

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651126

研究課題名（和文） フェムト秒コヒーレントX線を活用した複雑系生体高分子の  
溶液構造可視化法の構築

研究課題名（英文） Establishing imaging method for solution structure of complex  
biomolecular systems utilizing femtosecond coherent X-rays

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）：

我々が提案するパルス状コヒーレントX線溶液散乱法の基本概念を含むレビュー論文を出版した。制御された環境下での測定を可能にする試料ホルダとして環境セルを開発した。計算機シミュレーションにより、実験配置の検討やデータ解析アルゴリズムの開発を行った。X線自由電子レーザー施設SACLAを用いて、パルス状コヒーレントX線溶液散乱測定を行い、シングルショットでのコヒーレントX線回折パターン計測に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We published a review paper describing the basic concept of pulsed coherent x-ray solution scattering (PCXSS) that we are proposing. We developed environmental cells to be used for sample holders which enable measurement in a controlled environment. By numerical simulation, we designed experimental configurations and developed algorithms for data analysis. We performed PCXSS measurement by using an x-ray free-electron laser facility SACLA, and succeeded in recording single-shot coherent x-ray diffraction patterns.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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、フェムト秒、生体分子、放射線・X線・粒子線、X線自由電子レーザー

## 1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析法など従来の生体分子の構造解析法の限界が、近年顕在化している。例えば、(1) 膜タンパク質のような生体超分子や、tRNA複合体のような多重複合体は、生命活動において重要な役割を果たしているが、結晶化が困難で構造解析に膨大な時間を要する。(2) 生体分子を取り巻く水和

水が深く関与する構造ゆらぎが、生命現象の理解において決定的であるが、従来の構造解析法は平均構造を扱っているため、構造ゆらぎの情報が得られない。X線自由電子レーザー(XFEL)は、従来のX線にはない優れた特徴を持った新世代のX線である。史上初のXFELは、アメリカのスタンフォードで昨年成功した。第3期科学技術基本計画

で国家基幹技術に掲げられた日本のXFEL計画がこれに続き平成22年度末には完成予定で、平成24年度には利用実験が行える見込みである。

## 2. 研究の目的

生命現象の分子レベルからの理解には、生体分子の構造可視化が不可欠である。従来のX線結晶構造解析法は、生体超分子複合体や多重複合体など、結晶化が困難な試料には実用的でない。さらに本質的には、構造ゆらぎが重要な場合など、結晶化された平均構造が生体細胞中の自然な状態を表わしていないという問題が露呈している。本研究の目的は、新世代のX線であるX線自由電子レーザー(XFEL)を用いた、これら複雑系生体分子の構造可視化法を構築することにある。XFELが(1)フェムト秒の時間幅をもち(2)コヒーレントであることを活用し、溶液中で自然な状態にある生体分子を、分子の動きの時間スケールよりも短いX線露光で、止まった構造を可視化する未踏の手法を構築する。これは、結合・解離過程などダイナミクス研究にも通じる。

## 3. 研究の方法

本研究では(A)本研究期間内に日本のXFELを用いて実現可能なケースと(B)将来的にXFELの性能が向上した場合に可能となる究極的なケースを扱う。具体的な研究計画は(1)生体分子溶液にXFELを照射した際に得られる散乱パターンのシミュレーションを行う。これにより、散乱体積、溶液濃度などの実験条件を定める。これと平行して(2)生物学的に意義が高くかつ測定に適した試料の検討を進める。(3)得られた散乱パターンから試料構造を可視化するアルゴリズムを構築する。(A)のケースでは、XFELのパラメータのみならず、検出器のダイナミックレンジなど、利用可能な実験データ収集・制御系のパラメータも考慮に入れて現実的な提案を行う。以上の研究に基づき(4)XFELを用いたデモンストレーション実験を行いそのデータ解析を行う。また、実験結果をアルゴリズム開発にフィードバックする。

## 4. 研究成果

我々が提案するパルス状コヒーレントX線溶液散乱法の基本概念を含むレビュー論文を執筆しCurrent Opinion in Structural Biology誌に掲載された。パルス状コヒーレントX線溶液散乱法では、溶液試料をフェムト秒の時間幅をもちXFELで照射することにより、試料損傷が起こる前の試料からのコヒーレントX線回折パターンをシングルショット計測する。測定したコヒーレントX

線回折パターンを各種の方法でデータ解析することにより、溶液中にある自然な状態の試料構造を取得する。

パルス状コヒーレントX線溶液散乱法において鍵を握る技術開発要素は環境セルである。環境セルは、測定装置内の真空中においても、制御された試料環境下でパルス状コヒーレントX線溶液散乱測定を可能にする試料ホルダである。開発した環境セルは、溶液試料をシリコンナイトライドの薄膜でサンドイッチした構造をもつ。環境セルはXFELのシングルショットで破壊されると想定されるため、シリコン基盤にアレイ状に多数の環境セルを配置した。2011年度に、環境セルの初期バージョンを設計し、設計通りの構造を持った環境セルを開発することに成功した。2012年度には、より効率的な測定のため、アレイの要素数を増やす多窓化などの改良を行った。

また、各種の試料にX線自由電子レーザーを照射した際に得られるコヒーレント回折パターンのシミュレーションを行い、XFEL波長、カメラ長(試料検出器間距離)などの実験条件を定めた。初期のXFELで利用可能なX線のフルエンス、検出器のピクセルサイズなどの装置パラメータを使用したシミュレーションでは、金のナノ粒子集合体やマイクロメートル前後の大きさを持つ細胞が有望なターゲット試料に挙げられた。また、生体分子をターゲットとしたシミュレーションでは、XFELを極限集光する装置開発が必要であることが導かれた。

また、複雑系生体分子の構造可視化法を可能にするアルゴリズムの開発も進めた。一例を挙げると、空間的に制限したXFEL照明を用いることで、従来法では難しかった、空間的に広がった試料のシングルショットイメージングに道が拓かれることを示した。この成果を論文にまとめ、Optics Express誌に掲載された。

開発した環境セルに、金のナノ粒子集合体、SiO<sub>2</sub>ビーズ、バクテリアなどを封入して、X線自由電子レーザー施設SACLAを用いてパルス状コヒーレントX線溶液散乱測定を行った。実験は、preMAXIC(汎用コヒーレントイメージング装置)を用いた前方散乱配置でのコヒーレントX線回折である。SACLAのビームライン3(BL3)の第3実験ハッチ(EH3:コヒーレント集光ステーション)を用いた。実験配置の写真を図1に示す。SACLAから発生したXFELを、光学ハッチに設置された全反射ダブルミラーで高次光を除去し、EH3に設置された1μmコヒーレント集光装置で集光して、preMAXIC内に設置した試料に照射した。試料からのコヒーレントX線回折パターンは、SACLAで独自開発されたMPCCD(マル

チポートCCD) 検出器を用いて測定した。高精度のコヒーレントX線回折パターンを測定するため、preMAXIC内に設置した2組の四象限スリットで試料以外からの寄生散乱を除去した。MPCCDはタンデムに2段に配置され、上流のオクタルセンサーで広角領域をカバーし、下流のセンサーでは、オクタルセンサーの中心部の開口を通り抜けた小角領域をカバーした。下流センサーの直前にはビームストップを設置して、非常に強度の強いX線自由電子レーザーのダイレクト光が検出器に当たらないようにした。

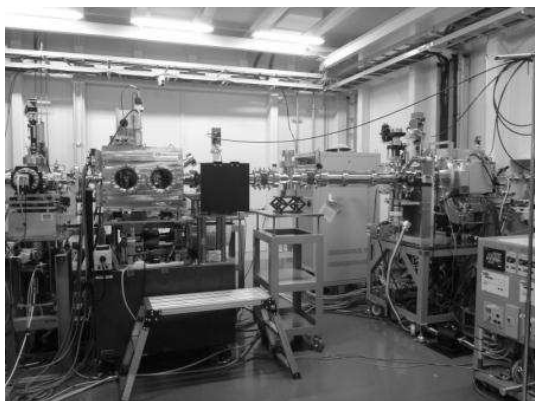


図1 X線自由電子レーザー施設SACLAを用いたパルス状コヒーレントX線溶液散乱実験のセットアップ

金ナノ粒子集合体は、X線に対する散乱断面積が大きいため、最初に試みる試料に適している。この試料は最近発見された新規材料であり、ラマン分光における表面プラズモン増強などへの応用が期待されている。SiO<sub>2</sub>ビーズは、形や大きさが揃っているため、計算から予想される理想的なコヒーレント回折パターンが得られるかのチェックに適している。生細胞は、比較的大きいマイクロメートルサイズの生体試料として測定を試みた。

XFELの時間幅はフェムト秒と、試料の放射線損傷のプロセスが進行する時間スケールよりも短い。このため、超短パルスXFELを用いたコヒーレントX線回折は、試料損傷が起こる前の試料構造を反映しており、これまでの限界を超えた高い空間分解能での生体イメージングが初めて可能となる。図2には、例として、SiO<sub>2</sub>ビーズに対してシングルショット計測した、試料が破壊される前の状態のコヒーレントX線回折パターンを示す。シングルショット・コヒーレントX線回折パターンには、計算から予想される理想的な同心円状の干渉縞が明瞭に観察された。環境セルや溶液からのバックグラウンド散乱の影響は観察されず、開発した環境セルが

高精度のパルス状コヒーレントX線溶液散乱測定を適していることを実験的に示すことに成功した。

測定した各種の試料のコヒーレントX線回折パターンから、反復的位相回復法により試料像を再構成することにも成功し、成果を論文にまとめ投稿した

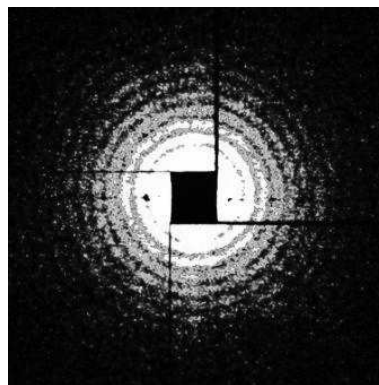


図2 X線自由電子レーザー施設SACLAを用いて測定された、SiO<sub>2</sub>ビーズからのシングルショット・コヒーレントX線回折パターン

## 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 21 件)

- ① Yoshihito Tanaka, Kiminori Ito, Takashi Nakatani, Rena Onitsuka, Marcus C. Newton, Takahiro Sato, Tadashi Togashi, Makina Yabashi, Tomoya Kawaguchi, Koki Shimada, Kazuya Tokuda, Isao Takahashi, Tetsu Ichitsubo, Eiichiro Matsubara, Yoshinori Nishino, Time-resolved Bragg coherent X-ray diffraction revealing ultrafast lattice dynamics in nano-thickness crystal layer using X-ray free electron laser, Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有、121 巻、2013、283-286
- ② 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
- ③ 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

- ④ 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

- ⑤ 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

[学会発表] (計 30 件)

- ① Yoshinori Nishino、Coherent Imaging with XFEL (招待講演)、The 5th International Workshop on FEL Science: Creation of New Science、2012 年 10 月 29 日、Gyeongju Hilton (Korea)
- ② Yasumasa Joti、Towards Synergistic Use of SACLA and K Computer for Bio-Molecular Imaging (招待講演)、The 5th International Workshop on FEL Science: Creation of New Science、2012 年 10 月 29 日、Gyeongju Hilton (Korea)
- ③ 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)
- ④ 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)
- ⑤ 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)

[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

城地 保昌 (JOTI YASUMASA)  
(財)高輝度光科学研究センター・  
XFEL 研究推進室・研究員  
研究者番号: 30360415

別所 義隆 (BESSHO YOSHITAKA)  
独立行政法人理化学研究所・  
機能解析第 2 研究チーム・チームリーダー  
研究者番号: 70242815

### (3) 連携研究者

竹内 昌治 (TAKEUCHI SHOJI)  
東京大学・生産技術研究所・准教授  
研究者番号: 90343110