コヒーレント X 線回折によるナノ構造解析

理化学研究所・放射光科学総合研究センター 西野吉則

Yoshinori NISHINO: Nanostructure Analysis using Coherent X-ray Diffraction

X-ray crystallography can routinely determine the atomic structure of crystalline materials. The method can be extended to non-crystalline materials by using coherent X-ray diffraction. In X-ray diffraction microscopy, coherent X-ray diffraction patterns are sampled finely enough to satisfy the oversampling condition for solving the phase problem, and the iterative phase retrieval method is used for the sample image reconstruction. Recently, we succeeded in three-dimensional visualization of an unstained human chromosome by X-ray diffraction microscopy. It is the first hard X-ray tomography for cellular organelles. The reconstructed images revealed the internal axial structure, demonstrating an excellent image-contrast of the method.

1. はじめに

X 線結晶構造解析では、波長の短い X 線の回折現象を利用して、原子分解能での構造解析を行っている。それでは、結晶以外の試料に対して、X 線を用いた原子構造解析は可能であろうか？ この可能性を開く手法が、コヒーレント X 線回折を利用した X 線回折顕微鏡法である (図 1)^{1),2)} この新型の X 線顕微鏡は、レンズを必要としないため、従来の X 線顕微鏡において、レンズの性能によって制限されてきた、分解能や試料の厚み (被写界深度) の問題が解消できる。これにより、透過電子顕微鏡などでは困難であった、マイクロメートル以上の厚さをもつ大きな試料に対しても、丸ごと非破壊で、三次元構造解析を行うことが可能となる。

2008 年に大阪で開かれた第 21 回国際結晶学連合会議 (IUCr2008) において、David Sayre 博士が Ewald 賞を受賞

した。彼は、直接法における Sayre の式を提案するなど、X 線結晶構造解析に多大な功績を残してきたパイオニアであるが、Ewald 賞の受賞理由は、これら X 線結晶構造解析に対する貢献のみではなかった。Sayre は、結晶に対して原子構造解析が可能のように、結晶以外の試料に対しても同様のことが行えるはずだとの確信のもと、半世紀以上の長きにわたり研究を続け、X 線回折顕微鏡法の礎を築いた。Ewald 賞の受賞は、これら幅広い業績に対するものであった。

Sayre は、今から 50 年以上前の 1952 年に、中心対称な構造をもつ結晶に対しては、回折強度を逆格子点の間隔よりも 2 倍以上細かく測定することによって、サンプリング定理に基づく位相回復が可能であることを指摘した。³⁾ サンプリング定理とは、連続的に変化する信号を、細かい間隔でサンプリングした離散的なデータから完全に復元する数学の定理である。今の場合、「連続的に変化する信号」

図 1 コヒーレント X 線回折。(Coherent X-ray diffraction.) 微小な試料に、波面の揃ったコヒーレント X 線を照射した際に観測される。コヒーレント X 線回折データからは、試料構造を三次元的に再構成できる。測定配置には、(a) 透過配置と (b) 反射配置があり、それぞれ異なった構造情報を与える。

図2 さまざまなサイズの結晶による回折パターン。(Diffraction patterns from crystals with various sizes.) 結晶がコヒーレント照明された場合の回折パターンは、単位胞構造因子の絶対値の2乗(最も左の図に対応)とLaue関数(結晶の周期性や外形を反映)の積で与えられる。結晶のサイズが小さくなると、連続的にスペckルが分布した回折パターンが得られる。結晶サイズが大きい場合、回折強度は逆格子点に集中し、回折パターンは離散的になる。透過配置のコヒーレントX線回折では、結晶以外の試料も扱うことができる。

とは、電子密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ のFourier変換で定義される構造因子 $F(\mathbf{K})$

$$F(\mathbf{K}) = \int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}} \quad (1)$$

の絶対値の2乗に比例するX線回折強度であり、これは散乱ベクトル $\mathbf{K}$ の連続関数である。X線回折実験では、このX線回折強度を、X線二次元検出器を用いて、離散的な検出器のピクセル位置でサンプリングする。

結晶に対するX線回折実験では、通常、離散的な格子点でのみ回折強度が測定でき、格子点以外では回折強度は弱すぎて測定ができない。このため、Sayreが提案した、サンプリング定理に基づく位相回復は、結晶に対しては一般には困難である。しかし、試料が結晶でない場合やナノ結晶の場合には状況は一変する。このような試料に対しては、図2に示すように、X線回折パターンは、たくさんの斑点(スペckル)が連続的に分布する(スペckルパターン)。このため、小さなピクセルサイズの(角度分解能の良い)X線二次元検出器を用いることにより、サンプリング定理で要求される逆空間の細かい間隔での回折強度測定が可能となる。X線回折顕微法では、このように細かい間隔で測定された回折強度から、位相回復を行い、試料構造を再構成する。

Sayreは、1980年代から、Janos Kirzを中心とするStony Brook大学のX線光学・顕微法グループと共同で、アメリカの放射光施設NSLS(National Synchrotron Light Source)において、細胞など結晶性をもたない試料に対するコヒーレント回折実験を行ってきた。そして、長年の研究が実り、1999年にX線回折顕微法の最初の実験が、当時、博士課程の学生だったJianwei Miaoらによって発表された。⁴⁾

コヒーレントX線回折を利用した測定配置には、透過

配置(図1a)と、ナノ結晶のBragg反射を利用する反射配置(図1b)がある。透過配置では、前方小角領域でのX線回折パターンから、結晶構造解析と同様に、電子密度分布が得られる。また、Ian Robinsonらによって提案されたように、ナノ結晶に対する逆格子点近傍のスペckル状の回折パターンからは、結晶の歪み場分布を得ることもできる。^{5),6)}

1つの入射角でのX線回折測定では、Ewald球上の回折強度が得られる。回折パターンの測定範囲が小さな立体角領域に限られ、Ewald球が平面とみなせる場合には、再構成像は試料の二次元投影とみなせる。また、さまざまな入射角で回折測定することにより、逆空間の三次元領域での回折強度分布データが取得でき、試料の三次元構造が得られる。^{7),8)}

本稿では、X線回折顕微法の概要と、この手法を用いた最近のトピックスある、われわれが行ったヒト染色体の三次元観察⁹⁾について報告する。

2. X線回折顕微法

2.1 コヒーレントX線回折

X線回折顕微法におけるX線回折実験では、試料全体がコヒーレントX線によって照射されなければならない(コヒーレントX線回折)。現状では、部分的にコヒーレントなアンジュレータ放射光が用いられるが、試料サイズは照射X線のコヒーレンス領域よりも小さい条件下で実験が行われている。このため、試料中のあらゆる電子によって弾性散乱したX線は干渉し、きれいなスペckルパターンが観測できる。

一方、X線結晶構造解析における、X線回折実験では、一般に、照射X線は完全にはコヒーレントではない。このた

図3 回折パターンのオーバーサンプリング。(Oversampling of a diffraction pattern.) 回折パターンをオーバーサンプリングすることは、位相回復の必要条件である。

め、試料中の離れた位置にある単位胞によって弾性散乱した X 線は干渉しない。しかし、試料構造の空間的周期性のため、コヒーレンス領域が単位胞よりも十分大きければ、X 線回折実験を行うことができる。ただし、コヒーレンス領域が限られているため、X 線結晶構造解析法で得られる情報は、膨大な数の単位胞にわたる平均構造である。一方、コヒーレント X 線を用いる X 線回折顕微法では、空間平均ではない、ありのままの全構造を観察することができる。

2.2 オーバーサンプリング

X 線回折顕微法では、前述のように、回折強度を逆空間の細かい間隔で測定する。測定間隔の条件はオーバーサンプリング条件¹⁰⁾と呼ばれ、位相回復の必要条件である。具体的には、二次元像再構成を行う場合、コヒーレント回折パターンを測定する二次元検出器のピクセルサイズは、スペックルサイズの半分以下でなければならない。図3に示すように、オーバーサンプリング条件は、実空間では試料の周りに散乱体(電子)がないことに相当する。このため、オーバーサンプリング条件を単純に満たすためには、微小サイズの孤立した試料が必要となる。大きな試料に対して測定を行うには、試料前にピンホール¹¹⁾や集光光学系^{12),13)}を置くなどして、照射領域を制限し、オーバーサンプリング条件を満たすことができる。

図4 反復的位相回復法。(Iterative phase retrieval method.) コヒーレント X 線回折データに、反復的位相回復法を適用することにより、試料構造を再構成できる。

2.3 反復的位相回復法

X 線回折顕微法では、コヒーレント X 線回折データからの位相回復に反復法を用いる。¹⁴⁾ 図4に反復的位相回復法の概念図を示す。この方法は、X 線結晶構造解析において、位相改良法として用いられる溶媒平滑化法と非常に似ている。反復的位相回復法では、ランダムな電子密度分布から出発し、Fourier 変換と逆 Fourier 変換を繰り返す。そして、各反復において、実空間および逆空間で既知の情報を補っていく。

まず、逆空間では、既知情報として X 線回折強度データを用いる。回折波の位相については、実験的に得られないため、各反復における計算値をそのまま用いる。実空間では、試料が存在するであろうと推定される領域(サポート)の外では電子密度がゼロであることや、物理的に電子密度が非負であることなどを拘束条件として課することができる。ここで、サポート領域は、スペックルのサイズが試料サイズに反比例するため、典型的なスペックルサイズから推定することができる。実空間での拘束条件の課し方には、さまざまな流儀があるが、James Fienup により提案された HIO (hybrid input-output) アルゴリズムが広く用いられている。¹⁵⁾

X 線回折顕微法研究の初期においては、回折実験において回折パターンの中心部にビームストップの影となるデータ欠如領域が不可避免的に存在することが大きな問題であった。このため、試料像は X 線回折強度分布データのみから再構成できず、試料の概形を与える補足的なデータが必要であった。しかしその後、データ欠如領域を小さくする実験装置上の改良に加えて、データ解析において、われわれが提案した反復的に電子密度分布を規格化する手法¹⁶⁾や、反復的にサポートを改良する手法¹⁷⁾が開発されて、現在では、X 線回折データのみから試料像が再構成できるようになった。

3. ヒト染色体の三次元観察

X 線の高い透過性は、試料が機能する自然な状態でのイ

図5 コヒーレントな入射波が、試料によって弾性散乱されて起こる位相シフト。(Phase shift occurring by the elastic scattering of illuminating coherent wave from the sample.) 位相シフトを可視化することにより、入射波を完全に透過する透明な物体(位相物体)に対しても、内部構造を観察することができる。

メージングを可能とする重要な特徴である。この特徴を活かすことで、X線回折顕微法の応用が広がる。生物学への応用では、細胞や細胞小器官の、生きているに近い状態での観察が大きな目標に挙げられる。この分野では、クライオ電顕が現在最も有力な手法であるが、500 nmを超す厚い細胞小器官や細胞を、丸ごとイメージングするには、透過能の優れたX線が有利である。¹⁸⁾

X線レンズを用いた通常の明視野の顕微鏡では、X線の高い透過性は諸刃の剣である。マイクロメートルサイズの無染色の生体試料は、X線をほぼ完全に透過してしまうため、吸収によるコントラストが得られず、内部構造を観察することは困難である。これに対し、X線回折顕微法ではコヒーレントX線回折を利用することによって、試料によるX線の波の位相シフト(図5)を高感度で検知することができ、無染色の生体試料のような透明な試料の内部構造も、高いコントラストで観察することができる。試料に重い金属元素を導入することによって、試料像の吸収コントラストを人為的に高める染色処理を施すこともできるが、特定の構造しか見ることができないという弊害がある。このため、X線回折顕微法が可能とする、無染色の生体試料のX線位相コントラストイメージングは重要である。

X線回折顕微法の世界初の生物学応用は、SPRING-8のBL29XULでわれわれが行った大腸菌の二次元観察である。¹⁹⁾ 試料の大腸菌は、散乱強度を増すために、マンガン酸化物で染色されていた。無染色の生体試料に関しては、その後、アメリカの放射光施設ALS (Advanced Light Source) で酵母菌の観察²⁰⁾ が行われたほか、日本のSPRING-8で魚の骨²¹⁾ やウイルス²²⁾ の観察が行われている。

最近になって、われわれは、硬X線による細胞小器官の三次元観察に世界で初めて成功した。⁹⁾ 試料には無染色のヒト染色体が用いられた。染色体は遺伝情報を担う生物学的に重要な細胞小器官である。細胞分裂の際には、DNAが複製され、2つの娘細胞に分配されることにより、遺伝情

図6 X線回折顕微鏡装置。(X-ray diffraction microscope instrument.) SPRING-8のBL29XULのアンジュレーター放射光を用いた。

報が継承される。DNAやヌクレオソームなど、染色体の分子レベルでの構造は、X線結晶構造解析や電子顕微鏡により調べることができる。しかし、より大きなサイズの高次構造に関しては、これまで観察をする有効な手段がなく、よくわかっていない。われわれは、ヒト染色体の高次構造を調べるため、X線回折顕微法での測定を行った。

実験は、図6に示すX線回折顕微鏡装置²³⁾ を用いて、SPRING-8のBL29XULで行われた。分裂期のヒト染色体を単離し、5 keVのアンジュレーター放射光を照射した。試料の大きさは2 μm 程度であり、照射X線のコヒーレンス領域よりも小さい。このため、試料はコヒーレント照明されている。試料の1 mほど上流には直径20 μm のピンホールを置き、1つのヒト染色体のみが照明されるよう照射領域を制限した。なお、試料は、X線の散乱がほぼ無視できる100 nm厚の窒化シリコン膜上にまばらに分散されている。これにより、微小試料の周りに散乱体がないという、オーバーサンプリング条件を満たした。コヒーレントX線回折パターンは、試料の1.32 m下流に置いた直接検出型X線CCD検出器で測定した。装置全体は、空気散乱の影響を避けるため、真空中に設置した。

図7に測定された、ヒト染色体のコヒーレント回折パターンを示す。このコヒーレント回折データに対し、前述の反復的位相回復法を適用することにより、図8に示す二次元投影像を再構成した。再構成された二次元投影像には、4つの腕をもつ染色体が、はっきりと見える。また、興味深いことに、染色体の中心軸付近には、密度の高い領域が広がっていた。さらに、この密度の高い軸状構造を詳しく観察すると、波状にうねっていることがわかった。蛍光顕微鏡で、染色体の軸付近に存在するタンパク質を蛍光標識すると、らせん状の構造が観察されることが知られており、²⁴⁾ 今回観察された波状の構造との強い相関を示している。染色体の軸状構造の観察は、染色や標識の処理をしない状態では初めてであり、X線回折顕微法が無染色の生物試料を、高いコントラストで観測するのに優れていることが示された。

図7 単離した無染色のヒト染色体からのコヒーレントX線回折パターン。(Coherent X-ray diffraction pattern from an isolated unstained human chromosome.)

構造を強調するため右図とは異なる配色を使用

図8 コヒーレントX線回折データから再構成されたヒト染色体の二次元投影像。(Two-dimensional projection images of a human chromosome reconstructed from the coherent X-ray diffraction data.) 中心軸付近に波状にうねった密度の高い構造が見える。

三次元像再生を行うため、試料を回転させ、 -70° から 60° までの範囲の入射角で、38 枚のコヒーレント回折パターンを測定した。この三次元のコヒーレント回折データに対し、三次元 Fourier 変換を用いた反復的位相回復法を適用することにより、ヒト染色体の三次元像を再構成した(図9)。X線の高い透過性のため、試料表面のみならず、試料の任意の断面を切り出して内部構造を観察できる。三次元像の解析から、最も電子密度が高い位置は、2つの染色分体が結合する、セントロメア付近(図9中の白矢印)であることがわかった。また、三次元像においても、染色体の中心軸付近に、高い電子密度をもつ構造が観察された。これにより、細胞小器官に対する硬X線CT撮影が、世界で初めて実現した。

図9 コヒーレントX線回折データから再構成されたヒト染色体の三次元像。(Three-dimensional images of a human chromosome reconstructed from the coherent X-ray diffraction data.) 白矢印は、1対の染色分体が結合するセントロメア付近の、最も電子密度の高い位置を示す。

4. おわりに

ヒト染色体の観察における分解能は、二次元投影像においては 38 nm、三次元像においては 120 nm と限られている。三次元像における分解能の低下は、試料の放射線損傷によるものと考えられる。放射線損傷は、生体試料をクライオ凍結することによって緩和でき、X線回折顕微法の三次元観察において、10 nmの分解能が達成可能と試算されている²⁵⁾。また、X線回折顕微法におけるこれまでの生体試料観察においては、試料は乾燥状態にあった。生きている状態により近く、放射線損傷を受けにくい、凍結水和状態での生体試料の観察が今後の課題である。

さらに、現在、日米欧で開発が進められているX線自由電子レーザーを用いると、その超短パルス性能により、試料構造が破壊される前にコヒーレントX線回折測定を行う可能性が開ける^{26),27)}。例えば、生体分子試料のコピーを、次々とX線自由電子レーザーに照射することにより、三次元原子構造解析を行うというシナリオが議論されている。この方法により、生物・医学上重要であるが、結晶化が困難な膜タンパク質の原子構造解析への可能性が開かれると期待されている。

また、同じ構造をもつコピーが存在しない細胞や細胞小器官に対しては、X線自由電子レーザーを分け、いくつかの方向から同時に試料に照射することによって、入射角が

異なるコヒーレント X 線回折パターンを同時測定するアイデアが Sayre らによって提案されている。²⁸⁾ これにより、放射線損傷の影響を受けず、細胞などの試料を立体的に観察することが可能となる。X 線自由電子レーザーの登場により、Sayre が長年思い描いてきた、結晶以外の試料に対する、X 線による原子構造解析へさらに一歩近づく。

ヒト染色体の X 線回折顕微鏡観察は、理研・基幹研究所の、前島一博（現在、国立遺伝学研究所）、今本尚子、および、理研・放射光科学総合研究センターの高橋幸生（大阪大学特任講師）、石川哲也（敬称略）との共同研究である。本研究は科研費および X 線自由電子レーザー利用推進研究課題の助成を受けたものである。

文 献

- 1) 西野吉則, 石川哲也: 放射光 **19**, 3 (2006).
- 2) 西野吉則: 顕微鏡 **44**, 24 (2009).
- 3) D. Sayre: *Acta Crystallogr.* **5**, 843 (1952).
- 4) J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz and D. Sayre: *Nature* **400**, 342 (1999).
- 5) I. K. Robinson, I. A. Vartanyants, G. J. Williams, M. A. Pfeifer and J. A. Pitney: *Phys. Rev. Lett.* **87**, 195505 (2001).
- 6) M. A. Pfeifer, G. J. Williams, I. A. Vartanyants, R. Harder and I. K. Robinson: *Nature* **442**, 63 (2006).
- 7) J. Miao, T. Ishikawa, B. Johnson, E. H. Anderson, B. Lai and K. O. Hodgson: *Phys. Rev. Lett.* **89**, 088303 (2002).
- 8) G. J. Williams, M. A. Pfeifer, I. A. Vartanyants and I. K. Robinson: *Phys. Rev. Lett.* **90**, 175501 (2003).
- 9) Y. Nishino, Y. Takahashi, N. Imamoto, T. Ishikawa and K. Maeshima: *Phys. Rev. Lett.* **102**, 018101 (2009). また、この研究内容は *Nature* **457**, 238 (2009) や *Physics Today* **62** [2], 20 (2009) などで紹介された。
- 10) J. Miao, D. Sayre and H. N. Chapman: *J. Opt. Soc. Am. A* **15**, 1662 (1998).
- 11) J. M. Rodenburg *et al.*: *Phys. Rev. Lett.* **98**, 034801 (2007).
- 12) B. Abbey *et al.*: *Nature Physics* **4**, 394 (2008).
- 13) P. Thibault *et al.*: *Science* **321**, 379 (2008).
- 14) R. W. Gerchberg and W. O. Saxton: *Optik* **34**, 275 (1971).
- 15) J. R. Fienup: *Appl. Opt.* **21**, 2758 (1982).
- 16) Y. Nishino, J. Miao and T. Ishikawa: *Phys. Rev. B* **68**, 220101(R) (2003).
- 17) S. Marchesini *et al.*: *Phys. Rev. B* **68**, 140101 (2003).
- 18) R. Henderson: *Q. Rev. Biophys.* **28**, 171 (1995).
- 19) J. Miao, K. O. Hodgson, T. Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros and Y. Nishino: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 110 (2003).
- 20) D. Shapiro *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15343 (2005).
- 21) H. Jiang *et al.*: *Phys. Rev. Lett.* **100**, 038103 (2008).
- 22) C. Song *et al.*: *Phys. Rev. Lett.* **101**, 158101 (2008).
- 23) Y. Nishino *et al.*: *IPAP Conference Series* **7**, 414 (2006).
- 24) E. Boy de la Tour, U. K. Laemmler: *Cell* **55**, 937 (1988).
- 25) S. Marchesini *et al.*: *Opt. Express* **11**, 2344 (2003).
- 26) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert and J. Hajdu: *Nature* **406**, 752 (2000).
- 27) H. N. Chapman *et al.*: *Nature Phys.* **2**, 839 (2006).
- 28) D. Sayre: *Acta Crystallogr. A* **64**, 33 (2008).

プロフィール

西野吉則 Yoshinori NISHINO
理化学研究所放射光科学総合研究センター専任研究員
RIKEN SPring-8 Center
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1 丁目 1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: nishino@spring8.or.jp
最終学歴：1996 年大阪大学大学院理学研究科物理学専攻博士後期課程修了
専門分野：X 線光学
現在の研究テーマ：放射光や自由電子レーザーを用いた時空間イメージング