



KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.5

2023年4月～2023年9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 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300kVクライオ電子顕微鏡Titan Krios G4と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/データ測定の実験に関する技術導入の支援
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

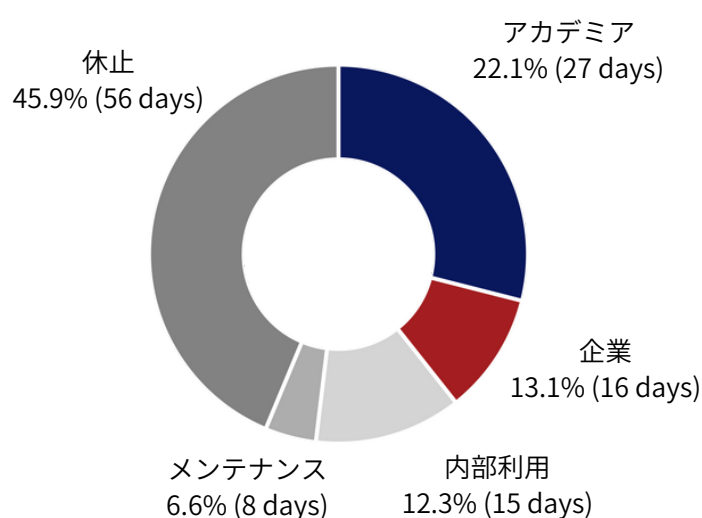
➤ 当日の持ち物

サンプル
希釈用buffer
4～8TBのHDD

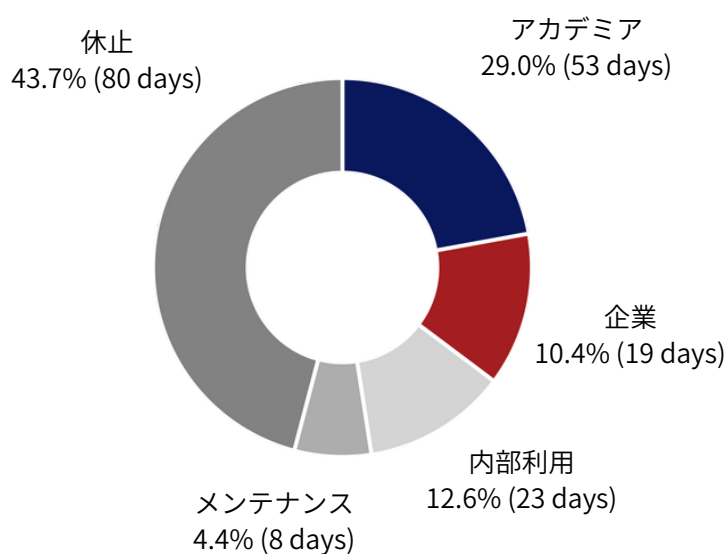
KEK SBRC
CRYO-EM

KEKクライオ電顕の利用統計

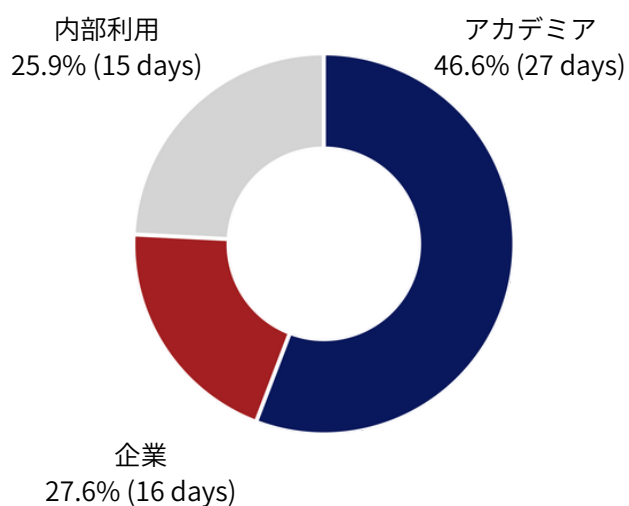
Titan利用状況
2023年度上期（6月～9月）
（122 days）



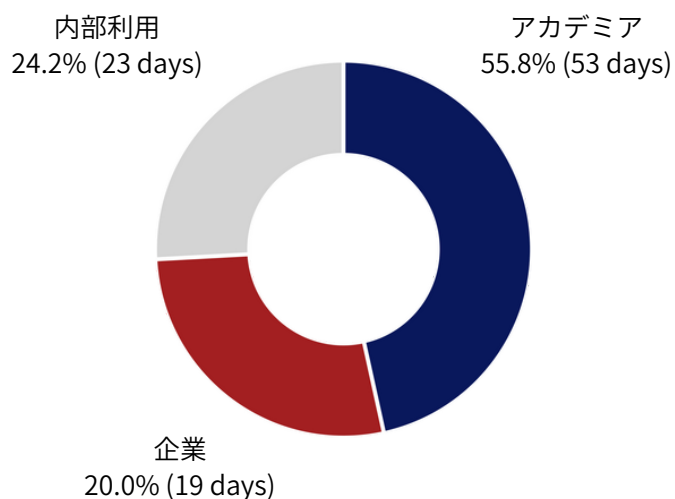
Talos利用状況
2023年度上期（183 days）



Titan利用状況（稼働日のみ）
2023年度上期（6月～9月）（58days）

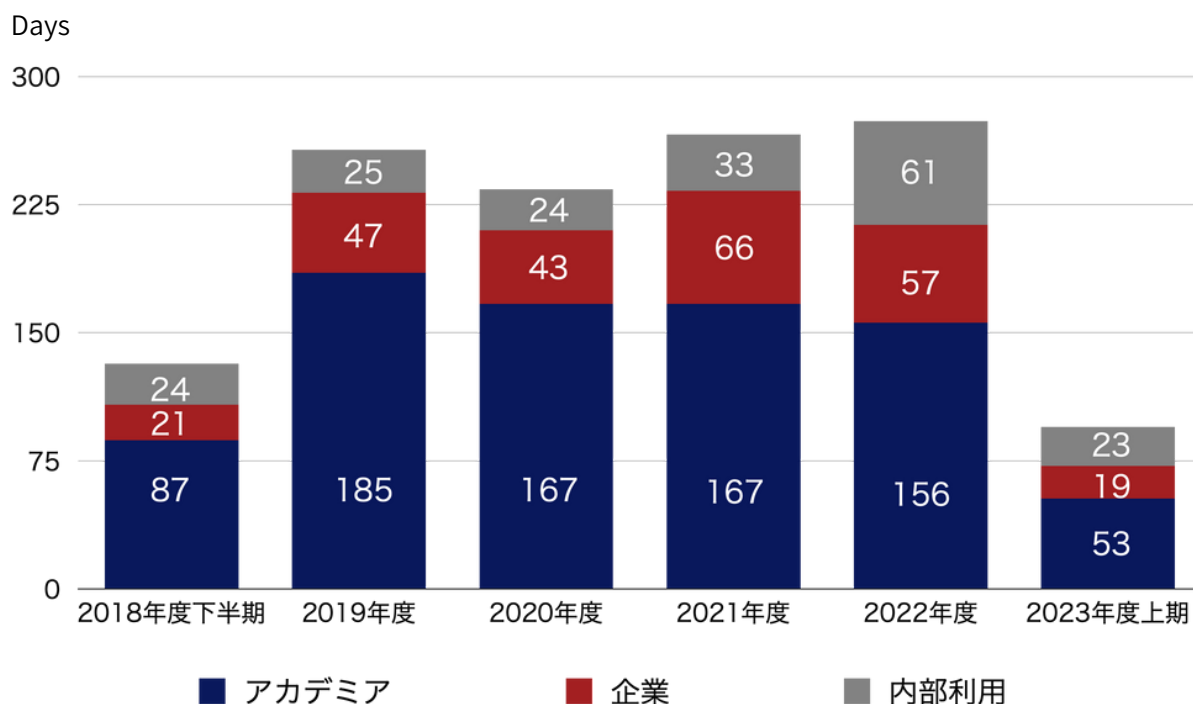


Talos利用状況（稼働日のみ）
2023年度上期（95days）

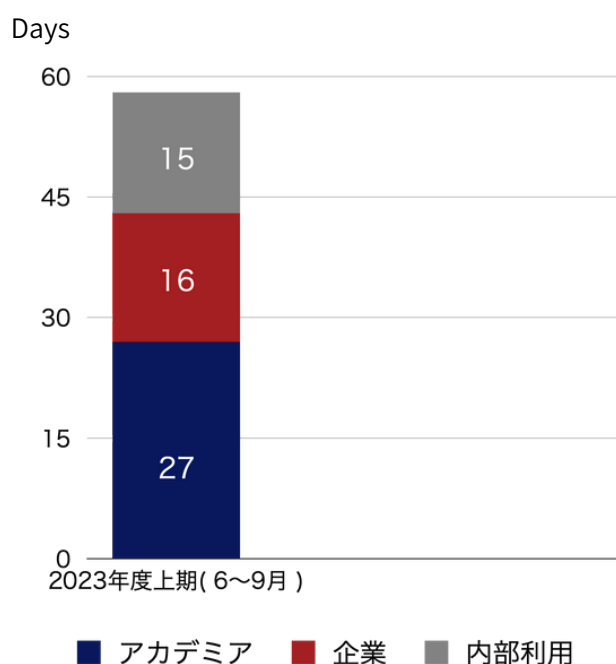


KEKクライオ電顕の利用統計

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～2023年度上期)



装置稼働日におけるTitanマシンタイム配分の推移
(2023年度上期 6月～9月)



※年間算出のためVol.1-4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。

学会参加報告

AMERICAN CRYSTALLOGRAPHIC ASSOCIATION ANNUAL MEETING

2023年7月9日～7月11日
米国メリーランド州のバルチモアにて開催

American Crystallographic Association (ACA) について

2023年7月9日から11日にかけて、米国メリーランド州のバルチモアにて、American Crystallographic Association (ACA) の年次総会が開催されました。ACAは1949年にLinus Pauling氏ら著名な科学者が中心となり、結晶学に関する研究、教育、技術の発展を目的として設立されたアメリカの学術組織です。2023年の年次総会は第73回目の開催となりました。3日間の会期中に総勢545名が参加し、287演題の口頭発表と88演題のポスター発表がありました。

主に5つのカテゴリー、1) 結晶学 (Xtal)、2) 小角散乱 (SAS)、3) 単粒子解析 (SPA)、4) 微結晶電子線回折 (MicroED/3DED)、5) クライオ電子線トモグラフィ (cryo-ET) に関する研究と技術開発の報告がありました。このうちの3つは透過型クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた手法となります。結晶学を中心に発足した ACA ですが、近年 cryo-EM に関わるトピックスも大きく取り上げられるようになり、生物分野における新技術への関心の高さが感じられました。特に cryo-ET、機械学習を用いた解析手法の開発、大容量化するデータの取り扱いと処理の自動化といったトピックスは、昨今の研究の方向性を反映しているように思います。多くの興味深いトピックスがありましたが、今回は KEK-SBRC の cryo-EM 利用者の皆様もご興味をお持ちと思われるトピックスについて紹介いたします。

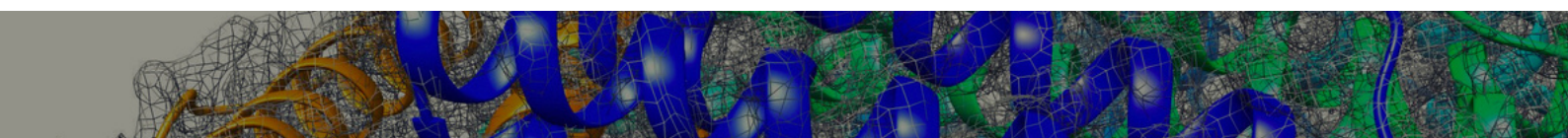


cryo-ETのワークフローと実践

Max Planck研究所の Dr. Dmitry Tegunovからは、cryo-ETの解析フローの開発に関する報告がありました。cryo-ETの解析は、様々なアプリケーションの開発により刻々と進歩している一方で、多くの解析用アプリケーションを用途に合わせて適切に使い分けることは解析手法の専門家でない限り困難であるのが現状です。そこで、彼らはこのような現状を打破するために単純化した基本的な解析フローを確立しました。その解析フローは、Warp、RELION、Mを用いて画像の前処理から最終マップ生成までを行います。大まかな解析フローは以下の通りです。

- 1) Warpを用いてリアルタイムで測定データの前処理を行い、画像またはサブトモグラムとして粒子像をエクスポートする。
- 2) 同時にWarpでMissing-wedgeとtiltの情報を考慮した3D CTFボリュームを各粒子像毎に生成する。
- 3) 粒子像をRELIONにインポートし、3次元再構成などの処理を行う。
- 4) 処理結果をMにインポートし、粒子像とCTFパラメータの精密化を行う。
- 5) Mを用いて、モデル構築に向けた高分解能3次元マップを生成する。
- 6) 改善されたアライメント情報やCTFパラメータを再度WarpやRELIONにエクスポートすることでより正確に粒子を分類する。

このように、測定から解析までの基本的なワークフローが提示されたことで、より多くのユーザーがcryo-ETの測定と解析に取り組みやすくなると思われます。



Scripps研究所のDr. Danielle A. Grotjahnは、小胞体(ER)ストレスによるミトコンドリアの膜構造の変化を調べるために開発した、光学顕微鏡とcryo-ETを組み合わせた手法を報告しました。この解析手法を使うことで、ERストレスによるミトコンドリア膜の構造変化と、それに対応するナノスケールでの超微細構造を同時に観察することが可能になりました。FIB-SEMで作成したミトコンドリアを含むラメラをcryo-ETで測定し、統計的にERストレスの影響を解析しました。その結果、ERストレスが、内膜と外膜の間隔、内膜の局所的な湾曲、クリスタ間の間隔など、ミトコンドリアの超微細構造のリモデリングを促進することが明らかになりました。cryo-ETを用いることで単一細胞での膜の構造変化の定量化が可能になり、構造生物学と細胞生物学の分野間の距離がより近くなると感じられました。

機械学習を用いた解析技術の発展

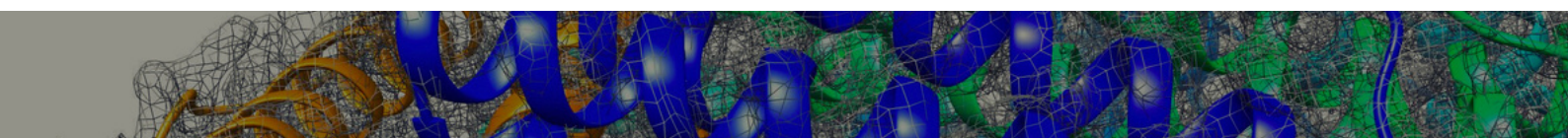
UCLAのDr. Hong Zhouからは、cryo-ETの解析に機械学習を活用することで、角度情報に偏りのある3次元マップの質を改善する試みが報告されました。cryo-ETではステージを傾けて撮影するため、物理的な角度制限が生じます。これはMissing-wedgeの問題と呼ばれ、分解能の異方性を生じさせる原因となります。分解能の異方性は、再構成した3次元マップの質とその解釈に影響を及ぼします。彼らは、特別な方法で訓練したニューラルネットワークを用いてMissing-wedge情報を補完して3次構造を再構成するソフトウェア、IsoNetを開発しました。そして、IsoNetを3つのcryo-ETデータ（未成熟HIV粒子、真核生物鞭毛、シナプスのクラスリンケー）へ適用して、3次元マップの質が改善することを示しました。興味深いのは、IsoNetはサブモグラムの平均化処理とは異なる（いわば一般化した）方法でmissing-wedgeの問題を解決しているところです。今後、このようなニューラルネットワークを利用した革新的な手法が発展することで、ますます詳細な細胞内の構造が明らかになっていくことが期待されます。

パルス波を用いた情報ロスの少ない位相コントラストの変調技術

コロンビア大学のDr. Anthony Fitzpatrickからは、cryo-ET(cryo-EM)に最適化したPulsed ponderomotive phase plate (PPPP)の研究報告がありました。PPPPは電子線に対してパルスレーザーを照射して入射電子線の位相を変化させる装置です。cryo-EMを用いた測定と解析では位相差コントラストを利用して試料を観察しているため、高コントラストの粒子像の獲得が重要な課題の一つです。高コントラストの像を得るために、大きめのデフォーカスを設定したり位相板を用いて測定したりすることは可能ですが、それらの手法では同時に高周波数成分（高分解能）情報が減衰しやすくなるという難点も抱えています。そこで通常は小さめのデフォーカスを複数設定して撮影することで、情報の欠損を補いつつ高分解能情報を含むマイクログラフを撮影しています。しかし、PPPPを用いれば高分解能情報の減衰を抑えて位相を変化させることが原理的に可能なため、インフォーカスでもコントラストをつけた撮影ができるようになります。彼らの計算によれば、フェムト秒レベルのフォトンパルスレーザーを300 keVの入射電子線に照射することで、位相を $\pi/2$ 変化させられるということです。この装置が実現すれば、小さいタンパク質の高分解能構造を目指す際にも有用な技術となります。専用の特殊な装置が必要なため、一般化するまでに時間を要するでしょうが、今後の動向が期待される技術だと思えます。

測定の自動化、低コスト化

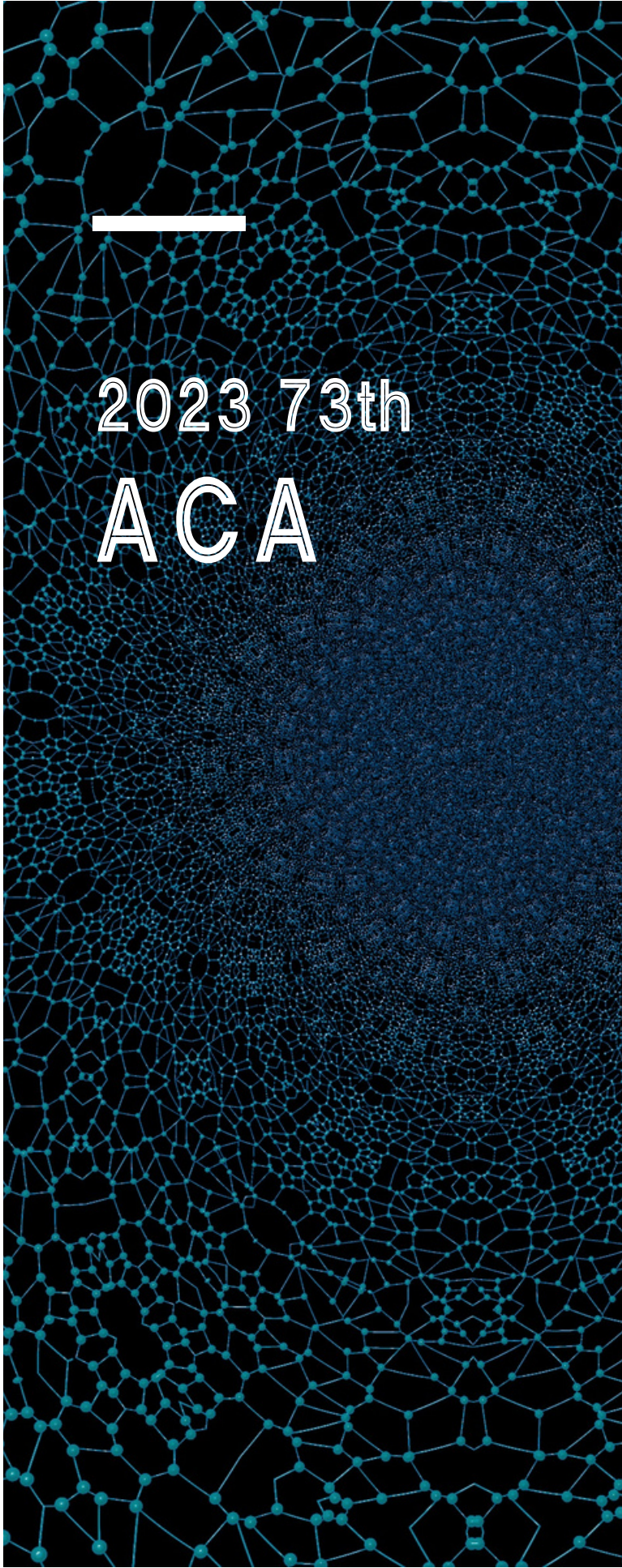
SPAのための高品質なデータの取得は、依然としてオペレーターの専門知識と経験に大きく依存しています。日本国内でもcryo-EM施設は増えましたが、経験の浅い利用者のみではcryo-EMの適切な利用が難しいのはこのためです。cryo-EMの高度な専門知識がない場合でも高品質なデータ取得ができるように、経験知の数値化と共に測定の自動化が進められています。



HTI社(Health Technology Innovations, Inc.)は Pacific Northwest CryoEMセンターと Salk研究所のLyumkis研究室との共同研究を行い、CryoFAST™ (Fast Acquisition for Single-particle and Tomography)を開発しました。CryoFAST™は、Cryo-EMデータ自動取得のための機械学習プラットフォームで、SerialEMおよびGatan GMS/Latitudeと統合されています。CryoFAST™は異なる倍率のマイクログラフから適した倍率を決定します。また、異なる箇所でもマイクログラフを自動的に取得してリアルタイムで処理を行い、マイクログラフの品質を評価します。さらにベイズ最適化によって撮影箇所の優先順位を更新します。

Thermo Fisher Scientific社からは、EPUのプラグインであるSmart EPUの紹介がありました。Smart EPUは撮影データとメタデータをリアルタイムで活用して、効率と品質の面で撮影を最適化することができます。具体的には、ドリフト補正やCTF決定などの処理を行い、撮影条件を調整・最適化します。さらに、AIを活用して撮影に適さないホールを自動的に認識し、選択から除外します。ユーザー自身でデータ測定に関するアルゴリズムを開発するためのAPIも搭載されています。

また2020年に Thermo Fisher Scientific社から発売された100 kVのcryo-EMである Tundra専用の検出機Falcon-Cの紹介もありました。Tundraはもともスクリーニング用として設計されましたが、Falcon-Cを搭載することでより高分解能のデータ収集が可能となるようです。実例として対称性の高いタンパク質から 100 kDa以下の非対称タンパク質の4Å分解能を超える構造が紹介されていました。300 kV や 200 kV の cryo-EMは管理運用にかかるコストが高額ですが、安価な100kV cryo-EMでも構造が決定できるため、cryo-EMをより利用しやすくなるかもしれません。測定に関する専門知識や経験が少なくても良質な測定ができる、ユーザーフレンドリーなマシンへの改善も進められているようです。



2023 73th
ACA

SPAに関する報告

テキサス大Austin校のDr. David Taylorは、速度論的解析に基づいて行われた反応中の一連の構造を決定する手法を報告しました。彼らはCas9のオフターゲット認識の分子メカニズムを理解するために、酵素反応溶液から異なる時点でサンプリングした試料をcryo-EMで観察し、Cas9の反応の構造スナップショットを取得しました。簡便に測定用の試料を作成可能なcryo-EMの利点を活かした実験手法の一例だと思います。

ノースカロライナ大Chapel HillのDr. Richard Bakerからは、ナノディスクを利用することで、細胞膜上に結合して機能するタンパク質

(membrane-associated protein) の構造を決定する手法が紹介されました。この研究グループは、ナノディスクの直径や脂質の組成を調節することで、17 nmナノディスクに結合したAP2クラスリンアダプター複合体の構造を3.3 Å分解能で決定することに成功しています。ナノディスクを構成する脂質の組成を変えることでナノディスクの電荷を調整することができ、タンパク質との相互作用を変えることが可能だということです。この方法は、現状では報告が少ない膜相互作用タンパク質の高分解能構造を決定する一助になる可能性があります。

Howard Hughes Medical InstituteのDr. Richard Heldからは、金ナノ粒子 (AuNPs) を用いて膜タンパク質の細胞外領域を標識し、表面構造を観察する方法が紹介されました。AuNPは均質で、大きさの調節も可能です。彼らはAuNPを用いて神経細胞間の接合部におけるAMPA型グルタミン酸受容体を特定し、神経伝達物質の放出部位から一定の距離を保ってクラスターを形成していることを明らかにしました。さらにAuNPで標識することでin situでの定量化と解析のための正確な粒子ピッキングが容易となります。この方法は、in situ構造生物学として簡便かつ強力な方法であると思います。

Structura Biotechnology社のDr. Ali Punjaniは、CryoSPARCの3DFlexに関する報告をしました。3DFlexは動的な領域を持つ3次元マップの再構成に適した機械学習モデルです。一般的な3次元マップの精密化処理では、動的な(複数の構造をとる)領域があると、その部分のマップは不明瞭になってしまいます。

しかし複数の構造内でも局所の構造は保持されていることが知られています。3DFlexは動的な領域の異なる立体構造の集合、いわゆるconformation landscapeを作成し、conformation landscape内の各立体構造中で保持されている局所構造の情報を集約することで、分解能とマップの質の向上を達成しています。粒子を分割せず全ての粒子の情報を活かすことができるため、効率が良いことも利点の一つです。タンパク質の動的な領域は生物学的な意義を持つことが多いため、SPAによる構造決定において有用な方法であると思われます。

年次総会では、今回取り上げたトピックの他にも結晶構造解析とSPAを組み合わせた難標的の構造決定やMicroED/3DEDと呼ばれる手法の開発などに関する多くの成果が報告されました。近年は複数の解析手法を組み合わせることで構造解析を行うのが一般的になったように思います。また全体を通して、cryo-ETおよび機械学習を応用した技術的な研究成果報告が多く、技術の進歩が感じられた年次総会でした。

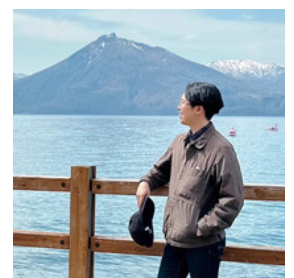
SPAと同様に、今後cryo-ETの技術的発展が進むことで、構造生物学の対象が広がり、細胞生物学など、他分野との共同研究の機会も増えると思います。一研究者として、構造生物学の今後の動向が楽しみです。

次回のACA年次総会は2024年7月7日から12日に、米国のデンバーにて開催されます。

池田 聡人

いけだ あきひと /
高エネルギー加速器研究機構
構造生物学研究センター

興味ある研究分野
クライオ電子顕微鏡を用いた測定および解析

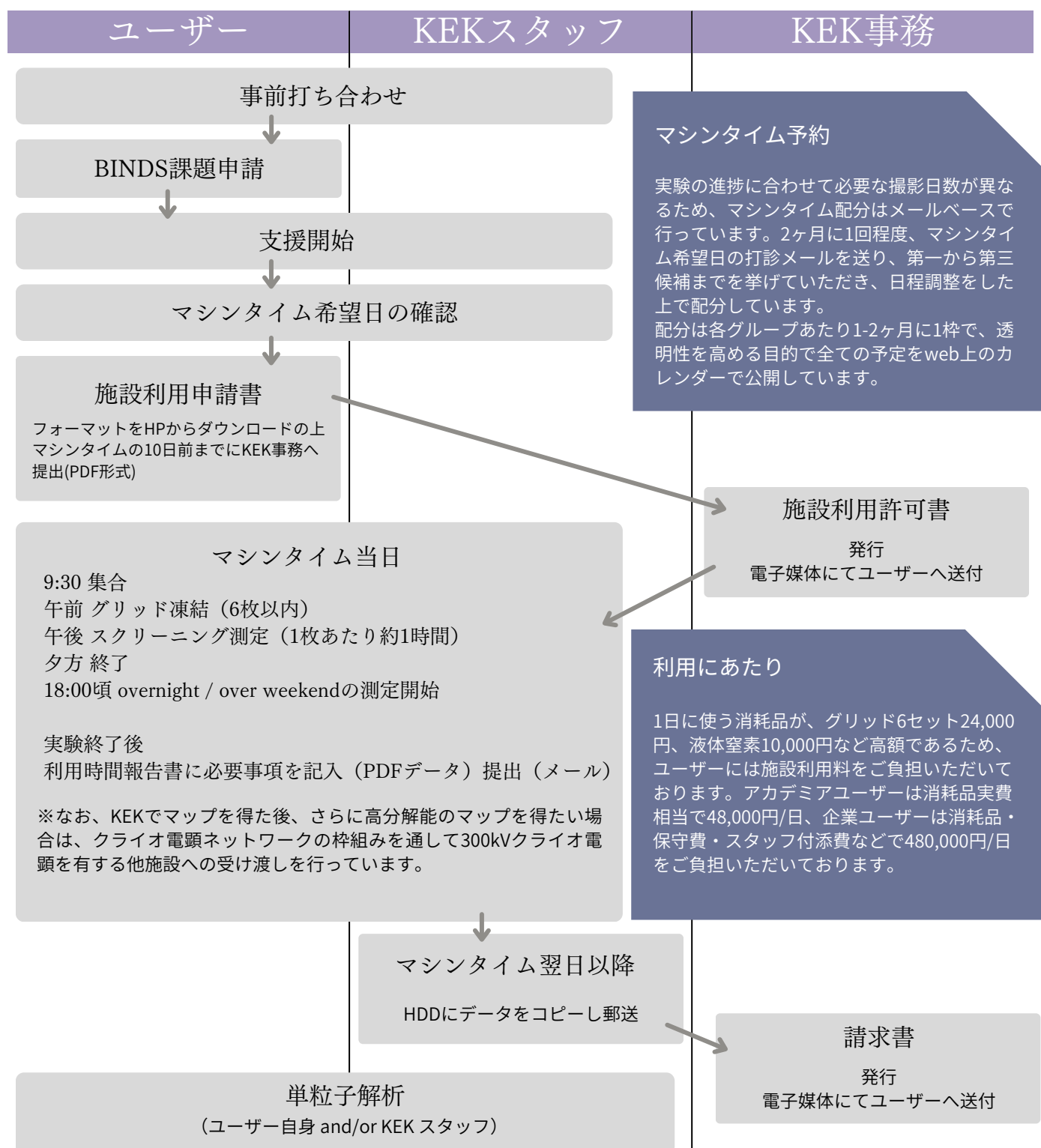


KEKクライオ電顕利用の流れ

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。



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。



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



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
徐 希帆

山田 悠介
高巢(篠田) 晃
鮎川 理恵子
増田 千穂

編集後記

Activity Report Vol.5を手にとっていただき、ありがとうございます！

今回の発行時にはTitan Kriosのユーザー測定が動き出しました。

皆様に測定で使っていただき、素晴らしい結果に繋がるようにお役に立てたら嬉しいです。ご利用をお待ちしております！

そして動き出すと言えば、ハワイのオアフ島で鉄道が開業しました！過去にはサトウキビとパイナップルを運んだオアフ鉄道、現在では観光列車のハワイアンレイルウェイが走っていますが、今回は空港からワイキキ方面の中心部への移動手段として鉄道「スカイライン」の一部分の運行が開始されました。これが全てつながると空港からの移動がとても便利になると思うので、とても楽しみです！

改め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.5 2023年4月～2023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>