

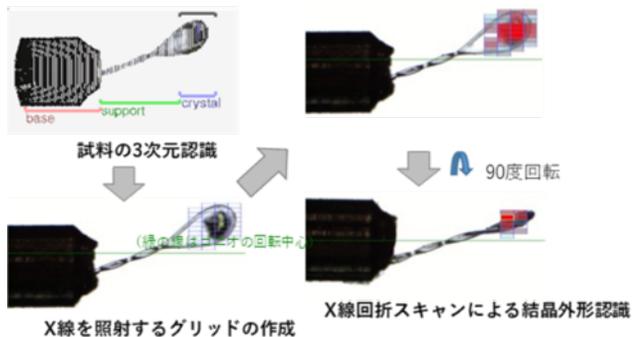
タンパク質結晶構造解析

KEK-PFでは5本の放射光ビームラインを運用し研究支援を行っています
(<https://www2.kek.jp/imss/sbr/beamline/px.html>)

全自動回折データ収集・データ解析

ビームラインに送付された凍結結晶に対して、全自動システムにより回折データ収集とデータ解析が自動的に行われる

X線回折スキャンによる結晶センタリング



PreMoによる実験データ管理と自動データ処理



回折データは実験データ管理システムPreMoによって自動処理され、実験条件等の情報と共にWebブラウザから閲覧可能

リモート実験や、回折データの即時ダウンロードも可能

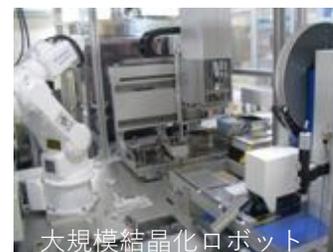


創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)

KEK-PFタンパク質結晶構造解析プラットフォーム
KEK-PF天然タンパク質に含まれる硫黄原子を利用したタンパク質の構造解析
X線結晶構造解析のための全自動大規模結晶化スクリーニング

大規模結晶化スクリーニングシステム

結晶化スクリーニング後In-situ測定を行い、タンパク質結晶かの判別や結晶性について迅速に評価する (LCPIによる膜タンパク質の結晶化にも対応)

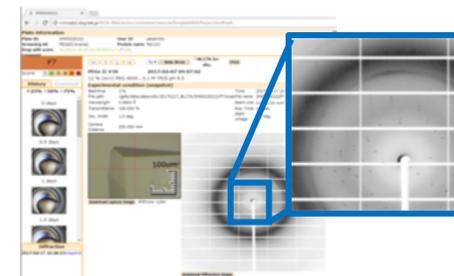


大規模結晶化ロボット



In situ データ測定@BL-17A

結晶化の様子はWEBから閲覧可能
結晶化実験の情報はin-situ測定の情報とともに実験データ管理システムPreMoで管理される

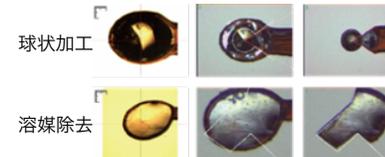


タンパク質結晶加工技術とNative SAD構造決定

試料結晶の加工やヘリウム環境下での回折データ収集などによる高精度測定により、タンパク質に元来含まれる硫黄の異常分散シグナルから構造を決定する



レーザー加工機



球状加工

溶媒除去

タンパク質結晶を波長193nmの深紫外レーザーで任意の形状に加工 (リモート実験可能)



長波長回折実験@BL-1A



松垣直宏
/Naohiro Matsugaki
naohiro.matsugaki@kek.jp



山田悠介
/Yusuke Yamada
yusuke.yamada@kek.jp



引田理英
/Masahide Hikita
masahide.hikita@kek.jp

KEK cryo-EM

2018年3月、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) はAMEDの支援で200kVクライオ電顕 (TFS社 Talos Arctica) を導入し、2018年10月より共同利用型の運用を開始しました。

**ほぼ全てのマシンタイムを外部利用者に供出し、
ほぼ全てのマシンタイムで測定支援を行い、
必要に応じた解析支援を行なっています。**

ご利用希望の方は担当者にメールをご送信ください。

～ご利用の流れ～

<BINDS申請>

担当者に打診のメール・事前打ち合わせ
BINDS支援コンサル申請&支援申請
支援承認→許可→支援開始

<マシンタイム希望日をメールで連絡>

KEKの公開カレンダー参照 (“KEKクライオ電顕”で検索！)

<マシンタイム配分>

各グループ、およそ月1枠を配分
スクリーニング+本測定用として、
1日枠 (800枚以上：火,水,木) か
3日枠 (3000枚以上：金土日) を選択

<実験日の10日前まで>

施設利用申請書を提出
施設利用許可書が発行

<マシンタイム当日>

09:30 構造生物実験準備棟に集合
(持ち物: サンプル, 希釈用Buffer, 4TB HDD)
10:00 グリッド作製 (6枚以内)
11:30 スクリーニング (1枚あたり1時間程度)
17:00 連続測定の設定開始
19:00 連続測定開始・利用報告書提出・解散

<マシンタイム翌日以降>

KEKスタッフがデータをHDDにコピーして返送
後日、KEK事務より請求書を送付させていただきます



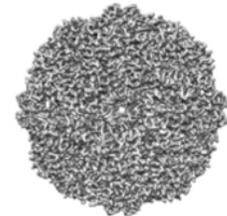
KEKクライオ電子顕微鏡による 単粒子解析に向けたデータ測定

～事前打ち合わせでの質問事項～

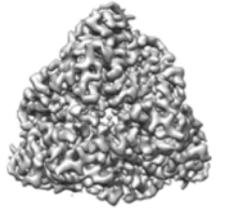
純度 (SDS-PAGEでシングルバンドが望ましい)、**分散性** (ゲルろかやDLSでシングルピークが望ましい)、**濃度** (まずは10-30 μ M, 沈殿の有無)、**体積** (ひとまず15 μ L)、**分子量** (100kDa以上が望ましい)、**対称性** (高い方が解析に有利)、**バッファ条件** (グリセロール濃度10%以上や塩濃度500mM以上は不適)。これまでに負染色像観察をしたことはあるか。複合体ならサブユニット構成の均一性、サブユニット間結合の強さ、結合様式の均一性、形状の均一性、など。

～解析例～

導入から4年間で、5Å以上の分解能のマップを65種類得ています。2022年3月時点で最高到達分解能は2.05Åで、モデルタンパク質であるApoferritinを除けば、200kVクライオ電顕では世界第1位の分解能が得られています。



硫黄酸化還元酵素
860kDa
2.05Å



亜硝酸還元酵素
110kDa
2.85Å

～施設利用料に関するお願い～

消耗品費 (グリッド・液体窒素・液体エタン・HDD) や保守契約費などの確保のため、施設利用料をお願いしています。

アカデミア 4.8万円/日 (+付添測定無料)
企業 24万円/日 (+付添測定24万円/8時間)

～その他のお願い～

クライオ電顕はサンプルの合う合わないが激しいため、初回はラボ内の100kDa・高純度のサンプルを4種類ほどお持ち下さい。スループットが高くない点を体感していただくため、初回はPIの方にも実験への参加をお願いしております。



千田俊哉
/Toshiya Senda
toshiya.senda@kek.jp



川崎政人
/Masato Kawasaki
masato.kawasaki@kek.jp



守屋俊夫
/Toshio Moriya
toshio.moriya@kek.jp