

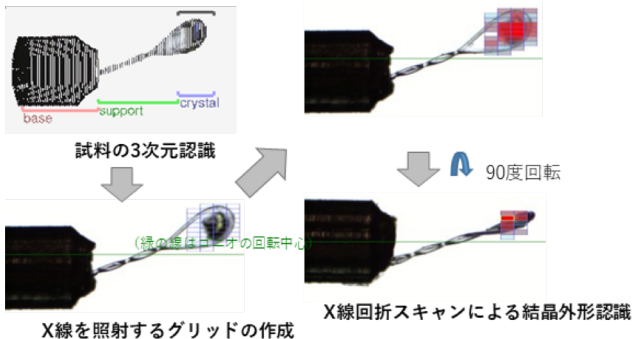
# タンパク質結晶構造解析

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/sbrc/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

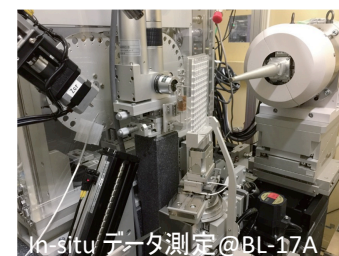
Experiment result

Run	Operator	Project Name	Detector	Image	Diffraction	Resolution	Intensity	Completions	Time
1						Resolution: 40.00	40.00	1.00	1.00
2						Resolution: 30.00	30.00	1.00	1.00
3						Resolution: 20.00	20.00	1.00	1.00
4						Resolution: 15.00	15.00	1.00	1.00
5						Resolution: 10.00	10.00	1.00	1.00
6						Resolution: 8.00	8.00	1.00	1.00

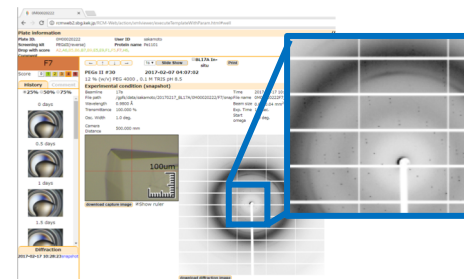
回折データは実験データ管理システムPreMoによって自動処理され、実験条件等の情報と共にWebブラウザから閲覧可能

## 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(LCPによる膜タンパク質の結晶化にも対応)

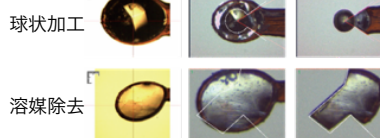
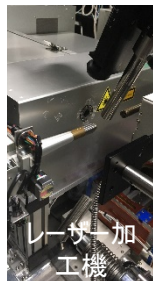


結晶化の様子はWEBから閲覧可能  
結晶化実験の情報はin-situ測定の情報とともに実験データ管理システムPreMoで管理される

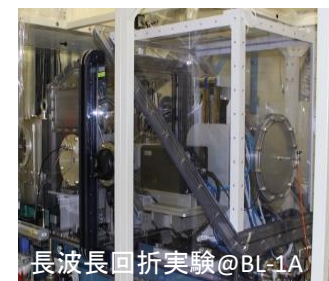


## タンパク質結晶加工技術とNative SAD構造決定

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



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



### 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)

- B2-1 KEK-PFタンパク質結晶構造解析プラットフォーム
- B2-2 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
- C9-1 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



松垣直宏  
/Naohiro Matsugaki  
[naohiro.matsugaki@kek.jp](mailto:naohiro.matsugaki@kek.jp)



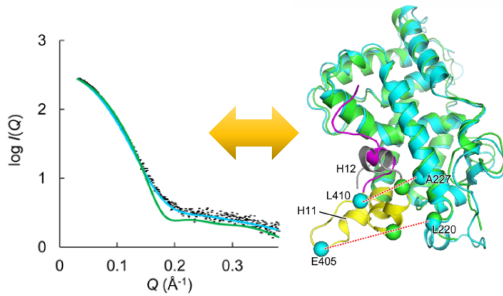
山田悠介  
/Yusuke Yamada  
[yusuke.yamada@kek.jp](mailto:yusuke.yamada@kek.jp)



引田理英  
/Masahide Hikita  
[masahide.hikita@kek.jp](mailto:masahide.hikita@kek.jp)

## BioSAXSを活用した相関構造解析例

- ✓ 溶液中の構造状態(分子サイズ、分子量、会合状態)の推定・評価
- ✓ Ab initioモデリングによる溶液概形解析
- ✓ Rigid bodyモデリングによる結晶構造等を用いた複合体の分子配置解析
- ✓ 溶液中に存在する構造分散とアンサンブルの推定
- ✓ MD-SAXS法による精密溶液構造解析(計算科学との連携)
- ✓ 分子複合系を含む多分散溶液試料の測定・解析
  - ゲル濾過を組み合わせたSEC-SAXS/MALS測定・解析
  - 連続滴定SAXS測定による多成分平衡状態の分子間相互作用解析



●MD-SAXS相関構造解析  
 ビタミンD受容体リガンド結合ドメインの溶液構造解析



←詳細はこちら！

●Ab initio モデリング  
 分子モーターKIF2とTubulin複合体の溶液構造解析



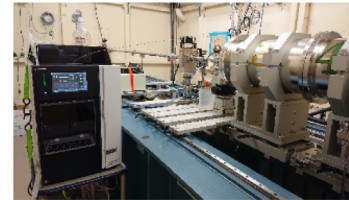
●Rigid bodyモデリング  
 複合tRNAメチル化酵素の溶液構造解析



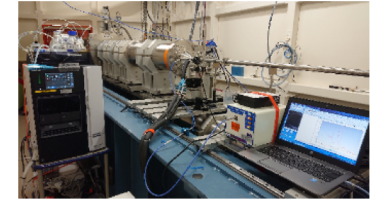
## SAXSビームライン+ BioSAXS最新の測定環境

高精度複合体/分子間相互作用解析

◆ SEC-SAXSシステム  
 @BL-10C



@BL-15A2



溶液中の複数の分子を分離しながら測定・解析

◆ SEC-MALS測定システム



溶液中の分子量や化学両論比の推定

◆ μ流路型自動サンプリングシステム



分子間相互作用/溶液構造解析



創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)

B2-3 KEK-PF生体高分子X線溶液散乱

PFの小角散乱ビームラインではSEC-SAXSや連続滴定SAXSを活用して蛋白質やDNA等の溶液中の生体高分子の構造解析を進めてきました。近年では結晶化しにくい高次複合体や柔軟性の高い蛋白質等も対象にした難易度の高い試料の測定・解析も可能になってきました。溶液中における分子の振る舞いについて明らかにしたい系がございましたら、是非ご相談下さい!!



米澤健人  
 /Kento Yonezawa  
[ykento@post.kek.jp](mailto:ykento@post.kek.jp)



清水伸隆  
 /Nobutaka Shimizu  
[nobutaka.shimizu@kek.jp](mailto:nobutaka.shimizu@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  
スクリーニング用の1日枠 (火,水,木) か  
高分解能データ測定用の3日枠 (金土日) を選択

### <実験日の10日前まで>

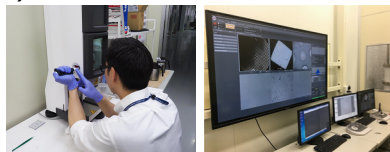
施設利用申請書を提出  
施設利用許可書が発行

### <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



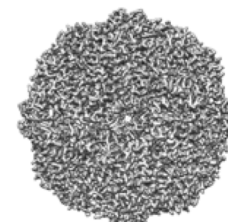
## B2-4 KEKクライオ電子顕微鏡による 単粒子解析に向けたデータ測定

### ～事前打ち合わせでの質問事項～

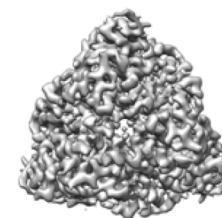
**純度** (SDS-PAGEでシングルバンドが望ましい)、**分散性** (ゲルろかやDLSでシングルピークが望ましい)、**濃度** (まずは10-30 $\mu$ M, 沈殿の有無)、**体積** (ひとまず15 $\mu$ L)、**分子量** (100kDa以上が望ましい)、**対称性** (高い方が解析に有利)、**バッファー条件** (グリセロール濃度10%以上や塩濃度500mM以上は不適)。これまでに負染色像観察をしたことはあるか。複合体ならサブユニット構成の均一性、サブユニット間結合の強さ、結合様式の均一性、形状の均一性、など。

### ～解析例～

導入から26ヶ月で、5Å以上の分解能のマップを27種類得ています。2020年6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Apoferitin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



安達成彦  
/Naruhiko Adachi  
naruhiko.adachi@kek.jp



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