

X線レーザーによるナノレベルでの 生きた細胞内部の観察



西野 吉則

Nishino Yoshinori

(北海道大学電子科学研究所)



木村 隆志

Kimura Takashi



城地 保昌

Joti Yasumasa

((公財)高輝度光科学
研究センター)



別所 義隆

Bessho Yoshitaka

(台湾中央研究院
物理研究所)

1 はじめに

兵庫県の播磨科学公園都市に、大型放射光施設 SPring-8 に隣接して、X線自由電子レーザー (X-ray Free-Electron Laser (XFEL)) 施設 SPring-8 Angstrom Compact free-electron LAsER (SACLA) が建設された¹⁾。

XFEL は、現在、日本の SACLA と米国の Linac Coherent Light Source (LCLS) でのみ利用可能な最先端の X 線である。LCLS は、2009 年 4 月に世界初の硬 X 線領域でのレーザー発振に成功した。この成果は、米国 *Science* 誌により 2009 年の 10 大科学ニュースの 1 つに選ばれた。SACLA は 2011 年 6 月にレーザー発振に成功し、2012 年 3 月より供用運転を行っている。

筆者らは、XFEL の優れた特徴を活かした新規 X 線イメージング法の開発を行っている。生物試料を高分解能で観察する際、従来の電子顕微鏡や X 線顕微鏡では、放射線による試料損傷が分解能を制限する要因となってきた。10 fs ほどの発光時間を持つ XFEL で試料を照らすことにより、試料が放射線による損傷を受ける前の一瞬の姿を捉えることができ、従来の分解能限界を超えた生物試料イメージングに道が開かれる。究極的には、結晶を必要としない生

体分子の構造可視化にも繋がる。

2 パルス状コヒーレント X 線溶液散乱法

筆者らは、XFEL を用いて溶液試料のスナップショットを捉える、パルス状コヒーレント X 線溶液散乱法 (Pulsed Coherent X-ray Solution Scattering (PCXSS)) を独自開発した^{2,3)}。PCXSS の概念図を図 1 に示す。生物にとって水は構造を保つ上で必須であり、PCXSS による溶液試料の観察は、生物試料のイメージングにとって極めて重要である。

XFEL を用いたイメージング実験に関して、LCLS ではこれまで、液体ジェット入射⁴⁾ やエアロゾル入射⁵⁾ など、飛翔試料を扱ってきた。これとは対照的に、PCXSS では、溶液試料を薄膜の間に静置し、環境を制御したイメージングが行えるのが特徴である。これは、生きた細胞のイメージングにおいて重要となる。XFEL は極めて強力で、溶液試料を挟む薄膜が、シングルショットで破壊される。このため、筆者らは、独立の液体槽を 2 次元アレイ状に多数配置した、マイクロ液体封入アレイ (MLEA (Micro Liquid Enclosure Array)) を独自開発した (図 2)。

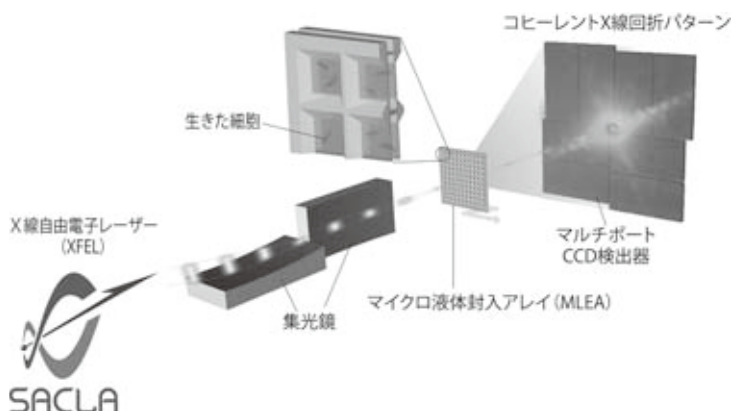


図1 パルス状コヒーレントX線溶液散乱法 (PCXSS) の模式図

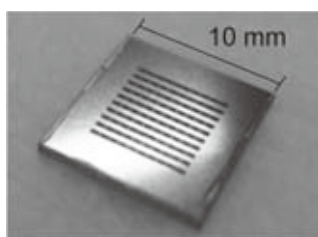


図2 マイクロ液体封入アレイ (MLEA)

3 生きた細胞のシングルショットイメージング

PCXSS による最初の実験として、筆者らは、生きた細胞のナノイメージングに成功した³⁾。研究では、*Microbacterium lacticum* という牛乳の中に生息する微生物細胞を観察した⁶⁾。*M. lacticum* は、サブ μm という小さなサイズのため、光学顕微鏡では内部構造の観察は困難で、細胞生物学的知見はほとんど得られていない。

筆者らは、まず、MLEA 内で細胞が生き続けることができることを、蛍光顕微鏡を用いて確かめた。実験の結果、99%以上の細胞が、MLEA を真空中に置き1時間後も生き続けていることを確認し、MLEA を用いた生細胞の PCXSS 測定が可能であることを示した。

M. lacticum 生細胞に対する、PCXSS 実験は、SACLA の BL3 において行った。SACLA からの光子エネルギー 5.5 keV の X 線レーザーを、

光学ハッチの全反射ダブルミラーを用いて高次光を除去し、EH3 (コヒーレント集光ステーション) の $1\ \mu\text{m}$ コヒーレント集光装置⁷⁾ を用いて $1.5\ \mu\text{m} \times 2.0\ \mu\text{m}$ に集光して、MAXIC (Multiple Application X-ray Imaging Chamber) (汎用コヒーレントイメージング装置)⁸⁾ 内に設置した MLEA 中の生細胞試料に照射した。試料からのコヒーレント回折パターンは、

MPCCD (Multi-Port Charged-Coupled Device)⁹⁾ を用いて計測した。高精度のコヒーレント X 線回折データを計測するため、MAXIC 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低減した。さらに、筆者らの実験により、MLEA の $20\ \mu\text{m}$ ほどのサイズのシリコン窓枠が、試料面での寄生散乱低減スリットの役割を果たし、サブ μm の大きさの生物試料からの極めて強度の弱いコヒーレント X 線回折を計測するのに、欠かせない役割を果たすことが示された。

図3に、*M. lacticum* 生細胞からのシングルショット XFEL コヒーレント回折パターンを示す。一方向に綺麗に延びた干渉縞が計測された。この干渉縞の縞間隔から、細胞がおよそ 194 nm の幅を持つことが導かれた。

図3のコヒーレント干渉パターンに、位相回復アルゴリズム^{10,11)} を適用して再構成した生細胞像を図4に示す。位相回復には、relaxed averaged alternating reflections (RAAR)¹²⁾、noise-tolerant hybrid input-output (HIO)¹³⁾、shrink-wrap¹⁴⁾ アルゴリズムを使用した。位相回復伝達関数¹⁵⁾ を用いて分解能を評価すると、37 nm (全周期分解能) と見積もられた。

再構成した細胞には、核様体由来すると考えられる、イメージ強度の高い領域 (図4中心の白色の領域) が観察された。このイメージ強

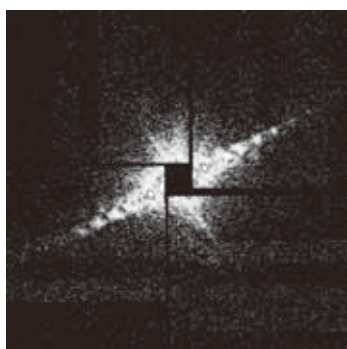


図3 *M. lacticum* 生細胞からのシングルショット XFEL コヒーレント回折パターン

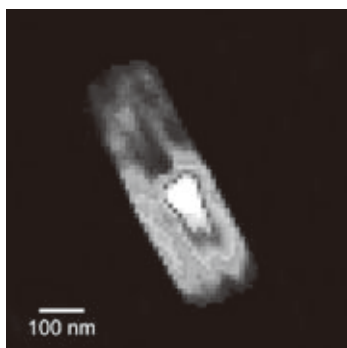


図4 シングルショット XFEL コヒーレント回折パターンをデータ解析して得た *M. lacticum* 生細胞の像

度の高い領域が主に核酸により構成され、細胞内のほかの領域が主にタンパク質で構成されていると仮定すると、定量的にほぼ説明がつく。

4 まとめと今後の展望

XFEL を用いた PCXSS は、染色しない生きた細胞を、nm の分解能で定量的に観察できる優れた手法である。今後、生きた細胞を系統的に測定することで、いまだ解明されていない原核微生物のゲノム複製やそれに続く細胞分裂などの、重要な細胞内現象の解明に繋がることが期待される。また、XFEL の集光度を更に向上させることなどにより、より小さな生体分子の観察や、更なる分解能の向上が期待される。また、PCXSS は生物試料のみならず、溶液中で

のみ構造を保つことのできる物質材料のナノイメージングなどにも、威力を発揮すると期待する。

【謝辞】

本研究は、(独)理化学研究所の石川哲也センター長、矢橋牧名グループディレクター、Changyong Song チームリーダー、Sangsoo Kim 博士、(公財)高輝度光科学研究センターの登野健介チームリーダー、共和化工(株)環境微生物学研究所の大島泰郎所長、森屋利幸博士、東京薬科大学の玉腰雅忠准教授との共同研究である。

本研究は、文部科学省 X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題、JST CREST、科研費、物質・デバイス領域共同研究拠点等の支援を受けて実施された。

参考文献

- 1) Ishikawa, T., *et al.*, *Nat. Photon.*, **6**, 540–544 (2012)
- 2) Pérez, J. and Nishino, Y., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 670–678 (2012)
- 3) Kimura, T., *et al.*, *Nat. Comm.*, **5**, 3052 (2014)
- 4) Chapman, H.N., *et al.*, *Nature*, **470**, 73–77 (2011)
- 5) Seibert, M.M., *et al.*, *Nature*, **470**, 78–81 (2011)
- 6) Suzuki, K. and Hamada, M., in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edn. Vol.5*, eds. Goodfellow, M., *et al.*, pp.814–852, Springer, New York (2012)
- 7) Yumoto, H., *et al.*, *Nat. Photon.*, **7**, 43–47 (2013)
- 8) Song, C., *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, **47**, 188–197 (2014)
- 9) Kameshima, T., *Rev. Sci. Instrum.*, **85**, 033110 (2014)
- 10) 西野吉則, *Isotope News*, **594**, 2–5 (2003)
- 11) 西野吉則, 石川哲也, *放射光*, **19**, 3–14 (2006)
- 12) Russell Luke, D., *Inverse Problem*, **21**, 37–50 (2005)
- 13) Martin, A.V., *et al.*, *Opt. Express*, **20**, 16650–16661 (2012)
- 14) Marchesini, S., *et al.*, *Phys. Rev. B*, **68**, 140101 (2003)
- 15) Chapman, H.N., *et al.*, *J. Opt. Soc. Am. A*, **23**, 1179–1200 (2006)