

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分  
平成30年3月12日現在

**X線レーザー回折による生細胞ダイナミクス**  
Cell dynamics studied by X-ray laser diffraction

課題番号：15H05737

**西野 吉則 (NISHINO YOSHINORI)**

北海道大学・電子科学研究所・教授



研究の概要

フェムト秒パルスのX線自由電子レーザー（XFEL）を用いて、独自開発したパルス状コヒーレントX線溶液散乱（PCXSS）法により、生細胞のナノレベルダイナミクスを観察することを目指した研究を行っている。同調培養、試料温度制御、ケージド化合物を用いたフラッシュ・フォトリソスなどの技術開発を進めたほか、XFELイメージング手法を高度化する研究を行っている。

研究分野：量子ビーム科学、X線

キーワード：X線自由電子レーザー、パルス状コヒーレントX線溶液散乱、細胞

1. 研究開始当初の背景

X線自由電子レーザー（XFEL）は、フェムト秒という極めて短いパルス幅をもつ、強力な質の高いコヒーレントX線である。この優れた特徴を利用すると、試料が放射線損傷を受ける前の、一瞬の姿を捕らえることができる。

コヒーレントなXFELは、また、対物レンズのないコヒーレント回折イメージング

（CDI）を可能にする。研究代表者の西野らは、X線にとって透明な無染色の生物試料に対し、CDIによる高コントラストなナノイメージングを実証してきた。

本研究課題に参加する研究者らは、さらに、パルス状コヒーレントX線溶液散乱（PCXSS）法と名付けた、XFELを利用した試料環境を制御したCDIを構築し、SACLAを用いて、生きた細胞のナノイメージングに世界で初めて成功した。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでのPCXSS法による試料損傷のないイメージング技術をさらに発展させ、生きた細胞のナノレベルダイナミクスの観察を目指す。極限環境でも安定に機能する酵素の開発など、我々の生活に密着した安心・安全社会に通じるテーマである。

3. 研究の方法

XFEL測定では、シングルショットで試料は破壊されてしまうため、一つの細胞を時系列でイメージングすることはできない。そこで

本研究課題では、いくつかのアプローチにより細胞の状態を同期させ、異なる状態の細胞を、XFELを用いてイメージングすることにより、生きた細胞のナノレベルダイナミクスの観察を目指す。細胞を同期させる方法として、同調培養、試料温度制御、ケージド化合物を用いたフラッシュ・フォトリソスなどの技術開発に取り組む。

XFELによるイメージングは、独自に構築したPCXSS法を用いて、SACLAにおいて行う。試料の細胞は、マイクロ液体封入アレイ（MLEA）に封じ込め、真空容器内に設置する。MLEAに封入した生きた細胞等の溶液試料に、集光したXFELのシングルパルスを次々照射して、コヒーレントX線回折（CXD）パターンを計測する。計測したCXDパターンに反復的位相回復法を適用し、試料像を再構成する。

4. これまでの成果

同調培養では、細胞周期の各段階での細胞のイメージングを目指す。細胞の最も基本的な現象といえる細胞分裂の機構は、バクテリアに対しては未解明の部分が多い。これはバクテリア細胞のサイズが小さく、内部構造の可視化が困難であることが一因に挙げられる。本研究では、バクテリアの中でも群を抜いて小さい、*Microbacterium*属の細菌を試料に用いた。

本研究ではアミノ酸飢餓により細胞周期を同調させることに成功した。バクテリアの同調培養技術は、大腸菌でのみ技術が確立されており、*Microbacterium*属の細菌の同調

培養は、それ自身で細胞生物学的な意義がある。同調培養した細胞に対する PCXSS 測定の結果、核様体に起因すると解釈できる構造が明瞭に観察された。

試料温度を制御した PCXSS 測定に向けた技術開発も進めた。米国の XFEL 施設 LCLS で行われているコヒーレント X 線イメージング測定では、エアロゾルインジェクターを用いて打ち出した飛翔した試料を主に測定しており、試料温度の精密制御は困難である。このため、本開発は、PCXSS 法が新たな可能性を切り開く研究と言える。

ペルチェ素子を用いた試料温度制御装置を設計・製作し、PCXSS 測定において問題なく使用できることを確認した。温度応答性金ナノ粒子の PCXSS 測定では、高温において金ナノ粒子が形成する集合体をイメージングすることに成功した。加熱殺菌に関連して、乳製品中に生息する *Microbacterium* 属の細菌に対する温度制御 PCXSS 測定も進めている。

平成29年度より SACLA において利用可能になったポンプ・プローブ測定に対応したコヒーレント X 線イメージング装置 (MAXIC-II) を用いた時間分解 PCXSS 測定を開始した。測定では、波長可変ナノ秒レーザーをポンプ光に、XFEL をプローブ光に用いる。マイクロ液体封入アレイ内の試料に、ポンプ光およびプローブ光を干渉なく照射する光学設計を行い、実装した。

MAXIC-II を用いて、DNA 修飾した AgCl 粒子から機能性銀ナノ粒子への光変換過程をポンプ・プローブ PCXSS 測定する研究を進めている。さらに、ケージドプロトンを用いた、フラッシュ・フォトリシス測定を開始した。ケージドプロトンに紫外線のポンプ光を照射すると、保護基が解離され、プロトンを放出し、瞬時に pH を下げることができる。ポンプ・プローブ PCXSS 測定により、pH 変化後の試料ダイナミクスの測定を目指す。

さらに、表面増強ラマン散乱やドラッグデリバリーにおける薬剤のキャリアなどへの応用に向けて開発されている各種の金ナノ粒子集合体に対して PCXSS 測定を行った。グルコース末端を持つフッ素化オリゴエチレングリコールで表面を修飾した2つのサイズの異なる金ナノ粒子が、ジオキサン水溶液中でサイズ分離し、小さなサイズの金ナノ粒子が外殻に一層あり、内側に大きなサイズの金ナノ粒子が分布する、Yolk/Shell (卵黄/卵殻) 構造に自己集合することを、直接観察することに成功した [1]。また、XFEL を用いた世界初の産学連携研究の成果創出を行った [2]。

コヒーレント回折イメージング手法の高度化として、4 つのアダプティブ全反射鏡を用いた X 線ズームレンズ光学系を構築した [3]。本光学系では、X 線強度の損失無しで、X 線ビームサイズを自由自在にマイクロからナノレベルまで変えることができる。この

技術を用いると、実験施設に限られる XFEL において、実験装置を入れ替えることなく、視野を変えた多彩なイメージング測定を効率的に行うことができるようになる。

この新規の光学系を用いて、独自開発した非走査型のアポダイズ照明コヒーレント回折イメージング法により、X 線集光スポットサイズよりも大きな試料の像再構成に成功した [4, 5]。

## 5. 今後の計画

同調培養と試料温度制御に関しては、これまでの研究で測定装置・手法の開発が順調に進み、基本的な技術開発が完了した。今後、開発した技術による成果創出を目指す。さらに、平成 29 年度より SACLA で利用可能になった MAXIC-II を用いて、ポンプ・プローブ PCXSS 測定の技術開発を進める。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. J. Wei, K. Niikura, T. Higuchi, T. Kimura, H. Mitomo, H. Jinnai, Y. Joti, Y. Bessho, Y. Nishino, Y. Matsuo and K. Ijro, "Yolk/Shell Assembly of Gold Nanoparticles by Size Segregation in Solution", *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3274–3277 (2016).
2. R. Yoshida, H. Yamashige, M. Miura, T. Kimura, Y. Joti, Y. Bessho, M. Kuramoto, J. Yu, K. Khakurel, K. Tono, M. Yabashi, T. Ishikawa and Y. Nishino, "Extending the potential of x-ray free-electron lasers to industrial applications — an initiatory attempt at coherent diffractive imaging on car-related nanomaterials", *J. Phys. B* **48**, 244008–244012 (2015).
3. S. Matsuyama, H. Nakamori, T. Goto, T. Kimura, K. P. Khakurel, Y. Kohmura, Y. Sano, M. Yabashi, T. Ishikawa, Y. Nishino and K. Yamauchi, "Nearly diffraction-limited X-ray focusing with variable-numerical-aperture focusing optical system based on four deformable mirrors", *Sci. Rep.* **6**, 24801 (2016).
4. K. Khakurel, T. Kimura, Y. Joti, S. Matsuyama, K. Yamauchi and Y. Nishino, "Coherent diffraction imaging of non-isolated object with apodized illumination", *Opt. Express* **23**, 28182–28190 (2015).
5. K. P. Khakurel, T. Kimura, H. Nakamori, T. Goto, S. Matsuyama, T. Sasaki, M. Takei, Y. Kohmura, T. Ishikawa, K. Yamauchi and Y. Nishino, "Generation of apodized X-ray illumination and its application to scanning and diffraction microscopy", *J. Synchrotron Rad.* **24**, 142–149 (2017).

ホームページ等

<http://cxo-www.es.hokudai.ac.jp/>