

京都大学北部キャンパス機器分析拠点セミナーシリーズ 第8回「構造解析セミナー：タンパク質結晶と生体材料について」

I. 「タンパク質結晶構造解析システム」 (高輝度単結晶X線構造解析装置 A28)

使用責任者 橋本渉 教授

1996 ~ 2019 マルチワイヤーデテクター (Bruker)

2020 ~ D8 Quest システム (Bruker)



タンパク質のX線結晶構造解析の原理と実際

1. タンパク質の結晶構造解析とは
2. 結晶からのX線の回折と構造解析
3. タンパク質の結晶化
4. 回折データの測定の実際 (凍結測定と常温測定)

X線を用いる理由

見える限界は用いる電磁波の波長程度

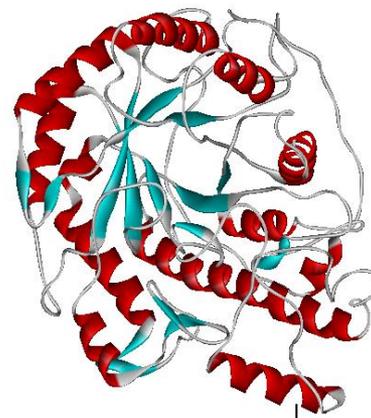
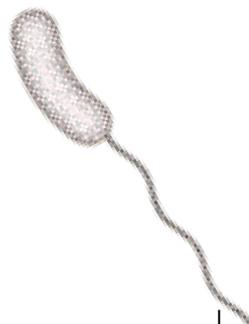
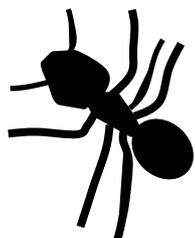
ひと

アリ

細菌

タンパク質

水分子



m

mm

μm

nm

\AA

1/1000

1/1000

1/1000

1/10

電磁波(光)の波長

電波

中波 短波

センチ波

ミリ波

赤外線



可視光

紫外線

X線(γ 線)

タンパク質の結晶化とX線結晶構造解析の歴史

結晶化

最初のタンパク質の結晶化
(1840, Hünefeld)

植物種子タンパク質の結晶化
卵白アルブミンの結晶化

ウレアーゼの結晶化
(1926, Sumner)

イオン交換樹脂(1950~)
PAGE(1964~)
SDS電気泳動(1970~)

結晶化の目的は昔は精製法、
純度検定、今は構造解析

X線結晶構造解析

空間群の発見
結晶学の確立

X線の発見(1895, Roentgen)

結晶によるX線の回折現象(1912, Laue)

X線による原子構造の決定(1913, Bragg)

低分子の構造解析

ペプシン結晶の回折像
(1934, Bernal & Hodgkin)

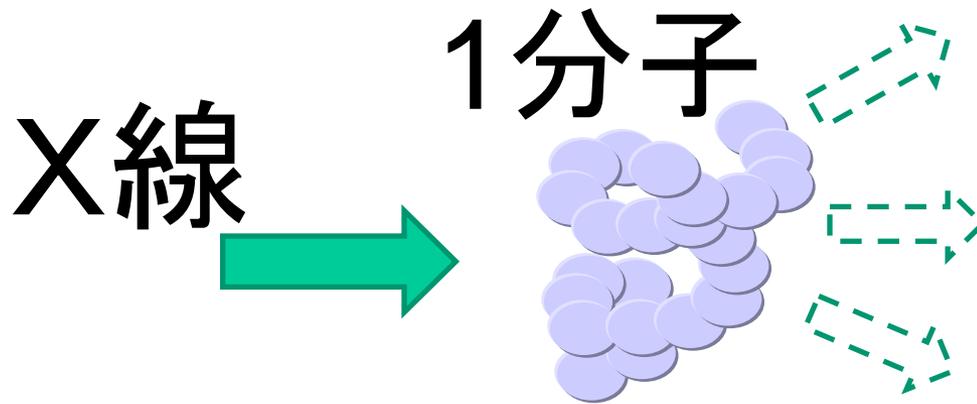
ミオグロビン, ヘモグロビンの構造解析
(1960, Perutz & Kendrew)

リゾチームの構造解析(1965, Phillips)
PDBの設立(1971)

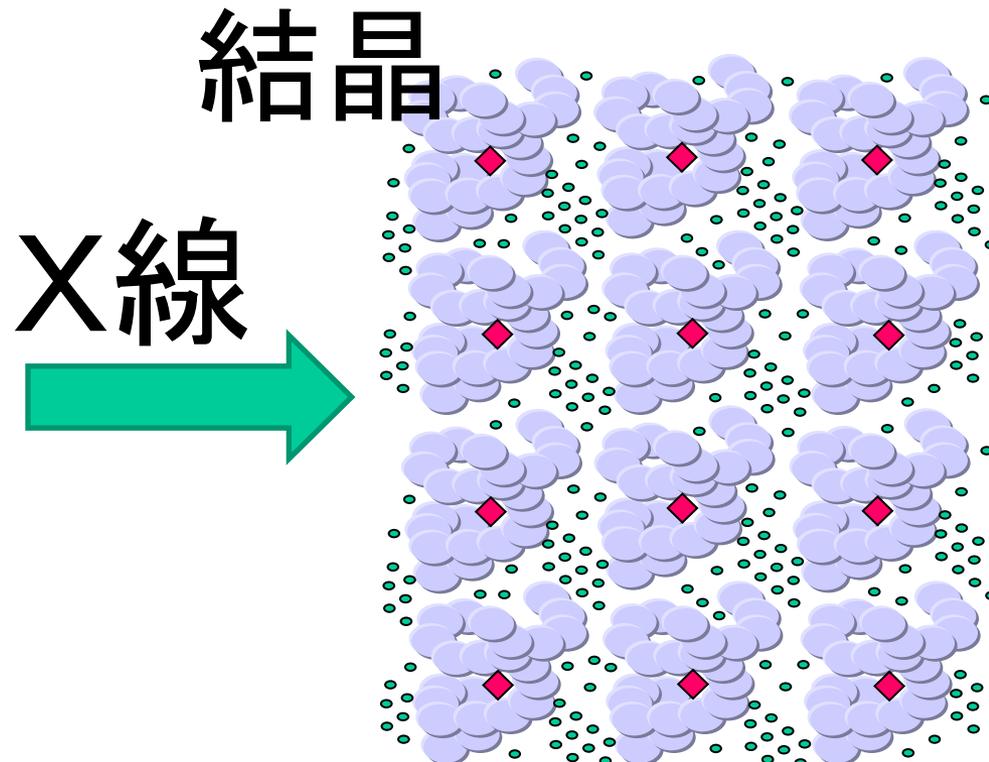
シンクロトロンの利用(1974~)

結晶凍結法の普及(1991~)

X線を結晶に当てると回折点が測定
できる。



弱い散乱
(測定不能)



強い回折点
(測定可)

X線回折法

単結晶法 → 原子構造

粉末法 → 物質の同定等

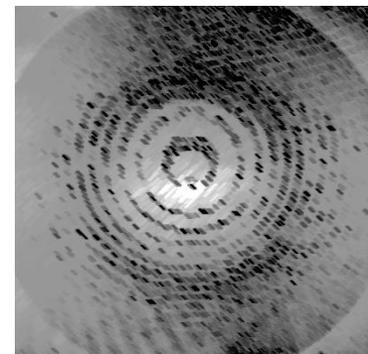
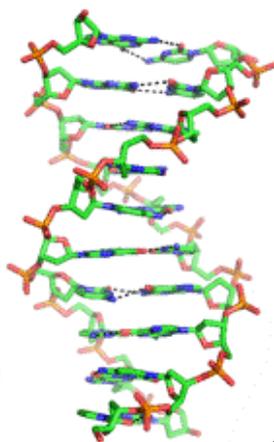
繊維写真法 → 繊維の周期

繊維タンパク質

DNA

J.D Watson,
F. Crick 1953

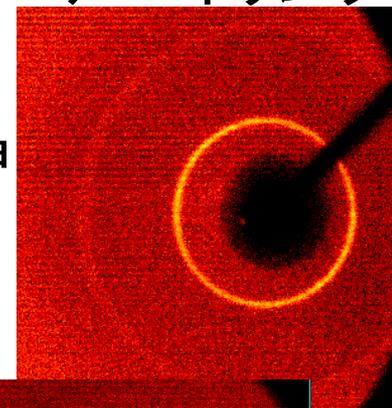
PDB 1CGC



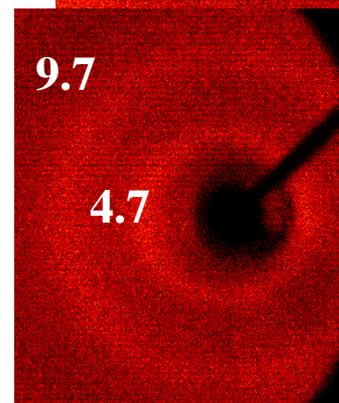
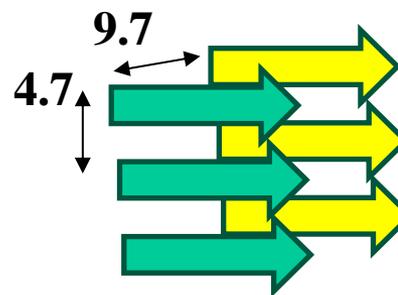
単結晶
回折点

デバイリング

粉末結晶
多結晶

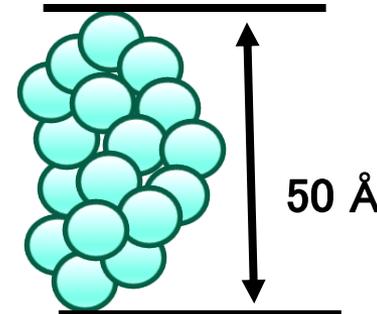
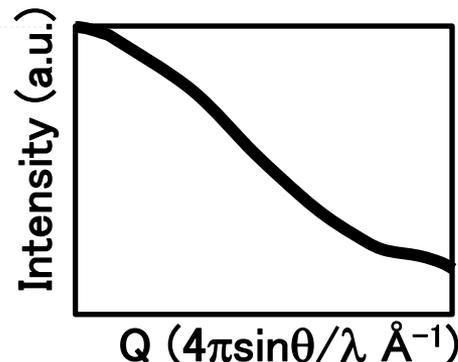


アミロイド

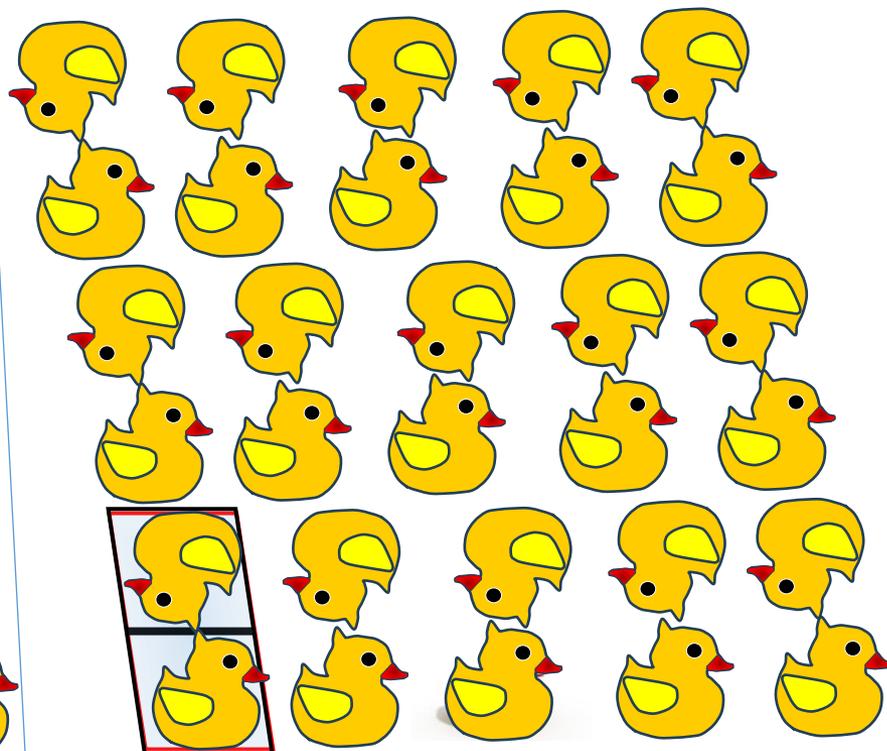
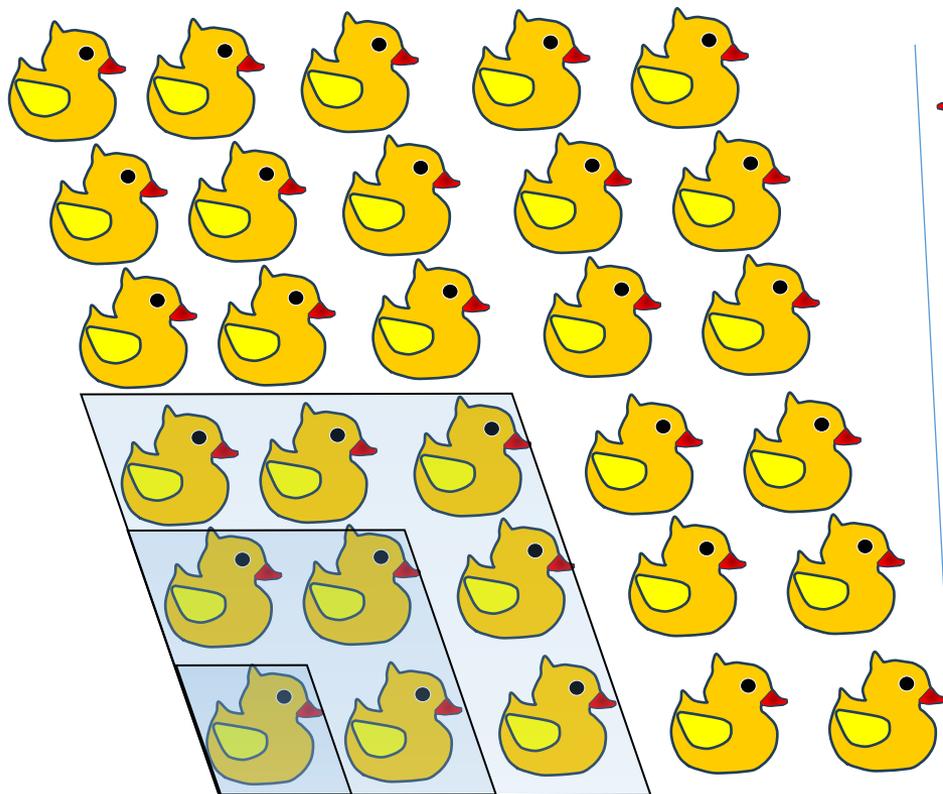


SAXS (X線小角散乱)

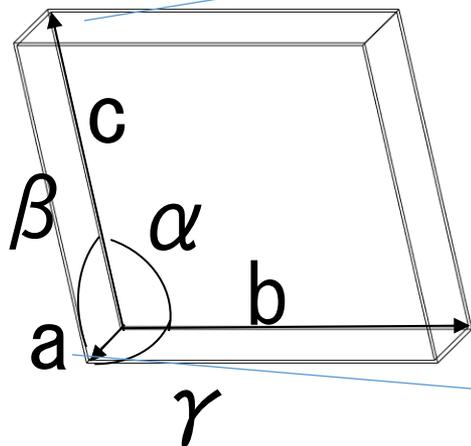
→ 分子形、会合状態



結晶の模式図



単位格子
(平行6面体)

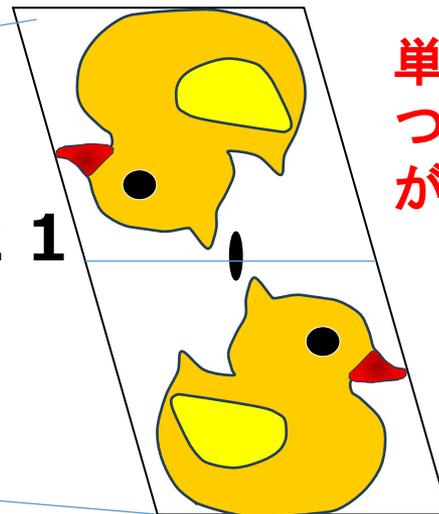


$P\ 1\ 2\ 1$
 $P2$

単位格子の中に2
つの非対称単位
がある

対称性によって
空間群に分けら
れる

格子定数
a, b, c の長さ と
 α , β , γ の角度



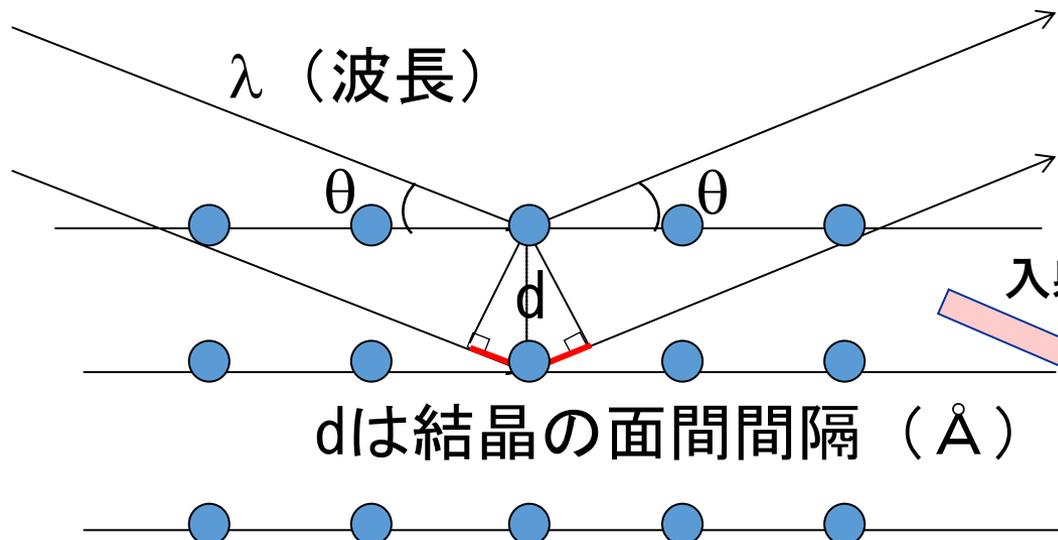
岩塩



1895年 W. Conrad Röntgen によるX線の発見

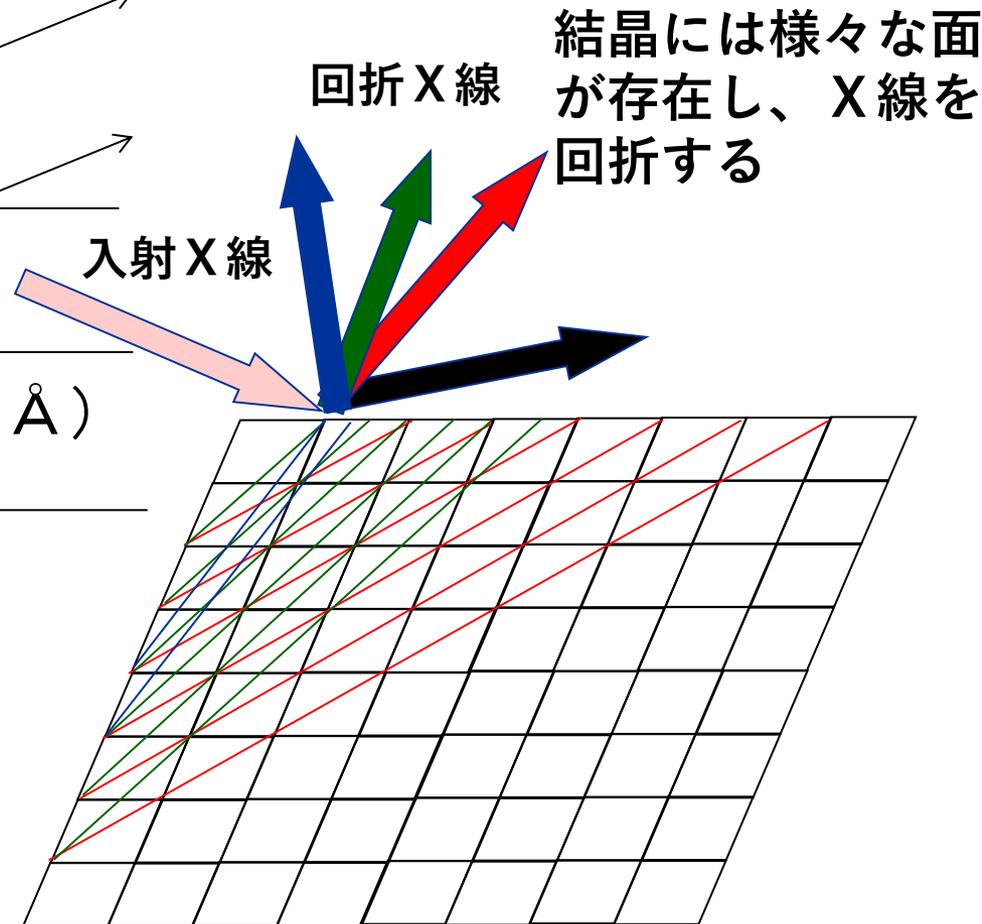
1912年 Max von Laueによる結晶からのX線回折現象の発見

1913年 Bragg親子 (W. Lawrence Bragg, W. Henry Bragg) は岩塩を用いてX線の回折現象を研究, 構造解析の基礎を築く

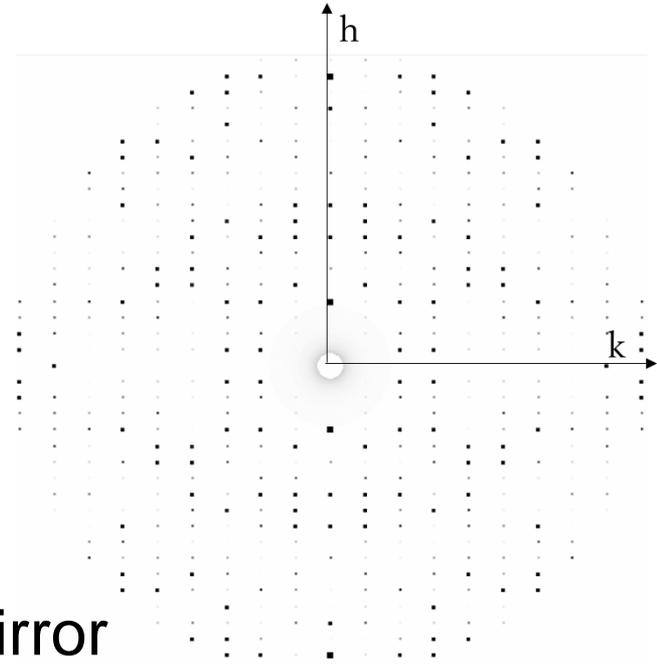
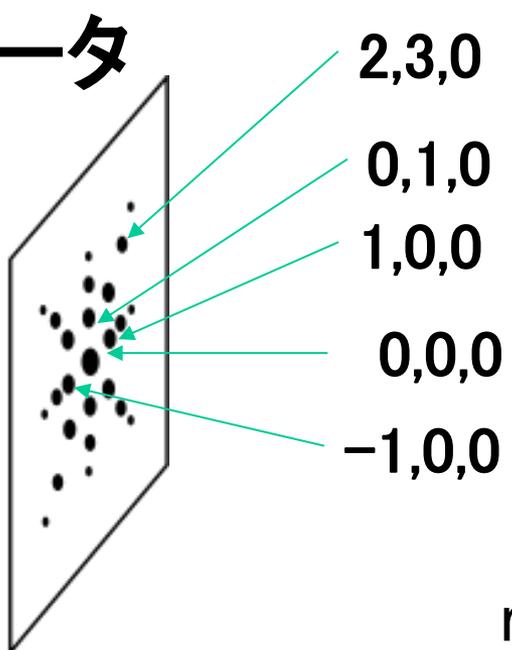
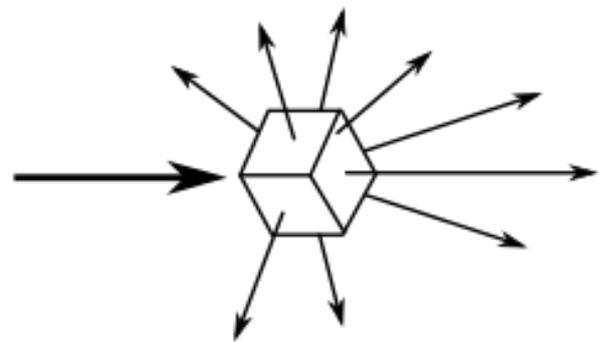


光路差 = $2d \sin \theta$

回折条件 $2d \sin \theta = n\lambda$
(Bragg の式)



指数づけと回折データ



mirror

$$|I(h,k,l)| = |F(h,k,l)|^2$$

86.324 86.324 144.719 90.000 90.000 120.000 p3121 格子定数と空間群

1	0	-4	9214.1	458.6
1	0	-3	1362.7	33.0
2	-1	1	1022.7	19.8
2	-1	2	3486.5	67.2
2	-1	3	2660.4	45.7
2	-1	4	1125.9	19.5
2	-1	5	373.4	7.1
2	-1	6	1948.4	68.0

指数 強度 バックグラウンドの強度

$h, k, l, I, \sigma(I)$

あるいは

指数 構造因子 Fのバックグラウンド

$h, k, l, F, \sigma(F)$

基本の式

1. 回折条件 $2d\sin\theta = n\lambda$ (Bragg の式)

2. 構造因子は波の振幅 回折強度から求める

$$|F(h,k,l)|^2 = I(h,k,l)$$

3. 結晶の構造因子は原子散乱因子の足し合わせ

$$F(h,k,l) = \sum f_n e^{2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)} = \sum \sum \sum \rho(x,y,z) e^{2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)}$$

4. 電子密度は構造因子の逆フーリエ変換

$$\rho(x,y,z) = 1/V \cdot \sum \sum \sum F(h,k,l) e^{-2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)}$$

分子構造！

$$F(h,k,l) = |F(h,k,l)| \exp(i\phi_{h,k,l})$$

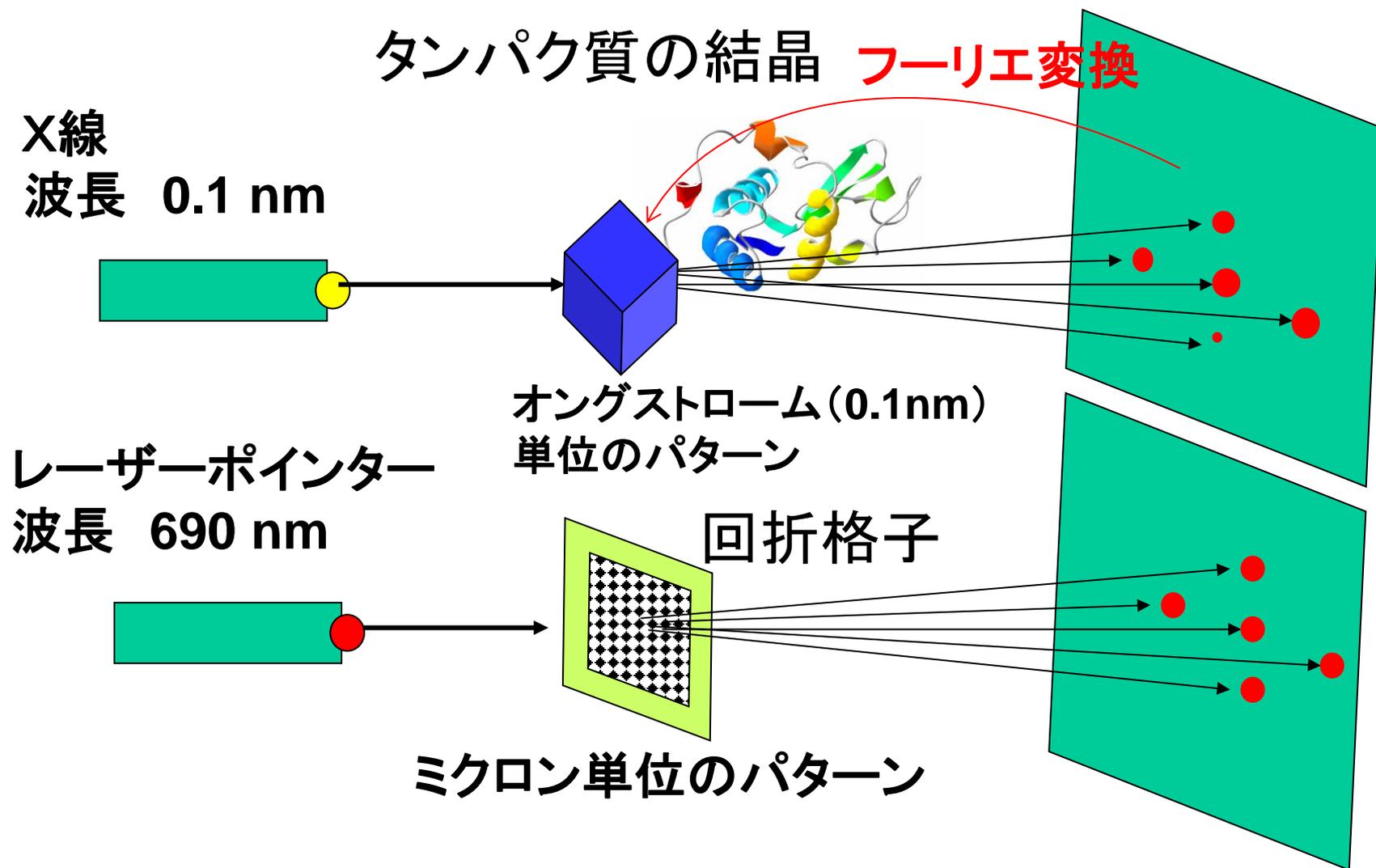
位相が分からない！

* 重原子法
(異常散乱法)

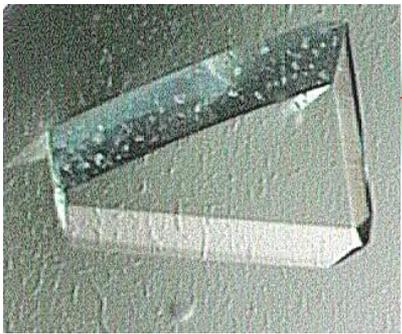
* 分子置換法

[AlphaFold server]

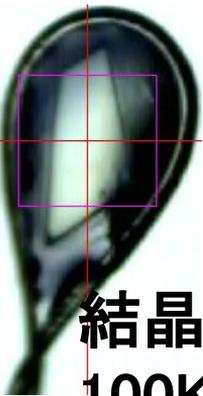
X線と光のちがい



結晶

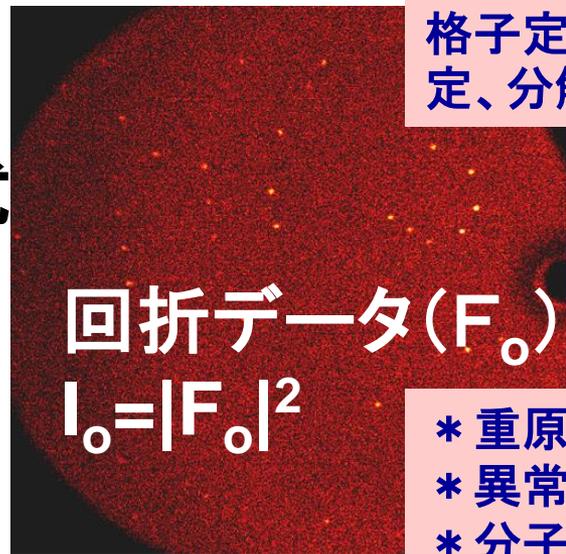


実験室、
シンクロトロン



結晶の凍結
100K

X線
Braggの式



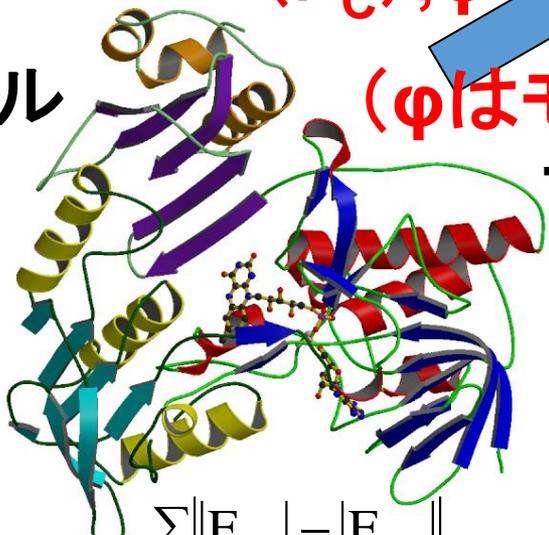
格子定数、空間群の決定、
分解能のチェック

回折データ (F_o)
 $I_o = |F_o|^2$

- * 重原子同型置換法
- * 異常散乱法
- * 分子置換法

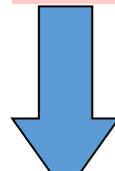
回折データ
(F_c), φ

モデル

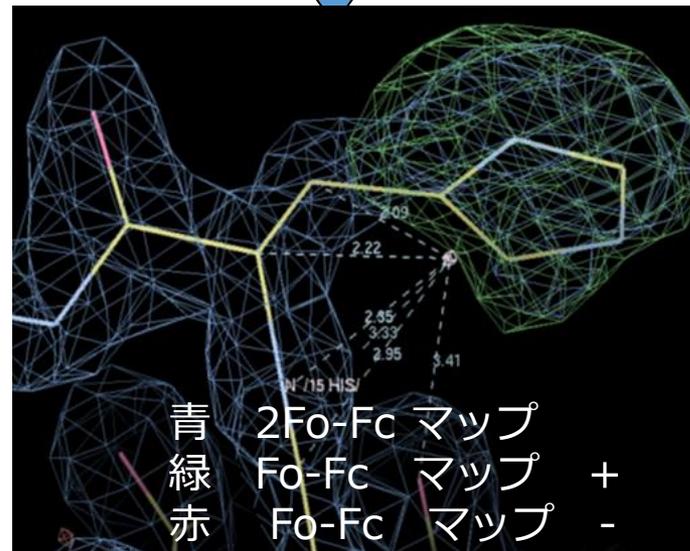


(φ はモデルから)
モデリング

電子密度



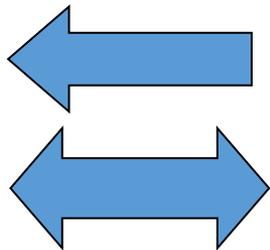
+ 位相 (φ)



青	2Fo-Fc	マップ	
緑	Fo-Fc	マップ	+
赤	Fo-Fc	マップ	-

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

精密化
 $R < 20\%$

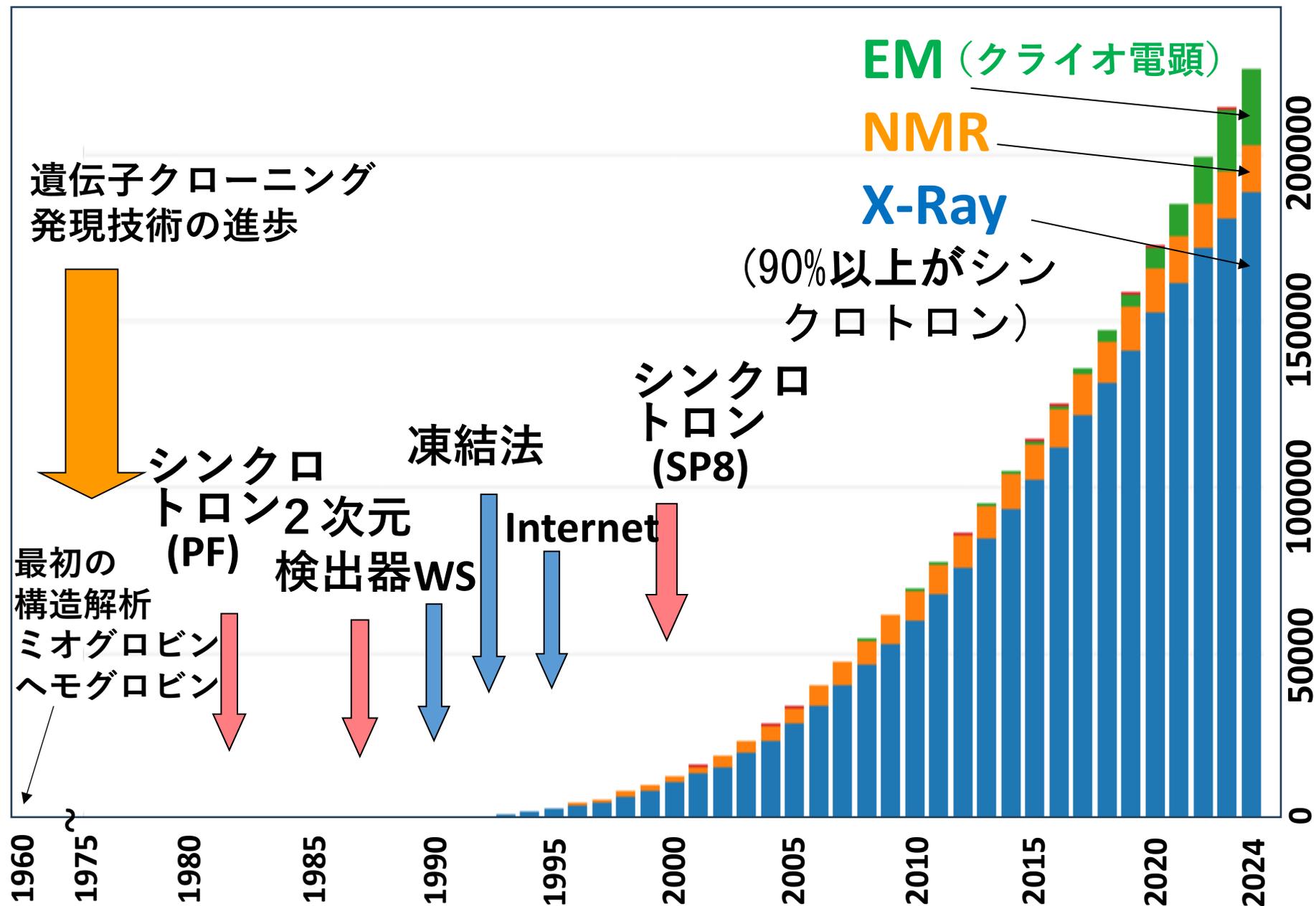


データの数 < 構造パラメータの数



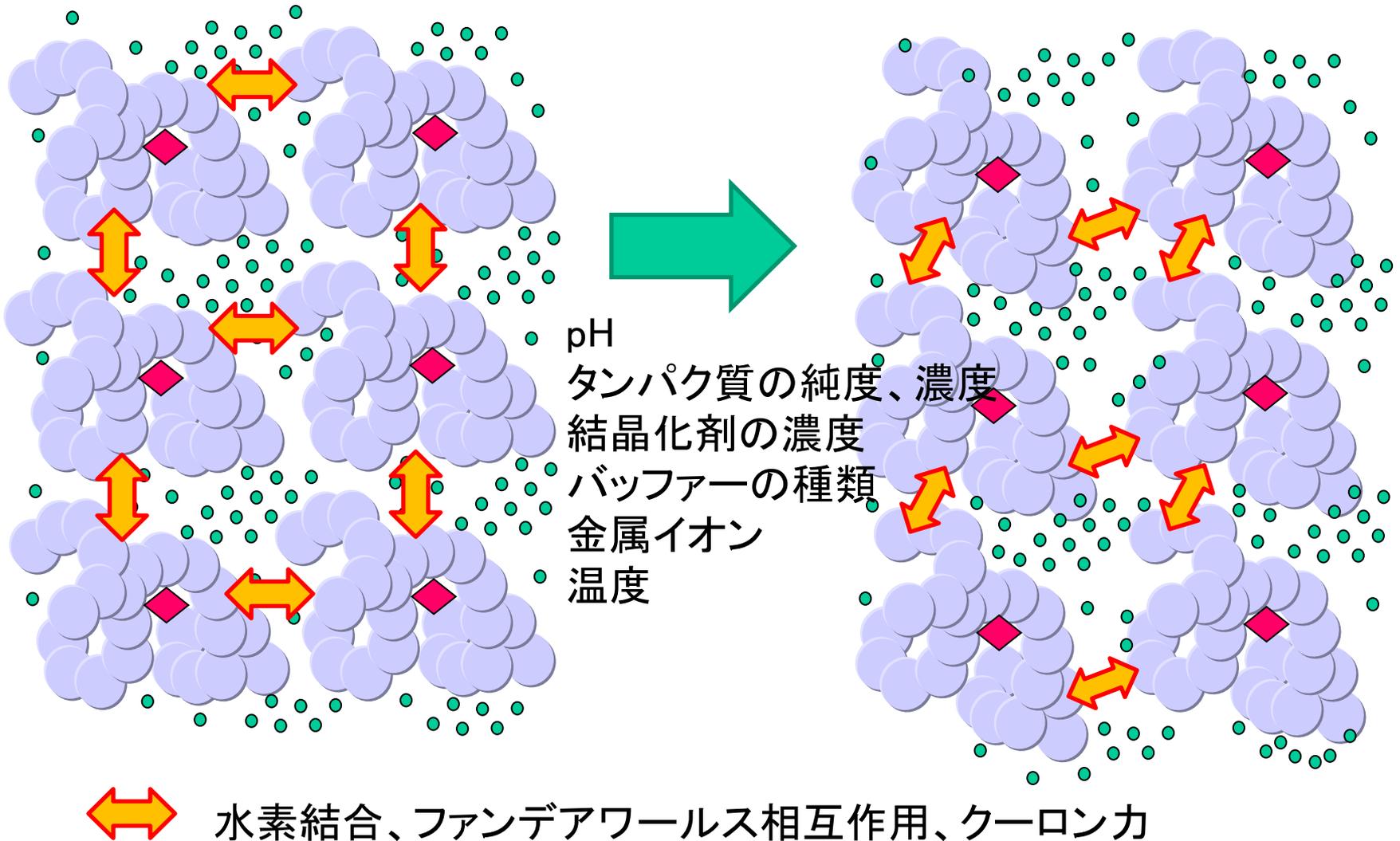
辞書が必要

Protein Data Bank (PDB) の登録数



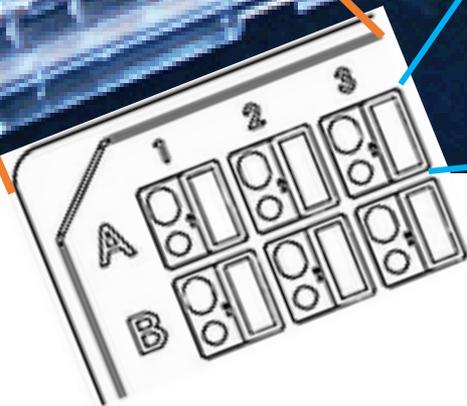
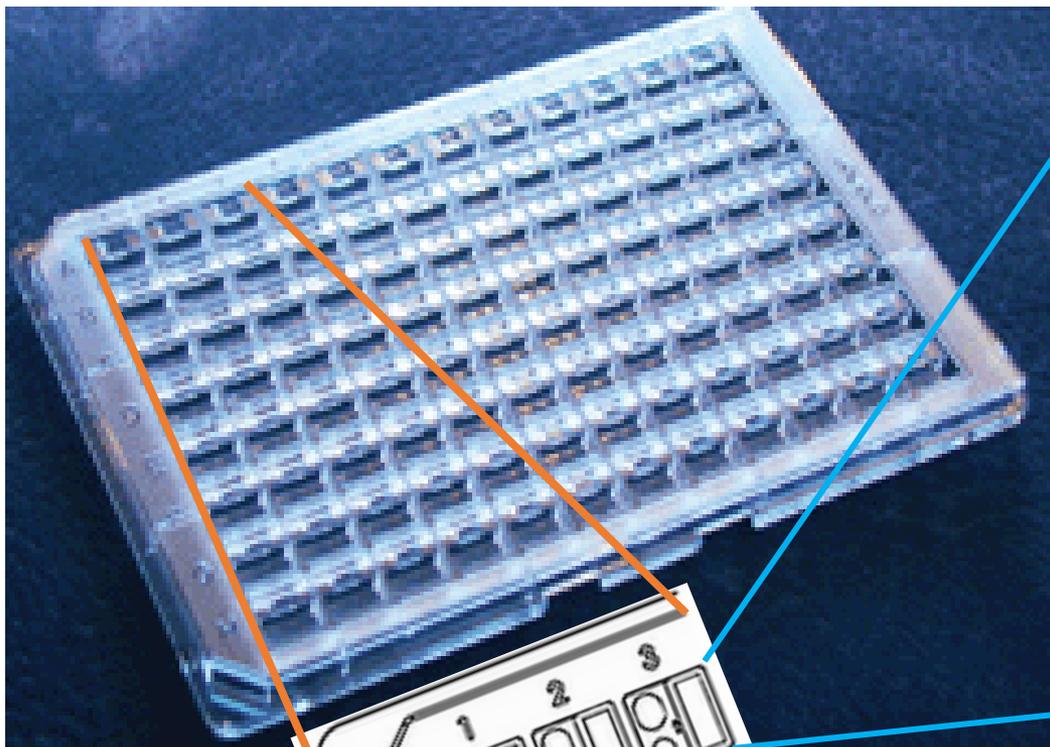
タンパク質の結晶は約50%の溶媒(水)を含む

タンパク質の結晶化にはスクリーニングが有効

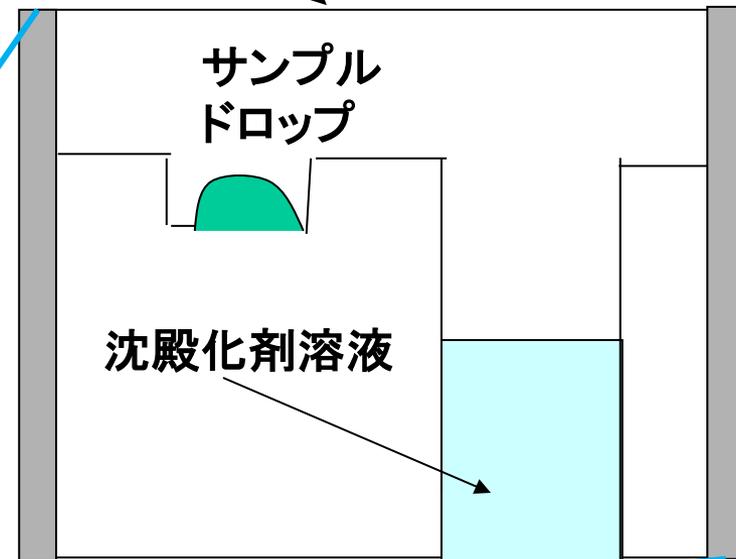


Sitting-drop vapor diffusion method

96穴インテリプレート



プラスチック透明シート



サンプル
ドロップ = タンパク質溶液 (1 μ l)
+ 沈殿化溶液 (1 μ l)

Crystal Screen I (Hampton research co.)において沈殿化剤として塩、アルコール、水溶性高分子(PEG)と二価塩を含むもの

A1. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Magnesium Chloride	F 25. 30% MPD, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Magnesium Acetate
A2. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate	F26. 30% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate
A3. 30% PEG 8000, 0.2 M Ammonium Sulfate	F27. 30% iso-Propanol, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Ammonium Acetate
A4. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Acetate	F28. 30% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride
A5. 30% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Sodium Citrate	F29. 30% iso-Propanol, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Sodium Citrate
B6. 30% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Ammonium Sulfate	G30. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Sodium Citrate
B7. 30% PEG 4000, 0.2 M Ammonium Sulfate	G31. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Calcium Chloride
B8. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Lithium Sulfate	G32. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 20% PEG 4000
B9. 30% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Sodium Acetate	G33. 10% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 20% PEG 4000
B10. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Sodium Acetate	G34. 2.0 M Ammonium Sulfate
C11. 30% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride	H35. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
C12. 30% PEG 1500	H36. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Sodium Acetate pH 4.6
C13. 28% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Calcium Chloride	H37. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
C14. 25% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Sulfate	H38. 0.4 M Ammonium Phosphate
C15. 20% PEG 8000, 0.05 M Potassium Phosphate	H39. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
D16. 20% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Magnesium Acetate	I40. 1.5 M Lithium Sulfate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
D17. 18% PEG 8000, 0.1 M Na PIPES pH 6.5, 0.2 M Calcium Acetate	I41. 1.4 M Sodium Acetate, 0.1 M Na PIPES pH 6.5
D18. 15% PEG 8000, 0.5 M Lithium Sulfate	I42. 1.0 M Sodium Acetate, 0.1 M Imidazole pH 6.5
D19. 8% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6	I43. 4.0 M Sodium Formate
E 20. 8% PEG 8000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5	I44. 2.0 M Sodium Formate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
E21. 2% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 2.0 M Ammonium Sulfate	J45. 1.4 M Sodium Citrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
E22. 2% PEG 8000, 1.0 M Lithium Sulfate	J46. 1.6 M Na, K Phosphate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
E23. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.02 M Calcium Chloride	J47. 0.4 M K, Na Tartrate
E24. 30% MPD, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Sodium Citrate	J48. 0.8 M K, Na Tartrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5

装置の概略図

デテクター
(検出器)

Photon III
改良型CMOS



低温窒素ガス
吹付装置

100K(-173°C)

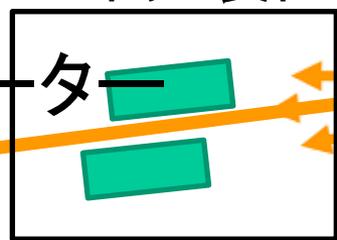
X線管球

陽極

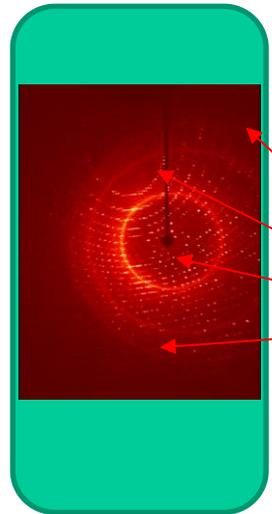
5万V
1.1mA

多層膜ミラー
集光装置

コリメーター



回折
X線



ビーム
ストッパー

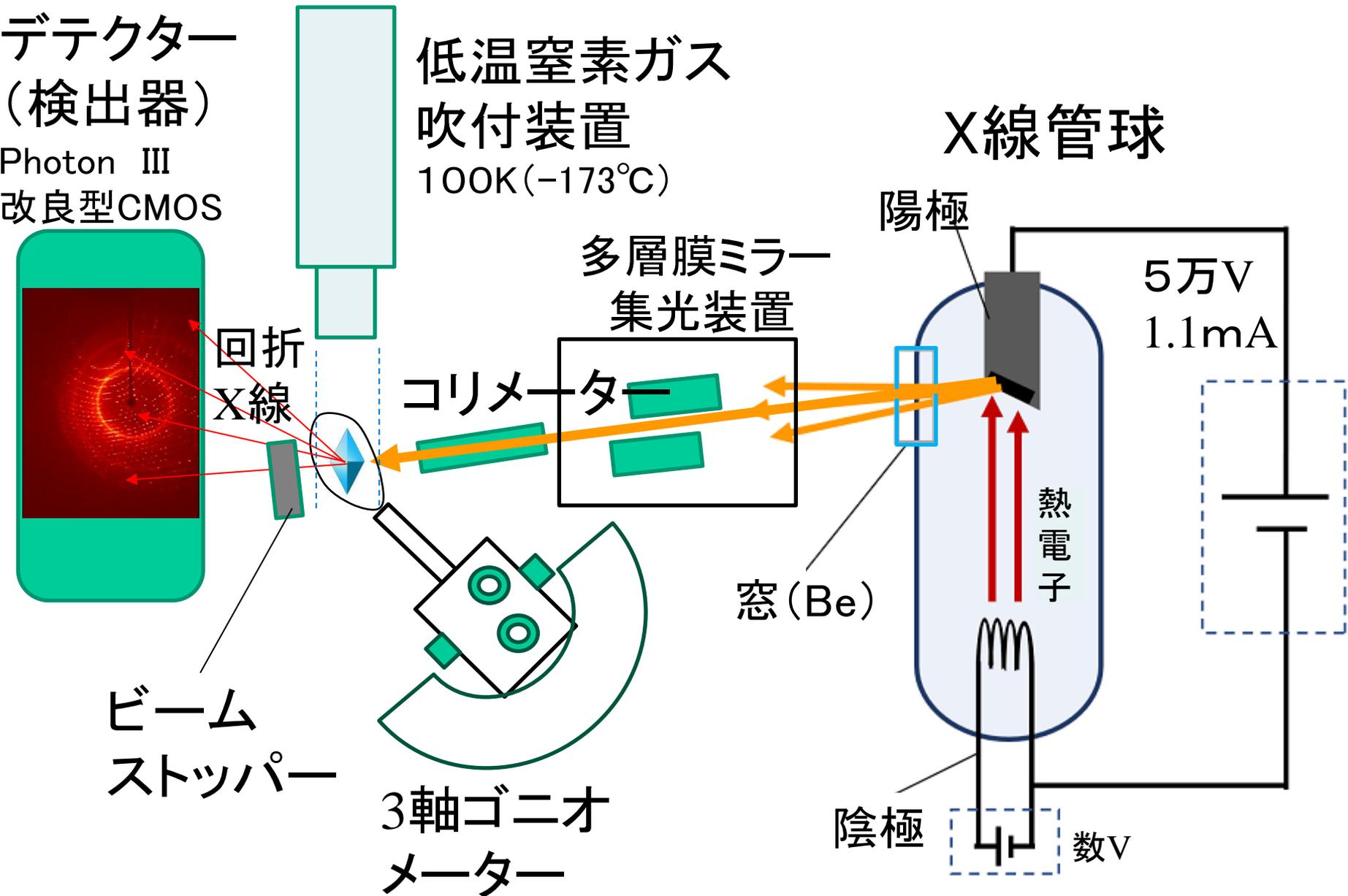
3軸ゴニオ
メーター

窓 (Be)

陰極

数V

熱電子



結晶構造解析は結晶格子との闘い パッキングによってはリガンドが結合できない

凍結法 (-173°C)

クライオループ

Flash cooling

LN2

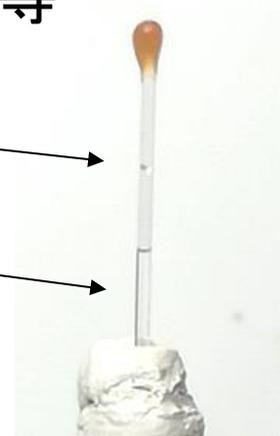


非凍結法 (室温 ~ -20°C)

ガラスキャピラリー等

結晶

母液



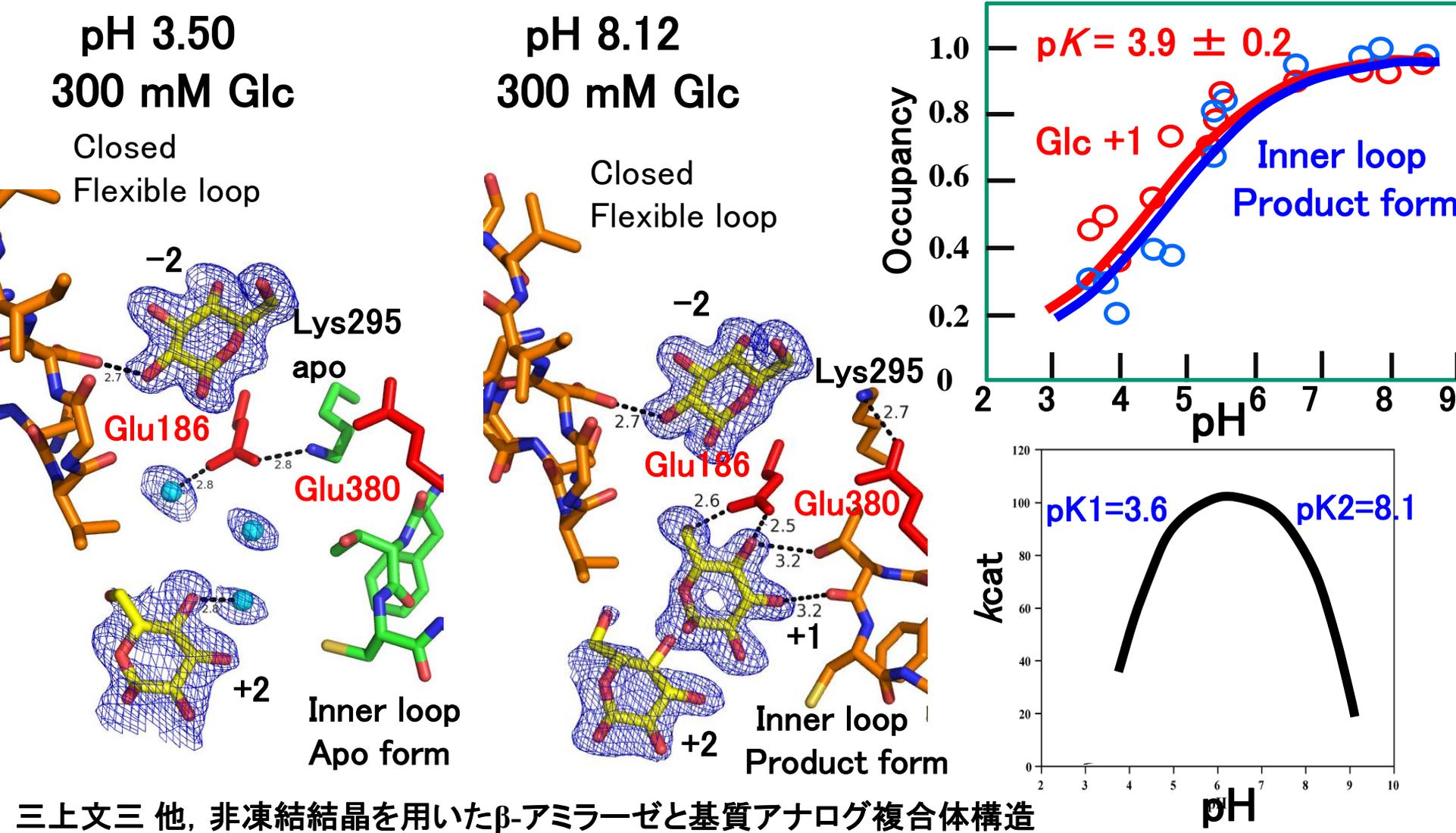
X線損傷の遅延
分解能の向上
(Mosaicityの増加)

凍結保護剤の影響
結晶格子の収縮
pHの変化

⇒ リガンドの解離等の構造
変化が生じることがある

X線損傷の増加
分解能の低下

非凍結法での測定事例 ①pHの変化 グルコースの結合によるSBAの構造変化のpH依存性



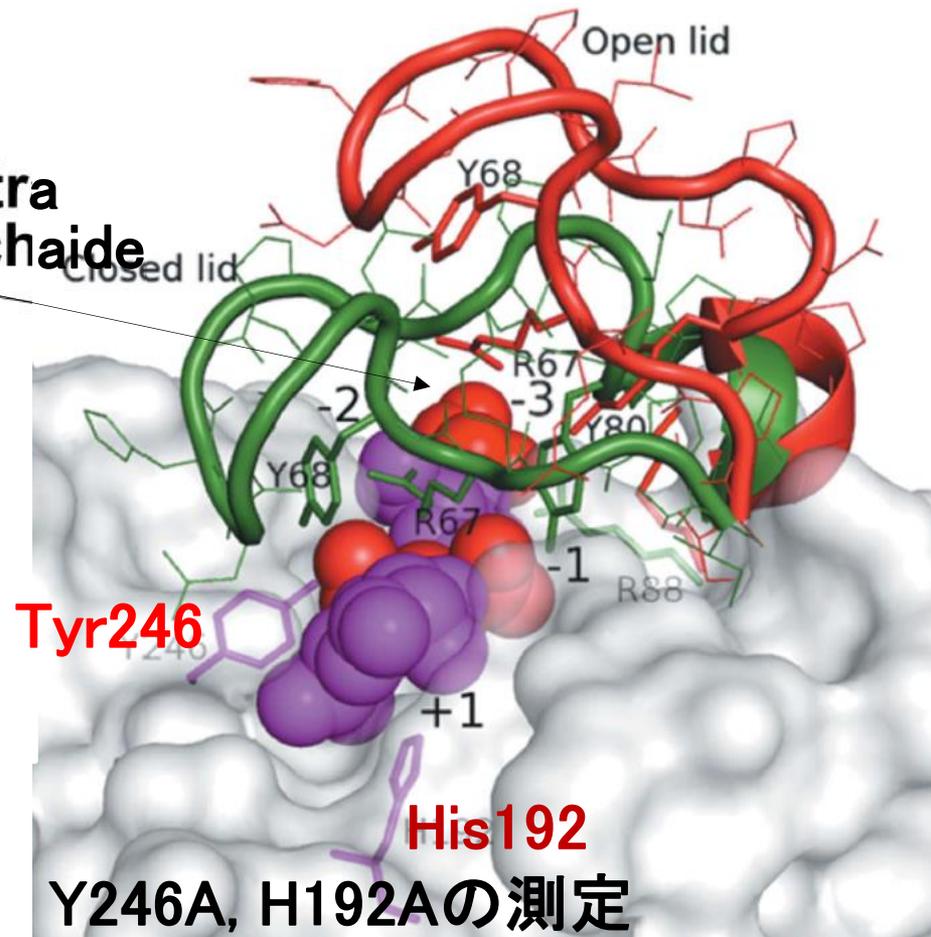
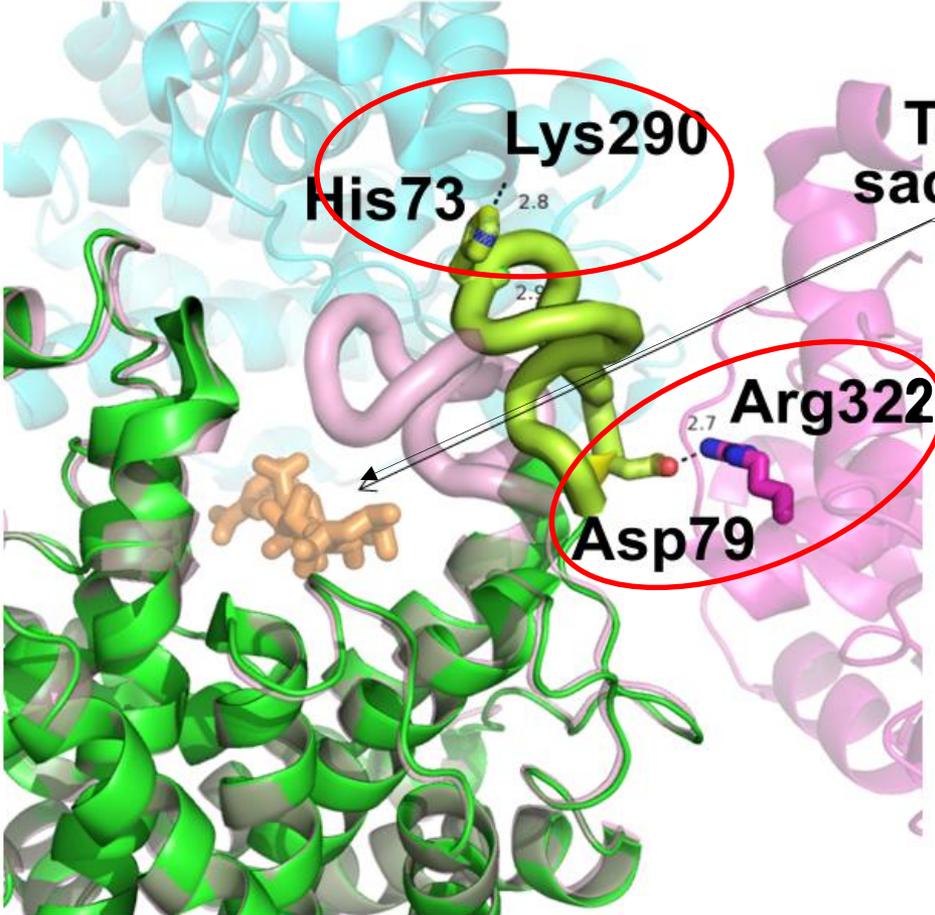
三上文三 他, 非凍結結晶を用いたβ-アミラーゼと基質アナログ複合体構造のpH変化の解析. 応用糖質科学 第11巻 第2号 79-86 (2021).

非凍結法での測定事例② 基質の解離 (アルギン酸リアーゼ)

C2 凍結

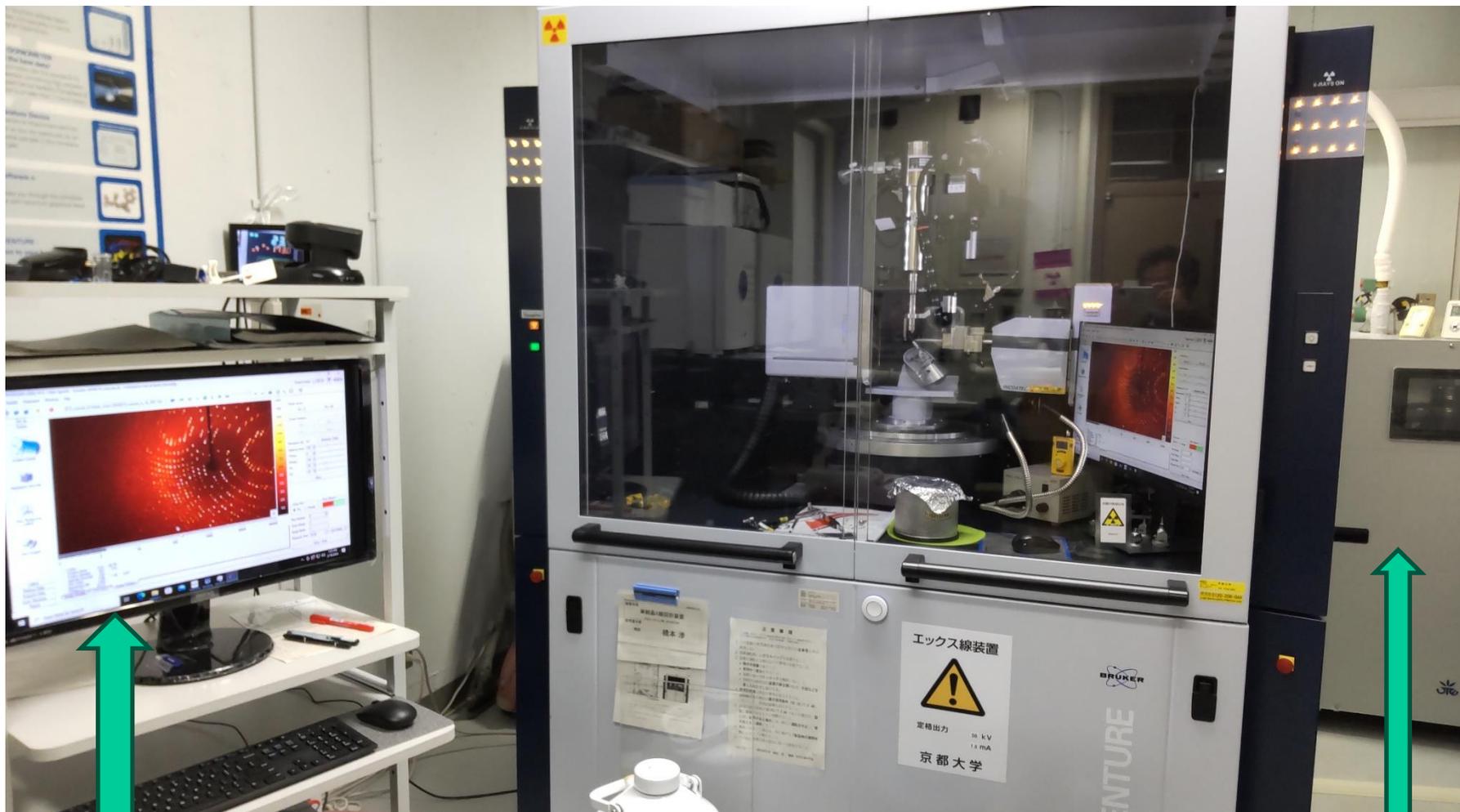
P2₁2₁2₁非凍結

基質が入ってもループが動けない



Mikami B., Ban M., Suzuki S., Yoon H.J., Miyake O., Yamasaki M., Ogura K., Maruyama Y., Hashimoto W., Murata K. Induced-fit motion of a lid loop involved in catalysis in alginate lyase A1-III. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68, 1207-1216 (2012).

実際の操作



制御用PC

X線装置

低温装置

① 低温N2ガス吹付装置のON (使用45分前) 汲出し用ホース



RUN ON

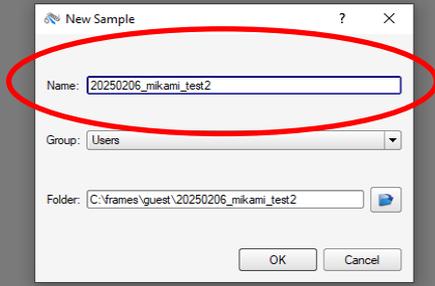
HEATER ON



低温ガス吹付装置

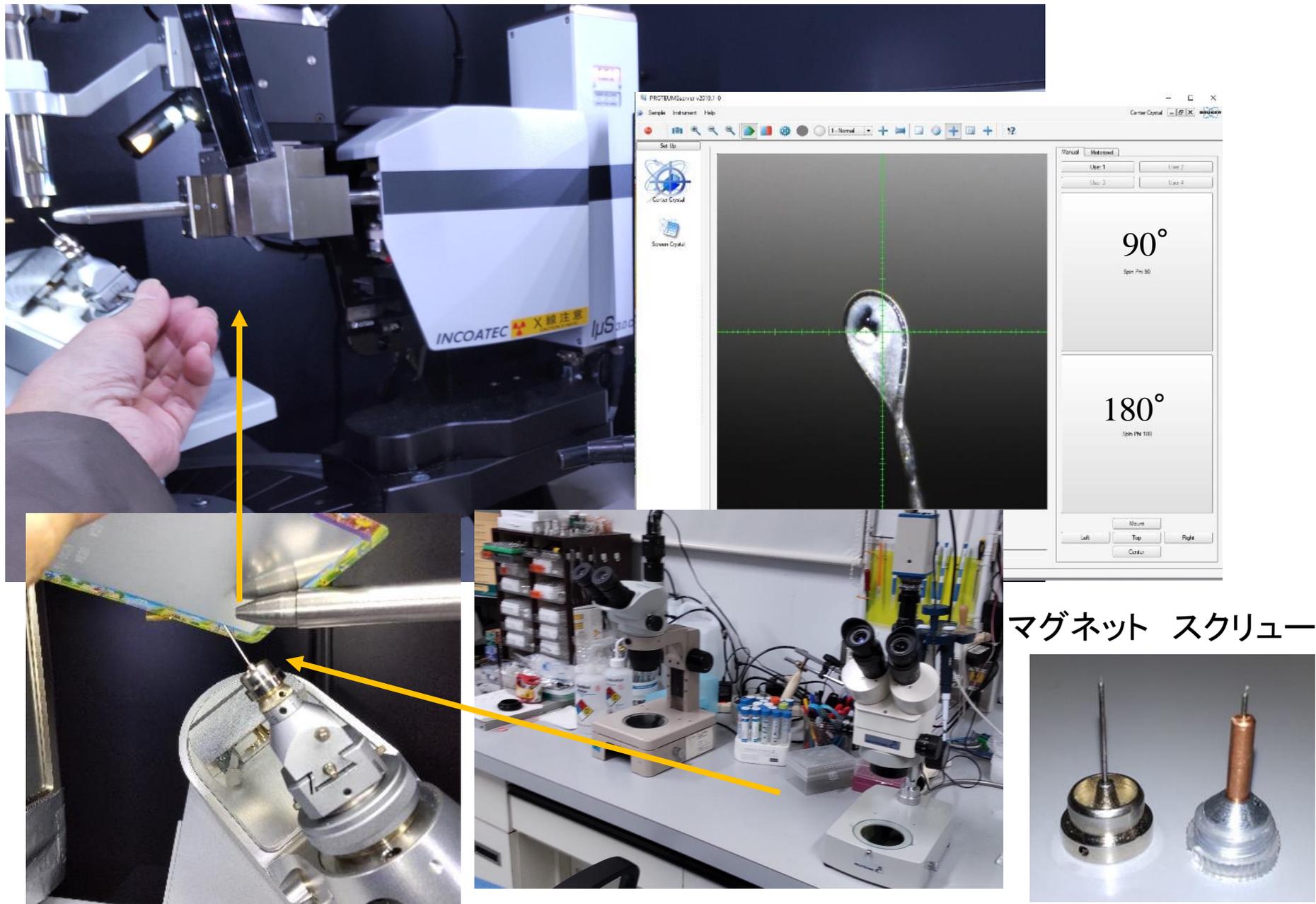
液体窒素自動供給装置 (JSN)
LN2の汲み出し

② PROTEUM3の準備



日付__使用者名__サンプル名
20250218_mikami_cyp1

③-1 結晶のマウントとセンターリング（凍結法）



③-1 結晶のマウントとセンターリング（キャピラリー法）

真上からの低温ガス吹付
低温装置を用いて室温 \sim -20°Cの測定が可能

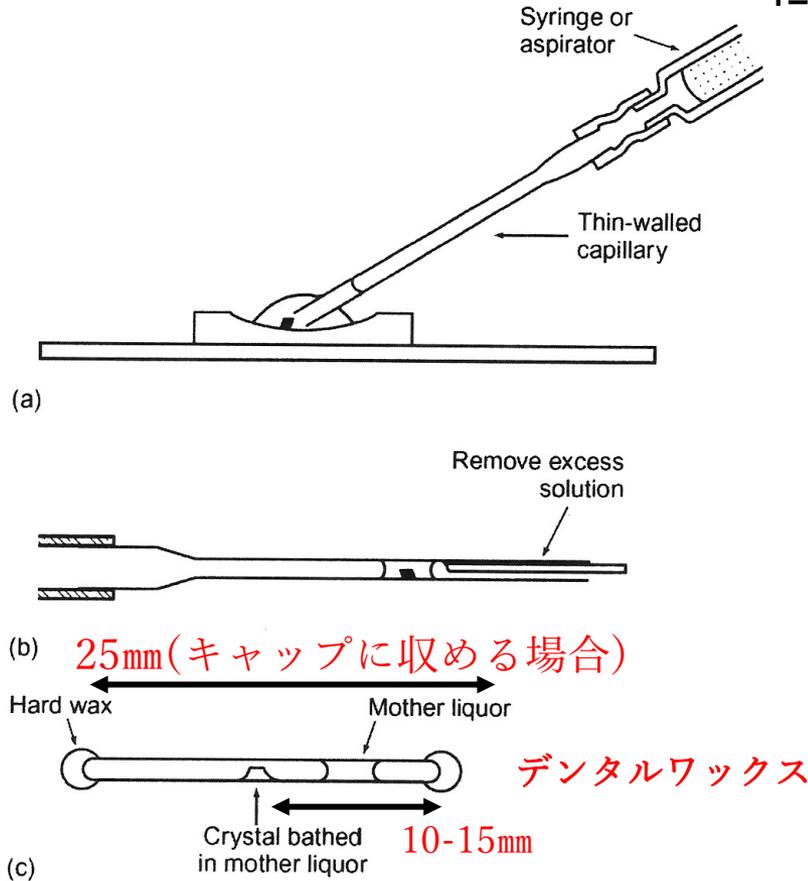


Fig. 2.17 The mounting of a crystal in a glass capillary.
(Reproduced by permission of Academic Press, Inc., from Rayment, 1985.)

④ 回折点のチェック Screen Crystals (diffraction Check)

PROTEUM3 v2019.1-0 - User: (guest) - Sample: 20210312_ikeuti_ghcolKI - Licensed to User at Kyoto University

Sample Instrument Windows Help

keuti_ghcolKI\simple_scans\20210312_ikeuti_ghcolKI_06_0001.afm

Screen Crystal

Set Up
Screen

Screen Crystal
Determine Unit Cell
View Reciprocal Lattice
View Images

Intensity [counts]
Total 82299652
Net 58461572
Average 156.96
Std. Dev. 76.18
Maximum 6629
Minimum -17

Box Width [pixels] 626
Height 595
Left 88
Right 713
Top 794
Bottom 200

Centroid [pixels] 388.67 506.36
Position [mm] 0.63 -0.63
HKL index 0.04 -0.04
Resolution [Å] 105.83
2Theta [°] 0.83

Resolution [Å] 2.58
Distance [mm] 80
2Theta: 0
Omega: 104
Phi: 90
Chi: -35

Scan Axis
● Phi ○ Omega

Scan Options

Run Number: 7
Scan Range: 1
Image Width: 1
Exposure Time: 20.00 secs/image

Drive + Scan

Distance をセット
 $2\theta=0$
 $\omega=104$
 $\chi=-35$
 $\phi=0$ or 90

$2\theta=0$	
D=37mm	1.68 Å
D=50mm	1.98
D=100mm	3.26
D=150mm	4.61

$\Delta\phi=1$

スタート

⑤ データ測定 Run experiment (Data Collection)

PROTEUM3 v2019.1.0 - User: (guest) - Sample: 20210312_ikeuti_ghcolKI - Licensed to User at Kyoto University

Sample Instrument Windows Help Run Experiment

Set Up Experiment Monitor Experiment

Image location: c:\frames\guest\20210312_ikeuti_ghcolKI

Filename or prefix: 20210312_ikeuti_ghcolKI

Number for first run: 1

Scan options:

Default time: 10.000 [sec/image]

Default width: 0.500 [degrees]

Detector format: 759x1024

Deicing: off

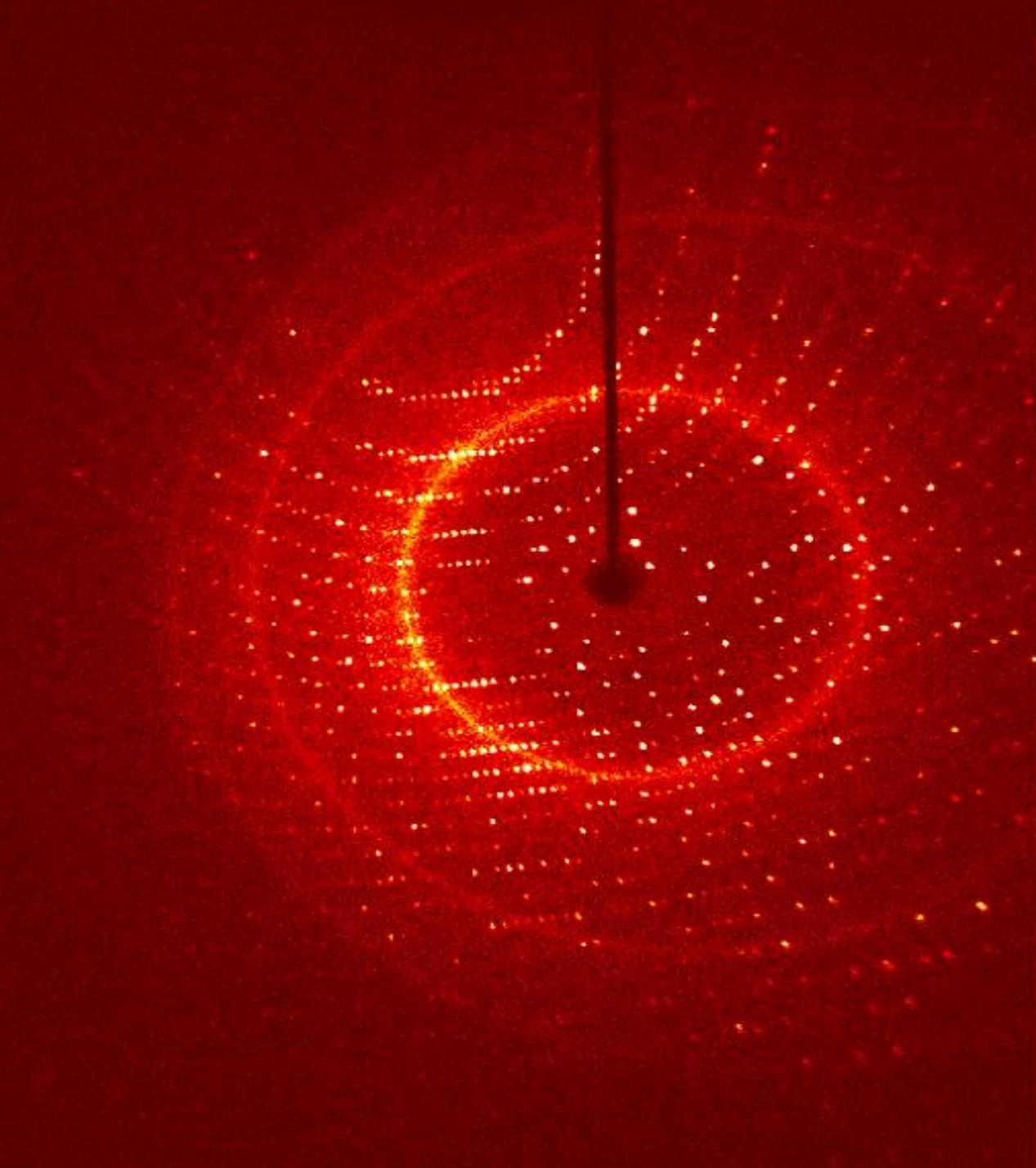
Operation	Active...	Distance [mm]	2Theta [deg]	Omega [deg]	Phi [deg]	Chi [deg]	Scan Options...	Time [sec]	Width [deg]	Sweep [deg]	Direction	
1	Phi Scan	Yes	100	0.000	14	0	-35		30.000	0.800	180	positive
2	Phi Scan	Yes	100	0.000	104	0.000	-35		30.000	0.800	180	positive
3	No Operation	Yes										
4	No Operation	Yes										
5	No Operation	Yes										
6	No Operation	Yes										
7	No Operation	Yes										

Operation	Active...	Distance [mm]	2Theta [deg]	Omega [deg]	Phi [deg]	Chi [deg]	Scan Options...	Time [sec]	Width [deg]	Sweep [deg]	Direction	
1	Phi Scan	Yes	100	0.000	14	0	-35		30.000	0.800	180	positive
2	Phi Scan	Yes	100	0.000	104	0.000	-35		30.000	0.800	180	positive
3	No Operation	Yes										
16	No Operation	Yes										
17	No Operation	Yes										
18	No Operation	Yes										
19	No Operation	Yes										
20	No Operation	Yes										
21	No Operation	Yes										
22	No Operation	Yes										
23	No Operation	Yes										
24	No Operation	Yes										
25	No Operation	Yes										

Append Strategy Append Matrix Strategy Load Table... Save Table... Validate Resume Execute

スタート





Detector: Bruker PhotonIII
Sample: Lysozyme
Wavelength: 1.54 Å
Exposure: 2s
Distance: 45 mm
2 θ : 14.05 deg
Rotation axis: ϕ
Rotation angle: 0.5 deg
Total : 120° (240 frames)
Edge left, right: 1.5, 2.5 Å
Edge up, down: 1.6 Å

⑤ データのプロセス XDSの場合 測定データをサーバーで処理

CBFファイルを使用

```
sad@hydra:/spica/usr1/people/sad/bruker/guest/20210212takita_p450/CBF/xds210324
File Edit View Search Terminal Help
20210212takita_p450_01_0085.cbf 20210212takita_p450_2_01_0028.cbf 20210212takita_p450_2_01_0139.cbf
20210212takita_p450_01_0086.cbf 20210212takita_p450_2_01_0029.cbf 20210212takita_p450_2_01_0140.cbf
20210212takita_p450_01_0087.cbf 20210212takita_p450_2_01_0030.cbf 20210212takita_p450_2_01_0141.cbf
XDSGUI 2018-06-08 running in /spica/usr1/people/sad/bruker/guest/20210212takita_p450/CBF/xds210324 (on hydra)
```

Menu Help

Projects Frame XDS.INP XYCORR INIT COLSPOT IDXREF DEFPX INTEGRATE CORRECT tools statistics XDS CONV XSCALE SHELX

Folder with XDS configuration and ... XDSGUI 2018-06-08 running in /spica/usr1/people/sad/bruker/guest/20210212takita_p450/CBF/xds210324 (on hydra)

Default is the current directory. The title ...

Load recent

/spica/us

Choose or create new folder

Load generate XDS.INP

Untrusted areas (set with right mouse button)

XDSGUI 2018-06-08 running in /spica/usr1/people/sad/bruker/guest/20210212takita_p450/CBF/xds210324 (on hydra)

Menu Help

Projects Frame XDS.INP XYCORR INIT COLSPOT IDXREF DEFPX INTEGRATE CORRECT tools statistics

Save Run XDS

! written by generate_XDS.INP version 0.84 (10-Oct-2018)

JOB= XYCORR INIT COLSPOT IDXREF DEFPX INTEGRATE CORRECT

ORGX= 385.01 ORGY= 510.39 ! values from file

```
DETECTOR_DISTANCE= 89.99964 ! read by XYCORR
OSCILLATION_RANGE= 0.8000
STARTING_ANGLE= 49.99991
X-RAY_WAVELENGTH= 1.54184
NAME_TEMPLATE_OF_DATA_FRAMES=/spica/usr1/people/sad/bruker/guest/20210212takita_p450/CBF/xds210324
! REFERENCE_DATA_SET=xxx/XDS_ASCII.HKL ! e.g.
DATA_RANGE=1 168
SPOT_RANGE=1 84
! BACKGROUND_RANGE=1 10 ! rather use default
SPACE_GROUP_NUMBER=0
UNIT_CELL_CONSTANTS= 70 80 90 90 90 90 ! do not change
INCLUDE_RESOLUTION_RANGE=50 0 ! after CORRECT
! IDXREF not obeys INCLUDE_RESOLUTION_RANGE
FRIEDEL'S_LAW_FALSE ! This acts only or
! If the anom signal turns out to be or is
! use FRIEDEL'S_LAW=TRUE instead of FALSE
! remove the "!" in the following line:
! STRICT_ABSORPTION_CORRECTION=TRUE
```

The discrepancies in X- and Y-coordinates of the spots are depicted in the two images DX-CORRECTIONS.cbf and DY-CORRECTIONS.cbf for inspection with the XDS-Viewer.

THE DATA COLLECTION STATISTICS REPORTED BELOW ASSUMES:

SPACE_GROUP_NUMBER=	16
UNIT_CELL_CONSTANTS=	52.06 53.28 138.94 90.000 90.000 90.000

CORRECTION PARAMETERS FOR THE STANDARD ERROR OF REFLECTION INTENSITY

The variance $v_0(I)$ of the intensity I obtained from counting statistics replaced by $v(I)=a*(v_0(I)+b*I^2)$. The model parameters a , b are chosen to minimize the discrepancies between $v(I)$ and the variance estimated from sample statistics of symmetry related reflections. This model implicates an asymptotic limit $ISa=1/\sqrt{a*b}$ for the highest $I/\sigma(I)$ that the experimental setup can produce (Diederichs (2010) Acta Cryst D66, 733-7

a	b	ISa
1.362E+00	6.607E-04	33.34

cpu time used 34.9 sec
elapsed wall-clock time 1.5 sec

Pixel Value:

value= 0
x= -39, y=

Brightness

Contrast

Zoom

convolute de



Menu Help

Projects Frame XDS.INP XYCORR INIT COLSPOT IDXREF DEFPIX INTEGRATE CORRECT tools statistics XDSCONV XSCALE SHELX

```

***** CORRECT ***** (VERSION Jan 31, 2020 BUILT=202
INPUT PARAMETER VALUES
-----
SPACE_GROUP_NUMBER= 1 as used in the INTEGRATE st
UNIT_CELL_CONSTANTS= 51.920 53.257 138.880
FRIEDEL'S_LAW=TRUE
PROFILE_FITTING= TRUE
OVERLOAD= 982860 MINPK= 75.00000 WFACI=
INCLUDE_RESOLUTION_RANGE= 50.000 0.000
NAME_TEMPLATE_OF_DATA_FRAMES=/spica/usr1/people/sad/
DATA_RANGE= 1 168
ROTATION_AXIS= 0.138462 0.820274 -0.554959
OSCILLATION_RANGE= 0.800000
STARTING_ANGLE= 50.000 STARTING_FRAME=
X-RAY_WAVELENGTH= 1.541840
INCIDENT_BEAM_DIRECTION= 0.002344 -0.002843 0.9999
FRACTION_OF_POLARIZATION= 0.500
POLARIZATION_PLANE_NORMAL= 0.000000 1.000000 0.00
AIR= 0.00134
DETECTOR=BRUKER
SILICON= 14.126883 SENSOR_THICKNESS= 0.000000
    
```

COMPLETENESS OF DATA

I/sigma (merged data)

R-meas

Menu Help

Projects Frame XDS.INP XYCORR INIT COLSPOT IDXREF DEFPIX INTEGRATE CORRECT tools statistics XDSCONV XSCALE SHELX

SUBSET OF INTENSITY DATA WITH SIGNAL/NOISE >= -3.0 AS FUNCTION OF RESOLUTION

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS OBSERVED	NUMBER OF REFLECTIONS UNIQUE	NUMBER OF REFLECTIONS POSSIBLE	COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR COMPARED expected	I/SIGMA	R-meas	CC (1/2)	Anomal Corr	
6.19	3900	944	1040	90.8%	5.2%	5.0%	3815	22.49	5.9%	99.8*	-2
4.40	7156	1629	1691	96.3%	10.7%	10.3%	7007	12.48	12.1%	99.1*	1
3.60	9334	2107	2150	98.0%	14.1%	14.1%	9172	9.92	15.9%	98.3*	3
3.12	10902	2459	2492	98.7%	29.0%	29.5%	10738	4.99	32.8%	91.8*	-2
2.79	9753	2615	2813	93.0%	54.1%	53.8%	9526	2.40	62.5%	73.9*	-2
2.55	6517	2500	3077	81.2%	69.2%	72.2%	6097	1.34	85.4%	53.9*	0
2.36	5087	2443	3341	73.1%	88.9%	91.9%	4414	0.89	115.4%	33.7*	3
2.21	3025	2010	3577	56.2%	106.7%	116.6%	1881	0.57	145.1%	27.9*	0
2.08	948	837	3792	22.1%	138.5%	143.6%	221	0.58	195.4%	6.3	0
total	56622	17544	23973	73.2%	20.2%	20.3%	52871	5.03	23.5%	98.0*	0

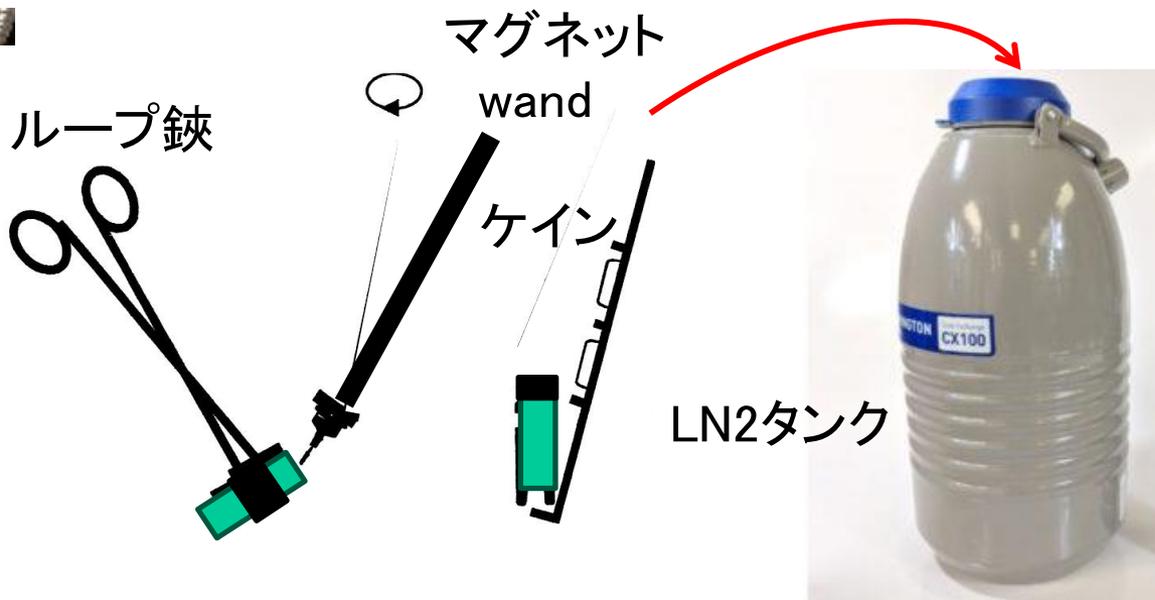
```

NUMBER OF REFLECTIONS IN SELECTED SUBSET OF IMAGES 56888
NUMBER OF REJECTED MISFITS 263
NUMBER OF SYSTEMATIC ABSENT REFLECTIONS 0
NUMBER OF ACCEPTED OBSERVATIONS 56625
NUMBER OF UNIQUE ACCEPTED REFLECTIONS 17546
    
```

→ CCP4, PHENIX, COOT等
による構造決定と精密化

⑥ 結晶の回収

凍結結晶取扱い器具





シンクロトロンでの測定

実際のタンパク質結晶の回折データの測定はSPring-8などのシンクロトロンで行っています。

非常に強いX線が得られ、波長を変えることも容易です。

現在は極微小結晶($> 1\mu\text{m}$)からの回折データの収集も可能です。

X線自由レーザーではシリアルフェムト秒結晶構造解析を用いた時分割構造解析等が行われています。

生体材料ミクロ構造 高度解析システムについて

農学研究科

松宮健太郎 南部優子

令和7年2月18日

生体材料ミクロ構造高度解析システムの概要

【目的】

生物の組織や細胞、食品などの生物材料、タンパク質やセルロースなどの生体高分子等の微細構造の観察

クライオ走査電子顕微鏡 (クライオSEM, A-30)

【特徴】

固定・乾燥といった前処理が不要
ナノオーダーの構造観察が可能

【欠点】

有機物の成分を区別することは
できない

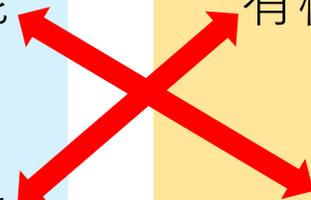
レーザーラマン顕微鏡 (A-29)

【特徴】

無染色で観察できる
有機物の成分分布が取得可能

【欠点】

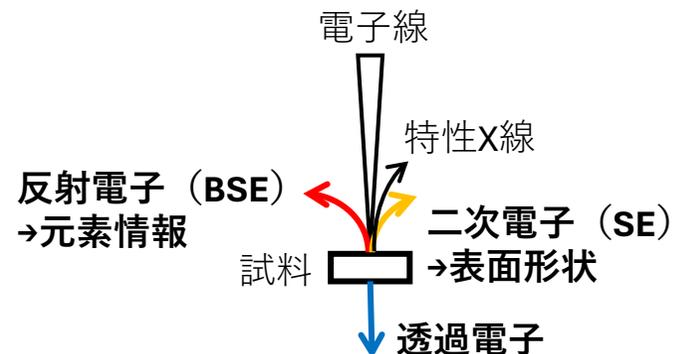
分解能はサブミクロン



SEMの原理とSEMの種類と含水試料の前処理方法

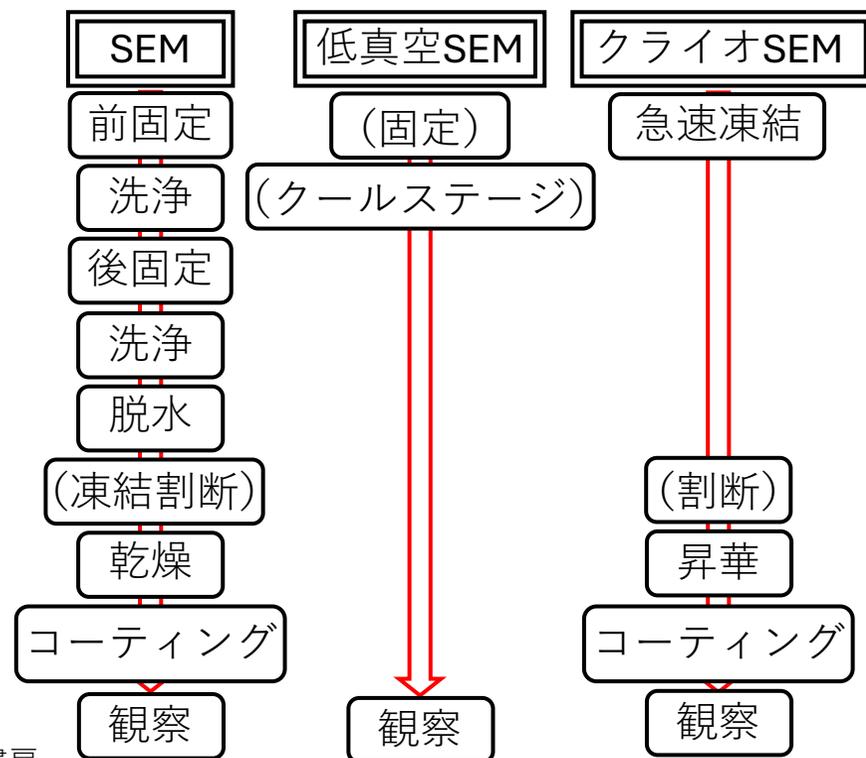
【SEMの原理】

物質に電子線を照射した際に生じる二次電子や反射電子などの信号を利用した顕微鏡で、ナノオーダーでの観察が可能



【SEMの種類と含水試料の前処理方法】

- ・ SEMの内部は高真空であり、含水試料の観察には固定、脱水、乾燥といった多くの工程が必要となる
- ・ 低真空SEMは装置内部の真空度を数十Paに保つことで含水試料の観察が可能となるが、長時間の観察では水分の蒸発により試料の変形が見られることがある。また、ゲルや液体試料の観察は難しい
- ・ クライオSEMは試料を凍結することで含水試料（ゲルや液体含む）の観察が可能



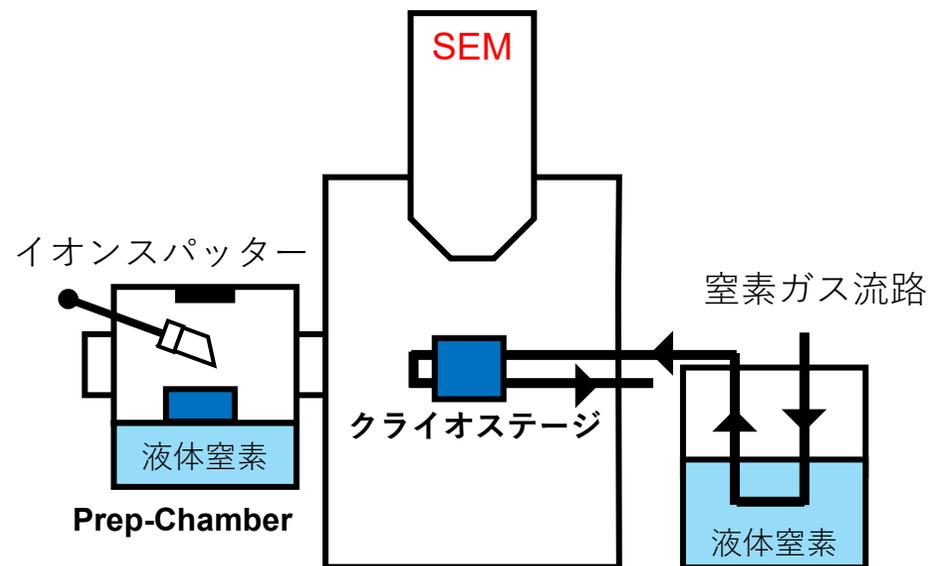
クライオSEMの概要

【クライオSEMの装置概要】

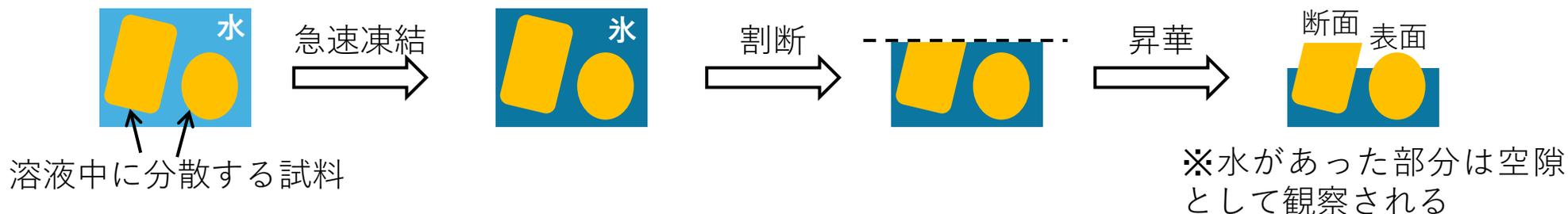
クライオシステムを搭載したSEM

含水試料を液体窒素やスラッシュ窒素などで急速凍結した後、冷却されたクライオステージを使用し、試料を凍結状態で観察

プレパレーションチャンバー（Prep-Chamber）内にもクライオステージがあり、そこで割断、昇華、コーティングを行うことができ、装置内で前処理が完了する



【クライオSEM観察のイメージ】



クライオSEM(A-30)の仕様・性能

【SEM】

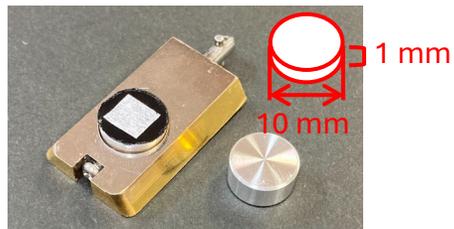
型式	SU8230 / 電界放射形走査電子顕微鏡 (FE-SEM)
メーカー	株式会社日立ハイテク
加速電圧 (Vacc)	0.5~30 kV
SE分解能	0.8 nm (Vacc = 15 kV, WD = 4 mm)
検出器 (検出できる電子)	Top (BSE) Upper (SE, BSE) Lower (SE) STEM (透過電子)

【クライオシステム】

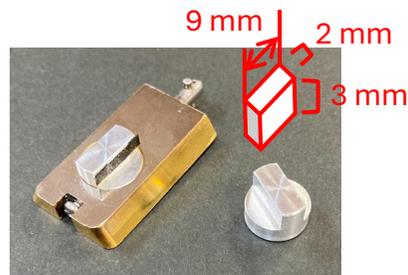
型式	Alto2500
メーカー	Gatan Inc.
温度範囲	クライオステージ -185~50°C / Prep-Chamber -180~100°C
スパッター電極	Pt

クライオSEMの観察モードと最大試料サイズ

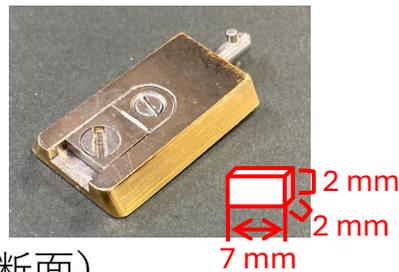
【SEM】 乾燥試料



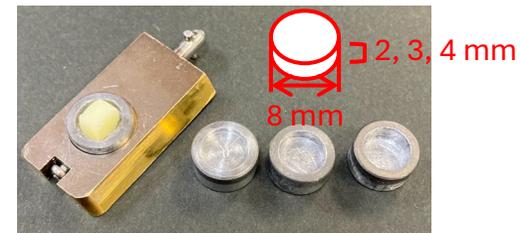
粉末、シート（表面）
円柱：φ10 x 1 mm以下



シート（断面）
T字：9 x 2 x 3 mm以下

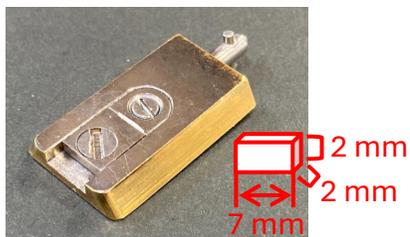


万力：7 x 2 x 2 mm以下

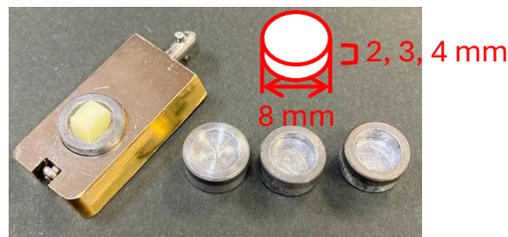


立体
凹み：φ8 x 2, 3, 4 mm以下

【クライオSEM】 含水試料（割断するため、乾燥試料の高さ+1mm）



シート（断面）
万力：7 x 2 x 2 mm以下



立体
凹み：φ8 x 2, 3, 4 mm以下



液体
リベット：10 μL以上



ゾル
溝：1 x 1 mmの溝から
あふれる程度

【STEM】 STEM用試料



TEM用グリッド
立体：超薄切片
液体：急速凍結装置（CryoPlunge3）
による氷包埋試料

【観察できない試料】
磁性体、サイズの大きいもの

レーザーラマン顕微鏡の概要

【ラマン分光法】

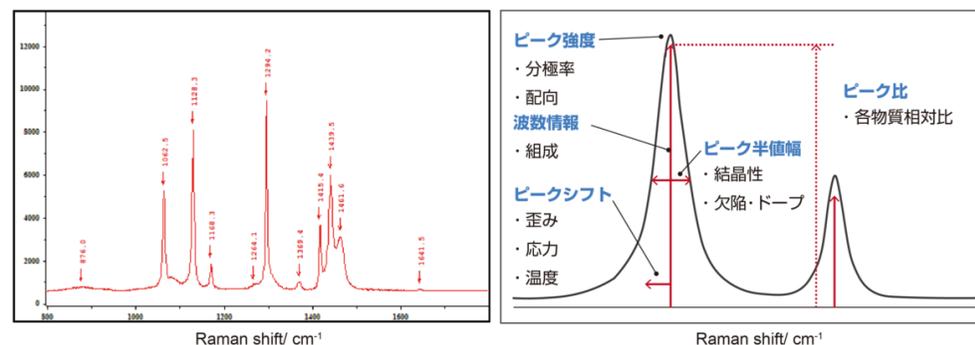
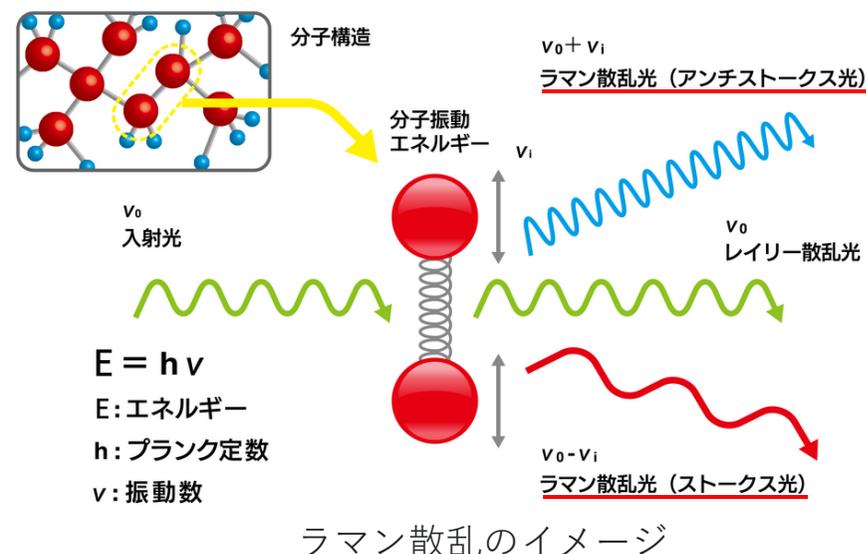
物質に光を照射した際に生じる散乱光のうち、入射光とは異なる波長をもつ**ラマン散乱光**を用いて物質の評価を行う分光法

ラマンスペクトルは物質固有であり、ピークは分子振動や格子振動に由来する

【レーザーラマン顕微鏡】

ラマン分光装置と光学顕微鏡を組み合わせた装置

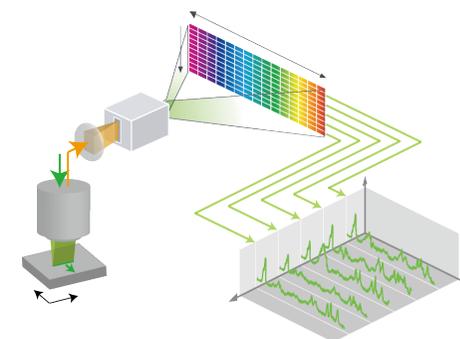
ラマンスペクトルを解析することで成分分布などの情報を得ることができ、試薬による染色の必要がない



(左) ポリエチレンのラマンスペクトル
(右) ラマンスペクトルの見方

レーザーラマン顕微鏡(A-29)の仕様・性能

型式	RAMANtouch
メーカー	ブルカージャパン株式会社（旧ナノフoton株式会社）
レーザー波長	532 nm, 785 nm
レーザー照射方式	ポイント照明 / ライン照明
グレーティング	300, 600, 1200 gr/mm
検出器	電子冷却式CCD 1340 x 400 画素
光学顕微鏡	正立型
オプション	冷却加熱ステージ (-20~120°C) 広視野観察用電動ステージ
空間分解能 (X/Y/Z)	350 nm / 500 nm / 1000 nm (532 nm, x100)
スペクトル測定範囲	100 cm ⁻¹ ~
スペクトル分解能 (FWHM)	1.2 cm ⁻¹ (785 nm, 1200 gr/mm)



ライン照射のイメージ

レーザーラマン顕微鏡の観察モードと試料サイズ

【室温観察】

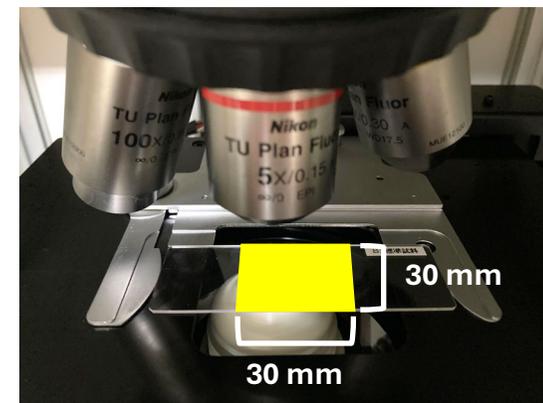
観察可能な最大試料サイズ：30 mm x 30 mm

スライドガラスに載せられる形状

※試料表面が水平で凹凸のないこと

（焦点が合わない部分はラマンスペクトルの強度が低くなる）

※試料の厚みは薄い方が望ましい



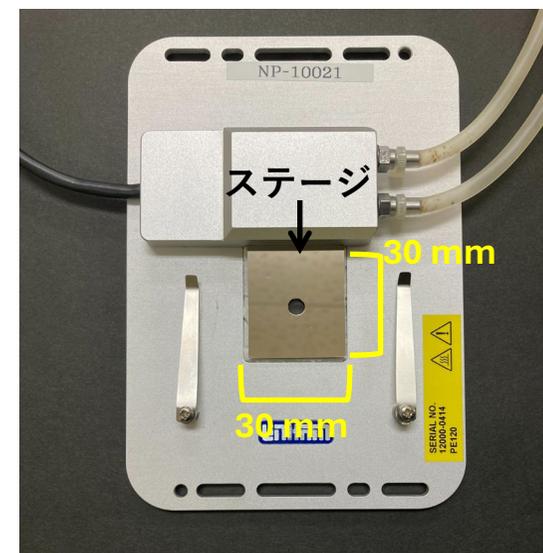
【冷却加熱ステージを使った観察】

観察可能な最大試料サイズ：30 mm x 30 mm x 1 mm

試料を二枚のカバーガラスに挟んで観察

※カバーガラスから試料がはみ出ないようにすること

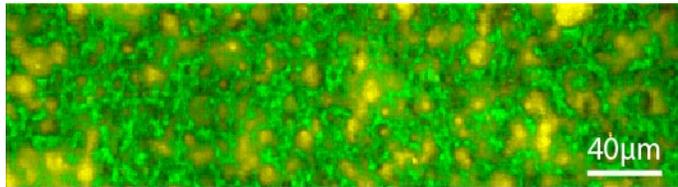
ステージに試料が付着すると使用できなくなる（特に加熱時は要注意）



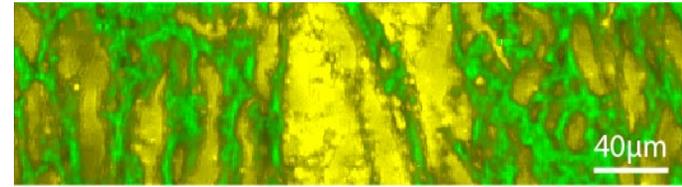
【観察できない試料】 蛍光を強く発する試料、純金属

レーザーラマン顕微鏡観察の実例 (拠点機器番号A-29)

(a) プロセスチーズ



(b) モッツアレラチーズ

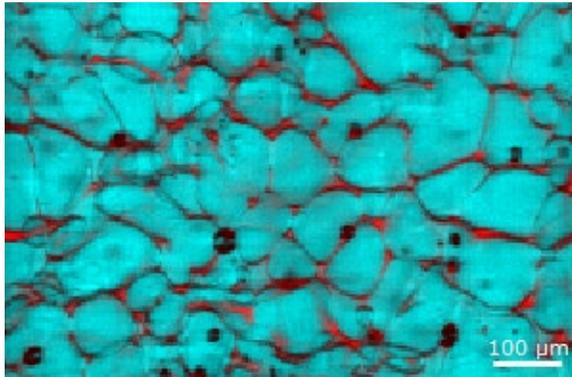


■ タンパク質 ■ 脂肪

(凍結切片作製 不二製油株式会社 芦田様)

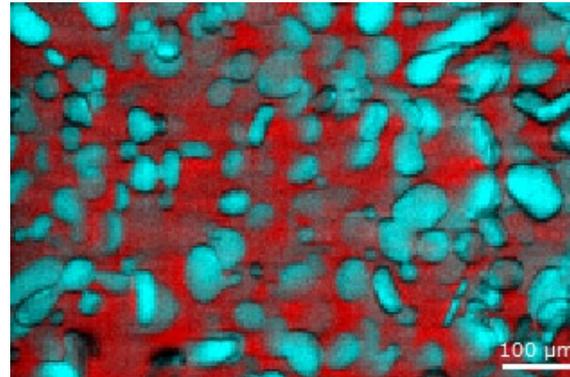
チーズのラマンイメージ

(a) 従来のスポーツドリンク



■ : 氷
■ : 水+糖類

(b) アイススラリー



■ : 氷+糖類
■ : 水+糖類

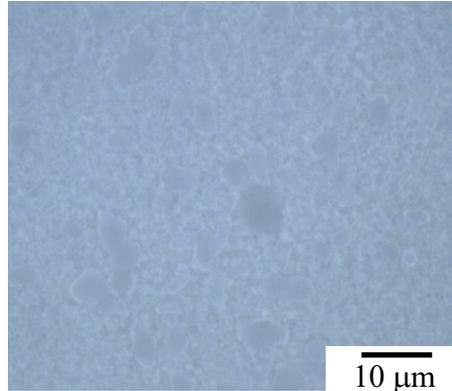
スポーツドリンクのラマンイメージ (-5°C)

(a) ヨーグルト1

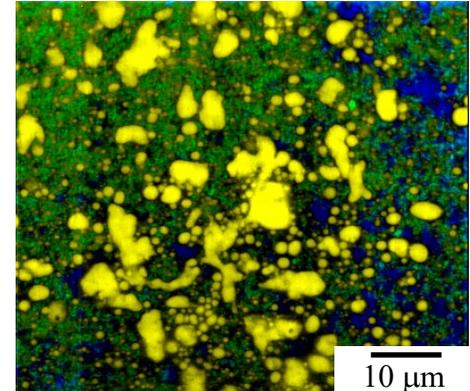


すくい上げると硬さがあり、
食感もしっかりとした印象

(c)



(e)

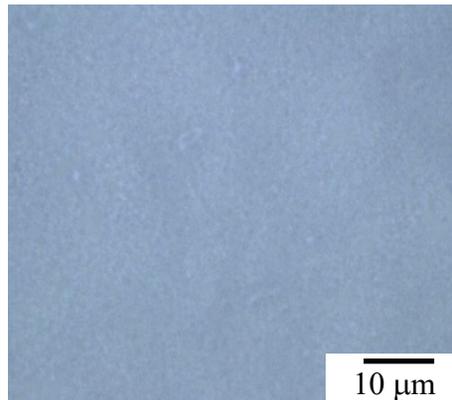


(b) ヨーグルト2

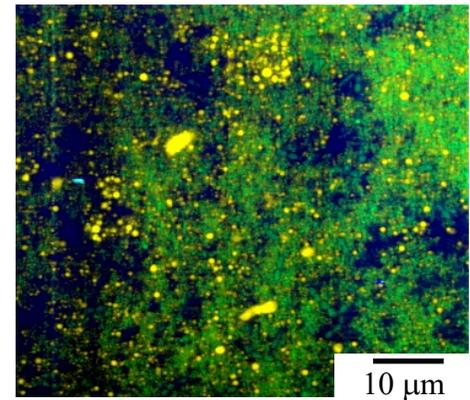


すくい上げた時は硬さを感じ
るが崩れやすく、なめら
かな食感

(d)



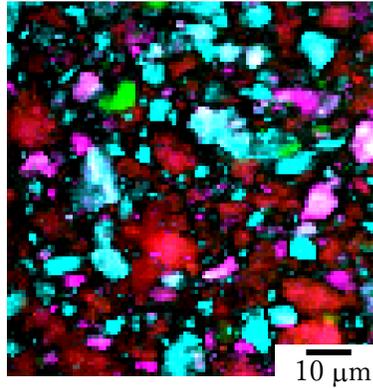
(f)



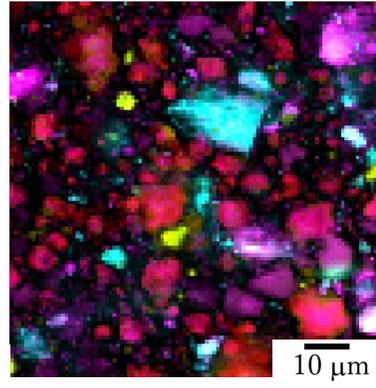
■ 脂肪 ■ タンパク質 ■ 水分

2種類のヨーグルトの外観および特徴、光学顕微鏡像とラマンイメージ (上段：ヨーグルト1、下段：ヨーグルト2)

(a)冷蔵保存前



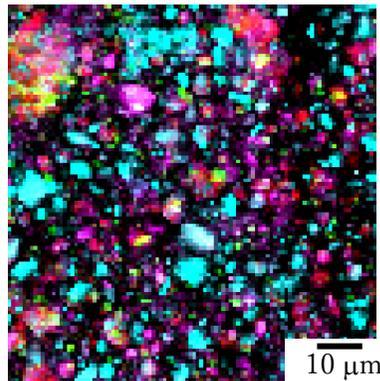
(b)冷蔵保存後



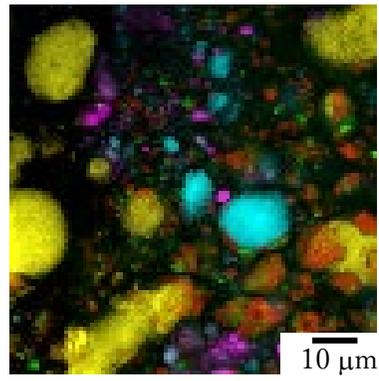
- 脂肪
- タンパク質
- スクロース1
- スクロース2
- ラクトース無水和物
- ラクトース水和物

冷蔵保存前後のホワイトチョコレートのラマンイメージ

(a)融解前



(b)融解・再凝固後

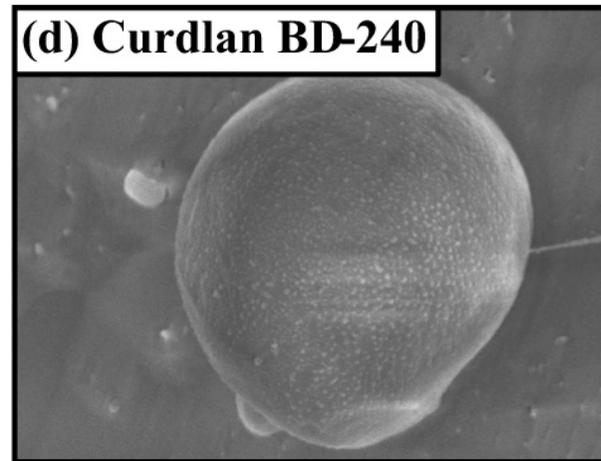
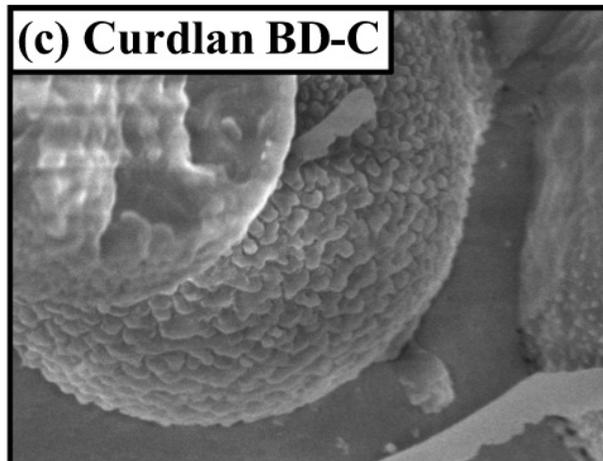
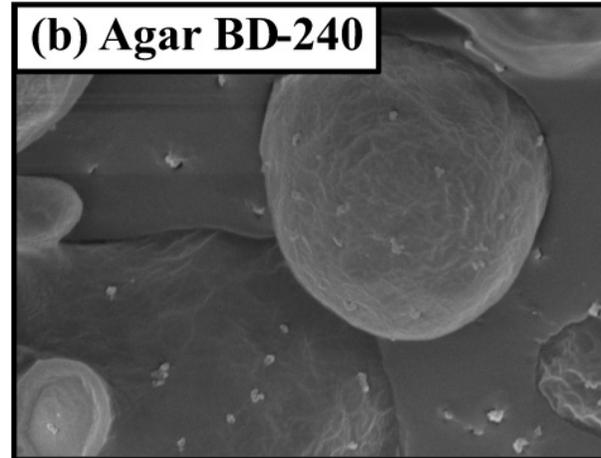
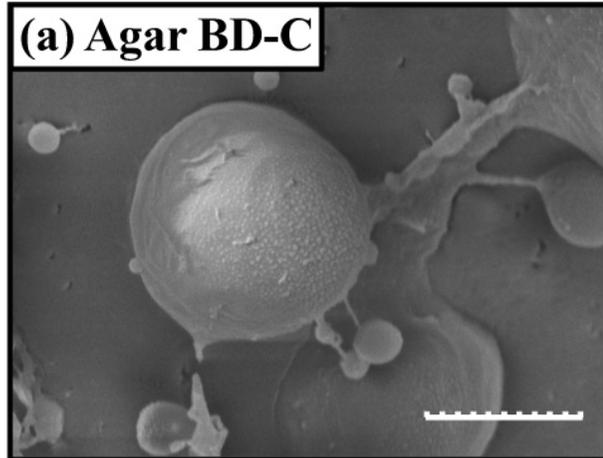


- 脂肪
- タンパク質
- スクロース1
- スクロース2
- ラクトース無水和物
- ラクトース水和物

融解前後のホワイトチョコレートのラマンイメージ

クライオ走査電子顕微鏡観察の実例 (拠点機器番号A-30)

乳化物の観察像 1

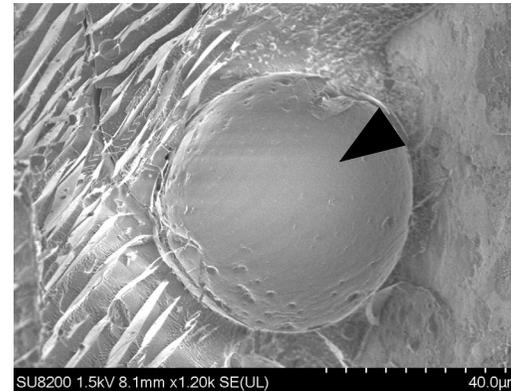
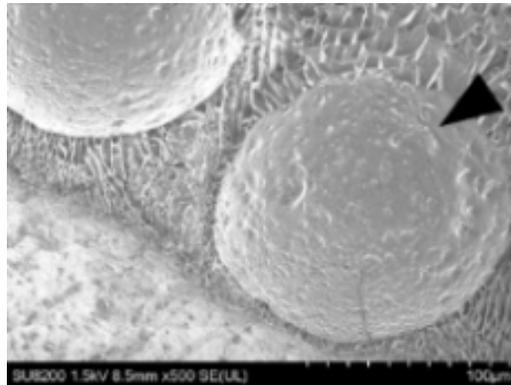


乳化物の観察像 2

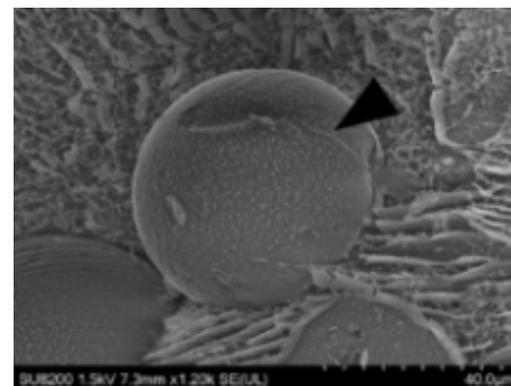
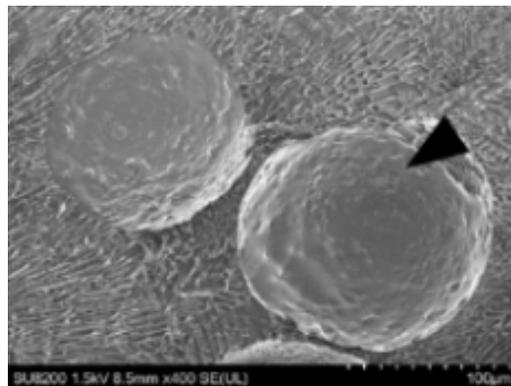
Japanese apricot

Avocado

p/w type
dispersion



p/o type
dispersion



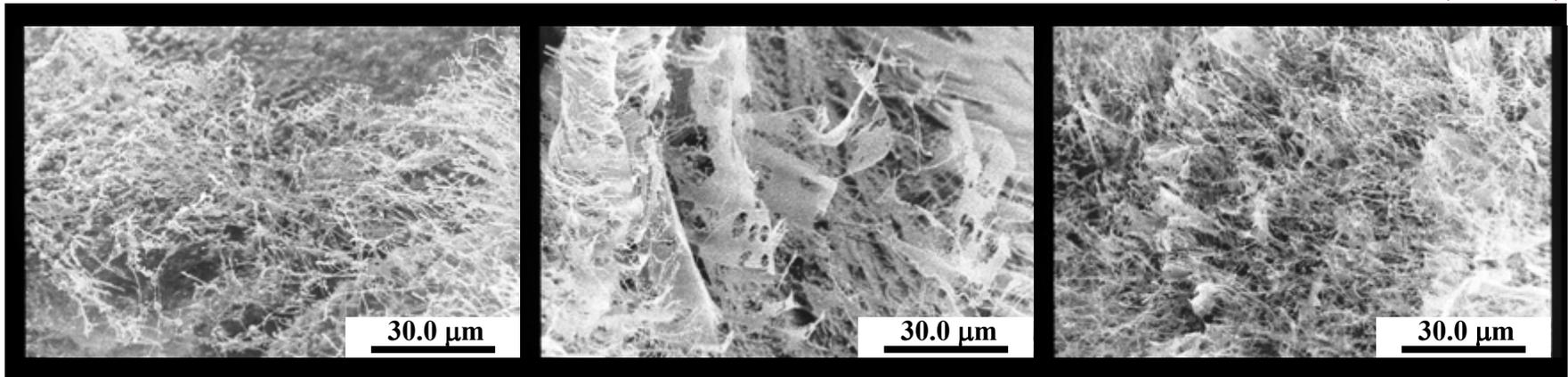
タンパク質の観察像

< bLF >

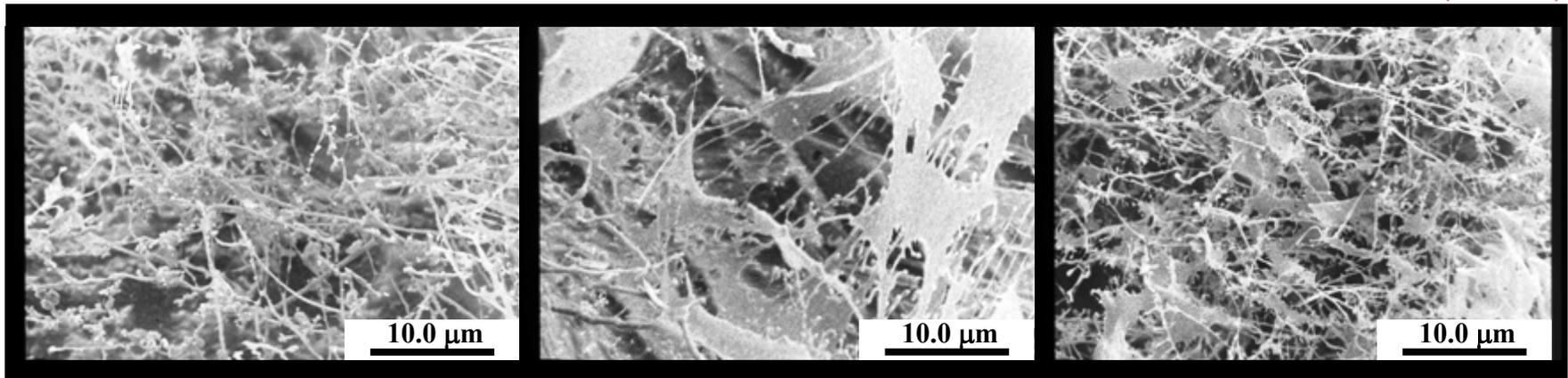
< bLF & SLs >

< SLs >

(x1,000)



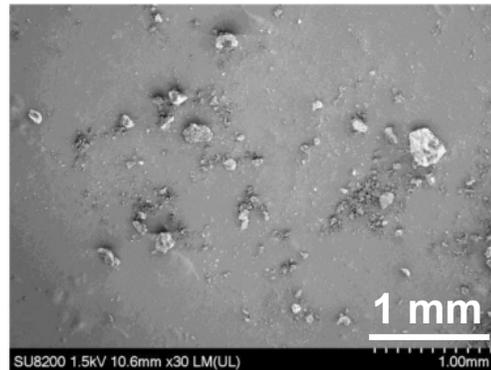
(x3,000)



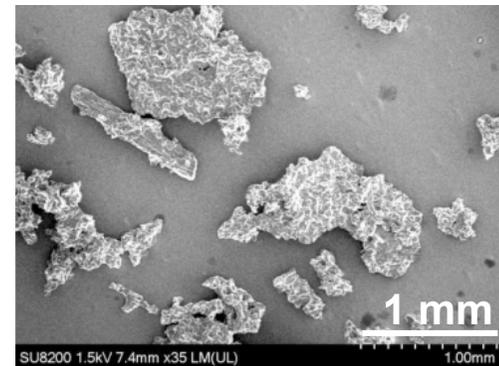
果実粉末と分散液の観察像

Original powders

Japanese apricot



Avocado



Powder dispersion

