

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891033

研究課題名(和文) コヒーレントX線回折顕微鏡法による真核細胞のナノメートル分解能空間階層構造解析

研究課題名(英文) Nanometer-resolution structural analysis of eukaryotic cells by coherent X-ray diffraction microscopy

研究代表者

高山 裕貴 (Takayama, Yuki)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40710132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：生命現象の物理化学的理解には、機能状態の細胞や細胞内小器官「丸ごと」の内部を高い分解能で可視化する必要がある。本研究ではX線自由電子レーザーを利用した低温コヒーレントX線回折顕微鏡法のための試料作製および測定法に関する技術開発を行い、従来法では困難だった大きさ1 μmの葉緑体「丸ごと」を分解能約70 nmで可視化することに成功した。より高分解能でのイメージング実現のため、コヒーレントX線回折シグナルを増強する新たな測定・解析法を開発し、計算機実験により実証した。

研究成果の概要(英文)：Biological cells and organelles are essential for lives. An understanding of their physicochemical functions requires visualization of internal structures of whole cells and/or organelles as close to the native state as possible at high resolution. In this study, we conducted structural study of chloroplasts with a size of 1 micron by cryogenic coherent X-ray diffraction microscopy using X-ray free electron laser. Development of a sample preparation method and a measurement scheme allows efficient diffraction data collection, and we have succeeded in visualization of internal structures of chloroplasts at a resolution of 70 nm. We have also proposed a method to enhance weak diffraction signals from biological samples and to achieve robust phasing, and demonstrated that resolution can be improved by a factor of two or more from a set of calculation based on current experiments.

研究分野：生物物理学

キーワード：X線回折イメージング 凍結水和試料 細胞・オルガネラ 構造解析 X線自由電子レーザー

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象の物理化学的理解には、水和状態の細胞「丸ごと」の内部構造を超分子複合体の解像が可能な nm の分解能で可視化する必要があるが、既存のイメージング技術では困難である。近年ナノ材料粒子などの構造解析に用いられ始めたコヒーレント X 線回折顕微鏡法(CXDM)は、この目的に有効であると期待されている。申請者らは CXDM により自然な状態の生体試料の内部構造をそのまま観察することを目指し、試料作製からコヒーレント X 線回折実験までを一貫した凍結水和試料の低温 CXDM 技術の開発を進めてきた。さらに本技術を最先端のコヒーレント X 線光源である X 線自由電子レーザー(XFEL)と組み合わせることで、不安定な細胞や細胞内小器官でも機能状態の構造を維持したまま高分解能でイメージングできる可能性が出てきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、XFEL を利用した低温 CXDM 法(低温 XFEL-CXDM 法)により単細胞真核生物 *Cyanidioschyzon merolae* やその葉緑体のイメージング研究を行い、細胞・オルガネラの形態形成や分裂機構を分子構造のレベルで解明することを目指している。

### 3. 研究の方法

XFEL は日本では 2012 年に供用が開始された先端的 X 線光源であり、経験蓄積の少ない XFEL-CXDM では慎重かつ着実な研究開発による実験系・解析系の構築が必要であった。本申請では特に(1)低温 XFEL-CXDM 法での効率的なデータ収集に向けた試料作製・測定法の開発と(2)高分解能イメージングに向けた無染色での回折シグナル増強法の開発を進めた。また、開発した手法を *C. merolae* 「丸ごと」や単離した葉緑体などに適用し、理化学研究所の XFEL 施設 SACLA のビームライン BL3 にて低温 XFEL-CXDM 実験を行った。

### 4. 研究成果

(1)低温 XFEL-CXDM 法の試料作製・測定法の開発による葉緑体内部構造の可視化

XFEL-CXDM 実験では、XFEL の強強度・極短パルス性により 1 ショットの XFEL 照射で試料は破壊される。XFEL は高繰り返し性も有するため、イメージング対象粒子を高い数密度で支持膜上に散布してラスタースキャンすることで、新しい粒子を効率的に照射野に供給できる(図 1)。試料支持膜には炭素薄膜や窒化シリコン薄膜が用いられるが、単に試料粒子懸濁液を支持膜上に滴下するのみでは試料粒子が集群化してしまう(図 2)。このような試料では 30%以上の高効率での回折データ収集を実現できないことがモンテカルロシミュレーションにより判明した。

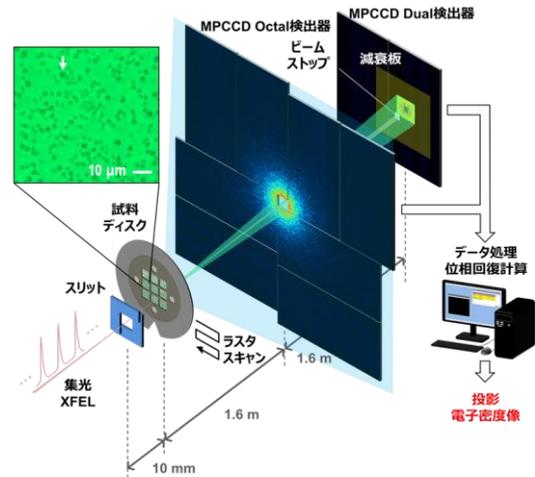


図 1 XFEL-CXDI 実験の模式図(上)と実験ハッチ内の様子(下)

そこで本研究では試料粒子表面の荷電状態に着目し、支持膜に吸着剤処理を施すことで試料粒子と支持膜の相互作用を増強する新たな試料作製法を開発した(雑誌論文①)。申請者が過去に開発した湿度制御下凍結水和試料作製装置と組み合わせることで、様々な生体粒子で高数密度かつ対象粒子が孤立分散した凍結水和試料が作製できることを確認した(図 2)。本手法は材料粒子に対しても有効であった(雑誌論文③, ④)。

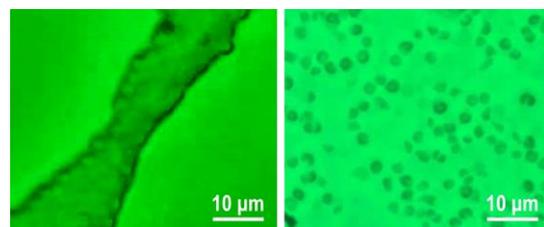


図 2 吸着処理無し(左)および吸着処理を施して作製した(右)凍結直前の葉緑体散布試料

また、試料支持膜を保持する試料ディスクをマルチウィンドウ化して、試料 1 つあたりの XFEL 照射点数を 10 倍以上増やし、効率的な測定を可能とした(図 3)。マルチウィンドウを採用することで、大面積の測定窓で問題となる急速凍結時の支持膜の破損を防ぎながら、測定範囲を広くとることができた。本試料ディスクには回折計にマウントした際の試料中心・傾き決定用のピンホールを備

えており、XFEL ビームに対してエッジスキャンを行うことで測定対象粒子に XFEL を照射することなく、試料の位置出しが行える。本試料ディスクは透過型・走査型電子顕微鏡と共用であり、電子顕微鏡との相関イメージングにも用いることができる。

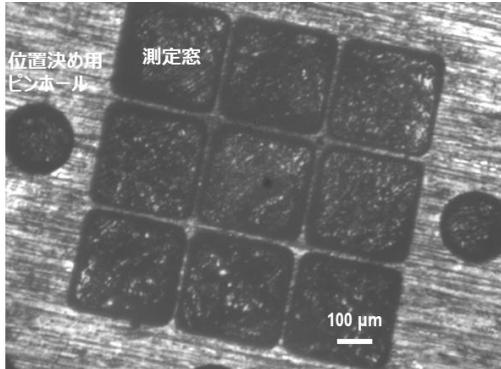


図 3 低温固定試料 X 線照射装置のスクリーンステージにマウントされたマルチウィンドウ試料

以上の方法で作製した *C. merolae* 由来の大きさ 1 μm 程度の葉緑体試料に対して行った低温 XFEL-CXDM 実験では試料位置出しを含む約 40 分の測定で約 1000 ショットの XFEL を照射し、90%以上の回折データ収集効率を実現した。さらに複数の回折パターンからの投影電子密度像の再生にも成功し、光合成反応の場であるチラコイド膜の葉緑体内部での分布を分解能約 70 nm で明らかにした(図 4; 雑誌論文①)。チラコイド膜の分布は *C. merolae* が水中で浮遊生活することを鑑みると光合成反応の効率向上に適したものであると考えられた。

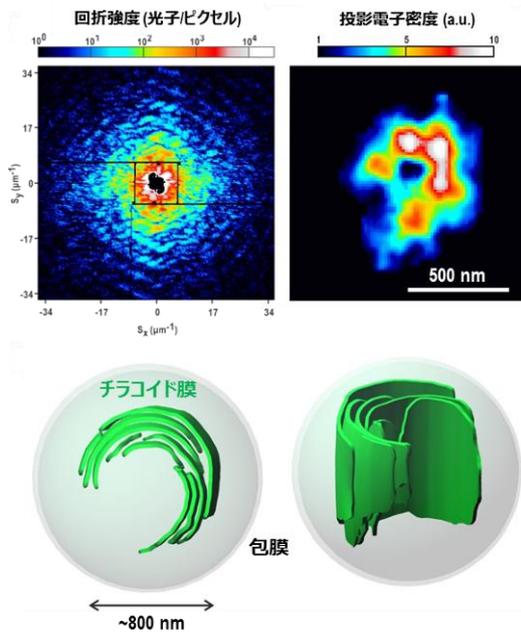


図 4 低温 XFEL-CXDI で得られた葉緑体の回折パターン(上左)と再生された投影像(上右)および予想される葉緑体構造モデル(下)

大きさ 1 μm の試料は電子線が透過しないため内部の高分解能観察はこれまで困難であった。本研究により低温 XFEL-CXDI 法の標準的な試料作製・測定法を構築し、低温 XFEL-CXDI 法が 1 μm 程度の細胞内小器官の構造・機能相関の研究に有効な手法であることを示すことができた。

## (2) 高分解能イメージングに向けた無染色での回折シグナル増強法の開発

生体試料は軽元素から構成されるため X 線回折能が低いが、超強強度の XFEL を光源とすることで分解能 30 nm 程度まで回折シグナルが得られている。しかし、破壊測定である XFEL-CXDI では長時間露光による回折シグナルの積算が不可能なため、到達分解能が制限される。本研究ではより高分解能でのイメージングを目指し、金コロイド粒子を援用した回折シグナル増強法および高信頼度解析法を開発し、SACLA での実験条件に基づく計算機実験で実証した(図 5; 雑誌論文②)。

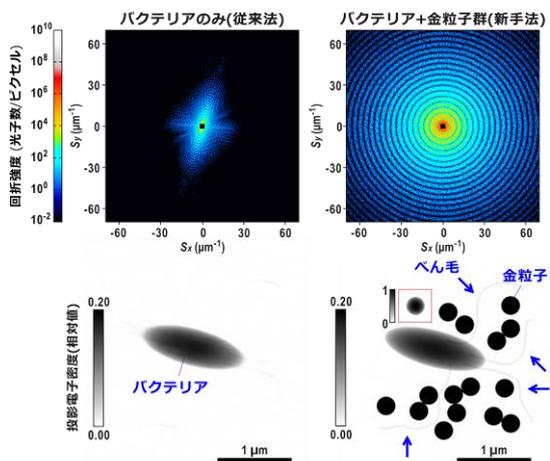


図 5 従来法(左)および金コロイド粒子を援用したシグナル増強法(右)で観測した細菌の回折パターン(上)と再生された投影像(下)のシミュレーション

本手法では対象の生体粒子の周囲に電子密度が 10 倍程度高い金コロイド粒子を多数散布し、両者からの回折 X 線の干渉効果によって生体粒子の弱い回折シグナルを増強する。生体粒子自体を染色しないため、染色による試料の変性や像の誤解釈の原因となる密度コントラストの変調は生じない。更に回折パターンのフーリエ変換で得られるパターン関数には金コロイド粒子同士の相対位置に高いピークが生じるため、これを元に金コロイド粒子の絶対配置を導出し、位相回復計算に利用することで再生像の収束性を高めることができる。

実験での実証に向けて、細菌を標準試料とした XFEL-CXDI 実験を開始しており、細菌のみの試料および細菌と金粒子の混合試料で回折パターンを取得し

(図 6)、解析を進めている。本手法が完成し、XFEL の高度化と併せて超分子複合体が解像可能な分解能でのイメージングが実現すれば、細胞機能を分子構造レベルで議論できるようになり、細胞生物学と構造生物学を結ぶ成果が期待できる。

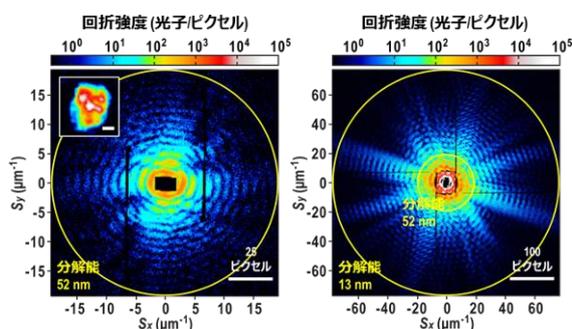


図 6 バクテリアのみの試料(左)およびバクテリアと金コロイド粒子の混合試料(右)で観測された回折パターン(左挿入図は自動データ処理で再生されたバクテリア像)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yuki Takayama, Yayoi Inui, Yuki Sekiguchi, Amane Kobayashi, Tomotaka Oroguchi, Masaki Yamamoto, Sachihiko Matsunaga and Masayoshi Nakasako, “Coherent X-ray diffraction imaging of chloroplasts from *Cyanidioschyzon merolae* by using X-ray free electron laser”, *Plant and Cell Physiology*, 査読有り, 2015, in press. DOI: 10.1093/pcp/pcv032
- ② Yuki Takayama, Saori Maki-Yonekura, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako and Koji Yonekura, “Signal enhancement and Patterson-search phasing for high-spatial-resolution coherent X-ray diffraction imaging of biological objects”, *Scientific Reports*, 査読有り, vol. 5, 8074, 2015. DOI: 10.1038/srep08074
- ③ Amane Kobayashi, Yuki Sekiguchi, Yuki Takayama, Tomotaka Oroguchi and Masayoshi Nakasako, “Dark-field phase retrieval under the constraint of the Friedel symmetry in coherent X-ray diffraction imaging”, *Optics Express*, 査読有り, vol. 22, 27892-27909, 2014. DOI: 10.1364/OE.22.027892
- ④ Yuki Sekiguchi, Tomotaka Oroguchi, Yuki Takayama and Masayoshi Nakasako, “Data processing software suite SITENNO for coherent X-ray diffraction imaging using X-ray free electron laser SACLA”, *Journal of Synchrotron Radiation*, 査読有り, vol. 21, 600-612, 2014. DOI: 10.1107/S1600577514003439
- [学会発表] (計 16 件)
- ① 高山裕貴、乾弥生、関口優希、小林周、荳口友隆、山本雅貴、米倉功治、松永幸大、中迫雅由、「X線自由電子レーザーを利用した低温コヒーレント X線回折イメージング法による葉緑体内部構造の可視化」、分子システム研究 第 4 回春季研究会、2015 年 5 月 16 日、静岡、伊東 (口頭発表)
- ② Yuki Takayama, Koji Yonekura, Masaki Yamamoto, Amane Kobayashi, Yuki Sekiguchi, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako, Yayoi Inui, Sachihiko Matsunaga, “Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of organelles at SACLA”, The 1st SACLA Workshop on Femtosecond Crystallography, 26 Mar. 2015, Harima, Hyogo, Japan (Poster presentation)
- ③ 高山裕貴、眞木さおり、荳口友隆、中迫雅由、米倉功治、「Patterson 解析法を利用したサブミクロン粒子集団のコヒーレント X線回折イメージング」第 28 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2015 年 1 月 12 日、滋賀、草津 (ポスター発表)
- ④ Yuki Takayama, Saori Maki-Yonekura, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako and Koji Yonekura, “Signal enhancement and Patterson-search phasing for high-spatial-resolution coherent X-ray diffraction imaging of biological objects”, 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 27 日、北海道、札幌 (ポスター発表)
- ⑤ 高山裕貴、「SPring-8・SACLA での非結晶生体粒子低温コヒーレント X線回折イメージング」、放射光学会第 6 回若手研究会 コヒーレント X線が拓く構造可視化の新しい世界、2014 年 8 月 23 日、SPring-8 キャンパス、兵庫、播磨 (招待講演)
- ⑥ Yuki Takayama, Masayoshi Nakasako, Tomotaka Oroguchi, Yuki Sekiguchi, Masaki Yamamoto, Koji Yonekura, Yukio Takahashi, Akihiro Suzuki, Sachihiko Matsunaga and Yayoi Tsujimoto-Inui, “Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological particles at SACLA”, 7 Aug. 2014, Montreal, Quebec, Canada (Oral presentation)
- ⑦ 高山裕貴、眞木さおり、荳口友隆、中迫雅由、米倉功治、「生体粒子の高分解能コヒーレント X線回折イメージングに向けた金属粒子による回折シグナル増幅及び位相決定法の開発」分子システム研究 第 3

回春季研究会、2014年4月25日、滋賀、彦根（口頭発表）

- ⑧ 高山裕貴、眞木さおり、荳口友隆、中迫雅由、米倉功治、「生体粒子のコヒーレントX線回折イメージングにおける金コロイド粒子を利用した回折シグナル増幅及び位相決定法の開発」第27回日本放射光学学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2014年1月13日、広島、広島（ポスター発表）

〔その他〕

プレスリリース

[http://www.spring8.or.jp/ja/news\\_publications/press\\_release/2015/150129/](http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2015/150129/)

新聞報道

「生体試料イメージングの分解能・信頼性を大幅向上」、科学新聞、2015年2月16日  
他2件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高山 裕貴 (TAKAYAMA, Yuki)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総

合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40710132