

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21621

研究課題名(和文)ホログラフィックX線回折イメージング法による単細胞藻類細胞分裂機構の研究

研究課題名(英文)Development of holographic X-ray diffraction imaging method and application to structural study of cell division in an unicellular algae

研究代表者

高山 裕貴 (Takayama, Yuki)

兵庫県立大学・物質理学研究科・助教

研究者番号：40710132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂の構造基盤を、特にオルガネラ相互作用に焦点を当てて明らかにすることを目的し、X線レーザーを利用したホログラフィック回折イメージング法の開発と単細胞紅藻の構造研究を行った。間期と分裂期の紅藻細胞を有効分解能110～200 nmでイメージングし、複数個体について共通のオルガネラ構造を認めることができた。また、オルガネラ分裂の様子や核内電子密度分布の変化を非侵襲・無染色で可視化することができた。

研究成果の概要(英文)：I developed a holographic diffraction imaging method with an X-ray laser and applied it to structural analysis of primitive red algae cells for understanding of structural basis of cell division, especially focusing on organelle interplay. Imaging red algae cells in interphase and M phase at spatial resolutions of 110 - 200 nm revealed common structural features of organelles and also visualized changes in the electron density distribution in a nucleus associating with cell division without sectioning and/or staining.

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 X線自由電子レーザー ホログラフィー 細胞分裂 凍結水和試料

1. 研究開始当初の背景

細胞内で織りなされる生命現象の構造基盤を分子構造レベルで解明するためには、 μm サイズの厚い細胞の内部を水和状態のまま、オルガネラ超構造や超分子複合体概形を観察可能な数十～数 nm 分解能で可視化する必要がある。しかし、このサイズ領域は、既存の顕微鏡技術の性能限界近傍に位置するため、依然として観察が難しい状況である。また、オルガネラ同士は相互作用しながら機能発現しており、その構造基盤を理解するためには、オルガネラの形態や配置が細胞内での程度厳密に制御されているかを、多数の個体を比較解析することで明らかにする必要がある。

近年利用可能となった X 線自由電子レーザー (XFEL) を光源とした低温コヒーレント回折イメージング法 (低温 XFEL-CDI) は、上記課題を解決する手法として期待される。パルス幅 10 fs 以下、繰り返し周期 30 Hz の強強度 XFEL パルスの利用により、XFEL シングルショットで照射野は破壊されるものの、放射線損傷が生じる直前の試料から、50 nm を超える空間分解能の回折パターンを迅速に収集できるようになった [文献 1, 2]。また、機能状態の細胞を湿潤環境下で凍結固定することで、細胞機能の中間状態の構造を可視化できる。

一方で、XFEL-CDI 法による真核細胞「丸ごと」の観察は依然として困難であり、応用は世界的に $1\ \mu\text{m}$ 以下のオルガネラや細菌に限定されていた [文献 3]。その要因の一つは、CDI 法では、試料像再生に重要な試料形状情報を有する極小回折角範囲のデータを、原理的に観測できないことにある (図 1)。このデータ欠損は試料のサイズが大きい程深刻になる。研究代表者は、CDI 法と同じ実験配置で試料形状を直接観測できるフーリエ変換ホログラフィー (FTH) 法に着目し、FTH 法と CDI 法を組み合わせたホログラフィック回折イメージング法へと発展させ、原理実証実験により大きさ $1.5\sim 2\ \mu\text{m}$ の単細胞真核藻類のイメージングに世界に先駆けて成功した。

2. 研究の目的

本研究では、真核細胞分裂機構の構造基盤を、特にオルガネラの形態や配向、相互作用に焦点を当てて明らかにすることを目指し、ホログラフィック回折イメージング法の高度化研究と原始単細胞紅藻の構造解析への応用を行った。

3. 研究の方法

試料には原始単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を用いた。*C. merolae* は主要なオルガネラを 1 つずつしか持たず、オルガネラ分裂と細胞分裂が完全に同期しており、明暗周期によって細胞周期の同調が可能という特徴があり、構造解析に有利である。XFEL を光

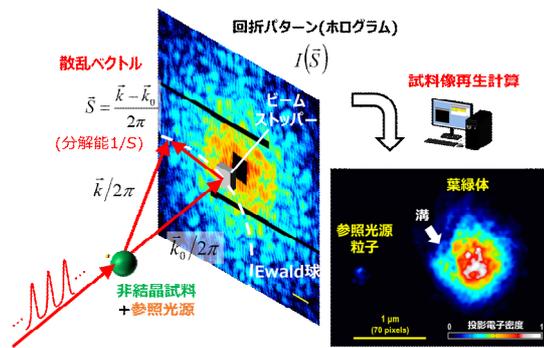


図 1 ホログラフィック X 線回折イメージング法の概念図。非結晶試料と参照光源を空間干渉性の高い X 線に充満し、回折パターン (ホログラム) を 2 次元検出器で十分細かくサンプリングして観測する。ただし、試料透過 X 線の近傍は検出器保護のため、ビームストッパーで遮蔽される。再生像の分解能は、散乱ベクトルの絶対値 S の逆数に相当する。

源としたホログラフィック回折イメージング法により間期及び分裂期の *C. merolae* の構造解析を行い、3 次元構造解析の可能性を探った。またホログラフィック回折イメージング法の測定歩留まりと空間分解能向上に向けて、半導体プロセス技術を利用した、参照光源をパターンニングした試料基板の開発と、良質なホログラムの選定から位相回復計算までの半自動化ソフトウェアの開発を進めた。

4. 研究成果

(1) *C. merolae* 間期及び分裂期の構造解析

明暗同調によって得た細胞周期間期及び分裂期の *C. merolae* について、参照光源粒子と細胞を同時に散布して凍結固定した試料を作製し、X 線自由電子レーザー施設 SACLA にて、低温ホログラフィック X 線回折イメージング実験を行った。光子エネルギー 5.5 keV の XFEL パルスを強度半値全幅 $1.5\ \mu\text{m}$ 程度に集光してシングルショットホログラムを取得した。

良質なホログラムの選定と位相回復計算による試料像の再生には、以下の処理を自動化したソフトウェアを開発して用いた。(a) ホログラムの高速フーリエ変換で得られるパターンソーン図 (ホログラフィー像) に独自開発の画像処理 [学会発表③] を施して試料領域 (サポート) を抽出。(b) サポートサイズ・関心領域内の回折強度の総和・最高空間周波数に基づき、解析に足るホログラムを選定。(c) 上記サポートと文献 [2] のプロトコルにより位相回復計算を行い、投影電子密度像を再生した。

典型的な間期及び分裂期の *C. merolae* 投影像を図 2 に示す。有効分解能 $110\sim 200\ \text{nm}$ 程度で再生した。複数の間期個体の構造比較から、細胞形状はやや異なるが、細胞核の異方的な形状や不均一な密度分布、葉緑体チラ

コイド膜の溝構造が共通して認められた。今後、単粒子解析法[文献 4]を応用したローカルトモグラフィーへと展開したい。また、間期および分裂期の個体の投影像から、オルガネラ分裂の様子や核内電子密度分布の変化を非侵襲・無染色で可視化できることが確認できた。

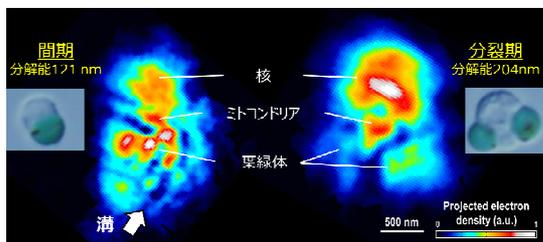


図 2 間期及び分裂期の *C. merolae* の投影電子密度像。内挿図は同細胞周期の個体の光学顕微鏡像。

(2) ホログラフィック X 線回折イメージング用試料基板の開発

現状の測定系では、集光ビームサイズと試料サイズが同程度であるため、バックグラウンド散乱が少ない一方で、ビーム中に参照光源粒子と試料細胞が同時に浴する確率(測定歩留まり)は低くなる。ホログラムの収集歩留まりをモンテカルロ計算により見積もると、参照光源粒子・細胞の散布数密度を最適化しても数%程度と予想された。そこで、参照光源を事前に配置した試料基板を作製し、歩留まりの向上と試料作製の簡便化を図った。

試作した試料基板を図 3 に示す。京都大学ナノテクノロジーハブ拠点にて、高速電子線リソグラフィーと電子線蒸着を併用したリフトオフ法により作製した。参照光源は照射野に複数入るよう配置し、試料由来の回折波と参照光源群由来の回折波の干渉による回折シグナルの増強とそれによる空間分解能の向上も図った[文献 2, 5]。

開発した試料基板でホログラフィック X 線回折イメージング実験を行った結果、測定歩留まりは 30%以上まで向上し、最高 26 nm を超える空間分解能までホログラムを観測できた(図 4a)。また、位相回復計算においてマイクロ集光 XFEL パルスの波面形状を考慮することで、従来は像を再生できなかったホログラムからも参照光源像を再生することに成功した(図 4b)。

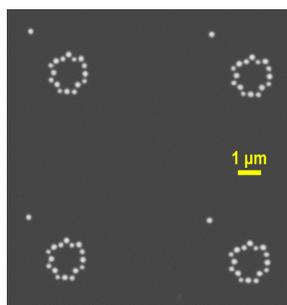


図 3 開発したホログラフィック回折イメージング用基板の SEM 像。

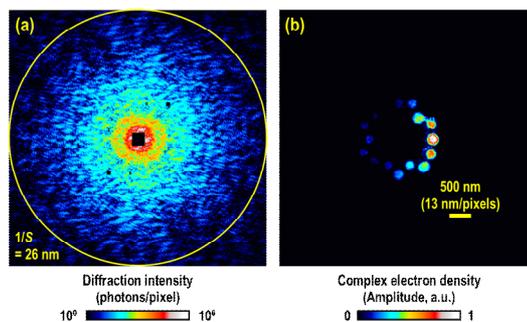


図 4 参照光源群由来のシングルショット回折パターンと再生された投影像。

(3) 今後の展望

シミュレーション研究により、ホログラフィック X 線回折イメージング法は従来の CDI 法に比べて極小回折角のデータ欠損にもロバストであることが明らかになっており[学会発表③]、マイクロ集光 XFEL を用いた真核細胞の構造研究には不可欠である。開発した試料基板を用いて取得した細胞のホログラムの解析を進めており、継続的な研究により、オルガネラ相互作用における膜超構造動態の解明を目指していく。

参考文献

- [1] Oroguchi, T. *et al.* “Cryogenic coherent x-ray diffraction imaging for biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA” *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **48**, 184003 (2015).
- [2] Takayama, Y. & Yonekura, K. “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).
- [3] Takayama, Y. *et al.*, “Coherent X-ray diffraction imaging of chloroplasts from Cyanidioschyzon merolae by using X-ray free electron laser” *Plant Cell Physiol.* **56**, 1272-1286 (2015); van der Schot, G. *et al.*, “Imaging single cells in a beam of live cyanobacteria with an X-ray laser” *Nat. Commun.* **6**, 5704 (2015); Kimura, T. *et al.*, “Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction” *Nat. Commun.* **5**, 3052 (2014).
- [4] Oroguchi, T. & Nakasako, M. “Three-dimensional structure determination protocol for noncrystalline biomolecules using x-ray free-electron laser diffraction imaging” *Phys. Rev. E* **87**, 022712 (2013).
- [5] Takayama, Y. *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).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Yuki Takayama*, Yuki Takami, Keizo Fukuda, Takamasa Miyagawa and Yasushi Kagoshima, “Atmospheric coherent X-ray diffraction imaging for in-situ structural analysis at SPring-8 Hyogo beamline BL24XU”, *Journal of Synchrotron Radiation*, in press

② Hiroshi Kameda, Sayaka Usugi, Mana Kobayashi, Naoya Fukui, Seki Lee, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, Yuki Sekiguchi, Yu Masaki, Amane Kobayashi, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako, Yuki Takayama, Masaki Yamamoto and Yasushi Kawata*, “Common structural features of toxic intermediates from α -synuclein and GroES fibrillogenesis detected using cryogenic coherent X-ray diffraction imaging”, *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **161**, 55-65 (2017), 査読有り. DOI: 10.1093/jb/mvw052

③ Amane Kobayashi, Yuki Sekiguchi, Yuki Takayama, Tomotaka Oroguchi, Keiya Shirahama, Yasufumi Torizuka, Masahiro Manoda, Masayoshi Nakasako* and Masaki Yamamoto* “TAKASAGO-6 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological non-crystalline particles using X-ray free electron laser at SACLA”, *Review of Scientific Instruments* **87**, 053109 (15 pages) (2016), 査読有り. DOI: 10.1063/1.4948317

[学会発表] (計 5 件)

① Yuki Takayama, Yuki Takami, Keizo Fukuda, Takamasa Miyagawa, Yoshimasa Urushihara, Shigeo Kuwamoto and Yasushi Kagoshima, “Coherent X-ray Diffraction Imaging at SPring-8 Hyogo Beamline BL24XU”, *The 24th Congress of the International Commission for Optics*, Tokyo, Japan, 22 Aug. 2017

② Yuki Takayama, Yuki Takami, Takamasa Miyagawa and Yasushi Kagoshima, “Coherent X-ray Diffraction Imaging at SPring-8 Hyogo Beamline BL24XU”, *International Conference on X-ray Optics and Application 2017*, Yokohama, Japan, 18-21 Apr. 2017

③ 高山裕貴、山本雅貴、米倉功治、小林周、関口優希、岡島公司、笠口友隆、中迫雅由、乾弥生、松永幸大、「XFEL による細胞の構造解析に向けたホログラフィック X 線回折イメージング法の開発」、第 30 回日本放射光学会

年会・放射光科学合同シンポジウム、神戸、2017 年 1 月 9 日

④ Yuki Takayama, Masaki Yamamoto, Koji Yonekura, Yuki Sekiguchi, Amane Kobayashi, Koji Okajima, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako, Yayoi Inui and Sachihiko Matsunaga, “Cryogenic coherent diffraction imaging of biological samples with synchrotron and X-ray laser”, *13th International Conference on X-ray Microscopy*, Oxford, UK, 18 Aug. 2016

[図書] (計 1 件)

① Yuki Sekiguchi, Amane Kobayashi, Yuki Takayama, Mao Oide, Asahi Fukuda, Takahiro Yamamoto, Koji Okajima, Tomotaka Oroguchi, Takeshi Hirakawa, Yayoi Inui, Sachihiko Matsunaga Masaki Yamamoto and Masayoshi Nakasako, “Coherent X-ray diffraction imaging of *Cyanidioschyzon merolae*’ in *Cyanidioschyzon merolae*: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology, Chapter 15 (pp.153-157), Springer (2017).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 裕貴 (TAKAYAMA, Yuki)

兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・助教

研究者番号：40710132