

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K14678

研究課題名（和文）放射線損傷限界を超える細胞の分子分解能三次元イメージング

研究課題名（英文）Three-dimensional X-ray nanoimaging of biological cells beyond the resolution limit due to radiation damage

研究代表者

高山 裕貴（Takayama, Yuki）

兵庫県立大学・理学研究科・助教

研究者番号：40710132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞機能の構造基盤を、素過程を担う超分子構造体の構造レベルで可視化することを目指し、単細胞真核生物試料の低温コヒーレントX線回折イメージングCT(CXDI-CT)研究を推進した。特に、放射線損傷限界を超えて、超分子複合体の概形を解像できる数nmの空間分解能を実現する為に、(1)従来より低い照射線量で高空間分解能データを取得するための回折シグナル増強基板の開発、及び、(2)従来よりシグナル対ノイズ比が低い、あるいは少ない回折データからの試料像再生を行う、スパースモデリングを組み込んだ位相回復及びCT再構成法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が実現すれば、細胞機能の構造基盤に分子構造レベルで迫ることができると期待される。開発手法による実験的な細胞構造研究の他、観察結果に基づいて、細胞構造モデルを超分子複合体レベルで構築することで、信頼度の高い計算機シミュレーションと実験を組み合わせた生命現象の理解が可能となる。例えば、細胞分化の研究に応用すれば、将来的に再生医療や生殖医療、代替食品開発等、広範な波及が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：We conducted a structural study of unicellular Eukaryotic cells via cryogenic coherent X-ray diffraction imaging computed tomography (CXDI-CT) toward visualizing structure-function relationship of whole cells at a supramacromolecular level. To extend spatial resolution beyond the radiation damage limit, we developed low-dose CXDI techniques including (1) a practical technique for enhancement of diffraction signals, and (2) phase retrieval and CT reconstruction algorithms implementing regularization techniques used in sparse modeling.

研究分野：X線イメージング

キーワード：コヒーレントX線回折イメージング タイコグラフィ 凍結水和細胞 トモグラフィ 位相回復 シグナル増強 スパースモデリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の目標は、細胞機能の構造基盤を、素過程を担う生体高分子の構造レベルで明らかにすることである。細胞内のオルガネラは数  $\mu\text{m}$  ~ 数百 nm の大きさながら、数十 ~ 数 nm スケールの機能特異的な超構造を持つ。これらの超構造は、大きさ数十 ~ 数 nm の生体高分子群によって構築されると同時に、生体高分子群が動的に相互作用する場となっている。分子構造解析技術の進展により、単離された生体高分子の立体構造が原子分解能で解明され、また、超解像蛍光顕微鏡により、生きた細胞内での分子分布動態が数十 nm 分解能で可視化可能となった。しかし、両知見のギャップを埋める、細胞「丸ごと」の分子構造レベルでの立体構造イメージングは依然として困難である。

その実現に向けて、研究代表者らは、凍結水和細胞の低温コヒーレント X 線回折イメージング(CXDI)技術の開発を進め、三次元構造解析の技術基盤を確立した[1]。本手法では、試料のコヒーレント X 線回折パターンに位相回復アルゴリズムを適用し、電子密度像を得る(図 1(a))。X 線の高い透過性と短波長性、製作が困難な X 線レンズを像形成に用いないことにより、 $\mu\text{m}$  サイズの厚い試料を 50 nm より高い分解能かつ非染色・非侵襲でイメージングできる。試料を凍結水和状態に維持することで X 線照射による放射線損傷を限界まで抑える。本技術を原始紅藻 *C. merolae* に適用し、細胞「まるごと」を 136 nm 分解能で構造解析することに成功し、不均一な核内密度分布や葉緑体チラコイド膜構造を明らかにした[1]。

一方で、上述の実験および放射線損傷に関する先行研究から、三次元構造イメージングの空間分解能は、凍結水和状態であっても 10 ~ 20 nm 程度が限界であると予想された。これは X 線イメージング法の限界であり、CXDI 法の場合、放射線損傷により試料への X 線照射量が制限され、高空間分解能の構造情報を有する微弱なコヒーレント回折シグナルを検出できないことに起因する。本研究目標の達成には、放射線損傷限界を超える空間分解能を実現する技術の構築が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞及びオルガネラ分裂における超構造形成の分子構造基盤の解明を目指し、単細胞真核生物試料の低温コヒーレント X 線回折イメージング研究を推進した。研究目的達成には、放射線損傷限界を超えて、超分子複合体の概形を解像できる数 nm の分解能で細胞「まるごと」の三次元構造解析を行う必要がある。その為に、従来より低い照射線量で高空間分解能の回折データを取得する方法として、(1)コヒーレント X 線の干渉効果を利用したコヒーレント X 線回折シグナル増強法の開発を、従来よりシグナル対ノイズ比が低い、あるいは少ない回折データからの試料像再生を実現する方法として、(2)位相回復及び CT 再構成へのスパースモデリングの導入を技術課題として実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) コヒーレント X 線の干渉効果を利用したコヒーレント X 線回折シグナル増強

回折能の高い金属構造体由来の回折波  $\psi_M$  と細胞の回折波  $\psi_B$  を干渉させることで、細胞の回折シグナルを検出可能なレベルに押し上げる、シグナル増強法[2-3]の実用化研究を進めた。回折強度  $I$  は、

$$I \propto |\psi_M + \psi_B|^2 = |\psi_M|^2 + |\psi_B|^2 + 2\text{Re}(\psi_M^* \psi_B)$$

となり、干渉項により、細胞の回折シグナルを 10 倍以上増強できることをシミュレーション研究により確認している[2]。

これまでに、X 線自由電子レーザー(XFEL)を光源としたサブミクロンサイズの生体粒子の CXDI 向けに、窒化シリコン基板上に高さ 100 nm の金ピラーを並べたシグナル増強基板を、電子線リソグラフィとリフトオフ法を用いて作製した。しかし、本研究で対象とする単細胞真核生物は 5  $\mu\text{m}$  程度の大きさであり、XFEL-CXDI 向けのシグナル増強基板では十分な増強効果が得られない。そこで、放射光 CXDI-CT 向けのシグナル増強基板の開発を行った。

#### (2) 位相回復及び CT 再構成法へのスパースモデリングの適用

CXDI の計測データは回折強度データであるため、高い空間分解能の投影像を得るには、十分

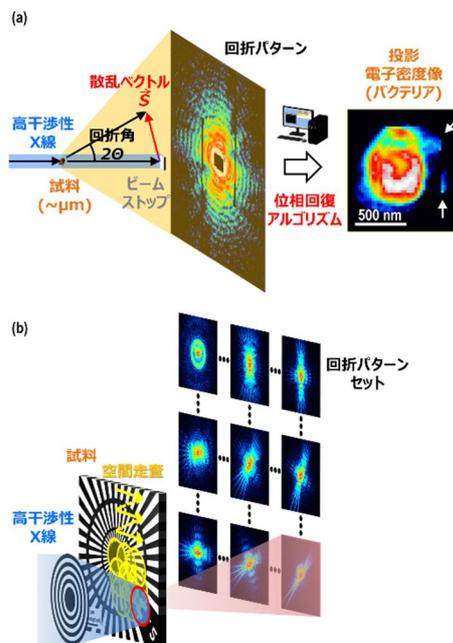


図 1(a) CXDI 法の模式図。再生像の分解能は、散乱ベクトルの絶対値  $S$  の逆数に相当。(b) タイコグラフィ法の模式図。

な照射線量で高回折角まで回折シグナルを計測する必要がある。そのため、低照射線量で高空間分解能の CT 像を再構成するには、粗い角度ステップで取得した少ない投影像から CT 再構成を行うことになる。また、装置上の制約から投影角度は $\pm 80^\circ$ 以下に制限される。CT 像は、試料領域の外側の電子密度がゼロのスパースなデータであることから、ゼロに近い画素値をより小さく抑える効果を有する L1 正則化を組み込んだ CT 再構成アルゴリズムの有効性を検討した。

また、よりサイズの大きな一般的な細胞試料のナノ構造解析へ CXDI を適用するには、走査型 CXDI であるタイコグラフィ法への技術拡張が必要となる。タイコグラフィでは、照射野の一部が重なるように試料をスキャンして回折強度パターンセットを収集し、重なった領域の構造が一致するように位相回復を行う(図 1(b))。シグナル対ノイズ比の小さい、あるいは照射野の重なりが少ない低照射線量回折データセットからの位相回復法として、従来より精密なノイズモデルと自然画像の特徴である「構造的滑らかさ」を拘束とする全変動(Total Variation, TV)正則化を組み込んだアルゴリズムの開発を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) コヒーレント X 線の干渉効果を利用したコヒーレント X 線回折シグナル増強 [シグナル増強基板の開発]

FIB デポジション加工により、直径 1  $\mu\text{m}$  前後、高さ 0.5~1  $\mu\text{m}$  の白金あるいはタングステン製ピラーアレイを窒化シリコン基板上に形成した、シグナル増強基板を開発した(図 2)。FIB 加工で製作する際に基板面も薄く金属コーティングされる問題を解決し、光学顕微鏡で透過観察しながら試料粒子をマイクロピラーアレイ内に置く[4]ことが可能となった。本基板を用いて細胞の凍結水和試料を作製し、着想通り微小液滴中に細胞を保持できることを確認した。

本シグナル増強基板の有効性を、大型放射光施設 SPring-8 BL29XUL での低温 CXDI-CT 実験により確認した。試料には、出芽酵母 *S. cerevisiae* の他、試料作製時の変形等が生じ難い複合樹脂材料(インクトナー)粒子や米デンプン粒子等を、開発手法評価のための主なモデル試料として用いた。試料の散乱断面積に依らず、露光時間 150 秒で 25 nm を超える空間分解能まで回折シグナルを観測することができた(図 2)。

更に、高空間分解能での試料像再生に向けて、X 線光学系の構成を再検討した。その結果、中回折角から高回折角のバックグラウンド散乱を低減し、高空間分解能データのスペックルの鮮明度を向上することができた。また、波動光学シミュレーションによる検討から、試料プランクのデータを減算することで試料由来の極小回折角データを部分的に抽出できることを見出し、小角分解能を 2 倍程度向上することに成功した。

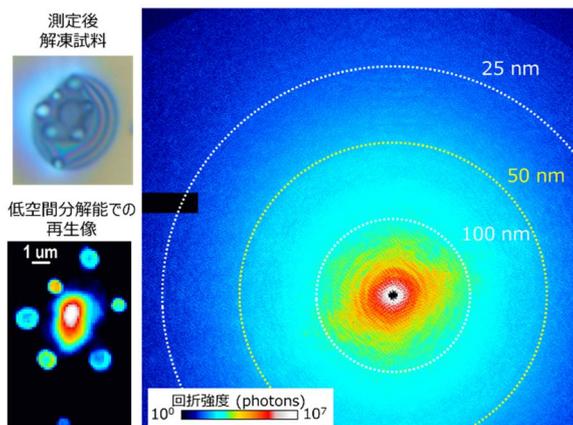


図 2 開発したシグナル増強基板で測定した凍結水和酵母の回折強度パターンと低空間分解能での再生像。

##### [タイコグラフィへの拡張]

現在採用している平面波照明型の CXDI では、計測原理上、ダイレクトビームとの重なりにより極小回折角のデータが欠損する。極小回折角のデータ欠損は位相回復の収束性に強く影響し、その傾向は分裂期細胞のようにより大きな細胞で顕著である。シグナル増強基板では、マイクロピラーアレイを試料粒子周囲に配置する分、散乱体全体のサイズは更に大きくなり、前項の計測上の改善を行っても試料像再生可能なデータの取得に困難が生じた。この課題を解決するために、走査型 CXDI であるタイコグラフィ(図 1(b))の導入に向けた技術検討を進めた。タイコグラフィでは、(a)走査型測定により大きな試料の測定が可能であり、(b)多重測定データを用いた高精度な位相回復や(c)広がったダイレクトビームとの干渉効果によるシグナル増強が期待できる。

SPring-8 BL24XU にタイコグラフィ装置を構築し[5-6]、低温タイコグラフィ CT 実現に向けた技術検討を進めた。低温ステージのドリフトによる像質の劣化が懸念されたため、照射位置精度の悪い計測データを生成し、位置補正アルゴリズムを組み込んだ位相回復法により、空間分解能 10 nm を達成し得ることを実験的に確認した[7]。また、散乱断面積の小さい試料であっても、シグナル増強基板を用いることで位置補正の精度が向上し、高空間分解能の試料像が再生できることが確認できた。

##### (2) 位相回復及び CT 再構成法へのスパースモデリングの適用

###### [L1 正則化 CT 再構成]

計算機シミュレーションや SPring-8 BL24XU で取得した CXDI-CT データを用いて、L1 正則化を組み込んだ CT 再構成法の評価を行った。例えば、投影角度範囲が  $130^\circ$  に制限された金コロイド粒子集合体のデータでは、標準的に用いられているフィルター補正逆投影法では粒子表面が削れて内部の空隙が露出したのに対し、L1 正則化 CT 再構成法を適用することでこれを抑制

し、SEM 像と良く対応した自然な表面形状の CT 像を再構成することができた。

[低線量タイコグラフィ位相回復]

早稲田大学の矢田部浩平博士(現東京農工大学)の協力を得て、ポアソンノイズモデルとTV正則化を組み込んだ新しいタイコグラフィ位相回復アルゴリズム AMPAMを開発した[8]。汎用アルゴリズム[9]で要求される照射線量あるいは回折データ数の凡そ 1/10 のデータセットでも、提案アルゴリズムではモデルを良く再現する試料像を再生することができた(図3)。また、同様にポアソンノイズモデルとTV正則化に基づき、定式化の異なる先行アルゴリズム[10]と比べても、より高精度かつ7-11倍高速であることを示した。

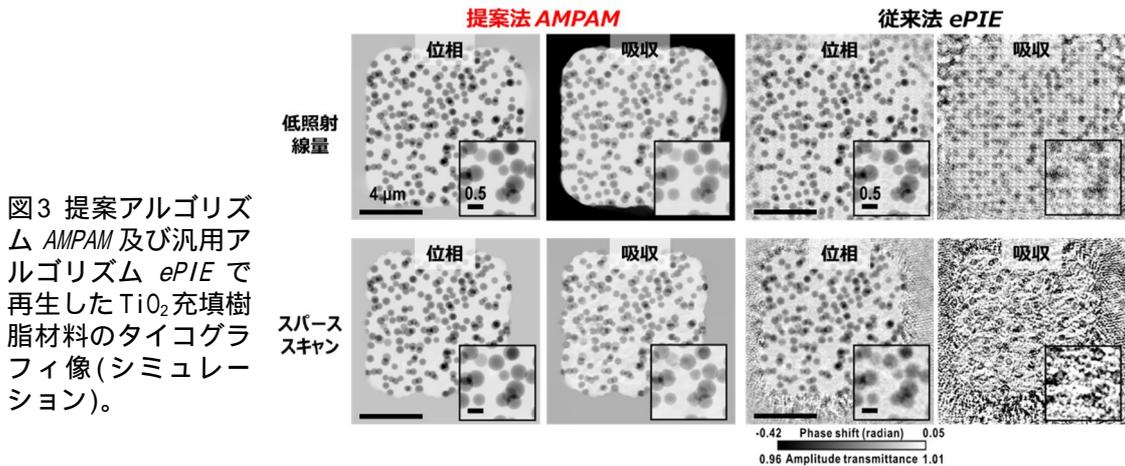


図3 提案アルゴリズム AMPAM 及び汎用アルゴリズム ePIE で再生したTiO<sub>2</sub>充填樹脂材料のタイコグラフィ像(シミュレーション)。

(3) 将来展望

本研究課題により、放射線損傷限界を超えるためのシグナル増強技術、低線量データからの試料像再生技術、クライオタイコグラフィ技術の基盤を構築することができた。2024年度に稼働予定の次世代放射光施設では、コヒーレントフラックスが10倍程度向上すると見込まれており、更なる空間分解能の向上が期待できる。本研究で開発した各技術を統合し、次世代放射光施設で更に深化させることで、本研究の目標である、超分子複合体レベルでの細胞「まるごと」構造解析の実現を目指す。

参考文献

- [1] Kobayashi, Takayama *et al.* “Diffraction apparatus and procedure in tomography X-ray diffraction imaging experiment for biological cells at cryogenic temperature by using synchrotron X-ray radiation” *J. Synchrotron Rad.* **25**, 1803-1818 (2018).
- [2] Takayama *et al.* “Signal enhancement and Patterson-search phasing for high-spatial-resolution coherent X-ray diffraction imaging of biological objects” *Sci. Rep.* **5**, 8074 (2015).
- [3] Takayama & Yonekura “Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological samples at SACLA: a correlative approach with cryo-electron and light microscopy” *Acta Cryst. A* **72**, 179-189 (2016).
- [4] Takayama & Nakasako “Humidity-controlled preparation of frozen-hydrated biological samples for cryogenic coherent X-ray diffraction microscopy” *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 054301 (2012).
- [5] Takayama *et al.* “Dynamic nanoimaging of extended objects via hard X-ray multiple-shot coherent diffraction with projection illumination optics” *Commun. Phys.* **4**, 48 (2021).
- [6] 高山裕貴, 中迫雅由 “SPring-8におけるコヒーレントX線回折イメージングの展開” **64**, 41-49 (2021).
- [7] 高山裕貴, 筆島靖 “コヒーレントX線を用いたレンズレス時空間階層イメージング法の開発” 電気学会 光・量子デバイス研究会, 0QD21068 (2021).
- [8] Yatabe & Takayama “Phase retrieval based on TV-regularized Poisson model for X-ray ptychographic imaging of low contrast object” *J. Appl. Cryst.*, in press.
- [9] Maiden & Rodenburg “An improved ptychographical phase retrieval algorithm for diffractive imaging” *Ultramicroscopy* **109**, 1256-1262 (2009).
- [10] Chang *et al.* “Advanced denoising for X-ray ptychography” *Opt. Exp.* **27**, 10395-10418 (2019).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yatabe Kohei, Takayama Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Phase retrieval based on TV-regularized Poisson model for X-ray ptychographic imaging of low contrast object	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Crystallography	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Amane, Takayama Yuki, Hirakawa Takeshi, Okajima Koji, Oide Mao, Oroguchi Tomotaka, Inui Yayoi, Yamamoto Masaki, Matsunaga Sachihito, Nakasako Masayoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Common architectures in cyanobacteria Prochlorococcus cells visualized by X-ray diffraction imaging using X-ray free electron laser	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83401-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 高山裕貴、中迫雅由	4. 巻 64
2. 論文標題 SPRING-8におけるコヒーレントX線回折イメージングの展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本結晶学会誌	6. 最初と最後の頁 41～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5940/jcrsj.64.41	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Takayama, Keizo Fukuda, Motoki Kawashima, Yuki Aoi, Daiki Shigematsu, Tatsuki Akada, Takumi Ikeda and Yasushi Kagoshima	4. 巻 4
2. 論文標題 Dynamic nanoimaging of extended objects via hard X-ray multiple-shot coherent diffraction with projection illumination optics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42005-021-00539-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masayoshi Nakasako, Amane Kobayashi, Yuki Takayama, Kenta Asakura, Mao Oide, Koji Okajima, Tomotaka Oroguchi and Masaki Yamamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Methods and application of coherent X-ray diffraction imaging of noncrystalline particles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 541-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00690-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高山裕貴
2. 発表標題 コヒーレントX線の最先端利用 - CDIとタイコグラフィ -
3. 学会等名 第61回SPring-8先端利用技術ワークショップ 「物質科学におけるコヒーレントX線利用の最先端研究とその将来展望」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山裕貴、川島基樹、籠島靖
2. 発表標題 縮小投影照明を用いた時分割コヒーレント回折による非孤立物体の動的ナノイメージング
3. 学会等名 第34回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山裕貴、李雷、漆原良昌、桑本滋生、野瀬惣市、吉村真史、芦聡、横山和司、福山直樹、藤井将、小口多美夫
2. 発表標題 兵庫県におけるMI x 放射光分析の産業実装の取り組みの現状と将来
3. 学会等名 第9回MI21フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井雄幹、高山裕貴、筆島靖
2. 発表標題 コヒーレントX線回折トモグラフィにおける投影角度・枚数制限下での三次元再構成法の評価
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayama Yuki、Fukuda Keizo、Kawashima Motoki、Aoi Yuki、Akada Tatsuki、Ikeda Takumi、Kagoshima Yasushi
2. 発表標題 Hard X-ray ptychography with coherent projection illumination optics
3. 学会等名 The 15th Symposium of Japanese Research Community on X-ray Imaging Optics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayama Yuki、Fukuda Keizo、Kawashima Motoki、Aoi Yuki、Oka Shotaro、Ohno Hiroshi、Akada Tatsuki、Ikeda Takumi、Kagoshima Yasushi
2. 発表標題 Hard X-ray Ptychography and Multi-Shot Coherent Diffraction Imaging with Coherent Projection Illumination Optics
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayama Yuki、Kagoshima Yasushi、Oka Shotaro、Ohno Hiroshi
2. 発表標題 X-ray lensless nano-imaging toward investigation of nanostructured materials and devices
3. 学会等名 Symposium on bioinspired design of advanced materials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山裕貴
2. 発表標題 コヒーレントX線を用いたナノ構造可視化技術の開発と産業利用
3. 学会等名 フロンティアソフトマター開発専用ビームライン産学連合体 第11回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山裕貴、籠島靖
2. 発表標題 コヒーレントX線を用いたレンズレス時空間階層イメージング法の開発
3. 学会等名 電気学会 光・量子デバイス研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山裕貴
2. 発表標題 マルチショットコヒーレントX線回折イメージングによるナノ構造ダイナミクスの可視化
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2021シンポジウム「X線・EUV結像光学のフロンティア」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山裕貴
2. 発表標題 コヒーレントX線を用いたレンズレス時空間階層イメージング法の開発
3. 学会等名 SPring-8シンポジウム2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山裕貴、森拓弥、小澤敬祐
2. 発表標題 放射光X線吸収分光イメージングと機械学習による鋼材腐食の反応系列及び生成物空間分布の可視化
3. 学会等名 東北大学 知のフォーラム 実践データ駆動科学オンラインセミナー 第9回「次世代放射光による先端可視化技術とAIの協奏 マテリアルズ・デザインの社会実装を目指して」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上江洲奏、高山裕貴、大出真央、中迫雅由
2. 発表標題 X線回折イメージング像回復効率化のための理論構築
3. 学会等名 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山裕貴、森拓弥、小澤敬祐
2. 発表標題 XAFSイメージングと機械学習による鋼材腐食の反応系列及び生成物空間分布の可視化
3. 学会等名 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山裕貴、福田敬三、川島基樹、青井雄幹、赤田樹、池田匠、籠島靖
2. 発表標題 非孤立物体のナノダイナミクス可視化に向けたマルチショット・コヒーレントX線回折イメージング
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------