

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390134

研究課題名(和文) 生きている細胞の内部構造とその変化をその場観察するハイブリッド顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of a hybrid microscope to observe inner structures and their variation of living biological cells in situ.

研究代表者

加道 雅孝 (KADO, Masataka)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：30360431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生きている細胞を蛍光顕微鏡と軟X線顕微鏡で同時に観察可能なハイブリッド顕微鏡を開発した。マウスの精巣ライディッヒ細胞の同時観察を実施することにより、生きている細胞内の単一のミトコンドリアの構造の観察に成功した。さらに、ハイブリッド顕微鏡の生命科学研究への活用の一例として、アポトーシスを起こした細胞核の構造変化を観察した。その結果、これまで明らかにされてこなかったアポトーシスによる細胞核の詳細な構造変化を観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：I have developed a hybrid microscopy which is a combination of a fluorescent microscope and a soft X-ray microscope and this microscopy enabled to observe live biological cells with both microscopes at the same time. Observing Leydig cells of mouse testis with the hybrid microscopy, I have succeeded to obtain a soft X-ray image of a single mitochondrion in a live biological cell. The hybrid microscopy also was applied to observe apoptotic cells and details of structural deformation due to the apoptosis have been cleared.

研究分野：X線光学

キーワード：軟X線顕微鏡 相関顕微法 細胞内小器官 アポトーシス 生きている細胞

1. 研究開始当初の背景

生命現象を理解するためには、生物を構成する基本単位である細胞を理解することが重要である。生命の維持に必要な機能を果たすために外界からの刺激に対して応答する細胞内の構造とその変化を明らかにすることは、様々な生命現象を解明するための極めて重要な情報を提供する。細胞の主要構成元素である炭素に吸収されやすく、細胞を取り巻く水にはほとんど吸収されないという特徴を持つ水の密波長軟X線(2.3 nm~4.4 nm)を用いた軟X線顕微鏡は、全ての生物を構成する基本単位となる細胞の内部構造を生きているままで“その場観察”できる技術として期待されてきた。しかし、細胞内の運動による空間分解能の低下を抑えたり、撮像時の放射線の影響を抑えたりするためには、1 マイクロ秒以下の瞬時撮像が要求され、その実現には非常に高輝度な軟X線源が必要とされた。これまでの国内外の研究では、軟X線光量の不足により、水溶液中の生きている細胞の撮像に数秒から数分の長時間露光が必要とされ、空間分解能の低下や放射線による影響を回避するために細胞を凍結する手法が一般的に用いられ、軟X線顕微鏡に本来期待されてきた生きた細胞の内部構造の“その場観察”はこれまで実現されなかった。

2. 研究の目的

様々な生命現象において重要な役割を果たす細胞の機能を理解するためには、生きている細胞の内部構造を詳細に“その場観察”することが必要である。高輝度レーザーで生成したレーザープラズマを光源とした軟X線顕微鏡(レーザープラズマ軟X線顕微鏡)は、生理活性状態にある細胞を生きたまま瞬時に観察可能で、様々な生命現象の観察が期待されている。しかし、細胞内には多くの細胞内小器官が密に分布しており、非常に複雑な構造となっている。そのため、レーザープラズマ軟X線顕微鏡で撮像した細胞内の構造をそれぞれ特定の細胞内小器官と対応付けることが困難であった。

申請者らは、このような目的を実現するための革新的顕微鏡としてレーザープラズマ軟X線顕微鏡の開発をすすめ、蛍光顕微鏡と軟X線顕微鏡を併用した“マルチカラーイメージング法”を考案し、生きている細胞の細胞内小器官の詳細な観察に成功した。本申請課題では、次の重要な課題である細胞内構造の動的観察を目的とし、生きている細胞を蛍光顕微鏡と軟X線顕微鏡で同時に観察可能な“ハイブリッド顕微鏡”を開発する。蛍光顕微鏡で細胞内小器官の構造変化を動的に捉えつつ軟X線顕微鏡により機能発現の重要な瞬間の高解像度観察を行うことにより、細胞機能の詳細な解析を実現する。

3. 研究の方法

生きている細胞を蛍光顕微鏡と軟X線顕微鏡により同時観察可能な“ハイブリッド顕微鏡”を開発し、細胞の詳細な内部構造とその変化の“その場観察”を実現することにより細胞機能の解析を実現する。具体的には、以下の研究開発を実施する。(1) 蛍光顕微鏡及び軟X線顕微鏡による同時観察を可能とする新型試料ホルダーの開発、(2) 倒立型蛍光顕微鏡の試料ステージ上に直接設置することにより、生きている細胞の蛍光顕微鏡観察と軟X線顕微鏡観察を同時に実現できるハイブリッド顕微鏡本体の開発、(3) 開発したハイブリッド顕微鏡を用いて、生きている細胞のその場観察を行う。

細胞の観察には、関西光科学研究所が保有する出力 20 J、パルス幅 600 ps の Nd:glass レーザーを用い、金の薄膜ターゲットに集光することにより生成する高温高密度プラズマ(レーザー生成プラズマ)を軟X線光源として用いる。ここで発生する X 線光量は約 1.3×10^{15} photons/sr/pulse と非常に強力で、生きている細胞を 600 ps の露光時間で瞬時に観察可能である。

4. 研究成果

蛍光顕微鏡と軟X線顕微鏡を併用したハイブリッド顕微鏡の実現に必要な新型試料ホルダー及び新しい窒化シリコン窓の設計及び製作を行った。新型試料ホルダーは細胞を試料ホルダーに生きたまま封入した状態で蛍光顕微鏡により 40 倍の高倍率観察が可能となる構造とし、蛍光顕微鏡と軟X線顕微鏡による細胞の同時観察を可能とした。一方、窒化シリコン窓表面に厚さ $5 \mu\text{m}$ 、幅 $5 \mu\text{m}$ のスペーサーと溝構造を構築し、窒化シリコン窓と PMMA フォトリソグの密着度をトルクレンチによって正確にコントロールすることによ

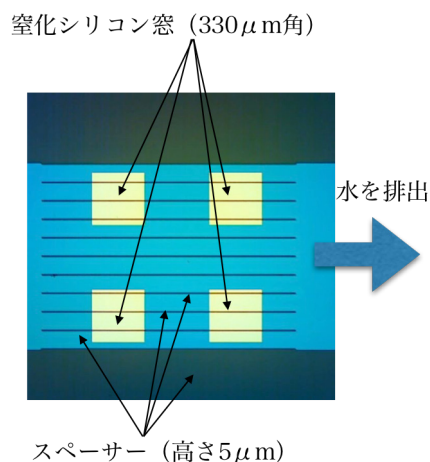


図1. 新しく開発した窒化シリコン窓

り細胞を取りまく培養液の層の厚さを常に一定に保つとともに培養液の余剰分を外部に排出する構造とした。(図1)

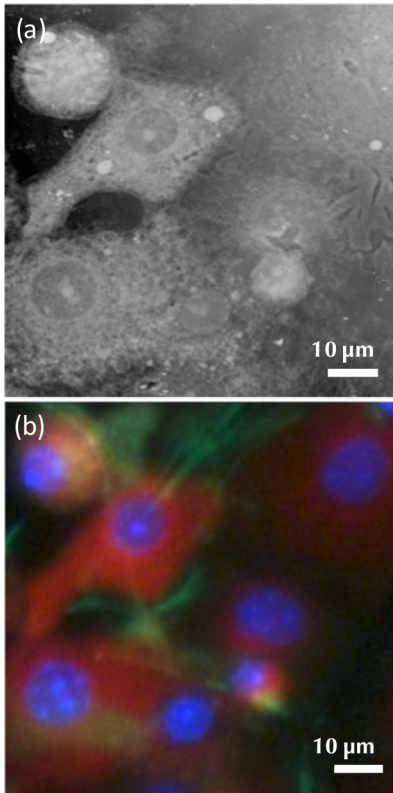


図2. ハイブリッド顕微鏡で観察したマウスの精巣ライディッヒ細胞の軟 X 線顕微鏡像(a)と蛍光顕微鏡像(b)

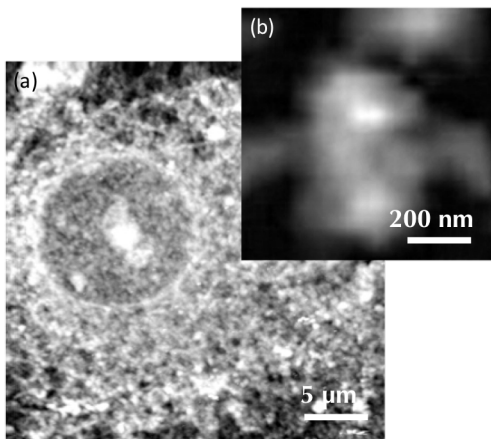


図3. ハイブリッド顕微鏡で観察した精巣ライディッヒ細胞の軟 X 線顕微鏡像(a)とミトコンドリアの拡大像(b)

新しく開発した新型試料ホルダーと窒化シリコン窓を用いて生きている細胞の観察を行った。まず、一定の現像条件の下で PMMA の現像を行った結果、細胞周辺の培養液の厚さが安定して $5\mu\text{m}$ に保たれていることを確認した。これは、非常に再現性よく細胞の軟 X 線顕微鏡観察が可能であることを意味し、軟 X 線顕微鏡を生命科学研究に活用する際に非

常に重要である。マウスの精巣ライディッヒ細胞を蛍光顕微鏡と軟 X 線顕微鏡により生きている状態で観察した結果、双方の顕微鏡において細胞核周辺に非常に多くのミトコンドリアが密集して分布していることが観察された。(図2) 蛍光顕微鏡ではそれらのミトコンドリアを個々に分離して観察することは出来なかったが、軟 X 線顕微鏡により単一のミトコンドリアの構造の観察にも成功した。(図3)

生きている細胞を蛍光顕微鏡と軟 X 線顕微鏡で同時に観察可能な“ハイブリッド顕微鏡”の本体部の設計を行った。具体的には、(1) 軟 X 線源と試料を格納するための真空容器と真空排気装置、(2) 出力 20 J、パルス幅 600 ps の高強度レーザーを金属薄膜ターゲットに集光照射するためのレーザー集光部およびターゲット部から構成され、(3) 平成 25 年度に開発した新型試料ホルダーを取り付けることにより生きている細胞の軟 X 線顕微鏡像と蛍光顕微鏡増を同時に撮像可能な構造として設計を行った。倒立型蛍光顕微鏡の試料ステージ上に設置できる十分にコンパクトな大きさとなるよう設計を行った。(図4) 高強度レーザーを金属薄膜ターゲットに集光する集光レンズは、真空容器に直接取り付けることとし、蛍光顕微鏡観察時に真空容器を移動した際にレーザーのターゲットへの集光がずれないように構造とした。試料ホルダーは、真空容器底面に外部から取り付け、容易に細胞試料を交換できる構造とした。軟 X 線顕微鏡本体部を倒立型蛍光顕微鏡の試料ステージ上に直接取り付けることにより細胞の軟 X 線顕微鏡像と蛍光顕微鏡像を同時に取得できる構造とした。これらの設計により、細胞機能発現の過程を蛍光顕微鏡によりリアルタイム観察しながら、機能発現の重要な瞬間を見きわめ

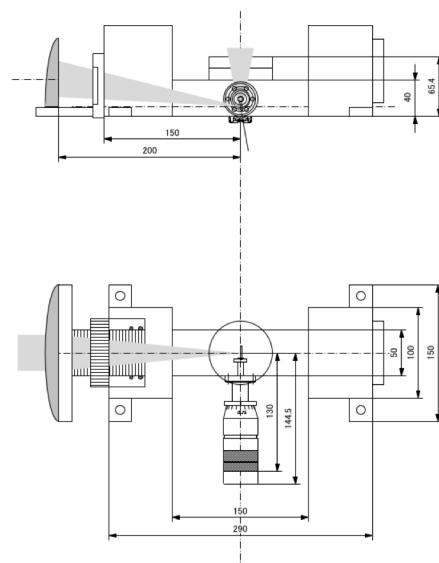


図4. 設計したハイブリッド顕微鏡の構造

て軟 X 線顕微鏡により高い解像度で観察することが可能となる。このことにより、様々な生命現象を理解する上で重要となる細胞の機能と構造の相関を直接観察することが可能となった。

生きている細胞を蛍光顕微鏡と軟 X 線顕微鏡で同時に観察可能なハイブリッド顕微鏡の製作を行うとともに、新型試料ホルダーと組み合わせ、ハイブリッド顕微鏡として完成させた。これまでに実績のあるマウスの精巣ライディッヒ細胞を用いてハイブリッド顕微鏡による蛍光顕微鏡と軟 X 線顕微鏡による同時観察を実施することによりその性能試験を実施した。さらに、ハイブリッド顕微鏡の生命科学への活用の一例として、アポトーシスを起こした細胞核の構造変化を観察した。プログラムされた細胞死であるアポトーシスは生命体の生存にとって非常に重要な生命現象の一つであり、これまでの蛍光顕微鏡を用いた研究で、アポトーシスを起こした細胞核は、DNA が細胞核周辺に集まるリング形状、DNA の断片化に伴うネックレス形状、DNA 凝

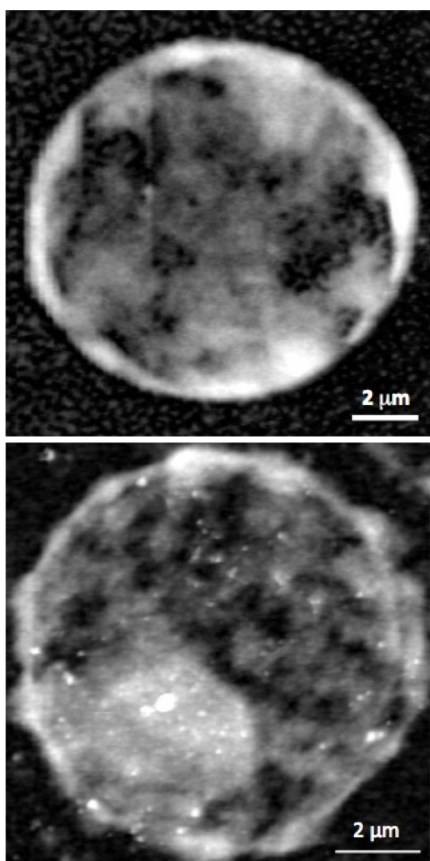


図 5. アポトーシスを起こした細胞核の軟 X 線顕微鏡像。上がリング形状、下がネックレス形状

縮、核崩壊という過程をたどることがわかってきているが、その詳細な構造変化は解明されてこなかった。開発したハイブリッド顕微鏡を活用し、蛍光顕微鏡と軟 X 線顕微鏡による同時観察を行うことによるこれまで明らか

にされてこなかったアポトーシスによる細胞核の詳細な構造変化を観察することによりハイブリッド顕微鏡の有用性を実証した。(図 5)

<引用文献>

- ① M. Kado, H. Daido, Y. Yamamoto, K. Shinohara and M. C. Richardson, *Laser Physics Letters* **3**, pp. 205–207 (2006).
- ② M. Kado, M. Ishino, S. Tamotsu, K. Yasuda, M. Kishimoto, M. Nishikino, Y. Kinjo and K. Shinohara, *JEEE* **130**, No. 10, Sec. C, pp. 1774–1778 (2010).
- ③ M. Kado, M. Ishino, S. Tamotsu, K. Yasuda, M. Kishimoto, M. Nishikino, Y. Kinjo and K. Shinohara, *AIP Conf. Proc.* **1365**, pp. 391–394 (2011).
- ④ M. Kado, M. Kishimoto, M. Ishino, S. Tamotsu, K. Yasuda and K. Shinohara, *AIP Conf. Proc.* **1465**, pp. 246–250 (2012).
- ⑤ M. Kishimoto, M. Kado, M. Ishino, S. Tamotsu, K. Yasuda and K. Shinohara, *AIP Conf. Proc.* **1465**, pp. 43–47 (2012).
- ⑥ M. Kado, M. Ishino, M. Kishimoto, S. Tamotsu, K. Yasuda, Y. Kinjo and K. Shinohara, *Proc. of SPIE* **8139**, pp. 8139O1–7 (2011).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① M. Kado, M. Kishimoto, S. Tamotsu, K. Yasuda, M. Aoyama, S. Tone and K. Shinohara, “Correlative imaging of live biological cells with a soft x-ray microscope and a fluorescence microscope”, *AIP Conference Proceedings* **1696**, 020019-1-4 (2016). doi: 10.1063/1.4937513 査読あり
- ② M. Kado, M. Kishimoto, S. Tamotsu, K. Yasuda, and K. Shinohara, “In situ observation of cellular organelles with a contact x-ray microscope”, *Journal of Physics: Conference Series* **463**, 012056-1-4 (2013). doi:10.1088/1742-6596 査読あり
- ③ M. Kado, M. Kishimoto, S. Tamotsu, K. Yasuda, M. Aoyama, and K. Shinohara, “Imaging of fine structures of cellular organelles in hydrated biological cells by a soft x-ray microscope combined with a fluorescence microscope”, *Proc. of SPIE* **8849**, 88490C1-7 (2013). doi: 10.1117/12.2022332 査読あり

[学会発表] (計 20 件)

- ① 加道雅孝、他、「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡による生きている細胞の観察」、電気学会 光・量子デバイス研究会、平成 28 年 3 月 30 日、兵庫県民会館 神戸市 (兵庫県) 招待講演
- ② 加道雅孝、「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡による生きている細胞の内部構造の観察」、「プラズマ科学における分光計測の高

- 度化と原子分子過程研究の新展開」「原子分子データ応用フォーラムセミナー」合同研究会、平成 28 年 1 月 28 日、核融合科学研究所 土岐市 (岐阜県) 招待講演
- ③ 加道雅孝、他、「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡を用いた相関顕微法による細胞内小器官の観察」、レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会、平成 28 年 1 月 10 日、名城大学天白キャンパス 名古屋市 (愛知県) 招待講演
- ④ 加道雅孝、他、「高輝度レーザープラズマ軟 X 線源を用いたアポトーシス誘発細胞核の軟 X 線顕微鏡観察」、第 38 回日本分子生物学会年会、平成 27 年 12 月 4 日、神戸国際会議場 神戸市 (兵庫県)
- ⑤ Masataka Kado, et al., “Correlative microscopy with a laser-plasma soft X-ray microscope and a fluorescent microscope for biological imaging of live hydrated cells”, Microscopy Conference 2015, 平成 27 年 9 月 6 日～11 日、ゲッティングゲン (ドイツ)
- ⑥ Masataka Kado, et al., “Live cell imaging with a soft X-ray microscope using a laser-plasma soft X-ray source”, ALPS 2015 Workshop, 平成 27 年 7 月 6 日～9 日、ワルシャワ (ポーランド) 招待講演
- ⑦ Masataka Kado, “Intense laser-plasma soft-X-ray sources and application for biological X-ray microscopy”, ASHULA2015, 平成 27 年 1 月 21 日、ロナワラ (インド) 招待講演
- ⑧ 加道雅孝、「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡による生きている細胞の内部構造の観察」、平成 26 年第 1 回「顕微表面・界面分析セミナー」、平成 26 年 12 月 19 日、島津製作所関西支社マルチホール 大阪市 (大阪府) 招待講演
- ⑨ 加道雅孝、「軟 X 線顕微鏡による細胞内部構造のその場観察」、第 4 回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、平成 26 年 12 月 11 日、宇都宮大学 宇都宮市 (栃木県) 招待講演
- ⑩ 加道雅孝、他、「生きている細胞の内部構造を直接観察できる軟 X 線顕微鏡の開発」、第 37 回日本分子生物学会年会、平成 26 年 11 月 25 日～28 日、パシフィコ横浜 横浜市 (神奈川県)
- ⑪ 加道雅孝、他、「レーザー生成プラズマ軟 X 線源の高輝度化と軟 X 線顕微鏡による生きている細胞の観察」、Plasma Conference 2014, 平成 26 年 11 月 18 日～21 日、朱鷺メッセ 新潟市 (新潟県)
- ⑫ Masataka Kado, et al., “Hybrid imaging of living biological cells with a soft X-ray microscope and a fluorescent microscope”, International Conference on X-ray Microscopy, 平成 26 年 10 月 27 日～31 日、メルボルン (オーストラリア)
- ⑬ 加道雅孝、他、「試料周辺の水の層の厚さの制御による密着型軟 X 線顕微鏡の高コントラスト化」、第 75 回応用物理学会秋季学術講演会、平成 26 年 9 月 17 日～20 日、北海道大学 札幌市 (北海道)
- ⑭ Masataka Kado, et al., “Single flash imaging of live hydrated biological cells by a contact soft x-ray microscope coupled with an intense laser-plasma soft x-ray source”, 18th International Microscopy Congress, 平成 26 年 9 月 8 日～12 日、プラハ (チェコ)
- ⑮ Masataka Kado, et al., “Soft X-ray emissions from ultra-thin foiled targets irradiated with an intense pulsed laser”, 33rd European Conference on Laser Interaction with Matter, 平成 26 年 9 月 1 日～5 日、パリ (フランス)
- ⑯ Masataka Kado, et al., “Development of a soft x-ray microscope with intense laser-plasma soft x-ray source produced by a high power pulsed laser”, HEDS in Asia 2014, 平成 26 年 1 月、釜山 (韓国) 招待講演
- ⑰ 加道雅孝、他、「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡によるアポトーシス細胞核の観察」、レーザー学会第 455 回研究会、平成 25 年 12 月 13 日、若狭湾エネルギー研究センター 敦賀市 (福井県)
- ⑱ Masataka Kado, et al., “Structural Study of Cellular Organelles with a Laser-Plasma Soft X-Ray Microscope”, The 12th Symposium on X-ray Imaging Optics, 平成 25 年 11 月 20 日、大阪大学中之島センター 大阪市 (大阪府) 招待講演
- ⑲ 加道雅孝、他、「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡によるアポトーシス細胞核の観察 II」、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、平成 25 年 9 月 16 日～20 日、同志社大学京田辺キャンパス 京田辺市 (京都府)
- ⑳ Masataka Kado, et al., “Imaging of fine structures of cellular organelles in hydrated biological cells by a soft x-ray microscope combined with a fluorescence microscope”, SPIE 2013, 平成 25 年 8 月 26 日～30 日、サンディエゴ (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加道 雅孝 (KADO, Masataka)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：30360431

(2) 連携研究者

岸本 牧 (KISHIMOTO, Maki)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：40360432