

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19310084
 研究課題名（和文）
 コヒーレントX線回折顕微法による生物試料のナノ構造解析
 研究課題名（英文）
 Nanostructure Analysis of Biospecimens with Coherent X-ray Diffraction Microscopy
 研究代表者
 西野 吉則（Nishino Yoshinori）
 独立行政法人理化学研究所・石川X線干渉光学研究室・専任研究員
 研究者番号：40392063

研究成果の概要（和文）：

X線回折顕微法によって生体試料を観察する際に必要となる、顕微鏡装置、試料調製、データ測定、データ解析などに関わる研究を行った。この結果、エネルギーの高いX線を用いて、世界で初めて、細胞小器官を3次的に観察するなど、世界をリードする研究成果を収めた。我々が可視化に成功した無染色のヒト染色体には、イメージコントラストを人為的に高める染色等をしない状態では初めて、軸状構造が観察されるなど、生物学的にも新たな知見を与えた。

研究成果の概要（英文）：

We performed research in bioimaging with x-ray diffraction microscopy on various aspects concerning microscope hardware development, sample preparation, data acquisition, data analysis, etc. We achieved results including first three-dimensional observation of a cellular organelle using hard x-rays leading research in the field. Our study also provided structural information of biological interest. For example, in the chromosome image which we successfully visualized, axial structure was observed first without staining or other methods to artificially enhance image contrast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：コヒーレントX線、染色体、X線回折顕微法、ナノ構造解析、位相コントラストイメージング、オルガネラ、高次構造、位相回復

1. 研究開始当初の背景

X線回折顕微法は、これまで実現が不可能であった、ナノメートル・原子の空間分解能を達成可能とする斬新なX線顕微法であり、世界的な注目を集めている。従来型のレンズ

を用いたX線顕微法では、開口数の大きなX線レンズの作製が困難なため、高い空間分解能の実現が難しかった。これに対し、X線回折顕微法は、レンズを必要とせず、コヒーレントX線回折データから計算機上で散乱の逆問題（位相問題）を解

くことによって、試料像を再構成する新しい方法である。

X線回折を利用した原子構造解析は、これまで、試料が結晶である場合に限定されていた。X線回折顕微鏡法は、コヒーレントX線を利用することにより、細胞など結晶化できない試料に対しても、ナノメートル・原子の空間分解能を可能とする点が画期的である。

原子分解能を持つ顕微鏡には、既に、透過電子顕微鏡、走査プローブ顕微鏡、アトムプローブ顕微鏡などが存在する。X線回折顕微鏡法は、X線の高い透過性を活かし、これら従来の顕微鏡では困難だった、マイクロメートル・オーダーの厚い試料に対する3次元イメージングができるという重要な利点がある。このため、生体試料を薄切片にすることなく、生きているに近い状態でのイメージングが可能となる。

X線回折顕微鏡法の着想は1950年代と極めて古い、世界初のデモンストレーション実験の報告は1999年になりようやく行われた。このように時間を要したのは、実験に不可欠なコヒーレントX線を得るために、放射光技術の進展を待たなければならなかったためである。

その後、日本のSPring-8を初めとする先端放射光施設で、X線回折顕微鏡法の基礎研究が進められた。2003年になり、この手法による世界初の生体イメージングである、大腸菌観察の報告が、研究代表者らによって行われた。基礎研究の進展に伴い、研究の重点は、科学的に有意義な構造情報を得ることを目的とした応用研究へと移りつつある。

2. 研究の目的

本研究課題は、可能な限り「生きた」状態に近い生体試料をX線回折顕微鏡法で可視化することによって、生物現象の理解に貢献することを目的としている。

本研究課題では、生体試料の中でも細胞小器官（オルガネラ）を主な対象とする。X線の高い透過性を活用して、オルガネラを丸ごとイメージングすることにより、他の顕微鏡では観察が困難な高次構造の解明を目指す。

本研究課題では、特に、細胞核・染色体に重点をおき研究を行う。直径2 nm、全長2 mにも及ぶヒトゲノムDNAは、通常、直径数 μm 程度の細胞核に納められている。そして、細胞が2つに分裂する際に、ゲノムDNAは短時間に46本の染色体に凝縮する。染色体が「ゲノムDNAからいかに折り畳まれているのか？」は染色体発見から100年以上経過した今でも謎であり、生物学者たちの興味を集めている。ポストゲノム時代といわれ、ヒトゲノムの1次配列がほとんど解読されたいま、細胞核・染色体のゲノムの高次構造を知ることは生物学上の最重要課題の1つである。

3. 研究の方法

(1) X線回折顕微鏡法

図1に、X線回折顕微鏡法の模式図を示す。X線回折顕微鏡法実験には、コヒーレントX線が必須である。コヒーレントX線とは、波の波面が揃ったX線で、優れた干渉性を示す。我々は、コヒーレントX線として、世界最先端の低エミッタンス蓄積リングであるSPring-8からのアンジュレーター放射光を用いた。X線回折顕微鏡法の実験は、SPring-8の理研ビームラインBL29XUにおいて行った。

X線回折顕微鏡法では試料にコヒーレントX線を照射し、試料からのコヒーレントX線回折パターンを、遠方界において、X線CCD検出器等の2次元検出器を用いて計測する。本研究課題では、研究代表者らが開発した既存のX線回折顕微鏡法装置を活用した。ただし、生体試料の測定において必要となるハードウェア類の開発は、本研究課題で進めた。

測定に用いる生体試料は、X線の吸収や散乱が無視できる極めて薄い100 nm程の厚みの窒化ケイ素膜上に分散した。単離したオルガネラ試料1個のみにコヒーレント線が照射するように、試料の上流に20 μm 程の直径のピンホールを設置し、また、分散させる試料の密度を最適化した。X線回折顕微鏡法の測定に適した生体試料の調整法については、本研究課題で開発を進めた。

X線回折顕微鏡法では、測定したコヒーレントX線回折パターンデータを、計算機で処理することにより、試料像を再構成する。データ解析では、反復的位相回復法を用いた。従来の位相回復法を更に発展させたアルゴリズムの改良は本研究課題で進めた。

試料を回転させ、様々な入射角で測定したコヒーレントX線回折データからは、試料の3次元構造を再構成することができる。3次元の試料像再構成には、比較的大規模の計算機が必要とされるが、本研究課題では理研が所有する、コヒーレントX線データ解析装置を活用した。

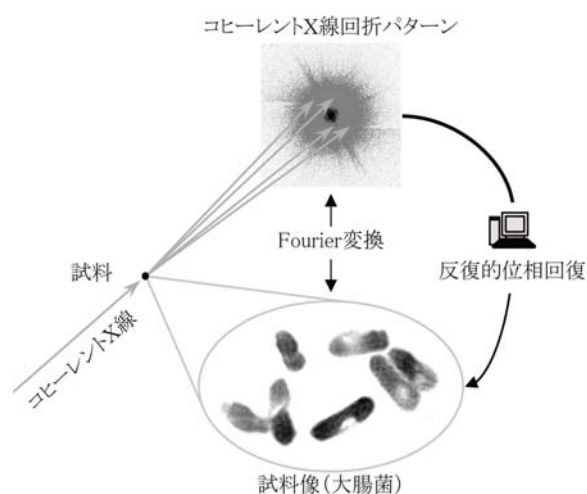


図1 X線回折顕微鏡法の概念図

(2) 研究体制

本研究課題は、図2に示すような役割分担で、相互に連携して進めた。X線回折顕微法による測定は、SPring-8の理研ビームラインBL29XUにおいて、全てのメンバーが参加して行った。測定に用いた生体試料は、前島が調製してSPring-8に持ち込んだ。測定では、西野らが製作した既存のX線回折顕微鏡装置を用いた。

測定で得られたコヒーレントX線回折データは、西野らが解析し、試料構造を再構成した。得られた構造データは、前島により生物学的観点から解釈が行われた。

X線回折顕微法測定で得られた結果を元に、装置の改良、試料調製法の改良、データ解析アルゴリズムの改良を進めた。

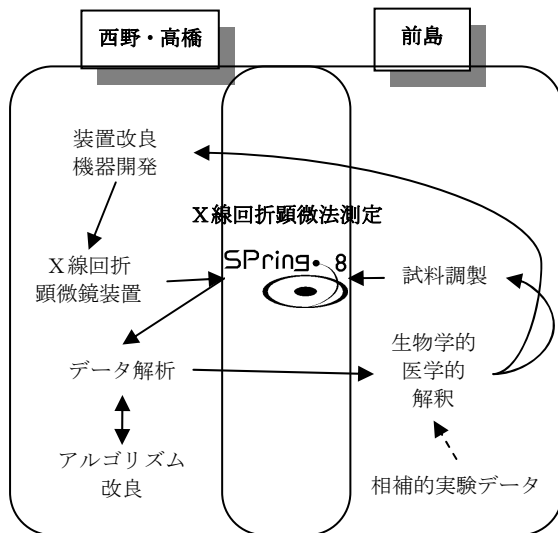


図2 研究体制

4. 研究成果

(1) 生物学的に意義の高い試料の選定

生物学的意義が高く、かつ既存のX線回折顕微法装置を用いた測定に適しているという観点から、染色体を最優先ターゲットに選定した。

染色体は、遺伝情報を担う重要なオルガネラである。その高次構造はいまだ未知の部分が多く、高い透過能をもつX線を用いた丸ごとイメージングを行う意義が高い。

X線回折顕微法を、エネルギーの高い硬X線を用いて行う場合、数 μm 程度の大きさの試料が測定に適している。染色体は直径約 $0.7\mu\text{m}$ で長さ数 μm 程度であり、X線回折顕微法測定のターゲットにふさわしい。

さらに、染色体はコンパクトに凝集しており、密度が高い。また、生体を構成する元素としては比較的重いリンを多く含んでいる。これらの理由から、X線による散乱が強いという利点もある。

(2) 試料調製法の検討

染色体試料の各種調整法について、SPring-8のビームラインBL29XUにおいて実際にX線回折顕微法測定を行うことによって比較・検討を行った。四酸化オスミウム染色をした染色体や、無染色の染色体を比較した結果、無染色の染色体に対してノイズ散乱強度が最も小さなデータが得られ、X線回折顕微法測定に適していることが分かった。四酸化オスミウム染色をした場合、試料からの散乱に加え、溶媒に含まれていたオスミウムからの散乱がノイズとして寄与し、これが悪影響を与えたと考えられる。無染色の染色体はより「生きた」状態に近いと見られ、これは好ましい結果である。

X線回折顕微法測定に適した無染色のヒト染色体試料の調整法に関して、さらに研究を進めた。HeLa細胞から単離精製したヒト染色体を、グルタルアルデヒドで化学架橋した後、窒化シリコン膜に遠心力で固定する方法を開発した。また、ヒト染色体の単離・精製法の改良を行い、効率的に1個1個のヒト染色体を培養細胞から単離することが可能となった。具体的には、染色体を単離するヒト培養細胞の種類の変更、培養条件（スピナーフラスコ）の改良、染色体単離の際のグリセロール密度勾配遠心の改良である。

(3) 生体試料に対するX線回折顕微法測定技術の確立

2次元検出器で計測されるスペックル当りのコヒーレントX線回折強度は、一般に、X線のエネルギーの2乗に反比例して弱くなる。本研究課題で測定に用いるX線のエネルギーの選定では、S/N比の良いコヒーレントX線回折データを得ることに主眼を置き、BL29XUで得られる最も低いX線エネルギーである 5keV とした。

X線回折顕微法測定では、試料以外のピンホール等からの寄生散乱を抑えることが重要となる。寄生散乱の影響は、コヒーレントX線回折パターンの中心部で特に顕著で、データ欠如領域を生じさせる。寄生散乱を抑えることで、中心部のデータ欠如領域を小さくでき、結果として、試料像再生が確実にできる。本研究課題では、寄生散乱を抑えるため、ピンホールやガードスリットの材質や形状の改良を行った。

(4) データ解析法の改良

3次元像の再構成には様々な入射角でのコヒーレントX線回折データを用いる。各入射角でのコヒーレントX線回折データは、測定時の入射X線強度の揺らぎのため、規格化が必要である。本研究課題では、各入射角でのコヒーレントX線回折データから試料の2次元投影像を再構成し、再構成像のピクセル強度の総和を基準に規格化を行った。

測定データを規格化後、3次元逆空間でのコヒーレントX線回折データを補間により構築し、3次元試料像の再構成を行った。ここで、2次元および3次元の試料像再構成に必要な位相回復には、X線回折顕微法で広く用いられているHIOアル

ゴリズムを用いた。

この研究により、オルガネラの3次元イメージングを実現するコヒーレントX線回折データの解析手法を確立した。

(5) ヒト染色体の観察

本研究課題の最大の成果は、X線回折顕微鏡による無染色のヒト染色体試料の2次元および3次元での観察である。

図3(上)に単離した1対のヒト染色体からのコヒーレントX線回折パターンを示す。試料は無染色で、重金属など散乱強度を高める人為的な処理をしていないが、ビジビリターの高いスペckルパターンが得られた。

図3(下)に、コヒーレントX線回折パターンから再構成されたヒト染色体の2次元投影像を示す。可視化された染色体像には、波状にうねった電子密度の高い軸状構造が観察された。染色体には背骨のような軸状構造があることは蛍光顕微鏡等の観察で知られていたが、蛍光標識等のイメージコントラストを人為的に高める試料処理をせずに、染色体の軸状構造が観察したのは世界初である。

図4にヒト染色体の3次元再構成像を示す。3次元像においても、電子密度の高い軸状構造が観察された。エネルギーの高い硬X線を用いたオルガネラの3次元イメージングは世界初である。

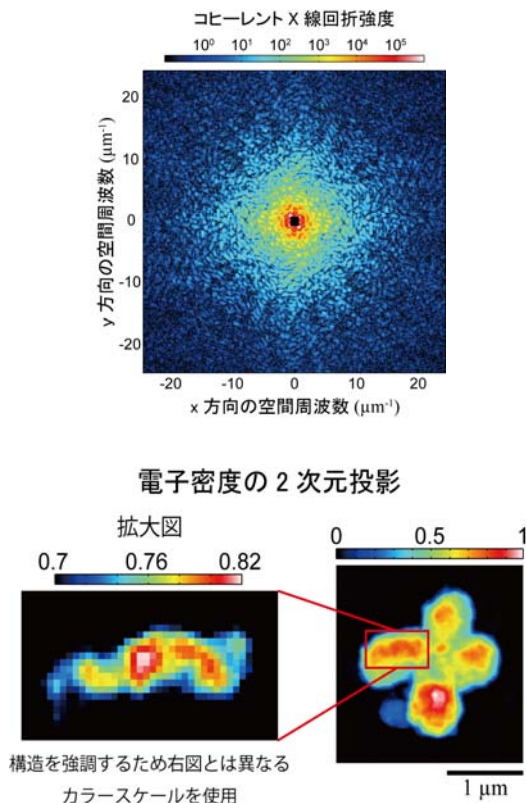


図3 ヒト染色体試料の(上)コヒーレントX線回折パターンと(下)再構成された2次元像

この研究は、X線回折顕微鏡が、従来の手法で

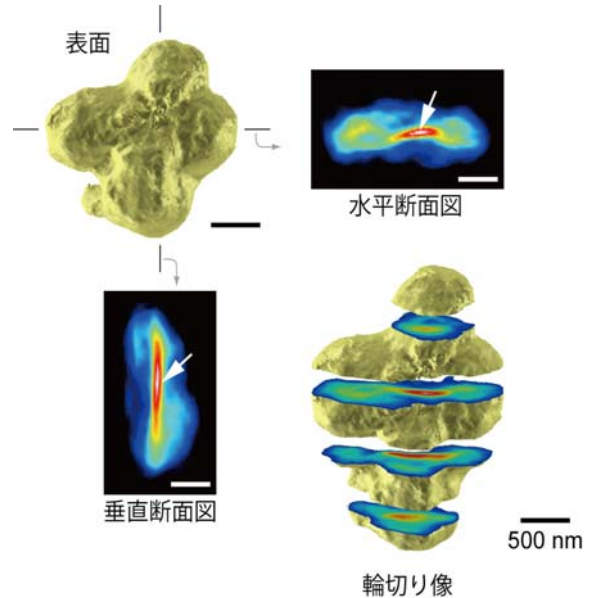


図4 ヒト染色体試料の3次元再構成像

は見るのが難しかった、オルガネラの高次構造の観察に有効な手法であることが実験的に示した。電子顕微鏡では、1 μm程の厚みをもつこれらの試料は、電子がほとんど透過しないため、内部構造の観察は難しい。また、蛍光顕微鏡では、蛍光標識した特定の構造のみしか観察できない。これに対し、X線回折顕微鏡は、X線の高い透過性のため、厚みのあるオルガネラの内部構造の観察に適している。また、コヒーレントX線回折を用いてX線位相コントラストを高精度に可視化できるため、イメージコントラストを高めるための染色などの試料処理を必要とせずに、オルガネラの内部構造を詳細に観察できる点が生体試料への応用上重要である。

この研究結果は、Physical Review Letters 誌の Editors's suggestion にも選ばれ、表紙を飾った。さらに、物理科学雑誌 Physics Today、自然科学雑誌 Nature にもニュースとして取り上げられ、国際的に高い評価を受けた。また、国内でも朝日新聞、時事通信などのメディアで大きく紹介された。

(6) その他の生体試料の観察

本研究課題の当初から関心をもってきた試料の1つであるヒト精子の観察を行った。その結果、精子の頭部中に、DNA が凝集していることによると考えられる高い電子密度の領域を観察することに成功した。

細胞内で独自のDNAをもつミトコンドリアに対してもX線回折測定を行った。ミトコンドリアの内膜にはクリステと呼ばれる構造があることが知られているが、このクリステによると考えられる干渉パターンを測定することに成功した。

(7) クライオX線回折顕微法に向けた開発

① 背景

生体試料の「生きたまま」に近い状態での固定のためには、試料を極めて短時間のうちに摂氏-150度以下に冷却し、細胞構造を破壊する結晶氷の成長を抑制することが必須である。このような条件で調製された凍結水和生体試料はアモルフォス氷（非結晶氷）で満たされており、細胞内構造がよく保存されていることが知られている。このため、凍結水和生体試料の観察は生物学上極めて重要である。

また、X線回折顕微法において、高い空間分解能を達成するためには、より高い散乱角での回折データが必要である。しかし、高散乱角では散乱断面積が小さいため、より高い線量のX線照射が必要となり、試料の放射線損傷が問題となる。放射線損傷は試料を冷却することにより緩和されることが知られている。このため、凍結水和生体試料の観察は、空間分解能の向上にもつながる。

② 試料調製

凍結水和生体試料の測定には、今まで試料支持膜として使用してきた窒化ケイ素膜では、その表面が高度に疎水性であるため適さない。このため、凍結水和生体試料のための支持膜の調査研究を行った。その結果、Quantifoil社製の整列穴付きカーボン膜を貼ったクライオ電顕用のグリッドが適当であると結論された。この穴付きカーボン膜を貼ったグリッドでは、個々の穴に適度な量の試料溶液が保持されるため、試料が乾燥せず、凍結には適している。このグリッドに、染色体を遠心力により貼り付けるための遠心分離器用のアダプターを作製して、試料調製法の検討を行った。そして、効率よくグリッド上に染色体試料を貼り付ける方法を確立した。

試料凍結は、大阪大学・生命機能研究科・難波研究室所有のFEI社のVitrobotを用いて、温度、湿度、その他の条件を制御した環境下で行われた。調製された試料は、液体窒素凍結保存容器（ドライシッパー）で保存し、SPring-8まで低温状態に保ったまま搬送した。

③ 装置および試料操作技術開発

凍結水和生体試料の測定においては試料構造の破壊を防ぐため、調製段階から測定に至るまで試料を低温に保つ必要がある。凍結水和生体試料の観察に向け、試料を低温に保つ装置および操作技術の開発を進めた。

クライオスタットには、振動の少ない連続フロー型のものを選定し、Advanced Research Systems社製のHelitran LT-3Bを購入した。また、試料を-150℃以下の温度に保ったままX線回折顕微鏡の真空チャンバ

に搬送するクライオトランスファー装置を設計・製作した。これらの装置を用いて、SPring-8 BL29XUにおいてX線回折顕微法測定を行った様子を図5に示す。実験では、試料を低温に保ったままの試料操作に成功した。



図5 凍結水和生体試料観測のためのクライオスタットおよびクライオトランスファー装置。SPring-8 BL29XUの第1ハッチに設置された様子を示す。

(8) まとめ

以上の研究により、X線回折顕微法が、厚さ1マイクロメートルを超えるオルガネラなど、透過電子顕微鏡にとっては厚すぎる生体試料の内部構造を、高コントラストで観察するのに有効であることが示された。本研究課題で行ってきた研究は、この分野の世界的研究をリードするものであり、国内外の学会等で多くの招待講演の依頼を受けた。

これにより、生体試料をX線回折顕微法で可視化することにより、生物現象の理解に貢献するという、本研究課題の当初目的を達成した。

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 19 件)

- ① Y. Nishino, Y. Takahashi, N. Imamoto, T. Ishikawa, K. Maeshima, Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-Ray Diffraction, Physical Review Letters 102, 018101 (2009). (4pages) 査読有
- ② Y. Nishino, Y. Takahashi, H. Kubo, H. Furukawa, K. Yamauchi, K. Maeshima, N. Imamoto, R. Hirohata, E. Matsubara, T. Ishikawa, Nanostructure analysis by coherent hard X-ray diffraction, Journal of Physics: Conference Series 186, 012056 (2009). (3 pages) 査読有
- ③ Y. Takahashi, H. Kubo, H. Furukawa, K. Yamauchi, E. Matsubara, T. Ishikawa, Y.

- Nishino, Element-specific hard x-ray diffraction microscopy, Physical Review B 78, 092105 (2008). (4 pages) 査読有
- ④ H. Jiang, D. Ramunno-Johnson, C. Song, B. Amirbekian, Y. Kohmura, Y. Nishino, Y. Takahashi, T. Ishikawa, J. Miao, Nanoscale Imaging of Mineral Crystals inside Biological Composite Materials Using X-Ray Diffraction Microscopy, Physical Review Letters 100, 038103 (2008). (4 pages) 査読有
- ⑤ Y. Takahashi, Y. Nishino, and T. Ishikawa, Methods for obtaining superresolution images in coherent x-ray diffraction microscopy, Physical Review A 76, 033822 (2007). (4 pages) 査読有
- ⑥ 西野吉則、コヒーレントX線が明かす細胞の内部世界、パリティ(丸善) 24(11), 14-20 (2009). 査読有。招待記事
- ⑦ 前島一博、西野吉則、コヒーレントX線回折によるヒト染色体構造の3次元観察、生物物理 49(6), 298-300 (2009). 査読有
- ⑧ 西野吉則、コヒーレントX線回折によるナノ構造解析、日本結晶学会誌 51(4), 239-244 (2009). 査読有
- ⑨ 西野吉則、X線回折顕微法、顕微鏡 44(1), 24-29 (2009). 査読有

[学会発表] (計 73 件)

- ① Y. Nishino, Coherent Imaging using Synchrotron Radiation and Free-Electron Laser, Bioimaging Symposium "Imaging from Molecules to Organisms", December 21, 2009, Hong Kong. 招待講演
- ② Y. Nishino, Visualization of Bio-structures using Coherent X-ray Diffraction, Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and Chinese Crystallographic Society (AsCA'09), October 23, 2009, Beijing, China. 招待講演
- ③ Y. Nishino, Coherent Imaging using Synchrotron Radiation and FEL, Satellite Meeting of the 10th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2009), Developments in Coherent X-ray Methods, October 4, 2009, Melbourne, Victoria, Australia. 招待講演
- ④ Y. Nishino, Visualization of Cells and Cell Organelles Using Coherent X-Ray Diffraction, The 25th European Crystallographic Meeting (ECM25), August 18, 2009, Istanbul, Turkey. 招

待講演

- ⑤ Y. Nishino, 3D view of mesoscopic internal structure by coherent hard X-ray diffraction, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008), August 28, 2008, Osaka, Japan. 招待講演
- ⑥ Y. Nishino, Coherent X-ray diffraction microscopy, Symposium "Present Status and Future Prospect of Microscopy by Leading Young Asian Researchers" at the 2008 annual meeting of the Japanese Society of Microscopy (JSM-2008), May 21, 2008, Kyoto, Japan. 招待講演
- ⑦ 西野吉則、放射光や自由電子レーザーを用いたコヒーレント光イメージング、日本物理学会 第65回年次大会、2010年3月21日、岡山大学。シンポジウム講演
- ⑧ 西野吉則、コヒーレントX線による回折顕微法 日本物理学会 第62回年次大会、2007年9月22日、北海道大学。シンポジウム講演
- ⑨ 西野吉則、X線回折顕微法、日本顕微鏡学会 第63回学術講演会、2007年5月21日、新潟。シンポジウム指定講演

[図書] (計 1 件)

- ① 前島一博、秀潤社、細胞工学別冊「電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ(ナノワールドに迫るパワフル技術入門)」、2008年、147ページ(執筆分担 121-129ページ)

[その他]

- ① 西野吉則研究室 web ページ
<http://cxo-www.es.hokudai.ac.jp/ja/>
- ② 前島一博研究室 web ページ
<http://www.nig.ac.jp/labs/MacroMol/>
- ③ 高橋幸生 web ページ
http://homepage2.nifty.com/yt_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 吉則 (Nishino Yoshinori)

独立行政法人理化学研究所・石川X線干渉光学研究室・専任研究員

研究者番号：40392063

(2) 研究分担者

前島 一博(Maeshima Kazuhiro)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号：00392118

(3) 連携研究者

高橋 幸生(Takahashi Yukio)

大阪大学・大学院工学研究科附属フロンティア研究センター・特任講師

研究者番号：00415217