

Talos Arctica



KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.1

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枚）

水:1日枠（スクリーニング&本測定800枚）

木:1日枠（スクリーニング&本測定800枚）

金土日: 3日枠（スクリーニング&本測定3000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

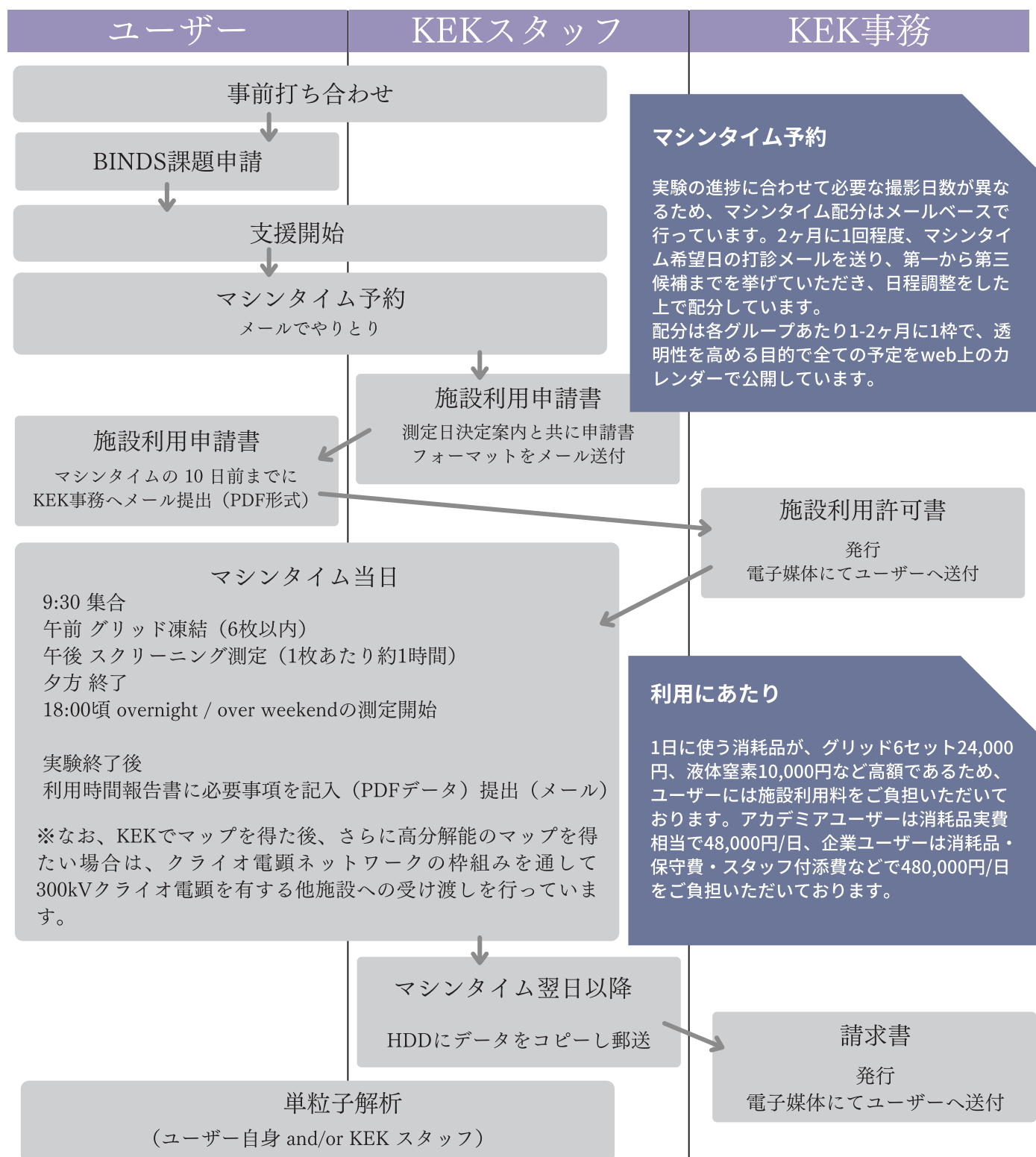
4～8TBのHDD

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。

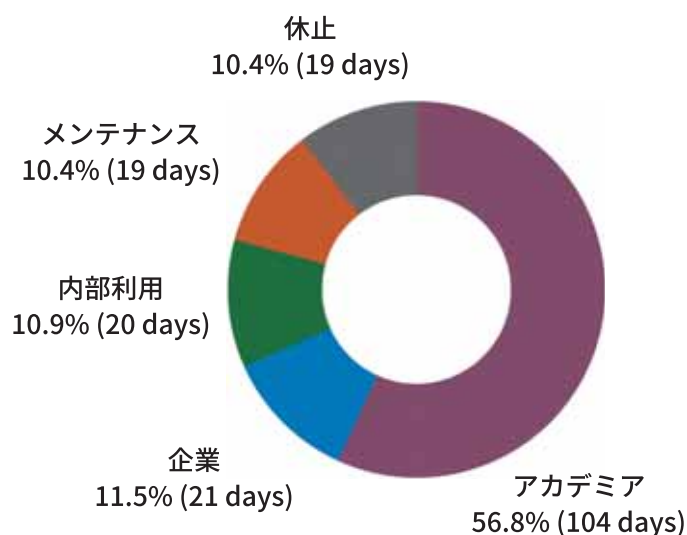
アカデミアユーザーの初回利用までの流れは「事前打ち合わせ→BINDS課題申請→支援開始→マシンタイム配分→マシンタイム当日」が一般的です。実験の進捗に合わせて必要となる撮影日数が異なるため、マシンタイム配分はメールベースで行っています。2ヶ月に1回程度、KEKからユーザー宛にマシンタイム希望日の打診メールを送り、第一から第三候補までを挙げていただき、日程調整をした上でマシンタイムを配分しています。配分は各グループあたり1-2ヶ月に1枠で、透明性を高める目的で全ての予定をKEKクライオ電顕のweb siteで公開しています。



KEKクライオ電顕の利用統計

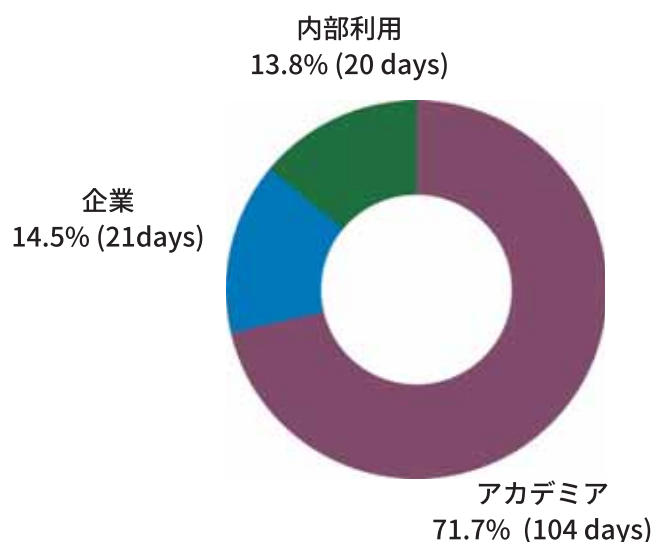
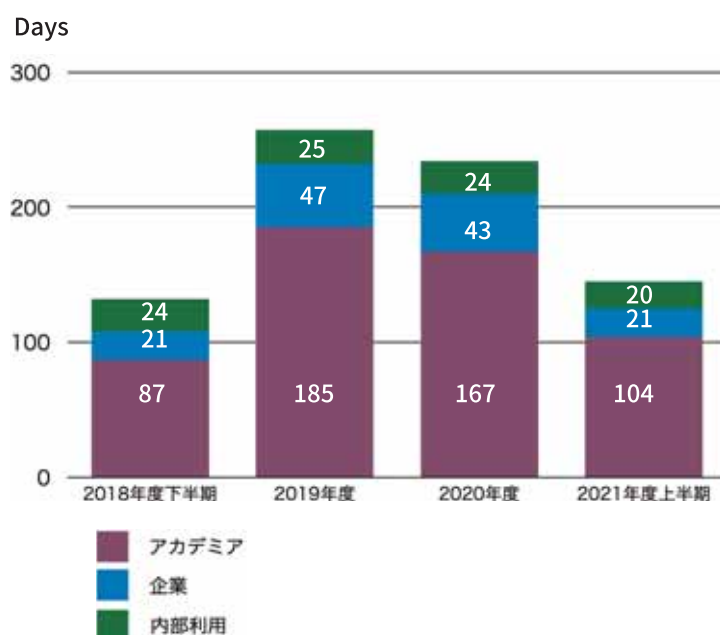
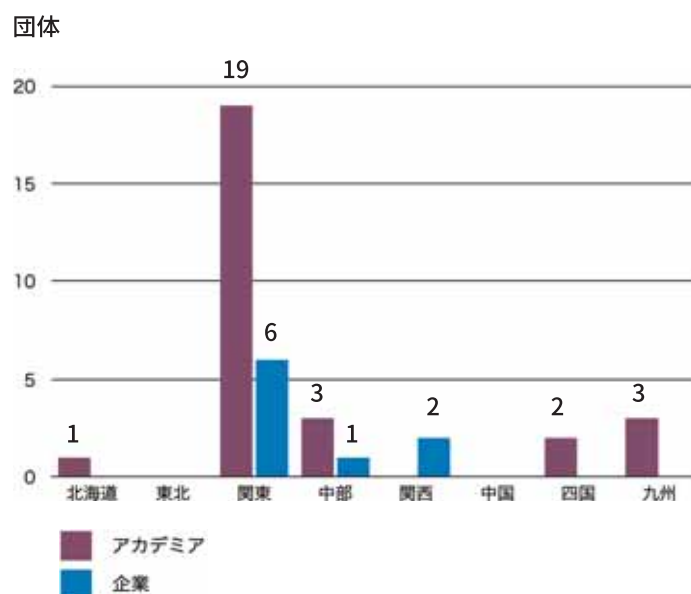
装置利用状況

2021年度上半期 4月～9月（183 days）



装置利用状況（稼働日のみ）

2021年度上半期 4月～9月（145 days）

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～2021年度上半期)地域別利用ユーザー数
(2021年度上半期)

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

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クライオ電顕を利用して出版された論文 2018年4月から2021年9月まで

KEKユーザーとの共同研究の成果

- Minimal protein-only RNase P structure reveals insights into tRNA precursor recognition and catalysis. Teramoto, T., Koyasu, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Numata, T., Senda, T., and Kakuta, Y. J. Biol. Chem. in press (2021).
EMDB-31432@3.62Å

九州大学 角田&寺本&沼田グループとの共同研究。タンパク型RNasePについて、分子量が23kDaと非常に小さいにもかかわらずtRNAを処理できる分子機構を解明。星型の12量体を形成。JBCのEditor's Pickに選ばれた。

- 2.85 and 2.99 Å resolution structures of 110 kDa nitrite reductase determined by 200 kV cryogenic electron microscopy. Adachi, N., Yamaguchi, T., Moriya, T., Kawasaki, M., Koiwai, K., Shinoda, A., Yamada, Y., Yumoto, F., Kohzuma, T., and Senda, T. J. Struct. Biol. in press (2021).
EMDB-0730@2.99Å (EMPIAR-10580), EMDB-0731@2.85Å (EMPIAR-10581)

茨城大学 高妻&山口グループとの共同研究。合計110kDaはクライオ電顕単粒子解析の対象としては小さいが、Box sizeやmask sizeなどを検討することで2.85Åという比較的高い分解能での単粒子解析に成功しました。

- Structural and functional analyses of the tridomain-nonribosomal peptide synthetase FmoA3 for 4-methyloxazoline ring formation. Katsuyama, Y., Sone, K., Harada, A., Kawai, S., Urano, N., Adachi, N., Moriya, T., Kawasaki, M., Shin-Ya, K., Senda, T., and Ohnishi, Y. Angew. Chem. 60, 14554-14562 (2021).
EMDB-30440@3.55Å

東京大学 大西&勝山グループとの共同研究。非リボソームタンパク質FmoA3について、クライオ電顕構造と結晶構造の合わせ技で発表しました。

- Cryo-EM structure of K⁺-bound hERG channel complexed with the blocker astemizole. Asai, T., Adachi, N., Moriya, T., Oki, H., Maru, T., Kawasaki, M., Suzuki, K., Chen, S., Ishii, R., Yonemori, K., Igaki, S., Yasuda, S., Ogasawara, S., Senda, T., and Murata, T. Structure 29, 203-212 (2021).
EMDB-30412@3.90Å (EMPIAR-10628), EMDB-30413@3.70Å (EMPIAR-10629)

千葉大学 村田グループと製薬企業5社（アクセリード株式会社、アステラス製薬株式会社、小野薬品工業株式会社、武田薬品工業株式会社、第一三共RDノバーレ株式会社〔五十音順〕）との共同研究。創薬において副作用の原因となりやすい膜蛋白質hERGについて、アステミゾールとの複合体の単粒子解析を行いました。Structure誌のMost readに選ばれました。



- Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism.

Tojo, S., Zhang, Z., Matsui, H., Tahara, M., Ikeguchi, M., Kochi, M., Kamada, M., Shigematsu, H., Tsutsumi, A., Adachi, N., Shibata, T., Yamamoto, M., Kikkawa, M., Senda, T., Isobe, Y., Ohto, U., and Shimizu, T. *Nature Commun.* 11, 5204 (2020).

EMDB-30002@2.8Å

東京大学 清水&大戸グループとの共同研究。KEKで初期のスクリーニング測定を行った後、SPring-8でさらにスクリーニングを重ね、東大で高分解能のクライオ電顕構造を取得。強い阻害剤との複合体構造をX線結晶解析で、弱い阻害剤との複合体構造をクライオ電顕単粒子解析で解き明かしました。複数のクライオ電顕施設を横断的に利用した好例であり、また、X線と電顕の長所を重ねた成果となりました。

- Crystallographic and cryogenic electron microscopic structures and enzymatic characterization of sulfur oxygenase reductase from *Sulfurisphaera tokodaii*.

Sato, Y., Yabuki, T., Adachi, N., Moriya, T., Arakawa, T., Kawasaki, M., Yamada, C., Senda, T., Fushinobu, S., and Wakagi, T. *J. Struct. Biol. X.* 4, 100030 (2020).

EMDB-30073@2.24Å, EMDB-30362@2.05Å (EMPIAR-10546)

東京大学 伏信&若木グループとの共同研究。KEKクライオ電顕を利用した論文の記念すべき第一号。硫黄酸化還元酵素のクライオ電顕構造と結晶構造の合わせ技。論文発表後、RELION3を用いて2.05Å分解能での単粒子解析に成功。KEKで解析した中では最も高い分解能が得られました。

KEKユーザーによる施設利用の成果

- Cryo-EM structure of the nucleosome core particle containing *Giardia lamblia* histones.

Sato, S., Takizawa, Y., Hoshikawa, F., Dacher, M., Tanaka, H., Tachiwana, H., Kujirai, T., Ikura, Y., Ho, C.H., Adachi, N., Patwal, I., Flaus, A., and Kurumizaka, H. *Nucleic Acids Res.* in press (2021).

EMDB-30591@3.57Å

東京大学 胡桃坂&滝沢グループによる研究成果。寄生虫Nucleosomeについての単粒子解析。DNAの出入口付近の構造が大きくゆらいているため、結晶化は困難であることが予想されます。単粒子解析ならではの成果です。

- DNA polymerase D temporarily connects primase to the CMG-like helicase before interacting with proliferating cell nuclear antigen.

Oki, K., Yamagami, T., Nagata, M., Mayanagi, K., Shirai, T., Adachi, N., Numata, T., Ishino, S., and Ishino, Y. *Nucleic Acids Res.* 49, 4599-4612 (2021).

EMDB-30937@7.1Å

九州大学 石野&沼田&真柳グループによる研究成果。DNAポリメラーゼDとprimaseの複合体構造。2つの複合体が結合した超複合体であるため、結晶化は困難であることが予想されます。単粒子解析ならではの成果です。



学会参加報告

アメリカ結晶学会 2021年7月30日～8月5日 オンライン開催

第71回アメリカ結晶学会（ACA）年次会議で発表されたクライオ電子顕微鏡（以下、クライオ電顕）を利用した構造解析に関連する最新の研究動向を報告します。以下、関連する合計30発表の概要をSPA（単粒子解析）16発表、MicroED 10発表、Cryo-ET 4発表ごとにまとめました。

SPA：ソフトウェア開発に関する発表は全てプロテインダイナミクス解析に関連するものであり、このテーマがホットトピックであることが伺えました。中でも深層学習を応用したCryoDRGNとCryoSPARC 3DFlexが最も実用に近いと感じました。また、CryoDRGNの出力密度マップのボクセル値を利用し系統的なサブユニットの占有率分析をしてコンフォメーション変化を検証する方法の発表がありました。今後注目したいのはCryoDRGNの開発グループの新しい二つの取組みです。

(1)「Cryofold」は、最近のAlphaFold2開発グループの研究成果と同様に、原子構造の生成モデルを深層学習ベースの三次元再構築アルゴリズムの制約条件として利用する。(2) CryoDRGNではコンセンサスマップを必要とせずに複数クラスの初期構造再構築を行う。検証方法関連では、2010年からValidation Task Forceが行なっているモデルチャレンジのまとめた内容が主でした。特に興味を惹かれたのはインタラクティブなSPA向けモデリングツールISOLDE (UCSF ChimeraXのプラグイン)の開発者による発表で、AlphaFold2との統合を目指してその検証結果の説明がされました。新規構造モデルにおいてはAlphaFold2予測構造をモデリングの初期モデルとして利用することを推奨していました。

2021 71st ACA

企業発表では、MiTeGenからは沸騰温度の液体窒素のみを使用して液体エタンを必要としない急速凍結を行う「NANUQ自動プランジクーラー」の研究開発（プランジ直前に液体窒素液面上の冷たいガス層を空気の流れによって取り除く）、Thermo Fisher Scientificからは比較的低価格なスクリーニング向けFEG搭載100kVクライオ電顕「Tundra」でApoferritin 2.6Å、T20S proteasome 3.0Å、GABAA receptor 3.4Å、AAV6 3.0Åの構造決定の発表がありました。

MicroED：本手法の開発を先導しているUCLAのGonen研究グループの関係者による発表が多く（6発表）、その大半の内容はレビュー的なものでした。MicroED構造の登録は2013年以来毎年ほぼ同数の構造が登録され線形に増加しており、まだ爆発的な普及には至っていません。まだ未成熟な本手法を利用するには高度な知識・技術が必要であり、現状では研究グループの数が世界でおよそ20ぐらいに限られてしまっているのが理由です。また、2013年から20種類のタンパク質構造しか決定できていないため近年はタンパク質に重点を置いているようで、mVDAC Transporter Protein等の構造解析の発表がありました。利用・検証している手法は去年とほぼ同じで、Cryo-FIB Milling、Bicells、Lipidic Cubic Phase (LCP)でした。新しい成果としては、PEG400を加えることでLCPをスポンジ相 (Sponge Phase) に変えることでAdenosine A2A receptorの構造を決定しました。

他に目立ったグループは昨年同様ストックホルム大学で、二つの発表がありました。一つはソフトウェア開発を含むデータ計測の自動化に関する発表で、去年からこれといった新しい機能追加はなかった。もう一つは新しいグリッド準備方法「Preassis」の提案で、ブロットング時に吸引圧力をかけることで、より多くの結晶がグリッド上に残り、粘性の高い結晶懸濁液にも対応できるとの発表でした。また、DIALSソフトウェア（MicroEDデータ処理・分析ツール）の開発者によるレビュー的な発表がありました。

Cryo-ET：Cryo-ETに関してはソフトウェア開発関連の発表のみで、未だ一般的なバイオ研究への応用は少ないようです。深層学習を応用したトモグラム三次元像からのタンパク質粒子のピックアップと膜のセグメンテーションを行う「PySeg in Scipion」、電子顕微鏡のビームシフトとイメージシフト機能を利用して一回だけの連続傾斜で複数の領域を同時に取得することで検出効率を向上する手法、AlphaFold2によって予測された原子構造をトモグラム三次元像の密度マップに当てはめタンパク質粒子のピックアップもしくは同定を行う「Visual Proteomics」、Scipionソフトウェアのサブトモグラム平均化パイプライン等の発表がありました。

#acamtg2021

#vACAmTg2021

守屋俊夫



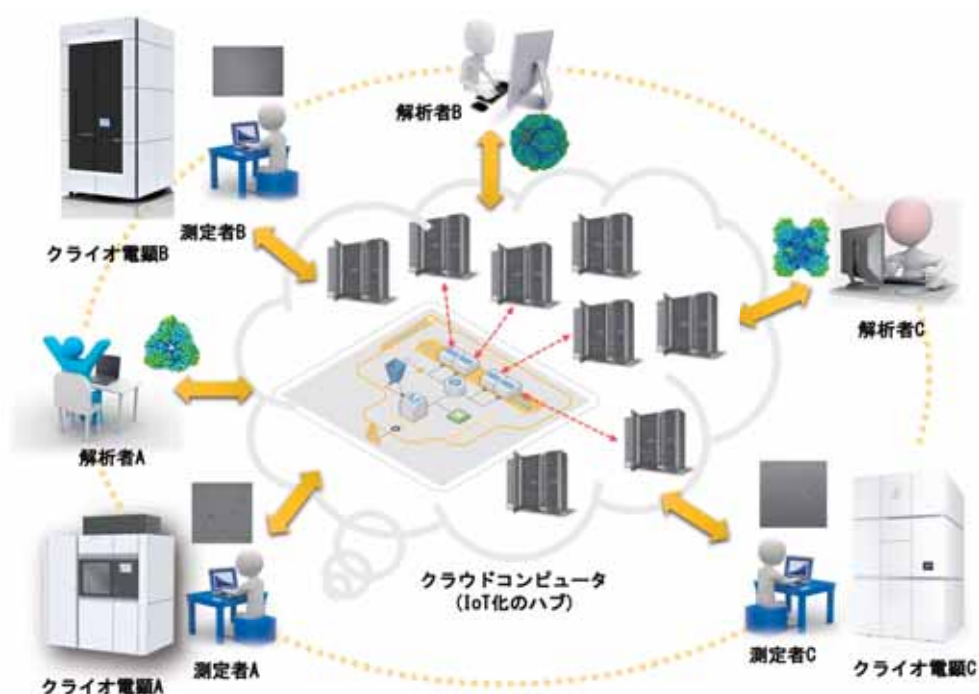
もりや としお / 高エネルギー加速器研究機構
構造生物学研究センター 特任准教授

2021 71st
ACA

AWS ParallelClusterをハブとした クライオ電顕構造ベースの化合物スクリーニング現場のIoT化

新型コロナウイルス感染症対策の反省から、構造ベースのドラッグデザインの要となる化合物スクリーニングにクライオ電顕法も実用できるようになることが望まれています。しかし、本手法は莫大な解析計算量を必要とするため、化合物スクリーニングに必要なスループットが実現できていません。その特徴を最大限に活かすためには、化合物とタンパク質が結合した構造を極短期間で決定するための解析計算基盤を確立する必要があります。そこで我々は、Amazon Web Servicesで提供されているクラウド環境を活用し、クライオ電顕法によるタンパク質構造解析に関わる「もの」、つまり、電子顕微鏡、解析計算ハードウェアとソフトウェア、そして人（測定者、解析者）を繋ぐ解析現場のIoT化に取り組んでいます（下図）。

この取組みでは、無尽蔵の計算資源を提供するクラウドをハブとして利用することで、関連する全ての作業を一元的にモニターすることを目指しています。これによって、一つ一つの作業の詳細をデータベース化し、測定者と解析者のノウハウを蓄積します。その構造解析経験データを利用し、深層学習で構造ベースの化合物スクリーニング工程の完全な自動化を行う計画です。



KEK クライオ電顕メンバー

千田 俊哉
川崎 政人
安達 成彦
守屋 俊夫
池田 聡人
久保田 孝幸

山田 悠介(解析環境)
篠田 晃(技術開発)
鮎川 理恵子(構造生物事務担当)
増田 千穂(クライオ電顕事務担当)

編集後記

KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORTをお読みいただきありがとうございます。

今回初めてKEKクライオ電顕に特化した冊子の制作を行いました。初めての編集作業で四苦八苦しながら作り上げましたが、完成してホッとしております。ホッとするとといえば、私はハワイやフラ（ダンス）が好きで、この編集後記も大好きなハワイアンソングを聴きながらホッと一息しつつ書いています。この冊子をお手元にホッと一息～とはいかないかもしれませんが、お役に立てたら嬉しいです。

そして、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致します。

A HUI HOU!(ハワイ語でまた会いましょうの意味です)

(CM)

KEK×CRYO-EM
ACTIVITY REPORT
VOL.1

KEK
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×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.1

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>