X線結晶学者のためのクライオ電子顕微鏡解析の手引き(6)

KEKの共同利用型クライオ電子顕微鏡の利用方法

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 安達成彦

Naruhiko ADACHI: How to Access the Cryo-EM Facility in KEK

In March 2018, KEK obtained a 200 kV cryogenic electron microscopy (cryo-EM; a Talos Arctica G2 with a Falcon 3EC direct electron detector) and prepared a pipeline for solving high-resolution structures of macromolecular biomolecules, such as proteins, DNA, and RNA. In October 2018, the cryo-EM facility in KEK opened to academic and industrial users. Our mission is three-fold: to provide cryo-EM machine time for external users, to support grid-prep and data collection (and single particle analysis, if needed), and to help users acquire cryo-EM skills. One remarkable result is the single-particle analysis of an 860-kDa enzyme at 2.05 angstrom resolution, which suggested that we had established a proper protocol for cryo-EM operation and single-particle analysis. We will continue to support external users and carry out cryo-EM single particle analysis of macromolecular biomolecules.

1. はじめに

最初に、本記事の趣旨を明らかにするため筆者に関する情報を記す。筆者自身はクライオ電顕の専門家ではない。これまで一分子イメージングを専門とする研究室（早稲田大学 石渡信一博士）、転写制御の分子機構解明を専門とする研究室（東京大学 堀越正美博士）、X線結晶解析を専門とする研究室（高エネルギー加速器研究機構（以下、KEK）千田俊哉博士）に所属し、NMR・X線小角散乱・クライオ電子顕微鏡（以下、クライオ電顕）については専門家と共同研究を行ってきた。2018年3月、KEKにクライオ電顕が導入されたタイミングでクライオ電顕の装置責任者となり、これまで非常に多くの方々からクライオ電顕の実験・管理・運用について学んできた。まだ浅学の身ゆえ、本連載企画のほかの先生方の記事に加えられるような情報は持ち合わせていないが、共同利用型クライオ電顕の運用に関してはほかにあまり例がないと聞いているため、新しい情報を発信できるのではないかと考え本記事の執筆を引き受けた。読者の皆様には「共同利用型クライオ電顕を運用してきた者のメモ書き」という視点でご一読いただきたい。

1.1 クライオ電子顕微鏡に関する世界の状況

2013年、クライオ電顕を用いた単粒子解析により、側鎖が見える分解能のマップが得られた。¹⁾その後、本体・

検出器・測定方法・解析ソフトのさらなる発展を受けて、現在では単粒子解析に適したグリッドさえ用意できれば、高分解能の立体構造解析をルーチンで完遂できるようになった。クライオ電顕の急速な発展と普及を受けて、技術面や理論面で大きな貢献のあった3名の研究者（Jacques Dubochet博士、Joachim Frank博士、Richard Henderson博士）に2017年のノーベル化学賞が授与された。グリッドスクリーニングを容易に行えるオートローダー付き300 kVクライオ電顕の登場は研究スピードをおおいに加速し、2017年の時点で欧米中にはそれぞれ50台以上が設置されていた。さまざまな施設のおよその役割分担としては、大学や研究機関に設置された装置は内部ユーザーやその共同研究者に利用される傾向があり、放射光施設やNational Centerに設置された装置は外部ユーザーに利用される傾向がある。

1.2 クライオ電子顕微鏡に関する国内の状況

2017年の時点で、日本国内におけるオートローダー付き300 kVクライオ電顕の設置台数はわずか5台ほどであった。その後、さまざまな支援と努力によって国内の整備が進み、現在では合計15台近くになりつつある。施設ごとに装置運用の詳細は異なるため、以降はKEKに導入された共同利用型クライオ電顕のみに焦点を絞って紹介する。

2. KEKのクライオ電子顕微鏡について

2.1 KEKにクライオ電顕が設置された経緯

2017年当時、国内のクライオ電顕の台数が少ないという状況を受けて、共同利用型クライオ電顕の設置が望まれた。特に、300 kVクライオ電顕のマシントimeを有効活用するため、「200 kVクライオ電顕でスクリーニングを行い、良好なグリッドを300 kVクライオ電顕で測定する体制の確立」が望まれた。これを受けて2018年3月、放射光施設における共同利用のノウハウを豊富にもつKEKに200 kVクライオ電顕 (Thermo Fisher Scientific社・Talos Arctica G2) が導入された (図1)。一般的に、200 kVクライオ電顕はスクリーニング機と位置付けられているが、KEKでは多くの場合、200 kVクライオ電顕でも十分に側鎖が見える分解能のマップが得られている。KEKでマップを得た後、さらに高分解能のマップを得たい場合は、クライオ電顕ネットワークの枠組みを通して300 kVクライオ電顕を有する他施設を利用することが可能である。

2.2 KEKクライオ電顕のミッション

KEKでは装置導入以降、以下3つのミッションを掲げて共同利用型クライオ電顕を運用している。

- ①アカデミア／企業ユーザーへのマシントime提供
- 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クライオ電顕実験に関する技術導入の支援

2.2.1 ①マシントimeの提供について

KEKクライオ電顕は、外部ユーザーに年間200日以上のマシントimeを供出している。これは装置稼働日のおよそ90%に相当する。実際、2020年度のマシントime配分は、アカデミア167日 (71.4%)、企業43日 (18.4%)、内部利用24日 (10.3%) となっている。企業利用については、KEKが大学共同利用機関であることや設置時の取り決めを踏まえて、マシントime全体の3割を上限としている。

2.2.2 ②グリッド凍結／測定／単粒子解析の支援について

KEKではユーザーにマシントimeを供出するだけでなく、ほぼすべてのマシントimeにスタッフが立ち会い、グリッド凍結とデータ測定を支援している。Zoomなどによるリモート実験にも対応しており、約半数のユーザーに利用されている。リモート実験では、Zoomでディス

カッションしつつKEKスタッフがグリッド凍結やデータ測定を行うため、遠隔地で出張が難しい場合や緊急事態宣言下などで出張が困難な状況であっても研究を進めることが可能である。

なお、次回マシントimeの方針を決めるには、ある程度の解析が必要となるが、KEKにはこれからクライオ電顕実験を始めるユーザーが多く、解析環境が立ち上がっていないグループも多い。そのため、KEKでは必要に応じた解析支援も行っている。以上の支援の結果、外部ユーザーによる成果として、2021年10月までに5 Å以上の分解能のマップを54種類得ており、10報の論文を報告している (例えば2)-11)。

2.2.3 ③技術導入の支援について

KEKではグリッド凍結やデータ測定の技術導入も支援している。独自の初期トレーニング用テキストを作成し、KEKクライオ電顕のweb siteで公開し、2021年10月までに4日間の初期トレーニングを15回開催し、アカデミア33グループ・企業4社への技術導入を支援してきた。

単粒子解析については九工大 安永卓生博士・理研 重松秀樹博士にご協力いただき、RELIONのtutorialに沿った2日間の初心者解析講習会を4回開催してきた (通算178名が受講)。なお、グリッド凍結・データ測定・単粒子解析の技術導入は、KEKスタッフとユーザーの関与の割合が8:2→6:4→5:5→4:6→2:8などとなるよう、段階的に移行する形で進めている。

2.3 KEKクライオ電顕の特徴

KEKクライオ電顕について、他施設とは大きく異なる点を以下に挙げる。

2.3.1 年間200種類程度のサンプルを測定している

クライオ電顕を専門とする研究室と比較すると、KEKはクライオ電顕に関する経験値は低いが、国内の既存のクライオ電顕コミュニティに助けられて今日まで徐々に経験を積み重ねてきた。同時に、年間約50グループの外部ユーザーを受け入れ、年間約200種類のサンプルを測定することで、Case studyという点では非常に豊富な経験を蓄積している。特定のサンプルに対する深い経験は他施設に劣るが、幅広い経験を有することからクライオ電顕実験への入門には適した施設だと思われる。実際、KEKで初期トレーニングを受けた後、近場のクライオ電顕施設を活用するユーザーも一定数いる。

図1 KEKに導入されたクライオ電顕 (Talos Arctica G2)。 (KEK introduced a 200 kV cryo-EM, Talos Arctica G2.) 左から順に、クライオ電顕が導入された建物、電顕室、搬入の様子、設置の様子、設置後の様子。

2.3.2 年間200日以上の有料運転を行っている

急な装置トラブルなどで予約日に測定ができなくなると、苦労して精製した貴重なサンプルが無駄になることもある。有料で運転を行う場合、そのようなことが何度か繰り返されれば信頼が損なわれ、予約制度自体が成立しなくなる。KEKでは故障によるダウンタイムを極力減らすために、装置の用途をほぼ単粒子解析のみに限定し、また、事前に十分なトレーニングを受けた者だけがグリッド凍結やデータ測定を行うこととしている。年間200日以上の有料運転を行っているクライオ電顕施設は世界的にも稀で(2020年度は210日を外部ユーザーに供出)、この点においても豊富な経験を蓄積している点がKEKクライオ電顕の特徴である。

2.3.3 クライオ電顕での構造決定にこだわらない

これまでKEKクライオ電顕を運用してきた経験では、クライオ電顕はサンプルの選り好みが多い。結晶化のようにロボットで1日700条件の系統的なスクリーニングをできるのであれば条件の最適化が可能であるが、現状では1日に観察できるグリッド枚数は6～8枚程度であり、マシンタイムも月に1回程度であることから、結果的に月6～8条件しか検討できない。膜タンパク質や巨大複合体のように結晶化が絶望的に難しいものはクライオ電顕一択となるだろうが、合計分子量が100 kDa以上であればX線結晶構造解析やX線小角散乱を目指して精製を行い、余りのサンプルをクライオ電顕で観察し、最も早く立体構造情報が得られた方法で論文発表することを推奨している。量的な見積もりを述べると、結晶化の初期スクリーニングやX線小角散乱の測定に必要なサンプル量はおよそ100 μ Mが100 μ L程度である一方で、クライオ電顕のグリッド1枚に必要なサンプル量は10～30 μ Mが3 μ Lなので、結晶化やX線小角散乱のために調製したサンプルの余りでクライオ電顕の実験が可能である。複数の構造解析手法を選べる点は、放射光施設に設置されたクライオ電顕の大きな特徴であり、実際、KEKクライオ電顕のユーザーの論文は、結晶構造とクライオ電顕構造の双方を含むものが多い^{2),3),5),7)–9)}

2.3.4 共同利用型の運用

共同研究型のクライオ電顕の場合、例えばタンパク質Aをすでに共同研究として受け入れている場合、他グループが同一のタンパク質Aについて申し込むことはきわめて難しい。KEKクライオ電顕は共同利用型の運用であるため、放射光施設と同様、同一の解析対象を複数受け入れることが可能である。

2.3.5 内部ユーザーによる高度化

KEKクライオ電顕では、放射光施設のスタッフが各々のバックグラウンドを活かしてクライオ電顕に関する技術の高度化を行っている。クラウド解析環境の構築、microED、小型グリッド凍結装置の開発、解析最適化法

の提案、特殊ペプチドの利用などが進められている。

3. KEKクライオ電顕の利用方法

3.1 申し込みとマシンタイム配分の流れ

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ある。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」が一般的である。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る。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1から第3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る。配分は各グループ当たり1～2ヶ月に1枠で、透明性を高める目的ですべての予定をKEKクライオ電顕のweb siteで公開している。マシンタイム当日は、サンプル・希釈用バッファ・HDDをご持参いただいている。このほか、現地での濃縮が必要な場合は濃縮ユニットをご持参いただいている。グリッド・ピペットマン・チップ・1.5 mLチューブ・ブロックインキュベーター・小型遠心器はKEKにて用意している。

3.2 KEKクライオ電顕の1週間の流れ

KEKクライオ電顕の1週間の流れは、おおよそ、月曜日にメンテナンス、火・水・木曜日に1日枠×3(本測定、800枚程度の画像を撮影)、金土日曜日が3日枠×1(本測定、3,000枚程度の画像を撮影)となっている。月曜日のメンテナンス後は、半日枠で内部利用としている。

3.3 KEKクライオ電顕の1日の流れ

KEKクライオ電顕のマシンタイム当日の流れは、

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枚当たり約1時間)

18:00 ころから overnight/over weekendの測定開始となっている。ユーザーは9:30に集合もしくはzoomに接続し、18:00 ころに解散する流れとなっている。測定データについては、翌日以降、ユーザーの持ち込んだHDDにKEKスタッフがコピーし、着払いで返送している。リモート実験の場合、サンプルは前日までに到着するよう、凍結または溶液の状態で郵送していただいている。

3.4 KEKクライオ電顕の利用料金

クライオ電顕実験においては、1日に使う消耗品が、グリッド6セット24,000円、液体窒素10,000円など高額であるため、ユーザーには施設利用料をご負担いただいている。2021年11月時点で、アカデミアユーザーは消耗品実費相当として48,000円/日、企業ユーザーは消耗品・保守費・スタッフ付添費などとして480,000円/日をご

負担いただいている。

4. KEK クライオ電顕の運用を通して得られた tips

五月雨式となるが、単粒子解析に用いるサンプルの必要条件やグリッドの改善方法について、共同利用型クライオ電顕の運用を通して得られた tips を以下にまとめる。

4.1 初回に準備するサンプルについて

単粒子解析のサンプルに要求される条件として、高濃度・高純度・単分散という点は結晶化と似ている。なのでまずは結晶化を目指して精製するのがよい。ただしクライオ電顕ではこのほかに、カーボン膜・濾紙・薄い氷との相性などが要求されるため、結晶化に適したサンプルが必ずしもクライオ電顕に適しているわけではない。この点を踏まえて、支援開始前の事前打ち合わせでは、サンプルに関する科学的背景のほかに、以下の事項を質問し、基本的には、結晶化グレードの精製標品を 10~30 μM で 15 μL 程度準備するよう提案している。

純度：SDS-PAGE でコンタミバンドがないことが望ましい

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 μM 前後（濃縮して沈澱しないか）

体積：15 μL あれば十分

種類：可溶性タンパク質であるか膜タンパク質であるか

分子量：100 kDa 以上が望ましい

対称性：対称性があつたほうが測定や解析が楽になる

バッファ条件：Glycerol 1 % 以下、塩濃度 500 mM 以下が望ましい

その他：ネガステで見たことがあるか、複合体の場合はサブユニット構成、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

上記の情報をお知らせいただいたからといって、いきなり素晴らしいグリッドを作れるわけではないが、分子量からおよそのサイズを推定できるので、測定時に見えたものが目的のサンプルであるかを判断する手がかりとなる。

なお、10~30 μM という濃度はクライオ電顕実験としては濃い濃度であるが、KEK で支援を行ってきた経験から、(i) 薄くて何も見えないと次の一手を考えにくいこと、(ii) タンパク濃度が濃いほうが薄い氷が張りやすい傾向があること、(iii) PF ユーザーにとっては 10~30 μM はそれほど濃い濃度ではないこと、から、KEK では 10~30 μM で初回の測定を行い、余裕があれば希釈したものも同時に測定している。

4.2 グリッドの改善（一般論）

単粒子解析で高分解能の map を得るためには、

- ・氷が張ること
- ・氷の中にサンプルが入ること
- ・粒子間隔が適度であること
- ・画面上に十分な粒子数があること

- ・氷の厚みが適度であること
- ・粒子の向きが揃いすぎていること
- ・粒子の形状や構成が均一であること

が必要である。逆にこれらの条件が満たされない場合、初心者が限られたマシンタイムで状況を改善していくことはきわめて困難である。KEK では、初回のマシンタイムでは、ユーザーの研究対象の中から 100 kDa 以上のサンプルを 4 つほど選んで、クライオ電顕で試し見していただいている。そして 1 周目については、たとえ結晶構造が解けていたとしても最も良好なサンプルについて実験を進めることを推奨している。結晶構造が解けているサンプルについてデータ測定や単粒子解析を進めることは、一見遠回りに見えるかもしれないが、ユーザーが性状や立体構造を熟知しているサンプルをポジコンとすることで、グリッド凍結の条件改善や単粒子解析が非常にスムーズに進む。また、map が得られた後の構造精密化が非常に迅速に進められる点も大きなメリットである。このようにして一度クライオ電顕実験の全体像を見渡すことによって、クライオ電顕実験ではどういう問題が起こりやすいか、どのステップがボトルネックとなりやすいかがわかるので、以降の研究計画を立てやすくなる。もし論文が必要であれば、相互作用因子や低分子との複合体を試みるよう提案している。

1 周目に本命サンプルに着手できた場合は良いが、そうでなかった場合、本命サンプルは 2 周目以降に行うことを推奨している。実際に KEK のユーザーも、1 周目は様子を見ながら実験を進めているが、2 周目からはこちらが驚くほどクライオ電顕実験に適応し、限られたマシンタイムで的確に条件を最適化し、単粒子解析を成功させている。

4.3 グリッドの改善（可溶性タンパク質の場合）

理想的には氷が薄ければ薄いほどバッファ由来のノイズが少なくなるので、高分解能の単粒子解析に適したデータが得られる。しかし、氷が薄すぎるとサンプルにさまざまな悪影響が発生するため、サンプルに応じて適切な氷の厚みを探す必要がある。KEK ではスクリーニング測定において常に、氷の薄い Square・中間 Square・厚い Square から 3 hole ずつ測定することで、氷の厚みと粒子の分布の相関を見出すようにしている。以下にスクリーニング測定で生じやすい問題とその対応策を記す（図 2）。

4.3.1 氷が張らない

可溶性タンパク質のグリッド凍結において最初に問題になるのは、氷が張らなかつたり、氷が張ったとしても厚い氷しか張らないことである。一般的に、タンパク濃度を上げると薄い氷が張りやすくなるため、この問題は解消することが多い。界面活性剤を添加すると氷は張りやすくなるが、粒の入り方やサンプル自体に悪影響を与

図2 グリッドの改善に関するフローチャート. (Flowchart for improvement of the cryo-grid preparation.)

える場合もあり一長一短である。

4.3.2 氷の中にサンプルが入らない

次に問題となるのは、氷の中にサンプルが入らないことである。一般的な傾向としては、同じタンパク濃度なら氷が厚いほうが粒は入りやすい。タンパク濃度を上げると氷が薄い領域にも粒が入るようになるが、上げすぎると粒同士がくっついてしまったり、上下で重なってしまったり、凝集したりしてしまう。この場合、粒子間隔を適度にするためには適度に希釈する必要があるが、希釈していくとどこかの段階で氷が張らなくなってしまう。4.3.1と4.3.2の内容を簡単にまとめると、
タンパク濃度高い：薄い氷が張りやすいが粒子が密になる
タンパク濃度低い：薄い氷が張りにくい粒子が粗になる
となるので、タンパク濃度については氷が張る範囲内で、解析可能な粒子間隔となるような妥協点を探すことになる。

4.3.3 氷の中でサンプルが凝集してしまう

次に問題となるのは、サンプルの凝集である。クライオグリッドの作製は、サンプルをグリッドにアプライした後、ろ紙でサンプルを吸うことでHoleに薄い水の膜を張り、液体エタンで瞬間凍結するという手順で行う。この過程で「薄い水の膜」という段階が問題の元凶で、薄い水の膜が形成されてから凍結されるまでの間、サンプルが気液界面と衝突するため、溶液中では凝集していなかったサンプルでも、グリッド上では凝集してしまうことが頻繁に見られる。

この問題は、単純にタンパク濃度を希釈すれば解決する場合もあるが、凝集した塊が点在するだけで粒が分離しないことも多々ある。こうなった場合、サンプルによって対策は異なるが、例えば、凍結融解の回数減、精製してからグリッド凍結までの時間短縮、生物種の変更、界面活性剤の添加、Glycerolの添加、塩濃度の変更、タグの付加／切除、Arg/Asp/Gluなどの添加、基質や相互作用因子の添加、グリッドの素材変更、などで改善するこ

とがある。サンプルによっては、凍結融解を嫌うものもあるので、精製後に凍結せず、4度で保存してグリッド凍結を行うと良い場合もある。ごく稀に、タンパク濃度を高くすると、氷が薄い領域に凝集していない粒が入ることもある。

4.3.4 氷の中でサンプルが変性してしまう

クライオグリッドの薄い氷の中でサンプルが変性してしまうこともよくある。その場合、氷がやや厚い領域を撮影することで改善できることがある。もしくは、低分子や相互作用因子を添加すると変性を防げる場合がある。力技としては、撮影枚数を増やすことでわずかに生き残った粒を拾い集めて単粒子解析する方向性もある。

4.3.5 氷の中でサンプルの向きが揃ってしまう

クライオグリッドの氷の中でサンプルの向きが揃ってしまうことも多々ある。この場合、少し氷が厚い領域を撮影することで、粒子の向きにバリエーションが生じることがある。もしくは、タンパク濃度を上げると氷が薄い領域に粒が入り、粒子の向きにバリエーションが生じることがある。例外的に、二次元結晶のようになって向きが揃うこともあるが、その場合はタンパク濃度を下げると解消することが多い。

4.3.6 サンプルの一部が外れてしまう／見えない

特にタンパク質－核酸複合体などは、氷が薄い領域で解離しやすいが、氷がやや厚い領域を撮影すると改善することがある。その場合は300 kVクライオ電顕で測定すると分解能が上がる人が多い。その他、低分子や相互作用因子を添加したり、バッファー条件を変更することで改善することもある。架橋により相互作用を安定化することも可能であるが、架橋によって新たな問題が生じたり、結果的に分解能が上がらなくなることがあるため、ほかの手段でうまくいかない場合に提案している。

4.4 グリッドの改善（膜タンパク質の場合）

KEKクライオ電顕では膜タンパク質の測定例はそこ

まで多くないが、これまでの6例ほどの成功例を踏まえてコメントする。膜タンパク質には界面活性剤が入っている影響か、グリッド凍結において薄い氷がきれいに張る傾向がある。氷の中に粒子が入っていない場合はタンパク濃度を上げると改善することが多い。粒同士がくっつく場合は、塩濃度などを調整しても良いが、膜タンパク質の場合、界面活性剤の種類を検討すると劇的に改善することが多い。また、一度濃縮してから希釈すると凝集したまま粒が分離しない場合があるので、濃縮の途中で分注したほうが良いこともある。また、Nanodisc化によって状況が改善する場合もある。

4.5 その他の注意点

重要な注意点は、クライオグリッドで見える状況が、必ずしも溶液中の状況を反映しているわけではない点である。クライオグリッドで凝集していたからといって、溶液中で凝集しているわけではないし、クライオグリッドでサイズの揃った粒が見えたからといって、溶液中でもそうであるとは限らない(サイズの揃った粒がたまたま薄い氷に入りやすかったという可能性を否定できない)。よって、クライオ電顕の画像から量比を算出したり、粒径分布を出すことはKEKでは行っていない。あくまで、「視野の範囲ではそうだった」というだけで、視野の範囲外がどうなっているかはわからない。

また、専門用語について、X線結晶解析とクライオ電顕単粒子解析は似ているようでところどころ異なるため、結晶構造の専門家と単粒子解析の専門家が議論する際には注意を要する。たまに同じ単語がまったく異なる事柄を指していることがあり、それが議論のすれ違いの原因となることもある。例えば、対称性・モデル・精密化などは典型例なので、違和感を感じたら言葉の定義を確かめ合うのが良い。

5. 最後に

5.1 今後の予定

KEKクライオ電顕では、2021年10月前半に検出器をFalcon 3ECからFalcon 4へとupgradeした。KEKで測定した多くのサンプルは、本格的な単粒子解析に1,000～1,500枚程度の画像を使っているが、1日枠の場合、Falcon 3EC検出器によるovernight測定(約16時間)では400枚程度しか撮影できなかった。そのため、これまでは週中の1日枠でスクリーニング、週末の3日枠で本測定とせざるを得なかったため、スクリーニング測定でせっかく良いグリッドができて、本測定には次のマシンタイムまで1ヶ月以上も待たなければならなかった。新しく導入されたFalcon 4はovernightで800～3,200枚程度の撮影が可能となり、これからはスクリーニングを行った1日枠でそのまま本測定が可能となり、より効率的な運用が可能となる。

このほか、KEKでは2022年3月、放射光施設とwet labの間にクライオ電顕実験棟を新営する。場所的に近接することで、今後、ビームライン・クライオ電顕・wet labの連携をより一層緊密に行っていく計画である。

5.2 今後の課題

国内の300 kVクライオ電顕の台数は増え、検出器や測定法の発展により単位時間当たりの撮影枚数は増えた。これに伴い、測定を支援するオペレーターや、データ解析のための計算資源・解析担当者が相対的に足りなくなっている。計算資源については、クラウド解析環境の構築やスーパーコンピュータの活用などが1つの解決策となるだろう。オペレーターや解析担当者については一朝一夕に育成できるものではないため、KEKでは内外の人材をOJT(On the Job Training)形式で育成している。ただし、KEKにある装置は限られており、手法にも限りがあるため、KEKをクライオ電顕実験の入り口として、より専門的な研究室と交流をもってもらえればと考えている。最後に、クライオ電顕の技術的発展はあまりにも著しく、特に共同利用型施設に関しては、解析環境を含めた整備・事務手続きを含めた支援体制・施設内外の人材育成などといった点で過渡期という印象を受ける。今後も本分野の発展に少しでも貢献できれば幸いである。最後に、KEKクライオ電顕にかかわる過去と現在のメンバーに深く感謝申し上げたい。

文 献

- 1) M. Liao, *et al.*: *Nature* **504**, 107 (2013).
- 2) Y. Sato, *et al.*: *JSB-X* **4**, 100030 (2020).
- 3) S. Tojo, *et al.*: *Nature Commun.* **11**, 5204 (2020).
- 4) T. Asai, *et al.*: *Structure* **29**, 203 (2021).
- 5) Y. Katsuyama, *et al.*: *Angew. Chem.* **60**, 14554 (2021).
- 6) N. Adachi, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **213**, 107768 (2021).
- 7) T. Teramoto, *et al.*: *J. Biol. Chem.* **297**, 101028 (2021).
- 8) T. Minato, *et al.*: *Commun. Biol.* **4**, 1238 (2021).
- 9) T. Mori, *et al.*: *Nature Commun.* **12**, 6294 (2021).
- 10) K. Oki, *et al.*: *Nucleic Acids Res.* **49**, 4599 (2021).
- 11) S. Sato, *et al.*: *Nucleic Acids Res.* **49**, 8934 (2021).

プロフィール

安達成彦 Naruhiko ADACHI
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
Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization
〒305-0801 茨城県つくば市大穂1-1
1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan
e-mail: naruhiko.adachi@kek.jp
最終学歴：早稲田大学・理工学部・物理学科
専門分野：転写制御機構、構造生物学、分子進化
現在の研究テーマ：クライオ電顕単粒子解析
趣味：粒子のManual Pick