

令和 2 年 6 月 4 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：2018～2019

課題番号：18H06061・19K21186

研究課題名（和文）コヒーレントX線回折イメージングを用いた真核細胞の時空間階層構造イメージング

研究課題名（英文）Spatio-temporal imaging of hierarchical structures of Eukaryote cells by using coherent X-ray diffraction imaging

研究代表者

小林 周（Kobayashi, Amane）

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60824034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：生命活動の解明には細胞の複雑な空間階層構造を可視化することが不可欠であり、 μm から nm の広い分解能情報を網羅できる構造解析手法が必要となる。本研究では、コヒーレントX線回折イメージングを用いて μm サイズの細胞の三次元電子密度分布を数十 nm の分解能で可視化するために、放射光施設SPRING-8にて回折実験を行うための試料調製手法および装置制御システムの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の構造解析には蛍光顕微鏡や電子顕微鏡のように優れた顕微鏡法が定着している。しかし、これらの手法では細胞に固定や染色といった加工を施さないと μm から数十 nm の空間階層構造を解析することが難しい。コヒーレントX線回折イメージングは、細胞の機能構造を損なうことなく、この空間階層を可視化する構造解析手法であり、顕微鏡法と組み合わせることで、生物学的研究を促進させることになると期待できる。

研究成果の概要（英文）：It is essential to visualize complicated hierarchical structures of biological cells for understanding why they can perform life activities. In this study, I developed sample preparation and machine control systems at a beamline in a synchrotron facility, SPRING-8, in order to visualize whole cells with sizes of micrometers at resolutions of several tens nanometers by using coherent X-ray diffraction imaging analyses.

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 細胞イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命活動の解明には細胞の複雑な空間階層構造を可視化することが不可欠であり、 μm から nm の広い分解能情報を網羅できる構造解析手法が必要となる。加えて、手法を適用する際には、生理条件下での機能構造をとらえるために、水和状態の細胞丸ごとを、損傷を与えることなく扱わなければならない。これらの要求を満足するため、以前より構造解析手法の一つであるコヒーレント X 線回折イメージングを用いた細胞及び細胞小器官の可視化に挑戦してきた。

研究開始前年度に試験的に実施したコヒーレント X 線回折イメージング(CXDI)実験を行い、凍結水和状態の細胞から 20 nm から 4400 nm の分解能情報を丸ごと含んだ X 線回折データを取得することに成功した。この結果を端緒として、本研究では、トモグラフィー実験系において試料の配向ごとの回折データを歩留り良く測定できる実験環境を構築することに着手した。

2. 研究の目的

本研究はコヒーレント X 線回折イメージングを用いて $6 \mu\text{m}$ 程度のサイズの真核生物である出芽酵母、原始紅藻類である *Cyanidioschyzon merolae*(シズン)をターゲットに三次元電子密度分布を数十 nm の分解能で可視化することを目指した。

3. 研究の方法

CXDI 実験では試料に空間コヒーレンスの高い X 線を入射し、試料からの回折 X 線の強度を二次元ピクセルアレイ検出器で回折強度パターンとして記録する(図 1)。回折強度パターンに位相回復アルゴリズムを適用することによって、X 線入射方向に投影した電子密度図を得ることが可能である。また、試料を回転させ(トモグラフィー)、配向ごとの回折強度パターンを測定することで三次元電子密度分布を可視化することが可能となる。本研究では放射光施設 SPring-8 BL29XUL にて CXDI トモグラフィー実験を行うための試料調製手法及び回折装置の制御ソフトウェアの開発等を行った。

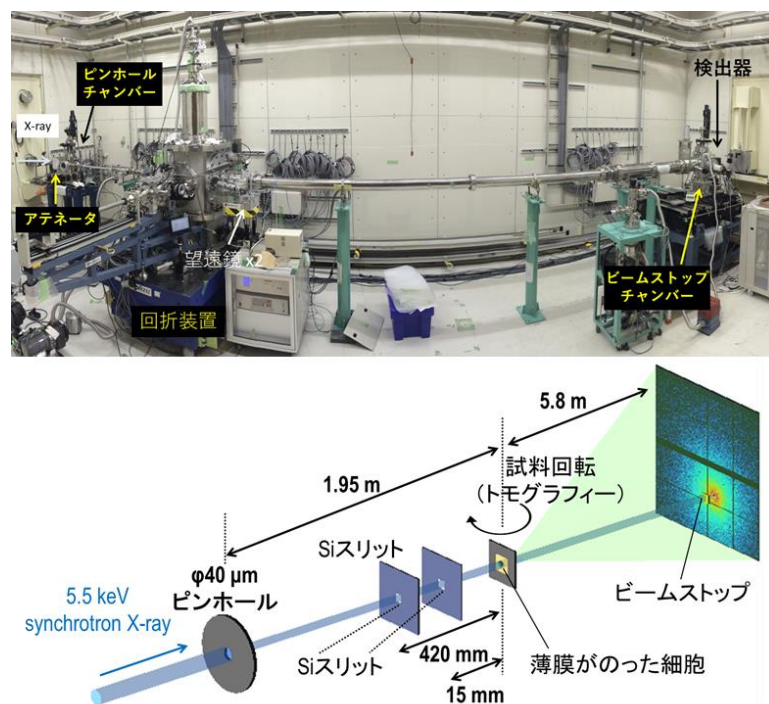


図 1. SPring-8 BL29 EH2 内の装置の写真(上)と光学系の模式図(下)

4. 研究成果

(1) 試料調製手法の開発

本研究では図 2 のような試料調製装置を作製した。まず、X 線回折吸収のほとんどない $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 100 \text{ nm}$ 厚の窒化珪素(Si_3N_4)薄膜に細胞試料を、キャピラリーを用いて一つ設置した。試料配向を入射 X 線に対して変化させるとき、薄膜ごと回転させるため、薄膜を支持する珪素フレームが回転時に入射 X 線を遮らないように光学顕微鏡で確認しながら薄膜の中心部に試料を設置した。また、細胞試料は乾燥することがないように、これらの操作は相対湿度 95%以上の湿潤空気を充満させたセル内で行った。試料設置後、薄膜ごと液体エタンへ投下し、瞬間凍結することによって凍結水和状態とした。薄膜試料は回折実験時には回折装置の真空槽内部の液体窒素を溜めることができるポットへ搬送されるため、X 線照射時でも凍結水和状態を保つことができる。また、極低温に保つことによって X 線照射によって生じる放射線損傷を抑制することが可能となる。

(2) 試料支持薄膜の加工と処理

X線を照射することによって試料が薄膜から外れてしまうことがあった。窒化珪素の帯電し、静電反発が生じていることが原因と考えられたため、窒化珪素に対して表裏両面に10 nm厚の炭素蒸着を施すと、上記のような問題が生じることはなくなった。

細胞を取り巻く培養液からもX線回折が生じるため、余剰な培養液を除く必要があるが、薄膜の面に沿って細胞がつぶれてしまう問題が生じたため(図3)、Focused Ion Beamを用いて、細胞設置箇所に貫通穴を空けることで対処した。また、薄膜と培養液の接触角が小さいと表面張力で細胞がつぶれる恐れがあるため、薄膜表面に吸着材の成膜処理を施さず、極力撥水性となるように保った。

(3) 回折装置制御ソフトウェアの開発

試料からの回折強度パターンを記録する際には回折装置における試料を固定する並進・回転ステージ、検出器を使用して、次のような操作手順①~④を繰り返す。

- ① 細胞試料に入射X線が当たるようにステージを並進させ、ラスタースキャンする。試料照射位置は検出器情報から最も回折強度が強くなる位置を採用する。
- ② 数分の露光時間にて回折強度パターンを記録する。
- ③ 薄膜の試料のない位置にX線を照射してバックグラウンド散乱を記録する。(位相回復前に規制散乱などの余分な強度データを減算することが可能となる)
- ④ ステージを回転させ、①の操作から再開する。

上記の操作を放射光施設のトラブル発生時の対応も含めて全自動で実行できるように制御ソフトウェアを、プログラミング言語labVIEWを用いて作製した。本ソフトウェアを使用することによって、 $1^\circ \sim 1.5^\circ$ 回転刻みで、検出器面に対して $\pm 80^\circ$ の配向範囲の回折強度パターン(図4)を24~36時間で記録し、50~100 nmの分解能を有する三次元構造情報を取得することが可能となった。得られた回折データから位相回復アルゴリズム及び逆投影法を用いて出芽酵母及びシジンの三次元構造(図4)を可視化することが可能となった。

(4) 入射X線の強度・位置の安定化

単色化のため上流光学ハッチにて二結晶分光器を用いているが放射光照射による熱負荷のため、結晶が変形を起こし、これに伴い入射X線の強度、位置が変化することがしばしばであり、変化の度に光学ハッチの光学素子(図1)の位置調整を行う必要があった。そこで、光学ハッチ内に位置敏感型電離箱や回折強度パターンをお測定する検出器とは別にCCD検出器を光路に設置し、ダイレクトビーム位置、強度分布を観察することで入射X線の安定となる条件を求めた。

図5にCCD検出器で記録したダイレクトビームの強度分布を示す。分光器を希望の波長

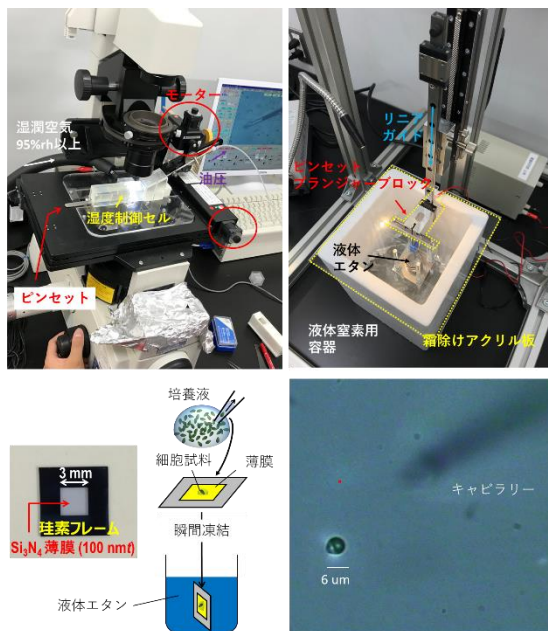


図2. 試料調製装置(左上)、試料凍結装置の写真(右上)と凍結の模式図(左下)、薄膜上の細胞試料の光学顕微鏡画像(右下)

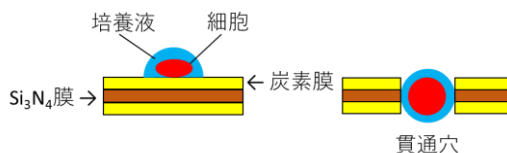


図3. 薄膜の断面図の模式図。
貫通穴なし(左)と貫通穴あり(右)

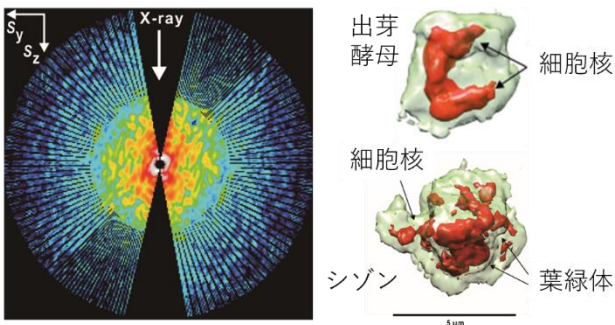


図4. 回折強度パターン・トモグラフィーデータセットの断面(左)、出芽酵母(右上)とシジンの三次元電

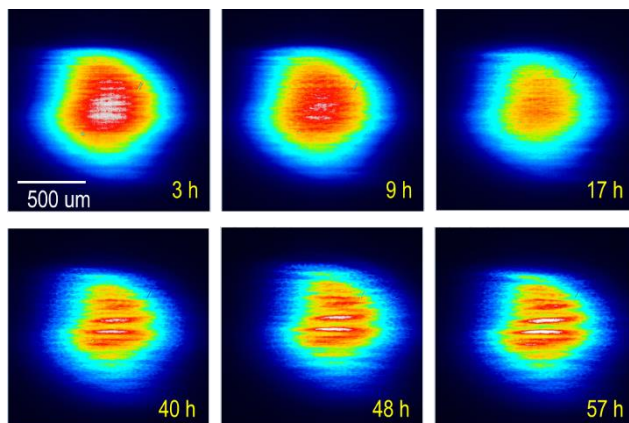


図5. 入射X線の強度分布の変化

の条件に設定後、40 時間経過の後に強度分布の変化が小さくなることが分かった。また、施設トラブルによって一時的に分光器に放射光が照射されなかった場合は安定化するのに 3 時間程度を要することが分かった。このようにして得た知見をもとに光学素子調整スケジュールを立てることで効率よく回折実験を行うことが可能となった。

(5) コールドトラップによる試料へのコンタミネーション付着防止

試料は回折実験中、真空下にあるが、液体窒素温度の極低温であるため、水分子などのコンタミネーションが徐々に付着し、試料搬送より 12 時間を超えるとコンタミネーションからの回折が強くなり、回折強度パターンに影響を及ぼすようになる。そこで、試料直近に同じく極低温に冷やした金属体(コールドトラップ)を設置した(図 6)。これによりトモグラフィータセットの測定時間にあたる 24~36 時間でコンタミネーションの付着による強い回折を抑えることに成功した。

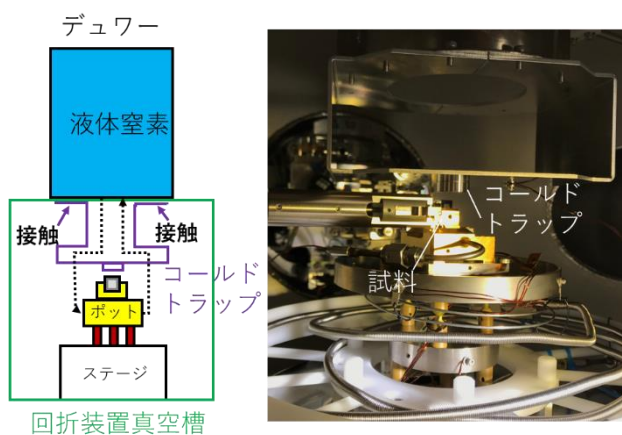


図 6. コールドトラップと回折装置の模式図(左)と真空槽内部の写真(右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Amane, Takayama Yuki, Okajima Koji, Oide Mao, Yamamoto Takahiro, Sekiguchi Yuki, Oroguchi Tomotaka, Nakasako Masayoshi, Kohmura Yoshiki, Yamamoto Masaki, Hoshi Takahiko, Torizuka Yasufumi	4. 巻 25
2. 論文標題 Diffraction apparatus and procedure in tomography X-ray diffraction imaging for biological cells at cryogenic temperature using synchrotron X-ray radiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Synchrotron Radiation	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577518012687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Amane, Takayama Yuki, Oroguchi Tomotaka, Okajima Koji, Oide Mao, Yamamoto Masaki, Nakasako Masayoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Cryogenic Coherent X-ray Diffraction Imaging Techniques for Structural Analyses of Biological Cells and Cellular Organelles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 14 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1431927618012503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 中迫雅由、高山裕貴、小林 周、山本隆寛、大出真央、岡島公司、笠口友隆、山本雅貴	4. 巻 31
2. 論文標題 生物細胞の低温X線回折イメージング	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射光	6. 最初と最後の頁 189 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakasako Masayoshi, Kobayashi Amane, Takayama Yuki, Asakura Kenta, Oide Mao, Okajima Koji, Oroguchi Tomotaka, Yamamoto Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Methods and application of coherent X-ray diffraction imaging of noncrystalline particles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 541 ~ 567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00690-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kobayashi Amane, Takayama Yuki, Oroguchi Tomotaka, Okajima Koji, Oide Mao, Yamamoto Masaki, Nakasako Masayoshi
2. 発表標題 Cryogenic Coherent X-ray Diffraction Imaging Techniques for Structural Analyses of Biological Cells and Cellular Organelles
3. 学会等名 14th International Conference on X-ray Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林周
2. 発表標題 コヒーレントX線回折イメージング実験における高効率データ収集法の開発
3. 学会等名 第10回放射光学会若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林周、高山裕貴、山本隆寛、朝倉健太、大出真央、大野哲、溝口陽太、岡島公司、苮口友隆、香村芳樹、山本雅貴、中迫雅由
2. 発表標題 細胞の低温コヒーレントX線回折イメージングトモグラフィー実験における計測手法の高度化
3. 学会等名 第32回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林周、高山裕貴、山本隆寛、大出真央、岡島公司、苮口友隆、山本雅貴、中迫雅由
2. 発表標題 コヒーレント X 線回折イメージング実験で得られる回折強度パターンの位相回復計算の高効率化
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林周、高山裕貴、平川健、岡島公司、大出真央、笠口友隆、乾弥生、山本雅貴、松永幸大、中迫雅由
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを用いたX線回折イメージング実験によるシアノバクテリアProchlorococcusの共通構造の可視化
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中迫雅由、山本隆寛、小林周、大出真央、岡島公司、高山裕貴、笠口友隆、山本雅貴
2. 発表標題 G1期酵母細胞核内における核酸分布のXFEL X線回折イメージング
3. 学会等名 第57回日本生物物理学学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中迫雅由、山本隆寛、小林周、大出真央、岡島公司、高山裕貴、笠口友隆、山本雅貴
2. 発表標題 間期酵母核内における染色体の構造特徴と空間分布 XFEL - X線回折イメージングによる構造解析
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朝倉健太、山本隆寛、小林周、大出真央、岡島公司、高山裕貴、笠口友隆、山本雅貴、中迫雅由
2. 発表標題 間期酵母核内における染色体の構造特徴と空間分布XFEL-X線回折イメージングによる構造解析
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

低温X線回折イメージング・トモグラフィ -技術の確立(プレスリリース)
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2018/181026/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----