



# KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

---

VOL.3 2022年4月～2022年9月

# KEKクライオ電子顕微鏡

名称 : Talos Arctica G2  
 加速電圧 : 200kV  
 電子銃 : XFEG  
 ステージ : AutoGrid挿入型サイドエントリーステージ  
 位相板 : Volta Phase Plate  
 旧検出器 : Falcon 3EC  
 (\*92k=1.13Å/px, 120k=0.88Å/px, 150k=0.69Å/px)  
 検出器1 : Falcon 4  
 (\*92k=1.08Å/px, 120k=0.84Å/px, 150k=0.66Å/px)  
 検出器2 : Ceta 16M  
 制御ソフト : EPU, EPU-D



## グリッド凍結装置

名称 : Vitrobot Mark IV

## 親水化装置

名称 : PIB-10

電流値 : soft mode = ~7mA, hard mode = ~11mA



KEKクライオ電子顕微鏡施設は以下3点をミッションとして、Thermo Fisher Scientific社の200kVクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica G2 (Falcon 4) を運用しています。

1. アカデミア/企業ユーザーへのマシンタイム提供 (年間200日以上)
2. グリッド凍結/データ測定の支援 (必要に応じた単粒子解析支援)
3. クライオ電顕を用いた実験に関する技術導入の支援

## ➤ 1週間の流れ

月:メンテナンス  
 火:1日枠 (スクリーニング&本測定 800-3,000枚)  
 水:1日枠 (スクリーニング&本測定 800-3,000枚)  
 木:1日枠 (スクリーニング&本測定 800-3,000枚)  
 金土日:3日枠 (スクリーニング&本測定 3,000-10,000枚)

## ➤ 当日の持ち物

サンプル  
 希釈用buffer  
 4~8TBのHDD

## ➤ 1日の流れ

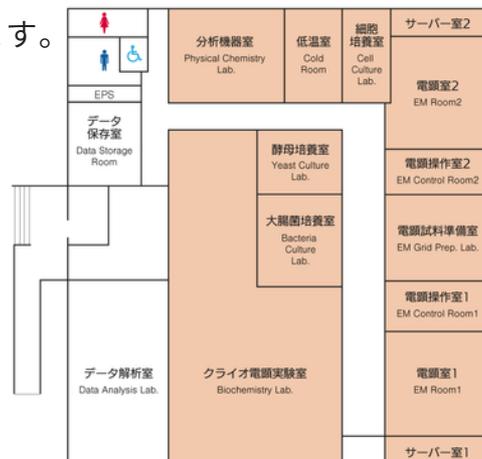
9:30 集合・Grid-prepに関する打ち合わせ  
 9:45 実験開始  
 午前 グリッド凍結 (6枚以内)  
 午後 スクリーニング測定 (1枚あたり約1時間)  
 18:00頃~ overnight/over weekendの測定開始  
 解散  
 翌日以降 KEKスタッフがデータをコピーして返送

# KEKクライオ電顕実験棟を新設しました！

新設されたばかりの、クライオ電顕実験棟をご紹介します。



オレンジとブルーが目印の建物です！



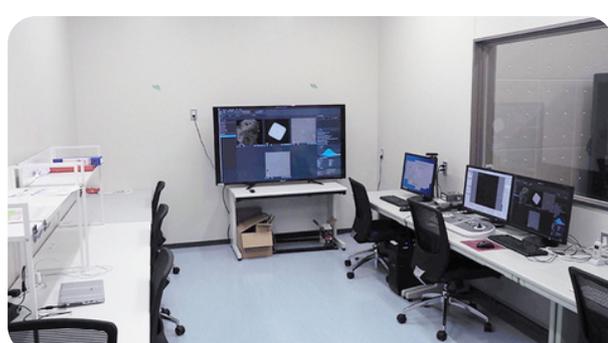
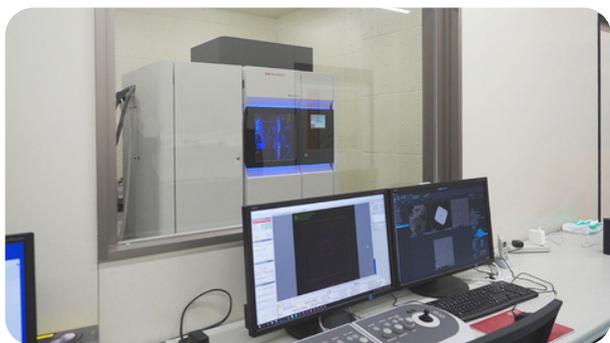
## 電顕室1 -EM Room 1-

Thermo Fisher Scientific社製200kVクライオ電顕Talos Arctica（検出器：Falcon4）が設置されています。年間を通して、温度22度、湿度40%以下で維持されています。



## 電顕操作室1 -EM Control Room 1-

Talos Arcticaの操作PCが設置されています。ユーザー数名とスタッフ数名で測定を行うのに十分な広さがあります。



## クライオ電顕実験室 -Biochemistry Lab.-

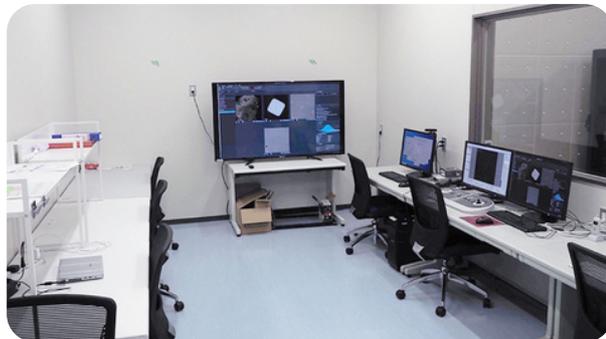
遺伝子組換え実験、蛋白精製、生化学実験などを行う実験室です。

最大20名が実験可能です。



### 電顕試料準備室 -EM Grid Prep. Lab.-

グリッドの凍結を行う部屋です。Vitrobotが2台、親水化装置PIB-10が1台、設置されています。年間を通して、温度20度、湿度40%以下で維持されています。



### 電顕室2 -EM Room 2-

Thermo Fisher Scientific社製300kVクライオ電顕Titan Krios G4（検出器：Falcon4i、エネルギーフィルター：Selectris-X、電子銃：XFEG）が搬入されました。年間を通して、温度22度、湿度40%以下で維持されています。



### 電顕操作室2 -EM Control Room 2-

Titan Krios G4の操作PCが設置されています。ユーザー数名とスタッフ数名で測定を行うのに十分な広さがあります。



### Titan Kriosの搬入を少しだけご紹介！

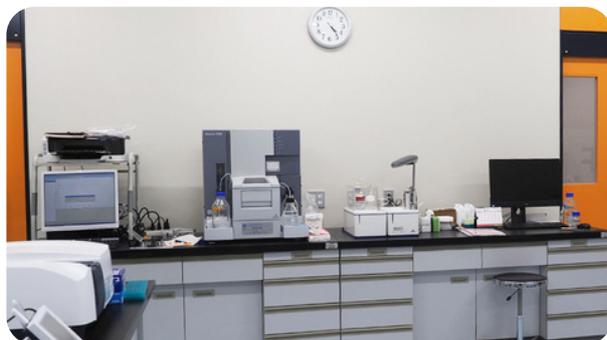


他にもWet実験を行う実験室があります。

**大腸菌培養室 -Bacteria Culture Lab.-**



**分析機器室 -Physical Chemistry Lab.-**



**酵母培養室 -Yeast Culture Lab.-**



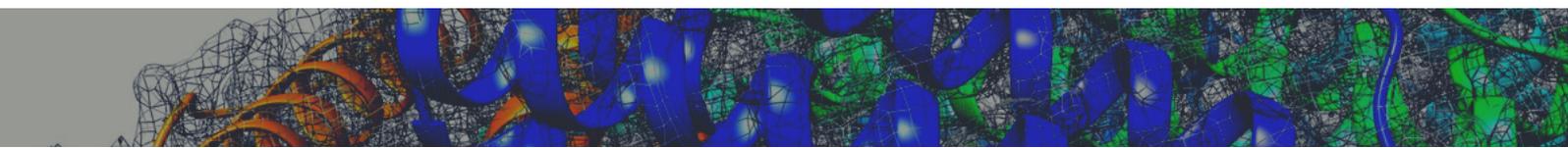
**細胞培養室 -Cell Culture Lab.-**



**低温室 -Cold Room-**



**データ解析室-Data Analysis Lab.-**

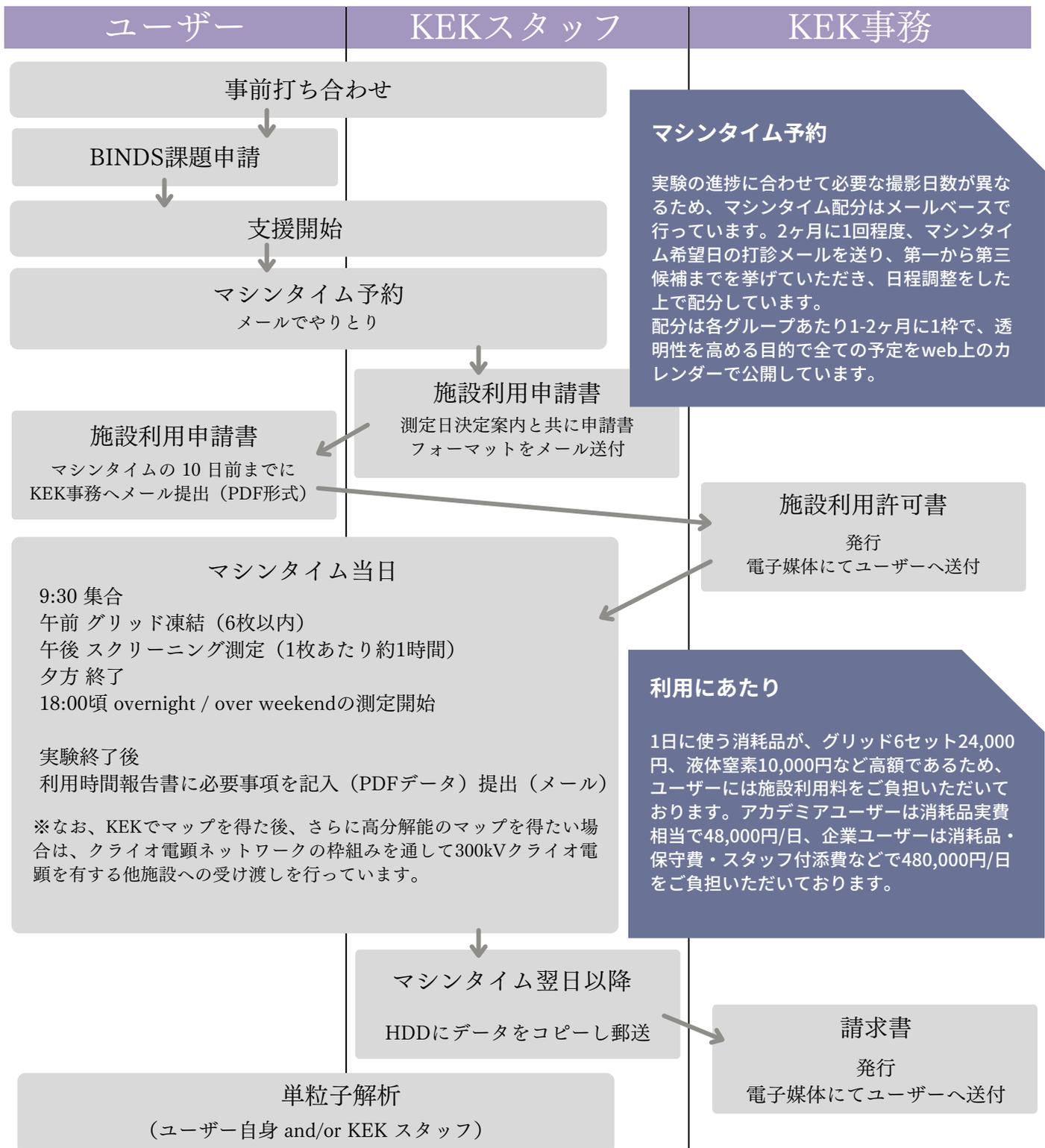


# KEKクライオ電顕利用の流れ

KEKクライオ電顕の利用は、アカデミアユーザーはBINDS経由で、企業ユーザーは共同研究契約・学術指導契約などの枠組みで可能です。

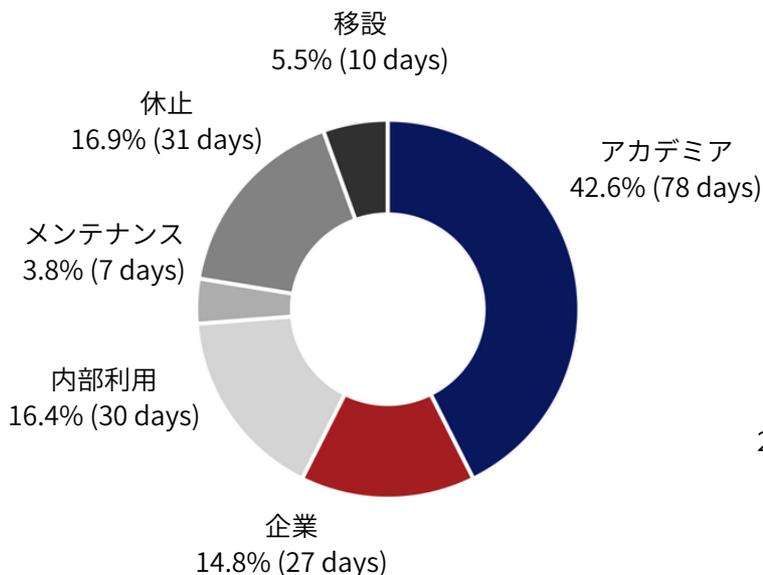
アカデミアユーザーの初回利用までの流れは「事前打ち合わせ→BINDS課題申請→支援開始→マシンタイム配分→マシンタイム当日」が一般的です。実験の進捗に合わせて必要となる撮影日数が異なるため、マシンタイム配分はメールベースで行っています。

2ヶ月に1回程度、KEKからユーザー宛にマシンタイム希望日の打診メールを送り、第一から第三候補までを挙げていただき、日程調整をした上でマシンタイムを配分しています。配分は各グループあたり1-2ヶ月に1枠で、透明性を高める目的で全ての予定をKEKクライオ電顕のweb siteで公開しています。

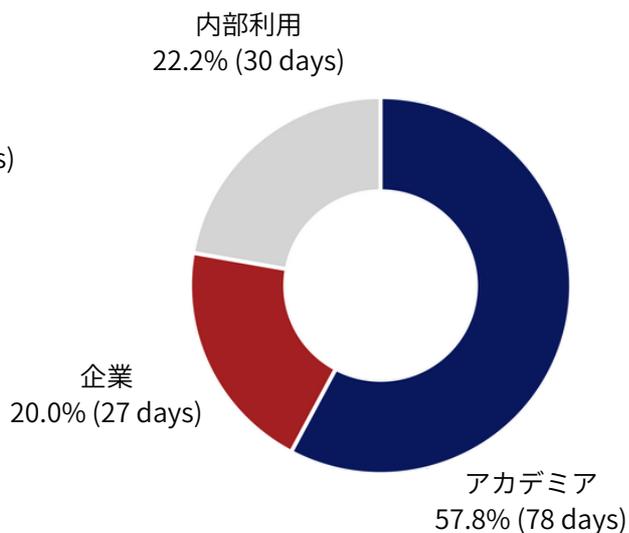


# KEKクライオ電顕の利用統計

装置利用状況  
2022年度上半期（183 days）

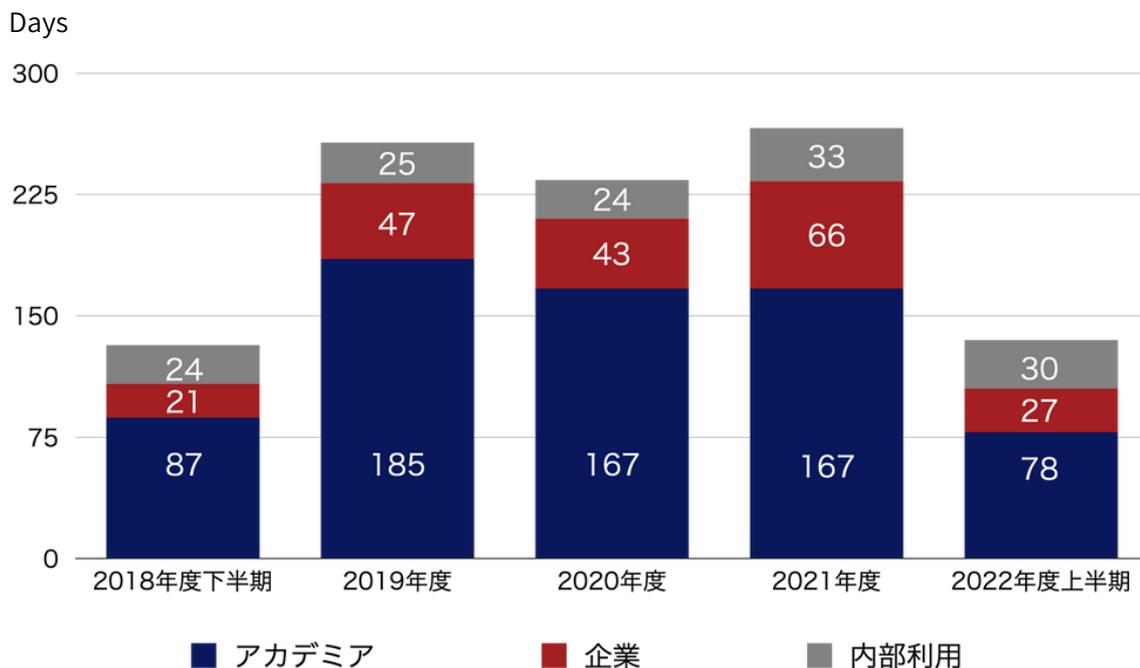


装置利用状況（稼働日のみ）  
2022年度上半期（135 days）



※「内部利用」には、主に週1回のカメラ調整を行なった後の時間が活用されています。

装置稼働日におけるマシンタイム配分の推移  
(2018年度下半期～2022年度上半期)



※年間算出のためVol.1,2の数字も含まれています。

## KEKクライオ電顕を利用して出版された論文 2022年4月から2022年9月まで

### KEKユーザーとの共同研究の成果

- **Structural bases for aspartate recognition and polymerization efficiency of cyanobacterial cyanophycin synthetase.**

Miyakawa, T., Yang, J., Kawasaki, M., Adachi, N., Fujii, A., Miyauchi, Y., Muramatsu, T., Moriya, T., Senda, T., and Tanokura, M. **Nature Commun.** 13, 5097 (2022).

EMDB-32381@2.91Å (PDB:7wac) (EMPIAR-)

EMDB-32382@2.96Å (PDB:7wad) (EMPIAR-)

EMDB-32383@2.64Å @TokyoU-Titan (PDB:7wae)

EMDB-32384@2.52Å @TokyoU-Titan (PDB:7waf)

東京大学 田之倉 & 宮川グループとの共同研究。糸状シアノバクテリアはシアノフィシン合成酵素を使って海洋の約50%の窒素固定を行っている。シアノフィシン合成酵素は複数の触媒ドメインを持ち、連続的な反応を行う酵素。アポ体、ATP結合型を解析し、さらに基質を100mM入れることで基質結合型を解析し、基質であるアスパラギン酸を可視化し、反応機構を解明しました。

- **Core fucose-specific *Pholiota squarrosa* lectin (PhoSL) as a potent broad-spectrum inhibitor of SARS-CoV-2 infection.**

Yamasaki, K., Adachi, N., Ngwe Tun, M.M., Ikeda, A., Moriya, T., Kawasaki, M., Yamasaki, T., Kubota, T., Nagashima, I., Shimizu, H., Tateno, H., and Morita, K. **FEBS J.** Online ahead of print (2022).

産業技術総合研究所 山崎グループとの共同研究。PhoSLはSARS-CoV-2のスパイクタンパクに結合するレクチンである。2次元平均像によりPhoSLがSpikeタンパクの凝集を引き起こすことを確認しました。

KEK×CRYO-EM  
ACTIVITY REPORT  
VOL.3

KEK IMSS  
Structural Biology Research Center

We, at the Structural Biology Research Center (SBRC), are studying about the mechanisms of biological phenomena based on 3-D structure information. We are always looking for new students and collaborators.

**• Discovery of non-squalene triterpenes.**

Tao, H., Lauterbach, L., Bian, G., Chen, R., Hou, A., Mori, T., Cheng, S., Hu, B., Lu, L., Mu, X., Li, M., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Senda, T., Wang, X., Deng, Z., Abe, I., Dickschat J.S., and Liu, T. **Nature** in press (2022).

EMDB-32531@3.17Å (PDB:7wjj) (EMPIAR-)

EMDB-32532@4.00Å (PDB:----) (EMPIAR-)

東京大学 阿部&森グループとの共同研究。炭素数30のトリテルペンを合成する酵素MpMSは、炭素数5のイソプレンを基質とするプレニル基転移酵素ドメインとテルペン環化酵素ドメインが融合した新奇合成酵素です。KEKクライオ電顕でMpMSのプレニル基転移酵素ドメイン、さらにMpMSの全体構造について単粒子解析を行いました。全体構造については架橋剤を用いて安定化することで、低分解能ながら2つのドメインの立体配置が明らかになりました。

**• Structural basis of the strict specificity of a bacterial GH31  $\alpha$ -1,3-glucosidase for nigerooligosaccharides.**

Ikegaya, M., Moriya, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Park, E.Y., and Miyazaki, T. **J. Biol. Chem.** 298, 101827(2022).

EMDB-32571@2.73Å (PDB:7wlg) (EMPIAR-11171)

静岡大学 宮崎グループとの共同研究。糖質加水分解酵素ファミリー31に属する乳酸菌の $\alpha$ -1,3-グルコシダーゼの6量体構造について、クライオ電顕構造と結晶構造を合わせて発表しました。クライオ電顕では2.73Åという高分解能のマップが得られ、結晶構造との違いを詳細に比較することが出来ました。

**KEKユーザーによる施設利用の成果****• Design and lyophilization of lipid nanoparticles for mRNA vaccine and its robust immune response in mice and nonhuman primates.**

Suzuki, Y., Miyazaki, T., Muto, H., Kubara, K., Mukai, Y., Watari, R., Sato, S., Kondo, K., Tsukumo, S.I., Yasutomo, K., Ito, M., and Tsukahara, K. **Mol. Ther. Nucleic Acids** 30, 226-240 (2022).

エーザイ株式会社による研究成果。mRNAを内包したリピッドナノ粒子について、クライオ電顕でその形状を確認しました。

# クライオ電顕利用料金

## アカデミア

### データ測定

<1日枠>2,000円 x 9h または 24h = 18,000円 または 48,000円

<3日枠>2,000円 x 72h = 144,000円

## 企業

### データ測定

<1日枠>10,000円 x 24h = 240,000円

<3日枠>10,000円 x 72h = 720,000円

### 測定解析補助・指導業務

30,000円 x 8h = 240,000円

### 初期解析（オプション）

125,000円 x 日数

### 詳細解析（オプション）

250,000円 x 日数

アカデミア以外の測定利用合計

<1日枠>480,000円

<3日枠>960,000円

KEK×CRYO-EM  
ACTIVITY REPORT  
VOL.3

KEK IMSS  
Structural Biology Research Center

We, at the Structural Biology Research Center (SBRC), are studying about the mechanisms of biological phenomena based on 3-D structure information. We are always looking for new students and collaborators.



## KEK クライオ電顕メンバー

千田 俊哉  
川崎 政人  
守屋 俊夫  
池田 聡人  
久保田 孝幸  
中山 友希子  
山本 美里  
山田 悠介  
篠田 晃  
鮎川 理恵子  
増田 千穂

### 編集後記

今回は、クライオ電顕棟をご案内する内容となりました。

全てがピカピカと輝いている新しい建物にワクワクしています！

ワクワクするといえば、ハワイ島では、38年ぶりに火山が噴火しました。

ハワイ島はいつでも火山が噴火しているのでは？と思われる方がいらっしゃると思うのですが、いつも噴火している山（キラウエア火山）とは違う山（マウナロア火山）から噴火したということなのです！

そして、ハワイには火山の神様がいることをご存知ですか？その名もペレ！あれ？と思われた方、サッカー界のレジェンドではないですよ。そんな38年ぶりの噴火のニュースにもワクワクしています。

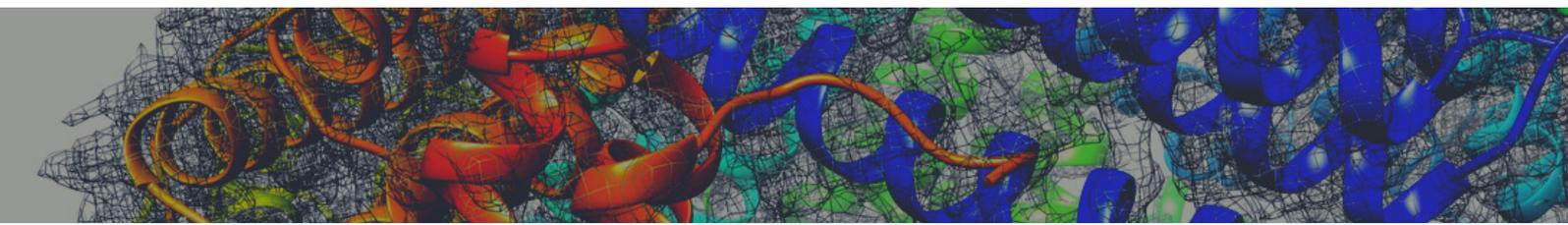
（編集後記をご覧の方は、私の”ハワイ好き”に気付いていらっしゃるのではないのでしょうか。その通り！普段から”ハワイ”と耳にするだけで心が躍ってしまいます。）

ワクワクするハワイ話は置いておいて、この場を借りて制作に協力して下さった皆様にお礼を申し上げます。

今後ともKEKクライオ電顕を宜しくお願いいたします。

A HUI HOU!(ハワイ語でまた会いましょうの意味です)

増田



# KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.3 2022年4月～2022年9月

高エネルギー加速器研究機構  
物質構造科学研究所  
構造生物学研究センター(SBRC)



〒305-0801  
茨城県つくば市大穂1-1

<https://www2.kek.jp/imss/sbrc/beamline/cryoem.html>