

 茨城県 <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2020PX3013 実験課題名(Title of experiment) iBIX テスト測定 実験責任者名(Name of principal investigator) 日下 勝弘 所属(Affiliation) 茨城大学		装置責任者(Name of responsible person) 日下 勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) BL03, iBIX 実施日(Date of Experiment) 2021.3.18

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 実験目的(Objectives of experiment)

iBIX における測定において、特にタンパク質試料の測定では、試料によって作成出来る結晶の品質や大きさにより、得られるデータの分解能が異なるため、構造解析用データを測定するために必要なビームタイムが大きく変化する。このため、要求する分解能をえるために準備すべき結晶のサイズも試料によって大きく異なってくるので、一般課題、BL 利用促進課題に関わらず、課題申請を行う前に予備実験を行うことが望ましい。課題申請を行っていないが、中性子構造解析に興味のある研究者に対して、単結晶が準備できている場合に事前の予備実験時間を割り当てることにより、試料準備に対する具体的な指針を与え、中性子構造解析の可能性を実感してもらい、iBIX への課題申請を促進するし、タンパク質測定ユーザーの掘り起こしを図ることを目的としている。

2. 試料及び実験方法

Sample(s), chemical compositions and experimental procedure

2.1 試料 (sample(s))

時計タンパク質 KaiC(ATPase ドメイン) 結晶 9個

100K にてクライオループにマウントして凍結した状態にて持ち込み、実験に使用した。

2.2 実験方法(Experimental procedure)

タンパク質の単結晶試料を液体窒素を用いてナイロンループにマウントした状態で凍結した。これらの結晶試料 9 個をまず予備測定として、25 分の露光時間で TOF 回折パターンの測定を行った。測定は冷却した窒素気流下(100K)で単結晶試料を低温にして行なった(図1)。この予備測定の結果をもとに、最も結晶性が良く分解能が高いものを選定して、改めてこれを回折計にマウントして、次の日の朝まで長時間測定を実施した。



図 1 低温測定時写真

3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

合計9個の凍結した単結晶試料について試料を凍結した状態で、回折計中心にマウントし、問題なく予備測定を行うことができた(図 2)。測定条件は以下のとおりである。加速器出力:600kW、測定波長領域:2.3~6.3 Å、測定時間:25min。図3にマウントした単結晶試料写真を示す(写真縦横長さ:3mm)。が結晶試料が 0.1mm³~0.4mm³ 程度の大きさであり、標準的な試料サイズ 1mm³ より小さかったこともあり、25min の短時間の測定では、明瞭な回折斑点を確認することができなかった。



図2 低温試料マウント

予備実験の結果や試料サイズ等を考慮して長時間測定を行う試料の選定を行なった。選定した試料について、長時間測定を実施した。測定条件は以下のとおりである。加速器出力:600kW、測定波長領域:2.3~6.3 Å、測定時間:約15時間。この結果最も低角に配置されている検出器 Det#8,7において回折点を確認することができた。Det#8 において、 $d=13.5 \text{ \AA}$ ($\lambda=5.15 \text{ \AA}$)、 $d=8.39 \text{ \AA}$ ($\lambda=4.09 \text{ \AA}$)、Det#7 において $d=8.82 \text{ \AA}$ ($\lambda=4.78 \text{ \AA}$) の反射が観測された。本試料は現状のサイズでも回折斑点を確認できる程度の結晶性を有していることがわかった。しかしながら、現状の強度では本測定を行うことは困難である。これについてはより大型の結晶を準備する必要があることが示された。



図3 低温測定時の単結晶試料

4. 結論(Conclusions)

課題申請を行っていないが、タンパク質の単結晶試料ができているユーザーに対して、結晶性や分解能を評価するためのテスト測定を実施することができた。これにより、今後の結晶化の指針(目標とする結晶の大きさや、結晶性の向上の必要性、結晶凍結の方法の再検討の必要性等)を与えることができた。