



KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.4 2022年10月～2023年3月

KEK Titan Krios

名称 : Titan Krios G4
加速電圧 : 300kV
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
エネルギーフィルター : Selectris-X
検出器 1 : Falcon 4i
(*130k=0.96Å/px, 165k=0.75Å/px, 215k=0.58Å/px, 270k=0.46Å/px)
検出器 2 : Ceta-D
ソフト : EPU, EPU-D

.....



KEK Talos Arctica

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
ソフト : EPU, EPU-D

.....



グリッド凍結装置

名称 : Vitrobot Mark IV

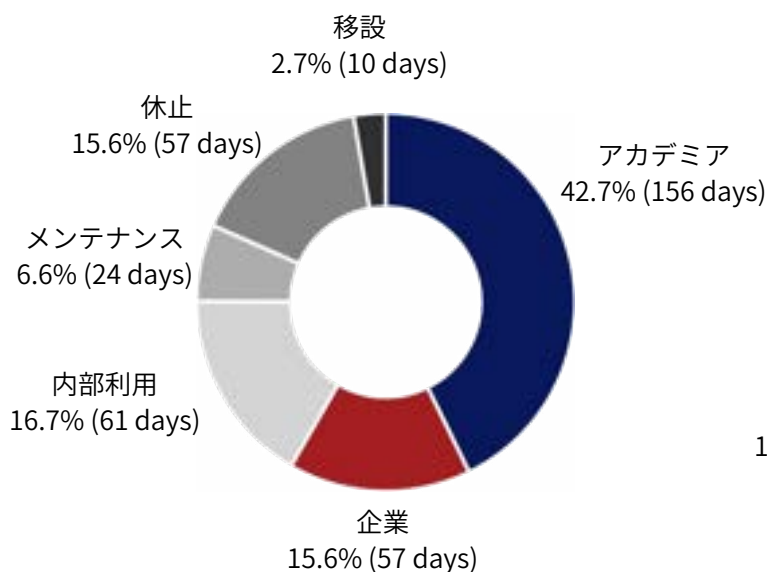
親水化装置

名称 : PIB-10

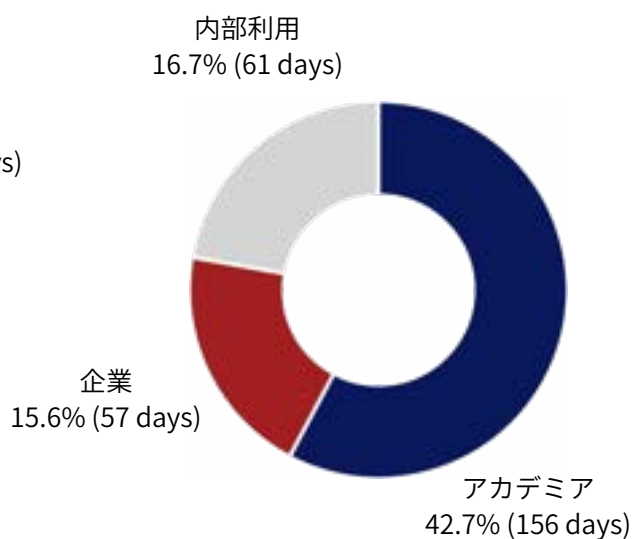
電流値 : soft mode = ~7mA, hard mode = ~11mA

KEKクライオ電顕の利用統計

Talos利用状況
2022年度（365 days）

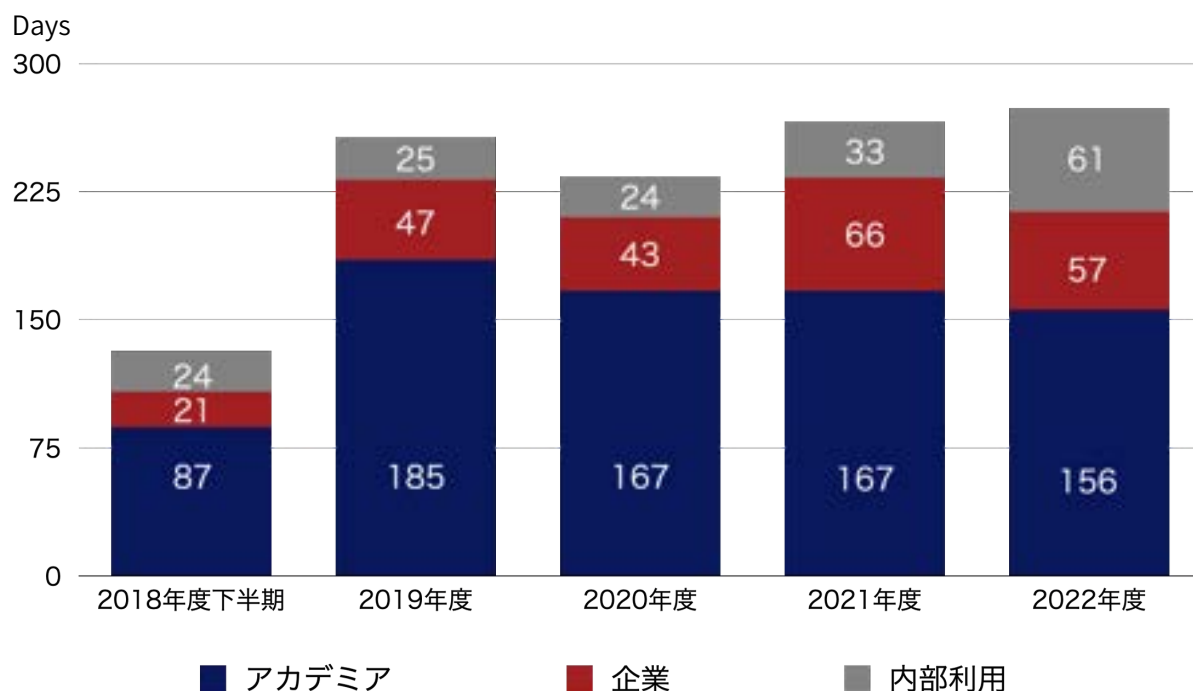


Talos利用状況（稼働日のみ）
2022年度（274 days）



※「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Talosマシンタイム配分の推移
(2018年度下半期～2022年度)



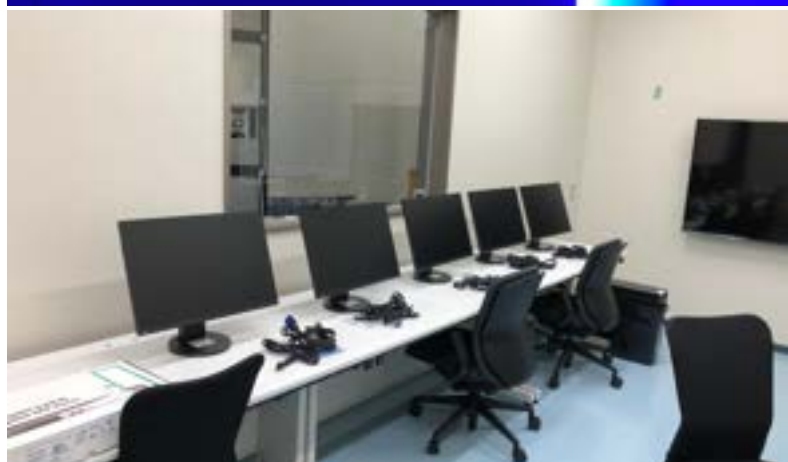
※年間算出のためVol.1,2,3の数字も含まれています。

※Titan Kriosは2022年度はテスト測定中のため集計していません。

KEK Titan Krios

Vol.3で装置搬入の様子を少しだけご紹介しましたが、Titan Krios G4がクライオ電顕実験棟に導入されました。

2022年3月に完成したクライオ電顕実験棟には電顕を設置するための部屋が2つあります。電顕室1では加速電圧200kVのクライオ電顕 Talos Arctica G2が稼働しています。200kVのクライオ電顕は、試料の良し悪しをチェックするためのスクリーニングには十分な性能ですし、高分解能のデータを取得することも出来ます。その成果はこのアクティビティーレポートでもお伝えしてきました。しかし、より高分解能のデータを測定するためには300kVの加速電圧のクライオ電顕が必要です。クライオ電顕実験棟の電顕室2は300kVクライオ電顕のための部屋として設計されました。そして念願の300kVクライオ電顕であるTitan Krios G4がとうとう電顕室2にやってきました。





設置作業は2022年10月下旬から始まり、11月1日には電顕本体が到着しました。例が無いほどのスピードで作業が進んで、12月6日には早くも設置が完了しました。

ただし、設置が終わっても実際に本稼働をするためにはいろいろな準備が必要です。約半年かけてユーザーの協力もいただきながら試験運転を重ねました。初期不具合を洗い出し、安定的に稼働できるようになりました。利用料金も決定して、2023年6月からユーザーを受け入れて本格始動いたしました。200kVで測定したサンプルを300kVで測定することで分解能が向上したという声がすでに寄せられています。ユーザーの皆様にはぜひ300kVの威力を実感していただければと思います。

川崎 政人

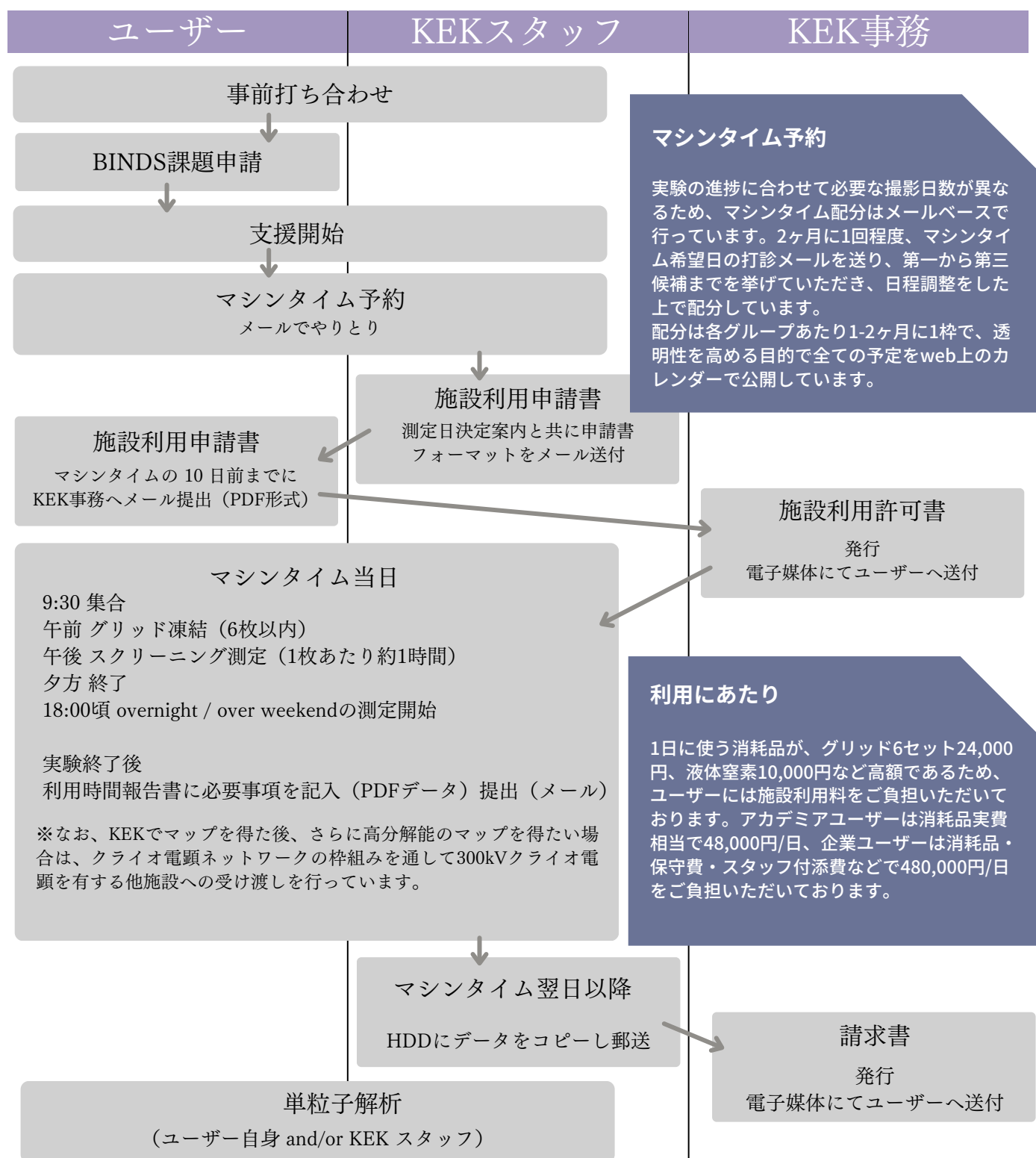


KEKクライオ電顕利用の流れ

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 構造生物学研究センター(SBRC) クライオ電子顕微鏡

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/データ測定の実験（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）

➤ 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

➤ 当日の持ち物

サンプル
希釈用buffer
4～8TBのHDD

KEK SBRC
CRYO-EM

KEKクライオ電顕を利用して出版された論文 2022年10月から2023年3月まで

KEKユーザーとの共同研究の成果

• Structural basis for activation of DNMT1.

Kikuchi, A., Onoda, H., Yamaguchi, K., Kori, S., Matsuzawa, S., Chiba, Y., Tanimoto, S., Yoshimi, S., Sato, H., Yamagata, A., Shirouzu, M., Adachi, N., Sharif, J., Koseki, H., Nishiyama, A., Nakanishi, M., Defossez, P.A., and Arita, K. **Nature Commun.** 13, 7130 (2022).

EMDB-33200@2.52Å @TokyoU-Titan (PDB:7xi9)

EMDB-33201@2.23Å @TokyoU-Titan (PDB:7xib)

横浜市立大学 有田グループとの共同研究。DNAメチル化酵素であるDNMT1について、KEKの200kVクライオ電顕でスクリーニングを行ったサンプルを東大の300kVクライオ電顕で測定することで、高分解能の構造決定に至りました。

• Reversible Assembly of an Artificial Protein Nanocage Using Alkaline Earth Metal Ions.

Ohara, N., Kawakami, N., Arai, R., Adachi, N., Moriya, T., Kawasaki, M., and Miyamoto, K. **J. Am. Chem. Soc.** Online ahead of print (2022).

EMDB-33289@3.96Å (PDB:7xm1)

信州大学 新井グループとの共同研究。金属イオン依存的に集合するようにデザインされた人工タンパク質について、集合して出来た60量体のかご状構造を明らかにしました。タンパク質の分子間集合を仲介しているバリウムイオンの位置を特定することができました。

• Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in an Antarctic alga.

Kosugi, M., Kawasaki, M., Shibata, Y., Hara, K., Takaichi, S., Moriya, T., Adachi, N., Kamei, Y., Kashino, Y., Kudoh, S., Koike, H. and Senda, T. **Nature Commun** 14, 730 (2023).

EMDB-35080@3.13Å(PDB:8HW1)

基礎生物学研究所 小杉グループとの共同研究。南極で採取したナンキョクカワノリから精製された、赤外線吸収型の光合成アンテナタンパク質の単粒子解析を行いました。光合成アンテナタンパク質としてはこれまでに例のない11量体のリング構造が明らかになりました。

- **Effect of alkali metal cations on the unilamellar vesicle of a squalene bearing 18-crown-6.**

ILinh, T.N., Arimura, T., Tominaga, K., Isoda, H., Kawasaki, M., and Adachi, N. **ACS Omega**. Online ahead of print (2023).

産業技術総合研究所 有村グループとの共同研究。合成スクアレンが形成する単層のベシクル構造を、クライオ電顕で位相板を使って測定しました。直径数百nmのベシクル全体が観察できるように、通常のタンパク質の単粒子解析よりも低い倍率で測定を行いました。

KEKユーザーによる施設利用の成果

- **Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases.**

Nishida, Y., Yanagisawa, S., Morita, R., Shigematsu, H., Shinzawa-Itoh, K., Yuki, H., Ogasawara, S., Shimuta, K., Iwamoto, T., Nakabayashi, C., Matsumura, W., Kato, H., Gopalasingam, C., Nagao, T., Qaqorh, T., Takahashi, Y., Yamazaki, S., Kamiya, K., Harada, R., Mizuno, N., Takahashi, H., Akeda, Y., Ohnishi, M., Ishii, Y., Kumasaka, T., Murata, T., Muramoto, K., Tosha, T., Shiro, Y., Honma, T., Shigeta, Y., Kubo, M., Takashima, S., and Shintani, Y. **Nature Commun.** 13, 7591 (2022).

国立循環器病研究センター 新谷グループによる研究成果。阻害剤の結合した大腸菌呼吸鎖酵素について、KEKのクライオ電顕でスクリーニングして構造解析につながりました。

KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT VOL.4

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.

クライオ電顕利用料金

Titan Krios

アカデミア

装置利用 : 3,000円/時間* (利用単位は9時間/日か24時間/日のいずれか)
測定解析補助: 無料

企業

装置利用 : 15,000円/時間 (利用単位は24時間/日)
測定解析補助: 30,000円/時間 (利用単位は8時間/日)

Talos Arctica

アカデミア

装置利用 : 2,000円/時間* (利用単位は9時間/日か24時間/日のいずれか)
測定解析補助: 無料

企業

装置利用 : 10,000円/時間 (利用単位は24時間/日)
測定解析補助: 30,000円/時間 (利用単位は8時間/日)

オプション

初期解析 : 125,000円 x 日数

詳細解析 : 250,000円 x 日数

*消耗品実費相当の金額となっています (グリッド・C-clip・C-clipリング・ろ紙・液体窒素・HDD など)。ユーザーの皆様のご協力に心より感謝申し上げます。



KEK IMSS
Structural Biology Research Center



KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

KEK クライオ電顕メンバー

千田 俊哉
川崎 政人
守屋 俊夫
安達 成彦
池田 聡人
久保田 孝幸
山本 美里

山田 悠介
高巢(篠田) 晃
鮎川 理恵子
増田 千穂

編集後記

今回は、新たに稼働し始めたTitan Kriosについてご紹介する事ができました！
2022年12月から設置のための作業をスタートし、何も置いていなかった電顕室に機器が設置されていく様子に日々ワクワクしていました。その後は稼働までの準備期間をいただき、6月からユーザー利用が可能となりました。
冊子だけではまだまだお伝えできていない事がたくさんありますので、直接クライオ電顕実験棟にお越しただいて、電顕だけでなくクライオ電顕実験棟の建物をご覧ください。
クライオ電顕実験棟については、壁や床の色から各部屋のサインの書体まで、色々なところにこだわったので、気になる事があれば、お気軽にその場にいるスタッフにお声がけいただくと裏話が聞けるかもしれません！

さて、いつもだと大好きなハワイについてお伝えしてしまうところですが、ハワイの話はまた次回にして、この場をお借りし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クライオ電顕をよろ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.4 2022年10月～2023年3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>