

博士論文

クライオ電子顕微鏡法を用いたベイズ推定  
に基づくらせん構造決定手法に関する研究

令和元年度

大橋 正隆

筑波大学大学院

人間総合科学研究科 感性認知脳科学専攻

## 目次

第 1 章	序論.....	1
1.1	本研究の背景.....	1
1.2	本研究の目的.....	4
1.3	論文構成.....	6
第 2 章	cryo transmission electron microscopy.....	7
2.1	はじめに.....	7
2.2	透過型電子顕微鏡.....	7
2.2.1	コントラスト.....	8
2.2.2	コントラスト伝達関数.....	9
2.3	cryo-TEM の工程.....	11
2.4	構造解析.....	12
2.5	3次元再構成.....	14
2.6	Projection Slice Theorem.....	17
2.7	統計的最適化.....	19
2.7.1	最尤推定.....	20
2.7.2	最大事後確率推定.....	20
2.7.3	ベイズ推定.....	21
2.7.4	モンテカルロ積分.....	22
第 3 章	Soft-Body モデルを用いたベイズ推定に基づくらせん再構成.....	24
3.1	背景.....	24
3.2	アルゴリズム.....	27
3.2.1	線形モデル.....	27
3.2.2	Soft-Body Model.....	29

3.2.3	変形.....	30
3.2.4	潜在変数.....	32
3.2.5	尤度.....	32
3.2.6	事前確率.....	33
3.2.7	事後確率最大化.....	34
3.2.8	下界の導出.....	35
3.2.9	ノイズ分散とエッジ変数の推定.....	37
3.2.10	二段階 EM アルゴリズム .....	38
3.2.11	E ステップ.....	39
3.2.12	M ステップ .....	40
3.2.13	従来のアルゴリズムとの相違点.....	42
3.3	評価.....	44
3.3.1	人工データによる評価.....	44
3.3.1.1	ゼロ平均データセット .....	44
3.3.1.2	非ゼロ平均データセット .....	48
3.3.2	実データによる評価.....	51
3.4	まとめ.....	53
第 4 章	ベイズ最適化を用いたラセンパラメータ推定.....	55
4.1	背景.....	55
4.2	ベイズ最適化.....	58
4.3	アルゴリズム .....	61
4.3.1	2 段階探索.....	62
4.4	評価.....	66
4.4.1	データセット .....	66

4.4.2	前処理.....	67
4.4.3	3次元再構成.....	67
4.4.4	尤度のばらつき.....	68
4.4.5	評価結果.....	70
4.4.6	計算量の削減.....	80
4.4.7	変形を考慮した Helix のための再構成アルゴリズムとの統合.....	82
4.5	まとめ.....	84
第5章	結論.....	85
5.1	変形を考慮したらせん再構成.....	85
5.2	cryo-TEM に対するベイズ最適化の適応.....	86
5.3	総括.....	87
謝辞	.....	89
参考文献	.....	90
業績	.....	96
付録	.....	97
A	3次 Spline 曲線.....	97
B	基底関数.....	100
C	3次 Spline 曲線上の最短点の導出.....	103
D	サブユニット空間への変換.....	106
E	下界の勾配の導出.....	111
F	人工らせんデータセットによる評価結果.....	112

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 本研究の背景

構造生物学 (structure biology) とは、生体高分子の構造および動的特性 (dynamics) を研究する分野であり、とりわけタンパク質の働きを解明するのに非常に貢献してきた。タンパク質は生物にとって重要な役割を果たす生体高分子である。その機能と構造には、密接な関係が存在する。例えば、生物の基本単位である細胞は、脂質二重層に覆われており、脂質二重層には受容体、イオンチャネル、トランスポーターと呼ばれる膜タンパク質が結合している。これらの膜タンパク質は、細胞内外の情報を伝達する重要な役割を担っていることが知られている。神経細胞の細胞膜にある受容体は、別の神経細胞から伸びた軸索の末端から放出される神経伝達物質と結合することで情報を伝達している。また、イオンチャネルは、膜電位やリガンドの結合がトリガーとなって、イオンを透過させるチャネルの開閉を行い、個々のパーツが相対的に動くことによってその機能を果たしている。このように、生体高分子は構造によってその機能を発揮することから、その立体構造を知ることが非常に重要である。

創薬に目を向けてみると、創薬ターゲットのほとんどは、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)、イオンチャネル、キナーゼ、核内ホルモン受容体またはプロテアーゼである [1]。その中でも GPCR は、種類が多く生理学的プロセスの調整に寄与していること、細胞表面に位置し薬がアクセスしやすいことから長年関心が持たれている。タンパク質や DNA などで決定された 3 次元構造が登録されているデータベースに Protein Data Bank (PDB) [2] がある。そこには、米国食品医薬品局 (FDA) によって 2010 年から 2016 年に承認された 210 の新薬のうちの 88% の構造情報が標的、または新薬、または標的と新薬とい

う形で登録されており [3]、今や創薬にとって3次元構造は欠かせないものとなっている。

現在、生体高分子の3次元構造を決定する手法には、X線結晶解析、Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 法、cryo transmission electron microscopy (略して cryo-TEM、あるいは cryo electron microscopy、略して cryo-EM) がある。前述のデータベース PDB に登録されている 145,000 の構造の決定に使用された手法の内訳は、X線結晶解析が 89.5% と圧倒的に多く、続いて NMR 法が 8.5%、cryo-TEM が 1.6% であるという報告がされている [3]。その中でも特に、cryo-TEM は、近年、目覚ましい成長を遂げており、年間登録数も既に NMR 法を超えたと言われている。

現在主流である X線結晶解析法は、観察対象の生体高分子を結晶化した試料に X線を照射して得られた回折像から立体構造を決定する [4]。一旦、生体高分子の単結晶が作製できれば、比較的短時間で X線結晶解析の結果が得られる。得られる3次元構造の分解能は結晶化の状態に依存する。均質で大きな結晶を作製できるかが、高分解能な3次元構造を決定できるかどうかの鍵となる [5]。ここで問題となるのは、関心のある生体高分子が結晶化するかどうかということである。結晶化には、十分な量の純粋かつ均質な精製された生体高分子が必要であり [6]、凝集や沈殿することなく生体高分子を過飽和の状態にする必要がある [7]。結晶化にかかる時間は生体高分子によってまちまちである。また、対象とする生体高分子がやわらかい場合は、結晶になりにくいと言われているように、そもそも結晶化が困難な場合もある。例えば、膜タンパク質の場合、タンパク質を膜から除去し、X線結晶解析に必要なサイズ、純度の規則的な結晶にするのは基本的に困難であることが知られている [8]。加えて、生体高分子に構造多型があるような場合、X線結晶解析を行うには結晶の均質性が求められることから、決定される構造は構造多型のうちのいずれか一つになる。

NMR 法は、核磁気共鳴を利用して生体高分子の構造を観測する手法である。試料は、溶液の状態で測定できるため、生理条件に近い状態で観察することが可能となる。また、生体高分子に構造多型が存在する場合に同時に観察できることや、生体高分子の動的構造を取り扱えるメリットがある。その一方、X線結晶解析よりも多くの試料を必要とし、加

えて試料は高濃度であることが求められる。さらに、解析対象となる生体高分子のサイズに制限があり、分子量が 40–50 kDa 以下の比較的低分子タンパク質に限定される [9]。

cryo-TEM は、急速凍結された生体高分子を極低温ステージが備え付けられた透過型電子顕微鏡 (TEM) で撮影し、得られた生体高分子の投影像から 3 次元構造を決定する手法である。透過型電子顕微鏡の鏡筒内は高真空状態であり、生体高分子をそのままの状態で鏡筒内に配置して観察することは困難である。そこで、生体高分子をバッファーごと急速凍結することで高真空の鏡筒内に試料を配置し、極低温状態に保ちながら観察を行う。これは、X 線結晶解析法とは異なり、結晶化なしで 3 次元構造の決定が行えるという利点をもたらす。近年、撮像デバイスの発達 [10][11][12]、自動撮影技術に代表される顕微鏡装置の改良 [13]、3 次元再構成アルゴリズムの改善により [14]、原子モデルの決定が可能な領域（近原子分解能）まで分解能が向上したことで注目を集めている [15][16][17]。

生体高分子は、機能の一部として構造多型を採用していることが多い。そのため、多くの試料は、構造的に完全に均質化することは困難である。異なる構造から得られた投影像を、同一の構造から得られた投影像として 3 次元構造を推定すると、推定精度劣化の原因となる。cryo-TEM では、3 次元構造の観点から観測画像を分類し、3 次元構造を推定する 3 次元構造分類<sup>1</sup> (3D Classification) が用いられる。3 次元構造分類は、構造多型に対して有効な手法であることが知られている [18]。

一方、透過型電子顕微鏡により得られるデータは 2 次元の投影像であり、生体高分子の 3 次元構造を決定するためには、投影像から 3 次元構造を推定しなければならない。2 次元画像から 3 次元構造の推定は 3 次元再構成と呼ばれる。cryo-TEM による 3 次元再構成は、一般的な 3 次元再構成問題のなかでも非常に難しい問題の 1 つと考えられる。まず、凍結前の生体高分子は溶液中でランダムな方向を向いており、そのままの状態ですべて瞬間的に薄層中に氷包埋されるため、生体高分子の投影像がどの方向から投影されたかは未知であ

---

<sup>1</sup> Classification (分類) とは、与えられたデータを似ているデータのグループ (クラス) に分類する処理を表す。3 次元構造分類では、3 次元構造の観点から投影像をクラス毎に分類し、分類されたクラス内の投影像を使用してクラス毎に 3 次元構造の推定を行う。

る。さらに、生体高分子の電子線による損傷を抑えるために、照射する総電子線量を制限する必要があり [19][20]、投影像の信号対雑音比<sup>2</sup> (SNR または S/N 比) が非常に低くなる。加えて、透過型電子顕微鏡によって撮影される投影像には、コントラスト伝達関数 (Contrast Transfer Function 略して CTF) と呼ばれる撮影条件に依存する変調が加えられる。CTF の特性<sup>3</sup>により、撮影画像内のいくつかの周波数情報は失われる。したがって、異なるデフォーカス量<sup>3</sup>で撮影された多量の投影像を統合することによって、低 S/N 比や CTF による情報劣化のために失われた情報を回復し、3次元構造を決定する必要がある。それでも、試料の結晶化が必要ないこと、生理状態に近い環境で観察が行えること、構造多型を取り扱えることは非常に大きなメリットであり、cryo-TEM は現在活発に研究が行われている。

3次元再構成では、3次元構造から投影像を生成する順投影 (Forward Projection) 計算と、投影像から3次元構造へ戻す逆投影 (Back Projection) 計算が行われ、この2つの投影処理が計算のほとんどを占める。多くの3次元再構成アルゴリズムは、この投影計算を周波数空間上で行う。周波数空間上の投影計算は、Projection Slice Theorem<sup>3</sup>のもとに成り立っている。実空間から周波数空間へデータを変換し、Projection Slice Theorem に基づいて投影計算を行うメリットの一つに、計算量の削減がある。これは、多量の投影像を使用して3次元構造の推定を行う cryo-TEM の3次元再構成にとって、大きなメリットである。

## 1.2 本研究の目的

前節では、3つの構造解析手法のメリット、デメリットについて触れ、特に本研究のターゲットである cryo-TEM に関してより詳細に言及した。本節では、本研究の目的について述べる。前述の cryo-TEM における3次元構造決定について整理すると、次のようになる。(1) 透過型電子顕微鏡によって得られた多量の投影像から投影方向と3次元構造を推定する。(2) 3次元再構成では、順投影計算と逆投影計算が処理の大半を占める。(3) 3次

---

<sup>2</sup> 信号対雑音比 (signal-to-noise ratio) は、信号とノイズの比率を表し、SNR または S/N 比などと記される。S/N 比が高い画像はノイズの少ない画像、S/N 比が低い画像はノイズの多い画像を表す。

<sup>3</sup> 第2章を参照のこと



元再構成アルゴリズムの多くは、周波数空間上で Projection Slice Theorem に基づく投影像計算を行う。

一方、Projection Slice Theorem を適用すると、3次元構造は剛体である、つまり変形が無いと仮定することになる。しかしながら、タンパク質は柔軟であり、この変形が無いという仮定が成り立たない場合がある。変形が無いという仮定のもとで、変形が加わったタンパク質の観測画像を用いると、3次元再構成アルゴリズムで仮定した観測モデルと、実際の観測プロセスとの間に不一致が発生する。

この不一致に関して、前述の3次元構造分類によって対処しようとしても、推定する3次元構造の数、いわゆるクラス数が無数に必要となる。クラス数の増加は、必然的にクラスに含まれるデータ数（投影像の数）を減少させる。結果として、推定される3次元構造が毎回変わってしまうなど推定が不安定となり、問題の解決策としては不十分である。

本論文では、柔軟なタンパク質としてらせん高分子 (Helix) をターゲットとし、Helix の投影像に様々な変形が加わっているという条件下で3次元再構成を実施するアルゴリズムを提案する。この際、パラメータによって変形を表現するモデルを定義し、ベイズ推定を用いて変形前の Helix の3次元構造を推定する。

本論文では、生体高分子のターゲットを Helix とした。Helix が持つらせん対称性は、らせんパラメータで規定することが可能である [21]。一般的に、Helix の3次元再構成では、3次元構造の推定に加えて、らせんパラメータの推定も実施される。Helix の3次元構造推定で、従来広く用いられている手法に iterative helical real-space reconstruction (IHRSR) がある [22]。IHRSR の特徴の一つに、3次元再構成とらせんパラメータ推定を交互に実施する点が挙げられる。

しかしながら、IHRSR には、3次元再構成の目的関数とらせんパラメータ推定の目的関数が異なり、全体として一つの目的関数を最適化していないことで、最適化の収束が保証されないという問題がある。目的関数とは、最適化問題において最大化または最小化される関数を表す。

本論文では、Helix の 3次元再構成において 3次元再構成とらせんパラメータ推定を一つの目的関数によって最適化する手法についても提案する。

### 1.3 論文構成

本論文は、5章により構成されている。第1章では、構造解析の重要性および、3つの構造解析手法に関して述べた。特に、cryo-TEM に関してはより詳細に説明した後に、従来の3次元再構成アルゴリズムの問題点に関して言及し、本研究の目的および論文構成について述べた。第2章では、cryo-TEM のデータ取得に使用される透過型電子顕微鏡の特性、cryo-TEM による観察手法、3次元再構成アルゴリズムに関して説明した。さらに、統計的最適化についても簡単に触れた。第3章では、変形を考慮したらせん再構成アルゴリズムを提案し、推定アルゴリズムの導出を行った。さらに、導出したアルゴリズムに関して、人工データを用いて効果を示した。加えて、実データを用いた評価によって、実環境に適応可能であることを示した。第4章では、ベイズ最適化を用いて、3次元再構成とらせんパラメータ推定を一つの目的関数によって最適化する手法を提案した。実データを用いた評価では、従来手法では推定が困難であった条件下で、提案手法ではらせんパラメータおよび3次元構造の推定が適切に実施可能であることを示した。第5章では、本研究の結論について述べた。

## 第 2 章

# cryo transmission electron microscopy

### 2.1 はじめに

第 1 章では、本研究の背景および目的に関して言及した。本章では、cryo-TEM において生体高分子がどのような装置を使用し、どのようにデータが採取されているかに関して説明する。加えて、得られたデータからどのような処理によって生体高分子の 3 次元構造が決定されるかについて述べる。さらに、生体高分子の 3 次元構造を決定する多くのアルゴリズムが採用する Projection Slice Theorem についても説明する。最後に、近年の 3 次元再構成アルゴリズムが使用する統計的最適化手法について簡単に触れる。

### 2.2 透過型電子顕微鏡

cryo-TEM では、生体高分子のデータを透過型電子顕微鏡によって収集する。透過型電子顕微鏡は、電子によって試料の内部を観察することができる。その構造は光学顕微鏡と同じであるが、可視光の代わりに電子を使用する。解像限界は光源の波長によって決まる。可視光の波長領域は 400–700 nm であるのに対して、電子の波長は加速電圧によって決まり、例えば、加速電圧が 200 kV の場合、0.00251 nm となる。これは、可視光に比べて非常に短いためより高い解像度で観測が可能となる。電子の波長  $\lambda$  は、加速電圧  $V$  によって、

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0e\left(V + \frac{eV^2}{2m_0c^2}\right)}} = \frac{1.226}{\sqrt{V + 0.9784 \times 10^{-6}V^2}} \quad (1)$$

のように表せる [23]。ここで、電子に関する物理量として、 $m_0 = 9.109 \times 10^{-31}$  kg、 $e = -1.602 \times 10^{-19}$  C、 $c = 2.998 \times 10^8$  m/sec、 $h = 6.626 \times 10^{-34}$  Jsec を用いた。式 (1) は、加速電圧が高くなるほど波長が短くなることを示している。さらに、波長が短くなると物質を透過する能力を表す透過能も高くなる。しかしながら、加速電圧の増加は、試料の放射線損傷増加の要因となる。cryo-TEM では、加速電圧 200 kV または 300 kV の透過型電子顕微鏡を使用することが多い。

電子顕微鏡のレンズは、光学顕微鏡のガラスやプラスチックによるレンズとは異なり、電界型または磁界型レンズが使用される。空気中では電子が自由に動けないことから、鏡筒内は高真空に維持される。透過型電子顕微鏡で試料を観察する場合、試料は真空中に配置されることとなる。撮影は、センサーデバイスにより行われる。初期は、写真フィルムにより記録されていたが、1990 年代から 2000 年代初頭にかけて、Charge Coupled Device (CCD) によって記録できるカメラが開発された [24]。CCD は直接電子を検出できないため、シンチレーターによって電子を光子に変換した後に、光ファイバーを通して CCD で撮像する。この種の光電変換は、センサーに届いた電子の点をさらに大きいサイズの光子の塊にボケさせ、高周波の情報を減少させる [25]。近年は、電子直接検出器 (Direct Detection Device) を備えた電子直接検出カメラ (Direct Detection Camera) の出現で [10][11][12]、電子から光子への変換無しに電子を直接検出することが可能となり、得られる画像の S/N 比が飛躍的に向上した。

### 2.2.1 コントラスト

cryo-TEM では、生体高分子を急速凍結することでアモルファス状の薄い氷の中に閉じ込め、極低温ステージを持つ透過型電子顕微鏡により観察する。氷の厚さは数百 nm と非常に薄い。一般的に、このような非常に薄い物体では、電子の波は、散乱や吸収をほとんど受けずに、位相のみが変化すると近似される。この近似は弱位相物体近似 (weak-phase object approximation) [26] と呼ばれる。薄い試料を通った電子の波は位相がズレ、一定距離進んだところで、位相の変化が振幅の変化に変換され像を形成する。この像は位相コントラストと呼ばれ [27][23]、振幅の像が形成される距離はデフォーカス量と呼ばれる。弱位相物体近似に基づくと、cryo-TEM では位相コントラストが支配的で、散乱吸収コントラ

スト（cryo-TEMでは、振幅コントラストと呼ばれることがある）は非常に小さい。散乱吸収コントラストとは、試料を透過した電子の波の散乱強度の違いをコントラストとして得たものを指す。

## 2.2.2 コントラスト伝達関数

前節で述べたように、cryo-TEMでは生体高分子の位相コントラストを撮影する。位相コントラストを撮影する場合、試料にフォーカスを合わせて撮影するとコントラストが非常に低くなるため、フォーカスを意図的にずらした状態で撮影する。フォーカスがずれた状態のことはデフォーカスと言い、フォーカスのずれ量のことをデフォーカス量という。

位相コントラストによって得られる像には、収差とデフォーカスに起因する位相のズレが加わる。この位相のズレにより得られる像の変化を周波数応答として表したものは、コントラスト伝達関数（Contrast Transfer Function 略してCTF）と呼ばれ、

$$\gamma(k) = \frac{\pi}{2} C_s \lambda^3 k^4 + \pi \lambda d k^2 \quad (2)$$

$$CTF(k) = \sqrt{1 - Q^2} \sin \gamma(k) + Q \cos \gamma(k) \quad (3)$$

のように表される [28]。ここで、 $k$  は波数、 $\lambda$  は電子の波長、 $C_s$  は3次球面収差係数、 $d$  はデフォーカス量を表す。さらに、 $Q$  は振幅コントラスト係数を表し、位相コントラストと振幅コントラストの割合を示す。図1は、式(3)を使用して各デフォーカス量におけるCTFをグラフで表したものである。グラフは、高周波になるほど、CTFは+1から-1の間の振動が激しくなることを示している。さらに、CTFは周波数応答、つまり変調前と変調後の値の比を表すことから、CTFの値が小さくなるほど情報の損失が発生する。特に、CTFが0となる周波数では、変調後の値が0となり情報の欠落が発生する。加えて、CTFはデフォーカス量によっても変化し、デフォーカス量が大きくなると振動が激しくなる。

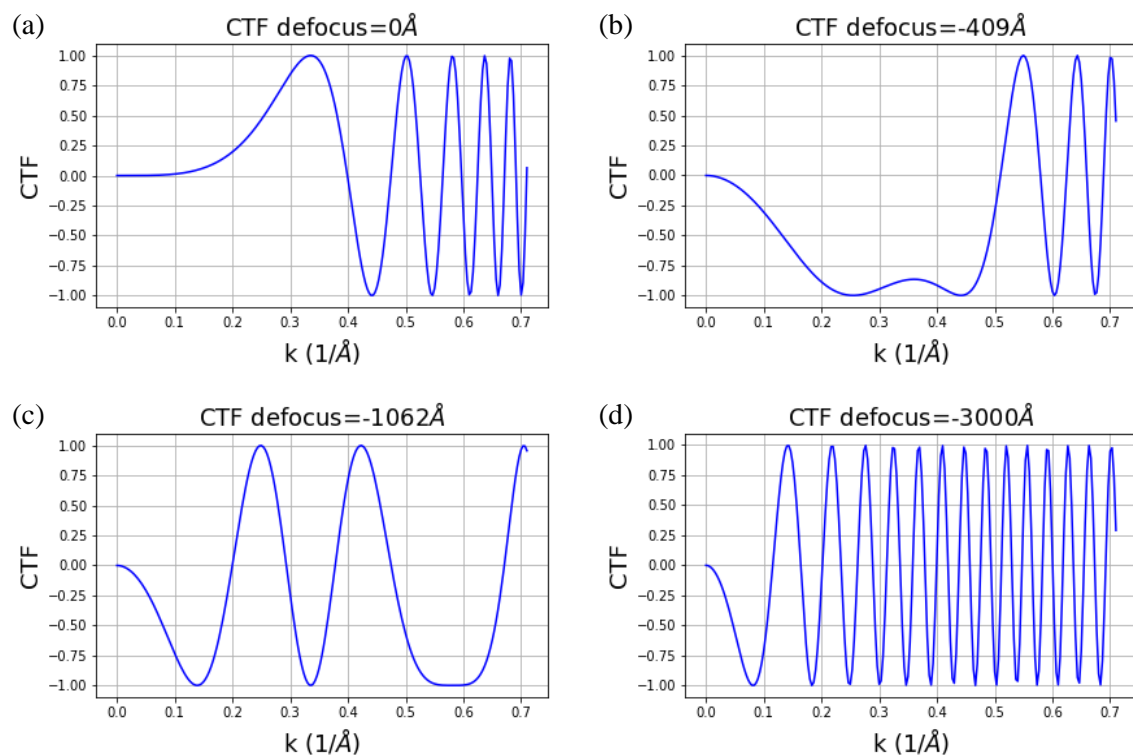


図1 グラフは、デフォーカス (defocus) におけるコントラスト伝達関数の違いを示したものである。横軸は周波数を表し、縦軸は周波数応答を表す。CTF 計算時の defocus は、グラフタイトルに記載した、(a) 0 Å、(b) -409 Å、(c) -1062 Å、(d) -3000 Å を使用した。さらに、加速電圧は 200 kV、球面収差係数  $C_s$  は 0.5 mm を使用した。(d) は、defocus が大きくなると周波数応答の振動が激しくなることを示している。さらに、defocus が小さい場合 (c) は、最初に周波数応答が 0 となる周波数が、高周波側になるのに対し、defocus が大きい場合 (d) は、最初に周波数応答が 0 となる周波数が、低周波側にあることがわかる。また、CTF が負となる周波数では白と黒の反転が発生する。defocus が小さいほうが、白黒反転の無い情報が高周波領域まで観測画像に存在することを示しており (b)、一般的に、高分解能な 3 次元構造を推定するためには、defocus は小さくするほうが望ましいとされる。しかしながら、defocus が小さい場合 (a) は、低周波領域の周波数応答が 0 に近くなっており、観測画像内の低周波情報が失われることを示している。画像の低周波情報は物体の輪郭を表すと言われており、defocus を小さくして撮影すると輪郭情報が失われ、さらに観測画像のコントラストも低くなり、粒子の抽出が困難になるというトレードオフが存在する。

## 2.3 cryo-TEM の工程

一般的な cryo-TEM による生体高分子の観察および構造解析工程は、図 2 に示すように、生体高分子の精製、スクリーニング、試料作製、電顕撮影、構造解析の順で行われる。本節では、試料作製から電顕撮影まで述べ、次節で構造解析について述べる。

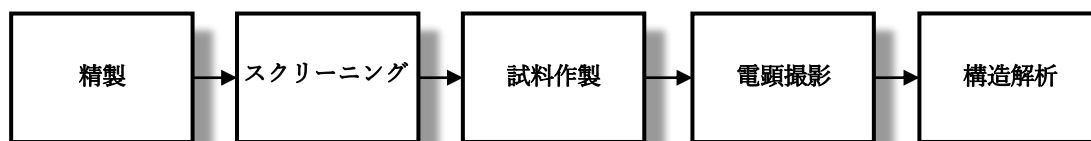


図 2 cryo-TEM 作業工程: 精製工程は、観察対象となる生体高分子の精製（抽出、調製）処理を行う。スクリーニング工程は、ネガティブ染色法などを使用して観察し、調製されたサンプルの状態の確認作業を行う。試料作製工程は、サンプルを氷包埋し、観察用試料を作製する工程である。電顕撮影工程では、急速凍結した試料を透過型電子顕微鏡で撮影する。構造解析工程は、撮影された電子顕微鏡画像から 3 次元構造の決定を行う。

構造解析を行う際には、できるだけ試料が均質であったほうが解析はスムーズに行える。そこで、精製工程では試料の抽出および調製を行い、スクリーニング工程では精製された生体高分子をネガティブ染色法などで観察し、濃度や均一性の観点から試料を評価する。試料作製工程では、透過型電子顕微鏡で撮影するための試料を作製する。まず、数百 nm から数  $\mu\text{m}$  の穴が空いたカーボン膜がはられたグリッド上に、生体高分子が含まれた水溶液を滴下する。余分な水溶液をろ紙で吸い取ったのちに、液体窒素で冷却された液体エタンに素早くグリッドを挿入し、急速凍結することでアモルファス状の薄い氷に生体高分子を包埋する。生体高分子は、なるべく薄い氷に包埋したほうが良いとされる。しかし、塩濃度やグリセロールの有無などの水溶液の状態、ろ紙によって吸い取る時間、滴下する水溶液の量、液体エタンにグリッドを挿入するまでの時間などの様々な要因によってできあがる試料の状態は大きく異なる。初期は、すべて手動により試料作製を行っていたが、近年は、試料作製を半自動で行う装置が登場した。より定量的に作製条件を調整することが可能となり、比較的効率よく試料作製が行えるようになった。作製した試料は、極低温ステージを備えた透過型電子顕微鏡により観察される。3次元構造を決定するために

は多量の生体高分子の投影像が必要である。最近では自動化撮影機能により、大量の電顕画像<sup>4</sup>の取得が可能となってきた。以上の工程により得られた電顕画像を用いて構造解析が行われる。

## 2.4 構造解析

cryo-TEM により得られた電顕画像から 3次元構造を決定する典型的なワークフローは、図3に示すように、Motion Correction、CTF Estimation、粒子抽出 (Picking)、2次元画像分類 (2D Classification)、3次元再構成 (3D Reconstruction)<sup>5</sup>、3次元構造分類 (3D Classification)、3次元精密化 (3D Refinement) となる [20]。

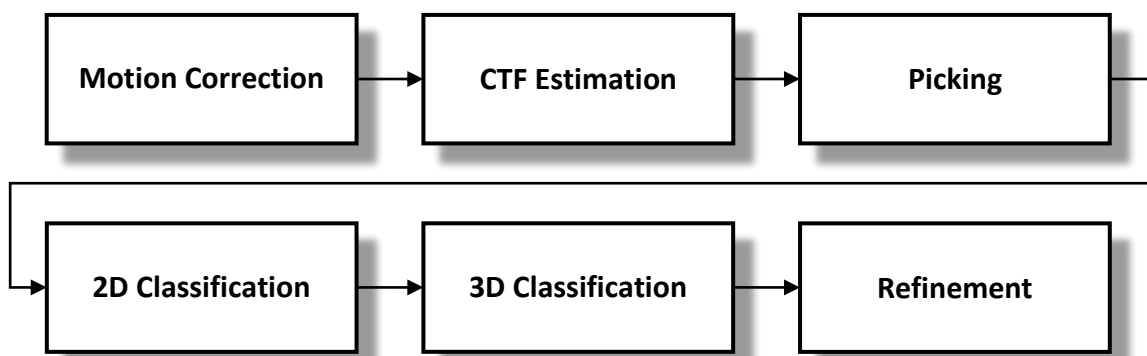


図3図は構造解析作業工程を表す。Motion Correction は、透過型電子顕微鏡により撮影した動画のフレーム間の位置合わせを行い、1枚の画像に変換する処理を行う。CTF Estimation は、各電顕画像のデフォーカス量を推定する。粒子抽出 (Picking) は、電顕画像から粒子画像の抽出を行う。2次元画像分類 (2D Classification) は、複数の粒子画像から似ている画像をグループごとに分類する処理を行う。3次元構造分類 (3D Classification) は、3次元再構成を行い、同じ3次元構造から投影されたと推測される粒子画像毎に分類する処理を行う。3次元精密化 (Refinement) は3次元構造の精密化処理を行う。図では、3次元構造分類 (3D Classification) で3次元再構成 (3D Reconstruction) を行うことから、2つを分割せずに3次元構造分類でまとめて表記した。

<sup>4</sup> 透過型電子顕微鏡により撮影された画像を指す。電顕画像内には、多数の生体高分子の投影像が含まれる。

<sup>5</sup> 3次元構造分類で3次元再構成を行うことから、2つを分けずに3次元構造分類でまとめて表記されることがある



Motion Correction では、Movie モードで撮影された電顕画像に対して、位置補正の処理を行う。透過型電子顕微鏡により照射された電子ビームは、試料の動きを誘発し、撮影画像のボケにつながり、分解能低下の要因となる。そこで、試料を Movie モードで撮影し、撮影した動画のフレーム画像を 1 フレーム毎に位置合わせを行い、重ね合わせることで撮影画像の S/N 比改善が報告されている [29][30]。この位置合わせ処理は Motion Correction と呼ばれ、様々なアルゴリズムが提案されている [11][31][32]。

前述のとおり、透過型電子顕微鏡により撮影された画像は CTF により変調される。通常、CTF は、加速電圧、3 次球面収差係数、デフォーカス量、振幅コントラスト係数によって表される。加速電圧や球面収差係数は、装置固有のパラメータとして与えられ、振幅コントラスト係数は、Hyper Parameter<sup>6</sup>として、ユーザーにより固定値 (0.07–0.14 [33]) が指定される。撮影の際には、透過型電子顕微鏡にデフォーカス量を設定する必要があり、情報の欠落を補うためには、なるべく様々なデフォーカス量で撮影を行ったほうがよいとされている。しかしながら、装置に表示されているデフォーカス量はあくまで目安であること、加えて生体高分子が包埋されている深さは個々に異なるため、実際のデフォーカス量は、撮影された生体高分子ごとに異なる。そこで構造解析では、電顕画像毎にデフォーカス量の推定を行う<sup>7</sup>。デフォーカス量の推定処理は CTF Estimation と呼ばれる。CTF Estimation を行うアルゴリズムは、CTFFIND [34] や Gctf [28] などがある。

Picking の工程では、電顕画像から手動、半自動、または全自動によって粒子（ここでは生体高分子を指す）の抽出を行う。2 次元画像分類 (2D Classification) では、切り出した粒子画像の教師なし Classification を行う。教師なしとは、ユーザーによってあらかじめ何らかの正解を与えることなしに、与えられたデータの特徴のみを使用することを表している。つまり、粒子画像のみから似ている画像をクラスに分類する処理を行う。2 次元画像分類を行う目的の一つは、不良粒子画像の除去にある。不良粒子画像除去では、クラス内の粒子画像により生成される平均像が不明瞭なクラスや、含まれる粒子画像数が極端に少ないクラスに属する粒子画像を取り除く。この取捨選択はユーザーにより手動で行われ

---

<sup>6</sup> ユーザーによってあらかじめ設定されるパラメータ

<sup>7</sup> 本来、粒子毎にデフォーカスは異なるが、通常は粒子が多数含まれる一枚の電顕画像毎にデフォーカスの推定が行われる。

る。3次元構造分類では、3次元再構成を行い、3次元構造の観点から粒子画像の分類を実施する。3次元構造分類によって分類した粒子画像により推定された各3次元構造の中から、明瞭な3次元構造が見られるクラスを選択し、クラスに含まれる粒子画像を使用して3次元精密化処理により最終的な3次元構造を推定する。

## 2.5 3次元再構成

3次元再構成では、図4に示すように3次元構造から投影像を生成する順投影 (Forward Projection) を行い、得られた投影像と観測画像から投影方向を決定し、決定された投影方向へ観測画像を3次元構造に戻す逆投影 (Back Projection) を行って3次元構造を推定する。2次元画像から3次元構造を推定する問題は3次元再構成と呼ばれ、これは逆問題 (Inverse Problem) に属する。逆問題とは、既知の物理過程を経て生成された観測データ (結果) から、観測データを生成した要因 (原因) を推定する問題のことを指す。前述の通り、cryo-TEMの3次元再構成は、投影方向が未知である、CTFによる情報の欠落がある、得られる観測画像が非常に Noisy である、という条件下で3次元構造を推定する。一般的に、このような問題設定は不良設定問題と呼ばれる。不良設定問題では、与えられたデータに過剰適合してしまう overfitting が問題となる。

3次元再構成の Traditional な手法では、フィルターを用いて低 S/N 比の周波数では再構成をあまり実施しないように制限をかけることで overfitting を防止していた。しかしながら、フィルターのヒューリスティック<sup>8</sup>なパラメータ調整を必要とし、ユーザーによる恣意性が含まれるという問題があった [35]。

統計的な手法を用いたアルゴリズムとしては、尤度の期待値を最大化する、いわゆる最尤法を使用するものがある [36][37]。しかし、最尤法は、観測データをもっともよく説明できるように3次元構造の推定が行われるため、観測データが非常に Noisy である cryo-TEM の不良設定問題が要因となる overfitting の直接的な解法としては不十分である。

---

<sup>8</sup> 何らかの経験則に基づいた

ヒューリスティックなパラメータ調整を排除するための試みとして、ベイズ推定を用いたアルゴリズムが提案されている。不良設定問題は、得られた観測データから一意に解が定められないことを意味するが、現実的にとりえる解は特定の特性を持っている。この性質を事前知識として利用し、事後確率を最大化する *Maximum a posteriori* 推定<sup>9</sup>を使用することで *ad hoc*<sup>10</sup>な調整を排除した RELION [35][14]は、3次元再構成ソフトウェアの中で近年最も成功したソフトウェアの一つである。

---

<sup>9</sup> 2.7.2 参照

<sup>10</sup> *ad-hoc* は、特定の問題のためだけを意味する

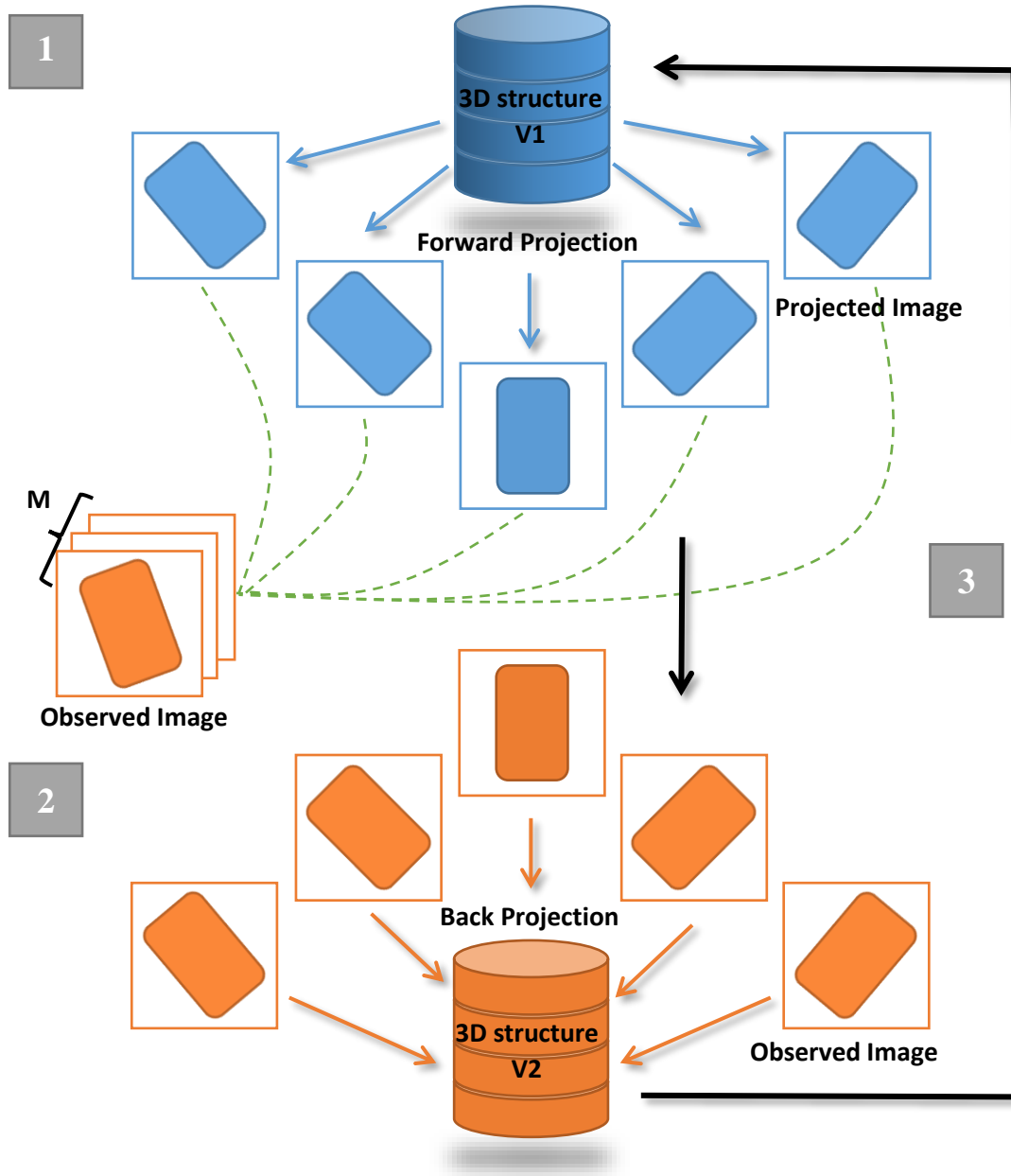


図4 3次元再構成処理は、(1) 3次元構造 V1 から様々な位置、投影方向の投影像 (Projected Image) を生成し、生成した投影像と観測画像 (Observed Image) を使用して観測画像の投影方向および位置を推定する。(2) 推定した投影方向および位置を用いて3次元構造 V2 を推定する。(3) 推定した3次元構造 V2 を V1 として、(1) の処理を行う。以上の処理を繰り返し最終的な3次元構造を推定する。

## 2.6 Projection Slice Theorem

前節で、3次元再構成では、3次元構造から投影像を生成する順投影 (Forward Projection) 計算と、投影像から3次元構造へ戻す逆投影 (Back Projection) 計算が行われると述べた。本節では、3次元構造と投影像間の関係を表した Projection Slice Theorem に関して説明する。

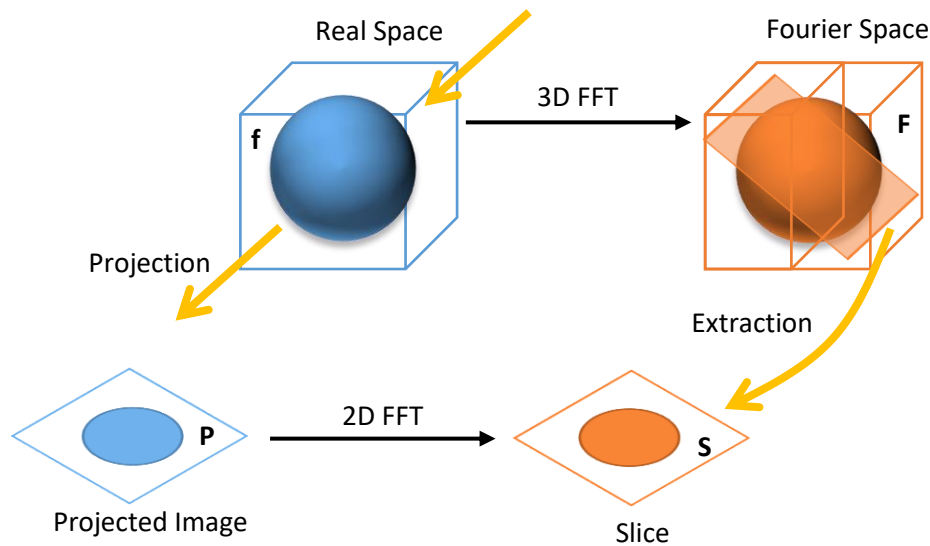


図5 Projection Slice Theorem は、実空間上の投影処理 (左) と周波数空間上のスライス処理 (右) の関係性を表している。Projection Slice Theorem では、実空間上の3次元物体  $f$  をある角度で投影した投影像  $P$  のフーリエ変換像と、3次元物体  $f$  を3次元フーリエ変換した  $F$  から同じ角度で中心を通る面でスライスした  $S$  が等しいことを示している。

図5は、Projection Slice Theorem を説明するためのイメージ図である。Projection Slice Theorem によると、実空間上のある方向からの投影像 (Projected Image)  $P$  の2次元フーリエ変換像は、3次元空間の物体  $f$  を3次元フーリエ変換した変換像  $F$  を投影と同じ角度で中心を通る面でスライスした  $S$  と一致する。実空間上で投影像を計算するには、投影像のあらゆる点に対して、光線方向の積分 (または積算) を行う必要がある。一方、Projection Slice Theorem によれば、一度3次元空間から周波数空間に変換しておけば、投影像のフーリエ変換は、投影方向に対応した面を抜き出すだけで取得することが可能となる。図6は、実空間と周波数空間の関係をまとめた図である。順投影と逆投影が周波数空間上のスライスの抽出と挿入によって可能であることを示している。3次元物体の投影像を大量に

生成する必要がある cryo-TEM の 3 次元再構成にとって、計算コストの面から非常に大きなメリットがある。しかしながら、これは、ある 3 次元構造から生成される投影像に関する順投影と逆投影に対して成り立つものであり、3 次元構造は剛体であると仮定していることになる。

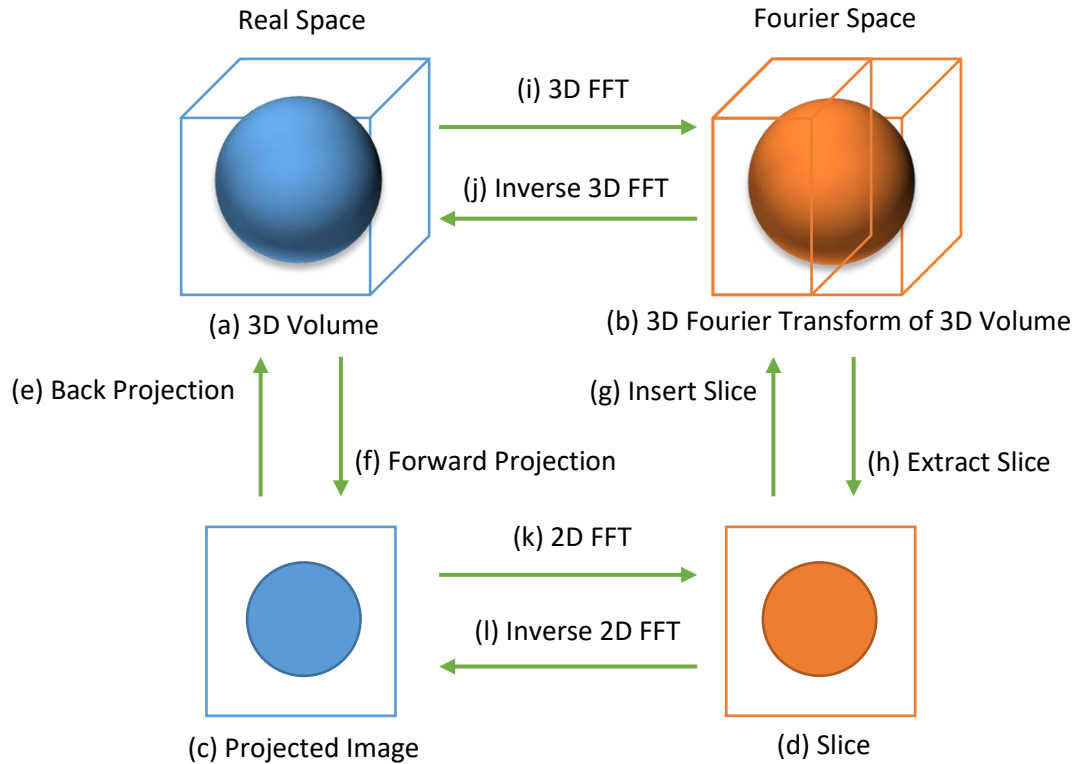


図 6 実空間上の 3 次元構造、投影像、周波数空間上の 3 次元構造のフーリエ像、スライス像と変換処理の関係を示す。(a)–(d) は変換処理の入出力を表し、(e)–(l) は変換処理を表す。Forward Projection (f) と Back Projection (e) は、それぞれ 3 次元構造 (a) から投影像 (c) を生成する処理と、投影像 (c) から 3 次元構造 (a) を生成する処理を表す。Extract Slice (h) と Insert Slice (g) は、それぞれ 3 次元構造のフーリエ変換像 (b) から投影方向と同じ角度で中心を通る面 (d) の抽出および挿入処理を表す。2D と 3D の FFT および Inverse FFT (i)–(l) は、それぞれの次元のフーリエ変換処理と逆フーリエ変換処理を表す。

## 2.7 統計的最適化

不確定性が含まれる観測データからその観測データを生成した要因を推定する場合、統計的に取り扱うのが有効である。中でもベイズ推定（推論）は、不確実性を確率分布で表現し、推論の枠組みに不確実性を効果的に取り入れることが可能である。ベイズ推定では、統計モデルの定義と、観測データに基づいて推論を行う。本節では、ベイズ推定に必要な事項に関して簡単に触れる。

ある2つの確率変数<sup>11</sup>、 $y$ と $\theta$ があって、 $y$ と $\theta$ に関するある事象が同時に起こる確率を同時確率と呼び $p(y, \theta)$ と記される。さらに、確率変数 $\theta$ に関して以下のように積分し、変数を除去する操作は周辺化と呼ばれ、周辺化によって得られる確率 $p(y)$ は周辺確率または周辺分布と呼ばれる。

$$p(y) = \int p(\theta, y) d\theta \quad (4)$$

確率変数 $y$ の特定の事象 $y_0$ が与えられたときの確率変数 $\theta$ の確率は、条件付き確率と呼ばれ、

$$p(\theta|y = y_0) = \frac{p(\theta, y = y_0)}{p(y = y_0)} \quad (5)$$

のように書く。式(5)から $p(y|\theta) = p(\theta, y)/p(\theta)$ とも書けるので、 $p(\theta|y)$ は、

$$p(\theta|y) = \frac{p(y|\theta)p(\theta)}{p(y)} = \frac{p(y|\theta)p(\theta)}{\int p(\theta, y) d\theta} \quad (6)$$

のように書くことができる。式(6)はベイズの定理と呼ばれ、原因 $\theta$ から結果 $y$ が得られる確率が与えられたとき、結果 $y$ から原因 $\theta$ の確率が得られることを示している。 $y$ を観測データ、 $\theta$ を推定したいモデルパラメータとしたとき、 $p(\theta|y)$ は観測データ $y$ が得られ

---

<sup>11</sup> 値が確率的に決まる変数

た後の、モデルパラメータ  $\theta$  の確率を表すため事後確率と呼ばれる。さらに、 $p(\theta)$  は観測データ  $y$  が得られる前のモデルパラメータ  $\theta$  の確率を表すため事前確率と呼ばれる。事前確率を導入することによって、事前知識を表現することが可能となる。 $p(y|\theta)$  はモデルパラメータ  $\theta$  が与えられたときの、観測データ  $y$  の尤もらしさを表し、尤度または  $p(y|\theta)$  を  $\theta$  の関数ととらえて尤度関数と呼ばれる。尤度関数は、パラメータ  $\theta$  からどのように観測データ  $y$  が発生されるかを記述した関数であり、その仮定のもとで特定のパラメータ  $\theta$  が与えられたときに観測データ  $y$  がどれだけ適合しているかを表している。次節以降では、統計的最適化手法について述べる。

### 2.7.1 最尤推定

統計的最適化の目的は、得られたデータが何らかの確率分布に従って生成されたとして、その確率分布のパラメータを推定することにある。最尤推定は得られたデータのみからパラメータの推定を行う手法である。最尤推定の考えでは、パラメータ  $\theta$  によって特徴づけられた確率密度関数<sup>12</sup>  $p(y_i|\theta)$  からランダムに標本  $y = \{y_i | i = 1, \dots, M\}$  が得られたとすると、最適な  $\theta$  は尤度  $L(\theta) = \sum_{i=1}^M \log p(y_i|\theta)$  が最大になるときとする。このとき、最大となる  $\theta$  の値は、最尤推定量  $\theta_{ML}$  と呼ばれ、

$$\theta_{ML} = \operatorname{argmax}_{\theta} \log p(y|\theta) \quad (7)$$

のように書かれる。最尤推定では、得られたデータ  $y$  を最もよく表す  $\theta$  は、観測されたデータの確率を最大化する（観測データ  $y$  がもっとも発生しやすい  $\theta$ ）としている [38]。

### 2.7.2 最大事後確率推定

前述の最尤推定は、観測データに基づいて尤度を最大化する。最尤推定は、データ数が少ないときに、過剰にデータに適合してしまう過適合 (overfitting) という現象を引き起こすことがある。最大事後確率 (*Maximum a Posteriori* 略して MAP) 推定では、パラメータ  $\theta$

<sup>12</sup> ある範囲内の値を取る確率が関数  $f(x)$  のある範囲の積分で表されるとき  $f(x)$  を確率密度関数と呼ぶ



の事前確率  $p(\theta)$  を導入し、観測データ  $y$  が与えられたもとで  $\theta$  の事後確率  $p(\theta|y)$  を最大化する。ベイズの定理を用いると事後確率は  $p(\theta|y) = p(y|\theta)p(\theta)/p(y)$  とかける。 $p(y)$  は  $\theta$  に依存しないため、事後確率の最大化は、以下のように書くことができる。

$$\hat{\theta}_{MAP} = \operatorname{argmax}_{\theta} \log p(\theta|y) = \operatorname{argmax}_{\theta} [\log p(y|\theta) + \log p(\theta)] \quad (8)$$

MAP 推定では、対数尤度  $\log p(y|\theta)$  に事前確率  $\log p(\theta)$  を加えたものを最大化することになる。この最大化において、事前確率は対数尤度が過剰に大きくなるようにする罰則の役目を果たす。このような追加の項を加えて最適化する手法は正則化と呼ばれ、追加の項は正則化項と呼ばれる。MAP 推定は、事前確率を導入することで、観測データが少数の場合でも、データに対する過適合を抑制することができる。

### 2.7.3 ベイズ推定

前述した最尤推定も MAP 推定も、もっともデータをうまく表現するパラメータ  $\theta$  一点のみを推定しているため点推定と呼ばれる。ベイズ推定では、 $\theta$  をある一点のみではなく確率分布として推定する。式 (4)、(5) から周辺尤度は以下のように書くことができる。

$$p(y) = \int p(y|\theta)p(\theta) d\theta = \int \prod_{i=1}^M p(y_i|\theta)p(\theta) d\theta \quad (9)$$

さらに、ベイズの定理と周辺尤度、式 (9) から事後確率  $p(\theta|y)$  は以下のように書ける。

$$p(\theta|y) = \frac{\prod_{i=1}^M p(y_i|\theta)p(\theta)}{\int \prod_{i=1}^M p(y_i|\theta')p(\theta') d\theta'} \quad (10)$$

$p(y|\theta)$  をパラメータ  $\theta$  の事後確率  $p(\theta|y)$  に関して積分消去すると、確率密度関数の推定量  $\hat{p}(y)$  は、

$$\hat{p}(y) = \int p(y|\theta)p(\theta|y) d\theta = \int p(y|\theta) \frac{\prod_{i=1}^M p(y_i|\theta)p(\theta)}{\int \prod_{i=1}^M p(y_i|\theta')p(\theta')d\theta'} d\theta \quad (11)$$

のように得られる。ただし、式 (11) における積分は一般的に困難な場合が多く、実際に計算する場合は、近似計算を用いることが多い。

ベイズ推定と、最尤推定や MAP 推定との違いは、最尤推定や MAP 推定が点推定なのに対して、ベイズ推定は確率分布を推定<sup>13</sup>する点にある。最尤推定や MAP 推定は、尤度関数または事後確率を最大化して  $\theta$  に関して一つの推定量を求める。これは、 $\theta$  の他の可能性を排除していることになる。対して、ベイズ推定では推定量が式 (10) のようにパラメータの確率分布として得られる。さらに、得られた確率分布  $p(\theta|y)$  で  $p(y|\theta)$  を積分 (平均化) することで、様々な可能性を考慮した予測分布  $\hat{p}(y)$  を得ることが可能となる。

#### 2.7.4 モンテカルロ積分

ベイズ推定では、式 (11) のようにパラメータ  $\theta$  に関して積分消去することで確率密度関数の推定量を得ることができる。しかしながら仮に事後確率  $p(\theta|y)$  が得られたとしても一般的に尤度  $p(y|\theta)$  は複雑な形状をしていることが多く解析的に積分を解くことが困難である。このような場合にモンテカルロ法と呼ばれる数値計算法によって、積分を近似的に求めることが行われる。

$f(x)$  の  $q(x)$  に関する期待値は、

$$E_{q(x)}[f(x)] = \int f(x)q(x) dx \quad (12)$$

のように書くことができる。モンテカルロ積分では、 $q(x)$  から独立に抽出されたサンプルの集合  $x = \{x_i | i = 1, \dots, n\}$  から、

---

<sup>13</sup> 分布推定と呼ばれる

$$\hat{f}_n = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f(x_i) \quad (13)$$

のように計算を行うことで近似解を求める。ここで、 $n$ は、 $q(x)$  から独立に抽出されたサンプルの数を表す。さらに、標本平均  $\hat{f}_n$  の期待値  $E[\hat{f}_n]$  と  $f(x)$  の期待値  $E[f(x)]$  には以下の関係が成り立つ。

$$E[\hat{f}_n] = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n E[f(x_i)] = E[f(x)] \quad (14)$$

また、標本平均  $\hat{f}_n$  の分散は、

$$\text{Var}[\hat{f}_n] = \text{Var}\left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f(x_i)\right] = \frac{1}{n} \text{Var}[f(x)] \quad (15)$$

のように書ける。式 (15) はサンプル数  $n$  を大きくすると、標本平均  $\hat{f}_n$  の分散が小さくなることを示している。すなわち近似解のばらつきを小さくするためには、サンプル数を多くする必要がある。

## 第 3 章

# Soft-Body モデルを用いたベイズ推定に基づくらせん再構成

### 3.1 背景

cryo-TEM におけるタンパク質の 3 次元構造推定は逆問題の一種である。逆問題とは、Forward Process<sup>14</sup>によって生成された観測値から未知の原因変数を推定する問題を表す。基本的に、逆問題では、Forward Process は既知の物理プロセスとされる。逆問題に分類される Computer Tomography と同様に、複数の観測画像を使用して 3 次元構造を推定する。一般に、この種の再構成においては、観測画像は基本的にすべて既知の観察プロセスに従って、同じ 3 次元構造から生成されると仮定する。しかしながら、cryo-TEM により得られる観測画像の場合、氷の中の粒子の向きは実質的にランダムであるため、観測プロセスが部分的に不明になる。さらに、観測画像は非常に Noisy なため、3 次元構造を推定しながら、粒子を正確に位置合わせ (alignment) し、投影方向を決定することは困難である。もう一つの問題は、タンパク質は柔らかく簡単に曲がる可能性があるということである。したがって、観測過程におけるパラメータが未知であるだけでなく、投影像の背後の 3 次元構造も投影像間で必ずしも一致しない。

本章では、柔軟な Helix (らせん分子) の 3 次元再構成に焦点を当て、近似ベイズ推定を使用することによって、この非常に困難な逆問題に取り組む。以降では、柔軟でらせん対称性をもつフィラメント (Filament) である Helix を対象とした 3 次元再構成アルゴリズムを示す。

---

<sup>14</sup> 入力から出力方向への通常の処理手順 (プロセス)

ベイズ推定は不確実性を確率分布で表現できることから、推定の不確実性を効果的に取り入れられることが知られている。特に、*ad hoc*<sup>15</sup>なパラメータ調整なしで正確な推定が行えるということで最も成功したアルゴリズムの1つとして知られている RELION [14] は、cryo-TEM 画像からの3次元再構成のために、ベイズ推定を利用する先駆的なアルゴリズムである。しかし、観測モデルと実際の観測プロセスとの間には不一致が存在する可能性があり、それらの推定は必ずしも成功するとは限らない。そのような不一致の要因の1つが Helix の変形である。この困難な逆問題の推定精度を向上させるために、変形を説明するための潜在変数<sup>16</sup>（隠れ変数）を導入する。さらに、これらの潜在変数の事後確率の推定に、いわゆる平均場近似法を利用する近似ベイズ推定アルゴリズムを用いて、Registration パラメータ（投影方向や位置を表すパラメータ）とともに変形パラメータを推定する。

らせん対称性をもつフィラメントタンパク質およびウイルスは、サブユニットとして知られる基本要素からなるらせん特性を有することがある。らせんの形状は、twist および rise と呼ばれるらせんパラメータによって特徴付けられる（図7）。らせんの中心軸は直線的に伸びているが、実際には完全な直線ではなく、曲がっている可能性がある。

近年、主流である3次元再構成アルゴリズム [14][39][40]は、周波数空間（フーリエ空間）における3次元ボリュームとその2次元投影との間の関係を記述するために線形観測モデルを使用している。このモデルの理論的背景は、Projection Slice Theorem を拠り所としている。データを実空間から周波数空間に変換することによって、投影計算のコストを削減できる。一方、Projection Slice Theorem を適用すると、3次元構造は少なくとも全体的にまたは局所的に剛体であると暗黙のうちに仮定されるため、実空間での変形を盛り込むことは困難である。変形を考慮した既存の研究は、そのような局所的な剛体を仮定し、周波数空間で再構成計算を行う。Nakane ら [41]は部分信号減算を利用し、Rohou ら [40]はらせん対称性の周期性の連続的な変化を表現することができる実空間モデルを使用して

---

<sup>15</sup> 特定の問題のためだけを意味する

<sup>16</sup> 潜在変数は、直接観測はできないが、変数間の関係を表すための変数を指す。

Maximum a Posteriori (MAP) 推定を行った。しかしながら、Rohou らの手法は、推定すべきパラメータが多量にあるため、パラメータの最適化が困難であった。

本章では、パラメータによって連続的な変形を表現する Soft-Body Model を用いて 3次元再構成を実施する手法を提案する。

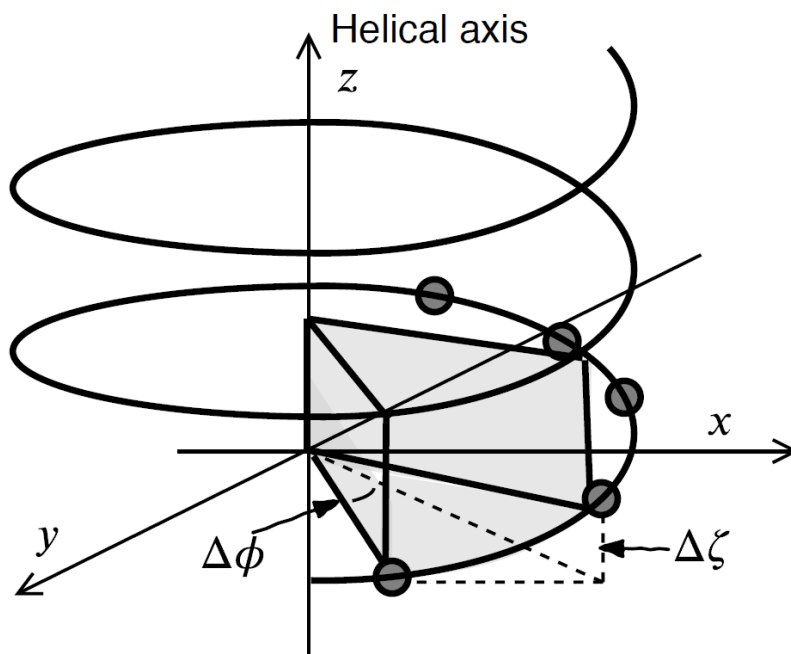


図7 Helical Model: 図は、らせんパラメータ twist  $\Delta\phi$  および rise  $\Delta\zeta$  とサブユニット（網掛け領域）を表す。らせん対称性は、らせん軸 ( $z$  軸) 回りに  $\Delta\phi$  回転し、 $z$  軸方向に  $\Delta\zeta$  に移動したときに同じ値になることを表す。サブユニット内はらせん対称性を持たず、非対称ユニット (Asymmetric Unit) と呼ばれることがある。

## 3.2 アルゴリズム

### 3.2.1 線形モデル

本提案手法で定義した cryo-TEM による観測過程に関して説明する。観測過程は、どのように観測データが得られるかというプロセスを示したものである。前章で述べた通り、cryo-TEM では、急速凍結された生体高分子を透過型電子顕微鏡で撮影する。このとき生体高分子の姿勢はランダムである。加えて、透過型電子顕微鏡で撮影した投影像にはコントラスト伝達関数による変調が加わる。このコントラスト伝達関数は、デフォーカス量と密接な関係があり、粒子画像<sup>17</sup>毎に異なる。さらに、本提案手法では、各粒子画像内の生体高分子、すなわち Helix に変形が加わっていることを想定する。以上のことを考慮し、cryo-TEM による観測過程を実空間上で

$$y_i = H_i * P(v_i)D(V; s_i) + \epsilon_i \quad (16)$$

のように記述する。ここで、 $y_i$  は生体高分子を含むように電顕画像から切り出した  $i$  番目 ( $i = 1, \dots, M$ ) の画像 Patch<sup>18</sup>を表し、 $M$  は画像 Patch の枚数を表し、 $V$  は Helix の 3 次元構造を表し、 $v_i$  は投影方向と、Helix をセンタリングするための原点からのオフセットを表し、 $P(v_i)$  は  $v_i$  によって決まる 3 次元構造から投影像を生成する投影行列を表す。 $D(V; s_i)$  は、変形パラメータ  $s_i$  によって変形された  $V$  を表す。 $H_i$  は Point Spread Function<sup>19</sup>を表し、 $i$  番目の画像に適応されているコントラスト伝達関数  $CTF_i$  の逆フーリエ変換により得られる。 $*$  は畳み込み演算子を表し、 $\epsilon_i$  は観測画像  $y_i$  に加えられている平均 0、分散  $\sigma_i^2$  の Gaussian Noise を表す。添字  $i$  は、 $i$  番目の画像に関する変数であることを示す。図 8 は観測過程を図示したものである。3 次元構造  $V$  は変形パラメータ  $s_i$  によって変形され  $D(V; s_i)$  となり、パラメータ  $v_i$  によって決まる投影方向と位置から投影され、 $CTF_i$  によ

<sup>17</sup> 実際、Helix は粒子では無いが、本論文では、電顕画像から抽出した画像を粒子画像と表記する

<sup>18</sup> 画像 Patch は 1 枚の画像から切り取られた画像を表す

<sup>19</sup> Point Spread Function とは、点拡がり関数とも呼ばれ、システムのインパルス応答を表す。この場合のインパルス応答は、点光源がシステムを通ったときにどのような分布になるかを示している。

って決まる Point Spread Function  $H_i$  で変調され、ノイズ  $\epsilon_i$  が付加され最終的な観測画像  $y_i$  となることを示している。

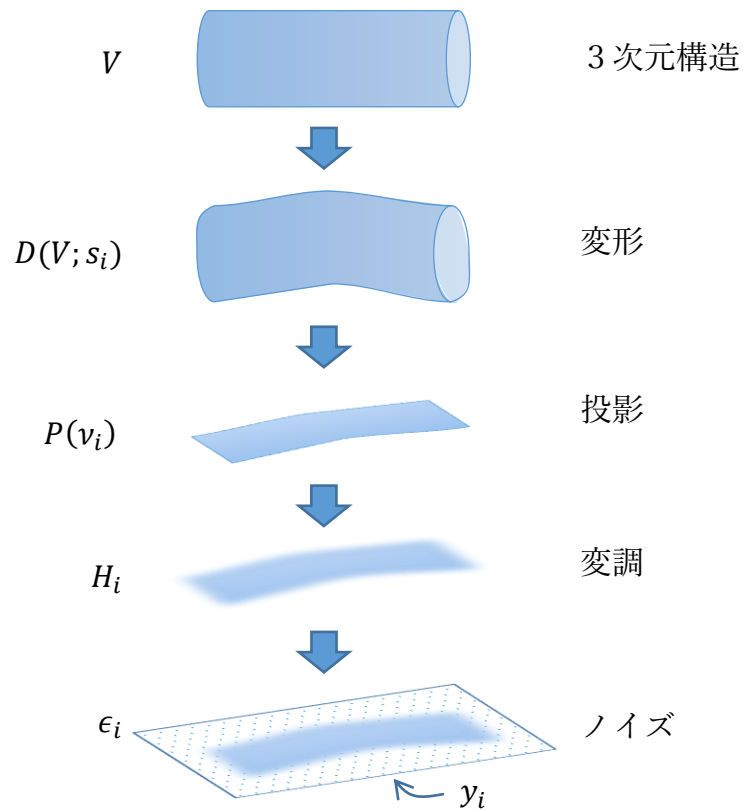


図8図は、提案手法で定義した観測過程である。観測画像  $y_i$  は、3次元構造  $V$  が変形され、投影され、CTF による変調がかかり、ノイズが加わって得られる。 $D(V; s_i)$  は、3次元構造  $V$  が変形パラメータ  $s_i$  によって変形された3次元構造を表す。 $P(v_i)$  は  $v_i$  によって決まる3次元構造から投影像を生成する投影行列を表す。 $H_i$  は Point Spread Function を表し、CTF の逆フーリエ変換により得られる。 $\epsilon_i$  は観測画像  $y_i$  に加えられている平均0、分散  $\sigma_i^2$  の Gaussian Noise を表す。



### 3.2.2 Soft-Body Model

Helix の 3次元構造は、らせん軸の周りをらせん経路に沿って配置されたサブユニットからなる。図7に示すように、らせん経路は2つのらせんパラメータ、twist  $\Delta\phi$  と rise  $\Delta\zeta$  によって決定される。らせんパラメータを使用することによって、らせん対称性は、円柱座標系の任意の点  $(r, \phi, \zeta)$  で、

$$V(r, \phi, \zeta) = V(r, \phi + n\Delta\phi, \zeta + n\Delta\zeta) \quad (17)$$

のように表される [21]。ここで、 $n$  は任意の整数を表す。さらに、 $r (< R)$ 、 $\phi$ 、および  $\zeta$  は、それぞれ最大距離を  $R$  とする軸方向距離、方位角、および円柱座標の軸座標を表す。提案手法では、上記のらせん対称性を利用し、サブユニットの3次元構造のみを推定する。これは推定されるパラメータの数を減らし、少ない観測画像で正確な推定を実現するのに大きく貢献する。さらに、サブユニットの3次元構造は、基底関数を使用して、

$$V(r, \phi, \zeta) = \sum_{j \in N(r, \phi, \zeta)} a_j \psi_j(r, \phi, \zeta; t_j) \quad (18)$$

のように表す。ここで、 $\psi_j(r, \phi, \zeta; t_j)$  は  $t_j$  に位置する基底関数を表し、 $a_j$  は重みを表す。 $N(r, \phi, \zeta)$  は、点  $(r, \phi, \zeta)$  の近傍にある8つの基底関数のインデックス  $j$  の集合を表す。基底関数の中心  $t_j$  は円柱座標系に均等に配置される。さらに、 $V(r, \phi, \zeta)$  は近傍にある8つの基底関数の中心  $\{t_j | j \in N(r, \phi, \zeta)\}$  を頂点とした立方体内の trilinear interpolation によって表される<sup>20</sup>。基底関数  $\psi_j$  は、trilinear interpolation によって決定された  $a_j$  の重みである。基底関数表現は、Voxel 表現と異なり、3次元構造内の任意の位置での値  $V(r, \phi, \zeta)$  が計算可能になる。基底関数表現は、比較的少ない数のパラメータを用いて正確な位置合わせおよび、3次元構造の空間的な滑らかさを表現するのに有益である。

まとめると、3次元構造  $V$  を決定するために、重み  $a$  を推定する。らせんパラメータ  $\Delta\phi$  と  $\Delta\zeta$  は既知または、他の方法で推定できるとする。これは、2次元画像分類のクラ

<sup>20</sup> 詳細は付録 B 基底関数を参照のこと

ス平均画像の回折パターンをインデックス化することで実現できる [42]。  $a$  以外に、式 (49) より各観測画像  $y_i$  から 3 次元構造の情報を取得する為に、パラメータ  $v_i$ 、  $s_i$ 、 および  $\sigma_i$  も推定する必要がある。ここで、  $v_i$ 、  $s_i$ 、 および  $\sigma_i$  は、それぞれ、投影パラメータ、変形パラメータ、および観測ノイズの強度を表す。

### 3.2.3 変形

つぎに、変形と投影の詳細に関して説明する。あらゆる変形を表現するためには、多量のパラメータが必要となる。多量なパラメータは、3次元再構成を非常に困難にするため、現実的と思われる変形を少数のパラメータで表すこととし、以下の2つの仮定を課す。ここでは、図9をもとに説明する。第一に、Helixが変形している場合でも、Helixの長軸が投影方向 ( $y$  軸) に垂直な薄い氷の面に存在すると仮定する。第二に、 $xz$  平面内の変形はらせん軸  $\zeta$  の変形によって決まるとする。このらせん軸  $\zeta$  の連続的な変形は、3次 Spline [43]によって表現する。したがって、変形パラメータ  $s$  は、3次 Spline のパラメータ、すなわち way-point の 2次元座標を表す<sup>21</sup>。さらに、らせん軸の変形の方角に関しては、手動により初期値として与えた way-point のらせん軸に沿った方向の変位は無いと考えて固定し、らせん軸に垂直方向の変位のみを推定する。観測画像は、変形後の Helix の投影像として得られているとする。

任意の点  $q$  の変形後の座標が  $(x, z)$ 、変形前の座標が  $(\xi, \zeta)$  であるとする。このとき、 $\xi$  は  $q$  と  $p$  間の距離で表される。ここで、 $p$  は変形したらせん軸上の点でかつ、点  $q$  までの距離が最小となる点である<sup>22</sup>。さらに、 $\zeta$  は始点  $s_1$  から点  $p$  までの曲線に沿った距離として与える。図10は変形前後の座標変換を示している。3次元空間かららせんモデルのサブユニット空間への座標変換を以下にまとめる。(1) 3次元空間内の任意の点  $(x, y, z)$  を前述の処理により  $(\xi, y, \zeta)$  に変換し、(2)  $(\xi, y, \zeta)$  を円柱座標系  $(r, \phi, \zeta)$  に変換し、(3)  $(r, \phi, \zeta)$  をサブユニット空間への写像により  $(r', \phi', \zeta')$  に変換する。サブユニット空間への最後の写像は、らせん対称性により定義される<sup>23</sup>。

<sup>21</sup> 3次 Spline に関しては付録 A 3次 Spline 曲線を参照のこと

<sup>22</sup> 最短点に関しては付録 C 3次 Spline 曲線上の最短点の導出を参照のこと

<sup>23</sup> サブユニット空間への写像は付録 D サブユニット空間への変換を参照のこと

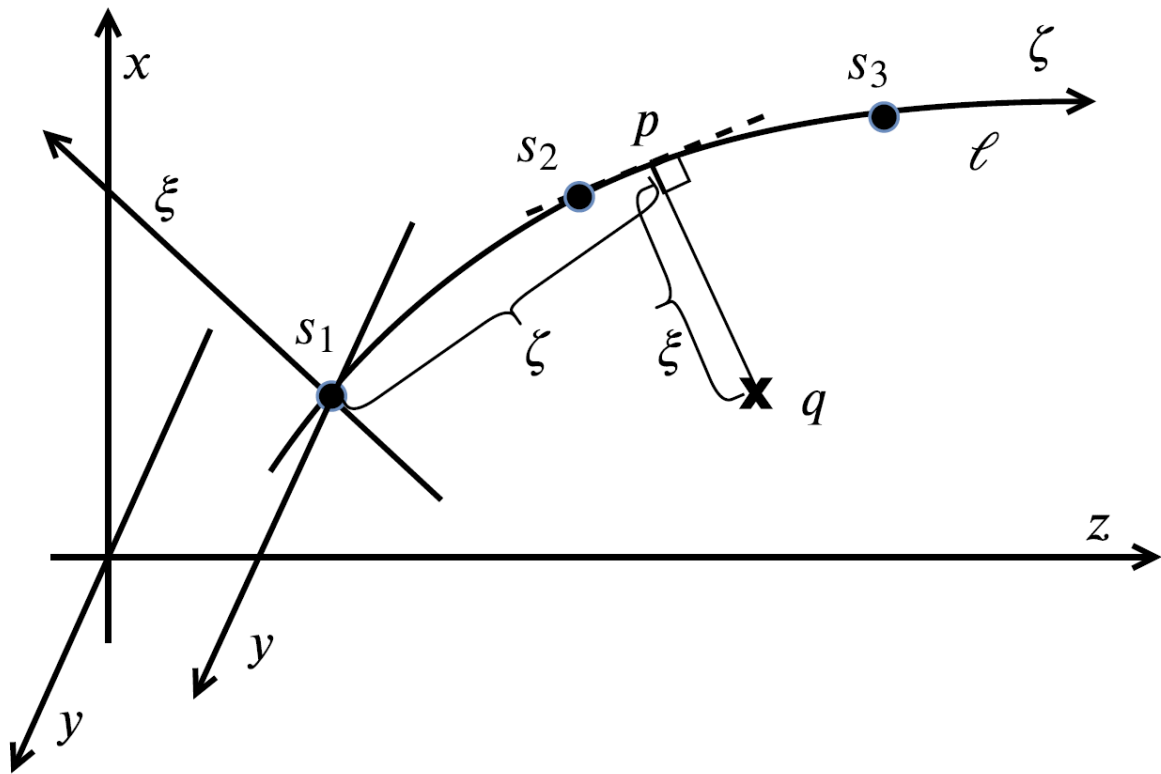


図9図は、実空間中の  $xyz$  直交座標系と Helix の中心を1つの軸とした  $\xi y \zeta$  座標系を示したものである。 $\zeta$  軸は、変形したらせん軸を表す。らせん軸の変形は3次 Spline によって表現し、 $s_1$ 、 $s_2$ 、 $s_3$  は3次 Spline のパラメータである way-point を表す。点  $q$  は、3次元空間上の任意の点を表し、変形後の座標は  $(x, y, z)$ 、変形前の座標は  $(\xi, y, \zeta)$  である。変形前の座標とは、3次元構造が変形される前の座標を表し、変形後の座標とは、3次元構造が変形された後の座標を表す。投影像は、変形後の座標中の3次元構造から投影処理により得られたとする。点  $p$  は変形したらせん軸上の点でかつ、点  $q$  までの距離が最小となる点である。 $\xi$  は  $q$  と  $p$  間の距離で表される。 $\zeta$  は始点  $s_1$  から点  $p$  までの曲線に沿った距離として与えられる。

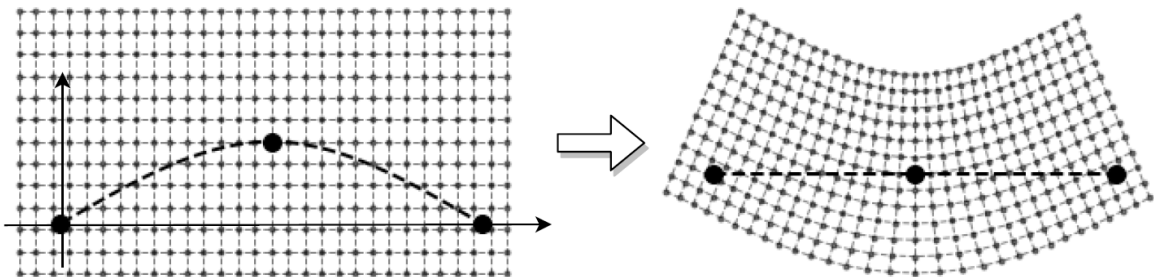


図10 変形後の空間(左)から変形前の空間(右)への  $xz$  平面の座標変換の例である。変形後の空間ではらせん軸が変形しているのに対し、変形前の空間ではらせん軸が直線になり、代わりに座標が変形することを示している。

### 3.2.4 潜在変数

投影像  $y_i$  に関しては、Helix のサブユニットは、Parameter  $v_i = (\omega_i, d_i, o_i)$  に従って、らせん軸に沿って配置される。 $\omega_i$  はらせん軸周りの回転を表し、 $d_i$  はらせん軸に平行な方向に沿ったシフト量を表す。 $o_i$  は、Helix の向きを決定する binary indicator を表す。ここで、同じ Helix から切り出される連続する画像 Patch については、 $o_i$  はすべて同じ値をとる。

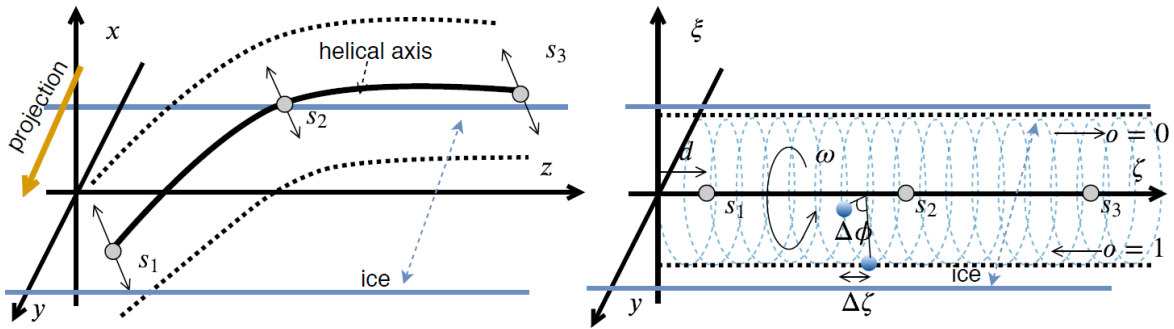


図 11 図は画像 Patch 毎に推定される潜在変数を示したものである。左図は、変形パラメータ  $s_i$  に関して説明した図であり、投影 (projection) は  $y$  軸に並行とし、氷は  $y$  軸に垂直な  $xy$  平面に並行に存在すると仮定する。 $s_i$  に記載の矢印は、変形パラメータの変位が、らせん軸 (helical axis) に垂直な方向のみとすることを示している。右図は、投影方向  $\omega_i$ 、シフト量  $d_i$ 、Helix の方向  $o_i$  に関して説明した図である。 $\omega_i$  は、らせん軸  $\zeta$  周りの回転を表し、 $d_i$  はらせん軸  $\zeta$  に平行な移動を表し、 $o_i$  は、Helix の方向を表す binary 変数である。 $y$  軸周りの回転は、変形パラメータ  $s_i$  によって表現される。Helix は  $xz$  平面に並行な薄い氷に存在し  $x$  軸回りの回転は無いものとする。 $\Delta\phi$  と  $\Delta\zeta$  は、らせんパラメータを表す。

### 3.2.5 尤度

推定の不確実性を考慮するために、観測過程と Soft-Body Model を統計モデルとして扱い、ベイズ推定を行う。図 11 は、各投影像を定義するのに必要なすべての潜在変数  $z_i = \{v_i, s_i\} = \{\omega_i, d_i, o_i, s_i\}$  を示したものである。式 (16) から尤度は、

$$p(y_i|z_i, \theta) = \mathcal{N}(y_i|H_i * P(v_i)D(V; s_i), \sigma_i^2) \quad (19)$$

のように表すことができる。ここで、 $\theta = (a, \sigma^2, \eta)$ 、 $\sigma^2 = (\sigma_1^2, \dots, \sigma_M^2)$  であり、 $\mathcal{N}(x|\mu, \sigma^2)$  は、平均  $\mu$ 、分散  $\sigma^2$  のガウス分布を表す<sup>24</sup>。

### 3.2.6 事前確率

正則化のために、事前確率 (prior) として潜在変数  $z = (z_1, \dots, z_M)$  に関して  $p(z)$  と、パラメータ  $\theta$  に関して  $p(\theta)$  を導入する。投影角度  $\omega_i$ 、シフト  $d_i$  および方向  $o_i$  をまとめたパラメータ  $v_i$  については、事前の知識がないため一様分布を仮定する。変形に関しては、Helix はまっすぐになる傾向があり、かつ 3次元ボリュームは局所的には滑らかであるという事前の知識を反映させるため、変形パラメータ  $s_i$  の prior を、平均ゼロのガウス分布とし、基底関数の重み  $a$  には、エッジ保存平滑化 prior [44][45][46]を適用する。エッジ保存平滑化 prior は、

$$\log p(a, \eta) = - \sum_{i \sim j} w_{ij} \left( \eta_{ij} (a_i - a_j)^2 + (1 - \eta_{ij}) \lambda \right) + C' \quad (20)$$

のように表される。ここで、 $C'$  は正規化定数を表す。 $i \sim j$  は、 $t_i$  と  $t_j$  が近傍であることを表す。 $\eta_{ij}$  は  $t_i$  と  $t_j$  の間にエッジが存在するかどうかを示す 0 か 1 のバイナリ変数である。 $\lambda$  は、正の定数パラメータで  $\eta_{ij}$  が 1 となるしきい値を制御する。 $\eta_{ij}$  が 1 のとき、エッジは平滑化 (smoothing) され、 $\eta_{ij}$  が 0 のとき、エッジは保存される。 $w_{ij}$  は、 $t_i$  と  $t_j$  の間の距離に応じた指数関数的減衰重み

$$w_{ij} = \alpha_w \exp \left( - \frac{\|t_i - t_j\|_2}{\beta_w} \right) \quad (21)$$

を表す。ここで、 $\alpha_w$  と  $\beta_w$  は定数である。

---

<sup>24</sup>  $\eta$  は後述

### 3.2.7 事後確率最大化

3次元構造とエッジ変数は、事後確率の最大化により推定する。事後確率  $p(\theta|y)$  はベイズの定理より、

$$p(\theta|y) = \frac{p(y|\theta)p(\theta)}{p(y)} = \frac{\prod_i^M p(y_i|\theta)p(\theta)}{\int p(y|\theta)p(\theta)d\theta} \quad (22)$$

のように書ける。ここで、 $y$  は  $(y_1, \dots, y_M)$  を表し、 $\theta$  は  $(a, \sigma^2, \eta)$  を表す。 $p(y_i|\theta)$  は各投影像の尤度を表し、 $p(\theta)$  は事前確率を表す。 $p(y)$  はモデルエビデンスまたは周辺尤度と呼ばれる。 $p(y)$  は  $\theta$  に依存しないので、事後確率は尤度と事前確率の積に比例し  $p(\theta|y) \propto p(y|\theta)p(\theta)$  のように書け、そこから対数事後確率は、

$$\begin{aligned} \log p(\theta|y) &= \log p(y|\theta) + \log p(\theta) + C \\ &= \sum_i^M \log p(y_i|\theta) + \log p(\theta) + C \end{aligned} \quad (23)$$

となる。ここで、 $C$  は  $-\log p(y)$  であり、正規化定数である。

cryo-TEMにより得られる観測画像は非常に Noisy であるため、観測画像  $y_i$  の投影条件を表す各パラメータ  $z = \{z_i | i = 1, \dots, M\}$  の推定には不確実性が伴う。観測画像の Noise が非常に大きいことに起因した不十分な観測データに基づいて、潜在変数  $z$  に関して点推定を行うことは、overfitting の危険性がある。overfitting の危険性を回避するために、潜在変数  $z$  に関して分布推定を行う。具体的には、潜在変数  $z$  に関して積分消去を行う。これにより、最大化される式の中に、不確実性を効果的に取り入れることが可能となる。潜在変数  $z$  を導入し  $z$  に関して周辺化すると、周辺尤度は、

$$p(y_i|\theta) = \int p(y_i, z_i|\theta) dz_i = \int p(y_i|z_i, \theta)p(z_i) dz_i \quad (24)$$

のように書ける。

### 3.2.8 下界の導出

$\theta$  に関しては、周辺尤度  $p(y_i|\theta)$  と prior  $p(\theta)$  に基づいて MAP 推定を実施する。しかし、事後確率の  $\theta$  に関する MAP 推定を考えた場合、式 (23) を直接最適化することは困難である。そこで、事後確率を直接計算するのではなく事後確率の下界<sup>25</sup>を求め、その下界を最大化する。潜在変数  $z$  に関して任意の確率分布  $q(z)$  を導入すると、尤度  $\log p(y|\theta)$  は以下のように書ける [47]。

$$\begin{aligned}\log p(y|\theta) &= \int q(z) \log p(y|\theta) dz \\ &= \int q(z) \log \frac{p(y, z|\theta)}{p(z|y, \theta)} dz \\ &= \int q(z) \log p(y, z|\theta) dz - \int q(z) \log p(z|y, \theta) dz\end{aligned}\tag{25}$$

さらに、 $p(y, z|\theta) = p(y|z, \theta)p(z)$  を式 (25) に代入すると、

$$\begin{aligned}\log p(y|\theta) &= \int q(z) \log p(y|z, \theta) dz + \int q(z) \log p(z) dz - \int q(z) \log p(z|y, \theta) dz \\ &= \int q(z) \log p(y|z, \theta) dz + \int q(z) \log p(z) dz - \int q(z) \log q(z) dz \\ &\quad + KL[q(z)|p(z|y, \theta)]\end{aligned}\tag{26}$$

を得る。ここで、 $KL[q(z)|p(z|y, \theta)]$  は、任意の確率分布  $q(z)$  と事後確率  $p(z|y, \theta)$  の Kullback-Leibler divergence (KL divergence または KL 距離) を表す。KL divergence は分布間の距離 (近さ) を表し、分布が近いほど小さい値になり、常に 0 以上の値をとる。

$$KL[q(z)|p(z)] = \int q(z) \log \frac{q(z)}{p(z)} dz \geq 0\tag{27}$$

---

<sup>25</sup> これ以上小さい値は取らないという値

事後確率、式 (23) に式 (26) を代入すると、

$$\begin{aligned} \log p(\theta|y) &= \int q(z) \log p(y|z, \theta) dz + \int q(z) \log p(z) dz - \int q(z) \log q(z) dz \\ &+ KL[q(z)|p(z|y, \theta)] + \log p(\theta) + C \end{aligned} \quad (28)$$

を得る。KL divergence は常に 0 以上となるため、事後確率の下界は、

$$\begin{aligned} F(q(z), \theta) &= \int q(z) \log p(y|z, \theta) dz + \int q(z) \log p(z) dz - \int q(z) \log q(z) dz \\ &+ \log p(\theta) \\ &= \sum_i^M \int q(z_i) \log p(y_i|z_i, \theta) dz_i + \int q(z_i) \log p(z_i) dz_i \\ &- \int q(z_i) \log q(z_i) dz_i + \log p(\theta) \end{aligned} \quad (29)$$

のようになる。事後確率は、下界と KL divergence の和によって、

$$\log p(\theta|y) = F(q(z), \theta) + KL[q(z)|p(z|y, \theta)] + C \quad (30)$$

のように書くことができる。ここで、下界  $F(q(z), \theta)$  は、 $q(z)$  に関して汎関数であり、 $\theta$  に関して関数となっている。 $\theta$  の MAP 推定は、 $\theta$  と  $q(z)$  の両方に関して最大化することで得られる。しかしながら、一般的に下界の  $q(z)$  と  $\theta$  の同時最適化は困難である。

ここからは、下界の最大化方法に関して説明する。事後確率は、任意の確率分布  $q(z)$  に依存しないため、下界  $F(q(z), \theta)$  の  $q(z)$  に関する最大化と KL divergence の  $q(z)$  に関する最小化は等価である<sup>26</sup>。したがって、 $q(z)$  に関して下界が最大になるとき、KL divergence は 0 になり、任意の確率分布  $q(z)$  は事後確率  $p(z|y, \theta)$  と一致する。すなわち、タイトなバウンド<sup>27</sup>をもつ下界を得るためには、下界を  $q(z)$  に関して最大化すればよ

<sup>26</sup>  $q(z)$  を変えても左辺の事後確率は変化しないので、下界を大きくすれば、相対的にKL距離は小さくなる

<sup>27</sup> 事後確率と下界の境界



い。さらに、その下界を  $\theta$  に関して最大化すると下界は増加し、加えて、任意の確率分布  $q(z)$  は更新前の  $\theta$  によって決められた値なので、 $KL[q(z)|p(z|y, \theta)]$  は正の値を持ち事後確率は増加する。したがって、下界を  $q(z)$  と  $\theta$  に関して、

$$\max_{\theta} \max_{q(z)} F(q(z), \theta) \quad (31)$$

のように、交互に最大化することによって、事後確率  $\log p(\theta|y)$  を最大化することができ、 $\theta$  の MAP 推定が得られる。

潜在変数を持つ確率モデルのパラメータを推定するためによく用いられる手法に、Expectation Maximization (EM) アルゴリズムがある [48]。EM アルゴリズムでは、潜在変数の事後確率を求める E ステップと、モデルパラメータを推定する M ステップを交互に繰り返す。下界  $F(q(z), \theta)$  の  $q(z)$  と  $\theta$  に関する最大化を、 $q(z)$  と  $\theta$  に関して交互に最大化することは、EM アルゴリズムのフレームワークを用いていると言える。

つぎに、任意の確率分布  $q(z)$  をパラメータで特徴づけられる分布族から選ぶ。パラメータ  $\tau = (\tau_1, \dots, \tau_M)$  で特徴づけられた分布を  $q(z; \tau)$  とすると、下界は以下のように書ける。

$$F(q(z; \tau), \theta) = \sum_i^M \int q(z_i; \tau_i) \log p(y_i | z_i, \theta) dz_i + \int q(z_i; \tau_i) \log p(z_i) dz_i - \int q(z_i; \tau_i) \log q(z_i; \tau_i) dz_i + \log p(\theta) \quad (32)$$

最終的に、 $\theta$  の MAP 推定は、 $\theta$  と  $\tau$  に関して下界を最大化することで得られる。

### 3.2.9 ノイズ分散とエッジ変数の推定

前節では、 $\theta$  の MAP 推定は、 $\theta$  と  $\tau$  に関する下界の最大化によって得られることを示した。 $\theta$  の構成要素は  $\theta = (a, \sigma^2, \eta)$  である。まず、最初にノイズ分散  $\sigma^2$  を推定し、つぎ

に、 $\sigma^2$  が与えられた条件下で、 $\tau$  と  $a$  と  $\eta$  を決定する。観測画像  $y_i$  のノイズ分散  $\sigma_i^2$  は、Helix が存在しないと仮定した領域（マスク領域外）の画素値の分散として与えられる。これは式 (19) の尤度の最尤推定によって得られる。

エッジ変数  $\eta$  は、 $a$  が更新されるたびに MAP 推定により求める。エッジ変数  $\eta$  は、バイナリ変数なので、式 (20) の  $(a_i - a_j)^2$  と  $\lambda$  を比較し事後確率が大きくなる方を選択する。具体的には、 $(a_i - a_j)^2 \geq \lambda$  のときは  $\eta_{ij} = 0$  とし、それ以外は  $\eta_{ij} = 1$  とする。

### 3.2.10 二段階 EM アルゴリズム

$\{\tau, a\}$  の最適化は、2 段階 (2 Phase) の EM アルゴリズムによって実施する。両方の Phase ともに、 $\tau$  は E ステップで最適化され、 $a$  は M ステップで最適化される。さらに、両方の Phase で、バイナリ変数  $o$  の周辺分布は Bernoulli 分布とする。しかし、残りの潜在変数の分布は、潜在変数  $z$  が観測過程へ複雑に依存しているため、よく知られているパラメトリックな分布で表現することが困難である。ただし、 $z$  の事後確率を正確に表現することはできないが、 $q(z)$  はいくつかの望ましい特性を満たす必要がある。最適化の開始時には、 $z$  がどのような値をとるのが妥当であるか未知のため、 $q(z)$  は多峰性 (multi-modal) 分布<sup>28</sup>をとるべきである。しかし、最適化が進むにつれて不確実性は徐々に減少するため、 $q(z)$  は単峰性 (uni-modal) 分布<sup>29</sup>に近づくはずである。そこで、第 1 Phase では、 $q(z)$  は  $z$  を荒く離散化した Categorical 分布として、

$$q_1(z_i | \tau_i^{(1)}) = \sum_{j=1}^{N^{(1)}} \tau_{ij}^{(1)} \delta(z_i - \Delta z_j) \quad (33)$$

のように表す。ここで、 $N^{(1)}$  はビンの数、 $\Delta z_j$  は  $j$  番目のビンの中心を表す。 $z$  を荒く推定した後、第 2 Phase に切り替えて解を絞り込む。多次元空間の細かい離散化は、 $N^{(1)}$  を指数関数的に増加させるので、第 2 Phase では  $q(z)$  に関してパラメトリック分布  $q(z; \tau)$  を仮定し、そのパラメータ  $\tau$  を最適化する。さらに、下界の最適化を容易にするため、式

<sup>28</sup> 多峰性とは分布の山が複数あることを指す

<sup>29</sup> 単峰性とは分布の山が 1 つであることを指す

(34) のように、平均場近似を使用する。つまり、 $q(z)$  は変数ごとに独立であると仮定する。

$$q(z) = q(\omega)q(d)q(o)q(s) \quad (34)$$

さらに、分布  $q(z)$  の各成分  $q(\omega)$  と  $q(d)$  および  $q(s)$  をガウス分布のような単純な単峰性の分布で制限し、平均と分散の初期推定値には第 1 Phase で得られた推定値を設定する。

### 3.2.11 E ステップ

第 1 Phase において  $q(z; \tau)$  が Categorical 分布  $q_1(z|\tau^{(1)})$  で表される場合、 $\tau^{(1)}$  に対する周辺対数尤度の最大化の解析解は、

$$q_1(z_i = \Delta z_k | y_i, \theta) = \frac{p(y_i | z_i = \Delta z_k, \theta)}{\sum_{j=1}^{N^{(1)}} p(y_i | z_i = \Delta z_j, \theta)} \quad (35)$$

のように書ける。この解析解を  $\tau^{(1)}$  に関する下界の最大化の近似解として使用する。

第 2 Phase では、 $\tau^{(2)}$  に関する下界の最大化は勾配降下法によって実施する。下界の  $\tau^{(2)}$  に関する勾配  $\nabla_{\tau_i^{(2)}} F(q_2(z_i|\tau_i^{(2)}), \theta)$  は、式 (32) を  $\tau^{(2)}$  に関して偏微分すると、

$$\nabla_{\tau_i^{(2)}} F(q_2(z_i|\tau_i^{(2)}), \theta) = \int q_2(z_i|\tau_i^{(2)}) G(z_i|\tau_i^{(2)}) dz_i \quad (36)$$

$$G(z_i|\tau_i^{(2)}) = \frac{\partial \log q_2(z_i|\tau_i^{(2)})}{\partial \tau_i^{(2)}} (\log p(y_i | z_i, \theta) + \log p(z_i) + \log q_2(z_i|\tau_i^{(2)})) \quad (37)$$

のようになる<sup>30</sup>。

---

<sup>30</sup> 下界の勾配の導出は付録 E 下界の勾配の導出を参照のこと

式 (36) の勾配  $\nabla_{\tau_i^{(2)}} F(q_2(z_i|\tau_i^{(2)}), \theta)$  の積分を解析的に解くことは困難である。解析的に解くことが困難な場合、モンテカルロ法によって積分を近似する方法が考えられる。しかし、勾配  $\nabla_{\tau_i^{(2)}} F(q_2(z_i|\tau_i^{(2)}), \theta)$  の近似精度を向上させるためには、確率分布から生成する変数の数が多く必要になる。さらに、勾配  $\nabla_{\tau_i^{(2)}} F(q_2(z_i|\tau_i^{(2)}), \theta)$  の計算は、観測画像数  $M$  と潜在変数  $z_i$  のパラメータである  $\tau_i$  の数の積だけ実施する必要がある。そのため、計算量が非常に多くなる。そこで、式 (36) の積分は、解析的に計算可能な期待値、すなわち  $z$  の線形関数  $G(z_i|\tau_i^{(2)})$  の  $q_2(z_i|\tau_i^{(2)})$  に関する期待値によって近似する。具体的には、式 (37) の  $G(z_i|\tau_i^{(2)})$  を

$$G(z_i|\tau_i^{(2)}) \approx A_{\tau_i^{(2)}} z_i + b_{\tau_i^{(2)}} \quad (38)$$

のように、超平面<sup>31</sup>で近似する。ここで、 $A_{\tau_i^{(2)}}$  と  $b_{\tau_i^{(2)}}$  は超平面の係数である。線形関数に関しては、 $q_2(z_i|\tau_i^{(2)})$  以外の被積分関数  $G(z_i|\tau_i^{(2)})$  を、 $q_2(z_i|\tau_i^{(2)})$  の平均  $\mu$  から  $q_2(z_i|\tau_i^{(2)})$  の標準偏差  $\sigma$  だけ離れたいくつかの標本点  $z_i$  すなわち  $\mu \pm \sigma$  で評価し、超平面の係数を推定する<sup>32</sup>。線形関数が推定された後、式 (36) は線形関数とガウス分布の積より解析的に計算できる。このとき、 $q_2(z_i|\tau_i^{(2)})$  のガウス分布のパラメータのうち、平均パラメータのみを勾配法によって推定し、標準偏差パラメータは最適化が進むにつれて初期値から線形的に減少させる。

### 3.2.12 M ステップ

M ステップでは、 $a$  に対して最適化を行う。下界は  $a$  に対して二次形式であるため、 $a$  に関する最大化は解析的に解くことができる。しかしながら、 $a$  の次元が大きい場合、逆行列の計算コストはそれに応じて高くなるため、実際には解析的に計算することが困難である。そこで、下界の  $a$  に関する最大化には勾配降下法を用いる。

<sup>31</sup> 2次元平面を  $n$ 次元へと一般化したもの

<sup>32</sup> 超平面の係数は最小二乗法により推定する

第1 Phase では、下界の  $a$  に関する勾配は、計算コストを抑えながら、適切な近似解を求めるために、Rao-Blackwellization [49][50][51]を使って、

$$\begin{aligned} \frac{\partial F(q_1(z_i|\tau_i^{(1)}), \theta)}{\partial a} &= \sum_{i=1}^M E_{q_1(z_i|\tau_i^{(1)})} [D_i(z_i, \theta)] + J(a, \eta) \\ &\approx \sum_{i=1}^M \left( \sum_{z_i \in \Omega_i} q_1(z_i|\tau_i^{(1)}) D_i(z_i, \theta) + \frac{T_i}{S^{(1)}} \sum_{t=1}^{S^{(1)}} D(z_{i,t}, \theta) \right) + J(a, \eta) \end{aligned} \quad (39)$$

$$z_{i,t} \sim q_1 \setminus \Omega_i(z_i|\tau_i^{(1)}) \quad (40)$$

$$D_i(z_i, \theta) = \frac{\partial \log p(y_i|z_i, \theta)}{\partial a} = \frac{1}{\sigma_i^2} (H_i * W(z_i))^T (y_i - H_i * W(z_i)a) \quad (41)$$

$$J(a, \eta) = \frac{\partial \log p(a, \eta)}{\partial a} \quad (42)$$

$$T_i = \sum_{z_{ij} \in \Omega_i^c} q_1(z_{ij}|\tau_i^{(1)}) \quad (43)$$

のように近似する。ここで、 $\Omega_i$  は、Categorical分布  $q_1(z_i|\tau_i^{(1)})$  のうち最大値から大きい順に  $K$  番目までに対応する  $z_i$  の集合を表し、 $\Omega_i^c$  は  $\Omega_i$  の補集合を表し、 $q_1 \setminus \Omega_i(z_i|\tau_i^{(1)})$  は補集合  $\Omega_i^c$  の Categorical 分布を表す。 $S^{(1)}$  は確率分布  $q_1 \setminus \Omega_i(z_i|\tau_i^{(1)})$  に従って生成する潜在変数  $z_{i,t}$  の数を表す<sup>33</sup>。

第2 Phase では、下界の  $a$  に関する勾配は、モンテカルロ法 [47]を使って、

$$\frac{\partial F(q_2(z_i|\tau_i^{(2)}), \theta)}{\partial a} \approx \frac{1}{S^{(2)}} \sum_{t=1}^{S^{(2)}} D(z_{i,t}, \theta) + J(a, \eta) \quad (44)$$

$$z_{i,t} \sim q_2(z_i|\tau_i^{(2)}) \quad (45)$$

のように近似する。ここで、 $S^{(2)}$  は確率分布  $q_2(z_i|\tau_i^{(2)})$  に従って生成する潜在変数  $z_{i,t}$  の数を表す。

<sup>33</sup> 確率の高い上位  $K$  番目までを計算し、残りはモンテカルロ法により近似する

最適化の擬似コードを以下に示す。

---

**Algorithm 1  $\theta = \text{HybridEM}(\theta_0)$**

---

- 1: for  $t = 1$  to  $N1$  do
  - 2:     Obtain  $\tau_t^{(1)} \approx \underset{\tau^{(1)}}{\operatorname{argmax}} F(q_1(z|\tau^{(1)}), \theta_{t-1})$
  - 3:     Obtain  $\theta_t \approx \underset{\theta}{\operatorname{argmax}} F(q_1(z|\tau_t^{(1)}), \theta)$  by L-BFGS-B [52] with an approximate gradient Eq. (39)
  - 4: end for
  - 5: Set  $\tau_1^{(2)}$  so as to  $q_2(z|\tau_1^{(2)}, \theta_{N1}) \approx q_1(z|\tau_{N1}^{(1)}, \theta_{N1})$
  - 6: for  $t = 1$  to  $N2$  do
  - 7:     Obtain  $\tau_t^{(2)} \approx \underset{\tau^{(2)}}{\operatorname{argmax}} F(q_2(z|\tau^{(2)}), \theta_{N1+t-1})$  by gradient descent
  - 8:     Obtain  $\theta_{N1+t} \approx \underset{\theta}{\operatorname{argmax}} F(q_2(z|\tau_t^{(2)}), \theta)$  by L-BFGS-B [52] with an approximate gradient Eq. (44)
  - 9: end for
- 

### 3.2.13 従来アルゴリズムとの相違点

本節では、提案手法の特徴をまとめる。RELION に代表される従来手法のほとんどにおいて、3次元構造は剛体と想定されている。対して、提案手法では、式(18)に示すように、あらかじめ定義された基底関数の重み和で構成される3次元の Soft-Body Model を想定した。そのため、Soft-Body Model では、実空間での観測過程をモデル化する必要がある。確率的観測モデル、式(19)は、3次元構造の変形パラメータと投影パラメータ、すなわち投影角とシフトが与えられた下で観測された投影像が、Soft-Body Model 自体からどのように生成されるかを表している (図 12)。低 S/N 比における変形パラメータ、投影

パラメータ推定の不確実性を考慮するために、それらを Prior として適用し、RELION などの最新の手法と同様に EM アルゴリズムを実施する。投影パラメータを正確に推定するには、E ステップでの投影パラメータの事後確率の適切な表現と最適化が重要である。一般的に事後確率は離散分布で表される。離散分布は多峰性 (multi-modal) 分布を表すことができるが、正確な推定のために細かい離散化を使用する場合には、非常に多くの計算を必要とする。変形パラメータおよび投影パラメータの事後確率の正確な推定における計算負荷を軽減するために、第 1 Phase で事後分布を離散分布と仮定し、第 2 Phase でさらに詳細に推定するために連続的な単峰性 (uni-modal) 分布であるガウス分布を仮定する。提案手法では、2つの異なる確率分布表現を用いた 2 段階の Hybrid EM アルゴリズムを採用する。両 Phase で、事後確率は周辺対数尤度と対数事前確率の和の下限式 (32) の最大化によって推定する。第 1 Phase の M ステップでは、効率的な計算のために Rao-Blackwellization を使用する。

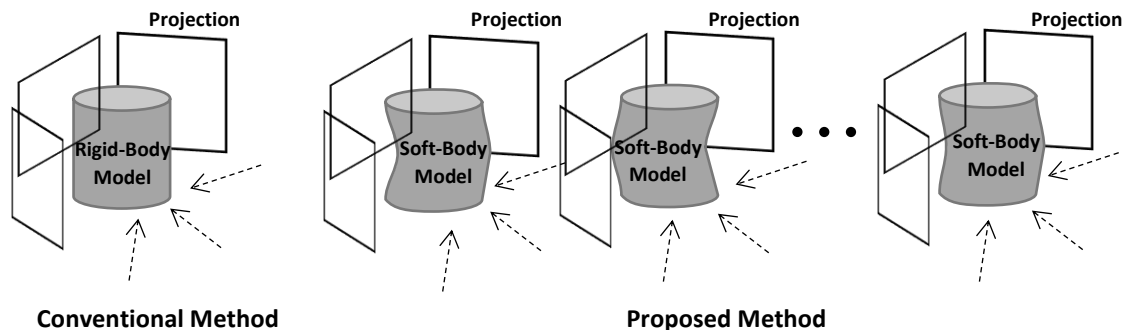


図 12 Rigid-Body Model を使用した手法と Soft-Body Model を使用した提案手法の違いを示す。従来手法は 3 次元構造が Rigid-Body であると仮定する。提案手法では、3 次元構造は観測画像毎に変形していると仮定し、その変形は Soft-Body Model により表現する。従来手法では一つの 3 次元構造から様々な投影方向、位置による投影像を生成する。一方、提案手法では、様々な変形に対して様々な投影方向、位置による投影像を生成することとなる。

### 3.3 評価

#### 3.3.1 人工データによる評価

##### 3.3.1.1 ゼロ平均データセット

提案した Soft-Body Model の有効性を評価するために、ランダムに変形した人工らせんを用いて、提案手法とまっすぐならせん軸を仮定した Rigid-Body Model を用いた手法とを比較した。性能を定量的に比較するために、人工らせん状フィラメントから生成された投影画像をシミュレーションにより生成した [図 13 (a) と図 13 (b)]。

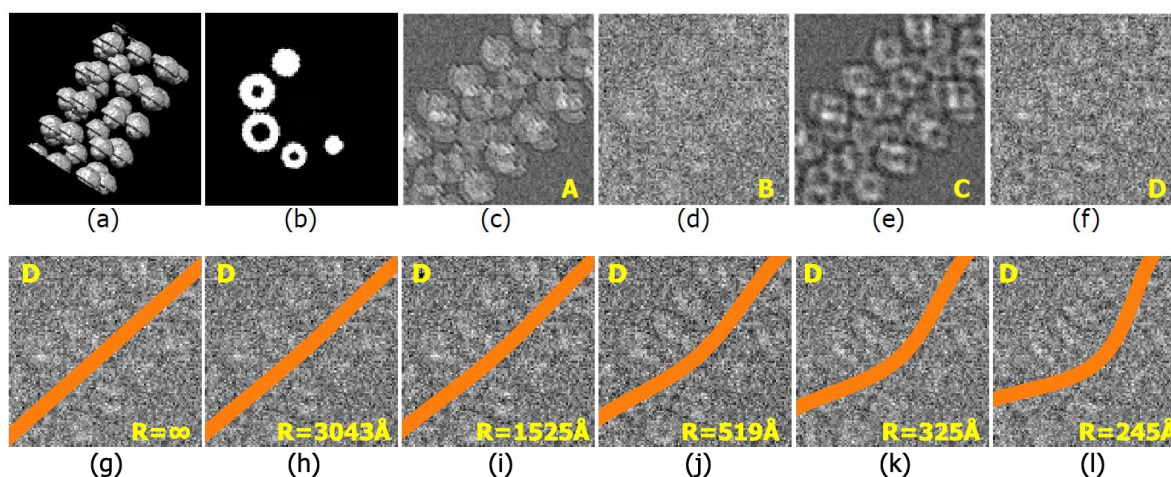


図 13 実験に使用した人工 Helix とそのシミュレーション投影像 (a) 人工 Helix の 3 次元構造、(b) 人工 Helix の断面図、(c)–(f) 異なる条件 A、B、C、D でのシミュレーション投影像、A: Weak ノイズ、Small デフォーカス、B: Strong ノイズ、Small デフォーカス、C: Weak ノイズ、Large デフォーカス、D: Strong ノイズ、Large デフォーカス。Weak ノイズの平均 PSNR は 24.1 dB である。Strong ノイズの平均 PSNR は 9.6 dB である。Small デフォーカスは、700–2000 Å の間でランダムに設定した。Large デフォーカスは、3500–10000 Å の間でランダムに設定した。(g)–(l) 6 つの異なる曲率の Helix の投影像の例。オレンジ色の太い曲線は、モデルの変形したらせん軸を表す。下記の R は、太いオレンジの曲線上の複数の点で計算された平均曲率半径を表す。

Soft-Body Model のより高い表現力は、提案手法の Rigid-Body Model に対する優位性を保証するものではない。それは、Soft-Body Model では、画像内の Helix の変形を記述するために、各投影に対して追加の変数を計算する必要があるからである。



推定精度を評価するために、二つの画像間の再構成誤差を測定した。一つは観測によって得られたもの（観測画像）であり、もう一つは推定された投影パラメータを用いて、推定した変形3次元ボリュームから投影によって生成した画像である。評価は、2つのレベルのノイズと2つのレベルのデフォーカスを組み合わせた4つの異なる観察条件の下で実施した [図 13 (c)–(l) を参照]。観測画像は、観測画像内に含まれる Helix の変形量にしたがって6つのグループに分割した。すなわち6つの異なる最大曲率を用意し、Helix の変形量を表す曲率は、0 からその最大曲率までの間でランダムに決定した。より正確に言うと、変形パラメータ  $s_i$  をゼロ平均一様分布  $[-\sigma_s, \sigma_s]$  に従って生成した。ここで、 $\sigma_s \in \{0, 0.5, 1, 3, 5, 7\}$  である。各条件下で、200 枚の観測画像を推定に使用した。この推定を各条件について10回実施した。この際、観測画像は推定施行毎に新たに生成した。再構成誤差はピーク信号対雑音比 (peak signal-to-noise ratio 略して PSNR) を使って測定した。ここで、誤差は観察された投影像と、推定した変形パラメータを用いて変形した3次元構造から投影した再投影像との間の差とした。さらに、3次元構造の断面の比較、すなわち観測画像を生成するために用いた3次元モデルと再構成した3次元構造との間で断面の比較を行った。

図 14 に、Soft-Body Model (青) と Rigid-Body Model (緑) の PSNR を示した。図 15 には、推定した3次元構造のらせん軸に垂直な断面である。図 14 および図 15 の (A) および (C) に示すように、比較的ノイズが小さい場合、Soft-Body Model の PSNR はそれほど減少していない。一方、Rigid-Body Model の PSNR はらせん軸の曲率が増加、すなわち変形が大きくなるにつれて明らかに減少し、推定された3次元構造の断面はぼやけていた。最大の変形が直線に対してそれほど明白な差が見られない小さな変形の場合でも、ぼけが明白であることは注目に値する [図 13 (h)–(j) を参照]。RELION は、解析から非常に曲がったらせんを除外することを勧めているが、彼らは  $1/400 \text{ \AA}$  [42] を曲率の閾値として使ったと報告している (この閾値は、柔軟な filament として知られている mitochondrial antiviral signaling and caspase activation and recruitment domain filament [53] に対する彼らの解析から計算した)。この閾値は、今回の実験で使用した曲率、 $1/3043 \text{ \AA}$ 、 $1/1525 \text{ \AA}$ 、 $1/519 \text{ \AA}$  よりも大きい。細いフィラメントの曲率の識別は、図 5 に示すように、ノイズのため困難であり、観測画像に投影されたフィラメントのほとんどの曲率は、 $1/400 \text{ \AA}$  よりもさらに小さい (図 16 上段)。これは、正確な位置合わせが3次元構造の正確で高解像度の推定にと

って重要であるという概念を支持する。しかし、図 14 および図 15 それぞれのパネル (B) および (D) に示すように、比較的大きなノイズの場合、Soft-Body Model と Rigid-Body Model の違いは減少する傾向にある。これはおそらく、ノイズの多い画像に対する変形および投影パラメータの不正確な推定によるものであり、これは Soft-Body Model の柔軟性に悪影響を及ぼす。そのような大きなデフォーカス条件下では、大きな変形がある場合、両方のアルゴリズムで性能が低下した。ただし、PSNR は悪化したが、断面図を見ると、Soft-Body Model によって得られた 3 次元構造は、Rigid-Body Model によって得られたものよりも鮮明であった。

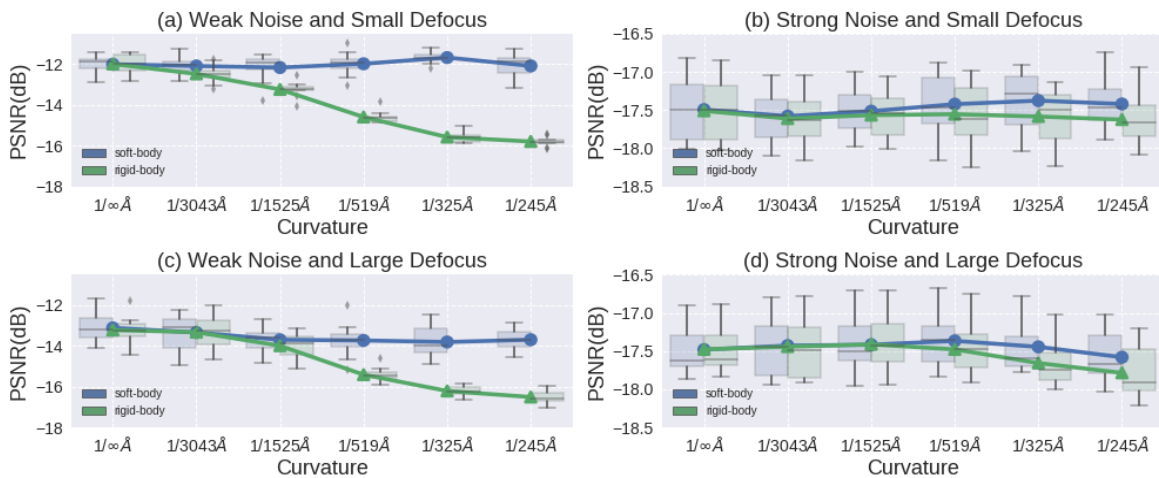


図 14 異なるレベルの変形、ノイズ、デフォーカスの条件で、観測された投影像と再構成された投影像間の PSNR の箱ひげ図。横軸は曲率を表し、縦軸は PSNR を表す。青は Soft-Body Model の結果を表し、緑は Rigid-Body Model の結果を表す。条件 A、B、C、D は図 13 の Caption を参照のこと。

R	$\infty$	3043 Å	1525 Å	519 Å	325 Å	245 Å
(A) Soft						
(A) Rigid						
(B) Soft						
(B) Rigid						
(C) Soft						
(C) Rigid						
(D) Soft						
(D) Rigid						

図 15 推定 3 次元構造のらせん軸に垂直な面の断面図。10 回の推定で平均 PSNR に最も近い画像を示した。R はデータセット中の最大曲率半径を表す。条件 A、B、C、D は図 13 の Caption を参照のこと。Rigid-Body Model の結果は、変形量が大きくなると断面図のボケも大きくなっている。一方、Soft-Body Model の結果は、変形量が大きくなっても断面図がくっきりしている。ノイズが多い場合、2 つのアルゴリズムによる断面図の視覚的差は減少している。これらの結果は、図 14 に示した PSNR の数値評価の傾向と断面図の視覚的傾向が一致していることを示している。推定結果の全断面図は、付録 F 人工らせんデータセットによる評価結果を参照のこと。

### 3.3.1.2 非ゼロ平均データセット

つぎに、変形パラメータに課せられた仮定から外れた場合の推定の堅牢性を調査する。確率モデルの事前確率では、らせん軸の way-point の位置、つまり変形パラメータは、ゼロ平均ガウス分布に従うと想定した。先の実験ではゼロ平均一様分布を使用して変形パラメータを決定したが、変形パラメータの平均は prior の平均と同様に 0 であった。変形パラメータのバイアスに対する堅牢性を確認するために、非ゼロ平均の一様分布に従って変形パラメータを生成した。より正確に述べると、 $s_1 \sim \text{uniform}(-\sigma_s, \sigma_s) + 2$ 、 $s_2 \sim \text{uniform}(-\sigma_s, \sigma_s) - 2$ 、 $s_3 \sim \text{uniform}(-\sigma_s, \sigma_s) + 2$  に従って変形パラメータ  $s_1, s_2, s_3$  をそれぞれ生成する。ここで、 $\sigma_s$  は  $\sigma_s \in \{0, 0.5, 1, 2, 3, 4\}$  とした。変形パラメータのバイアスとしては、定数 +2, -2, +2 を加えた。図 16 は、バイアスなし（上）とバイアスあり（下）のデータセットから計算された曲率のヒストグラムを示したものである。データセット以外の実験条件は、前回と同様とした。図 17 は、バイアスされた変形パラメータで生成された Helix の投影像の例を示したものである。

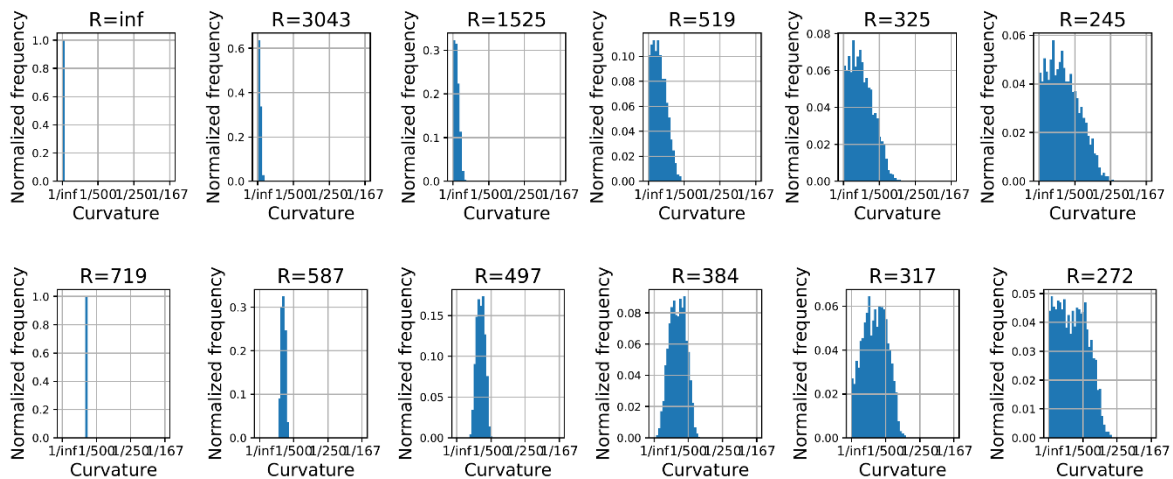


図 16 ゼロ平均（上）と非ゼロ平均（下）の分布によって生成したデータセットから計算された曲率のヒストグラム: 横軸は曲率を表し、縦軸は正規化頻度を表す。タイトルに記載の数値は、データセット内の最大曲率半径を表す。ゼロ平均は prior に課した仮定に即した分布になっているのに対し、非ゼロ平均は prior に課した仮定したから逸脱した分布となっている。非ゼロ平均の分布によって生成したデータセットは、推定の堅牢性を評価するために用いる。

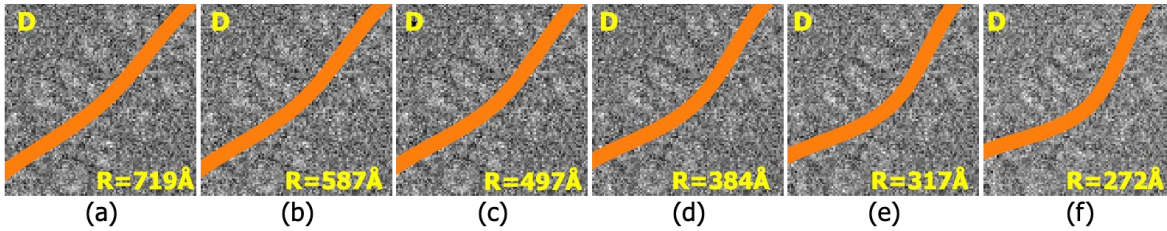


図 17 実験に使用した人工 Helix のシミュレーション投影像: (a)-(f) 6つの異なる曲率の非ゼロ平均分布のもとで生成された変形を伴う Helix の投影像の例。オレンジ色の太い曲線はモデルの変形したらせん軸を表す。下記の R は、太いオレンジの曲線上の複数の点で計算された平均曲率半径を表す。

図 18 は Soft-Body Model (青) および Rigid-Body Model (緑) の PSNR、図 19 は推定 3 次元構造のらせん軸に垂直な平面による断面図を表している。図 18 および図 19 パネル (A) および (C) に示されているように、比較的小さなノイズの場合、バイアス分布のすべてのレベルで Soft-Body Model の結果は Rigid-Body Model の結果よりも全体的に優れている。図 18 および図 19 それぞれのパネル (B) および (D) に示すように、前回の実験の場合と同様に、Soft-Body Model のアドバンテージは減少した。これらの結果は、事前の仮定とは異なる非ゼロ平均一様分布の下で生成されたデータセットに対しても、提案手法が有効であることを示している。

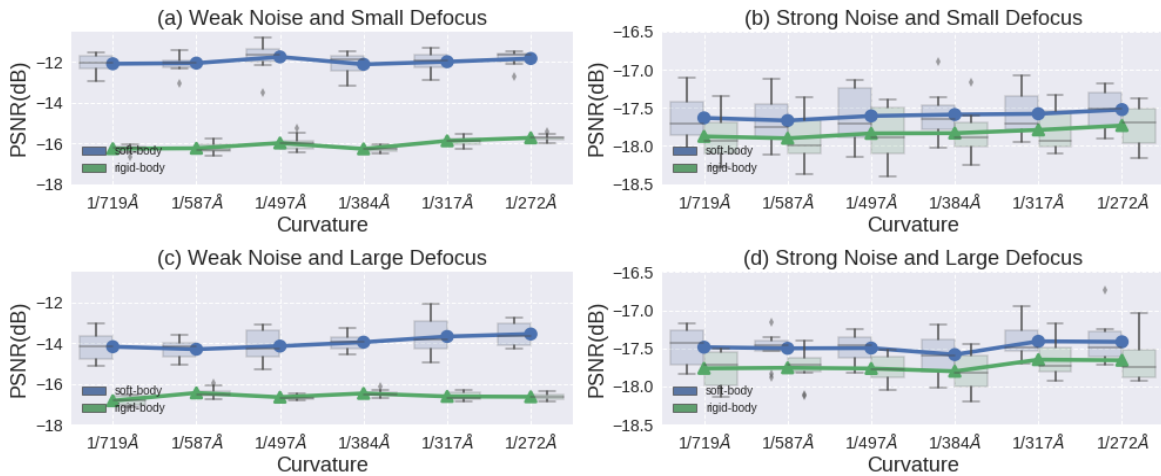


図 18 異なるレベルの変形・ノイズ・デフォーカスの条件で、観測された投影像と再構成された投影像間の PSNR の箱ひげ図。横軸は曲率を表し、縦軸は PSNR を表す。青は Soft-Body Model の結果を表し、緑は Rigid-Body Model の結果を表す。データセットの変形は、図 16 に示した非ゼロ平均分布より決定した。条件 A、B、C、D は図 13 の Caption を参照のこと。

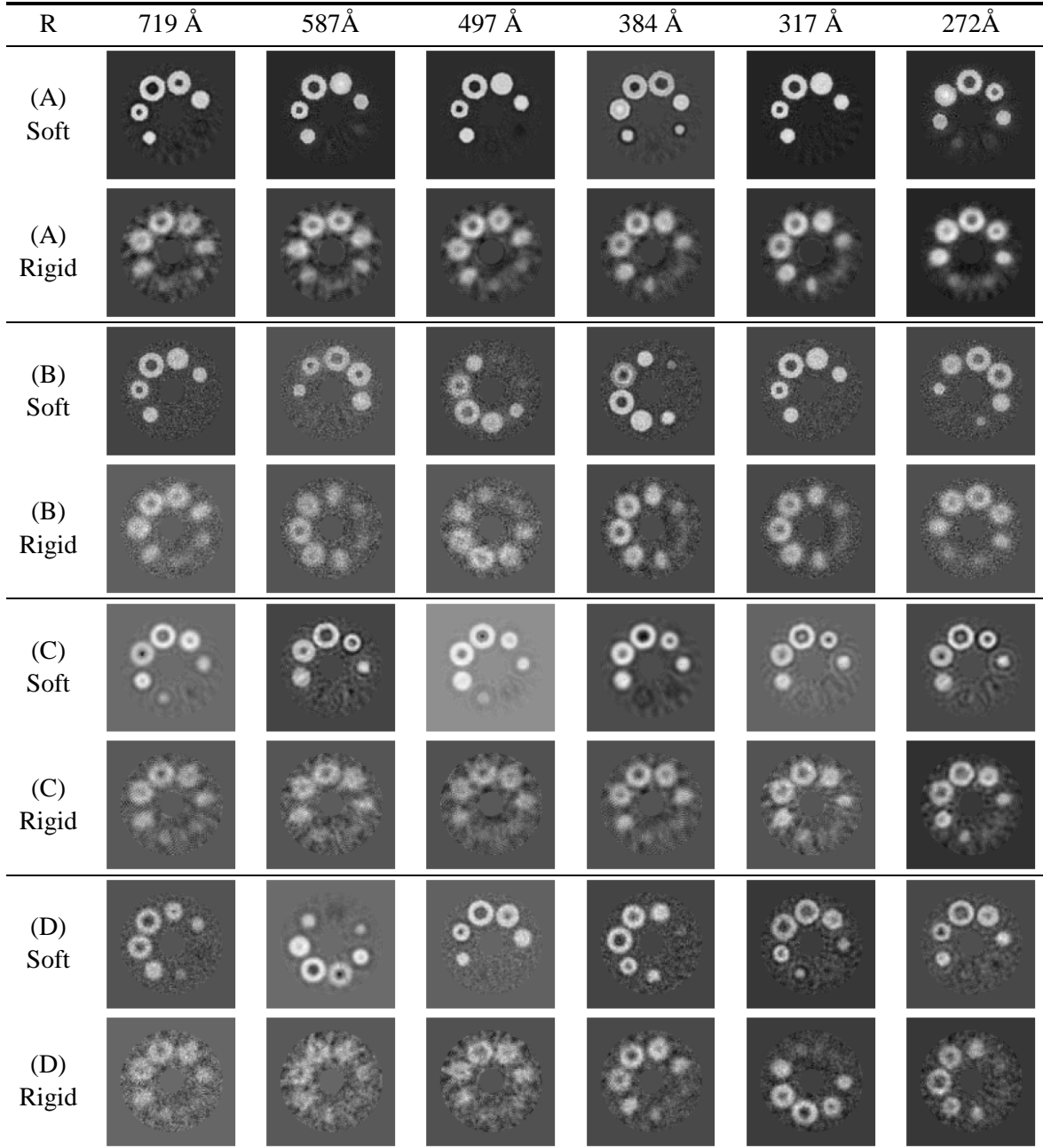


図 19 推定 3 次元構造のらせん軸に垂直な面の断面図。10 回の推定で平均 PSNR に最も近い画像を示した。R はデータセット中の最大曲率半径を表す。条件 A、B、C、D は図 13 の Caption を参照のこと。Rigid-Body Model の結果は、変形量によらず断面図のボケが大きい。一方、Soft-Body Model の結果は、変形量によらず断面図がくっきりしている。ノイズが多い場合、2 つのアルゴリズムによる断面図の視覚的差は小さくなっている。これらの結果は、図 18 に示した PSNR の数値評価の傾向と断面図の視覚的傾向が一致していることを示している。推定結果の全断面図は付録 F 人工らせんデータセットによる評価結果を参照のこと。

### 3.3.2 実データによる評価

提案手法が実際の問題に対応できることを示すために、実際の cryo-TEM 画像を使用して 3次元再構成を実施した。観測画像として、EMPIAR database [54]から入手できるデータセット、EMPIAR-10020 tobacco mosaic virus (TMV) [55]を使用した。3次元構造推定の前に、以降に示す一般的な前処理を適用した。Motion Correction に Gatan 社 GATAN MICROSCOPY SUITE ソフトウェアの Image Alignment を使用し、得られた画像に対して CTFFIND4 [34]を使ってデフォーカス量を推定した。その後、RELION [14]を使用して2次元画像分類を実施した。その結果、粒子画像数は 1341 枚となり、これを使用して提案手法の評価を実施した。3次元構造の初期モデルとして、単純な無情報円筒モデルを作製し使用した。

3次元再構成を行う前に、らせんパラメータである twist  $\Delta\phi$  と rise  $\Delta z$  を決定する必要がある。そこで、らせんパラメータを決定するために、探索範囲 twist  $22.00^\circ$ – $22.08^\circ$ 、rise  $1.39$ – $1.48 \text{ \AA}$  で網羅的探索 (Grid Search) を実施した。探索範囲の中心には、He ら [42]の研究を参考にして twist  $22.04^\circ$  および rise  $1.45 \text{ \AA}$  を使用した。対数事後確率の下界、つまり式 (32) が探索範囲内で最大となる twist と rise のペアを探索した。計算負荷を軽減するため、twist と rise の離散間隔が最初のステップでは、それぞれ  $0.02^\circ$  および  $0.03 \text{ \AA}$ 、2 番目のステップでは、それぞれ  $0.01^\circ$  および  $0.01 \text{ \AA}$  とする 2 段階の網羅的探索を実施した。その結果、推定らせんパラメータは、twist が  $22.02^\circ$ 、rise が  $1.43 \text{ \AA}$  であった。

図 20 に、提案手法による 3次元再構成の断面図を示した。図 20 の左側の画像は、提案手法によって推定された 3次元構造の断面図で、図 20 の右側の画像は、X線結晶解析による TMV (PDB ID: 2TMV [56]) の 3次元構造の表面図である。図 21 は、TMV の観測画像から推定した曲率のヒストグラムを示している。図 21 が示すように、TMV の曲率は非常に小さくなっている。He らは TMV の最大曲率として  $1/3378 \text{ \AA}$  を使用した<sup>34</sup>。曲率が  $1/3378 \text{ \AA}$  以下の観測画像は全体の 99.4% を占めていることから、推定結果は、He らの採

---

<sup>34</sup> このしきい値は、最大曲率 0.05 と画像サイズの 80% のマスクサイズから計算した

用した TMV があまり曲がらないという仮説は妥当なものであるということを示している。

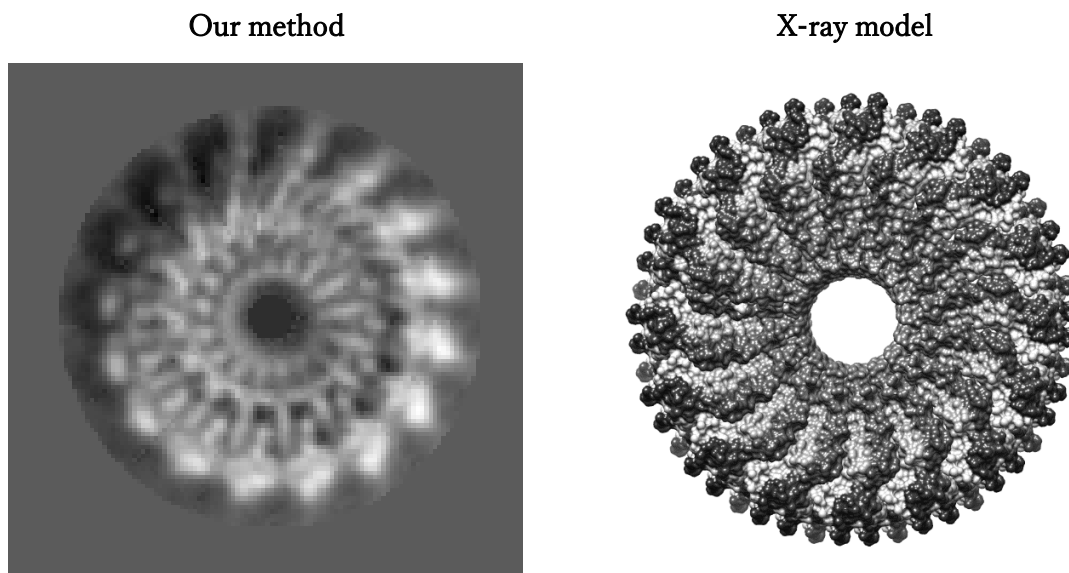


図 20 TMV の再構成像と X-ray model。左: 提案手法による 3 次元再構成像の断面図、右: RCSB PDB [57] PDB ID: 2TMV の表面図

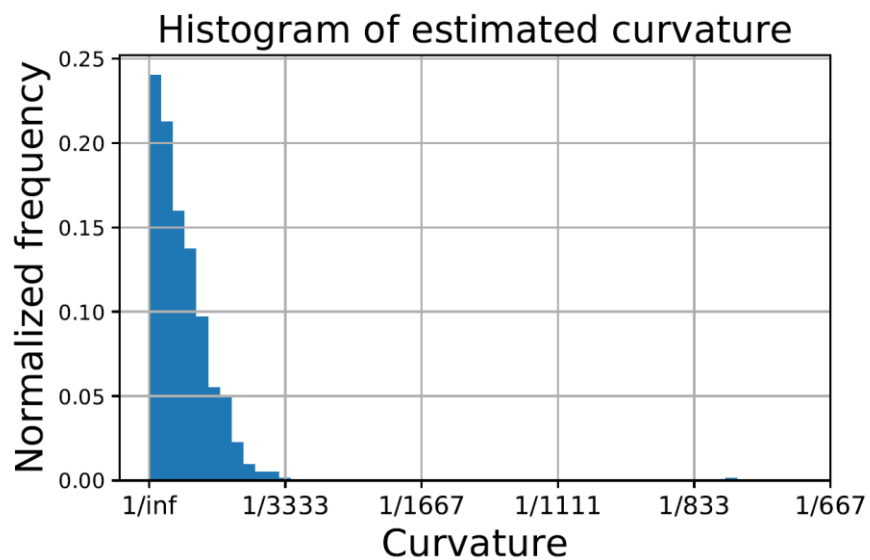


図 21 提案手法によって推定された TMV の各観測画像の曲率のヒストグラム: 横軸は曲率を表し、縦軸は正規化頻度を表す。He ら使用した TMV の最大曲率閾値の  $1/3378 \text{ \AA}$  以下の観測画像は全体の 99.4%であった。



### 3.4 まとめ

本章では、変形によって起こる観測モデルと実際の現象の不一致に焦点を当てた。この不一致を解消するためのアプローチとして、パラメトリックな **Soft-Body Model** を使用したベイズ推定に基づく3次元らせん再構成手法を提案し、その有効性を検証した。

はじめに、人工3次元構造物から生成したデータセットを使用した評価を実施した。評価用データセットに、変形量が6通り、ノイズ量とデフォーカス量の組み合わせで4通りの合計24通りのデータセットを使用することで、様々な角度から提案手法の効果を検証した。評価は、PSNRを指標とした観測画像と投影像の再構成誤差による数値評価と、推定した3次元構造の断面図による視覚的評価を実施した。

数値評価によって、ノイズ量が小さいデータセットにおいて変形量が大きくなるほど、変形に対応した **Soft-Body Model** を用いた手法と、変形に非対応の **Rigid-Body Model** を用いた手法の性能差が増加することを示した。さらに、視覚的評価結果が、数値評価と同様の傾向にあることを示した。一方、ノイズ量が大きいデータセットにおいては、ノイズ量が小さい場合と比較して数値評価による性能差は減少するものの、視覚的評価結果には明確に差があることを示した。加えて、RELIONでは極端に曲がった **Helix** を除外することを勧めており、その際の閾値である  $1/400 \text{ \AA}$  以下の変形が含まれるデータセットにおいても性能差があることを示した。これは、変形に対応することの重要性と有効性を支持するものである。さらに、変形に対して事前に課せられた仮定から外れた場合の推定の堅牢性について、前述の数値評価と視覚的評価を実施し、**Soft-Body Model** を用いた手法の堅牢性を示した。

つぎに、EMPIAR databaseに登録されているTMVのcryo-TEM画像を使用して、実環境への適応性の評価を実施した。この際、らせんパラメータは網羅的探索により推定し、推定されたらせんパラメータ及び3次元構造から、ノイズ量やCTFや観測画像数などの実環境条件において適切に推定が行えることを示した。さらに、各観測画像に含まれる **Helix** の変形量を推定し、ヒストグラムを求めたところ、従来TMVの最大曲率として使用されている閾値  $1/3378 \text{ \AA}$  以下の変形量と推定された観測画像数が全体の99.4%であっ

た。この結果は、TMV があまり曲がらないという仮説の妥当性を支持するものであった。

## 第 4 章

# ベイズ最適化を用いたらせんパラメータ推定

### 4.1 背景

Helix の 3 次元再構成において、らせん対称性のメリットは、少数の観測画像によって 3 次元構造の決定ができる点にある。このメリットは、Helix が持つ構造の特性によりもたらされる。前章で述べたように、Helix はサブユニットと呼ばれる 3 次元構造と、らせんパラメータにより表現することが可能である。サブユニットは、らせん軸を中心とした、らせんパラメータによって規定されるらせん軌跡上に配置される。したがって、サブユニットの 3 次元構造とらせんパラメータを推定することで、全体の構造が決定できる。さらに、2 次元画像から 3 次元構造を推定するには、あらゆる方向の投影像が必要となるが、Helix の場合、1 つの投影像中に様々な方向から投影されたサブユニットの投影像が含まれるため、対称性を持たない生体高分子に比べて、少数の観測画像で 3 次元構造の決定が可能となる。

前述したように、Helix の 3 次元再構成の際に、らせんパラメータを推定することで、らせん対称性の恩恵をより多く受けることが可能となる。らせんパラメータと 3 次元構造の両方を推定するらせん再構成で、従来広く用いられている手法に Egelman らによって提案された iterative helical real-space reconstruction (IHRSR) がある [22]。IHRSR は SPIDER [58]、RELION [42]、FREALIGN [39]、FREALIX [40] など多くのアルゴリズムで利用されている手法である。IHRSR では、3 次元再構成とらせんパラメータ推定を交互に繰り返し実施する。観測画像から 3 次元構造を推定し、推定した 3 次元構造かららせんパラメータを推定する。推定したらせんパラメータによって表現されるらせん対称性を、推定した 3 次元構造に適用し、これを初期モデルとして、再度 3 次元構造を推定する。

IHRSRにおいて、らせんパラメータは、3次元構造かららせん対称性に従って取得した値の平均2乗誤差を用いて推定される。らせん対称性は、円筒座標系において  $V(r, \phi, \zeta) = V(r, \phi + n\Delta\phi, \zeta + n\Delta\zeta)$  のように表される [21]。ここで、 $\Delta\phi$  と  $\Delta\zeta$  は、それぞれ、らせんパラメータの twist および rise を表し、 $n$  は任意の整数を表す。らせん対称性の式は、ある点  $(r, \phi, \zeta)$  から、らせんパラメータに従って移動した点  $(r, \phi + \Delta\phi, \zeta + \Delta\zeta)$  の3次元構造の値が同じになることを表している。例えば、推定したらせんパラメータの twist を  $\Delta\phi^*$ 、rise を  $\Delta\zeta^*$  としたとき、推定が正しければ、整数倍移動した点  $(r, \phi + n\Delta\phi^*, \zeta + n\Delta\zeta^*)$  の3次元構造  $V$  の値はすべて同じ値になる。実際には、3次元構造  $V$  にはノイズが含まれるため、すべて同じ値にはならないが、平均2乗誤差は小さくなる。対して、推定したらせんパラメータが正しくない場合、平均2乗誤差は大きくなる。IHRSRでは、この性質を利用し、らせんパラメータを徐々に変化させながら、その都度平均2乗誤差を計算し、求めた平均2乗誤差を使って2次方程式でカーブフィッティング (Curve Fitting) を実施し、2次方程式が最小となるらせんパラメータを求める。

IHRSRでは、3次元再構成によって、与えられた観測画像を最もよく説明する3次元構造を推定し、らせんパラメータ推定によって、与えられた3次元構造に最も適合するらせんパラメータを推定していることになる。このように、IHRSRは、3次元再構成の目的関数と、らせんパラメータ推定の目的関数が異なる。統計的最適化手法を用いた3次元再構成は、尤度や事後確率が目的関数になるのに対し、らせんパラメータ推定では平均2乗誤差が目的関数となる。IHRSRでは、3次元再構成の目的関数が向上するように推定3次元構造を更新し、推定3次元構造を用いてらせんパラメータ推定の目的関数が向上するようにらせんパラメータを更新する。しかしながら、らせんパラメータ推定の目的関数を向上するように更新したらせんパラメータ推定値が、3次元再構成の目的関数を向上させるとは限らない。このように、目的関数が異なる、つまり全体として一つの目的関数を最適化していないことは、最適化の収束が保証されない可能性がある。本章では、この目的関数の不統一に焦点を当てる。

近年、機械学習の分野でベイズ最適化 [59]が注目されている。ベイズ最適化の目的は、最適化したい関数  $f(x)$  自身は未知であるが、 $f(x)$  を評価して値を得ることができるという条件下で、 $f(x)$  を最大化または最小化することにある。特に、 $f(x)$  の評価に時間がか

かる場合や、 $f(x)$  の勾配が計算できない場合や、 $f(x)$  が非凸である場合に有効な手段と  
言われている。例えば、一回一回の実験に時間がかかるような場合において、なるべく実  
験回数を少なくしたいという場面でベイズ最適化は求められる。これは三次元構造とらせ  
んパラメータを統一的枠組みによって最適化するために、3次元再構成によって得られた  
目的関数の値に応じて、次に評価するらせんパラメータの値を決定したいという本章のニ  
ーズとマッチする。さらに、従来手法の IHRSR が局所最適化である一方、ベイズ最適化  
は大域最適化に分類され、本提案手法には局所解への収束が抑えられるというメリットも  
ある (図 22)。そこで、本章ではベイズ最適化を用いて、3次元構造とらせんパラメータを  
一つの目的関数によって最適化する手法を提案する。

次節以降では、ベイズ最適化に関して簡単に述べた後に、提案手法に関して説明し、実  
際の cryo-TEM 画像を使用した評価を示す。

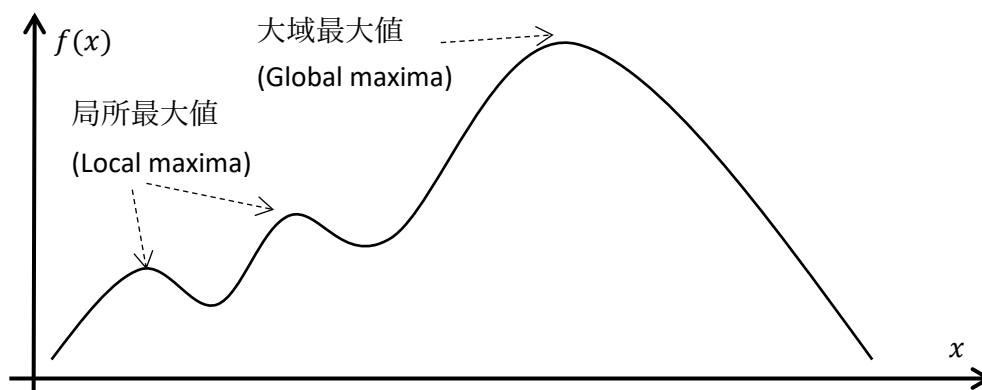


図 22 最適化では、目的関数  $f(x)$  が最大 (または最小) となる  $x$  を求める。勾配法等の局所最適化は、 $f(x)$  が局所的に最大となる局所最大値  $x$  を求める。一方、ベイズ最適化などの大域最適化は、探索空間中で  $f(x)$  が最大となる大域最大値  $x$  を求める。

## 4.2 ベイズ最適化

本節では、ベイズ最適化に関して簡単に説明する。ベイズ最適化は、ガウス過程回帰 [47][60]に基づき、未知の目的関数  $f(x)$  を最大化する  $\hat{x}$  を求める手法である [式 (46)]。

$$\hat{x} = \operatorname{argmax}_x f(x) \quad (46)$$

ガウス過程回帰は、ベイズ推定を用いて入力変数  $x$  から出力変数  $y$  への関数  $y = f(x)$  を推定するモデルの一つである [61]。ガウス過程回帰では、関数  $f(x)$  の事前確率がガウス過程に従うとし、 $f(x)$  の事後確率を求める。ガウス過程回帰によって事後確率は、期待値と標準偏差の形で推定される。ガウス過程は以下のように定義される [62]。

入力  $x_1, x_2, \dots, x_N$  に対応する出力  $f = (f(x_1), f(x_2), \dots, f(x_N))$  が平均  $\mu$ 、 $k(x, x')$  を要素とする共分散行列  $K$  のガウス分布に従うとき  $f$  はガウス過程に従うという。

$f$  がガウス過程に従うとき、以下のように書く。

$$f(x) \sim \mathcal{GP}(\mu(x), k(x, x')) \quad (47)$$

多次元ガウス分布は平均と共分散行列によって、分布の形状が決まる。共分散行列の  $i$  行  $j$  列目の要素は、 $x_i$  と  $x_j$  の共分散を表している。ガウス過程において、共分散行列  $K$  の要素である  $k$  はカーネル関数と呼ばれ  $x$  の類似度を表す。カーネル関数は、様々なものが提案されている。例えば、Matérn52 カーネルは、

$$k(x, x') = \left(1 + \frac{\sqrt{5}r}{\theta} + \frac{5r^2}{3\theta^2}\right) \exp\left(-\frac{\sqrt{5}r}{\theta}\right) \quad (48)$$

となる [60]。ここで、 $\theta$  はスケールパラメータを表し、 $r$  は  $|x - x'|$  を表す。

多次元ガウス分布において2つの変数間の共分散が大きいとき、2つの変数は似た値を取りやすい。カーネル関数  $k(x, x')$  は  $x$  の類似度を表し、変数  $x$  と  $x'$  が似た値のときに大きな値になる。 $f$  がガウス過程に従うとき、共分散行列内の  $x$  と  $x'$  に関する共分散  $k(x, x')$  が大きくなると、出力  $f(x)$  と  $f(x')$  も似た値をとることになる。つまり、ガウス過程は  $x$  が似ているときに、 $y$  も似ているというモデルを表現していると言える。さらに、カーネル関数を変えることで、様々なガウス過程を定義することができる。

観測データ  $D_{1:n} = ((x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)) = (x_{1:n}, y_{1:n})$  が与えられ、 $f$  が平均0のガウス過程から生成されているとしたとき、新しい入力  $x_{n+1}$  に対する  $y_{n+1}$  の事後確率  $p(y_{n+1}|D_{1:n}, x_{n+1})$  は式 (49) のように平均と共分散で表すことができる [62]。

$$\begin{aligned}
 p(y_{n+1}|D_{1:n}, x_{n+1}) &= \mathcal{N}(\mu_n(x_{n+1}), \sigma_n^2(x_{n+1})) \\
 \mu_n(x_{n+1}) &= k^T K^{-1} f_n \\
 \sigma_n^2(x_{n+1}) &= k(x_{n+1}, x_{n+1}) - k^T K^{-1} k \\
 k &= [k(x_{n+1}, x_1), k(x_{n+1}, x_2), \dots, k(x_{n+1}, x_n)]
 \end{aligned} \tag{49}$$

図 23 は事後確率と、平均および共分散の関係を説明するためのイメージ図である。事後確率  $p(y_{n+1}|D_{1:n}, x_{n+1})$  を計算することで、 $x_{n+1}$  における  $y_{n+1}$  の期待値  $\mu_n(x_{n+1})$  と分散  $\sigma_n^2(x_{n+1})$  が得られる。

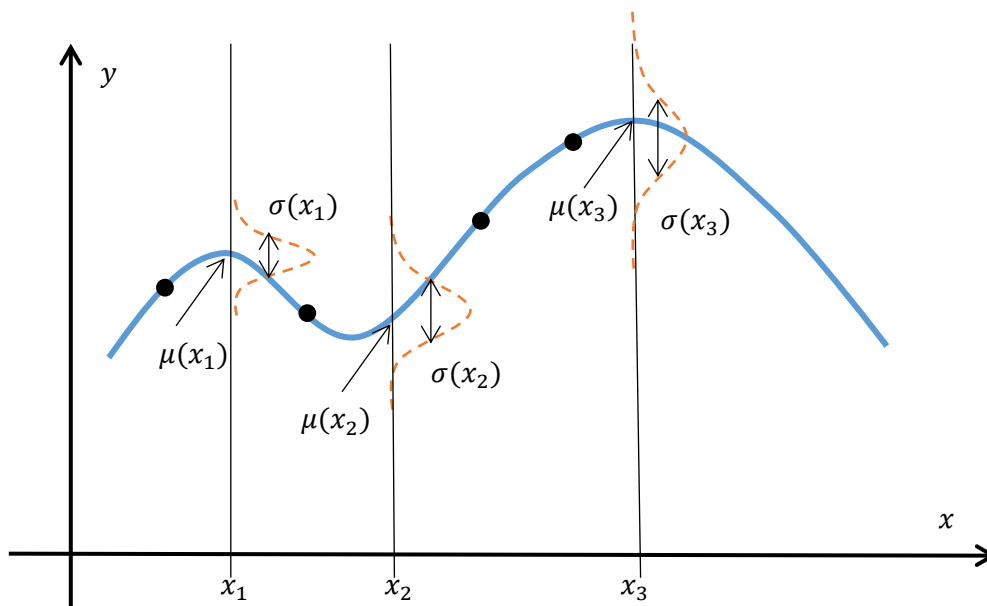


図 23 ガウス過程における事後確率の平均  $\mu(x_i)$ 、標準偏差  $\sigma(x_i)$  の関係を示す。青線は目的関数の事後確率の平均を表し、標準偏差  $\sigma(x_i)$  は事後確率のばらつき、すなわち誤差を表す。目的関数の最大値付近で平均は大きくなり、未評価の場所では標準偏差が大きくなる。

ベイズ最適化は、目的関数の評価を行い、入力データと得られた出力データからガウス過程回帰を用いて事後確率を推定する。推定した事後確率を用いて、次に評価すべき目的関数の入力値を決定する。これを擬似コードにより記述すると以下のようになる。

---

Algorithm 1 ベイズ最適化 [59]

---

- 1: for  $t = 1, 2, \dots$  do
  - 2:   Find  $\mathbf{x}_t$  by optimization the acquisition function over the GP
  - 3:   Sample the objective function:  $\mathbf{y}_t = \mathbf{f}(\mathbf{x}_t) + \epsilon_t$
  - 4:   Augment the data  $\mathbf{D}_{1:t} = \{\mathbf{D}_{1:t-1}, (\mathbf{x}_t, \mathbf{y}_t)\}$  and update the GP
  - 5: end for
-



ベイズ最適化では、次に評価すべき目的関数の入力値は獲得関数を用いて決定する。ガウス過程回帰による推定結果は、事後確率の平均  $\mu(x)$  と標準偏差  $\sigma(x)$  で得られる。目的関数の最大値付近では平均  $\mu(x)$  が大きくなり、評価があまり行われていない箇所では標準偏差  $\sigma(x)$  が大きくなる。この性質を利用して、獲得関数は事後確率の平均  $\mu(x)$  と標準偏差  $\sigma(x)$  の組み合わせで定義され、獲得関数が最大となる  $x$  を次の評価の候補値  $x_{n+1}$  とする。獲得関数には様々なものが提案されており、例えば、Expected improvement [59]がある。Expected improvement は、

$$EI(x) = \begin{cases} (\mu(x) - f(x^+))\Phi(Z) + \sigma(x)\phi(Z) & \text{if } \sigma(x) > 0 \\ 0 & \text{if } \sigma(x) = 0 \end{cases} \quad (50)$$

$$Z = \frac{\mu(x) - f(x^+)}{\sigma(x)}$$

のように定義される。ここで、 $x^+$  はこれまで評価したなかで目的関数が最大となる  $x$  を表し、 $\phi(x)$  はガウス分布の確率密度関数、 $\Phi(x)$  はガウス分布の累積分布関数<sup>35</sup>を表す。

### 4.3 アルゴリズム

本提案手法は、前節で説明したベイズ最適化を用いて、3次元再構成によって得られる目的関数の出力に従って、らせんパラメータである twist と rise を推定する。図 24 は、IHRSR と提案手法の違いを示したものである。

IHRSR では、3次元再構成により投影像から3次元構造の推定を行い、得られた3次元構造 (Asymmetric 3D Volume) を使ってらせんパラメータの推定を行った後、推定したらせん対称性を適用し、らせん対称性を有した3次元構造 (Helically Symmetric 3D Volume) を出力する。一方、提案手法では3次元再構成により3次元構成の推定を行い、3次元構造の目的関数の出力、尤度 (Likelihood)、を使用してベイズ最適化により、つぎに探索するらせんパラメータを出力する。この処理を繰り返すことで、提案手法では、3次元再構成とらせんパラメータ推定を尤度という一つの指標のもとに最適化する。

<sup>35</sup> 確率変数  $X$  がある値  $x$  以下になる確率を表す関数  $F(x)$  を指す

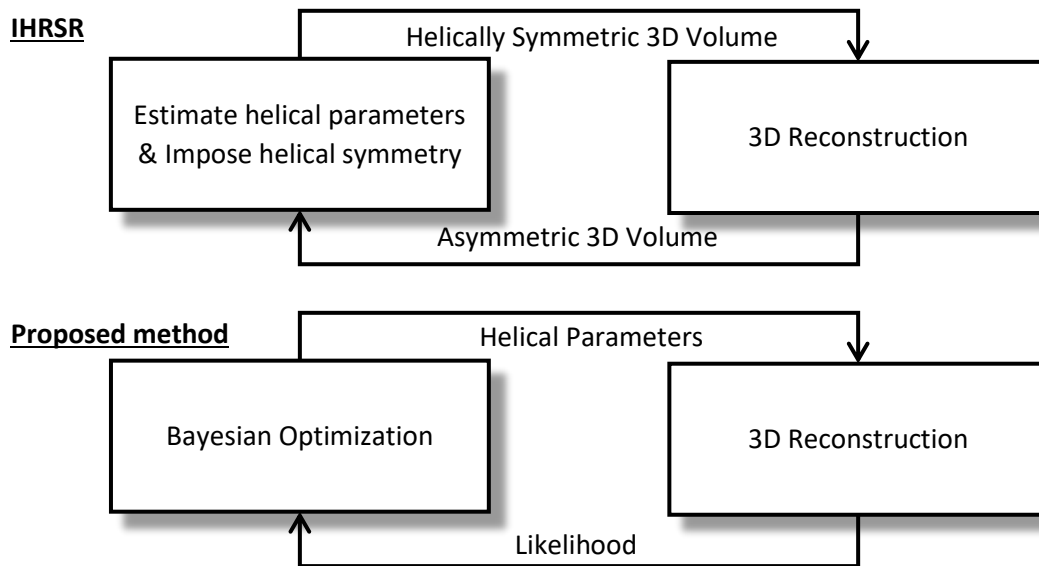


図 24 IHRSR（上）と提案手法（下）の違いを示す。IHRSR では、3D Reconstruction により対称性を持たない 3次元構造 (Asymmetric 3D Volume) を推定する。つぎに、Estimate helical parameters & Impose helical symmetry により Asymmetric 3D Volume から、らせんパラメータを推定し、推定したらせんパラメータに従うらせん対称性を Asymmetric 3D Volume に課す。Estimate helical parameters & Impose helical symmetry より出力されたらせん対称性をもった 3次元構造 (Helically Symmetric 3D Volume) を初期モデルとして、再度 3D Reconstruction により 3次元構造を推定する。一方、提案手法では、らせんパラメータ (Helical Parameters) に従い 3D Reconstruction によって 3次元再構成を行う。つぎに、得られた尤度 (Likelihood) を使用して、つぎに評価するらせんパラメータをベイズ最適化 (Bayesian Optimization) により決定する。

#### 4.3.1 2段階探索

ベイズ最適化を用いるメリットは、網羅的探索に比べて探索空間を効率よく調べることができる点にある。それでも、探索空間が広い場合は、探索に多くの時間を要する。そこで、探索を効率化するために、らせんパラメータの性質を利用した2段階の探索手法を用いる。

Helix の 3次元構造は、らせんパラメータである twist と rise によって決定される。前述のように、らせん対称性は、らせんパラメータによって、円柱座標系の任意の点  $(r, \phi, \zeta)$

で  $V(r, \phi, \zeta) = V(r, \phi + n\Delta\phi, \zeta + n\Delta\zeta)$  として表される。さらに、らせんが一周したときの移動量は pitch と呼ばれ、pitch とらせんパラメータである twist と rise の間には、

$$pitch = 360 \times \frac{rise}{twist} \quad (51)$$

の関係がある。図 25 は、pitch とらせんパラメータの関係を示した図である。

式 (51) は、横軸を twist、縦軸を rise として探索空間を定義したとき、同じ pitch である twist と rise は、式 (51) を満たす直線上に位置することを示している。そこで、2 段階探索では、まず第 1 Phase で pitch をベイズ最適化の下で推定する。第 2 Phase では、推定した pitch により決まる直線上のらせんパラメータ twist と rise をベイズ最適化の下で探索する。このように探索範囲を絞り込むことで、探索の効率化を行う。

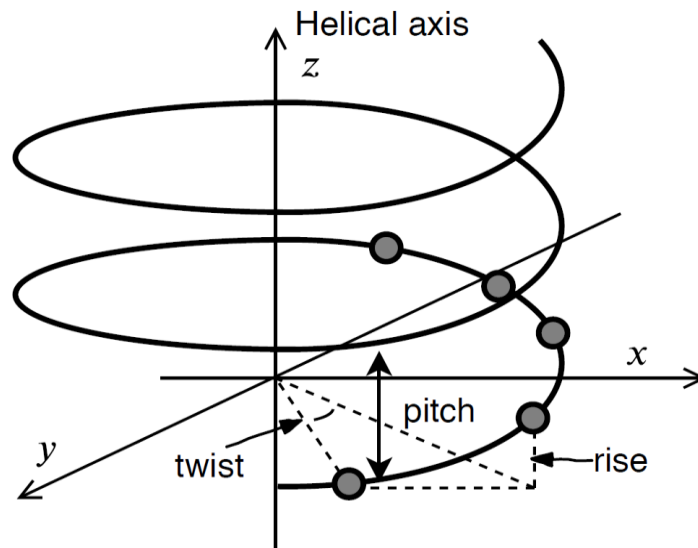


図 25 pitch とらせんパラメータ twist および rise の関係: らせんパラメータである twist と rise は、らせん対称性を表現するための変数であり、らせん軸 (z 軸) 回りに twist だけ回転し、z 軸方向に rise だけ移動したときに同じ値になることを表す。さらに、pitch はらせんが一周したときの移動量を表す。

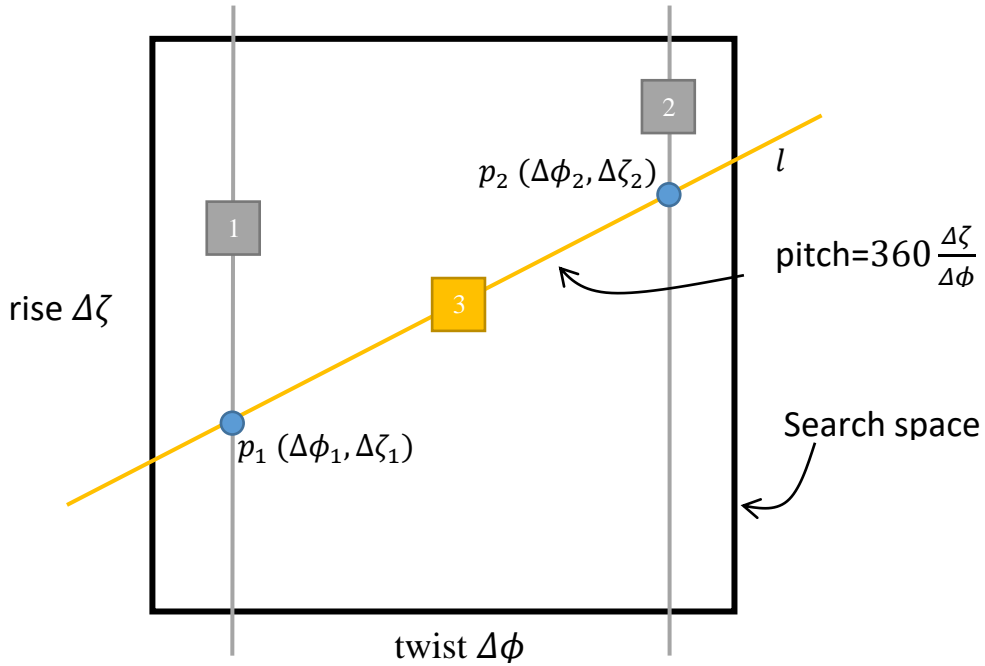


図 26 2 段階探索: 図は探索空間を示したものである。横軸は twist、縦軸は rise を表す。はじめに、図中 1 の直線上を探索し、つぎに、図中 2 の直線上を探索し、得られたそれぞれの推定値  $p_1$  と  $p_2$  の値  $(\Delta\phi_1, \Delta\zeta_1)$  と  $(\Delta\phi_2, \Delta\zeta_2)$  から直線  $l$  を求めて pitch を推定する。最後に、図中 3 の推定した pitch によって決まる直線  $l$  上から最適ならせんパラメータを探索する。

図 26 は、2 段階探索を説明するための図である。第 1 Phase の pitch の推定は、twist を  $\Delta\phi_1$  に固定したもとで rise を探索し、つぎに、twist を  $\Delta\phi_2$  に固定したもとで rise を探索する。探索によって得られた推定値、点  $p_1 (\Delta\phi_1, \Delta\zeta_1)$  と点  $p_2 (\Delta\phi_2, \Delta\zeta_2)$  を結ぶ直線  $l$  を計算し、pitch を推定する。 $\Delta\phi_1$  または  $\Delta\phi_2$  が正しい twist の値でないとき、rise が正しい pitch と一致するように推定されることに関しては、のちの実験で示す。第 2 Phase では、点  $p_1$  と点  $p_2$  を結ぶ直線上を探索する。推定した pitch 上の twist  $\Delta\phi$  と rise  $\Delta\zeta$  は媒介変数  $t$  を用いて表現すると、

$$\begin{aligned}\Delta\phi &= \Delta\phi_1 + t(\Delta\phi_2 - \Delta\phi_1) \\ \Delta\zeta &= \Delta\zeta_1 + t(\Delta\zeta_2 - \Delta\zeta_1)\end{aligned}\tag{52}$$

のように書ける。第 2 Phase では、媒介変数  $t$  を目的関数の入力としてベイズ最適化を用いてらせんパラメータを推定する。以下にアルゴリズムの疑似コードを示す。

---

**Algorithm 2  $\theta = \text{HelicalReconstruction}(\theta_0, \Delta\phi_1, \Delta\phi_2)$** 

---

```
1: for n = 1 to N do
2:   Get a next candidate of  $\Delta z_n$  according to Bayesian Optimization based on  $S_{1:n}$ 
3:    $L^{(n)} = \text{3D Reconstruction}(\Delta\phi_1, \Delta\zeta^{(n)})$ , where  $L^{(n)}$  is likelihood.
4:    $S_{1:n+1} = \{S_{1:n}, (\Delta\phi_1, \Delta\zeta^{(n)}, L^{(n)})\}$ 
5: end for
6: Find the best rise  $\Delta\zeta_1$ 
7: Clear  $S_{1:n}$ 
8: for n = 1 to N do
9:   Get a next candidate of  $\Delta\zeta_n$  according to Bayesian Optimization based on  $S_{1:n}$ 
10:   $L^{(n)} = \text{3D Reconstruction}(\Delta\phi_2, \Delta\zeta^{(n)})$ 
11:   $S_{1:n+1} = \{S_{1:n}, (\Delta\phi_2, \Delta\zeta^{(n)}, L^{(n)})\}$ 
12: end for
13: Find the best rise  $\Delta\zeta_2$ 
14: Clear  $S_{1:n}$ 
15: for n = 1 to N do
16:   Get a next candidate of  $t^{(n)}$  according to Bayesian Optimization based on  $S_{1:n}$ 
17:    $\Delta\phi^{(n)} = \Delta\phi_1 + t^{(n)}(\Delta\phi_2 - \Delta\phi_1), \Delta\zeta^{(n)} = \Delta\zeta_1 + t^{(n)}(\Delta\zeta_2 - \Delta\zeta_1)$ 
18:    $L^{(n)} = \text{3D Reconstruction}(\Delta\phi^{(n)}, \Delta\zeta^{(n)})$ 
19:    $S_{1:n+1} = \{S_{1:n}, (t^{(n)}, L^{(n)})\}$ 
20: end for
21: Find the best parameter  $t^*$ 
22:  $\Delta\phi^* = \Delta\phi_1 + t^*(\Delta\phi_2 - \Delta\phi_1), \Delta\zeta^* = \Delta\zeta_1 + t^*(\Delta\zeta_2 - \Delta\zeta_1)$ 
```

※灰色は第1 phase を表し、黄色は第2 phase を表す。

## 4.4 評価

本節では、実際の cryo-TEM 画像を用いた提案手法の評価について述べる。本評価では、提案手法の 3 次元再構成に RELION を用いた。3 次元再構成の目的関数には、RELION から出力される対数尤度<sup>36</sup>を使用した。さらに、らせんパラメータを固定するため、RELION のらせんパラメータの探索範囲設定を 0 にした。ベイズ最適化に関しては、様々なライブラリが提供されており、本評価では GpyOpt [63]を使用した。GpyOpt は、初期値として、すでに得られている目的関数の入力と出力のペアを渡すことが可能である。今回、探索の効率化を図るため、探索区間を粗くサンプリングして目的関数を評価し、得た結果を初期値として使用した。カーネル関数は Matérn 52 を使用した。さらに、目的関数の統一による効果を明確にするために、比較として同条件で RELION のみによる 3 次元再構成も実施した。

### 4.4.1 データセット

実際の cryo-TEM 画像として、EMPIAR database [54]に登録されている、EMPIAR-10020 tobacco mosaic virus (TMV) [55]と、EMPIAR-10019 VI 型分泌装置の VipA/VipB タンパク質 [64]を用いた。表 1 はデータセットの特性を示したものである [42]。

表 1 データセットの特性

	TMV	VipA/VipB
EMDB entry	10020	10019
Pixel Size	1.126 Å	1.0 Å
Helical rise	1.41 Å	21.79 Å
Helical twist	22.03°	29.41°
Nr.asym.unit/box	30	2
Point group symmetry	C <sub>1</sub>	C <sub>6</sub>

<sup>36</sup> 対数尤度は、RELION より出力されるファイルである run\_it#\_model.star 内の\_rlnLogLikelihood に記載されている値を使用した。#は iteration 番号を表す。

#### 4.4.2 前処理

本節では、評価の前処理について述べる。TMV に関しては、EMPIAR database のエントリー EMPIAR-10020 に登録されているデータが動画であるため、Gatan 社の GATAN MICROSCOPY SUITE ソフトウェアの Image Alignment 機能を使用して Motion Correction を行った。つぎに、CTF Estimation では、Motion Correction 済みの画像に対して、CTFFIND4 [34] を用いてデフォーカス量を推定した。粒子抽出は、電顕画像が少ないため、すべてマニュアルにより抽出した。抽出した粒子を 2 次元画像分類によりクラス分類し、クラス平均像を評価することにより不要な粒子画像をグループごと除去した。粒子抽出および 2 次元画像分類は RELION を用いた。最終的な粒子画像数は 1341 枚であった。

VipA/VipB に関しては、EMPIAR database のエントリー EMPIAR-10019 に、Motion Correction 済みのデータが登録されているため Motion Correction は行わなかった。CTF Estimation は TMV 同様に CTFFIND4 によって実施した。粒子抽出は、撮影画像が多いため、まず数枚の画像を用いてマニュアルにより粒子を抽出した。つぎに、2 次元画像分類によって自動抽出用のテンプレートを作成し、作成したテンプレートを用いて自動抽出を行った。自動抽出により抽出した粒子を 2 次元画像分類によりクラス分類し、クラス平均像を評価することにより不要な粒子画像をグループごと除去した。粒子抽出および 2 次元画像分類は、TMV と同様に RELION を使用した。最終的な粒子画像数は 7543 枚であった。

#### 4.4.3 3次元再構成

本節では、3次元再構成に用いた RELION [35] のアルゴリズムに関して簡単に説明する。RELION では、周波数空間上で線形モデルを定義し、EM アルゴリズムを使用して正規化尤度最適化 (Regularized likelihood optimization) を行う。E ステップにて、投影方向に関する離散化された事後確率を計算し、M ステップでは、E ステップで計算した事後確率を用いて 3次元構造を推定する。E ステップと M ステップの更新式は、それぞれ

$$\Gamma_{ik\phi}^{(n)} = \frac{P(X_i|k, \phi, \Theta^{(n)}, y)P(k, \phi|\Theta^{(n)}, y)}{\sum_{k'=1}^K \int_{\phi'} P(X_i|k', \phi', \Theta^{(n)}, y)P(k', \phi'|\Theta^{(n)}, y)d\phi'} \quad (53)$$

$$V_{kl}^{(n+1)} = \frac{\sum_{i=1}^N \int_{\phi} \Gamma_{ik\phi}^{(n)} \sum_{j=1}^J P_{lj}^{\phi^T} \frac{CTF_{ij} X_{ij}}{\sigma_{ij}^2(n)} d\phi}{\sum_{i=1}^N \int_{\phi} \Gamma_{ik\phi}^{(n)} \sum_{j=1}^J P_{lj}^{\phi^T} \frac{CTF_{ij}^2}{\sigma_{ij}^2(n)} d\phi + \frac{1}{T\tau_{kl}^2(n)}} \quad (54)$$

のようになる。ここで、 $\Gamma_{ik\phi}$  は事後確率を表し、 $V_{kl}$  は3次元構造のフーリエ変換を表す。 $X_{ij}$  は観測画像のフーリエ変換を表し、 $CTF_{ij}$  はコントラスト伝達関数を表す。 $i$  は観測画像の番号、 $j$  は2次元フーリエ変換の  $j$  番目の要素を表し、 $l$  は3次元フーリエ変換の  $l$  番目の要素を表し、 $k$  は複数の3次元構造を識別するインデックスを表す。 $P^{\phi}$  は3次元フーリエ変換から投影方向によって決まる平面を抽出する処理を表す。この処理は Projection Slice Theorem により、投影画像のフーリエ変換を得ることと等価である。 $\phi$  は投影方向と画像の中心位置の変位を表す。 $\tau$  は信号の強度、 $\sigma$  はノイズの強度を表す。 $n$  は iteration の番号を表す。 $P(X_i|k, \phi, \Theta^{(n)}, y)$  は尤度を表す。式 (54) の分母の  $\frac{1}{T\tau_{kl}^2(n)}$  は正則化項を表し、 $T$  は正則化の強度を制御するためのパラメータを表す。

#### 4.4.4 尤度のばらつき

ベイズ最適化では、目的関数の入力と得られた出力から、次に評価する目的関数の入力値を決定する。本評価では、RELION により出力される対数尤度を目的関数の出力として使用する。しかしながら、RELION により出力される対数尤度の値は、ばらつきが大きく、効率よく探索することが困難であった。探索が困難な要因は、対数尤度のばらつきが大きい場合、ベイズ最適化が利用している事前知識である目的関数はなめらかにつながっている、つまり入力が近い値は出力も近い値になる、というものから極端に逸脱するためと考えられる。

そこで、RELION の正則化項のパラメータである式 (54) の  $T$  と対数尤度のばらつきに関して調査を行った。パラメータ  $T$  によって、正則化の強度を制御することができる。 $T$  の値が小さいほど、正則化の強度は強くなり、逆に  $T$  の値を大きくすると、正則化の強度は



弱くなる。通常、3次元構造分類や精密化を行うときは、Tの値を4に設定することが推奨されている [35]。

調査では、らせんパラメータを固定し、Tの値が0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0毎に3次元構造分類を15回実行し対数尤度を取得した。図27はTの値と対数尤度の標準偏差の結果を示したものである。図27からTが大きくなるほど標準偏差が大きくなることがわかる。図28は、Tの値ごとに3次元再構成により推定された3次元構造の断面図である。Tの値をある程度小さくしても3次元構造が推定されていることがわかる。

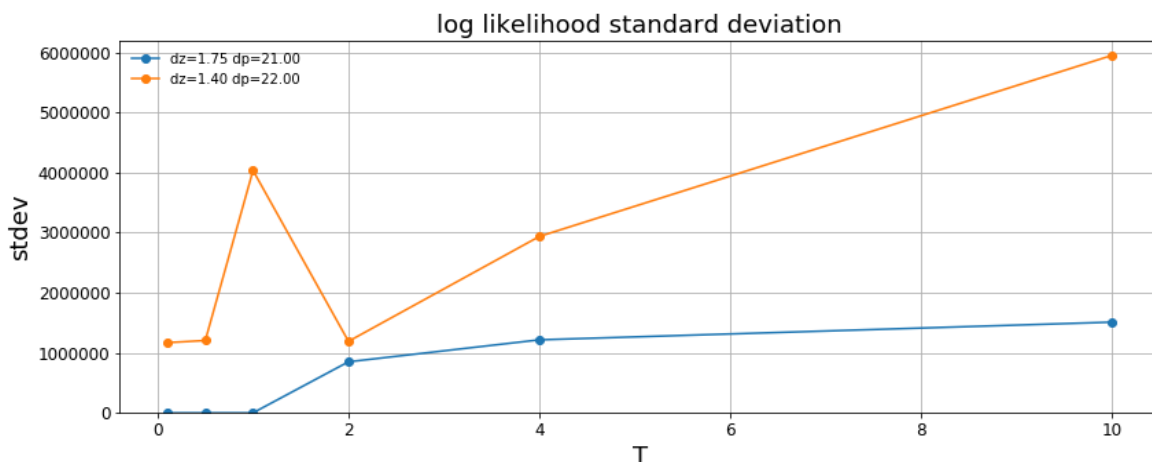


図27 パラメータ T を横軸に対数尤度の標準偏差を縦軸にプロットした。実線（オレンジ）は、TMV の実際のらせんパラメータに近い値である twist が 22.00°かつ rise が 1.40 Å に固定したときの結果を表す。実線（青）は、TMV の実際のらせんパラメータから外れた値である twist が 21.00°かつ rise が 1.75 Å に固定したときの結果である。図は T の値が大きくなるほど、すなわち正則化の強度が弱くなるほど標準偏差が大きくなることを示している。

パラメータ T の値を大きくした場合、正則化の強度が弱くなり、観測データにより強く従うように3次元構造の推定が行われる。しかし、正則化の強度が弱まるとノイズの影響も受けやすくなり、対数尤度の標準偏差が大きくなったと考えられる。対して、T の値を小さくした場合、正則化の強度が強くなり、正則化項の影響がより大きくなる。式 (54) の正則化項は平滑化の役割を果たすため、得られる3次元構造はなめらかになる。このとき、ノイズによる影響を受けづらくなり、毎回安定した3次元構造が推定され、結果とし

て対数尤度の標準偏差が小さくなったと考えられる。今回、T の値には、3次元再構成で構造が推定されかつ、標準偏差が小さくなる 0.5 を採用した。

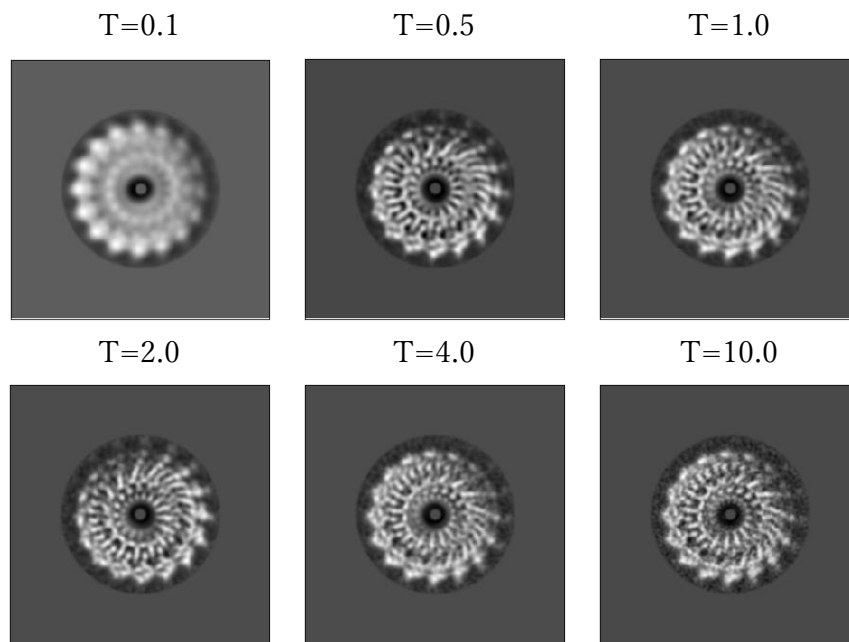


図 28 パラメータ T と推定された 3次元構造の断面図を示す。パラメータ T は正則化の強度を表し、断面図は正則化の強度を強くすると、構造がよりなめらかになることを示している。T が 0.1 のときは、図 27 に示したように標準偏差は小さくなるが、構造がなめらかになり過ぎていることがわかる。

#### 4.4.5 評価結果

本節では、cryo-TEM 画像を使用した評価結果を示す。らせんパラメータの探索範囲は、TMV では twist は  $21.0^{\circ}$ – $24.0^{\circ}$ かつ rise は  $1$ – $2 \text{ \AA}$  とし、VipA/VipB では twist は  $20.0^{\circ}$ – $35.0^{\circ}$ かつ rise は  $10$ – $30 \text{ \AA}$  とした。また、初期モデルは無情報円筒モデルを使用した。さらに、pitch の値は正、つまりらせんは右巻きとした。右巻きのらせんと左巻きのらせんの投影像は同じであり、右巻きか左巻きかは別の手法により決定する必要がある。そこで本実験では、らせんの回転方向は右巻きに固定した。表 2 は推定結果を示したものである。TMV のらせんパラメータ twist と rise の推定値は、それぞれ  $22.03^{\circ}$ と  $1.40 \text{ \AA}$ であった。前述した表 1 より TMV の実際のらせんパラメータは、twist が  $22.03^{\circ}$ 、rise が  $1.41 \text{ \AA}$ であることから、推定結果は妥当であることがわかる。VipA/VipB のらせんパラメータ twist と

rise の推定値は、それぞれ 29.35°と 21.66 Åであった。VipA/VipB の実際のらせんパラメータは、twist が 29.41°、rise が 21.79 Å であることから、こちらも適切に推定できていることがわかる。

表 2 らせんパラメータ推定結果

	TMV		VipA/VipB	
	Estimation	Ground Truth	Estimation	Ground Truth
twist	22.03°	22.03°	29.35°	29.41°
rise	1.40 Å	1.41 Å	21.66 Å	21.79 Å

※Estimation は推定結果を表し、Ground Truth は正解値を表す。

図 29 は第 1 Phase の推定推移を表したものであり、図 30 は第 2 Phase の推定推移を表したものである。図 29 の rise の推定値である実線（オレンジ）は、正解値である鎖線（緑）に近づいており、正しく推定できていることを示している。さらに、図 29 の結果は、正解値ではない twist のときでも、正しい pitch と一致するように rise が推定されることを示している。この理由としては、twist や rise が異なっても pitch が同じであれば、投影像の形状は似てくるが [図 31 (a)]、pitch が異なると投影像の形状も異なるため [図 31 (b)]、pitch が一致するように rise が推定されたのではないかと考えられる。図 30 の rise の推定値である実線（オレンジ）と twist の推定値である実線（青）が、それぞれ、正解値である鎖線（緑）と破線（緑）に近づいているため、適切に推定できていることを示している。

ここからは、評価結果に関してもう少し詳細に述べる。図 32 は、各データセットの探索の様子を示したものであり、横軸が twist、縦軸が rise を表し、対数尤度の値をグレイスケールで表している。破線（緑）/鎖線（緑）/点線（緑）は、それぞれ twist/rise/pitch の正解値を表し、実線（青）/実線（オレンジ）/実線（赤）は、それぞれ推定した twist/rise/pitch を表している。図 32 (a) は、実線（赤）と点線（緑）がほとんど重なっており、TMV の pitch がうまく推定されていることを示している。VipA/VipB の評価では、図 33 (b) に示すように、twist を 20.0°と固定した第 1 Phase の探索で、rise が 29.37 Å のときに最大となった。しかし、らせんを右巻き、つまり pitch は正とした仮定と異なり、この場

合は pitch が負となる。そこで、もう一つのピークである 15.0 Å を中心として 10.0–20.0 Å の範囲で再度探索を行った。このときの推定値は、14.62 Å であった。最初の第 1 Phase の探索で、rise が 29.37 Å で最大となったのは、twist を 20.0° と固定したときに正しい pitch となる rise の値の 14.82 Å に対して、29.37 Å がほぼ 2 倍であることから、らせんが 2 周したところを検出したためと考えられる。10.0–20.0 Å の範囲で再度探索した結果である図 32 (b) は、実線 (赤) と点線 (緑) がほとんど重なっており、VipA/VipB の pitch がうまく推定されていることを示している。

図 34 は、同じ探索範囲で、同じ初期モデルから RELION のみで 3 次元再構成したときの結果である。図 34 から、rise の推定値の実線 (オレンジ) と twist の推定値の実線 (青) が、それぞれ、正解値の鎖線 (緑) と破線 (緑) に近づいておらず、らせんパラメータがうまく推定できていないことを示している。この点に関しては He らの論文でも言及されており [42]、彼らは別の手法により推定したらせんパラメータを使用してこの問題に対処した。

図 35 は、本提案手法と RELION のみで推定した 3 次元構造の断面図の比較である。さらに、比較のために PDB に登録されている原子モデルの表面図を記載した。図 35 の TMV の結果を見ると、RELION のみの場合は、推定されたらせんパラメータが正しくないため、断面図中にサブユニットの繰り返し構造が見られない [図 35 (a) と (b)]。一方、提案手法の場合は、断面図中にサブユニットの繰り返し構造が確認できる [図 35 (e) と (f)]。TMV の twist は 22.03° であり、原子モデルの表面図からもわかるようにサブユニットは 360 度中に 16 回出現する [図 35 (i)]。提案手法の断面図 [図 35 (e) と (f)] でも 16 回のサブユニットの繰り返しを確認できる。また、VipA/VipB の場合、twist は 29.41° であり、サブユニットは 360 度中に 12 回出現する [図 35 (j)]。VipA/VipB の結果を見ると、RELION のみの場合は、原子モデルの表面図で特徴的な 12 回の繰り返し構造は見られない [図 35 (c) と (d)]。一方、提案手法では、この 12 回のサブユニットの繰り返しを確認できる [図 35 (g) と (h)]。図 35 の断面図の比較結果が示すように、RELION のみの結果と比較して本提案手法の方がより 3 次元構造を推定できていることがわかる。

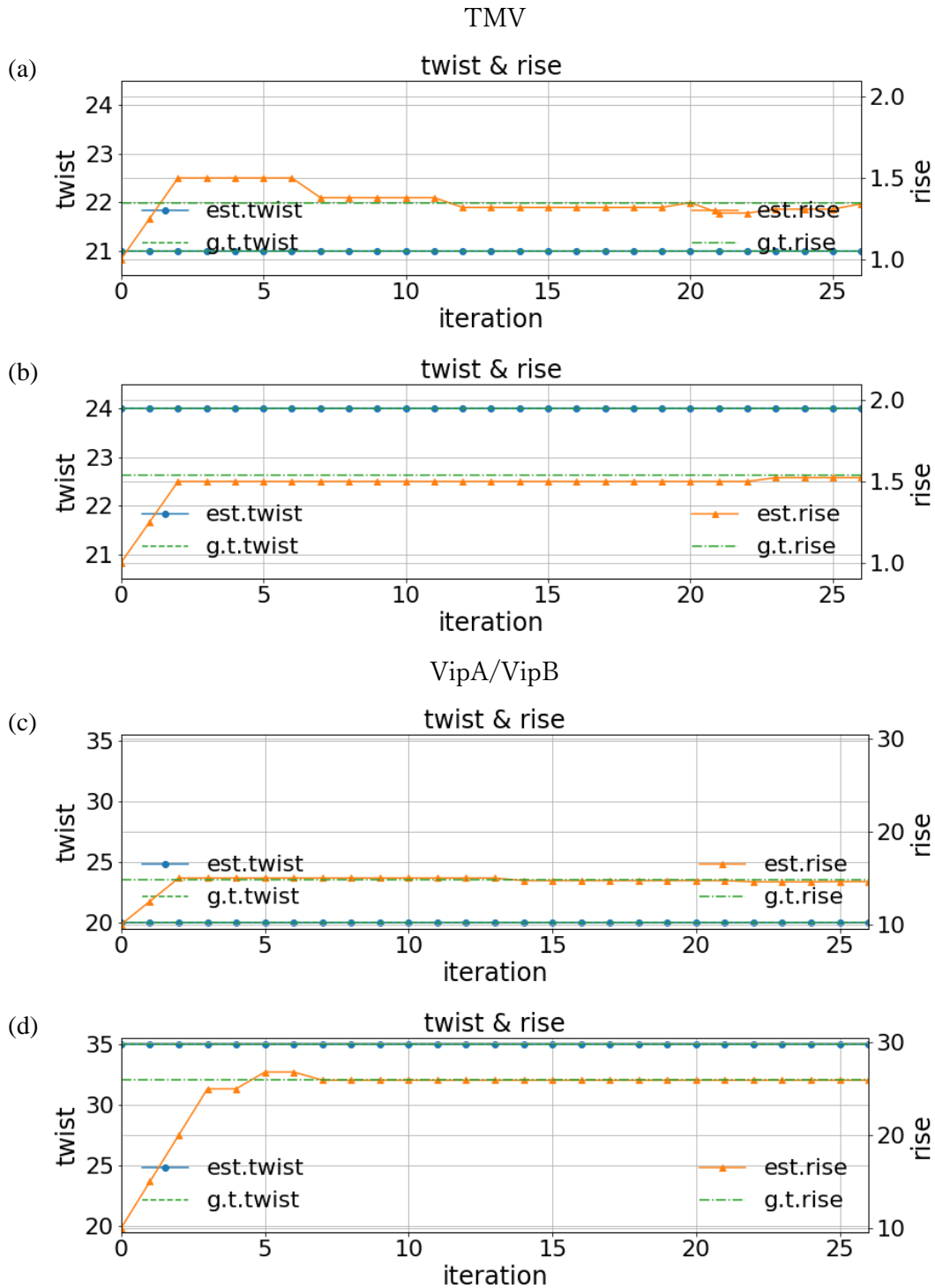


図 29 第 1 Phase のらせんパラメータ推定推移: (a) と (b) は、それぞれ TMV の第 1 Phase の 1 番目と 2 番目の探索結果を表し、(c) と (d) は、それぞれ VipA/VipB の第 1 Phase の 1 番目と 2 番目の探索結果を表す。グラフの横軸は最適化回数 (iteration)、縦軸 (左) は twist、縦軸 (右) は rise を表す。ラベルが est. twist である実線

(青) とラベルが est. rise である実線 (オレンジ) は、それぞれ twist と rise の推定値を表す。ラベルが g.t. twist である破線 (緑) とラベルが g.t. rise である鎖線 (緑) は、それぞれ twist と rise の正解値を表す。さらに、グラフ中の rise の正解値を表す鎖線 (緑) の値は、twist を固定したときに pitch が正解値となる rise の値とした。例えば、(a) のグラフの場合、鎖線 (緑) の値は、twist が正解値とは異なる  $21.0^\circ$  とした際に、pitch が正解値の  $23.04 \text{ \AA}$  となる rise の値である  $1.34 \text{ \AA}$  を表している。pitch の推定では、twist を固定し rise を探索するため、グラフ中の twist の推定値は固定値となる。

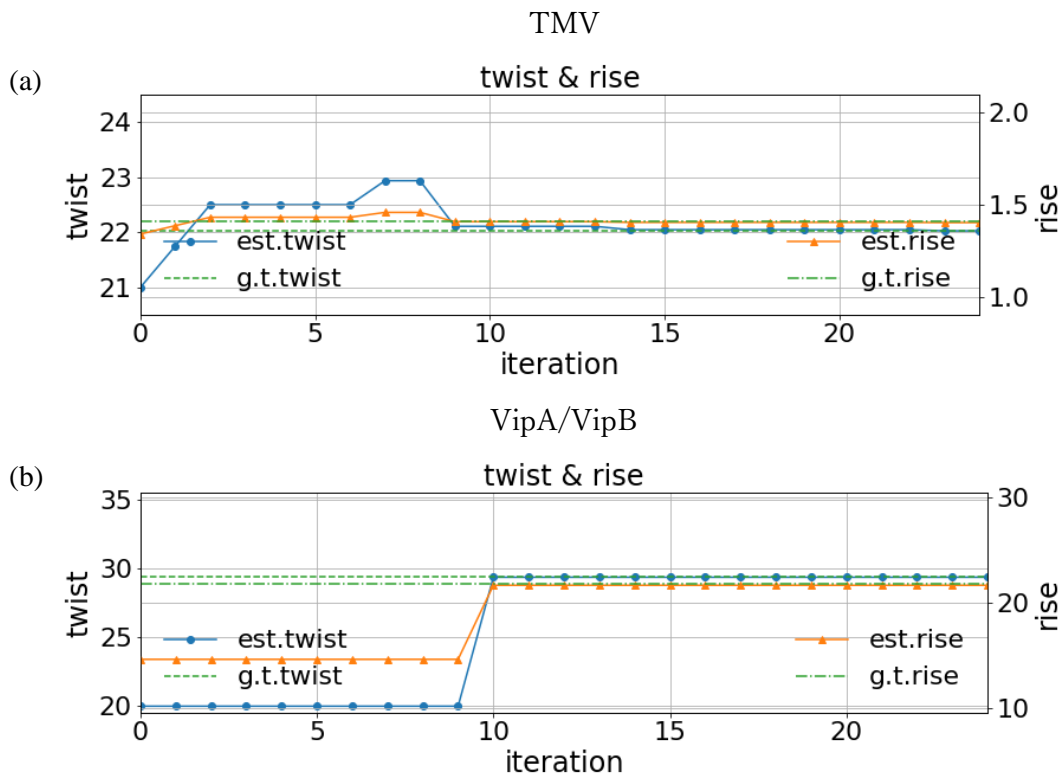


図 30 第 2 Phase のらせんパラメータ推定推移: 上段 (a) は TMV の結果、下段 (b) は VipA/VipB の結果を表す。グラフの横軸は最適化回数 (iteration)、縦軸 (左) は twist、縦軸 (右) は rise を表す。ラベルが est. twist である実線 (青) とラベルが est. rise である実線 (オレンジ) は、それぞれ twist と rise の推定値を表す。ラベルが g.t. twist である破線 (緑) とラベルが g.t. rise である鎖線 (緑) は、それぞれ twist と rise の正解値を表す。

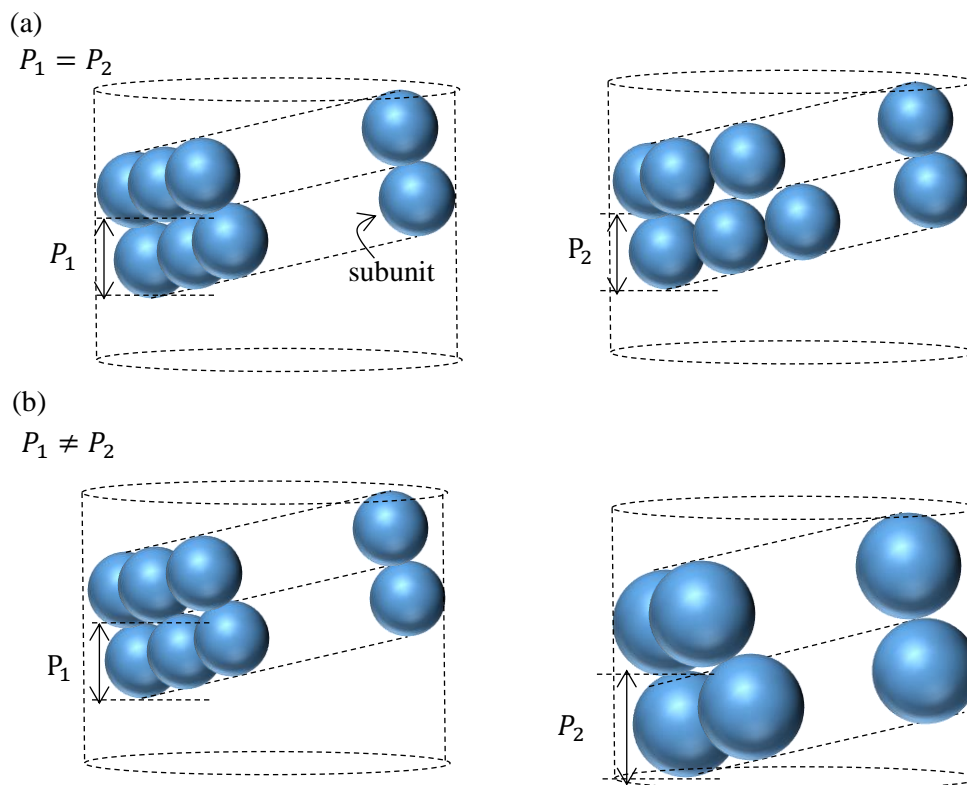


図 31 上段 (a) は twist と rise は異なるが pitch が同じ場合、下段 (b) は twist と rise と pitch が異なる場合の 3 次元構造のイメージ図である。 $P_1$  と  $P_2$  は pitch を表している。上段 (a) の pitch が同じ場合は、twist と rise が異なるため一周中のサブユニットの数が異なる。そんな中、観測画像をうまく説明するために、投影像の輪郭が似た形状になるように 3 次元構造が推定されることが考えられる。一方、下段 (b) の twist と rise と pitch が異なる場合は、pitch が異なるため投影像の輪郭を似せるように 3 次元構造を推定することができない。これにより、twist を正解値とは異なる値で固定した状態で、rise を探索した場合でも、pitch の推定が可能になったと考えられる。

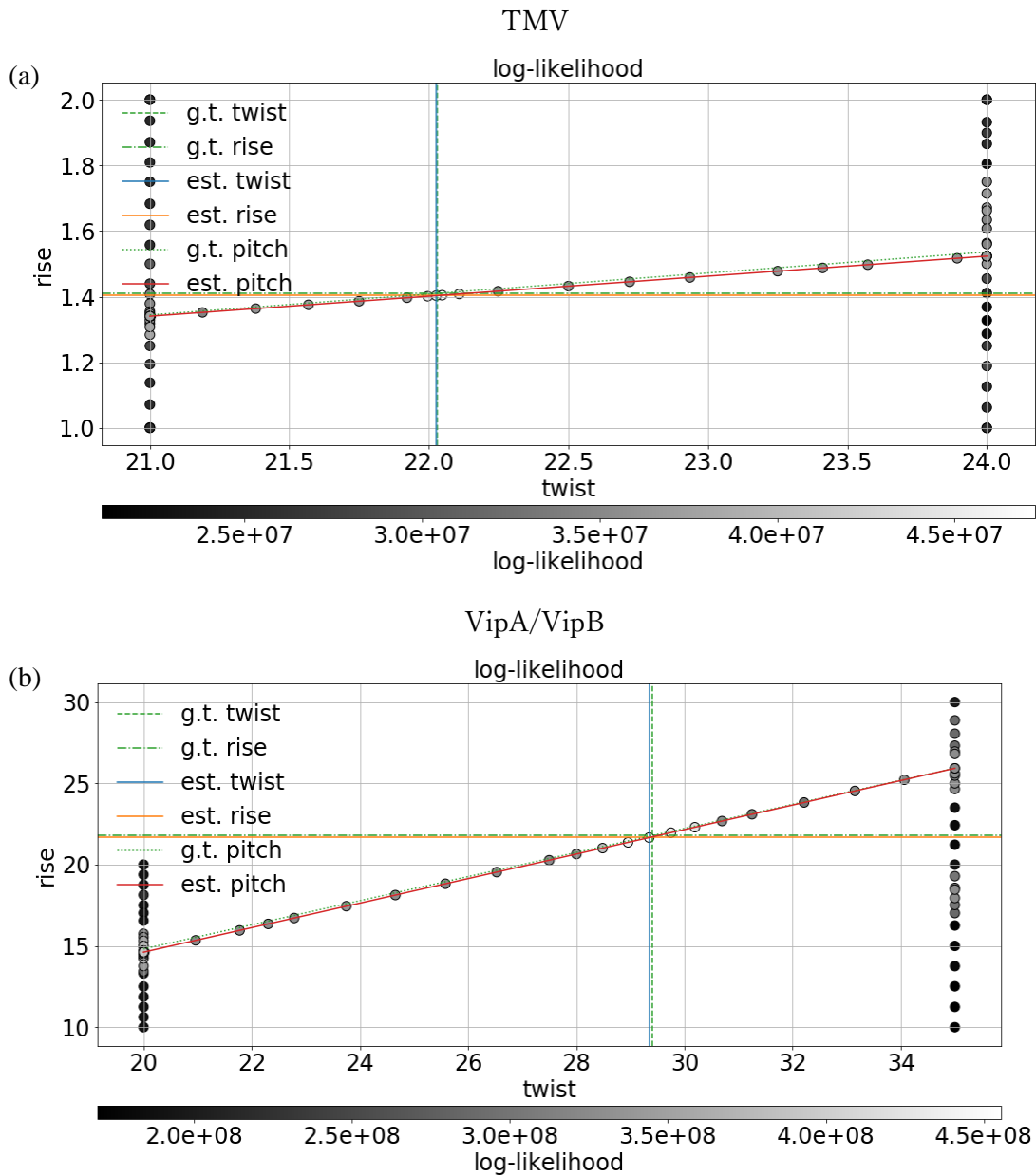


図 32 図は 2 次元探索空間に、第 1 Phase と第 2 Phase の探索結果を散布図として示したものである。上段 (a) は TMV の結果、下段 (b) は VipA/VipB の結果を表す。グラフの横軸は twist を表し、縦軸は rise を表す。各点は探索したらせんパラメータの値を座標位置で、推定結果として得られた対数尤度を濃度で表したものである。ラベルが est. twist である実線 (青) とラベルが est. rise である実線 (オレンジ) とラベルが est. pitch である実線 (赤) は、それぞれ twist と rise と pitch の推定結果を表す。ラベルが g.t. twist である破線 (緑) とラベルが g.t. rise である鎖線 (緑) とラベルが g.t. pitch である点線 (緑) は、それぞれ twist と rise と pitch の正解値を表す。最終的ならせんパラメータの推定値である実線 (青) と実線 (オレンジ) の交点は、TMV の場合、twist が 22.03° および rise が 1.40 Å、VipA/VipB の場合、twist が 29.35° および rise が 21.66 Å であった。



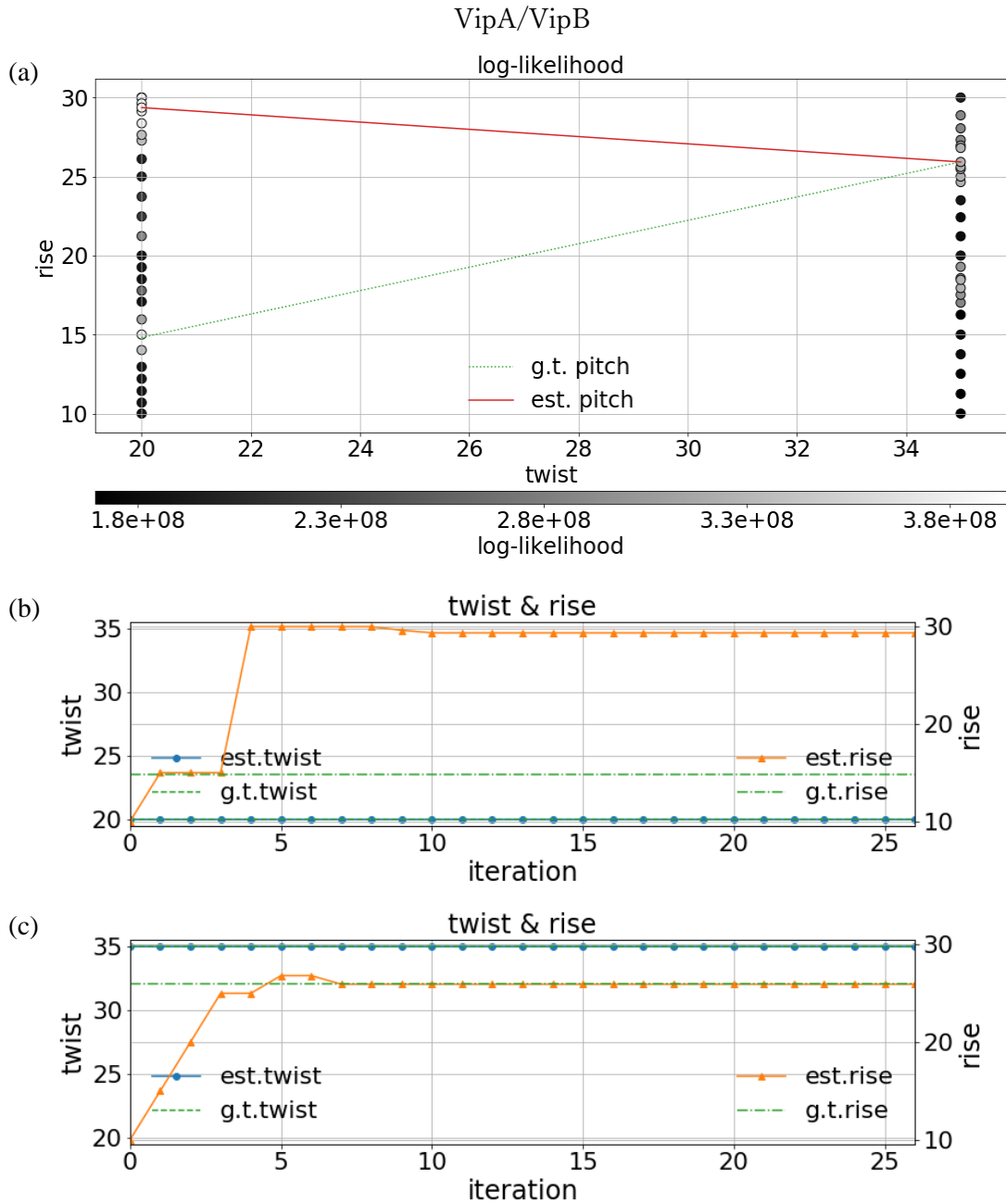


図 33 VipA/VipB において rise の探索範囲を 10.0–30.0 Å にしたときの第 1 Phase の推定結果: (a) は 2 次元探索空間に、第 1 Phase の探索結果を散布図として示したものである。グラフの横軸は twist を表し、縦軸は rise を表す。各点は探索したらせんパラメータの値を座標位置で、推定結果として得られた対数尤度を濃度で表したものである。ラベルが est. pitch である実線 (赤) は推定値、ラベルが g.t. pitch である点線 (緑) は正解値を表す。(b) は、第 1 Phase の 1 番目の探索である twist を 20.0° に固定して rise を探索したときの結果で、(c) は、第 1 Phase の 2 番目の探索である twist を 35.0° に固定して rise を探索したときの結果である。グラフの横軸は最適化回数 (iteration)、縦軸 (左) は twist、縦軸 (右) は rise を表す。ラベルが est. twist である実線 (青) とラベ

ルが est. rise である実線（オレンジ）は、それぞれ twist と rise の推定値を表す。ラベルが g.t. twist である破線（緑）とラベルが g.t. rise である鎖線（緑）は、それぞれ twist と rise の正解値を表す。(b) の twist を 20.0° と固定した第 1 Phase の探索で、rise の推定結果を表す実線（オレンジ）と rise の正解値を表す鎖線（緑）が離れており、うまく推定できていないことがわかる。このときの rise の推定値は 29.37 Å であった。twist を 20.0° と固定したとき、正しい pitch となる鎖線（緑）の rise の値は、14.82 Å であり、推定結果である実線（オレンジ）の 29.37 Å は、14.82 Å の 2 倍である 29.64 Å とほぼ等しいことから、らせんが 2 周したところを検出したためと考えられる。

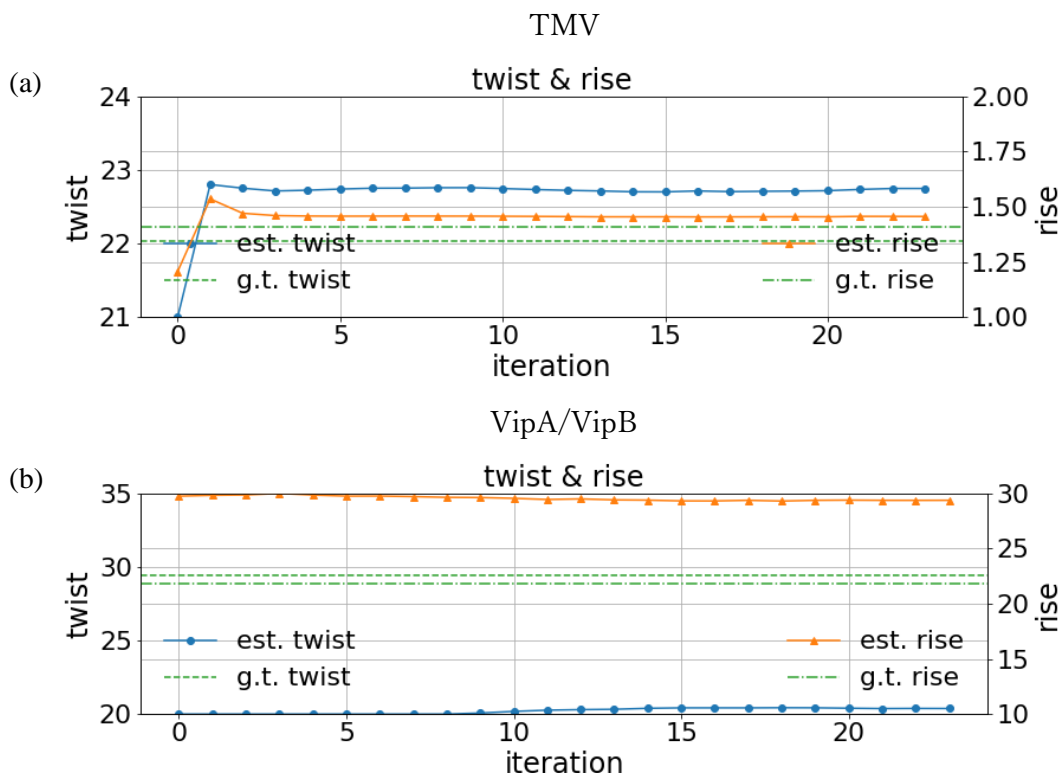


図 34 RELION のみを使用した 3 次元構造分類によるらせんパラメータ推定の結果: 上段 (a) は TMV の結果、下段 (b) は VipA/VipB の結果を表す。グラフの横軸は最適化回数 (iteration)、縦軸 (左) は twist、縦軸 (右) は rise を表す。ラベルが est. twist である実線（青）とラベルが est. rise である実線（オレンジ）は、それぞれ twist と rise の推定値を表す。ラベルが g.t. twist である破線（緑）とラベルが g.t. rise である鎖線（緑）は、それぞれ twist と rise の正解値を表す。最終的ならせんパラメータの推定値は、TMV の場合、twist が 22.75° および rise が 1.46 Å、VipA/VipB の場合、twist が 20.38° および rise が 29.37 Å であった。

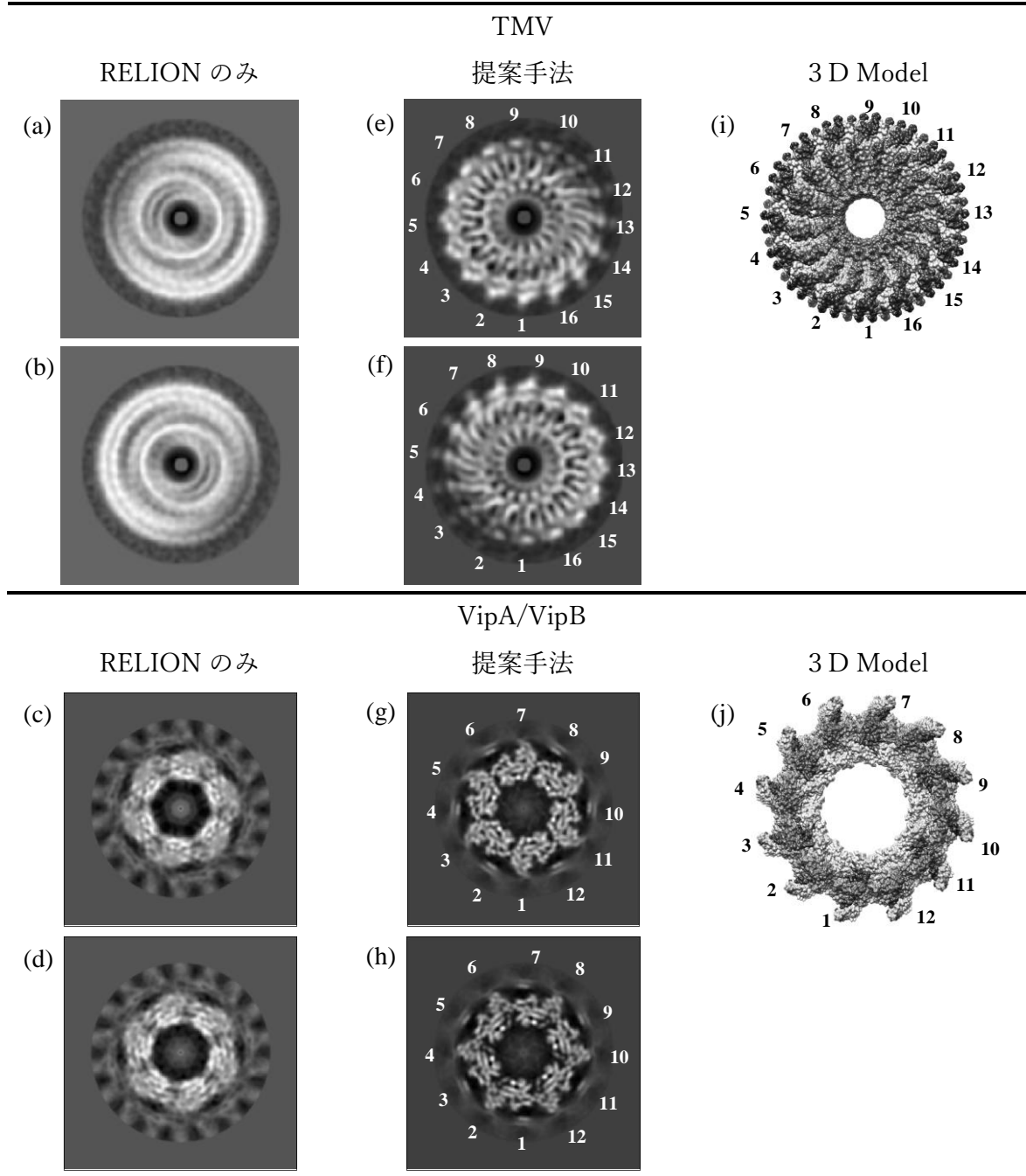


図 35 3次元構造断面図: 上は TMV の結果を表し、下は VipA/VipB の結果を表す。左側 (a)–(d) が RELION のみによって推定された 3次元構造の異なる 2箇所 の断面図、中央 (e)–(h) は提案手法によって推定された 3次元構造の異なる 2箇所 の断面図、右側 (i)–(j) は PDB に登録されている原子モデル、TMV は PDB ID: 2TMV、VipA/VipB は PDB ID: 3J9G の表面図である。360度内のサブユニットの数は、TMV で約 16個、VipA/VipB で約 12個となる。VipA/VipB の場合、pitch が 266.7 Å と TMV の 23.0 Å に比べて大きいので、(g) の偶数番目の突起は小さいが、(h) の断面図では偶数番目の突起が確認できる。

#### 4.4.6 計算量の削減

本提案手法の問題の一つに、計算量の多さが挙げられる。本提案手法では、らせんパラメータを固定して3次元再構成を行い、そこから得られた対数尤度をもとに次の探索候補を決定する。これは、3次元再構成を複数回実施することとなり計算量増加の要因となる。そこで、計算量削減のため、粒子画像数を減らした場合の堅牢性を評価した。TMVの場合、先の実験で使用した粒子画像数は1341枚だった。そこから、粒子画像数が200、400、600、800、1000となるように、粒子画像をランダムに抽出した。粒子画像数毎に評価を3回実行し、粒子画像は評価の度に毎回ランダムに抽出した。表3は、粒子画像数毎の探索結果を示したものである。粒子画像数800および1000枚の場合は、らせんパラメータが3回とも正しく推定された。一方、200、400、600枚では、らせんパラメータが正しく推定されなかった。推定が正しく行えなかった原因は、第1 Phaseのpitch推定、すなわち第2 Phaseの探索領域となる直線の推定がうまく行えず、第2 Phaseのtwistとriseの探索領域の近傍に正解値がなかったためであった。これは、粒子画像数を減らしたことで第1 Phaseのpitch推定が不安定になったためと考えられる。図36は粒子数毎の推定pitchの結果を示した図である。図は、粒子画像数が200、400、600枚のとき、点線の正解値に対して実線の推定値がずれていることを示している[図36(a)-(c)]。しかし、800枚という粒子画像数でも、単粒子解析に用いられる標準的なシステムで容易に取り扱える画像数であり、計算量の削減効果が得られる。

表3 画像枚数毎の探索結果

画像数	1回目		2回目		3回目	
	twist	rise	twist	rise	twist	rise
200	22.08°	1.37Å	23.00°	1.39 Å	23.00°	1.44 Å
400	23.40°	1.61 Å	23.00°	1.55 Å	23.47°	1.59 Å
600	23.00°	1.62 Å	23.44°	1.62 Å	24.00°	1.70 Å
800	22.05°	1.39 Å	22.00°	1.43 Å	22.05°	1.41 Å
1000	22.07°	1.38 Å	22.05°	1.39 Å	22.02°	1.38 Å

※TMVの実際のらせんパラメータは、twistが22.03°およびriseが1.41 Åである。

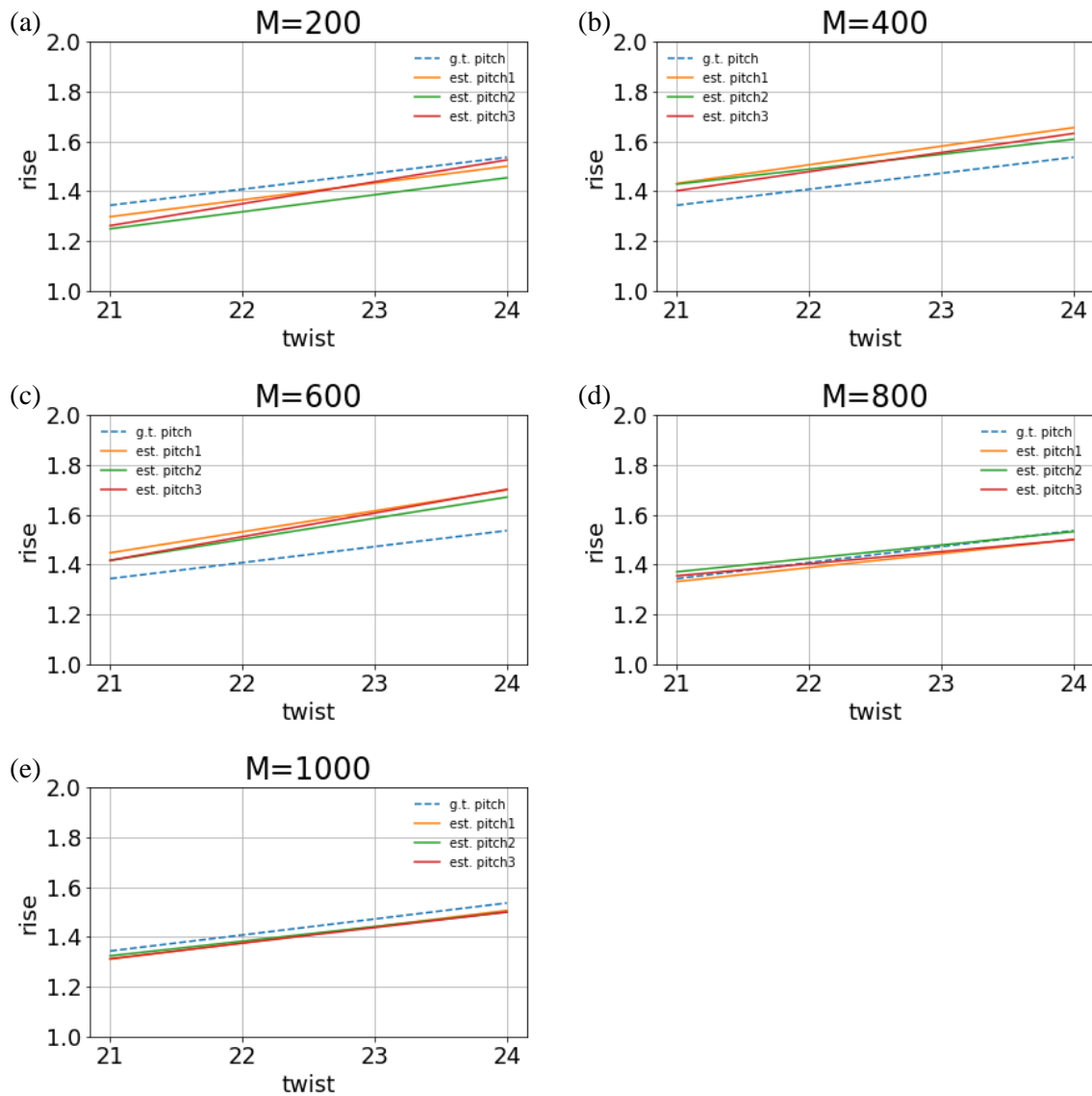


図 36 粒子数ごとの pitch の推定結果を示す。グラフは探索空間を表し、横軸は twist、縦軸は rise を表す。さらに、探索空間中に推定した pitch が表す直線を示した。粒子画像数は (a) 200、(b) 400、(c) 600、(d) 800、(e) 1000 とし、グラフタイトルに示した。評価は粒子画像数毎に 3 回実施した。ラベルが g.t. pitch である点線 (青) は正解値を表す。ラベルが est.pitch1 / est.pitch2 / est.pitch3 の実線 (オレンジ / 緑 / 赤) は、3 回の評価の推定 pitch を表す。

#### 4.4.7 変形を考慮した Helix のための再構成アルゴリズムとの統合

ここまでの評価では、提案手法の 3 次元再構成には RELION を用いた。本節では、前章で提案した変形を考慮した Helix のための再構成アルゴリズムを 3 次元再構成のアルゴリズムとして用いた評価を示す。前章の 3 次元再構成アルゴリズムでは、事後確率の下界を最大化することで 3 次元構造の推定を行った。そこで、目的関数としては下界の値を使用して、ベイズ最適化によってらせんパラメータの推定を行う。

実データには、1341 枚の TMV 画像を用いた。図 37 は探索結果を示したものである。図 37 (a) のグラフは、横軸が twist、縦軸が rise を表し、グレイスケールは下界の値を表している。図 37 (b) のグラフは、第 2 Phase における推定の推移を表している。twist の推定値は  $22.02^\circ$ 、rise の推定値は  $1.40 \text{ \AA}$  であった。前述した表 1 より TMV のらせんパラメータは、twist が  $22.03^\circ$ 、rise が  $1.41 \text{ \AA}$  であることから、らせんパラメータの推定がうまく行っていることがわかる。この結果は、らせんパラメータを入力とし、何らかの目的関数に従って最適化を実施するという条件を満たした 3 次元再構成手法であれば、本提案手法と統合可能であることを示している。

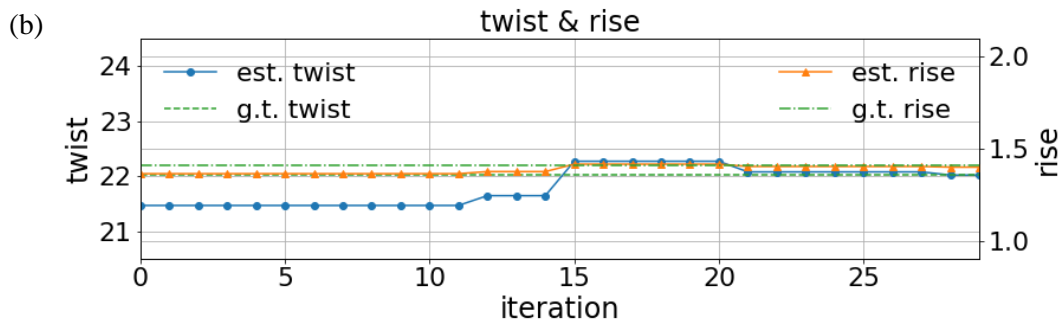
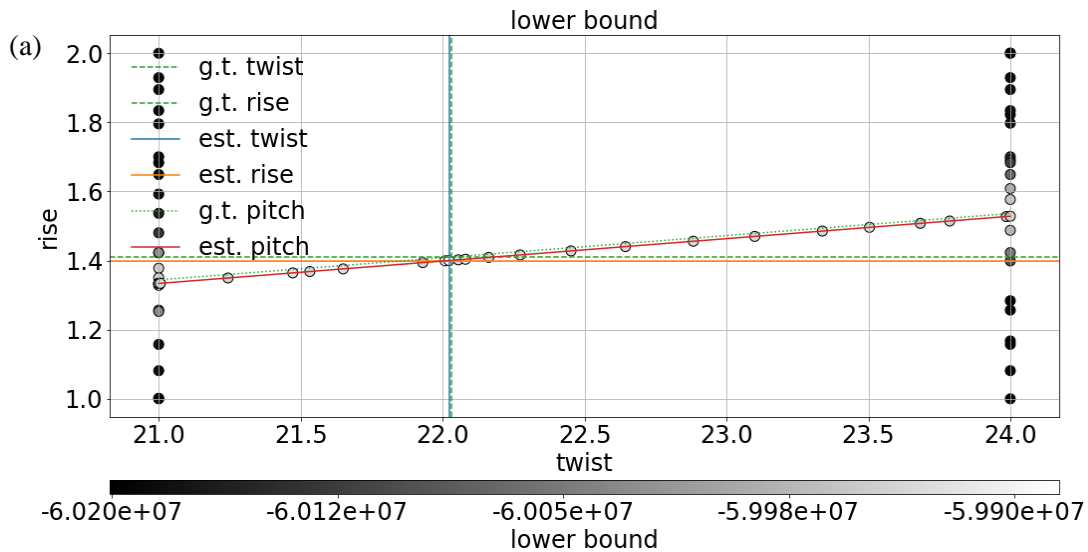


図 37 上段 (a) は 2 次元探索空間に、第 1 Phase と第 2 Phase の探索結果を散布図として示したものである。グラフの横軸は twist を表し、縦軸は rise を表す。各点は探索したらせんパラメータの値を座標位置で、推定結果として得られた下界の値を濃度で表したものである。ラベルが est. twist である実線 (青) とラベルが est. rise である実線 (オレンジ) とラベルが est. pitch である実線 (赤) は、それぞれ twist と rise と pitch の推定結果を表し、ラベルが g.t. twist である破線 (緑) とラベルが g.t. rise である鎖線 (緑) とラベルが g.t. pitch である点線 (緑) は、それぞれ twist と rise と pitch の正解値を表す。下段 (b) は、第 2 Phase のらせんパラメータ推定推移を表す。グラフの横軸は最適化回数 (iteration) を表し、縦軸 (左) は twist を表し、縦軸 (右) は rise を表す。ラベルが est. twist である実線 (青) とラベルが est. rise である実線 (オレンジ) は、それぞれ twist と rise の推定値を表す。ラベルが g.t. twist である破線 (緑) とラベルが g.t. rise である鎖線 (緑) は、それぞれ twist と rise の正解値を表す。

## 4.5 まとめ

本章では、IHRSR が持つ目的関数の不統一という問題に焦点を当てた。この問題を解消するためのアプローチとして、ベイズ最適化を用いたらせんパラメータの2段階探索による3次元らせん再構成手法を提案し、その有効性を検証した。

評価では、EMPIAR database に登録されている TMV と VipA/VipB の cryo-TEM 画像を用いて、提案手法と RELION の比較を行った。評価に先立って、尤度のばらつきを抑制するために、正則化強度を制御するパラメータの値と尤度の標準偏差の関係を調査した。比較評価では、TMV において提案手法のらせんパラメータの推定誤差は、twist が  $0.00^\circ$  で rise が  $0.01 \text{ \AA}$  であったのに対し、RELION では、twist が  $0.72^\circ$  で rise が  $0.05 \text{ \AA}$  であった。同様に、VipA/VipB において提案手法の推定誤差は、twist が  $0.06^\circ$  で rise が  $0.13 \text{ \AA}$  であったのに対し、RELION では、twist が  $9.03^\circ$  で rise が  $7.58 \text{ \AA}$  であった。いずれにおいても、提案手法では、らせんパラメータ推定が適切に行えることを示した。また、推定三次元構造の断面の比較によって、提案手法が三次元構造を適切に推定していることを示した。

さらに、計算コスト削減のため、粒子画像数を削減した場合の堅牢性について検証を行った。評価結果によって、本評価に使用した TMV の場合、約6割の800枚に粒子画像数を削減しても依然として推定が可能であることを示した。この結果は、仮に粒子画像数と計算時間に比例の関係が存在する場合、すべての粒子画像1341枚を使用した場合と比較して計算時間が約6割まで短縮されることを示している。

加えて、前章で提案した変形を考慮した Helix のための3次元再構成アルゴリズムとの統合可能性を検証した。TMV の cryo-TEM 画像を使用した評価において、らせんパラメータの推定誤差は twist が  $0.01^\circ$  で rise が  $0.01 \text{ \AA}$  であり、統合した手法が適切に推定可能であることを示した。



# 第 5 章

## 結論

### 5.1 変形を考慮したらせん再構成

第 3 章では、RELION に代表される従来のアルゴリズムが、Projection Slice Theorem に基づいた投影計算を使用することで、生体高分子を剛体と仮定して 3 次元構造を推定していることによる観測過程の不一致について説明した。この問題を解消するために、Helix の変形を考慮したらせん再構成アルゴリズムの提案を行った。

まず、変形を考慮するために、3 次元構造の変形をパラメータにより表現する Soft-Body Model を導入した。あらゆる変形を表現するためには多量のパラメータを必要とするが、観測画像の低 S/N 比や CTF によって推定が不安定となる要因になる。したがって、単純な推定パラメータの増加は、必ずしも良い結果を保証するものではない。提案手法の Soft-Body Model では、3 次元構造の変形を座標の変形として捉えた。その際、Helix の中心であるらせん軸の曲がりをも 3 次 Spline で表現し、らせん軸の変形に応じて座標を変化させることで、少数のパラメータで 3 次元構造の変形が表現可能であることを示した。

変形を表現するパラメータは潜在変数として、投影方向や位置と共に観測画像毎にベイズ推定される。一般的に、推定する潜在変数が増加すると、計算量は指数的に増加し、推定を困難にする。そこで、推定の初期段階では離散的に粗く推定し、学習が進んだ段階で詳細に推定する、Coarse-to-Fine な 2 段階の最適化手法を示した。

通常、らせん再構成を行う際に、極端に曲がった Helix は除外することが推奨される。評価によって、従来閾値として使用される最大曲率以下の変形が含まれる人工モデルによるデータセットにおいても、変形に対応した Soft-Body Model と変形に非対応である Rigid-Body Model では性能差があることを、PSNR を用いた数値評価と推定 3 次元構造の

断面による視覚的評価により明確にした。加えて、cryo-TEM 画像を使用した評価において、提案手法が実環境に適用可能であることを示した。

今後の課題としては、第3章では、らせん対称性が安定している場合について議論したが、らせん対称性が不安定な、つまり局所的に変化している場合については改善の余地が残されている。らせん対称性が不安定な生体高分子に対して、対称性を考慮せず粒子として3次元構造を推定することは可能ではあるが、その場合、対称性の恩恵は受けられず、より多くの観測画像が必要となる。らせん対称性の局所的な変化を定式化し、投影方向や変形を表す潜在変数と同様に推定することで、提案手法の拡張が可能である。また、対称性を持たない生体高分子の変形に関しても、変形をどのように効率よく表現するかという課題を解決することによる、改善の可能性が残されている。

## 5.2 cryo-TEM に対するベイズ最適化の適応

第4章では、らせん再構成におけるらせん対称性のメリットを説明し、その恩恵を受けるために、サブユニットの3次元構造に加えて、らせんパラメータを推定する必要があることに触れた。さらに、らせんパラメータと3次元構造の両方を推定する従来広く使用されている手法の IHRSR について言及した。しかし、従来手法である IHRSR は、らせんパラメータの推定と3次元構造の推定が別々の目的関数により行われており、アルゴリズムの収束性が保証されないという問題がある。第4章の研究の目的は、この目的関数の不統一の解消にあり、らせんパラメータ推定と3次元再構成を統一的枠組みによって最適化するアルゴリズムを提案した。

まず、統一した目的関数により最適化を行うために、ガウス過程回帰に基づいた未知の目的関数を最適化する手法であるベイズ最適化を用いて、尤度を指標にしたらせんパラメータと3次元構造を推定するアルゴリズムを示した。さらに、推定を効率化するために、らせん対称性の性質を利用した2段階の探索手法を示した。

評価では、実環境により得られた TMV と VipA/VipB の cryo-TEM 画像を用いて従来手法と提案手法の比較を実施した。評価によって、2段階探索の有効性を示し、さらに、従

来手法では推定が困難であった条件下においても、提案手法では適切に、3次元構造とらせんパラメータの推定が可能であることを示した。

今後の課題としては、計算量のさらなる抑制が挙げられる。提案手法はベイズ最適化を用いており、探索に関しては逐次最適化を実施する。探索の並列化方法の課題を解決することによって、さらなる計算効率向上が改善の余地として残されている。

### 5.3 総括

本研究の目的は、らせん構造の決定にあり、そのためのアルゴリズムに関して、観測モデルの不一致と、目的関数の不統一に焦点を当て研究を行った。らせん対称性をもつ生体高分子には、細胞骨格フィラメント状アクチン、微小管、 $\alpha$ -ヘリックス、およびDNAらせんなどのタンパク質複合体がある。例えば、アルツハイマー病に関係するらせん構造を持つタウフィラメント (tau filament) は、近年 cryo-TEM による構造解析結果が報告されている [65]。また、パーキンソン病の患者の損傷した脳細胞には、 $\alpha$ -シヌクレイン (alpha-synuclein) と呼ばれるタンパク質の凝集体が含まれることが知られており、近年 cryo-TEM を使用して  $\alpha$ -シヌクレインがクラスターを形成しらせん構造となることが明らかにされた [66]。このように、神経科学分野において、らせん構造をもった生体高分子の cryo-TEM による構造決定は重要な役割を担っている。しかしながら、フィラメントは、その形状故に粒子に比べて、より変形しやすいと予想され、変形を考慮することは今後益々重要になってくると考えている。

本研究によって提案されたアルゴリズムの目的は、観測モデルの不一致や目的関数の不統一の解消による性能向上であった。このとき、変形を効率よく表現する、計算を効率よく行う、探索を効率よく行う、というように効率化が鍵であった。cryo-TEM がより発展していくためには、多くのユーザーによって使用されることが重要であるが、試料作製などの不確定要素が多く現時点ではトライアンドエラーを繰り返す必要がある。そのため、効率的に3次元構造を決定するための自動化技術の研究は重要なトピックの一つである。しかしながら、現状の cryo-TEM では、様々な場面でユーザーによる判断が求められ、それにより結果が異なる可能性がある。本研究で提案したベイズ最適化を用いたパラメータ

を推定する枠組みは、らせんパラメータの推定のみならず、他のパラメータに対しても有効であり、本研究は今後の構造決定の自動化に寄与するものと考えている。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官の佐藤主税教授からは多大なる御指導、御助言を賜りました。厚く感謝申し上げます。また、副指導教官として御指導いただきました産業技術総合研究所産総研-東大オペランドOILバイオ分子動態チームラボチーム長の三尾和弘博士に深く感謝申し上げます。また、お忙しい中、本論文の審査員として多くの御助言をいただきました、主査の筑波大学 人間総合科学研究科 設楽宗孝教授、副査の人間総合科学研究科 山中敏正教授、山田洋助教授、生命環境科学研究科 深水昭吉教授に深く感謝申し上げます。

本研究の全般において非常に多くの有益な御助言をいただくとともに、度重なる議論をさせていただきました株式会社 Preferred Networks の前田新一博士に、心より感謝致します。本研究のアルゴリズムの実装に関して多大なる御協力をいただいたヒューバー智子氏に深く感謝申し上げます。電子顕微鏡の原理や収差補正に関して御教授いただきました、株式会社バイオネット研究所の細川史生博士に深く感謝申し上げます。cryo-TEM のサンプル作製および電子顕微鏡の操作と原理を御教授いただきました、産業総合研究所の越野雅至博士に深く感謝申し上げます。電子顕微鏡の操作に関しまして御教授いただきました、池田充氏に深く感謝申し上げます。サンプルの精製や撮影や研究室の運営に関して御教授いただきました、佐藤真理氏に深く感謝申し上げます。本研究の完成のために、筑波大学大学院博士後期課程への進学を御支援いただきました、株式会社バイオネット研究所の新川隆郎博士に深く感謝申し上げます。

最後に、ここに名前をあげることができなかった、お世話になった多数の方々に、心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] A. S. Hauser, M. M. Attwood, M. Rask-Andersen, H. B. Schiöth, and D. E. Gloriam, “Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 12, pp. 829–842, Dec. 2017.
- [2] H. Berman, K. Henrick, and H. Nakamura, “Announcing the worldwide Protein Data Bank,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 10, no. 12, pp. 980–980, Dec. 2003.
- [3] J. D. Westbrook and S. K. Burley, “How Structural Biologists and the Protein Data Bank Contributed to Recent FDA New Drug Approvals,” *Structure*, vol. 27, no. 2, pp. 211–217, Feb. 2019.
- [4] N. Jones, “Crystallography: Atomic secrets,” *Nature*, vol. 505, no. 7485, pp. 602–603, Jan. 2014.
- [5] Y. Cheng, “Single-particle cryo-EM—How did it get here and where will it go,” *Science*, vol. 361, no. 6405, pp. 876–880, Aug. 2018.
- [6] J. A. Delmar, J. R. Bolla, C.-C. Su, and E. W. Yu, “Crystallization of Membrane Proteins by Vapor Diffusion,” in *Methods in Enzymology*, 1st ed., vol. 557, Elsevier, 2015, pp. 363–392.
- [7] M. A. Dessau and Y. Modis, “Protein Crystallization for X-ray Crystallography,” *J. Vis. Exp.*, vol. 9, no. 47, p. 2285, Jan. 2011.
- [8] V. Marx, “Structural biology: ‘seeing’ crystals the XFEL way,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 9, pp. 903–908, Sep. 2014.
- [9] X. Bai, G. McMullan, and S. H. W. Scheres, “How cryo-EM is revolutionizing structural biology,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 49–57, Jan. 2015.
- [10] A. R. Faruqi and R. Henderson, “Electronic detectors for electron microscopy,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 549–555, Oct. 2007.

- [11] X. Li *et al.*, “Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 584–590, Jun. 2013.
- [12] A.-C. Milazzo *et al.*, “Initial evaluation of a direct detection device detector for single particle cryo-electron microscopy,” *J. Struct. Biol.*, vol. 176, no. 3, pp. 404–408, Dec. 2011.
- [13] D. Lyumkis *et al.*, “Automation in Single-Particle Electron Microscopy,” in *Methods in Enzymology*, 1st ed., vol. 483, no. C, Elsevier, 2010, pp. 291–338.
- [14] S. H. W. Scheres, “RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination,” *J. Struct. Biol.*, vol. 180, no. 3, pp. 519–530, Dec. 2012.
- [15] W. Jiang, M. L. Baker, J. Jakana, P. R. Weigele, J. King, and W. Chiu, “Backbone structure of the infectious  $\epsilon$  15 virus capsid revealed by electron cryomicroscopy,” *Nature*, vol. 451, no. 7182, pp. 1130–1134, Feb. 2008.
- [16] X. Yu, L. Jin, and Z. H. Zhou, “3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy,” *Nature*, vol. 453, no. 7193, pp. 415–419, May 2008.
- [17] X. Zhang *et al.*, “Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 6, pp. 1867–1872, Feb. 2008.
- [18] S. H. W. Scheres *et al.*, “Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization,” *Nat. Methods*, vol. 4, no. 1, pp. 27–29, Jan. 2007.
- [19] R. Henderson and R. M. Glaeser, “Quantitative analysis of image contrast in electron micrographs of beam-sensitive crystals,” *Ultramicroscopy*, vol. 16, no. 2, pp. 139–150, Jan. 1985.
- [20] Y. Cheng, N. Grigorieff, P. A. Penczek, and T. Walz, “A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy,” *Cell*, vol. 161, no. 3, pp. 438–449, Apr. 2015.
- [21] R. Diaz, J. Rice, William, and D. L. Stokes, “Fourier–Bessel Reconstruction of Helical Assemblies,” in *Methods in Enzymology*, vol. 482, Elsevier, 2010, pp. 131–165.

- [22] E. H. Egelman, “A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods,” *Ultramicroscopy*, vol. 85, no. 4, pp. 225–234, Dec. 2000.
- [23] 今野豊彦, *物質からの回折と結像-透過電子顕微鏡法の基礎-*. 共立出版, 2003.
- [24] O. L. Krivanek and P. E. Mooney, “Applications of slow-scan CCD cameras in transmission electron microscopy,” *Ultramicroscopy*, vol. 49, no. 1–4, pp. 95–108, Feb. 1993.
- [25] P. Mooney, “Optimization of Image Collection for Cellular Electron Microscopy,” in *Methods in Cell Biology*, vol. 79, Elsevier, 2007, pp. 661–719.
- [26] R. H. Wade, “A brief look at imaging and contrast transfer,” *Ultramicroscopy*, vol. 46, no. 1–4, pp. 145–156, Oct. 1992.
- [27] 長谷俊治, 高尾敏文, and 高木淳一, *タンパク質をみる-構造と挙動タンパク質をみる-構造と挙動*. 化学同人, 2009.
- [28] K. Zhang, “Gctf: Real-time CTF determination and correction,” *J. Struct. Biol.*, vol. 193, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2016.
- [29] A. F. Brilot *et al.*, “Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film,” *J. Struct. Biol.*, vol. 177, no. 3, pp. 630–637, Mar. 2012.
- [30] M. G. Campbell *et al.*, “Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron Cryo-Microscopy,” *Structure*, vol. 20, no. 11, pp. 1823–1828, Nov. 2012.
- [31] X. Li, S. Q. Zheng, K. Egami, D. A. Agard, and Y. Cheng, “Influence of electron dose rate on electron counting images recorded with the K2 camera,” *J. Struct. Biol.*, vol. 184, no. 2, pp. 251–260, Nov. 2013.
- [32] X. Bai, I. S. Fernandez, G. McMullan, and S. H. Scheres, “Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles,” *Elife*, vol. 2, p. e00461, Feb. 2013.
- [33] J. A. Mindell and N. Grigorieff, “Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy,” *J. Struct. Biol.*, vol. 142, no. 3, pp. 334–347, Jun. 2003.
- [34] A. Rohou and N. Grigorieff, “CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs,” *J. Struct. Biol.*, vol. 192, no. 2, pp. 216–221, Nov. 2015.



- [35] S. H. W. Scheres, “A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination,” *J. Mol. Biol.*, vol. 415, no. 2, pp. 406–418, Jan. 2012.
- [36] Z. Yin, Y. Zheng, P. C. Doerschuk, P. Natarajan, and J. E. Johnson, “A statistical approach to computer processing of cryo-electron microscope images: virion classification and 3-D reconstruction,” *J. Struct. Biol.*, vol. 144, no. 1–2, pp. 24–50, Oct. 2003.
- [37] C. J. Prust, P. C. Doerschuk, G. C. Lander, and J. E. Johnson, “Ab initio maximum likelihood reconstruction from cryo electron microscopy images of an infectious virion of the tailed bacteriophage P22 and maximum likelihood versions of Fourier Shell Correlation appropriate for measuring resolution of spherical or cyli,” *J. Struct. Biol.*, vol. 167, no. 3, pp. 185–199, Sep. 2009.
- [38] T. Hastie, R. Tibshirani, and J. Friedman, *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction, Second Edition*. Springer-Verlag New York, 2009.
- [39] N. Grigorieff, “FREALIGN: High-resolution refinement of single particle structures,” *J. Struct. Biol.*, vol. 157, no. 1, pp. 117–125, Jan. 2007.
- [40] A. Rohou and N. Grigorieff, “Frelax: Model-based refinement of helical filament structures from electron micrographs,” *J. Struct. Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 234–244, May 2014.
- [41] T. Nakane, D. Kimanius, E. Lindahl, and S. H. Scheres, “Characterisation of molecular motions in cryo-EM single-particle data by multi-body refinement in RELION,” *Elife*, vol. 7, p. e36861, Jun. 2018.
- [42] S. He and S. H. W. Scheres, “Helical reconstruction in RELION,” *J. Struct. Biol.*, vol. 198, no. 3, pp. 163–176, Jun. 2017.
- [43] W. Böhm, G. Farin, and J. Kahmann, “A survey of curve and surface methods in CAGD,” *Comput. Aided Geom. Des.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–60, Jul. 1984.
- [44] A. Kanemura, S. Maeda, and S. Ishii, “Superresolution with compound Markov random fields via the variational EM algorithm,” *Neural Networks*, vol. 22, no. 7, pp. 1025–1034, Sep. 2009.

- [45] F.-C. Jeng and J. W. Woods, “Compound Gauss-Markov random fields for image estimation,” *IEEE Trans. Signal Process.*, vol. 39, no. 3, pp. 683–697, Mar. 1991.
- [46] S. Bi, X. Han, and Y. Yu, “An  $L_1$  image transform for edge-preserving smoothing and scene-level intrinsic decomposition,” *ACM Trans. Graph.*, vol. 34, no. 4, p. 78, Jul. 2015.
- [47] C. M. Bishop, *Pattern recognition and machine learning*. Springer-Verlag New York, 2006.
- [48] A. P. Dempster, N. M. Laird, and D. B. Rubin, “Maximum Likelihood from Incomplete Data Via the EM Algorithm,” *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, vol. 39, no. 1, pp. 1–22, Sep. 1977.
- [49] A. E. Gelfand and A. F. M. Smith, “Sampling-Based Approaches to Calculating Marginal Densities,” *J. Am. Stat. Assoc.*, vol. 85, no. 410, p. 398, Jun. 1990.
- [50] J. S. Liu, W. H. Wong, and A. Kong, “Covariance Structure of the Gibbs Sampler with Applications to the Comparisons of Estimators and Augmentation Schemes,” *Biometrika*, vol. 81, no. 1, pp. 27–40, Mar. 1994.
- [51] G. Casella, “Rao-Blackwellisation of sampling schemes,” *Biometrika*, vol. 83, no. 1, pp. 81–94, Mar. 1996.
- [52] R. H. Byrd, P. Lu, J. Nocedal, and C. Zhu, “A Limited Memory Algorithm for Bound Constrained Optimization,” *SIAM J. Sci. Comput.*, vol. 16, no. 5, pp. 1190–1208, Sep. 1995.
- [53] H. Xu *et al.*, “Correction: Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity,” *Elife*, vol. 4, p. e07546, 2015.
- [54] A. Iudin, P. K. Korir, J. Salavert-Torres, G. J. Kleywegt, and A. Patwardhan, “EMPIAR: a public archive for raw electron microscopy image data,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 5, p. 387, 2016.
- [55] S. A. Fromm, T. A. M. Bharat, A. J. Jakobi, W. J. H. Hagen, and C. Sachse, “Seeing tobacco mosaic virus through direct electron detectors,” *J. Struct. Biol.*, vol. 189, no. 2, pp. 87–97, Feb. 2015.

- [56] K. Namba, R. Pattanayek, and G. Stubbs, “Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus: Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction,” *J. Mol. Biol.*, vol. 208, no. 2, pp. 307–325, Jul. 1989.
- [57] H. M. Berman, “The Protein Data Bank,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000.
- [58] J. Frank, B. Shimkin, and H. Dowse, “Spider—A modular software system for electron image processing,” *Ultramicroscopy*, vol. 6, no. 4, pp. 343–357, Jan. 1981.
- [59] E. Brochu, V. M. Cora, and N. de Freitas, “A Tutorial on Bayesian Optimization of Expensive Cost Functions, with Application to Active User Modeling and Hierarchical Reinforcement Learning,” *arXiv Prepr. arXiv1012.2599*, p. 49, Dec. 2010.
- [60] Carl Edward Rasmussen and C. K. I. Williams, *Gaussian Processes for Machine Learning*. MIT press Cambridge, MA, 2006.
- [61] 赤穂昭太郎, “ガウス過程回帰の基礎,” システム/制御/情報, vol. 62, no. 10, pp. 390–395, 2018.
- [62] 持橋大地 and 大羽成征, ガウス過程と機械学習. 講談社, 2019.
- [63] The GPyOpt authors, “GPyOpt: A Bayesian Optimization framework in Python,” 2016. [Online]. Available: <http://github.com/SheffieldML/GPyOpt>.
- [64] M. Kudryashev *et al.*, “Structure of the Type VI Secretion System Contractile Sheath,” *Cell*, vol. 160, no. 5, pp. 952–962, Feb. 2015.
- [65] A. W. P. Fitzpatrick *et al.*, “Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer’s disease,” *Nature*, vol. 547, no. 7662, p. 185, 2017.
- [66] R. Guerrero-Ferreira *et al.*, “Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils,” *Elife*, vol. 7, p. e36402, Jul. 2018.

# 業績

## 論文

- [1] M. Ohashi, S. Maeda, and C. Sato, “Bayesian inference for three-dimensional helical reconstruction using a soft-body model,” *Phys. Rev. E*, vol. 100, no. 4, p. 42411, 2019

## 特許

- [1] 大橋正隆、前田新一, 特願2019-190733、生体分子の3次元再構成装置、3次元再構成方法及び3次元再構成プログラム

本論文は、上記出願特許の請求項すべてと関連がある。その中でも、第3章の変形に関しては、請求項3と関連がある。第3章の最適化に関しては、請求項1、2、4と関連がある。第3章の基底関数表現および prior に関しては、請求項5と関連がある。第4章に関しては、請求項2と関連がある。

# 付録

## A 3次 Spline 曲線

節点 (knot または way-point) の数が  $N+1$  点、間隔が  $N$  区間の 3 次 Spline 曲線は、

$$S_j(x) = a_j + b_j(x - x_j) + c_j(x - x_j)^2 + d_j(x - x_j)^3 \quad (55)$$

のように定義される。ここで、 $(x_j, y_j)$  は節点を表し、 $(a_j, b_j, c_j, d_j)$  は 3 次 Spline 曲線の係数を表す。添字  $j$  は節点の番号を表す。さらに、3 次 Spline 曲線は、以下の 3 つの条件を満たす。

条件 1: 曲線は節点を通る

$$S_j(x_j) = y_j \quad (56)$$

条件 2: 区間と区間の間は滑らかにつながっている

$$\begin{aligned} S_{j+1}(x_{j+1}) &= S_j(x_{j+1}) \\ S'_{j+1}(x_{j+1}) &= S'_j(x_{j+1}) \\ S''_{j+1}(x_{j+1}) &= S''_j(x_{j+1}) \end{aligned} \quad (57)$$

条件 3: 始点と終点の二次微分は 0

$$S''_0(x_0) = S''_N(x_N) = 0 \quad (58)$$

前述の 3 つの条件を満たすように、3 次 Spline 曲線の係数を求める。

はじめに、3次 Spline 曲線の1次微分  $S'_j(x)$  と2次微分  $S''_j(x)$  は以下のように書ける。

$$S'_j(x) = b_j + 2c_j(x - x_j) + 3d_j(x - x_j)^2 \quad (59)$$

$$S''_j(x) = 2c_j + 6d_j(x - x_j) \quad (60)$$

条件1より以下の関係が成り立つ。

$$\begin{aligned} s_j(x_j) &= a_j = y_j \\ s_j(x_{j+1}) &= a_j + b_j(x_{j+1} - x_j) + c_j(x_{j+1} - x_j)^2 + d_j(x_{j+1} - x_j)^3 = y_{j+1} \end{aligned} \quad (61)$$

条件2より以下の関係が成り立つ。

$$\begin{aligned} s'_j(x_j) &= b_j \\ s'_j(x_{j+1}) &= b_j + 2c_j(x_{j+1} - x_j) + 3d_j(x_{j+1} - x_j)^2 = b_{j+1} \\ s''_j(x_j) &= 2c_j \\ s''_j(x_{j+1}) &= 2c_j + 6d_j(x_{j+1} - x_j) = 2c_{j+1} \end{aligned} \quad (62)$$

条件3より以下の関係が成り立つ。

$$\begin{aligned} s''_0(x_0) &= c_0 = 0 \\ s''_N(x_N) &= c_N = 0 \end{aligned} \quad (63)$$

式(61)、式(62)、式(63)から  $a_j, b_j, d_j$  は以下の式で求められる。

$$\begin{aligned}
a_j &= y_j \\
b_j &= \frac{a_{j+1} - a_j}{h_j} - \frac{c_{j+1} + 2c_j}{3} h_j \\
d_j &= \frac{c_{j+1} - c_j}{3h_j} \\
h_j &= x_{j+1} - x_j
\end{aligned} \tag{64}$$

さらに、 $c_j$  は、

$$h_{j-1}c_{j-1} + 2(h_{j-1} + h_j)c_j + h_jc_{j+1} = \frac{3}{h_j}(a_{j+1} - a_j) - \frac{3}{h_{j-1}}(a_j - a_{j-1}) \tag{65}$$

のように書けるので、求めた  $a_j$  および  $h_j$  を用いて、以下の式より求めることができる。

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & \cdots & \cdots & \cdots & 0 \\ h_0 & 2(h_0 + h_1) & h_1 & 0 & \cdots & \cdots & \cdots & 0 \\ 0 & h_1 & 2(h_1 + h_2) & h_2 & \cdots & \cdots & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \ddots & \ddots & \cdots & \cdots & \cdots & 0 \\ 0 & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & h_{n-2} & 2(h_{n-2} + h_{n-1}) & h_{n-1} \\ 0 & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_0 \\ c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_{n-1} \\ c_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ \frac{3}{h_1}(a_2 - a_1) - \frac{3}{h_0}(a_1 - a_0) \\ \frac{3}{h_2}(a_3 - a_2) - \frac{3}{h_1}(a_2 - a_1) \\ \vdots \\ \frac{3}{h_{n-1}}(a_n - a_{n-1}) - \frac{3}{h_{n-2}}(a_{n-1} - a_{n-2}) \\ 0 \end{pmatrix} \tag{66}$$

## B 基底関数

本研究で提案した Soft-Body Model を使用した 3次元再構成アルゴリズムでは、3次元構造を基底関数によって、

$$V(r, \phi, \zeta) = \sum_{j \in N(r, \phi, \zeta)} a_j \psi_j(r, \phi, \zeta; t_j) \quad (67)$$

のように表現する。ここで、 $\psi_j(r, \phi, \zeta; t_j)$  は  $t_j$  に位置する基底関数を表し、 $a_j$  は重みを表す。 $N(r, \phi, \zeta)$  は、点  $(r, \phi, \zeta)$  の近傍にある 8つの基底関数のインデックス  $j$  の集合を表す。図 38 は、座標  $(r, \phi, \zeta)$  の 8近傍を図示したものである。図の例では、 $t_j$  は  $t_0 = (r_0, \phi_{00}, \zeta_0)$ ,  $t_1 = (r_0, \phi_{00}, \zeta_1)$ ,  $t_2 = (r_0, \phi_{01}, \zeta_0)$ ,  $t_3 = (r_0, \phi_{01}, \zeta_1)$ ,  $t_4 = (r_1, \phi_{10}, \zeta_0)$ ,  $t_5 = (r_1, \phi_{10}, \zeta_1)$ ,  $t_6 = (r_1, \phi_{11}, \zeta_0)$ ,  $t_7 = (r_1, \phi_{11}, \zeta_1)$  となる。

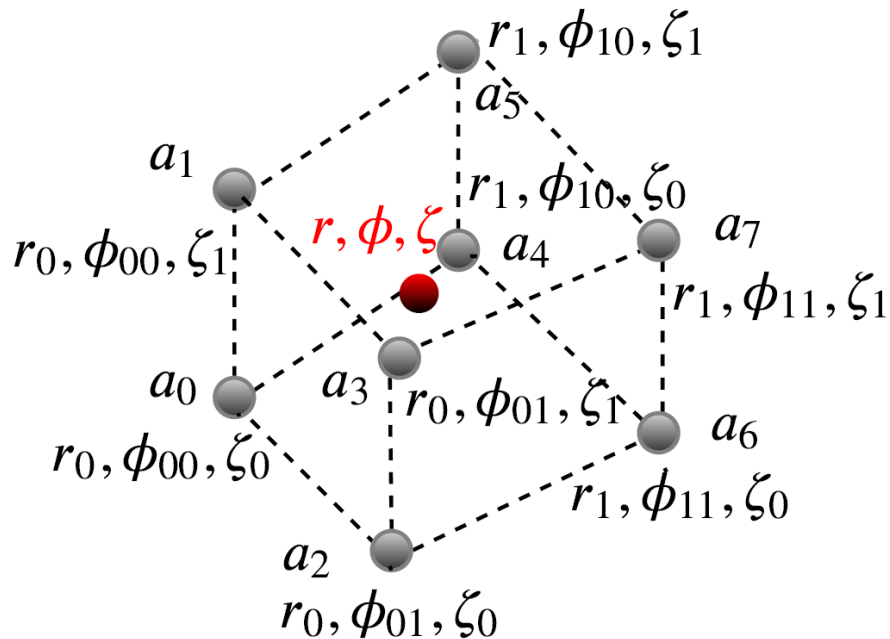


図 38 8近傍のイメージ図:丸 (灰色) は、基底関数の位置をあらわし、丸 (赤) は、座標  $(r, \phi, \zeta)$  を表す。 $(r_0, \phi_{00}, \zeta_0)$ ,  $(r_0, \phi_{00}, \zeta_1)$ ,  $(r_0, \phi_{01}, \zeta_0)$ ,  $(r_0, \phi_{01}, \zeta_1)$ ,  $(r_1, \phi_{10}, \zeta_0)$ ,  $(r_1, \phi_{10}, \zeta_1)$ ,  $(r_1, \phi_{11}, \zeta_0)$ ,  $(r_1, \phi_{11}, \zeta_1)$  は 8つの基底関数の座標を表す。 $a_i$  は基底関数の重みを表す。



$(r, \phi, \zeta)$  の値は trilinear interpolation によって求める。trilinear interpolation は、1次元の線形補間を、2次元に拡張した bilinear interpolation をさらに3次元に拡張した補間手法である。図 39 は、1次元の線形補間のイメージ図である。

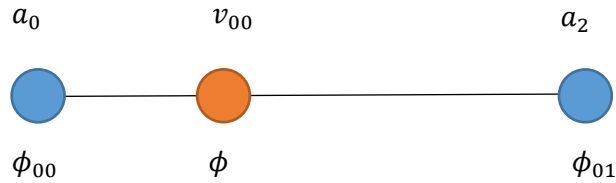


図 39 線形補間のイメージ図: 丸 (青) は、基底関数の位置  $\phi_{00}$  と  $\phi_{01}$  を表し、丸 (オレンジ) は、補間点を表す。 $a_0$  と  $a_2$  は、基底関数の重みを表し、 $v_{00}$  は補間によって得られた値を表す。 $v_{00}$  は線形補間により求める。

$\phi$  に関して線形補間を行うと、 $v_{00}, v_{01}, v_{10}, v_{11}$  は以下のように書ける。

$$\begin{aligned}
 v_{00} &= a_0 \frac{(\phi_{01} - \phi)}{(\phi_{01} - \phi_{00})} + a_2 \frac{(\phi - \phi_{00})}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \\
 v_{01} &= a_1 \frac{(\phi_{01} - \phi)}{(\phi_{01} - \phi_{00})} + a_3 \frac{(\phi - \phi_{00})}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \\
 v_{10} &= a_4 \frac{(\phi_{11} - \phi)}{(\phi_{11} - \phi_{10})} + a_6 \frac{(\phi - \phi_{10})}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \\
 v_{11} &= a_5 \frac{(\phi_{11} - \phi)}{(\phi_{11} - \phi_{10})} + a_7 \frac{(\phi - \phi_{10})}{(\phi_{11} - \phi_{10})}
 \end{aligned} \tag{68}$$

求めた  $v_{00}, v_{01}, v_{10}, v_{11}$  を用いて、 $r$  に関して線形補間を行うと、 $v_0, v_1$  は以下のように書ける。

$$\begin{aligned}
 v_0 &= v_{00} \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} + v_{10} \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \\
 v_1 &= v_{01} \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} + v_{11} \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)}
 \end{aligned} \tag{69}$$

求めた  $v_0, v_1$  を用いて、 $\zeta$  に関して線形補間を行うと  $v(r, \phi, \zeta)$  は以下のように書ける。

$$v(r, \phi, \zeta) = v_0 \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} + v_1 \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \quad (70)$$

式 (70) に式 (68) と式 (69) を代入すると  $v(r, \phi, \zeta)$  は以下のように書ける。

$$\begin{aligned} v(r, \phi, \zeta) = & a_0 \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{01} - \phi)}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} + a_2 \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{00})}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ & + a_4 \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{11} - \phi)}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} + a_6 \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{10})}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ & + a_1 \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{01} - \phi)}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} + a_3 \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{00})}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ & + a_5 \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{11} - \phi)}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} + a_7 \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{10})}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \end{aligned} \quad (71)$$

式 (71) より基底関数  $\psi_j(r, \phi, \zeta; t_j)$  は以下のようになる。

$$\begin{aligned} \psi_0(r, \phi, \zeta; t_0) &= \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{01} - \phi)}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_1(r, \phi, \zeta; t_1) &= \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{01} - \phi)}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_2(r, \phi, \zeta; t_2) &= \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{00})}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_3(r, \phi, \zeta; t_3) &= \frac{(r_1 - r)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{00})}{(\phi_{01} - \phi_{00})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_4(r, \phi, \zeta; t_4) &= \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{11} - \phi)}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_5(r, \phi, \zeta; t_5) &= \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi_{11} - \phi)}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_6(r, \phi, \zeta; t_6) &= \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{10})}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta_1 - \zeta)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \\ \psi_7(r, \phi, \zeta; t_7) &= \frac{(r - r_0)}{(r_1 - r_0)} \frac{(\phi - \phi_{10})}{(\phi_{11} - \phi_{10})} \frac{(\zeta - \zeta_0)}{(\zeta_1 - \zeta_0)} \end{aligned} \quad (72)$$

## C 3次 Spline 曲線上の最短点の導出

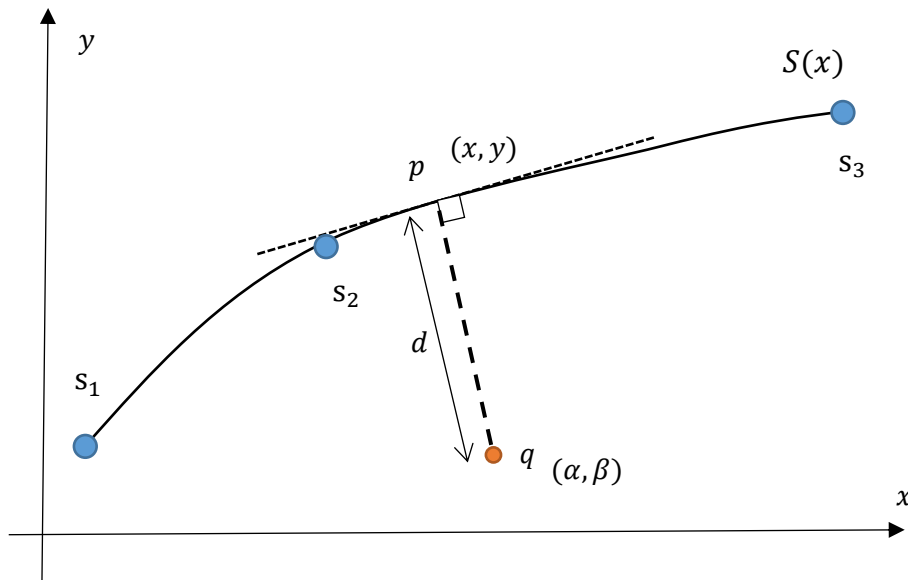


図 40 3次 Spline 曲線上の最短点の導出:  $S(x)$  は 3次 Spline 曲線を表し、 $s_i$  は節点を表す。任意の点  $q$  から 3次 Spline 曲線の接線に直交する点  $p$  が最短点となる。 $d$  は点  $q$  から曲線上の点  $p$  までの距離を表す。

3次 Spline 曲線の最短点はニュートン法により求める。ニュートン法は、方程式を漸化式の反復処理により求める手法である。3次 Spline 曲線を  $y = S(x)$  とすると、点  $q$  から曲線上の点  $p$  までの距離  $d$  は下記のように書ける。

$$d = \sqrt{(x - \alpha)^2 + (y - \beta)^2} = \sqrt{(x - \alpha)^2 + (S(x) - \beta)^2} \quad (73)$$

点  $(\alpha, \beta)$  から曲線上の最も近い点（最短点）は、 $d$  の長さが最小になる点である。そこで、 $d$  を  $x$  の関数とし、 $d(x)$  が最小となる  $x$  を求めるための漸化式を導出する。 $d(x)$  が最小となるとき  $d(x)^2$  も最小となるので、 $D(x) = d(x)^2$  とすると、

$$D(x) = (x - \alpha)^2 + (S(x) - \beta)^2 \quad (74)$$

のようになる。この  $D(x)$  に関して最小化を行う。 $D(x)$  を  $x_n$  のまわりで2次の項までテーラー展開すると、

$$D(x) \approx D(x_n) + D'(x_n)(x - x_n) + \frac{1}{2}D''(x_n)(x - x_n)^2 \quad (75)$$

のように書ける。 $D(x)$  の最小値は  $D'(x) = 0$  が成り立つので、式 (75) を  $x$  に関して微分すると、

$$D'(x_n) + D''(x_n)(x - x_n) = 0 \quad (76)$$

のようになる。式 (76) から  $x$  の更新式は、

$$x_{n+1} = x_n - \frac{D'(x_n)}{D''(x_n)} \quad (77)$$

のようになる。式 (74) から  $D(x)$  の一次微分  $D'(x)$  と二次微分  $D''(x)$  は、

$$D'(x) = 2(x - \alpha) + 2(S(x) - \beta)S'(x) \quad (78)$$

$$D''(x) = 2 + 2S'(x)^2 + 2(S(x) - \beta)S''(x) \quad (79)$$

のように書ける。式 (77) に式 (78) と式 (79) を代入すると更新式は、

$$x_{n+1} = x_n - \frac{D'(x_n)}{D''(x_n)} = x_n - \frac{(x_n - \alpha) + (S(x_n) - \beta)S'(x_n)}{1 + S'(x_n)^2 + (S(x_n) - \beta)S''(x_n)} \quad (80)$$

のようになる。ここで、 $S'(x_n)$  と  $S''(x_n)$  に関しては、節点  $j$  から  $j+1$  までの区間の 3 次 Spline 曲線を  $S_j(x)$  とすると、一次微分  $S'_j(x_n)$  と二次微分  $S''_j(x_n)$  は、

$$\begin{aligned} S_j(x) &= a_j + b_j(x - x_j) + c_j(x - x_j)^2 + d_j(x - x_j)^3 \\ S'_j(x_n) &= b_j + 2c_j(x - x_j) + 3d_j(x - x_j)^2 \\ S''_j(x_n) &= 2c_j + 6d_j(x - x_j) \end{aligned} \tag{81}$$

のように書ける。式 (81) を式 (80) に代入して、 $x_{n+1}$  を更新する。最終的に得られた最短点  $(x^*, y^*)$  から、図 9 の  $\xi$  は  $\sqrt{(x^* - \alpha)^2 + (y^* - \beta)^2}$  と求められ、 $\zeta$  は点  $s_1$  から点  $p$  まで距離として求める。点  $s_1$  から点  $p$  まで距離は、区間をいくつか分割し、分割した点までの直線距離の和で計算する。

## D サブユニット空間への変換

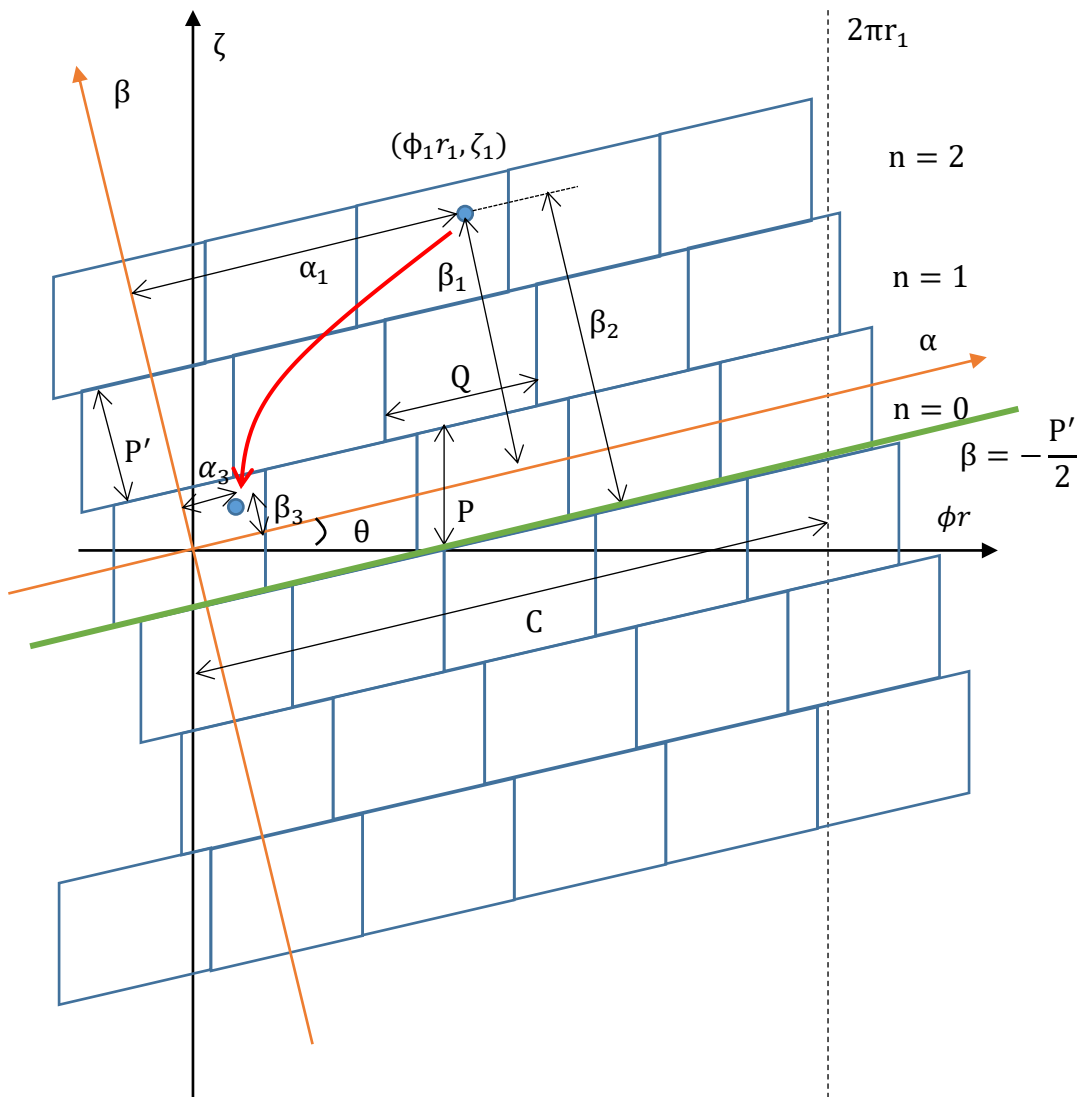


図 41  $\beta_1 \geq -\frac{P'}{2}$  のときのサブユニット空間への変換

3次元空間上の点からサブユニット空間への変換について述べる。変換はサブユニットを3次元空間上に敷き詰めたとき、求めたい点がどのサブユニットに含まれるかを計算し、そこからサブユニット空間上の座標位置を求める。はじめに、円筒座標系の3次元空

間上の点を  $(r_1, \phi_1, \zeta_1)$  とし、 $r = r_1$  の円周上の空間を  $\phi r, \zeta$  空間として図 41 のように定義する。さらに、らせんパラメータ  $\Delta\phi$  と  $\Delta\zeta$  によって決まる空間を  $\alpha, \beta$  と定義する。点  $(r_1, \phi_1, \zeta_1)$  の  $\phi r, \zeta$  空間から  $\alpha, \beta$  空間への写像は、

$$\begin{bmatrix} \alpha_1 \\ \beta_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & \sin \theta \\ -\sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 r_1 \\ \zeta_1 \end{bmatrix} \quad (82)$$

のように書ける。ここで、 $\theta$  は  $\theta = \tan^{-1} \frac{\Delta\zeta}{\Delta\phi r_1}$  とする。pitch  $P$  はらせんパラメータの性質より、

$$P = 2\pi \frac{\Delta\zeta}{\Delta\phi} \quad (83)$$

のように書ける。さらに、図中の  $P'$ 、 $C$ 、 $Q$  は  $P' = P \cos \theta$ 、 $C = \frac{2\pi r_1}{\cos \theta}$ 、 $Q = \sqrt{(\Delta\phi r_1)^2 + \Delta\zeta}$  と書ける。以降では、 $\beta_1$  に関して場合分けをして、それぞれの変換式を求める。

(1)  $\beta_1 \geq -\frac{P'}{2}$  のとき

サブユニット内の  $\alpha, \beta$  空間の  $\beta_3$  は以下のように計算される。

$$\beta_3 = \beta_2 - nP' - \frac{P'}{2} \quad (84)$$

$$\beta_2 = \beta_1 + \frac{P'}{2} \quad (85)$$

$$n = \left\lfloor \frac{\beta_2}{P'} \right\rfloor \quad (86)$$

このとき  $[x]$  は、 $x$  以下の最大の整数を表す。さらに、サブユニット内の  $\alpha, \beta$  空間の  $\alpha_3$  は以下のように計算される。

$$\alpha_3 = \alpha_2 - mQ - \frac{Q}{2} + \beta_3 \tan \theta \quad (87)$$

$$\alpha_2 = nC + \alpha_1 - \beta_1 \tan \theta + \frac{Q}{2} \quad (88)$$

$$m = \left\lfloor \frac{\alpha_2}{Q} \right\rfloor \quad (89)$$

$\alpha_3, \beta_3$  を、 $\alpha, \beta$  空間から  $\phi, \zeta$  空間へ変換すると以下のようなになる。

$$\begin{bmatrix} \phi_1' r_1 \\ \zeta_1' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \alpha_3 \\ \beta_3 \end{bmatrix} \quad (90)$$



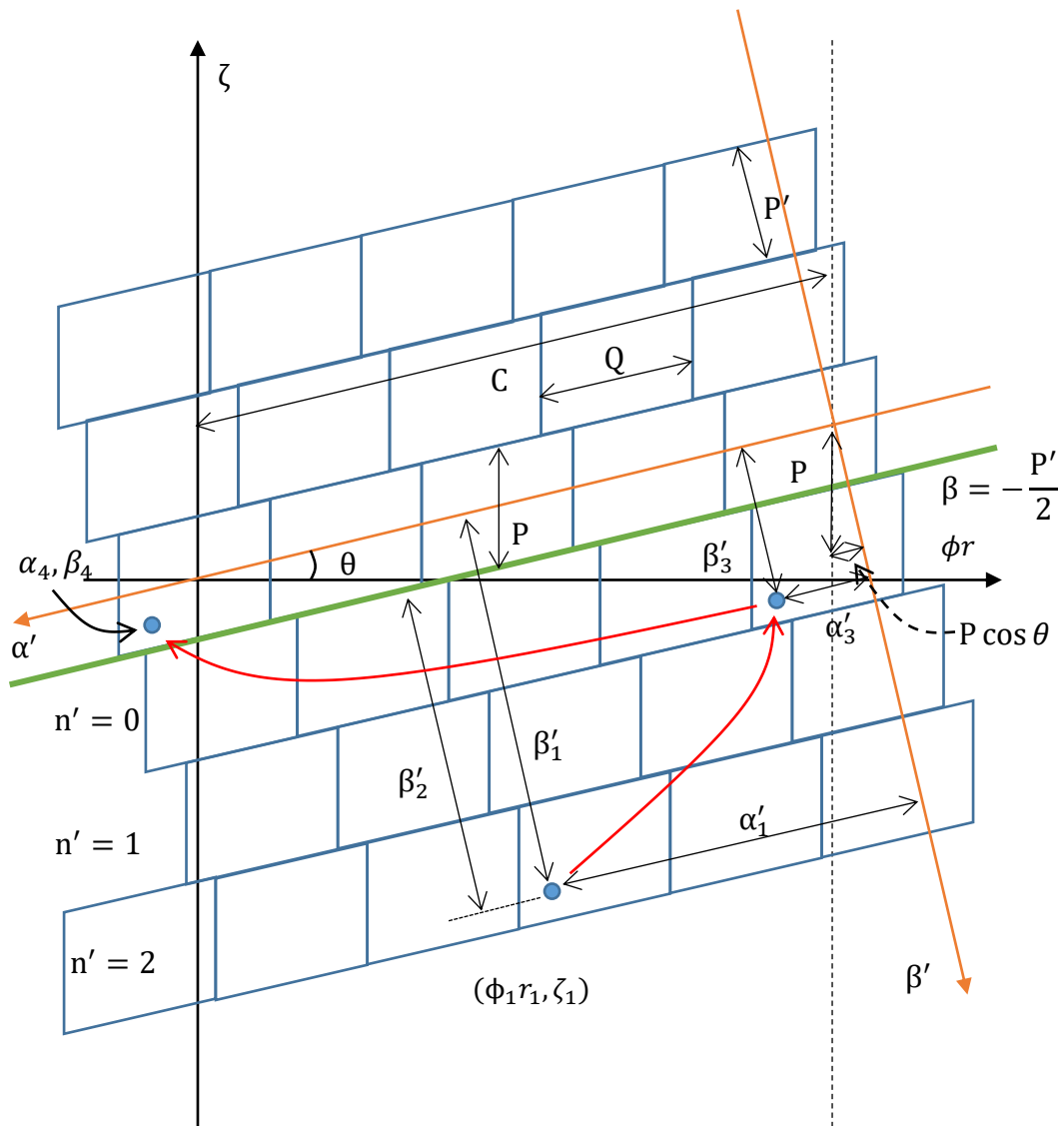


図 42  $\beta_1 < -\frac{P'}{2}$  のときのサブユニット空間への変換

(2)  $\beta_1 < -\frac{P'}{2}$  のとき

サブユニット内の  $\alpha, \beta$  空間の  $\beta'_3$  は以下のように計算される。

$$\beta'_3 = \beta'_2 - n'P' + \frac{P'}{2} \quad (91)$$

$$\beta'_2 = \beta'_1 - \frac{P'}{2} \quad (92)$$

$$\beta'_1 = -\beta_1 \quad (93)$$

$$n' = \left[ \frac{\beta'_2}{P'} \right] \quad (94)$$

サブユニット内の  $\alpha, \beta$  空間の  $\alpha'_3$  は以下のように計算される。

$$\alpha'_3 = \alpha'_2 - m'Q - \frac{Q}{2} + \beta'_1 \tan \theta \quad (95)$$

$$\alpha'_2 = n'C + \alpha'_1 - \beta'_1 \tan \theta + \frac{Q}{2} \quad (96)$$

$$\alpha'_1 = C - \alpha_1 \quad (97)$$

$$m' = \left[ \frac{\alpha'_2}{Q} \right] \quad (98)$$

$\alpha'_3, \beta'_3$  から  $\alpha_4, \beta_4$  への変換は以下のように書ける。

$$\alpha_4 = -(\alpha'_3 - P \cos \theta) \quad (99)$$

$$\beta_4 = -(\beta'_3 - P') \quad (100)$$

$\alpha_4, \beta_4$  を、 $\alpha, \beta$  空間から  $\phi r, \zeta$  空間へ変換すると以下のようなになる。

$$\begin{bmatrix} \phi'_1 r_1 \\ \zeta'_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \alpha_4 \\ \beta_4 \end{bmatrix} \quad (101)$$

## E 下界の勾配の導出

下界  $F(q(z; \tau), \theta)$  は、

$$F(q(z; \tau), \theta) = \sum_{i=1}^M \int q(z_i; \tau_i) \log p(y_i | z_i, \theta) dz_i + \int q(z_i; \tau_i) \log p(z_i) dz_i - \int q(z_i; \tau_i) \log q(z_i; \tau_i) dz_i + \log p(\theta) \quad (102)$$

のように書ける。下界を  $i$  番目の観測画像の任意の確率分布のパラメータ  $\tau_i$  で偏微分すると、下界の勾配は、

$$\begin{aligned} & \frac{\partial F(q(z; \tau), \theta)}{\partial \tau_i} \\ &= \int q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \log p(y_i | z_i, \theta) dz_i + \int q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \log p(z_i) dz_i \\ & \quad - \int q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \log q(z_i; \tau_i) dz_i - \int \frac{\partial}{\partial \tau_i} q(z_i; \tau_i) dz_i \quad (103) \\ &= \int q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \log p(y_i | z_i, \theta) dz_i + \int q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \log p(z_i) dz_i \\ & \quad - \int q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \log q(z_i; \tau_i) dz_i \end{aligned}$$

のようになる。ここで、以下の関係を使用した。

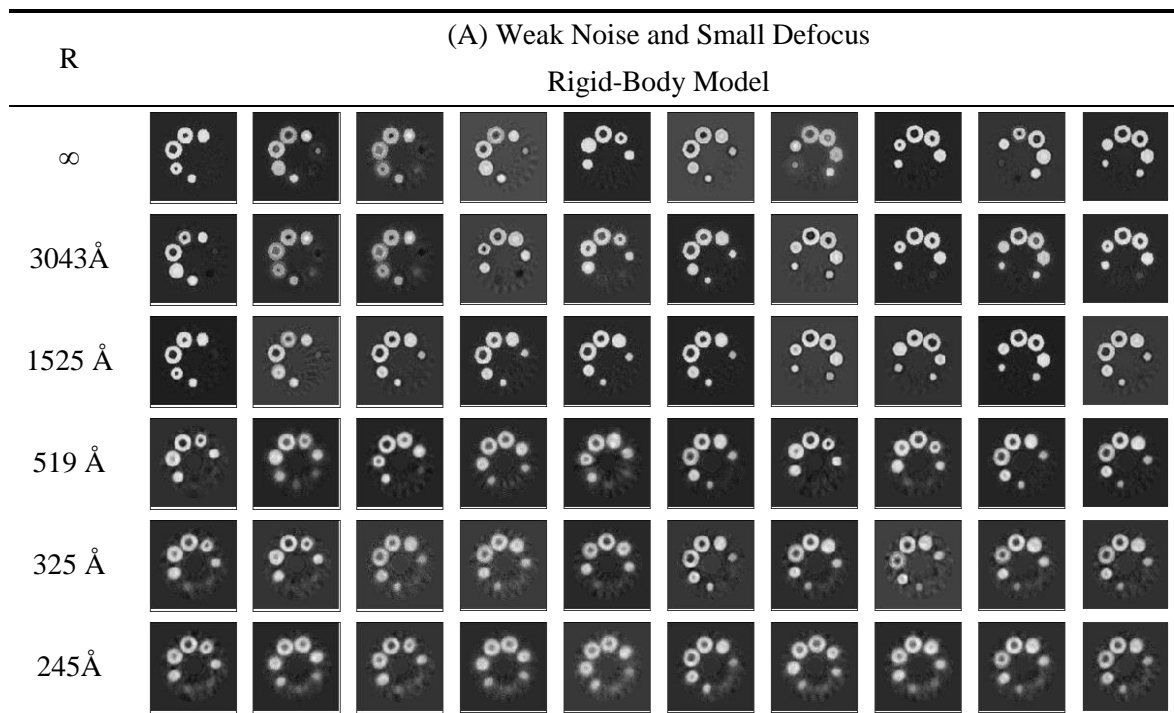
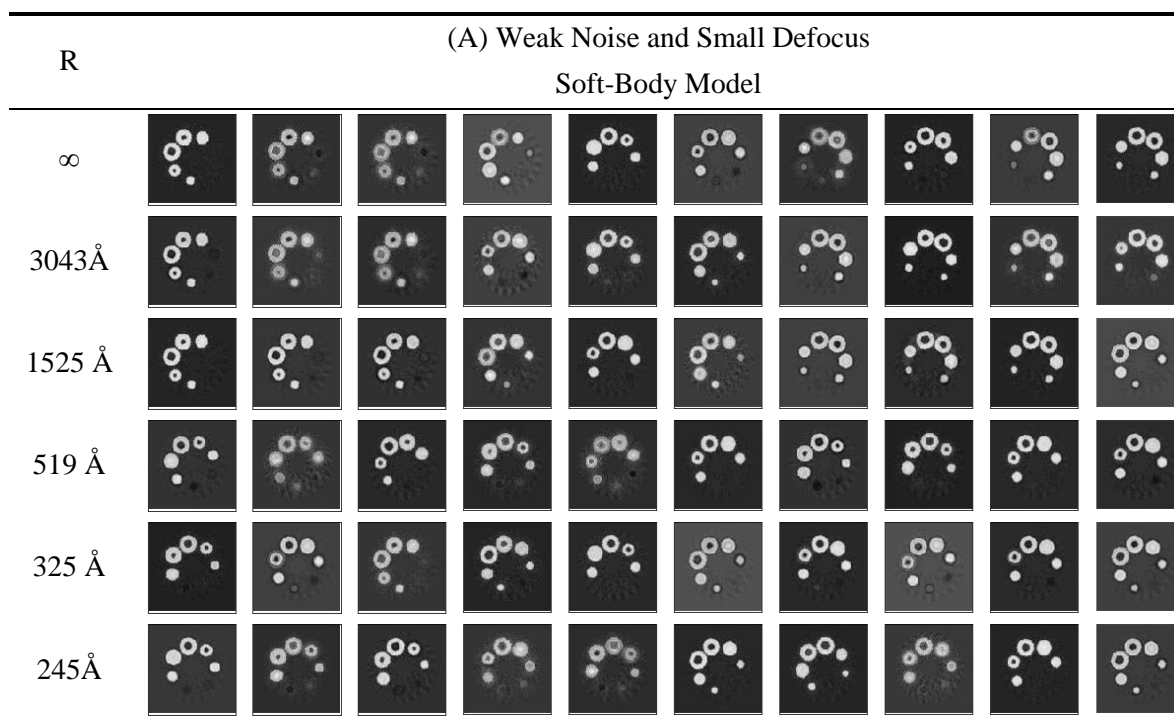
$$\int \frac{\partial}{\partial \tau_i} q(z_i; \tau_i) dz_i = \frac{\partial}{\partial \tau_i} \int q(z_i; \tau_i) dz_i = 0 \quad (104)$$

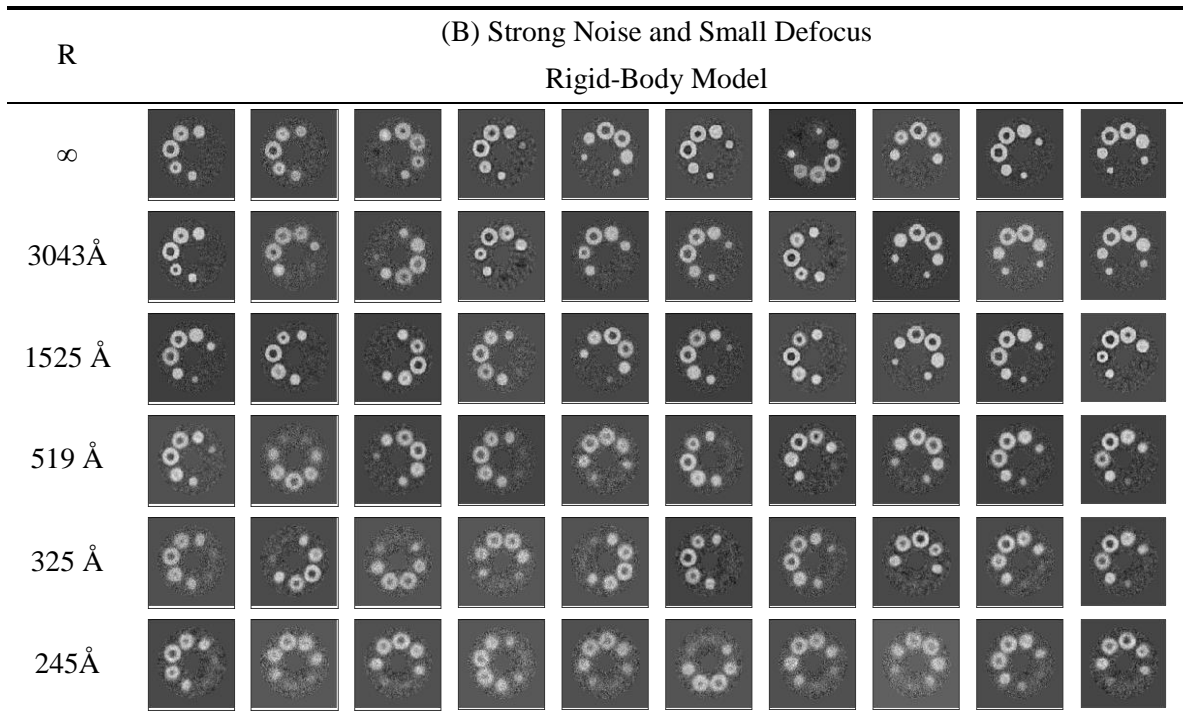
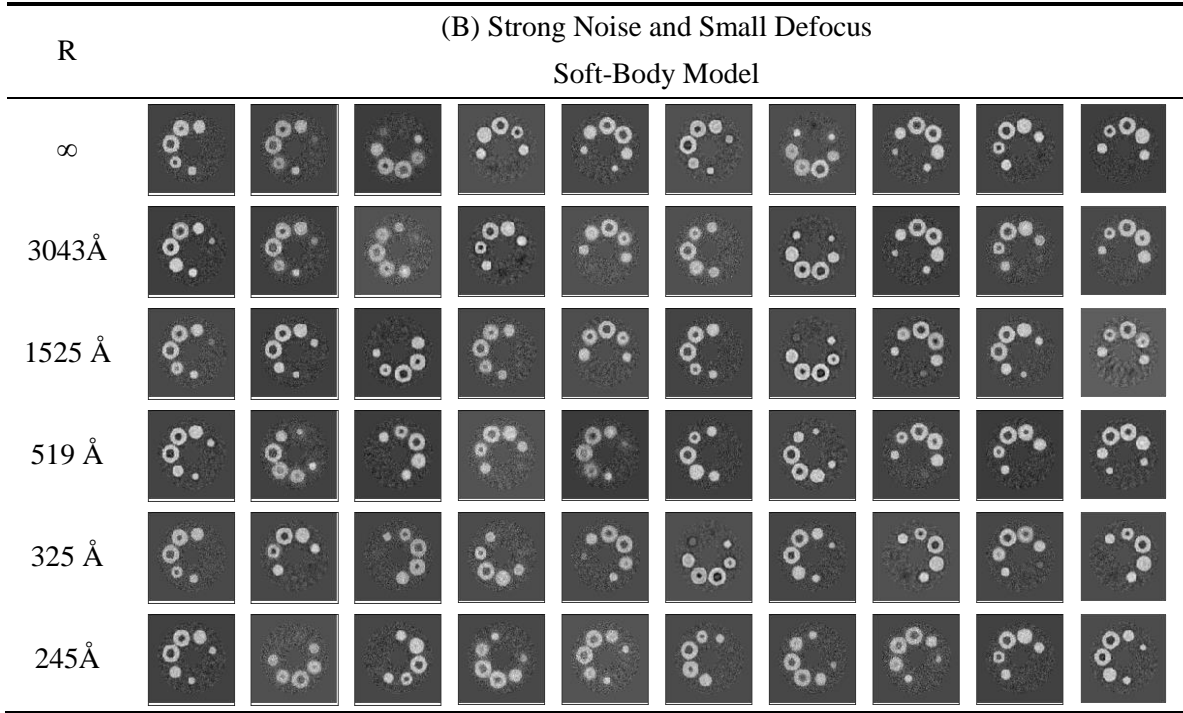
$$\frac{\partial q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} = q(z_i; \tau_i) \frac{\partial \log q(z_i; \tau_i)}{\partial \tau_i} \quad (105)$$

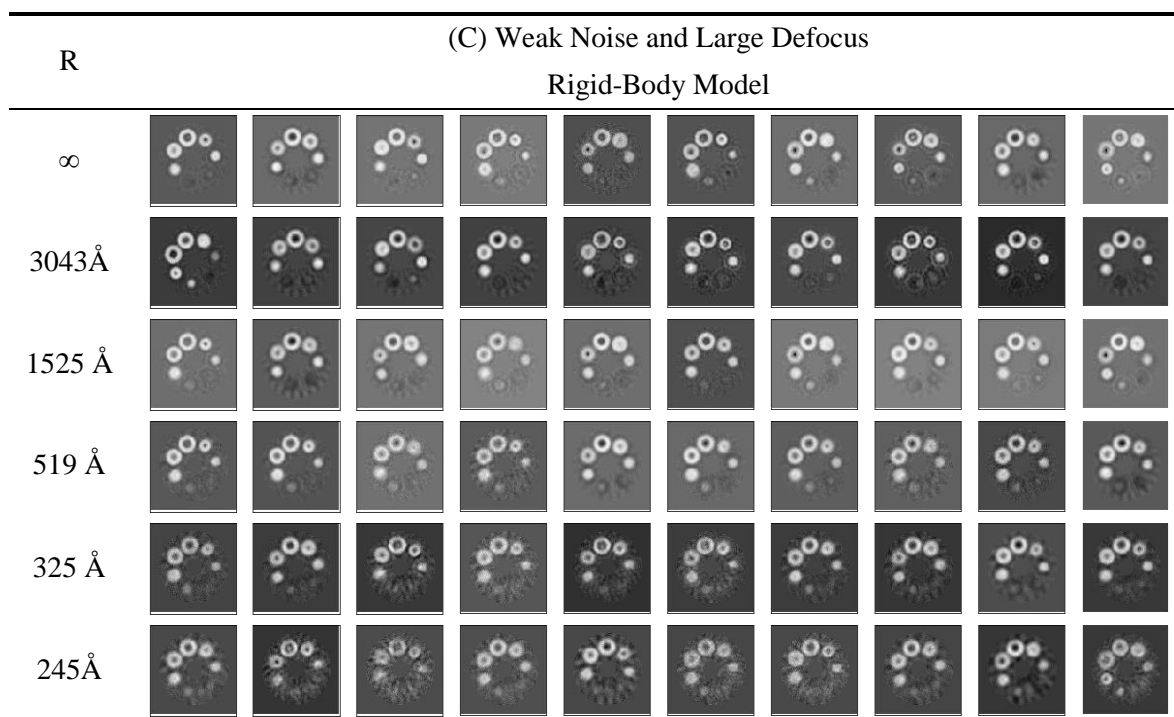
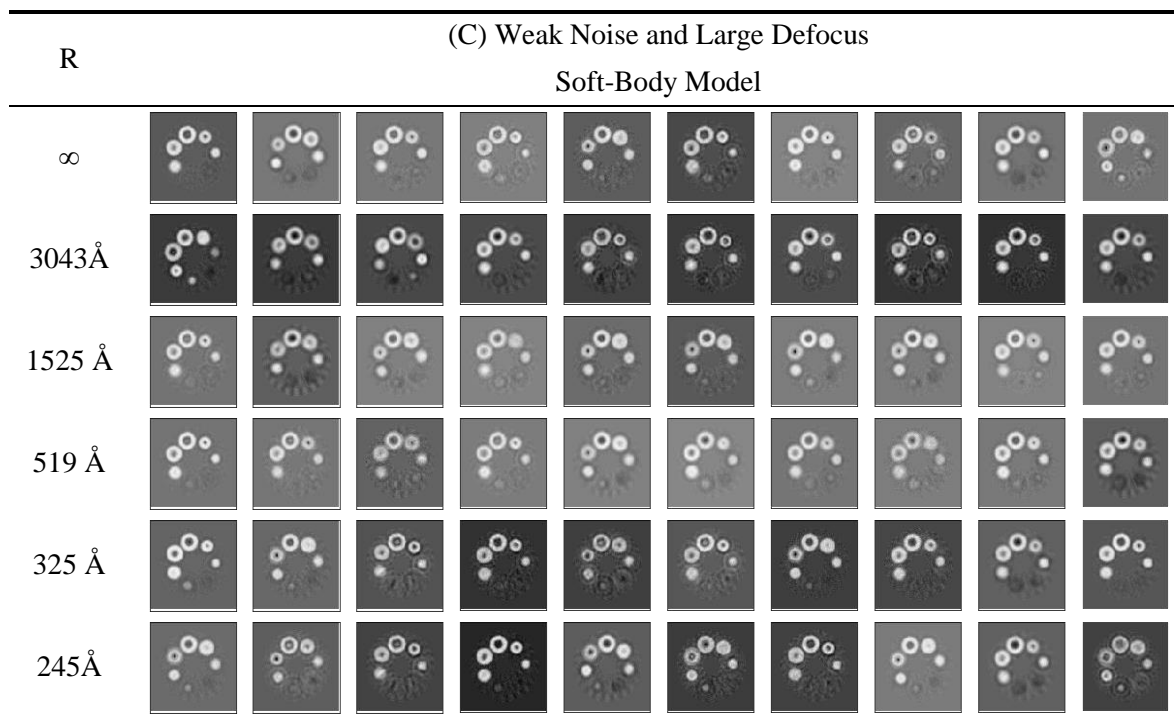
## F 人工らせんデータセットによる評価結果

人工データを使った評価で得られた推定3次元構造の全断面図を示す。評価は条件毎に10回行った。さらに、ゼロ平均一様分布より生成したデータセットと、非ゼロ平均一様分布より生成したデータセットの2つのデータセットで評価を行った。

ゼロ平均一様分布より生成したデータセットを用いた結果







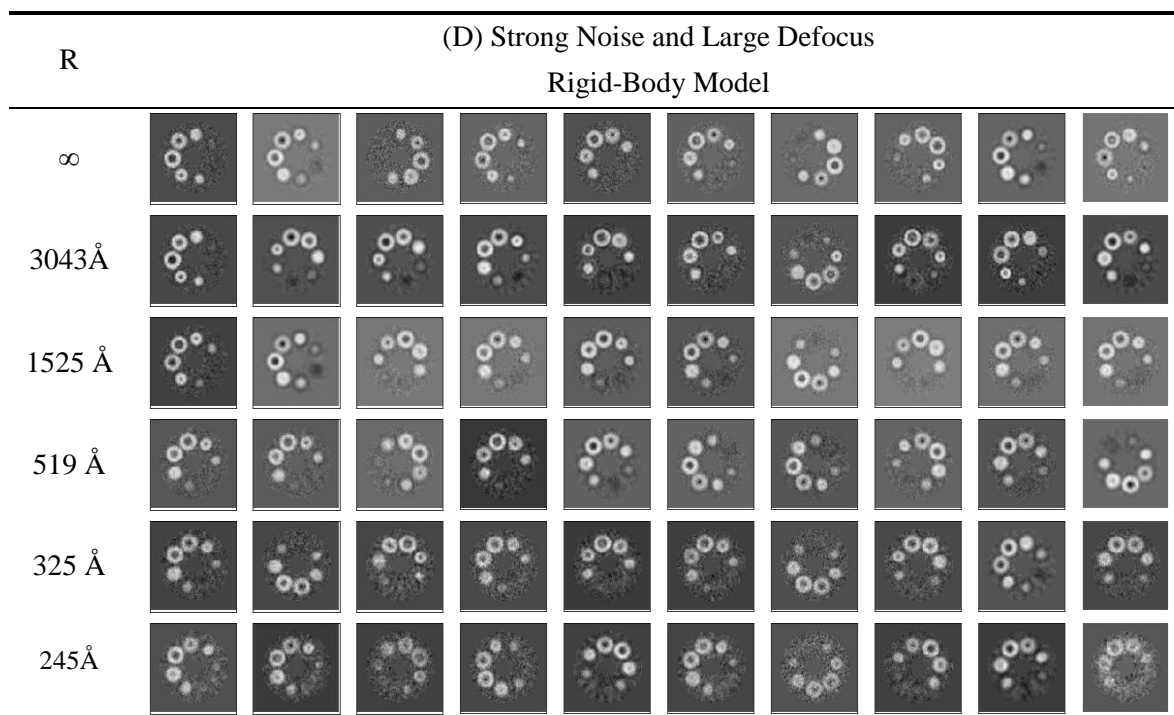
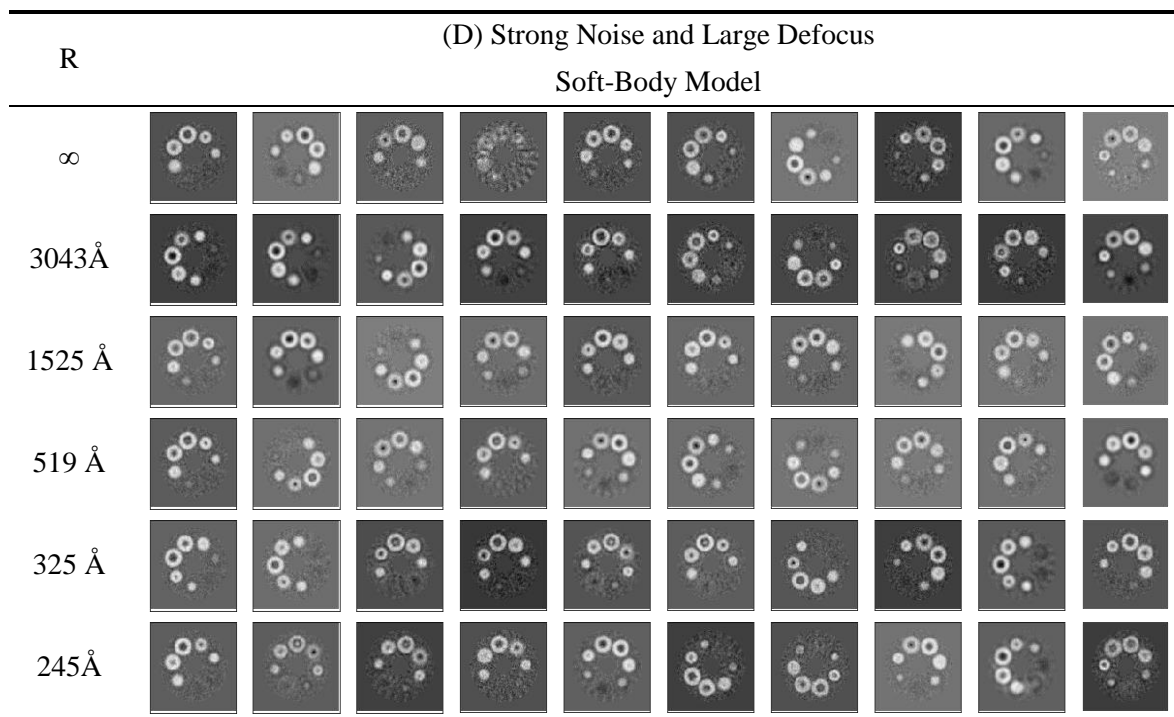
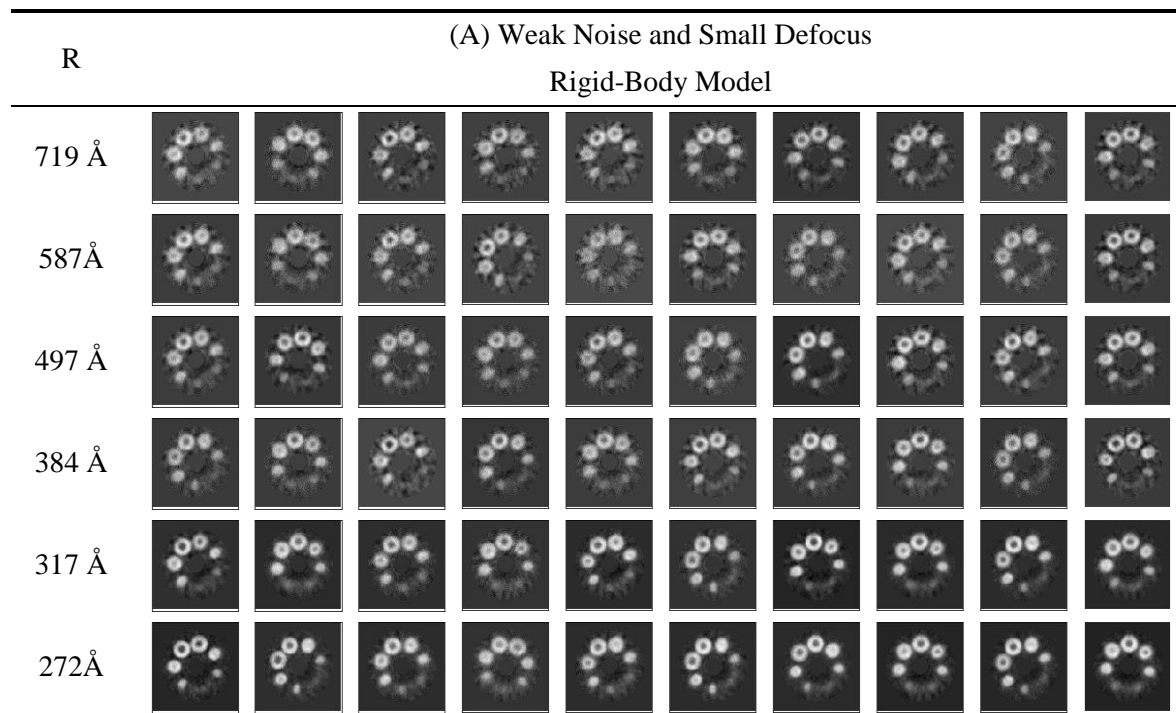
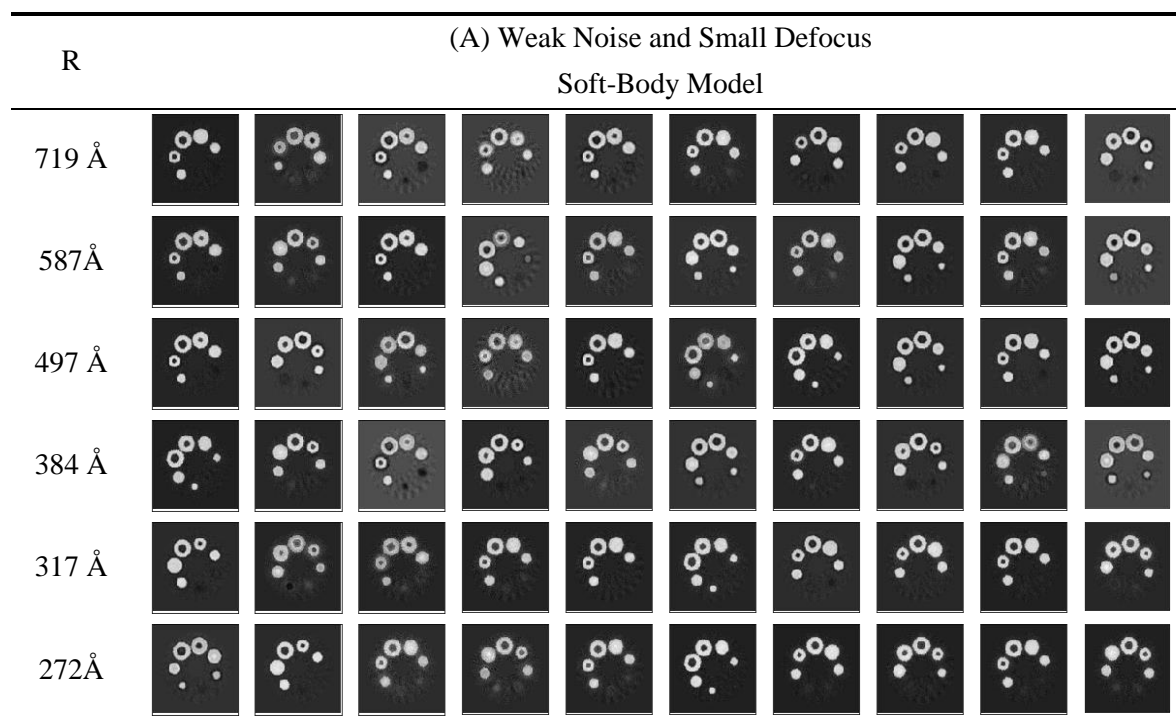
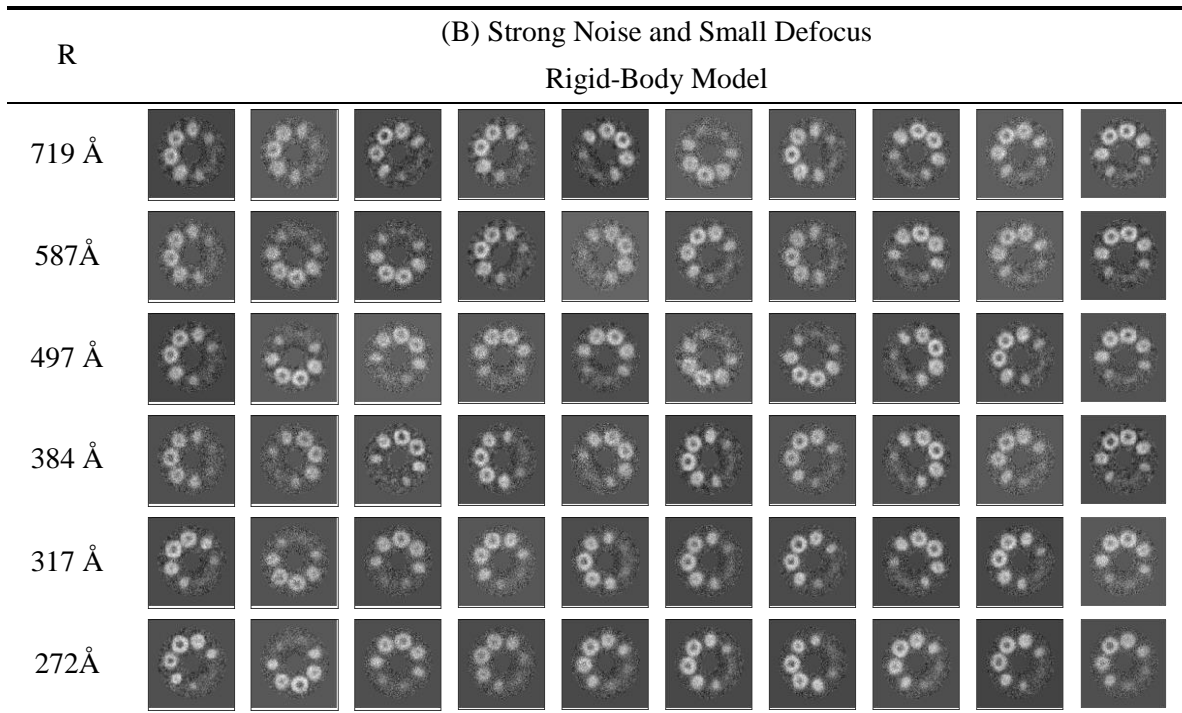
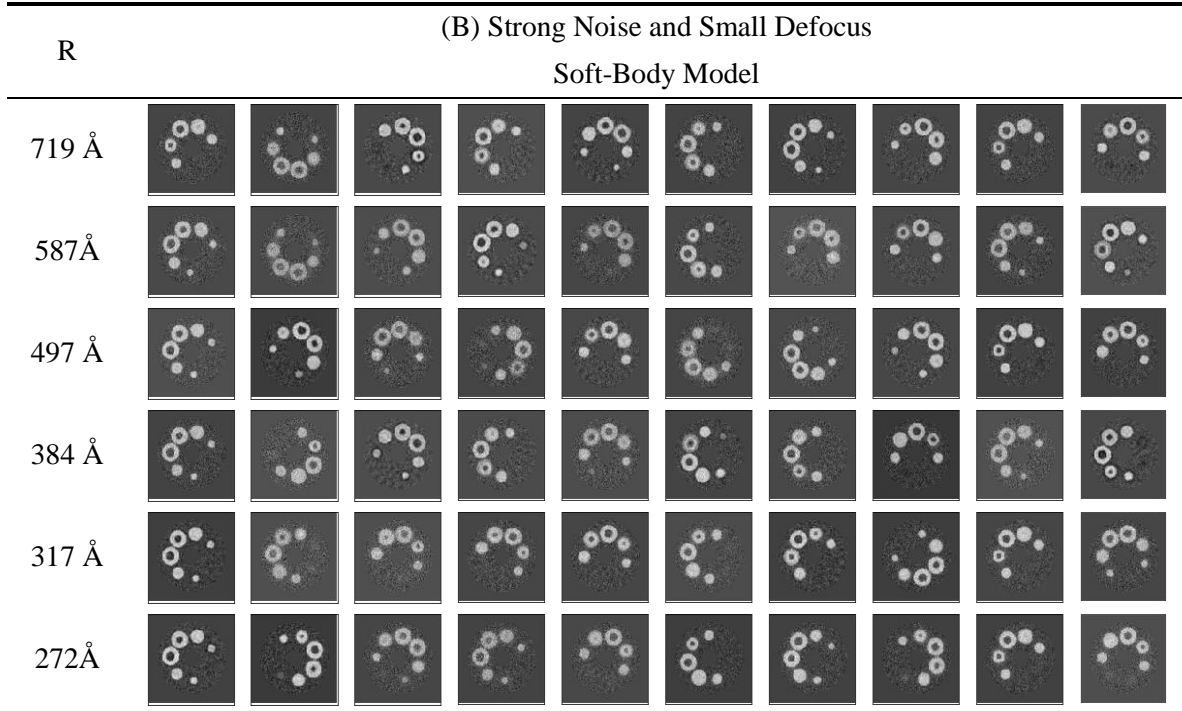


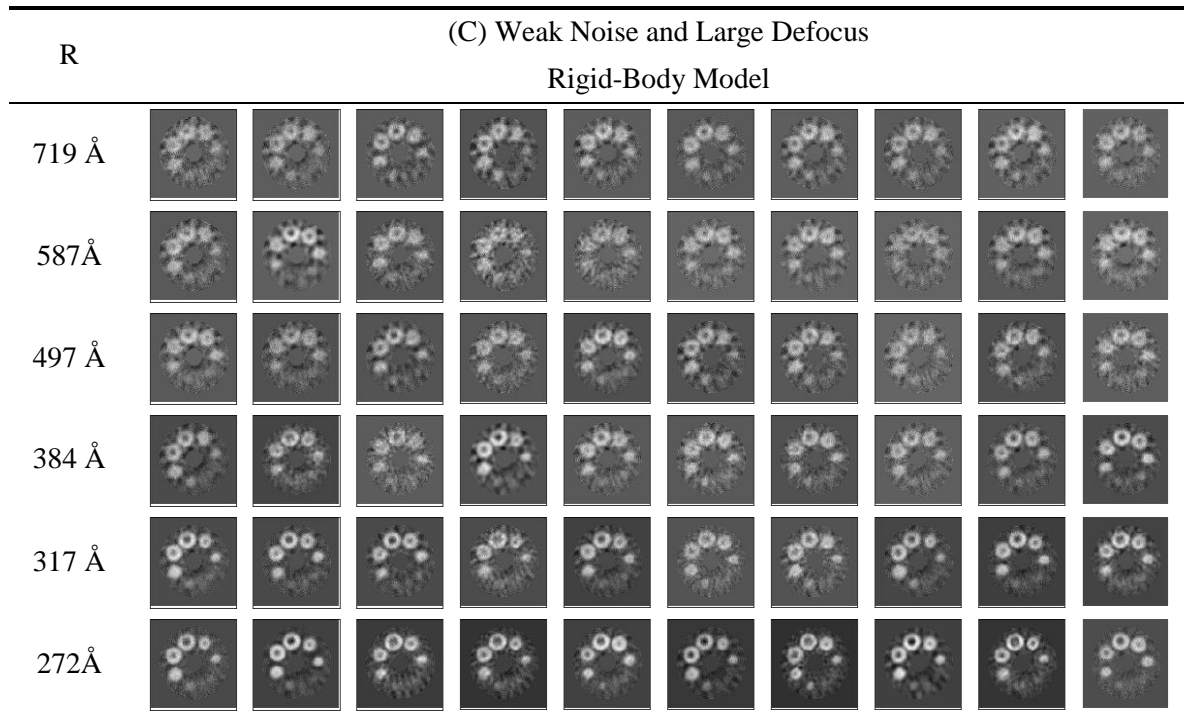
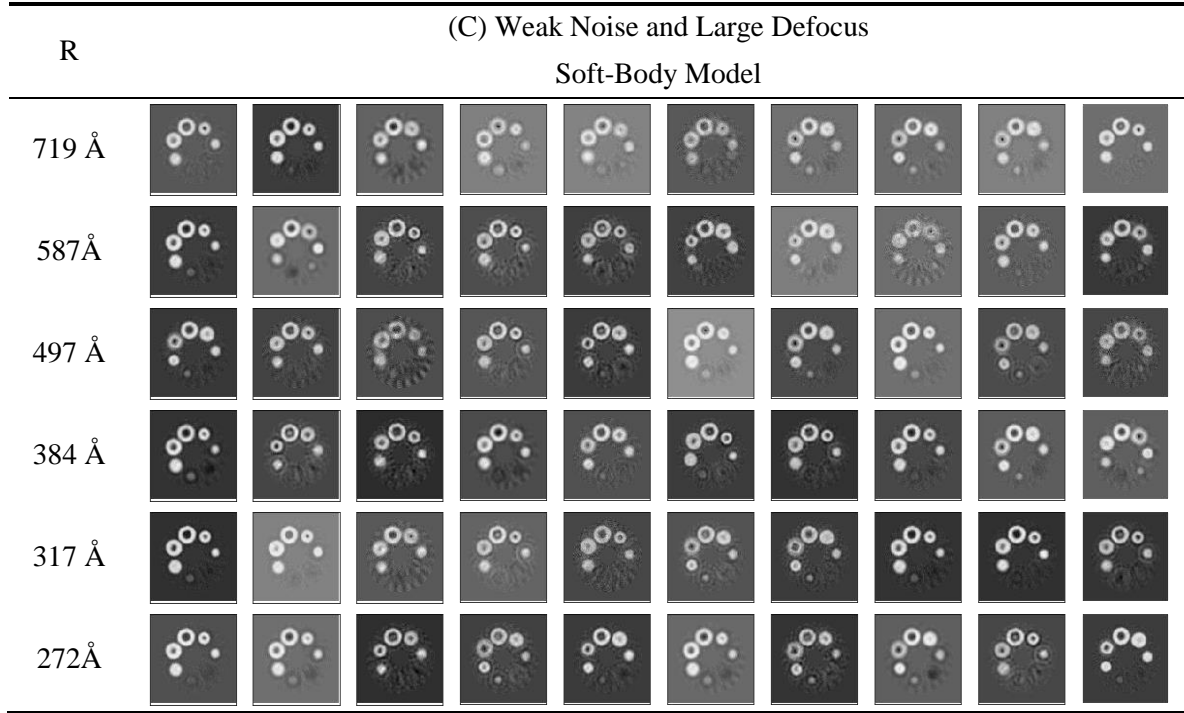
図 43 ゼロ平均データセットを使った Soft-Body Model と Rigid-Body Model による全推定 3 次元構造の断面図: R は曲率半径を表す。条件 A、B、C、D は図 13 の Caption を参照のこと。評価は各条件で 10 回実施した。



非ゼロ平均一様分布より生成したデータセットを用いた結果







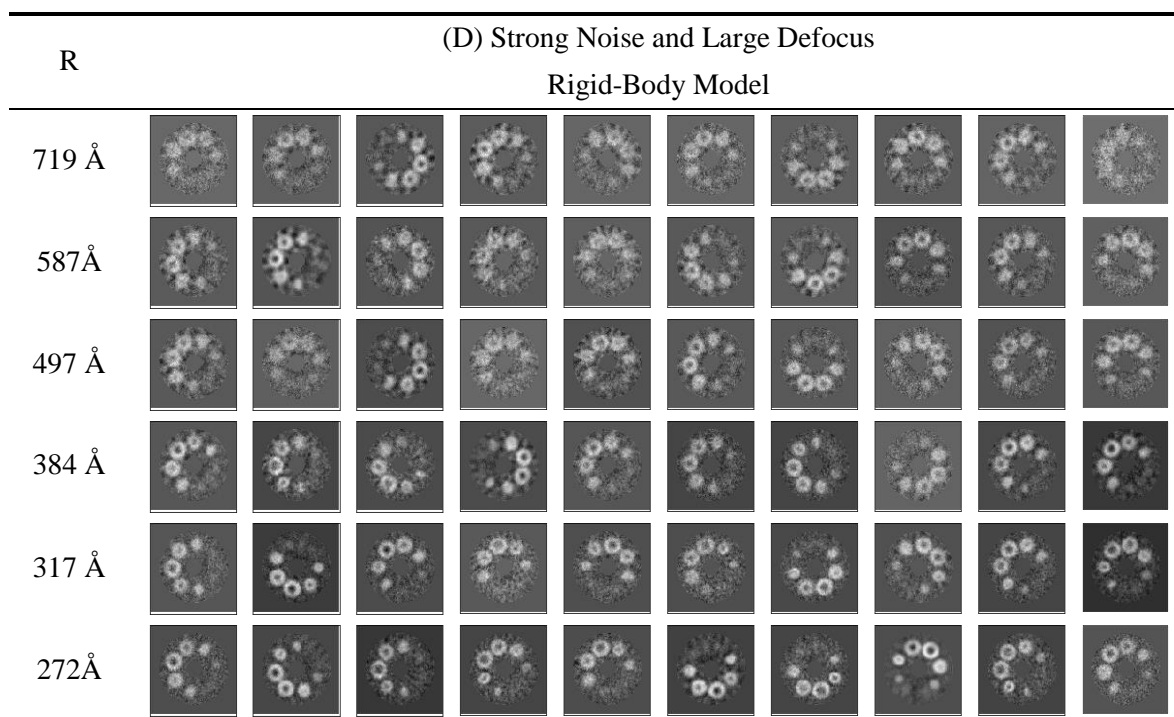
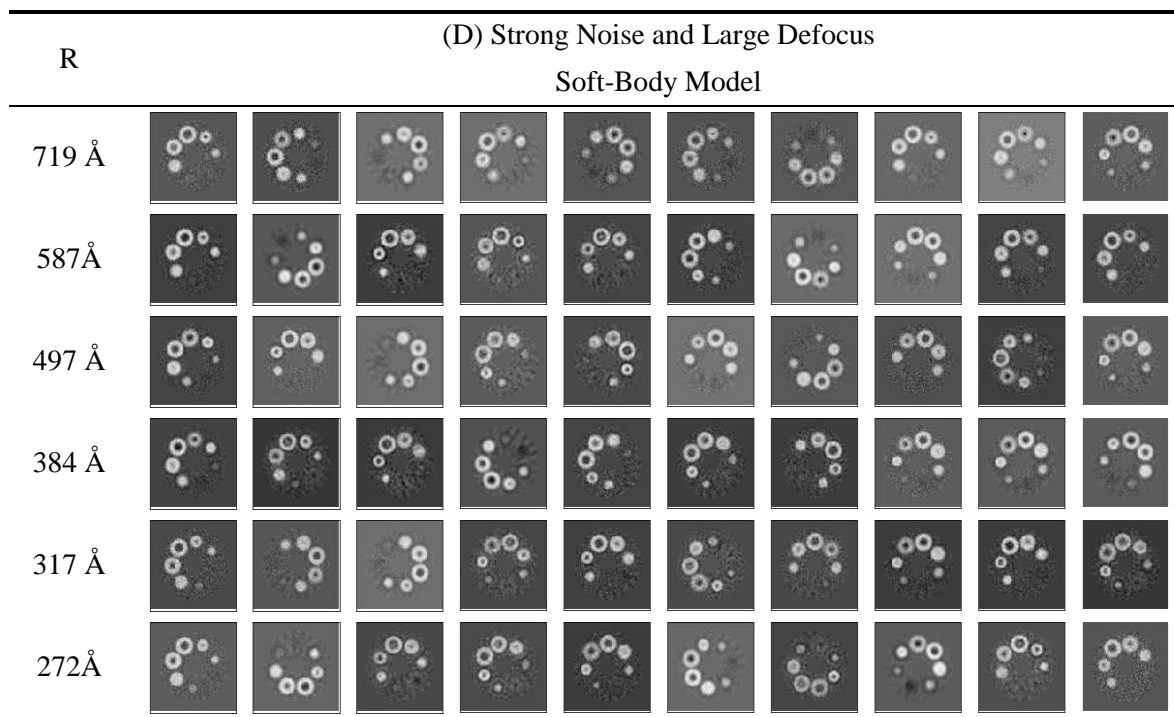


図 44 非ゼロ平均データセットを使った Soft-Body Model と Rigid-Body Model による全推定 3 次元構造の断面  
 図: R は曲率半径を表す。条件 A、B、C、D は図 13 の Caption を参照のこと。評価は各条件で 10 回実施した。