

# Electron crystallography with MerlinEM

## アセトアミノフェンの構造解析

MerlinEM は、透過型電子顕微鏡(TEM)アプリケーション用の高速、電子カウント、ハイブリッドピクセル検出器です。高ダイナミックレンジ、高耐放射線性、汎用性の高い読み出しシステムにより、電子結晶解析に最適です。



### 主な用途

- 3D ED、マイクロ ED、電子結晶構造解析

### 特徴

- 1 電子イベントの直接検出**  
ノイズフリー読み出し
- ワイドダイナミックレンジ**  
24 ビット最大計数深度、12 ビット、6 ビット、1 ビット計数深度、デッドタイムゼロ
- 高速で多彩な読み出し**  
複数のビット深度モードにより、読み出し速度を変更可能(12 ビット連続モードでは最大 1,825Hz、1 ビット連続モードでは最大 21,000Hz)。
- ビーム耐性**  
ダイレクトビームを制限する必要はありません。30keV~300keV のビームエネルギーに対応
- サイズと取り付け**  
512 × 512 ピクセルで、ほとんどの顕微鏡に適合する静止型およびコンパクトな格納型システム
- インテグレーション**  
TCP/IP によるサードパーティ製ソフトウェア/ハードウェアの制御が可能

透過型電子顕微鏡(TEM)は、物質の化学的・物理的性質を理解するための非常に貴重なツールです。

従来、TEM は静的な試料から 2 次元(2D)画像と回折パターンを測定するために使用されてきました。しかし、この 20 年間で、TEM の柔軟性を利用して、サブミクロンサイズ(500 nm 未満)の試料から 3 次元電子回折(3D ED)(MicroED と呼ばれる)データセットを収集し、構造情報を解明できるようになりました。

3 次元電子線回折は、ゼオライト、鉱物、有機金属骨格、医薬品、タンパク質など、幅広い試料に適用できます。さらに、3D ED への関心と利用が世界的に着実に高まっている背景には、データ収集と処理パイプラインの進歩、そして近年では MerlinEM のような直接検出技術の開発があります。このノートでは、TEM を用いた 3D ED のアプリケーションを、TEM の設定における重要な検討事項と、3D ED における MerlinEM の主な利点に重点を置いて紹介します。

### 実験方法

最も簡単な 3 次元 ED データ取得法は、連続回転電子回折(cRED)法です。この方法では、結晶を静的な平行電子プローブの下で回転させながら、回折データと構造解明に必要なメタデータを記録します(図 1)。

一般に、TEM で cRED を行うには、適切に調整された電子顕微鏡、高いダイナミックレンジを持つ高速で放射線に強い検出器、信頼性の高いデータ収集ソフトウェアが必要です。

cRED データは MerlinEM(512 × 512 ピクセル)と Gatan 914 高傾斜クライオホルダーを備えた加速電圧 200 kV で動作する日本電子 2200FS TEM を用いてアセトアミノフェンから収集しました。TEM は低フラックス( $\sim 0.1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ )TEM モードに設定され、比較的大きな平行プローブを用いて、結晶は選択領域電子回折(SAED)アパーチャーで照射領域を制限して収集しました。ホルダーとゴニオメーターへのアライメントを慎重に行うことで、最大有効傾斜範囲 $\pm 60^\circ$ (結晶が電子ビームに照射され続ける傾斜範囲)を達成しました。有効傾斜角度が大きくとれると、十分な精度を確保するために複数の結晶から得られたデータセットをマージする必要があります。MerlinEM は 12 ビット連続読み出しモードに設定しました。データはオープンソースの Python パッケージ Instamatic で取得しました。

アセトアミノフェンの構造はよく知られていることから、cRED の実装をテストするためにこの材料が選ばれました。

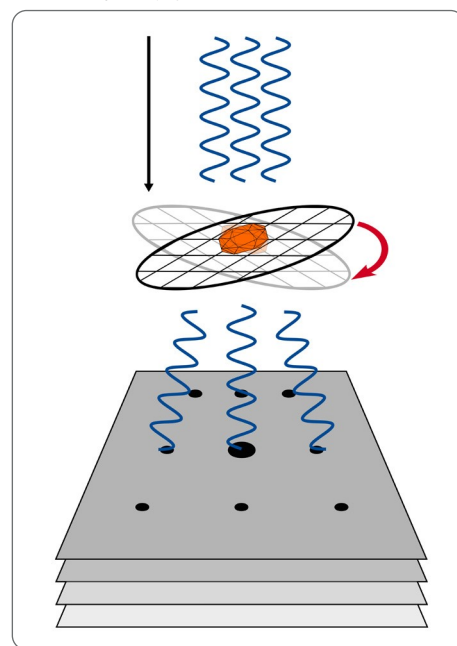


図 1: cRED の模式図



## 結果

データ収集パラメータを表1に示す。表2は、XDS1によるアセトアミノフェンのデータセットの指数付けとデータ結合から得られた主な情報を示しています。データは、想定されるアセトアミノフェンの単斜晶基本格子に一致します。(a = 7.0939 Å, b = 9.2625 Å, c = 11.657 Å,  $\beta = 97.672^\circ$ )<sup>2</sup>。反射強度は空間群P2<sub>1</sub>/nで計算し、SIR20193の直接法を用いて初期構造を決定しました。図2に示す構造は、その後Olex25のSHELXL4で精密化を行いました。

この解析では、動的精密化を行わなかったため、表3のRファクターが高くなっています。

## ディスカッション

この実験では、MerlinEMで収集したデータをよく知られている構造解析プログラムで処理し、アセトアミノフェンの構造解明に3D EDを用いた例を紹介しました。この結果は、3D EDによる構造解析がハイスpekな顕微鏡を必要としないことを明らかにします。この実験では、JEOL 2200FS TEMでデータを収集しましたが、MerlinEMは、TCP/IPを介してサードパーティのソフトウェアやハードウェアと通信し、データ収集を行うことができます。3DEDデータ収集には、InstamaticやSerialEM用のMerlinEMプラグインなど、いくつかの選択肢があります。

一般的に、cRED用のTEMアライメントで最も重要な条件は、ゴニオメーターとホルダーの機械的な精密なアライメントで、定期的なメンテナンスと調整が必要です。

アセトアミノフェンのような電子ビームに敏感な材料の場合、電子線照射量の低減と試料の極低温冷却は、結晶性の維持、ひいては実験中の散乱強度を向上させるために非常に重要です。また、このような実験要求には、MerlinEMの高い感度、ゼロノイズ、広いダイナミックレンジ、高読み出し速度は非常に有用であり、微弱な反射を測定し、3D EDデータ処理に満足するいくデータを提供する上で非常に重要です。

表 1: アセトアミノフェンの cRED データ収集の実験詳細

$\lambda$ (Å)	0.02508 (200 keV)
Oscillation angle (°)	0.2235
Tilt range (°)	94.32
Frames used	422
Exposure time per frame (s)	0.1
Camera length (mm)	377

表 2: アセトアミノフェンのデータセットに対する XDS によるデータ処理の詳細

Resolution (Å)	0.95
No. of total reflections, No. of unique reflections	1706, 646
Completeness (%)	68.4
I/ $\sigma$	2.97
R <sub>meas</sub> (%), R <sub>obs</sub> (%), R <sub>exp</sub> (%)	24.3, 19.4, 28.1

表 3: アセトアミノフェンの精密化データセットの詳細; SIR2019 を用いて解かれた構造と SHELXL を用いて精密化を行なった結果

Empirical formula, Z	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> , 4
a (Å), b (Å), c (Å), $\beta$ (°)	7.070, 9.220, 11.900, 95.58
Space group	P2 <sub>1</sub> /n (14)
Resolution (Å)	0.95
Data/restraints/parameters	1274/24/48
Final R indexes [ $I \geq 2\sigma(I)$ ]	R <sub>1</sub> = 26.91 %, wR <sub>2</sub> = 53.22%
R <sub>int</sub> (%)	21.06
Goof	1.415

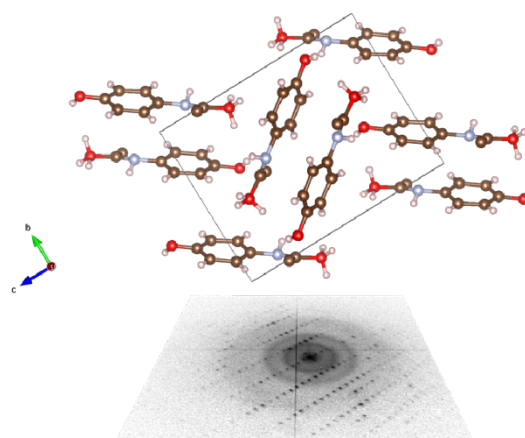


図 2: アセトアミノフェンの精密構造と電子回折図形の例

