

 <b>茨城県</b> <small>IBARAKI Prefectural Government</small>	<b>MLF Experimental Report</b>	
課題番号(Project No.) 2019PX3001 実験課題名(Title of experiment) iBIX テスト課題 実験責任者名(Name of principal investigator) 日下 勝弘 所属(Affiliation) 茨城大学	提出日(Date of Report)  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) 2019.6.7, 6.8, 7.1	

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.

<b>1. 実験目的(Objectives of experiment)</b>
<p>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。課題申請を行なっていないが、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。</p>

<b>2. 試料及び実験方法</b> Sample(s), chemical compositions and experimental procedure
<b>2.1 試料 (sample(s))</b> フェレドキシン-NADP <sup>+</sup> -レダクターゼ FNR 3個(凍結) 光化学系 II PSII (凍結) 3個(凍結) セルロース分解酵素 PC6A 5個(キャピラリー封入) <b>2.2 実験方法(Experimental procedure)</b> タンパク質の単結晶試料を液体窒素によりクライオループにマウントした状態で凍結もしくはキャピラリーに封入して測定に用いた。これらの結晶試料をまず予備測定として、30 分の露光時間で TOF 回折パターンを測定を行った。キャピラリー封入試料についてはそのままマウントし、凍結試料は冷却した窒素気流下(100K)で測定を実施した。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。

### 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11個の単結晶試料について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:500kW、測定波長領域:2.3~6.3Å、測定時間:30min。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)。



図1 試料マウント (PC6A)

FNR については、2つの試料について回折斑点を確認することができた。長時間測定の結果、20時間の測定で1.8Å分解能のデータを得ることができた。

PSII については結晶も小さく(0.36~0.64mm<sup>3</sup>) 予備実験では、回折斑点を確認することはできなかった。20

時間の長時間測定の結果、最も低角の検出器 Det#8 において、d=11.3Åの反射を観測することができた。本試料は、現状の強度では本測定を行うことは困難である。本試料は分子量も大きいことから、より大型でより結晶性の高い結晶試料を準備する必要があることが示された。

PC6A については、0.25mm<sup>3</sup>~0.39mm<sup>3</sup> と標準的なサイズより小さな結晶ではあったが、結晶性の良い反射を得ることができた。20時間の長時間測定の結果から、目視分解能で d=2.7Åの反射を確認した。結晶性は良好であったが、解析用の本測定をするには分解能が低いため、結晶の大型化が必要であることがわかった。

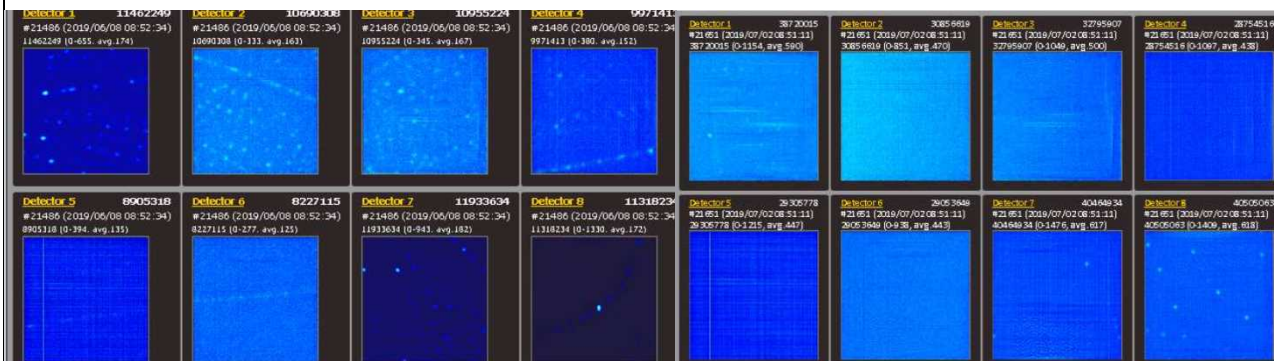


図2 FNR の長時間測定時の回折パターン

図3 PC6A の長時間測定時の回折パターン

### 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。