トピックス

コヒーレントX線回折によるヒト染色体構造の
3次元観察前島一博¹, 西野吉則²¹国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター生体高分子研究室²理化学研究所放射光科学総合研究センター石川X線干渉光学研究室

1. はじめに

私たちが、あるタンパク質やその複合体の構造を知りたい場合、それらをまず結晶化しなくてはならない。そして結晶が運よく作製できたとすると、その結晶のX線回折パターンから、約1-2 Åの精度で構造を決定できる。それでは、たとえばヒト染色体や細胞核のような、もっと大きな構造を同じような精度で調べたい場合、どのようにすればよいのだろうか？このような形もサイズもヘテロな物体は、当然、結晶化しない。また、これらの物体はミクロンサイズであり、電子顕微鏡観察には厚すぎるため、非弾性散乱や多重散乱をおこして、明瞭なイメージを得ることが困難だろう。しかしながら、透過力に優れたX線を用いると、個々の細胞のみならず、レントゲン検査やX線CT (computed tomography) のように、私たちの体もイメージングできる。X線を用いて非結晶の物体をもイメージングし、構造解析できる技術、それが本稿で紹介する「X線回折顕微法 (XDM)」である¹⁾⁻³⁾。

2. X線回折顕微法 (XDM)

位相のそろったコヒーレントX線を結晶ではない一般の物体に照射すると、その回折パターンは、スペックルとよばれる斑点状になることが知られている (図1a)¹⁾⁻³⁾。このスペックルは、物体中のさまざまな位置で散乱されたX線の干渉効果によるものであり、照射されたX線の波が物体中でどのようにゆがめられるか、その位相差を反映している。このスペックル状のコヒーレントX線回折パターンは、物体の電子密度分布のフーリエ変換であり、通常の光学顕微鏡や透過電子顕微鏡では、「レンズ」がこのような回折パターンの逆フーリエ変換をおこなって、実像に戻している。

しかしながら、光学顕微鏡や透過電子顕微鏡とは異なり、波長1-2 ÅのX線を高解像度で結像できる性能のよいレンズは存在していない。このため、XDMではレンズの代わりに、計算によってコヒーレントX線回折パターンから実像に戻している。実際には、検出器で測定できる回折パターンは「強度」をあらわしており、その位相情報は欠落してしまっている。XDMでは、この位相情報を補うため、回折パターンを「オーバーサンプリング」とよばれる条件を満たす間隔で測定し、反復的位相回復法で位相情報を回復する。位相回復法の詳細については、西野らによる総説³⁾を参照してほしい。

1つの入射角度 (固定されたX線に対する物体の回転角度) で測定した回折パターンからは、物体の2次元の投影像が得られる。また、さまざまな入射角度で測定した多数の回折パターンを用いることにより、物体の3次元像が得られる。X線は透過性が高いため、観察した3次元像からは、物体の表面のみならず、内部構造に関する詳細な構造情報を得ることができる。これはいわば「ナノX線CT」とよべるであろう。

3. ヒト染色体のXDM測定

私たちはXDMの生物ターゲットとしてヒト染色体を選んだ。染色体は、細胞が分裂する際、複製されたゲノムの遺伝情報を2つの娘細胞に正確に分配するために必須な構造である⁴⁾。長さが合計2メートルにもおよぶヒトゲノムDNAは、細胞が分裂期に入ると短時間のうちに、23対の数ミクロンの大きさをもつ染色体に束ねられる。このような染色体の構造 (高次構造) や、その束ねられるメカニズムはいまだよくわかっていない。この染色体をヒト分裂期細胞から単離し、グルタルアルデヒドで化学固定し、Si₃N₄ 薄膜上に弱い遠心力で物理吸着させ、試料とした。この際、

Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-ray Diffraction

Kazuhiro MAESHIMA¹ and Yoshinori NISHINO²¹Structural Biology Center, National Institute of Genetics²RIKEN SPring-8 Center

図 1

(a) X線回折顕微鏡法(XDM)の模式図。コヒーレントX線はピンホール、2枚のガードスリットを通過し、ヒト染色体に照射される。直接光はビームストップで除去し、回折光をCCD検出器で測定する。回折パターンは斑点(スペックル)状になる。(b)(c)回折パターンの位相を回復して再構築したヒト染色体の2次元像。矢印(b)は高電子密度のセントロメア。(c)では直径200 nmほどの高電子密度領域が軸状に見える。(d)ヒト染色体の3次元像。文献2より改変。

X線ビームが単一の染色体に照射されるようにするのがポイントである(図1a)。

実験では、大型放射光施設 SPring-8 のアンジュレータービームライン BL29XUL のコヒーレントX線(5 keV)を用いた。測定配置は図1aの通りである。得られた回折パターンに「反復的位相回復法」を適用して、ヒト染色体の2次元像を得た(図1b, c)²⁾。さらに私たちは、入射角-70度から70度までの38枚の独立した回折データを取得し、ヒト染色体の3次元像の再構成にも成功した(図1d)²⁾。波長が短くエネルギーの高い硬X線を用いて、染色体などの細胞小器官を丸ごと高いコントラストで3次元観察することに成功したのは世界ではじめてである。

4. XDMによるヒト染色体イメージング

測定によって得たヒト染色体イメージから、染色体のいくつかの興味深い内部構造が明らかになった。た

とえば、染色体は2つの姉妹染色分体から構成されるが、分体どうしが接合するセントロメアとよばれる領域で、もっとも電子密度が高いことが見いだされた(図1b)²⁾。また、染色体の軸付近に電子密度の高い構造が広がっていることなどがわかった(図1c)²⁾。このような軸状構造は、これまで、特定のタンパク質を標識し、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いて観察されてきたが⁴⁾、標識せずに観察できたのは今回がはじめてである。

5. 今後の期待

現在のところ、私たちのXDMの解像度は2次元で38 nm、3次元で120 nmにすぎない²⁾。このため、XDMを用いて、十分に新しい生物学的発見をもたらしていないのが現状である。しかしながら、XDMの優れているところは、その解像度の物理的な限界が照射光の波長のみに依存することである。もちろん、生物試料を用いる限り、試料の放射線損傷を考慮してはならない。しかし、試料損傷が起きる時間スケールよりも短い時間幅をもつ強いX線を用いれば、X線結晶構造解析で得られるような原子レベルの情報を得ることも不可能ではないだろう。理研が建設を進めているX線自由電子レーザー⁵⁾などの次世代X線光源を利用することにより、XDMの飛躍的な発展が期待される。また、本研究の測定は真空中でおこなわれたが、より「生きた状態」に近い生物試料の観察も必須である。近年、生物試料を急速凍結し、極低温下で観察するクライオ電子顕微鏡がさかんに用いられるようになった。極低温下での観察は、試料損傷も緩和できる。このため、私たちはXDMのためのクライオ装置を製作し、極低温下での凍結ヒト染色体の測定を試みている。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、理研・石川哲也主任研究員・今本尚子主任研究員、大阪大学・高橋幸生講師との共同研究です。深く感謝いたします。

文 献

- 1) Miao, J. *et al.* (1999) *Nature* **400**, 342.
- 2) Nishino, Y. *et al.* (2009) *Phys. Rev. Lett.* **102**, 018101.
- 3) 西野吉則, 石川哲也 (2006) 放射光 **1**, 3-14.
- 4) Maeshima, K. and Eltsov, M. (2008) *J. Biochem.* **143**, 145-153.
- 5) 新竹 積, 石川哲也 (2009) 物理学会誌 **64**, 160.

前島一博

前島一博（まえしま かずひろ）

国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター生体高分子研究室教授

1999 年大阪大学大学院医学研究科博士課程修了，同年から 2004 年までスイス・ジュネーブ大学・研究員。理化学研究所・今本細胞核機能研究室を経て，09 年 4 月から現職。

研究内容：ゲノムが納められている細胞核の構築と細胞核や分裂期染色体でゲノムクロマチンがどのように折りたたまれているのか？（大学院生，ポスドク募集中）

連絡先：〒 411-8540 静岡県三島市谷田 1111

E-mail: kmaeshim@lab.nig.ac.jp

URL: <http://www.nig.ac.jp/section/maeshima/maeshima-j.html>

西野吉則（にし の よしのり）

理化学研究所放射光科学総合研究センター石川 X 線干涉光学研究室専任研究員

1996 年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了，同年 -2001 年高輝度光科学研究センター，1998 年 -2000 年ドイツ電子シンクロトロン（DESY）客員研究員。01 年より理化学研究所，08 年より現職。

研究内容：X 線光学

E-mail: nishino@spring8.or.jp