



Structural Biology Research Center

Institute of Materials Structure Science
High Energy Accelerator Research Organization, KEK

SBRC International Cryo-EM Seminar Series, No.8

Dr. Takanori Nakane (中根 崇智), MD, PhD
MRC Laboratory of Molecular Biology,
University of Cambridge.



今回は初の試みとして相談会形式のセミナーを日本語で行います。クライオ電子顕微鏡単粒子解析のデータ解析計算に関して、ソフトウェア開発にも携わっているエキスパートから直接アドバイスをいただきます。第一回目は、本形式のご提案いただいた中根先生をお招きします。中根先生はこれまでX線結晶学(特にシリアル結晶学)とクライオ電子顕微鏡単粒子解析の両方のソフトウェア開発を行い、ご専門である計算構造生物学に多大な貢献をされています。現在はケンブリッジのMRC分子生物学研究所のSjors H W Scheres博士の研究グループの一員として、世界中で最も広く利用されているクライオ電子顕微鏡学向けソフトウェアであるRELIONの開発プロジェクトに参加されています。また、共同研究者からの難しいデータセットの解析計算処理にも情熱的に取り組まれています。今回は初めてということもあり、質問は主催者側で選ばさせていただきますが、参加者の皆さんからも時間が許す限り質問をしていただくことができます。

Profile

MD (Department of Medicine), Kyoto University, Japan, 2013

MPhil (Computational Biology), University of Cambridge, UK, 2014

PhD (Graduate school of Medicine), Kyoto University, Japan, 2017

2014-2017 Researcher (Department of Biological Sciences), University of Tokyo, Japan

2017-2017 Project Assistant Professor (Department of Biological Sciences), University of Tokyo, Japan

2017-2020 Postdoctoral Scientist with Dr. S H W Scheres, MRC Laboratory of Molecular Biology, UK

2020-Present Investigator Scientist, MRC Laboratory of Molecular Biology, UK

Date: Tuesday, March 2, 2021 17:00 pm - 18:30 pm

Location: Online Zoom Meeting

Please join us for this upcoming SBRC International Cryo-EM Seminar Series at KEK!

Inter-University Research Institute Corporation
High Energy Accelerator Research Organization (KEK)
Structural Biology Research Center
Institute of Materials Structure Science

1. Class2D 関係の質問

[1-1 (ID:横山 A1-01)]

質問：2D で上手く粒子を分ける方法

質問者：東北大田中研・次田篤史 (学生 M2)

内容：Auto-refine 後の map がボソボソしていて質が良くなりません。2D class averages を見ると、二次構造の特徴が見えるものの、一部がとても白くなっています。おそらく、粒子の一部が気液界面に接触して変性しているのだと考えています。グリッド作成の条件で気液界面に接しないように工夫したいのですが難しそうです。3D classification で変成している粒子を分けることが出来なかったので、2D classification でなんとか分けたいのですが、何か良い方法がないでしょうか？

[1-2 (ID:杉田 A2-02)]

質問：2D Classification や 3D Classification の iteration 回数の決め方

質問者：京都大野田研・藤田陽子 (学生 D1)

内容：まずは 25 回で計算を実行し、その後は 50 回などの適当な回数で continue していますが、何を以って計算が収束したと判断すれば良いかを知りたいです。また、continue で計算を再開する場合に、sampling の各パラメータや mask の大きさを変更できますが、変更して continue した方が良い場合や変更しない方が良い場合、気にしなくても影響がない場合などの判断基準があれば知りたいです。

[1-3 (ID:守屋 A4-01)]

質問：2D Classification に 1 回で入れるのに最適な粒子数 (5-10 万粒?)

質問者：KEK SBRC・安達 成彦(特任准教授)

Relion 2D Classification を行う上で、撮影した全てのマイクログラフから抽出した膨大な数の粒子画像を使うより、一部のマイクログラフから抽出した少ない粒子数を使った方が、出力結果が良いように思えます。なので、この頃はデータセットを分けてそれぞれで 2D Classification を行っています。そこで今悩んでいるのは、2D Classification に 1 回で入れるのに最適な粒子数です。個人的には、K=200 のとき 5-10 万粒くらいが良いと感じています。最適な粒子数を決める方法もしくは指標があれば、教えていただけますか？

2. Class3D & flexibility 関連の質問

[2-1 (ID:岸川 A3-01)]

質問：適切な Mask の設定方法

質問者：阪大蛋白研・高崎寛子 (助教)

内容：適切な Mask の設定はどのようにしたらよいか？Postprocess だけでなく、Masked 3D refinement や Masked classification などの時について聞きたいです。特に、小さな膜蛋白質のような場合や Sidesplitter を使うような場合についても聞きたいです。

[2-2 (ID:杉田 B1-01)]

質問：アライメントなしで Class 3D する時の T の決め方

質問者：京都大野田研・藤田陽子（学生 D1）

内容：通常（アライメントありの）3D Classification では T=3 や 4 で上手くいくことが多いですが、アライメントなしで 3D Classification では T の値を大きくしないと収束しないことが多くあります。適当な数値を何パターンか入れてそれぞれ計算を実行し、マップに overfitting の特徴（バックグラウンドに見える放射状の線）が無いことと、うまくクラス分けができる T の値を試行錯誤して決定しています。こちらでも systematic な決め方があるのかどうかを知りたいです。

[2-3 (ID:杉田 B1-02)]

質問：Initial low pass filter の決め方

質問者：京都大野田研・藤田陽子（学生 D1）

内容：3D initial model で参照構造を作った時は 60 Å くらい、3D class average や Refine 3D の計算結果を参照構造にする時は 20 Å くらいを目安に、何らかの値を入れて試行錯誤しています。公式 Tutorial でもリボソームなら 70 Å、さらに小さい分子なら 40~60 Å との記載がありますが、systematic な low pass filter の決め方があるのかどうかを知りたいです。

[2-4 (ID:岸川 A3-02)]

質問：タンパク質の動きが離散的なのか、連続的なのかの区別をする方法

質問者：京産大横山研・横山 謙（教授）

内容：分子内であるドメインが相対的に動くタンパク質について 3D Classification などを行った場合に、その動きが離散的に分布しているのか、連続的なのかの区別が可能か、可能ならばどの様に行えばよいかを教えてください。

[2-5 (ID:守屋 B1-02)]

質問：一部のドメインの動きが大きくて密度が出ない場合の処理方法

質問者：KEK SBRC・守屋 俊夫（特任准教授）

一部のドメインの動きが大きくて密度が出ない場合はどのような処理がお勧めですか？3D Classification でクラス分けして、それぞれのクラス内での動きのバリエーションを小さくすることで動いているドメインの密度が見えてくるかと思いましたが、うまくいきません。Relion の Multi-Body Alignment や CryoDRGN などを使った方が良いでしょうか？

3. CryoEM マップ精密化関連の質問

[3-1 (ID:杉田 A2-01)]

質問：螺旋対称性の symmetry relaxation の行い方

質問者：京都大野田研・藤田陽子（学生 D1）

内容：螺旋対称性を持つ複合体で symmetry relaxation を行いたい時はどうすればいいのか RELION の wrapper が螺旋に対応しているのかが知りたいです。対応している場合は、symmetry の指定の方法、mask の作り方等を知りたいです。

[3-2 (ID:守屋 B1-01)]

質問：繰り返しによって変わる aberration 図の意味と解釈

質問者：KEK SBRC・守屋 俊夫(特任准教授)

relion31_tutorial.pdf の方法に従って CTF Refinement と Bayesian polishing をやっています。これを 3-4 回繰り返し行くと分解能が向上します。その時、aberration 図がちょっとずつ変化するのですが、これはどう考えれば良いのでしょうか？また、aberration 図をどのように解釈、評価すれば良いか詳しく教えていただけますか？

4. 原子モデル精密化関連の質問**[4-1 (ID:守屋 A4-02)]**

質問：残基ごとの温度因子の計算

質問者：KEK SBRC・安達 成彦(特任准教授)

RELION とは関係のない質問で申し訳ありませんが、phenix.real_space_refine では、温度因子を残基ごとに計算する仕様になっています。これはどういった経緯でこのようになったかご存知でしょうか。分解能がそこまで高くない場合、原子ごとに温度因子を計算しても意味がないから、計算を軽くすることを優先した、ということでしょうか。

[4-2 (ID:守屋 B1-02)]

質問：モデリングに使うべき Cryo-EM 密度マップ

質問者：KEK SBRC・守屋 俊夫(特任准教授)

モデリングはどの Cryo-EM 密度マップを使うべきなのでしょう？ Refine3D の出力である Fullset Map と Halfset Maps、PostProcess の出力である B-Factor sharpened map、LocalRes の出力である LocalRes filtered map などが考えられるのですが、どれが良いのでしょうか？また、LocScale のようなモデルを使った Sharpening がありますが、これはやった方が良いでしょうか？

以上。