

# 金コロイド粒子を利用した 非結晶生体試料の高分解能・高精度 コヒーレント X 線回折イメージング





高山裕貴 眞木さおり Takayama Yuki Maki-Yonekura Saori (理化学研究所)





**苙口 友隆 中追 雅由** Oroguchi Tomotaka Nakasako Masayoshi (慶應義塾大学理工学部物理学科,理化学研究所)



米倉 功治 Yonekura Koji (理化学研究所)

#### **1** はじめに

Bragg親子がX線回折による食塩の構造解 析でノーベル賞を受賞してからちょうど 100年 が経過し、X線結晶構造解析法は分子構造決定 の一大手法へと発展した。現在では、大きさ 数 nm から数十 nm のタンパク質のように, 巨 大かつ複雑な分子の構造決定にも広く利用され るようになっている。一方,細胞や細胞内小器 官に代表される結晶化が不可能な試料(非結晶 試料)の構造観察には、光学顕微鏡や電子顕微 鏡が用いられてきた。しかし、光学顕微鏡の分 解能は、可視光の波長 200 nm 程度に制限され る。また、電子線の透過力は高くなく、試料を 100 nm 以下の薄切片にしなければ、透過型電 子顕微鏡でその内部構造を調べることはできな い。このため、サブ µm から µm の大きさの非 結晶試料を、そのまま詳細に観察することは依 然として困難である。

1999年、サブ $\mu$ m から $\mu$ m の領域の非結晶試 料の構造解析がX線回折によって可能なことが 示された<sup>1)</sup>。コヒーレントX線回折イメージン グ(Coherent X-ray Diffraction Imaging: CXDI) 法と呼ばれるこの手法では、放射光科学の進展 により利用可能となった強力かつ空間干渉性 (コヒーレンス)の高いX線を非結晶試料に照 射して回折パターンを測定し、計算機上で試料 像を再構成する。そのため、レンズ収差なくX 線の短波長性と高い透過性を活かせ、電子顕微 鏡での観察が困難な厚い試料の内部構造を光学 顕微鏡より数桁高い分解能で解像できる。

真核細胞では、大きさ数百 nm から数 μm の 様々な細胞内小器官が数 nm スケールまでの複 雑な膜超構造を進化させ、生命現象の素過程を 担うタンパク質などの生体高分子群を適切に配 置して高度な細胞機能を実現している。細胞や 細胞内小器官の内部を"丸ごと"、広い空間ス ケールにわたって観察することで、生命現象の 物理化学的理解を大きく進めることができる。 この目的のため,筆者らのグループでは,技術 開発を進めながら CXDI 法による非結晶生体試 料のイメージングを展開してきた<sup>2-6)</sup>。

最近筆者らは,生体試料と同時に多数の金コ ロイド粒子をイメージングする新たな測定・解 析法を考案し,生体試料の構造を従来よりも2 倍以上高い分解能で,かつ信頼性高く再構成で きることを実際の実験に基づいた計算機実験に より示した<sup>71</sup>。本稿では,CXDI法の概要と金 粒子を利用した高分解能・高精度イメージング 法について紹介する。CXDI法の理論及び実験 の詳細は文献 4-6)を参照されたい。

## **2** CXDI 法の原理

CXDI 実験の模式図を図1に示す。X線は主 に物質中の電子と相互作用する。孤立した試料 に空間干渉性の高い,すなわち波面の揃ったX 線を入射すると,試料中の個々の電子によって 回折されたX線は互いに干渉し,試料中の電 子の密度分布を反映した特徴的な干渉縞(回折 パターン)を遠方に生じる。特に回折角が比較 的小さい範囲では,回折X線の振幅と波面(す なわち位相)は,X線入射方向に投影した電子 密度のフーリエ変換(構造因子と呼ぶ)を用い

図1 コヒーレントX線回折イメージング実験の模式図

 $\rho(\vec{r})$ 

て表せる<sup>8,9)</sup>。したがって,逆に回折 X 線の振幅と位相が回折角 2 $\theta$ まで得られれば,逆フーリエ変換によって試料の投影電子密度像を分解能 $\lambda/(2\sin\theta)$ ( $\lambda$ は X 線の波長)で再生することができる。

実験で直接観測される回折パターンは、回折 X線の振幅の2乗に比例した強度分布である。 X線と物質中の電子との相互作用は極めて小さ く、周期性を持たない非結晶試料では回折強度 は連続的に分布するので、得られるシグナルは 非常に弱い。そのため、CXDI法の実用化には 今日の第三世代放射光やX線自由電子レー ザー(XFEL)のような空間干渉性が高く高強 度なX線光源が必要であった。

CXDI 法のもう1つの課題は,測定において 試料像の再生に必要な位相の情報が失われてし まう,いわゆる位相問題の解決である。CXDI 法では,回折パターンを原理的な中心対称性を 考慮して試料像の画素数より2倍以上細かくサ ンプリング(オーバーサンプリング<sup>10)</sup>)して観 測する(図2)。これにより試料像再生に必要 な情報量を確保し,反復的位相回復法<sup>11)</sup>によ って回折パターンから直接位相情報を復元する ことができる。

反復的位相回復法は, 試料像の空間(実空間)と構造因子の空間(逆空間)をフーリエ変

換によって行き来しながら拘束条 件を課すことで位相を復元するア ルゴリズムである(図2)。乱数 により生成した投影電子密度像を 初期像とし,逆空間では構造因子 の振幅を観測値に置き換える。実 空間では試料領域(サポートと呼 ぶ)の外側の電子密度をゼロに漸 近させる拘束条件を課す。以上の 計算を数千から数万回繰り返すこ とで,収束解として試料投影電子 密度像が再生される。ただし,多 くの場合サポートは未知であるの で,Shrink-wrap法<sup>12</sup>と呼ばれる 補助アルゴリズムで推定する。 Shrink-wrap 法では,初期サポ ートを回折パターンのフーリエ 変換で得られる試料像の自己相 関数(パターソン関数)の概 形とする。さらに,位相回復計 算数百回ごとに試料像にローパ スフィルターを適用し,閾値以 上の電子密度領域を新たなサポ ートとして更新する。

## 3 非結晶生体試料への応用

筆者らのグループでは、水和 状態の生体試料を凍結し液体窒 素温度下でX線回折強度を測 定する低温CXDI法を開発 し<sup>2,3)</sup>,兵庫県西播磨地区の大 型放射光施設 SPring-8 や XFEL 施設 SACLA<sup>13,14)</sup> にて生体試料 のイメージング実験を実施して いる<sup>4-6)</sup>。急速凍結により、分裂 期の細胞などの生命現象の過渡 的な状態や単離した細胞内小器 官のような不安定な試料を機能 状態に固定することができる。 極低温下では 10<sup>-5</sup> Pa の真空中 であっても水和状態を保持でき るので、 周囲の余分な水を減ら

るので、周囲の余分な水を減ら した低バックグラウンドの回折パターンの測定 が可能である。また、この数年で利用可能とな った XFEL は、完全な空間干渉性を有する X 線パルスを光子数密度~ $10^{10}$ – $10^{11}$  photons/ $1.5 \times$  $1.5 \mu m^2$  (FWHM)、パルス幅~10 fsec で照射す ることを可能とし、1 回の照射により試料は原 子レベルで破壊されるが、放射線損傷が生じる 前の一瞬の構造を高分解能で観察することがで きる<sup>15)</sup>。

SACLA での低温 CXDI 実験では, 1 µm 前後 の生体試料から 20 nm より良い分解能まで回





Sx (µm-1)

折パターンが得られている<sup>4-6)</sup>。実験では検出 器保護のために設置されるビームストッパーや 検出器の飽和により,500から600 nm以上の 試料概形情報を有する極小回折角範囲の回折パ ターンは観測できないが<sup>4,6)</sup>,例えば原始紅藻 由来の葉緑体を分解能70 nm でイメージング することに成功している<sup>5)</sup>(図**3**)。

#### 4 金コロイド粒子を利用した高分解能・ 高信頼度イメージング

低温 CXDI 法により,厚い生体試料の機能状 態の構造をそのまま光学顕微鏡より高い分解能 でイメージングすることが可能となった。しか し,生体試料は軽元素で構成されるため,分解 能の更なる向上には,低い X線回折能が依然 として大きな障壁である。また,前述のように 実験では位相回復に重要な試料概形情報が得ら れないため,測定条件によっては安定に正しい 像が再生できないという問題があった。

これらの問題を同時に解決するために,筆者 らは生体試料と同時にX線回折能の高い多数 の金コロイド粒子をイメージングするという新 たな測定・解析法を考案した<sup>1)</sup>。新手法では, 図4(a)のように生体試料(べん毛を有するバ クテリア)の周りに多数の金粒子を散布し,X 線を照射する。このとき,生体試料と金粒子に それぞれ回折されたX線が干渉を起こす。金 粒子の単位体積当たりのX線回折能は生体試 料より10倍程度高いので,生体試料由来の回 折シグナルは測定可能レベルまで押し上げられ る。これにより,高分解能情報を有する大きな 回折角まで,生体試料のシグナルが観測可能と なる。SACLAでのCXDI実験に基づいてモデ ル試料から計算した回折パターン(図4(b-1)) では,バクテリアのみ(図4(b-2))に比べて 2倍以上の広い回折角で強い回折シグナルが 観測でき,各項の寄与を計算すると,金粒子に



図4 新手法の試料モデルと計算機実験で得られた回折バターン (a) モデル試料。(b-1) バクテリア+金粒子群,(b-2) バクテリアのみから計算した回折パターン。(c) 回折パターン実線上の理論回折強度プロファイル。寄与の小さいものから順に,バクテリア由来,濃灰実線;バクテリア・金粒子の干渉シグナル(絶対値),灰実線;金粒子由来,薄灰実線;全回折シグナル,黒破線。全回折シグナルの約8割が金粒子由来であり,両者のプロットはほぼ重なっている



図5 パターソン解析法による初期位相決定 (a) 新手法の回折パターンから計算した先鋭化パターソン関数。(b) パターソン 解析により導出した金粒子配置。(c)金粒子配置を拘束として再生した金粒子投 影電子密度像。青は金粒子配置を基に設定したサポートの外側

よってバクテリアの回折シグナルをお およそ1桁押し上げられることが確認 できた (図4( $\mathbf{c}$ ))。

新手法では全回折強度の大部分は 金粒子群からの寄与であることから (図4(c)), 金粒子群由来の構造因子 の位相は全体の位相の良い近似とな り、これを位相回復の初期値とするこ とで試料像再生の収束性を向上できる と考えられた。この原理は、X線結晶

構造解析法の位相決定に広く用いられる重原子 法に類似したものである。そこで, 筆者らは重 原子法で使用されるパターソン解析アルゴリズ ム<sup>16)</sup>を組み込んだ独自の解析ソフトウエアを 開発し、回折パターンから金粒子群の位相情報 を抽出して位相回復計算に利用する新たな試料 像再生法を構築した。

新手法の回折パターンには、個々の金粒子由 来の回折X線の干渉により金粒子間の相対位 置の情報が含まれており、パターソン関数(2 章)を描くことでこの情報を顕在化すること ができる。図5(a)は新手法の回折パターン (図4(b-1))から計算したパターソン関数を金 粒子が球形であることを利用して先鋭化したも ので、16個の金粒子に由来する16×15+1個 のピークが各粒子間の相対位置に現れている。

0.13

(a) バクテリアのみ(従来法) (b) バクテリア+金粒子群(新手法)



図6 従来法と新手法で再生した試料投影像の比較

これにパターソン解析アルゴリズムを適用して 金粒子の配置を導出し(図5(b)),位相回復 法の拘束条件に利用すると,金粒子群の構造因 子の位相を近似的に回復して投影像を再生する ことができた(図5( $\mathbf{c}$ ))。

こうして得られた金粒子投影像を初期モデル として再度位相回復計算を行うことで、分解 能13 nm で試料像を再生することに成功した (図 6)。従来法での分解能は 29 nm であり, 2 倍 以上の分解能向上を確認できた。また,新手法 で再生された投影電子密度像では、従来法では 困難な、金粒子の僅か1%の投影電子密度しか ないバクテリア細胞周囲のべん毛まで再現性良 く可視化できており(図6(b)),新手法の有効 性を示している。

## 5 今後の展望

筆者らは現在、金粒子を利用した高分解能・ 高信頼度 CXDI 法の実証実験を進めている。金 粒子は実際には個々に形状が異なる多面体であ るが、パターソン解析法を適用できることが、 SACLA で取得した金粒子集団からの回折パタ ーンの解析で確認できた<sup>17)</sup>。金粒子の配置によ っては試料像再生効率が従来法の約40倍に向 上する例もあり、パターソン解析法導入の効果 は大きい。多数粒子の同時イメージングはX線 回折能の増大により分解能向上が見込める<sup>18)</sup>。 測定も効率化されるので, 粒子形状分布などの 統計解析<sup>19,20)</sup> や多数の投影像からの3次元像 再構成<sup>18)</sup>に有効であろう。CXDI法が実用化さ れて約15年が経過したが、この研究で示した ように、これまで培われてきたX線結晶構造 解析法,電子顕微鏡法のような関連する技術を 取り入れながら独自の手法を開発していくこと で、その可能性は更に広がると期待できる。

#### 【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科研費 (No.25891033),理化学研究所基礎科学特別研 究員制度,理化学研究所戦略的研究展開事業 の援助を受けて実施されました。また、本研究 の着想を得た SACLA での低温 CXDI 実験は理 化学研究所放射光科学総合研究センター 山本 雅貴部長、慶應義塾大学大学院理工学研究科 関口優希氏、小林周氏、東京理科大学応用生物 学科 松永幸大教授、乾弥生博士、大阪大学大 学院工学研究科 高橋幸生准教授、鈴木明大氏、 高輝度光科学研究センター 登野健介博士、亀 島敬博士、城地保昌博士、犬伏雄一博士と共同 で, SACLA 利 用 研 究 課 題 (2012A8005, 2012A8010, 2012B8037, 2013A8043, 2013B8049) として実施されました。ここに感謝の意を表し ます。

#### 参考文献

- 1) Miao, J., et al., Nature, 400, 342-344 (1999)
- Takayama, Y. and Nakasako, M., *Rev. Sci. Instrum.*, 83, 054301 (2012)
- Nakasako, M., et al., Rev. Sci. Instrum., 84, 093705 (2013)
- 4) 中追雅由ら,日本結晶学会誌,56,27-35 (2014)
- Takayama, Y., et al., Plant Cell Physiol., 56, 1272– 1286 (2015)
- Oroguchi, T., et al., J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 48, 184003 (2015)
- 7) Takayama, Y., et al., Sci. Rep., 5, 8074 (2015)
- Born, M. and Wolf, E., 光学の原理Ⅱ第7版, 東 海大学出版会, 第8章(2006)
- Chapman, H.N., et al., J. Opt. Soc. Am. A, 23, 1179– 1200 (2006)
- 10) Miao, J., et al., Phys. Rev. B, 67, 174104 (2003)
- 11) Fienup, J.R., Appl. Opt., 15, 2758–2769 (1982)
- 12) Marchesini, S., et al., Phys. Rev. B, 68, 140101 (2003)
- 13) Ishikawa, T., et al., Nat. Photon., 6, 540-544 (2012)
- 14) 田中均, レーザー研究, 40, 666-674 (2012)
- 15) Hirata, K., et al., Nat. Methods, 11, 734-736 (2014)
- 16) Sheldrick, G.M., Methods in Enzymol., 276, 628– 641 (1997)
- 17)高山裕貴ら,第28回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム予稿集,12P048
  (2015)
- 18) Oroguchi, T. and Nakasako, M., Phys. Rev. E, 87, 022712 (2013)
- 19) Takahashi, Y., et al., Nano Lett., 13, 6028–6032 (2013)
- 20) Sekiguchi, Y., et al., J. Synchrotron Rad., 21, 600– 612 (2014)