

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310075

研究課題名（和文） コヒーレントX線回折を用いたクライオバイオイメージング

研究課題名（英文） Cryo-bioimaging by using coherent X-ray diffraction

研究代表者

西野 吉則 (NISHINO YOSHINORI)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：40392063

研究成果の概要（和文）：

SPring-8 での X 線散乱実験により、ヒト染色体構造に関して定説を覆す発見をした。定説の 30 nm クロマチン線維やクロマチン線維の規則的折り畳みは存在せず、ヌクレオソーム線維が不規則に折り畳まれていることを示した。また、凍結水和生体試料では氷が広がっているため、X 線回折顕微法の従来のデータ解析アルゴリズムが適用できないが、空間的に制限された照明を用いる新たな手法の提案によりこの問題を解決した。

研究成果の概要（英文）：

We revised the established theory of the structure of human chromosomes by X-ray scattering experiments conducted using SPring-8. Experimental data indicate irregularly folded nucleosome fibers without a 30-nm chromatin structure or regularly folding of chromatin fibers. We also proposed a new coherent imaging method using a confined illumination, which can be applicable also to frozen-hydrated biological samples with extended ice layer, to overcome the limitation of conventional data analysis algorithm in X-ray diffraction microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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

従来型の X 線レンズを用いた X 線顕微鏡では、高性能の X 線レンズの作製が困難なため以下のような難点があった。(1) 高い空

間分解能が得られない。(2) 厚い試料の三次元イメージングができない(レンズの被写界深度による制限)。(3) 非染色の生体試料のように X 線にとって透明な試料(位相物

体)をイメージングするのが難しい。これに対し、X線回折顕微鏡(XDM)はレンズ等のX線光学素子を必要としない新型のX線顕微鏡である。このため、従来法の問題を取り除き、非染色の厚い生体試料の内部を、高コントラスト、高分解能で三次元イメージングできる。XDMでは、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。X線は透過能が高いため、透過電子顕微鏡などでは不可能であった、マイクロメートル・オーダーの厚い試料に対しても、薄切片のように「破壊」することなく、三次元イメージングができる。さらに、XDMは、非染色の生体試料のように、X線にとって透明な試料に対しても、高いコントラストで内部構造をイメージングできる。

XDMの生体試料に対する応用研究に関しては、本研究提案者らが世界をリードしている。XDMによる世界初の生体試料観察は、2003年に研究代表者らによって行われた大腸菌の二次元投影像イメージングである(J. Miao *et al.*, “Imaging Whole Escherichia Coli Bacteria by Using Single-Particle X-Ray Diffraction”, PNAS 100, 110-112 (2003))。その後、XDMによる生体試料の二次元イメージングの報告がいくつかあったが、三次元でのイメージングが長い間の課題であった。最近、本研究提案者らは、非染色ヒト染色体の観察に成功した(Y. Nishino *et al.*, “Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-Ray Diffraction”, 102, 018101 (2009))。これはXDMによる世界初の生体試料の三次元イメージングである。この研究は、従来の顕微鏡では観察が難しかった構造を、XDMによって実際に見ることができた成果として、Nature や Physics Today で取り上げられるなど、世界的な注目を集めた。

2. 研究の目的

コヒーレントX線を利用したX線回折顕微鏡(XDM)は、透過電子顕微鏡など従来の顕微鏡では難しかったマイクロメートル以上の厚みをもつ生体試料の内部を、高コントラスト、高分解能で観察でき、世界的に注目されている。本研究では、XDMによるクライオバイオイメージングに向けた研究開発を行う。これにより、ヒト染色体、細胞核、精子などにおけるヒトゲノムDNAの折り畳み構造の理解に貢献することを目的とする。クライオバイオイメージングには、2つの重要な意義がある。(1)試料の放射線損傷を抑え、より高空間分解能での試料観察が期待される。(2)「生きた」状態に近い凍結水和生体試料の観察が可能となる。

3. 研究の方法

従来のXDM研究では室温で乾燥した生体試料が扱われていた。本研究では生物学的・医学的に意義の高い、極低温試料の測定を目指した技術開発を行う。特に、氷などからのバックグラウンド散乱の影響がある場合にも有効な試料像再構成アルゴリズムの検討などを行う。研究では、手法開発と平行して、ヒト染色体、細胞核、精子などを生物学・医学的意義が特に高い生体試料と位置づけ、ヒトゲノムDNA構造解析を目指す。

4. 研究成果

本課題で用いられるX線回折顕微鏡の装置を用いて、ヒトの分裂期染色体の構造を詳しく解析した。DNAはヒストンに巻きついてヌクレオソームとなり、このヌクレオソームが30-nmクロマチン線維に折り畳まれ、さらに規則正しい階層構造を取ることで染色体が構築されると長年考えられてきた。分子生物学の最も有名な教科書である「細胞の分子生物学」では、過去25年以上にわたって、この定説が掲載されてきた。また高等学校の生物IIの教科書にも記載されている。しかし、大型放射光施設SPring-8で得られた実験データを解析したところ、この定説を覆す結果が得られた。

まず、SPring-8のBL45XUにおいてX線小角散乱(SAXS)測定を行った。その結果30nmの周期構造は検出されず、30nmのクロマチン線維が存在しないことが示唆された。さらにSPring-8のBL29XUにおいて超小角X線散乱(USAXS)測定を行った。実験の配置図を図1に示す。USAXS実験の結果、図2に示すように、50~1000nmの範囲において、周期的な構造は観察されなかった。これらX線散乱実験データにより、分裂期のヒト染色体は、図3に模式図を示すように、ヌクレオソーム線維の不規則な折り畳みによって構築されていることを発見した。本研究内容を論文にまとめ投稿し、EMBO Journal誌に掲載された。この成果は、EMBO Journal誌、日本経済新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞などでも解説記事がとりあげられた。

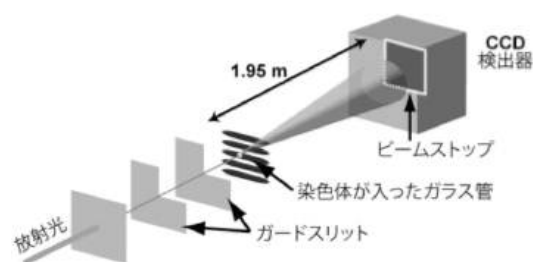


図1 SPring-8 BL29XUにおける超小角X線散乱(USAXS)測定の実験配置の模式図

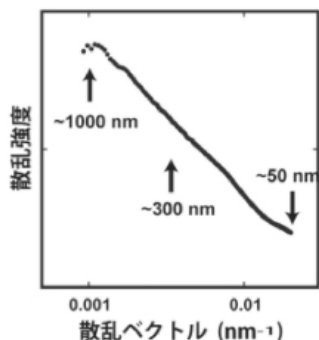


図2 分裂期のヒト染色体に対するX線散乱実験の結果

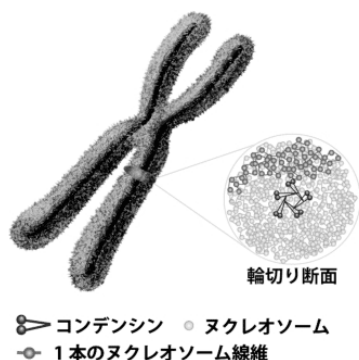


図3 染色体の中では、ヌクレオソーム線維が不規則に折りたたまれている。染色体には、コンデンシンやトポイソメラーゼ II という蛋白質が軸のように存在する。

さらに、間期の HeLa 細胞の単離核に対する散乱実験を SPring-8 において行った。まず BL45XU で行った SAXS 測定の結果 30 nm の構造は検出されず、分裂期染色体と同様に、

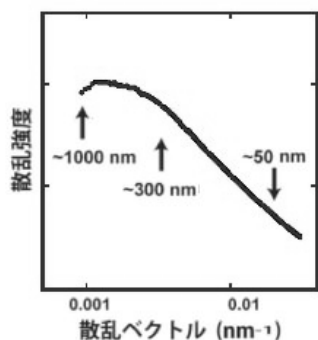


図4 間期のヒト染色体に対するX線散乱実験の結果

ヒト間期クロマチンにも 30 nm のクロマチン線維が存在しないことが示唆された。また BL29XU で行った USAXS 測定においても、図4に示すように、50~1000 nm の範囲において、間期クロマチンに周期的な構造は観察されなかった。間期クロマチンの限られた領域では 30 nm 線維や他の規則的な階層構造が存在している可能性は否定できないが、SAXS や USAXS 測定の結果から、間期クロマチンの大部分の構造もヌクレオソーム線維が不規則に折り畳まれていると考えられる。上記の成果を論文にまとめ Nucleus 誌に掲載された。

また、ヒト精子を研究材料に用いて、XDM 測定を行った。精子は、細胞核からなる頭部、運動のための ATP を合成するミトコンドリアを含む中片部、べん毛の尾部から構成される。頭部の精子核にはヒトゲノム DNA が非常にコンパクトに収納されている。その構造を調べることは、生物学的にも医学的にも非常に有意義である。ヒト精子を単離し、窒化シリコン薄膜に固定し、SPring-8 BL29XUL でコヒーレント X 線を照射した。測定は、まず、電子密度が最も高い頭部の精子核に対して行った。7つの試料に対して、いずれも精度の高いコヒーレント X 線回折パターンを測定することに成功した。図5に測定したコヒーレント X 線回折パターンの一つを示す。

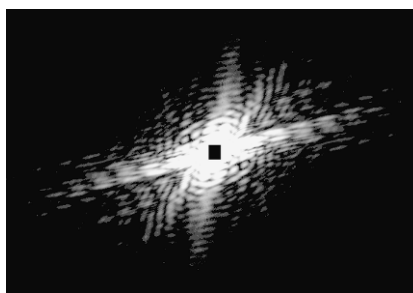


図5 SPring-8 BL29XU において測定したヒト精子の頭部からの高精度コヒーレント X 線回折パターン

凍結水和生体試料では、試料粒子の周りは水の層が広がっている。従来の X 線回折顕微鏡法では孤立した試料を仮定するため、凍結水和生体試料には従来のアルゴリズムをそのまま適用できない。我々は空間的に制限された照明を用いることで、擬

似的に試料を孤立させ、ひとつのコヒーレント回折データのみから試料像を再構成する新手法を提案した。計算機シミュレーションの結果、図6に示すような複雑な試料構造を持つ場合にも、新たに開発した手法の有効性を示す結果が得られた。上記の成果を論文にまとめ Optics Express 誌に掲載された。

また、試料を時間的に凍結させる試みとして、X線自由電子レーザー施設 SACLA を用いたコヒーレント X線回折顕微法測定を行った。

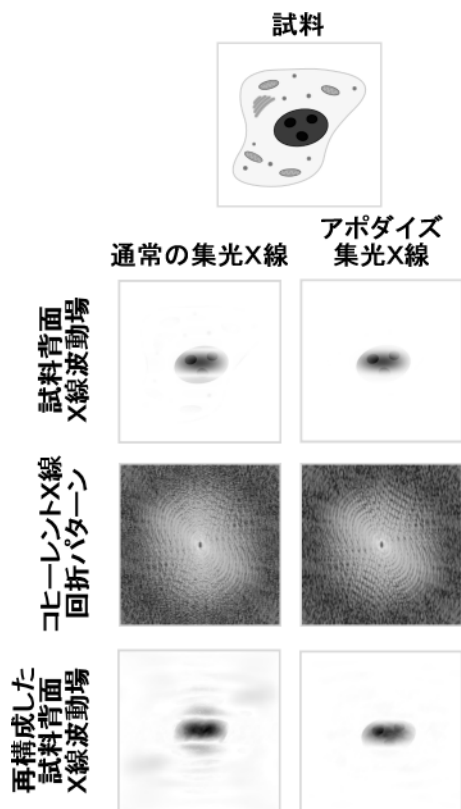


図6 空間的に制限された照明を用いる X線回折顕微法の新手法の数値シミュレーション

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 41 件)

- ① Takashi Kimura, Satoshi Matsuyama, Kazuto Yamauchi, Yoshinori Nishino, Coherent x-ray zoom condenser lens for diffractive and scanning microscopy, Optics Express, 査読有、21 巻、2013、9267
DOI: 10.1364/OE.21.009267
- ② Javier Pérez, Yoshinori Nishino,

Advances in X-ray scattering: from solution SAXS to achievements with coherent beams, Current Opinion in Structural Biology, 査読有、22 巻、2012、670-678

DOI: 10.1016/j.sbi.2012.07.014

- ③ Yasumasa Joti, Takaaki Hikima, Yoshinori Nishino, Fukumi Kamada, Saera Hihara, Hideaki Takata, Tetsuya Ishikawa, Kazuhiro Maeshima, Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber, Nucleus, 査読有、3 巻、2012、404-410

DOI: 10.4161/nucl.21222

- ④ Yoshinori Nishino, Mikhail Eltsov, Yasumasa Joti, Kazuki Ito, Hideaki Takata, Yukio Takahashi, Saera Hihara, Achilleas S Frangakis, Naoko Imamoto, Tetsuya Ishikawa, Kazuhiro Maeshima, Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure, The EMBO Journal, 査読有、31 巻、2012、1644-1653

DOI: 10.1038/emboj.2012.35

- ⑤ Satoshi Matsuyama, Mari Shimura, Masaki Fujii, Kazuhiro Maeshima, Hirokatsu Yumoto, Hidekazu Mimura, Yasuhisa Sano, Makina Yabashi, Yoshinori Nishino, Kenji Tamasaki, Yukihiro Ishizaka, Tetsuya Ishikawa, Kazuto Yamauchi, Elemental mapping of frozen-hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy, X-Ray Spectrometry, 査読有、39 巻、2010、260-266

DOI: 10.1002/xrs.1256

[学会発表] (計 50 件)

- ① Yoshinori Nishino, Exploring the Nanoworld using Coherent X-rays (招待講演)、Korean Physical Society Meeting (KPS2012-Spring)、2012 年 4 月 26 日、Daejeon Convention Center (Korea)
- ② Yoshinori Nishino, Toward Coherent Imaging Using XFEL (招待講演)、The 4th International Workshop on FEL Science、2011 年 8 月 31 日、Peppers Beach Club and Spa (Australia)
- ③ Yoshinori Nishino, Imaging Cellular Organelles (招待講演)、X-ray Diffraction Limit Workshop Series Workshop 1 -Diffraction Microscopy, Holography and Ptychography using Coherent Beams-, 2011 年 6 月 6 日、Cornell University (USA)

- ④ Yoshinori Nishino, Coherent Imaging using Synchrotron Radiation and FEL (招待講演)、Biology with FELs : Toward the Molecular Movie、Lawrence Berkeley National Laboratory、2011年1月18日、California (USA)
- ⑤ Yoshinori Nishino、Phase-Contrast Coherent Imaging (招待講演)、The 17th International Microscopy Congress (IMC17)、2010年9月19日、Windsor Barra Convention Center, Rio de Janeiro (Brazil)

[図書] (計3件)

- ① Yoshinori Nishino、Pan Stanford Publishing, Chapter 4 “Coherent X-Ray Diffraction for High-Contrast Bioimaging”、Synchrotron Radiation and Structural Proteomics (Pan Stanford Series on Nanobiotechnology Vol.3), E. Pechkova & C. Riedel, Eds、2011、105–124
- ② 西野吉則、講談社、第2章16節「細胞の中の染色体を立体的に映し出す技術とは?」、ブルーバックス「放射光が解き明かす驚異のナノ世界—魔法の光が拓く物質世界の可能性—」日本放射光学会編、2011、108–110
- ③ 石川 哲也、北村 英男、矢橋 牧名、西野吉則、足立 伸一、講談社、第9章「世界を変えるX線レーザー」、ブルーバックス「放射光が解き明かす驚異のナノ世界—魔法の光が拓く物質世界の可能性—」日本放射光学会編、2011、251–267

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 吉則 (NISHINO YOSHINORI)
北海道大学・電子科学研究所・教授
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

なし