



展 TENBO 望

レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡で 生きた細胞の内部を観る



加道 雅孝

Kado Masataka

(日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門)

1 はじめに

生命現象を理解し、生命の起源を解き明かすという生命科学の分野の究極の目的を達成するためには、生物を構成する基本単位である細胞の機能を理解することが重要である。細胞の機能は、その構造に大きく依存している。したがって、その機能発現状態における構造を生きたまま高い解像度で“その場観察”することは重要な情報を提供する。光学顕微鏡により生きている細胞のその場観察が可能であるが物理的な解像度に制約があるため、細胞内小器官の高解像度観察には電子顕微鏡による情報が必須となる。しかし、電子顕微鏡で細胞全体をそのまま観察することは難しく、薄い切片による情報から解析することになる。すなわち、現状ではミトコンドリアや染色体繊維、微小管といった機能単位として重要な構造を直接観察できない。

細胞の主要構成元素である炭素にはよく吸収されるが、細胞を取り巻く水にはほとんど吸収されない水の窓波長軟 X 線 (2.3~4.4 nm) を用いた軟 X 線顕微鏡は、光学顕微鏡よりも数十倍高い解像度を持ち、電子顕微鏡よりも高い透過性により、生きている細胞の内部構造 (細胞内小器官) を“その場観察”できる技術とし

て期待されてきた。しかし、細胞の“動き”による解像度の低下を抑えるためには、1 マイクロ秒以下の瞬時撮像が要求される。これまでの研究では軟 X 線光量の不足により、培養液中の細胞の撮像に数秒から数分の長時間露光が必要とされ、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”は実現されなかった。

2 高輝度軟 X 線の発生

日本原子力研究開発機構の関西光科学研究所において開発された高強度レーザーを厚さ数 10 nm の金の極薄膜ターゲットに集光することにより生成した高温高密度プラズマ (レーザープラズマ) から放射される軟 X 線を軟 X 線顕微鏡用の光源として用いた。高強度レーザーを金属ターゲットに集光するとターゲット表面で吸収されたレーザーのエネルギーは、電子熱伝導等によりターゲット内部へ拡散され、ターゲットを効率的に加熱することができないという問題が生じるが、ターゲットの厚さを 20 nm と薄くすることにより効率的な加熱を実現した。厚さ 20 nm という極薄膜ターゲットの製作は非常に困難であるため、厚さ 100 nm の窒

化シリコン薄膜と厚さ 20 nm の金の薄膜から構成される二層構造薄膜ターゲットを製作し実験を行った。図 1 に厚さ 50 μm と厚さ 20 nm の金ターゲットを高強度レーザーで照射し、生成したプラズマから発光する軟 X 線像を示した。細胞の瞬時撮像には、試料上で 1 μm^2 辺りに約 10 万個 (10^5 個) 以上の軟 X 線フォトン数が必要であるが¹⁾、実験結果から約 44 万個 (4.4×10^5 個) のフォトン数が得られることが分かった。

3 密着型軟 X 線顕微鏡

軟 X 線顕微鏡には大きく分けて、(1) 結像型、(2) 走査型、(3) 密着型の 3 種類がある。これまでの研究、特に軟 X 線源にシンクロトロン放射光を用いた研究²⁻⁶⁾ では主に結像型と走査型が用いられてきた。これらの方式では、使用する X 線集光素子による軟 X 線の減衰の問題や試料の走査に時間が掛かるなどの問題だけでなく、X 線の集光に一般的に用いられるフレネルゾーンプレートや多層膜鏡は単色の軟 X 線源を必要とするため、試料上で十分な軟 X 線光量を実現することが難しく、長時間の露光が必要となる。その結果、空間分解能の低下や試料の放射線損傷を抑えるために試料の固定や凍結が必須となり、生きた細胞をそのまま観察することができなかった。また、光源にレーザープラズマ軟 X 線を用いた結像型の研究も行われたが、生きた細胞の観察に必要な軟 X 線光量は実現されなかった⁷⁻¹⁰⁾。それに対して、光源にレーザープラズマ軟 X 線を用いた密着型は、高強度レーザーによって生成したレーザープラズマから放射される軟 X 線を X 線感光材上に培養した細胞に直接照射する方式で (図 2)、(1) 軟 X 線光量の減衰の原因となる X 線集光素子を使用しない、(2) 広い波長帯域の軟 X 線の使用が可能、(3) 高い空間分解能と広い視野の両立が可能という特徴を持ち、生きた細胞の瞬時撮像が可能である¹¹⁻¹⁴⁾。

4 密着型軟 X 線顕微鏡による細胞の観察

細胞を X 線感光材として用いる PMMA フォトレジスト上に直接培養し、専用開発したステンレス製の試料ホルダー中に培養液を含んだ状態で封入した。その構造と写真を図 3 に示す。ステンレス製試料ホルダーは、生きたまま

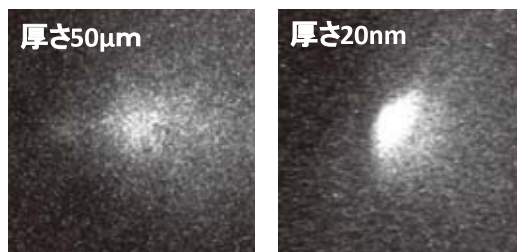


図 1 厚さ 50 μm (左) と厚さ 20 nm (右) の金ターゲットからの軟 X 線発光

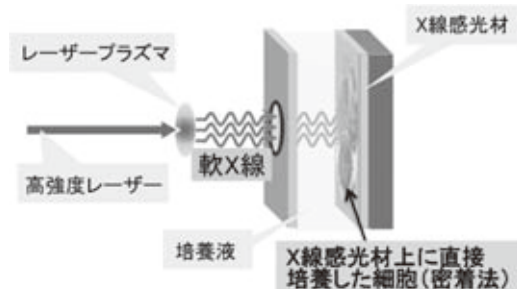


図 2 レーザープラズマ軟 X 線源を用いた密着型軟 X 線顕微鏡の原理

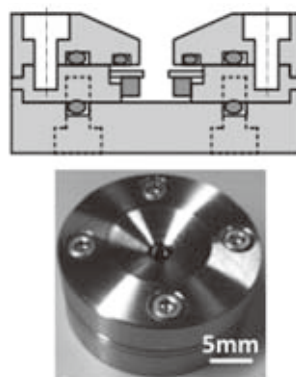


図 3 ステンレス製試料ホルダー

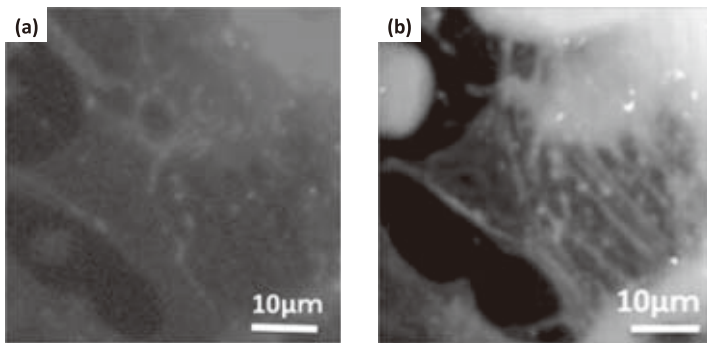


図4 マウスの精巣ライディッヒ細胞の蛍光顕微鏡像 (a) と軟 X 線顕微鏡像 (b)

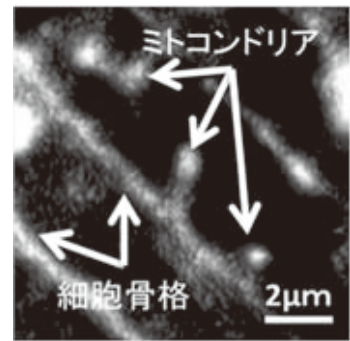


図5 軟 X 線顕微鏡像の拡大像

の細胞をセットした状態で位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡、軟 X 線顕微鏡の各種顕微鏡により高解像度で観察できるよう工夫を行った。あらかじめ特定の細胞内小器官を選択的に標識できる DAPI、マイトトラッカー、ファロイジン等の蛍光標識を施した細胞を蛍光顕微鏡と軟 X 線顕微鏡で観察した¹⁵⁻¹⁷⁾。図 4 に、マウスの精巣ライディッヒ細胞の蛍光顕微鏡像 (a) と軟 X 線

顕微鏡像 (b) を示した。細胞は、あらかじめマイトトラッカーで蛍光標識を施してあったので、蛍光顕微鏡像で明るく見えている構造はミトコンドリアに対応する。蛍光顕微鏡像と軟 X 線顕微鏡像を注意深く比較すると、どちらにも同じ場所に粒状の構造が確認でき、蛍光顕微鏡像の情報からこれらがミトコンドリアであることが分かった。蛍光顕微鏡では、蛍光標識を施した構造しか可視化されないのに対して、軟 X 線顕微鏡では原理的にすべての細胞内小器官が可視化される。例えば、この軟 X 線顕微鏡像では、蛍光顕微鏡像との比較から特定されたミトコンドリアの他に格子状の構造が確認されたが、これらはこれまでの観察から細胞骨格であることが分かった。

図 5 に、軟 X 線顕微鏡像の拡大像を示した。

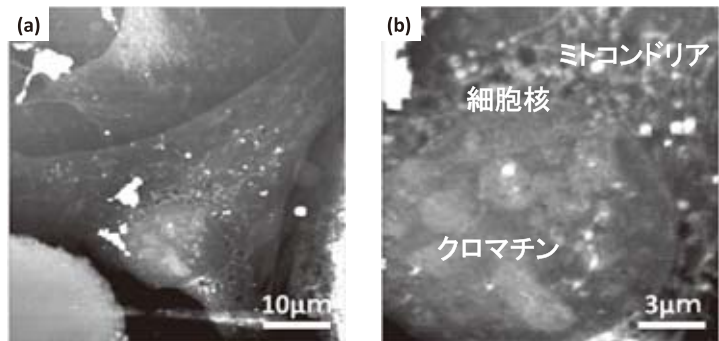


図6 軟 X 線顕微鏡によるマウスのライディッヒ細胞の全体像 (a) と細胞核部分の拡大像 (b)

この像では、ミトコンドリアと細胞骨格の構造を明瞭に確認することができる。この像から、ミトコンドリアと細胞骨格が密接に結びついている様子が分かった¹⁷⁾。図 6 は同様に軟 X 線顕微鏡によるマウスのライディッヒ細胞の全体像 (a) とその細胞核付近の拡大像 (b) である。細胞の全体像 (a) において、細胞核の周辺に網目状の構造が確認できる。蛍光顕微鏡像との比較から、この網目状の構造がミトコンドリアであることが分かった。拡大像 (b) では、細胞核の内部の構造 (クロマチン構造) と細胞核を取り巻くミトコンドリアの詳細が確認できる。このように、従来の顕微鏡では不可能であった、培養中の生きている細胞の細胞内小器官の詳細な構造を直接観察する技術の確立に成功した。

5 まとめと今後の展望

高強度レーザーを金の極薄膜ターゲットに集光することによって発生させた高輝度軟X線源とX線感光材上に細胞を直接培養し、軟X線光量の減衰の原因となるX線光学素子を用いず細胞に軟X線を直接照射する密着型軟X線顕微鏡を組み合わせるにより、培養中の生きている細胞の細胞内小器官の詳細な構造を高解像度で観察できるレーザープラズマ軟X線顕微鏡を開発した。マウスの精巣ライディッヒ細胞の観察を行った結果、細胞核周辺を取り巻く網目状のミトコンドリアの詳細な構造や細胞核内のクロマチン構造の観察に成功した。

レーザープラズマ軟X線顕微鏡の開発は、放射線を照射された細胞内の構造変化の観察による放射線影響の解明や、細胞の免疫機能発現、細胞内情報変換機構、たんぱく質の合成、染色体の遺伝情報の伝達等、広く生命現象を細胞レベルで理解する研究に役立つことが期待できる。さらに、これらの生命科学の基礎的な分野での利用だけでなく、がん細胞や神経細胞の変性過程等、病理学や薬理学などの医療の分野への利用も期待できる。将来的には分子レベルから組織レベルにまで対象を広げることにより、これまでも、光学顕微鏡によって細胞が、電子顕微鏡によってウイルスが発見されたように、軟X線顕微鏡という新たな技術の開発は、生命の起源の解明にせまる、多くの新しい知見をもたらすと期待できる。

参考文献

- 1) Sayre, S., Howells, M., Kirz, J. and Rarback, H., eds., X-Ray Microscopy II, Springer-Verlag, Berlin (1988)
- 2) Michette, A.G., Morrison, G. and Buckley, C.J., eds., X-Ray Microscopy III, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- 3) Aristov, V.V. and Erko, A.I., eds., X-Ray Microscopy IV, Bogorodskii Press, Chernogolovks, Russia (1994)
- 4) Thieme, J., Schmahl, G., Rudolph, D. and Umbach, E., eds., X-Ray Microscopy and Spectroscopy, Springer-Verlag, Berlin (1998)
- 5) Meyer-Ilse, W., Warwick, T. and Attwood, D.T., eds., X-Ray Microscopy VI, American Institute of Physics, Melville, N.Y. (2000)
- 6) Susini, J., Joyeux, D. and Polack, F., eds., X-Ray Microscopy VII, EDP Sciences, Paris (2003)
- 7) Johansson, G.A., Holmberg, A., Hertz, H.M. and Berglund, M., *Rev. Sci. Instrum.*, **73**, 1193-1197 (2002)
- 8) Rymell, L. and Hertz, H.M., *Opt. Commun.*, **103**, 105-110 (1993)
- 9) Malmqvist, L., Rymell, L., Berglund, M. and Hertz, H.M., *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 4150-4153 (1996)
- 10) Rymell, L. and Hertz, H.M., *Rev. Sci. Instrum.*, **66**, 4916-4920 (1995)
- 11) Kado, M., Richardson, M.C., Rajyaguru, J.M., Muszynski, M.J. and Yamamoto, Y., *Proc. of Experimental Biology and Medicine*, **220**, 27-30 (1999)
- 12) Rajyaguru, J.M., Kado, M., Richardson, M.C. and Muszynski, M.J., *Biophysical Journal*, **72**, 1521-1526 (1997)
- 13) Rajyaguru, J.M., Kado, M., Nekula, K., Richardson, M.C. and Muszynski, M.J., *Microbiology*, **143**, 733-738 (1997)
- 14) Kado, M., Daido, H., Yamamoto, Y., Shinohara, K. and Richardson, M.C., *Proc. of 8th Int. Conf. X-ray Microscopy*, 41-43 (2006)
- 15) Kado, M., Ishino, M., Tamotsu, S., Yasuda, K., Kishimoto, M., Nishikino, M., Kinjo, Y. and Shinohara, K., *JEEE*, **130**, 1774-1778 (2010)
- 16) Kado, M., Ishino, M., Tamotsu, S., Yasuda, K., Kishimoto, M., Nishikino, M., Kinjo, Y. and Shinohara, K., *AIP Conf. Proc.*, **1365**, 391-394 (2011)
- 17) Kado, M., Ishino, M., Kishimoto, M., Tamotsu, S., Yasuda, K., Kinjo, Y. and Shinohara, K., *Proc. of SPIE*, **8139**, 81390O1-7 (2011)