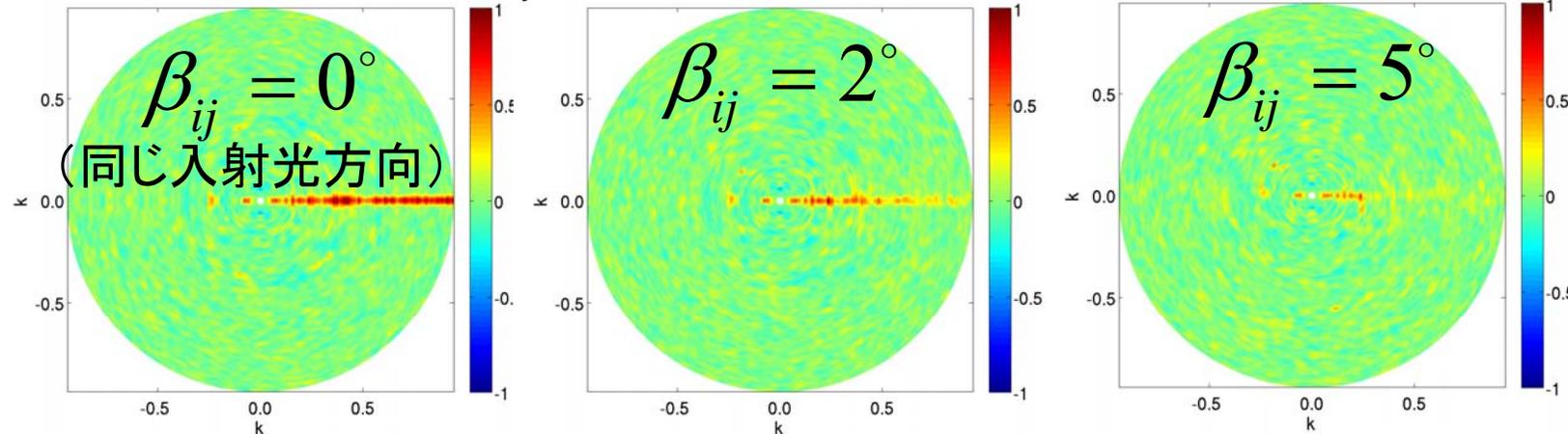
アウトライン

- 高分解能単粒子構造解析の概要
 - コヒーレントイメージングの1手法
- 開発したアルゴリズムの説明
 - 回折像の分類・平均法(S/N比の向上)
 - 回折像の相対位置の決定法(3次元強度関数の構築)
- **達成可能な分解能の見積もり**
 - 適した実験条件を考えるための指標
 - 原子分解能の達成が視野
- 大量の回折像を分類するための取り組み
 - 回折像類似度の自動判定法→感度も向上
 - 京コンピュータへのアルゴリズムの実装
- 放射線損傷の影響
 - 解析法へ与える影響
 - 損傷を抑えるための実験条件

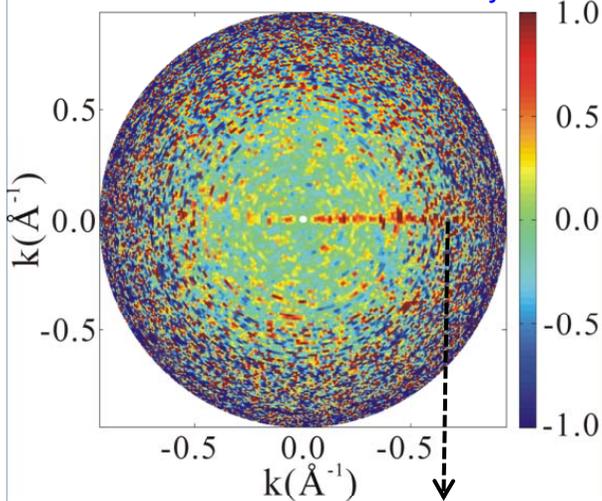
量子雑音の程度が分解能を決める

相関図(雑音なし)

β_{ij} : 1対の回折像(l,j)の分子から見た入射光方向の違い



相関図(雑音あり, $\beta_{ij}=0^\circ$)



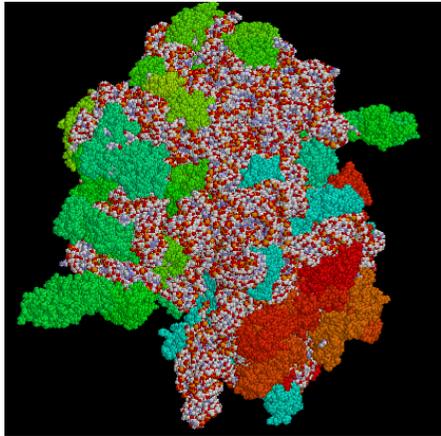
雑音が顕著になる波数: $k_N(\text{\AA}^{-1})$

$k_N(\text{\AA}^{-1})$ の逆数を分解能とした

1. β_{ij} が大きくなるにつれ相関線が見える波数領域が狭くなる
2. $\beta_{ij}=0^\circ$ でも量子雑音により波数 $k_N[\text{\AA}^{-1}]$ で相関線が認識できなくなる
3. $k_N[\text{\AA}^{-1}]$ より外側は似ているか判断できない
4. 平均により $k_N[\text{\AA}^{-1}]$ までS/N比が向上

➤ 量子雑音の程度を散乱強度動径関数から評価することで雑音が顕著になる波数を見積もることが可能

達成可能な分解能 (70s-Ribosome)



270 Å

70s-Ribosome
PDB_ID:1YL3,1YL4

- サンプル: Ribosome(L=270 Å)
- 入射X線強度: 5×10^{11} [photons/pulse]
- 集光径: 50[nm]
- 入射X線強度密度: 2.55×10^{20} [photons/pulse/mm²]
- 入射X線波長: 1[Å]=12.4[keV]
- **達成可能な分解能: 3.0 Å ($k_N=0.3 \text{ 3 Å}^{-1}$)**
- グループの角: 0.91[deg]
- グループ数: 16,000
- グループ内で平均に必要な枚数: 88枚
- **必要有効回折像: 1.4×10^6 枚**
- 分類計算の回数: 2.2×10^{10} 回 (グループ数×回折像数)
- 総回折像データ量: 20.8TB (詳細省略)

- 播磨設置の10Tフロップス計算機を用いた場合 (1相関計算0.5秒)
→ 500日ほどかかる
- 大規模な分類計算を行うための枠組みが必要

ここまでのまとめ

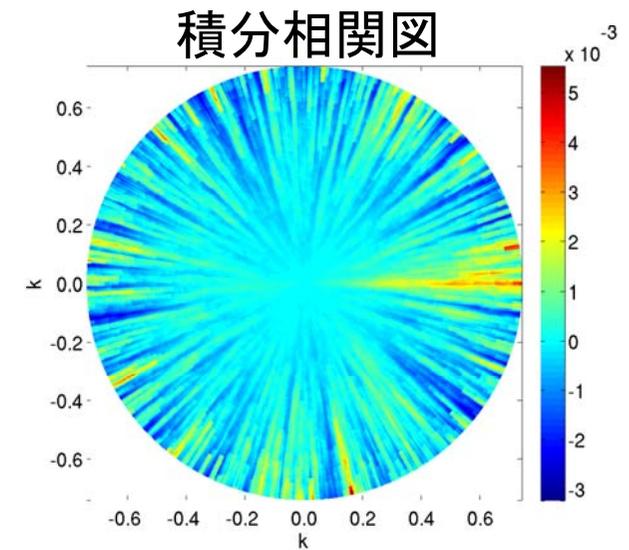
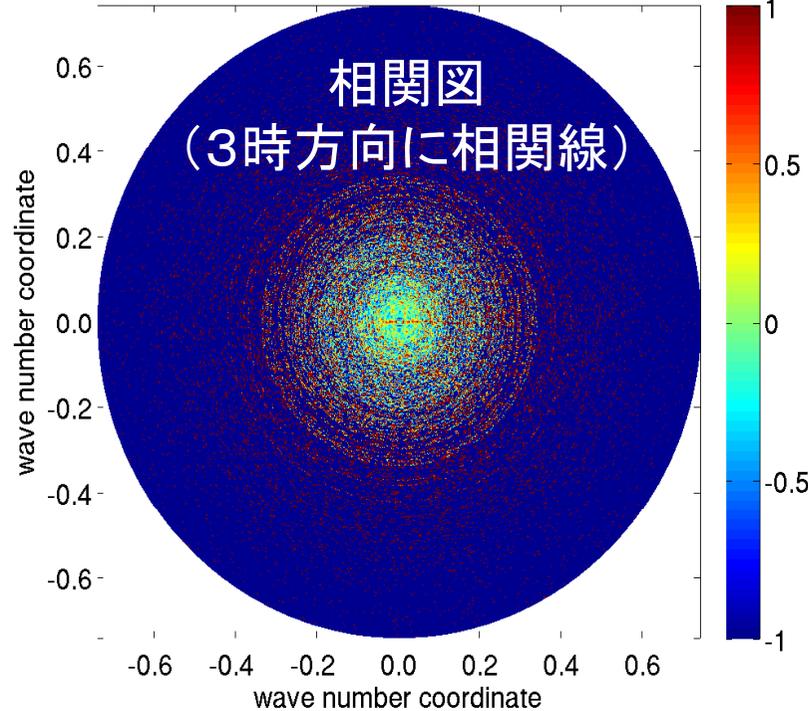
- 高分解能単粒子構造解析のアルゴリズムを開発
 - 1. 相関図を用いて回折像を分類する方法
量子雑音によりS/N比を向上できる波数に制限→分解能
 - 2. 共通交円を用いて回折像の相対位置を決定する方法
- XFEL光を数十nm集光することで原子分解能を達成できる見込み
- 大量の回折像を分類するには大規模計算を行う機構を整備する必要がある

アウトライン

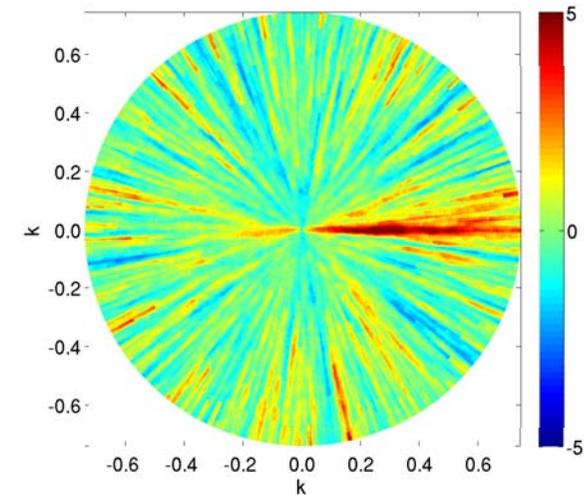
- 高分解能単粒子構造解析の概要
 - コヒーレントイメージングの1手法
- 開発したアルゴリズムの説明
 - 回折像の分類・平均法(S/N比の向上)
 - 回折像の相対位置の決定法(3次元強度関数の構築)
- 達成可能な分解能の見積もり
 - 適した実験条件を考えるための指標
 - 原子分解能の達成が視野
- **大量の回折像を分類するための取り組み**
 - 回折像類似度の自動判定法→感度も向上
 - 京コンピュータへのアルゴリズムの実装
- 放射線損傷の影響
 - 解析法へ与える影響
 - 損傷を抑えるための実験条件

回折像類似度の自動判定法

Ribosome, $I_i = 5 \times 10^{19}$ [photons/pulse/mm²]. $\beta_{ij} = 0.59^\circ$



κ_{sum} (有意度)



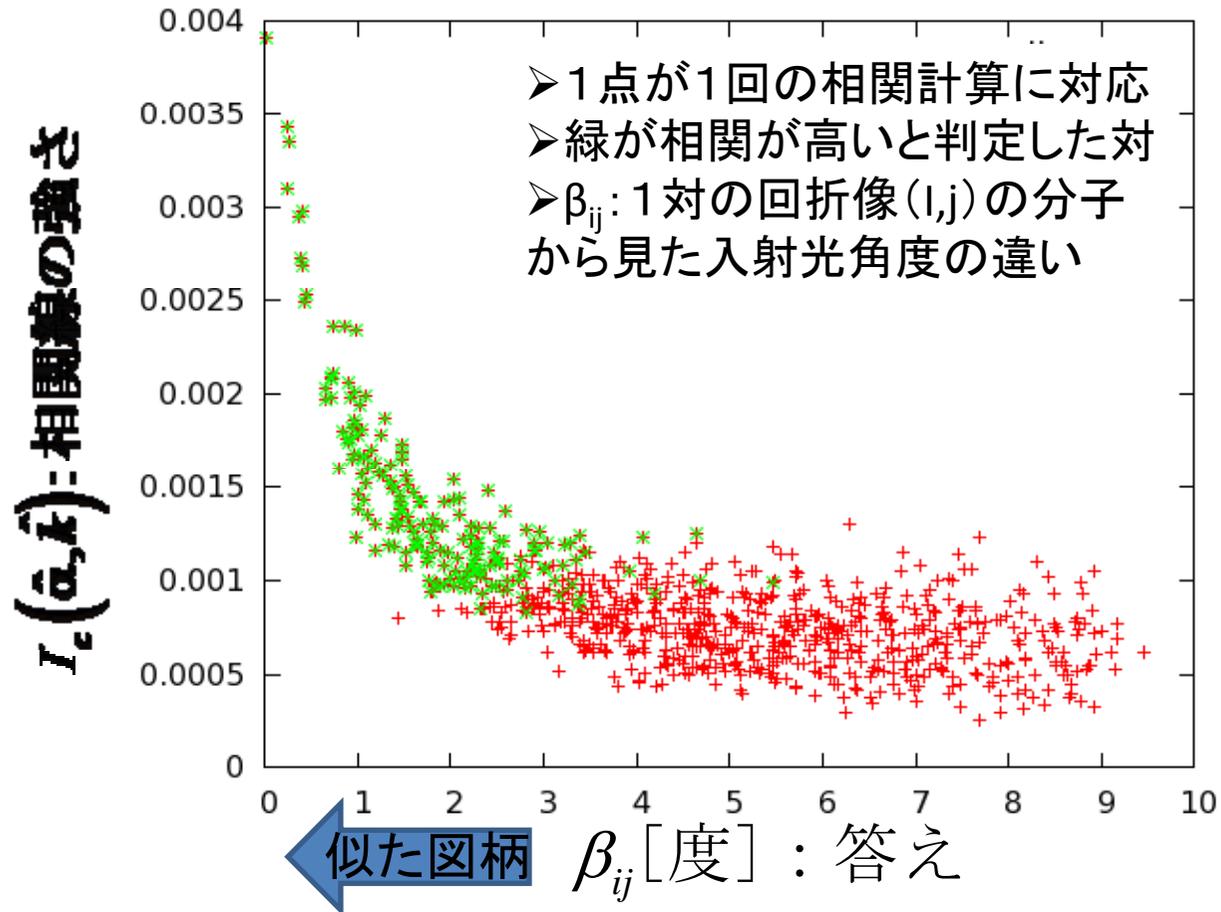
相関線の①方向 $\hat{\alpha}$ ②長さ \hat{k} ③強さ $I_c(\hat{\alpha}, \hat{k})$
④有意度 κ_{sum} を判定することが目的

相関図の積分値を考える背景

1. 1枚の図の中で雑音を平均化
2. 微弱な信号を集めて感度を向上

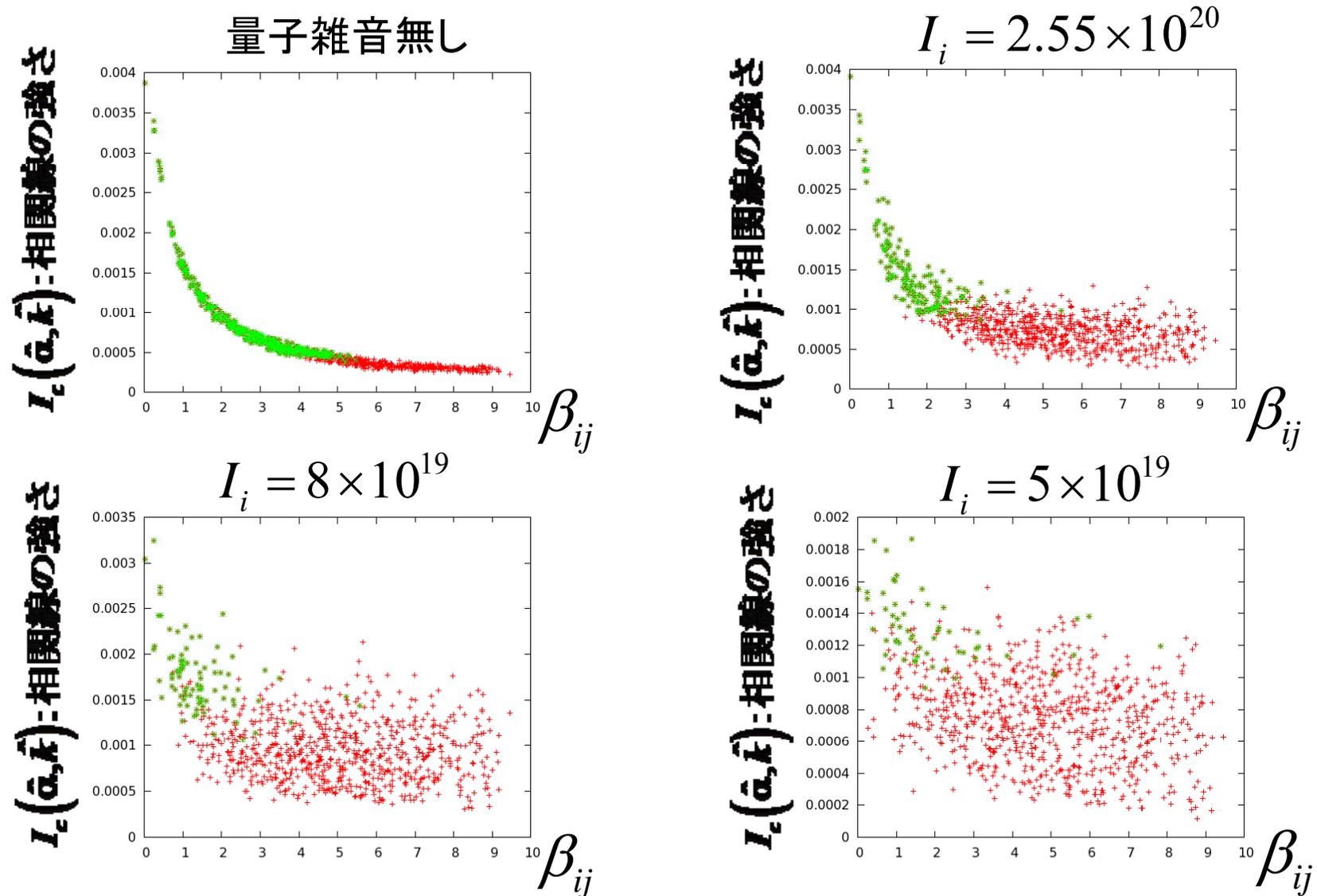
自動判定法の結果（相関線の強さ）

Ribosome, $I_i = 2.55 \times 10^{20}$ [photons/pulse/mm²] (設計値を 50nm に集光した強度)



- 図柄が似ている対を正しく拾うことができている
- I_c と β_{ij} の相関が高いことから狭い β_{ij} 角でグループ化が可能
→ 見積もった分解能よりも高い分解能を狙える可能性も出てきた

自動判定結果の入射強度依存性

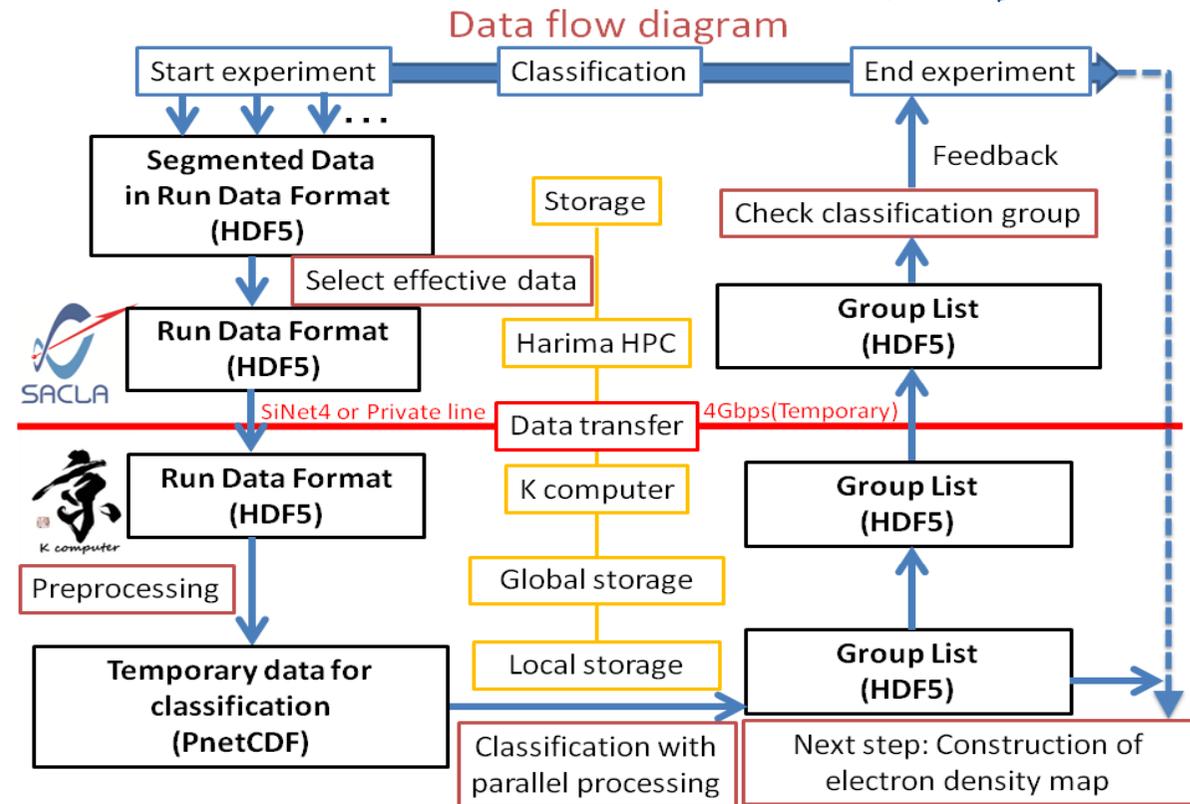


- いくつかのパラメータ最適化前の暫定的な結果
- 入射X線強度 8×10^{19} [photons/pulse/mm²] 以上で回折像を分類可能

開発したアルゴリズムの京への実装



連携



- 実験と並行して分類計算を実行→フィードバック機構を構築
- 140万枚の回折像を4万ノードで24時間以内に分類
 1. 1相関あたり約0.5秒の計算時間
 2. 並列化実行効率: 0.75倍速/コア

アウトライン

- 高分解能単粒子構造解析の概要
 - コヒーレントイメージングの1手法
- 開発したアルゴリズムの説明
 - 回折像の分類・平均法(S/N比の向上)
 - 回折像の相対位置の決定法(3次元強度関数の構築)
- 達成可能な分解能の見積もり
 - 適した実験条件を考えるための指標
 - 原子分解能の達成が視野
- 大量の回折像を分類するための取り組み
 - 回折像類似度の自動判定法→感度も向上
 - 京コンピュータへのアルゴリズムの実装
- **放射線損傷の影響**
 - 解析法へ与える影響
 - 損傷を抑えるための実験条件

XFEL光による放射線損傷過程のシナリオ ²⁵

(数十アト秒)

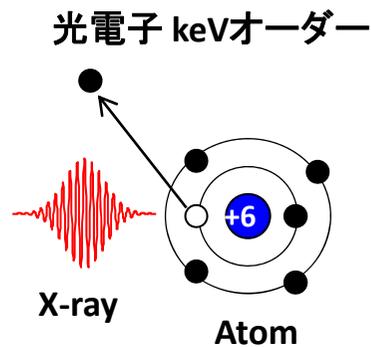
(~フェムト秒)

(数フェムト~)

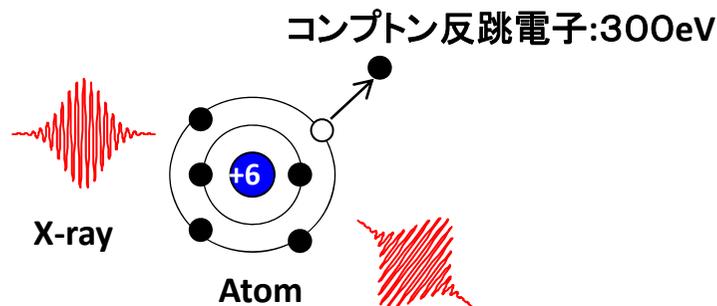
(10フェムト秒~)

● 1次損傷

・光電離過程 (0.1個/10fs)



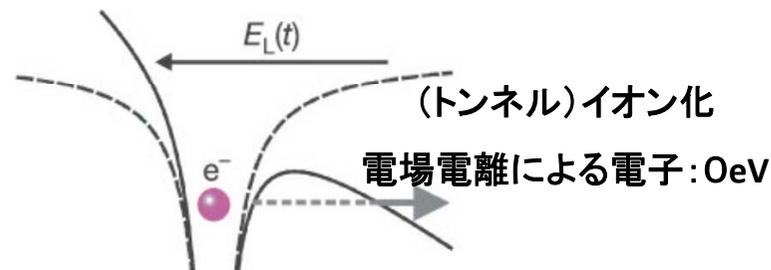
・コンプトン散乱 (0.01個/10fs)



● 2次損傷

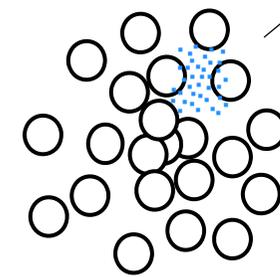
・電場電離過程

(1個/10fs)



● クーロン爆発

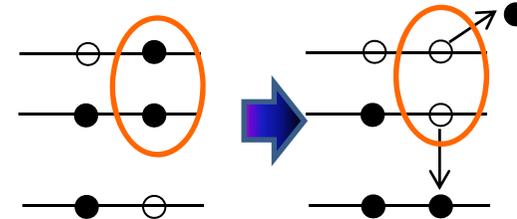
多価イオン



・オージェ過程

(0.01個/10fs)

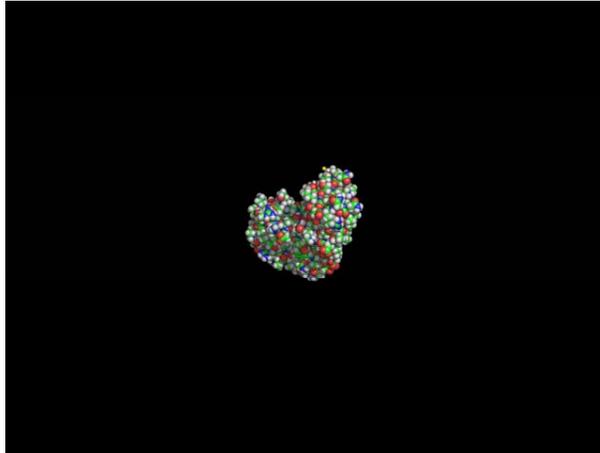
オージェ電子:
300eV~500eV



電場電離過程: T. Nakamura et. al., Phys. Rev. A, 80, 053202 (2009)

損傷を考慮した回折像データのシミュレーション

損傷過程の時系列データ



リゾチーム、12.4keV, 5fs, 1E22

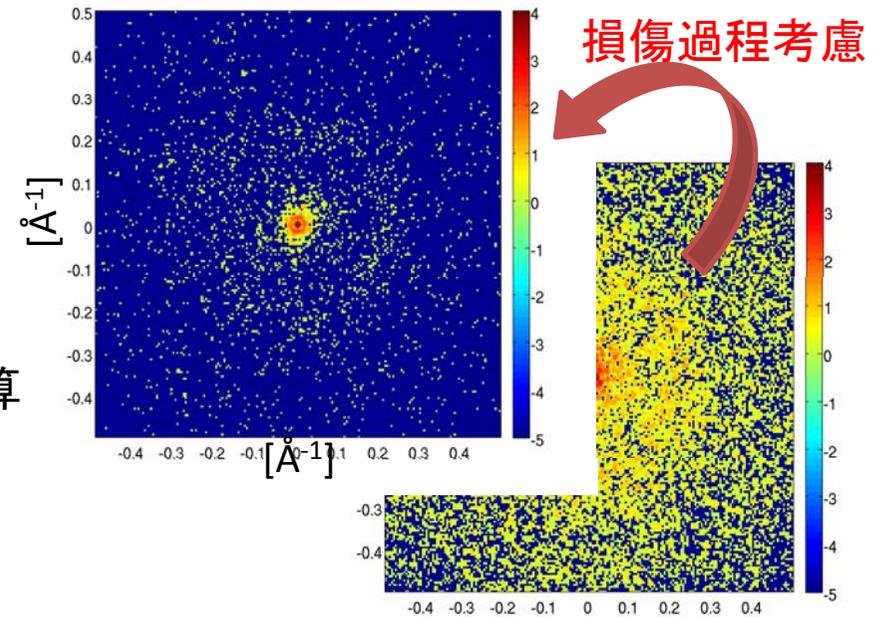
損傷過程のシミュレーション
(モンテカルロ法とニュートン
方程式を用いた方法)

- 光電離過程
- コンプトン散乱過程
- 電場電離過程
- オージェ過程
- クーロン爆発過程

T Kai, Phys. Rev. A 81, 023201 (2010)

放射線損傷を考慮した回折像

積分強度を計算



損傷を考慮した回折像の計算

$$S(k) [\text{photons} / \text{pulse} / \text{mm}^2]$$

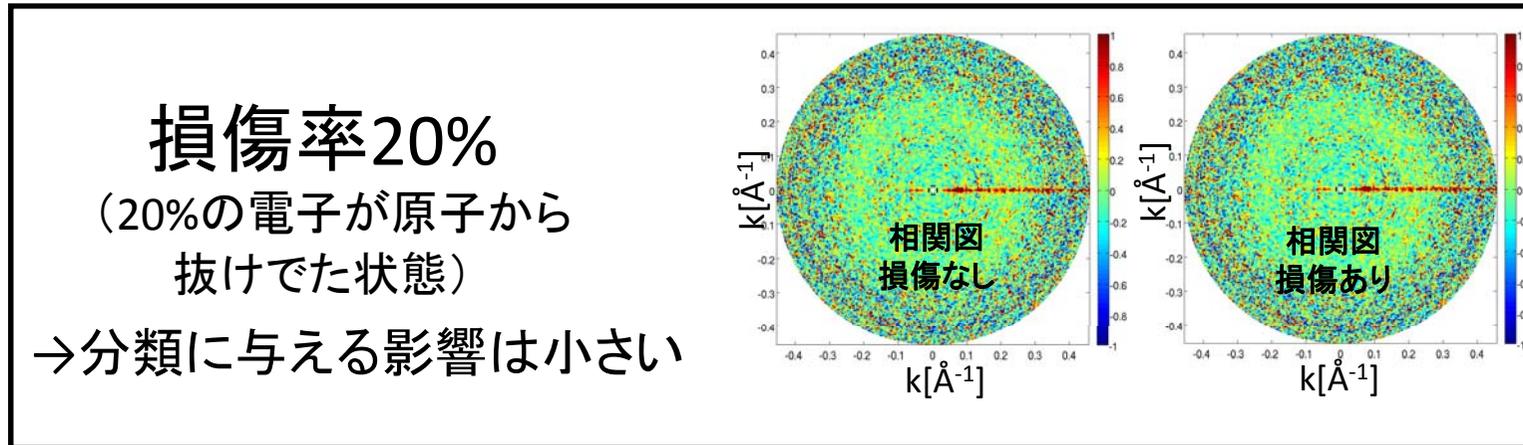
$$\cong \sum_{j=1}^N \Delta t [s] \cdot \frac{I_0 [\text{photons} / \text{pulse} / \text{mm}^2]}{\tau [s]} r_c^2 \omega |F(\mathbf{k}, t_j)|^2$$

$$F(\mathbf{k}, t_j) = \sum_a f_{s(a)}(k, t_j) \exp(-2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_a)$$

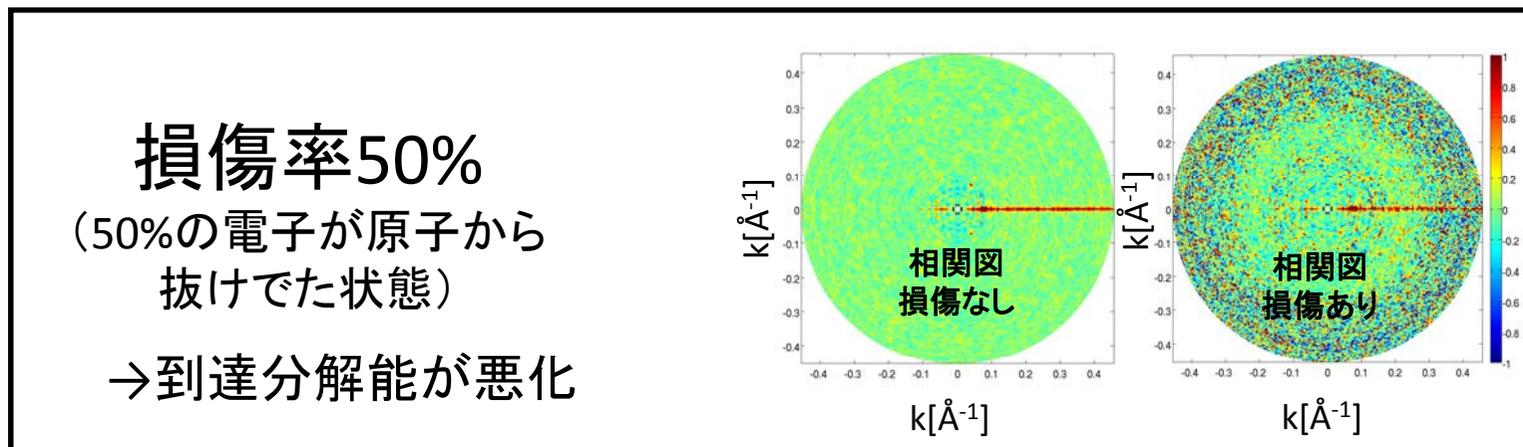
- 損傷過程の時系列データと遷移状態の原子散乱因子を用いて回折像データを作成

単粒子構造解析法に対する放射線損傷の影響²⁷

HsLUV(200 Å)を用いた光電離、コンプトン散乱、オージェを考慮した計算結果を使用



入射X線強度は下段の方が1桁強い

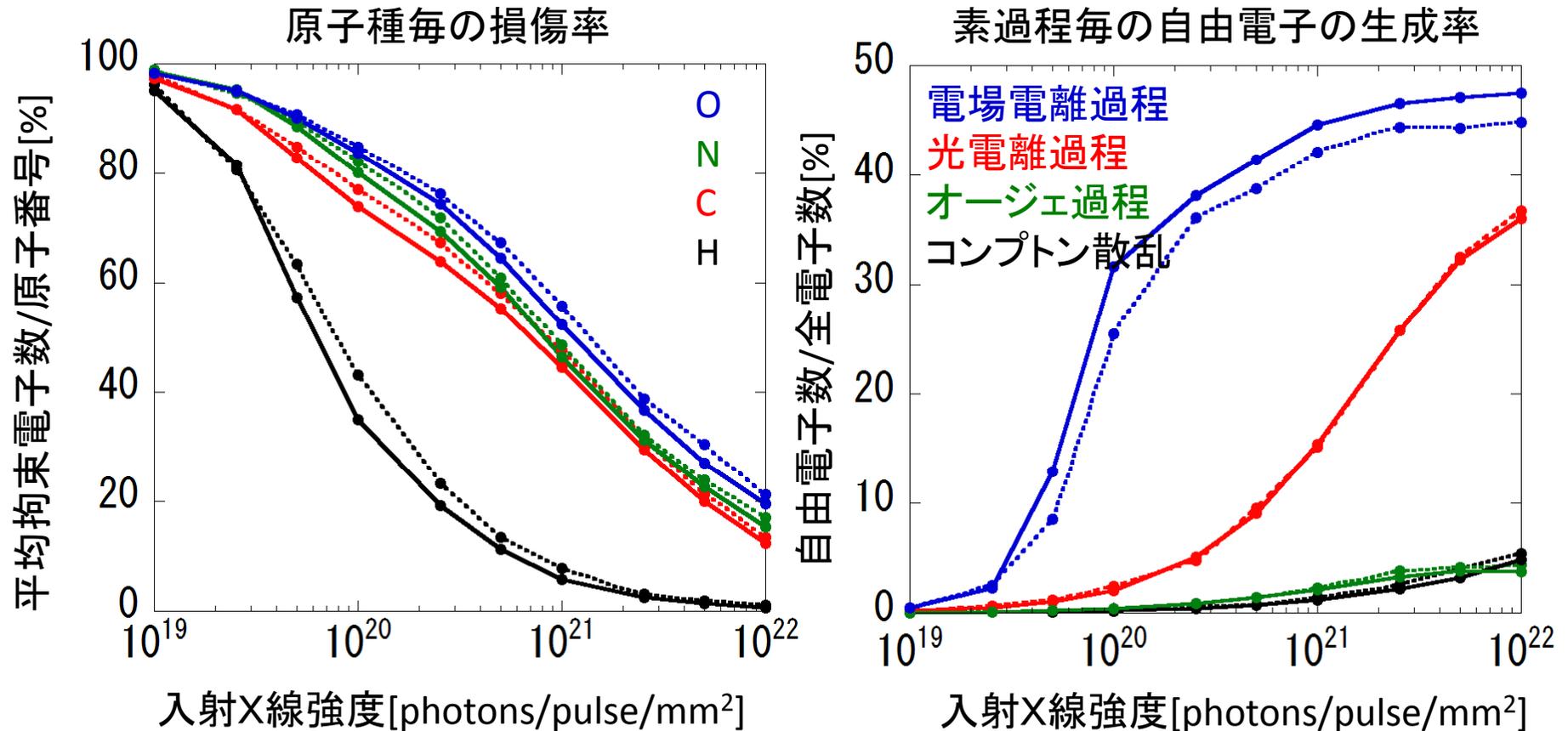


- 損傷率20%では解析法に対してあまり影響を与えない
- 損傷率50%では分解能が悪化するが解析法は破綻しない

放射線損傷の入射X線強度依存性

入射X線エネルギー12.4keV, パルス幅 5fs

実線: アルデヒド酸化還元酵素 (100 Å)、点線: リゾチーム (60 Å)



- 電場電離過程の寄与が大きい
- 分子サイズが大きいほど電場電離過程により放射線損傷が進む
- 放射線損傷を一定以下に抑えるには $\sim 10^{21}$ [photons/pulse/mm²]に抑えるのが望ましい

まとめと今後

- 高分解能単粒子構造解析法に対するアルゴリズムを開発した
- 数十nm集光することで原子分解能を達成できる見込み
- 自動同定法における積分相関図の採用
 - 入射光強度の下限を下げた
 - **入射強度の下限**: $\sim 8 \times 10^{19}$ [photons/pulse/mm²]
- 大規模分類計算は京を用いることで実行可能
- XFEL光を用いた観測では放射線損傷を伴う
- 放射線損傷が解析に与える影響を評価した
 - **入射強度の上限**: $\sim 10^{21}$ [photons/pulse/mm²]
- 実験データを用いて構造解析を行いたい!!
 - 検出器の不感領域など実験系への対応(我々の課題)
 - 分子飛翔法の開発の進展を期待