

コヒーレント X 線回折イメージング構造解析理論の開発と展望

中迫雅由^{1,2}, 笠口友隆^{1,2}, 高山裕貴^{1,2}, 小林 周^{1,2},
児玉 渉¹, 坂本啓太¹, 吉留 崇³, 池口満徳³

¹慶應義塾大学理工学部物理学科 〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

²理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター基盤研究部 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

³横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-29

要旨

コヒーレント X 線回折イメージングは、結晶化が原理的に不可能な非結晶粒子の立体構造解析に有効な手法であり、回折パターンから得られる構造振幅のみから粒子の投影構造、トモグラフィ実験によって三次元電子密度を再構成できる。本稿では、これまでに提案されたコヒーレント X 線回折イメージング特有の構造解析を振り返る。また、動き始めた XFEL 施設での将来の実験に向けて、新たに考案した溶媒包埋粒子の構造解析プロトコルの概要を示しながら、今後解決すべき諸問題を検討した。

1. はじめに

ノーベル化学賞は、2003年以降3年周期で、特別に重要な働きを持つ生体高分子の構造解析に授与されている。このことは、X線構造解析が“結晶化可能な分子”の原子解像度での立体構造解析に大きく貢献していることを反映している。一方で、基礎科学分野や材料科学分野で発見あるいは創生された、“結晶化不可能な分子や粒子”が多数存在する。生命科学での例を挙げると、細胞核中にどのような形態でDNAが格納されているのかを高分解能で可視化した例が無い場合、細胞分裂期の染色体形成メカニズムは依然として不明である。

近年、高輝度 X 線光源を用いるコヒーレント X 線回折イメージング法 (Coherent X-ray Diffraction Imaging: CXDI)¹⁻³による非結晶粒子の構造解析に期待が持てる状況になってきた。CXDIでは、高空間コヒーレンス X 線を孤立試料粒子に照射して高空間分解能検出器で回折パターンを記録し、反復位相回復法⁴)を用いて、観測構造振幅のみから粒子の入射 X 線方向への投影電子密度を再生する (Fig. 1)。高空間コヒーレンス X 線ビームが供給可能な放射光施設では、ナノ材料や生体内粒子などの構造研究に適用され始めている⁵⁻⁸)。CXDIでは、電子顕微鏡で問題となるレンズ収差に煩わされることなく、短波長 X 線の透過性によって、電子顕微鏡の適用範囲を超えた厚みのある粒子の内部構造を、光学顕微鏡では到達不可能な解像度で可視化できる。例えば、電子顕微鏡による細胞切片観察が細胞やオルガネラなどの多階層性機能空間の構造研

究に用いられてきたが、CXDIではそれらを丸ごと観察することが期待されている。

本稿では、これまでの CXDI 構造解析の原理を纏めるとともに、X線自由電子レーザー (X-ray Free Electron Laser: XFEL) を用いた CXDI 構造解析プロトコル開発の現状を紹介しながら、将来的な発展を俯瞰する。

2. 孤立粒子からの X 線回折強度

Maxwell 方程式を縦横に使いこなしている学会誌読者には失礼かと思いつつも、古典電子半径などを度外視した構造生物学者からの奇妙な提案⁹)を見るにつけ、敢えて X 線の弾性散乱について簡単に纏めることにした。

Liénar-Wiechert ポテンシャル¹⁰)に従えば、外部から入射する X 線電場が電子を振動運動させると、電子からは入射 X 線と同波長の双極子放射が生じ、X 線“散乱”が観測される。平面波 X 線を物質に照射すると、あちらこちらの電子から“散乱波”が生じ、Maxwell 方程式の線形性が保証する“足し合わせ”によって、電子分布に起因する干渉縞が観測される。波長 λ で入射強度 I_{incident} の X 線を、入射方向から見た最大サイズ A の粒子に照射する場合を考える。入射伝播ベクトル \vec{k}_0 と観測方向伝播ベクトル \vec{k} で定義される散乱ベクトル \vec{S} ($\vec{S} = (\vec{k} - \vec{k}_0)/2\pi$, $|\vec{S}| = 2 \sin \theta/\lambda$) での X 線強度 $I(\vec{S})$ は、Fraunhofer 近似¹¹)で、X 線照射域の電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ の Fourier 変換 (FT) である構造因子 $F(\vec{S})$ とその複素共役の積で表わされる。

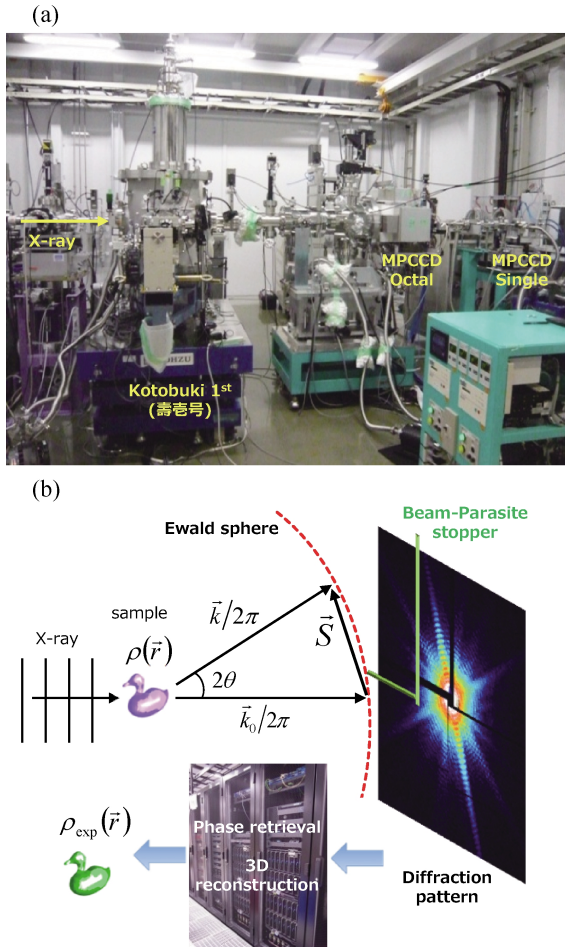


Fig. 1 (color online) (a) Photograph of apparatuses for cryogenic CXDI experiment at BL3 of SACLA²⁰. (b) Schematic illustration of CXDI experiment and analysis. The CXDI pattern from a cluster of 250 nm Au-colloid was recorded by a 10-fs pulse.

$$I(\vec{S}) = I_{\text{incident}} r_e^2 \left(\frac{\lambda}{\sigma_1 A} \right)^2 F(\vec{S}) * F(\vec{S})$$

$$F(\vec{S}) = \int \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{S} \cdot \vec{r}) d^3 r = |F(\vec{S})| \exp[i\alpha(\vec{S})] \quad (2-1)$$

ここで、 σ_1 は後述する一次元のオーバーサンプリング比と呼ばれるパラメータ、 r_e は古典電子半径 ($2.8179 \times 10^{-15} \text{ m}$)¹⁰ である。構造因子 $F(\vec{S})$ の大きさ $|F(\vec{S})|$ を構造振幅、偏角 $\alpha(\vec{S})$ を位相と呼ぶ。 $\alpha(\vec{S})$ は回折強度パターンから失われるが、物質内電子密度分布に依存して干渉パターンの幅や強さを決定する。構造因子の逆 Fourier 変換 (IFT) によって電子密度分布を再現するには、位相を推定する必要がある、X 線構造解析における位相問題と呼ぶ¹²。

実験を行う上で大変重要な二点に注意すべきである。第一に、入射 X 線電場によって生じる電子からの X 線“散乱”の確率 (散乱断面積) は、古典電子半径 r_e の自乗に比例して極めて小さい。第二に、弾性散乱では入射と散乱

伝播ベクトルの大きさが変化しないため、観測される回折パターンは逆空間の半径 $1/\lambda$ の反射球 (Ewald 球) と交差する強度に限定される (Fig. 1(b))¹²。小さな散乱断面積の克服には超高輝度 X 線を用いる。単色 X 線実験で第二の点に対応するには、試料を回転して Ewald 球と逆空間強度分布の交差を変化させ、回折強度データを収集する。

3. CXDI における位相回復

3.1 回折パターンと情報量

投影定理によれば、三次元電子密度の投影像の二次元 FT は、電子密度の三次元 FT における原点を通過する一断面となる。

$$F(S_x, S_y, S_z=0) = \int_{x,y} \rho_P(x,y) \exp[2\pi i(S_x x + S_y y)] dx dy$$

$$\rho_P(x,y) = \int_z \rho(x,y,z) dy dz \quad (3-1)$$

よって、逆空間原点を通り、入射伝播ベクトル \vec{k}_0 に垂直な平面の構造振幅 $|F(S_x, S_y, S_z=0)|$ は、試料粒子内電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ を z 方向に投影した $\rho_P(x,y)$ の FT の絶対値となる¹³。以下では、この投影定理を仮定して議論を簡単にするため、Ewald 球を平面に近似する。これは回折角が小さいか、波長が短い場合に対応する。

粒子の投影電子密度 $\rho_P(x,y)$ を $N_x \times N_y$ ピクセル解像度で再現する場合を考える。観測した回折パターン上の $(S_x, S_y, S_z=0)$ ピクセルでの構造振幅は

$$|F_{\text{OBS}}(S_x, S_y, S_z=0)| = \left| \sum_{x=0}^{N_x-1} \sum_{y=0}^{N_y-1} \rho_P(x,y) \exp \left[2\pi i \left(S_x \frac{x}{N_x} + S_y \frac{y}{N_y} \right) \right] \Delta x \Delta y \right| \quad (3-2)$$

で与えられる。ここで、 $\Delta x \Delta y$ は逆空間面積素片である。今、構造振幅 $|F_{\text{OBS}}(S_x, S_y, S_z=0)|$ を $N_x \times N_y$ ピクセルで得る場合、回折強度分布の中心対称性 (Friedel 則、 $I(S_x, S_y) = I(-S_x, -S_y)$)¹² のために、方程式数は投影図再現に必要な数の半分 ($N_x \times N_y / 2$) となって、 $\rho_P(x,y)$ が求まらない (Fig. 2(a))。一方、回折パターンを、 x 方向に σ_x ($\sigma_x > 1$) 倍かつ S_y 方向に細 σ_y ($\sigma_y > 1$) 倍と細かくサンプルして測定する場合 (Fig. 2(a))、 $\sigma_2 = \sigma_x \sigma_y > 2$ であれば中心対称性に起因する情報欠損を補って、投影構造が得られる。この条件を Oversampling (OS) 条件、 σ_2 を二次元での OS 比、 σ_x や σ_y を一次元での OS 比と呼ぶ。

3.2 回折パターンからの位相回復

本稿の構造解析では、OS 条件で得た構造振幅に対して反復的位相回復アルゴリズム (Fig. 2(b))⁴ を適用して ρ_P

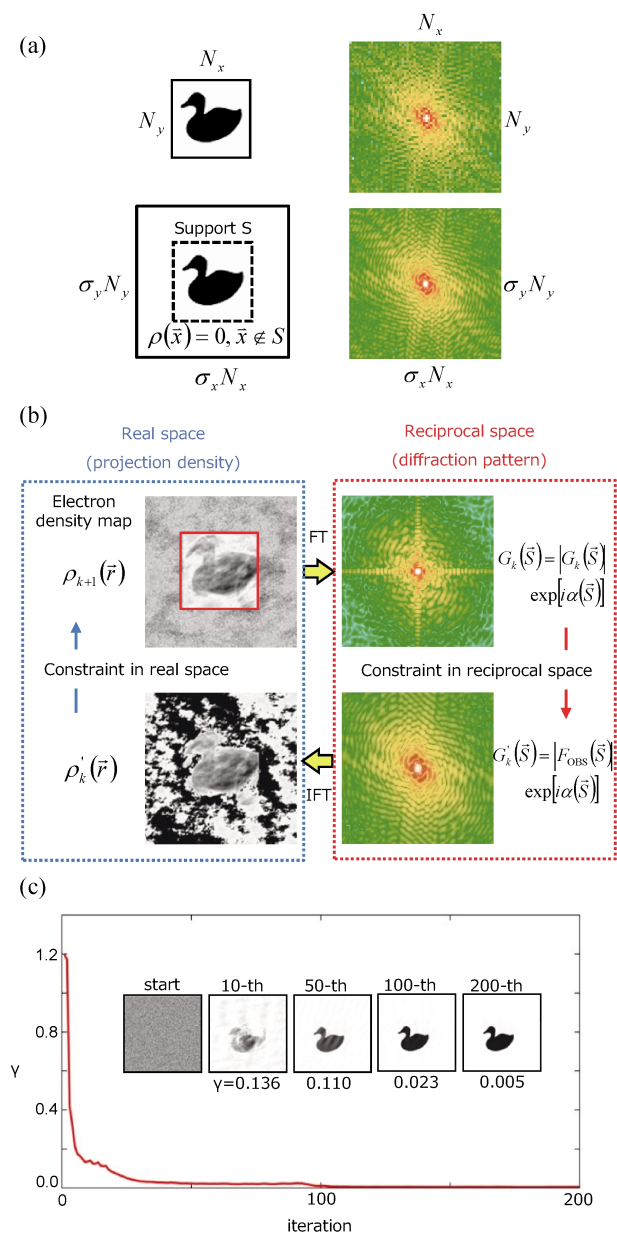


Fig. 2 (Color online) Theoretical background of phase-retrieval analysis used in CXDI. (a) Oversampling of diffraction pattern increase the amount of information necessary to solve the phase problem. (b) Schematic illustration of the phase retrieval algorithm⁴⁾. (c) Example of phase retrieval calculation for the diffraction pattern from a cartoon monitored by the γ -value.

(x, y) を再生している。同アルゴリズムでは、実空間と逆空間を FT と IFT によって交互に往来しながら、算出された投影電子密度 $\rho_k(\vec{r})$ や構造因子 $G_k(\vec{s})$ に拘束条件 (restraint) を課す。逆空間拘束条件では、常に構造振幅を観測値 $|F_{\text{OBS}}(\vec{s})|$ に置換する。

実空間での拘束条件については、収束性を向上させるために様々なものが考案されてきた⁴⁾。OS 条件で得られた構造因子の IFT 投影像には、逆空間と実空間の相反性から、求めるべき $N_x \times N_y$ 領域 (通常サポートと呼ぶ) より

も大きな $\sigma_x N_x \times \sigma_y N_y$ 内に像が再生される (Fig. 2(a))。サポート外電子密度は零であるべきなので、そのことを考慮した実空間拘束条件が採用されている。収束性改善に向けた努力⁴⁾により、現在では、Hybrid-Input-Output (HIO)⁴⁾ アルゴリズムやその変法^{6,7)} が用いられる。HIO の実空間拘束条件は

$$\rho_{k+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho'_k(\vec{r}) & \vec{r} \in \text{support and } \rho'_k(\vec{r}) \geq 0 \\ \rho_k(\vec{r}) - \beta \rho'_k(\vec{r}) & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3-4)$$

であり、定数 β を用いてサポート外電子密度を敢えて零にせず停留を防いでいる。構造振幅のみを用いるので、収束解が偽の可能性もありうるが、二次元以上の問題で偽解の出現は希であるとされている¹⁴⁾。サイクル反復を繰り返すと、サポート内は正しい電子密度に収束し、サポート外電子密度の和は零に漸近するであろう。その判定にはサポート内外の電子密度総和の比に、サポート内外の面積比 $(1/(\sigma-1))$ を乗じた

$$\gamma = \frac{1}{(\sigma-1)} \frac{\sum_{\vec{r} \notin \text{Support}} \rho(\vec{r})}{\sum_{\vec{r} \in \text{Support}} \rho(\vec{r})} \quad (3-5)$$

を利用する (Fig. 2(c))。乱雑な初期電子密度から開始しても、十分な S/N で得た $|F_{\text{OBS}}(S_x, S_y, S_z=0)|$ からは $\rho_p(x, y)$ を回復できる。

3.3 サポート形状の更新

本来、粒子のみが電子密度を持つため、粒子投影像形状をサポートとすることで位相回復速度や精度の改善が見込まれる。粒子構造が不明な初回サイクルでは、回折強度パターンの FT である自己相関関数が零に収束する領域をサポートとするのが良い (Fig. 3(a))。さらに進んだ方法として Shrink-Wrap (SW) 法¹⁵⁾ が提案された。位相回復サイクル中に、定期的に回復投影電子密度にローパス・フィルターとして作用するガウス関数

$$G(x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\alpha^2}} \exp\left[-\frac{x^2+y^2}{2\alpha^2}\right] \quad (3-7)$$

を畳み込む。その結果、ある閾値以上の電子密度を持つ領域を新たなサポートとする。ガウス関数標準偏差、閾値、更新間の位相回復回数が適切な場合、サポート形状は粒子外形に収束する (Fig. 3(a))。SW 法は、タンパク質結晶構造解析での溶媒領域電子密度平滑化¹²⁾ に似て、粒子境界の明確化で、正しい位相の組を与える大域解への接近を速めている。我々は、SW によって動的に更新される最適サポート領域を使用する HIO 位相回復プログラムを作成して、実験やシミュレーションに用いている。ノイズを含む実験データに対しては、Fig. 3(b) の葉緑体粒子のように

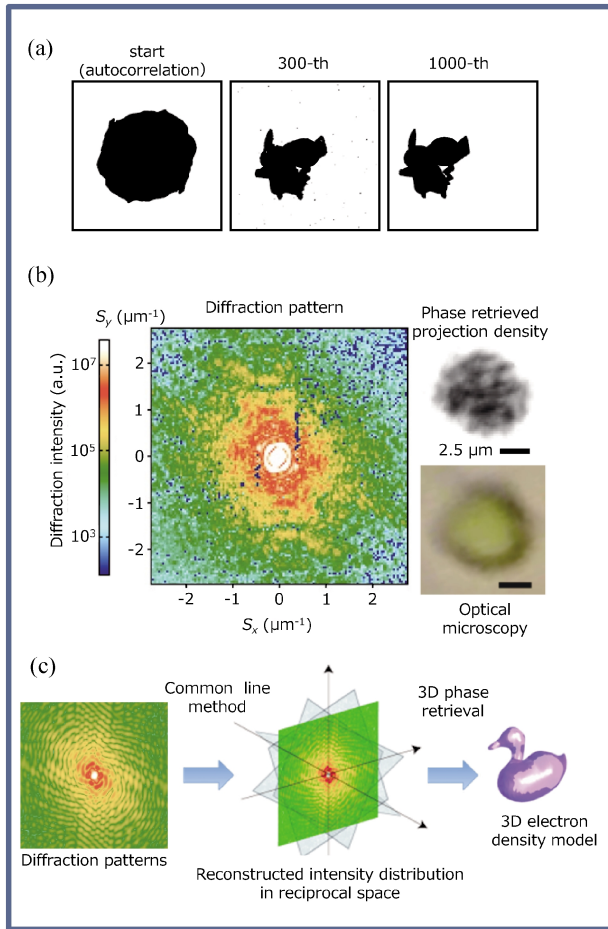


Fig. 3 (Color online) (a) Variation of support shape during HIO-SW phase retrieval calculation. (b) Projection electron density map of a spinach intact chloroplast phase-retrieved from a cryogenic CXDI diffraction experiment at BL29XU of SPring-8⁴¹⁾. The density map at a resolution of 182 nm is compared with its image viewed using optical microscope¹⁶⁾. (c) Schematic illustration of three-dimensional phase retrieval analysis for structure amplitude distribution reconstructed in reciprocal space¹⁷⁾.

1000回の独立した HIO-SW 位相回復計算を行い、回復された1000の投影電子密度像間の相互相関や γ 値を検討して最終の投影電子密度を得る¹⁶⁾。

3.4 三次元電子密度の回復

入射伝播ベクトルに対して様々な配向にある真空中孤立粒子の回折パターンを多数得て、逆空間での三次元 OS 比を満足できる空間分解能で構造振幅分布を再構成できれば、三次元反復的位相回復にて粒子の三次元電子密度を再現できるであろう¹⁷⁾ (Fig. 3(c))。得られる回折パターンは逆空間原点を通過するので、任意の2組のパターンには、同一の強度を示す共通円弧 common line¹⁸⁾が見出される。3組の回折パターンについて相対的配向が決定されれば、残りの配向も決定でき、逆空間での構造振幅分布を再現することができる。

4. XFEL-CXDI 実験

XFEL パルスは超強光子場であるため、パルス通過後には原子内束縛電子が剥ぎ取られ、残された原子核間の静電反発によって原子団がクーロン爆発を起こすと予想されている¹⁹⁾。実際、入射強度が 10^{12} photons/ μm^2 /pulse 程度と見積られる SACLA からの X 線パルスを用いた CXDI 実験 (Fig. 1(a)) では、照射領域が消失するにもかかわらず、回折パターンから標準試料の電子密度が回復される。このことから、極く短時間のうちに原子内電子が双極子放射を生じ、原子が壊れる前に回折現象が生じている (diffraction before destroy) と考えるのが自然である²⁰⁾。この様に、XFEL 実験が原則原子レベルでの破壊的測定であるため、試料粒子を順次照射野に投入する必要がある。また、稼働中の XFEL 施設における X 線パルス発生は 10–100 Hz なので、大量の回折パターンを短時間で取得するには、歩留まりの高い試料照射を可能とする回折装置の開発が望まれる。

溶媒環境で機能する生体粒子や機能性ナノ材料粒子では、溶媒環境を整えた状態での試料作製が不可欠であり、粒子試料を直接真空中に曝すことは避けねばならない。一方、バックグラウンド散乱を低減するためには、試料を真空中に置くべきであるというディレンマがある。この点を解決できる方法として、液滴中に試料粒子を入れて照射野に導入し、溶媒が蒸散する前に X 線照射する装置が実用化された²¹⁾。照射の歩留まりは極めて低いが、構造解析実験に利用されている。

これに対して、我々は生体分子・粒子の電子顕微鏡観察で技術基盤が確立されている氷包埋法に着目し、沢山の粒子を氷包埋した試料を一定速度で移動させて、試料粒子に順次 X 線照射する低温試料固定照射装置“壽壺号”^{20,22)}を開発した (Fig. 1(a))。試料粒子は、電子顕微鏡用ピンホール板に貼り付けた吸着促進処理炭素薄膜上に湿度制御試料作製装置“宝恵駕籠四号”¹⁶⁾を用いて展開し、液体エタンで急速凍結する。液体窒素中で試料ピンホール板を装着されたホルダーは、専用装填装置によって昇温・霜着することなく、壽壺号真空槽内の液化ガスポットに搬送される。これら開発装置と新規に考案した試料作製方法を用いることで、SACLA で得られる入射 XFEL パルスの 20–60% が試料粒子にヒットする状況にある。

5. 溶媒包埋粒子の構造解析

溶媒包埋粒子試料の回折パターンを考える。照射野に存在する全ての原子・分子を考慮すると、観測される回折強度は以下の様になる。

$$I(\vec{S}) = I_0 \gamma_e^2 \left(\frac{\lambda}{\sigma A} \right)^2 [|F_P(\vec{S})|^2 + |F_w(\vec{S})|^2 + F_P(\vec{S}) \cdot F_w(\vec{S})^* + F_P(\vec{S})^* \cdot F_w(\vec{S})] \quad (5-1)$$

ここで $F_P(\vec{S})$ と $F_w(\vec{S})$ は、それぞれ、試料粒子と溶媒領域の構造因子である。A は (2-1) と異なり、方形断面を持つ X 線が照射される溶媒領域一辺の長さである。 $F_w(\vec{S})$ が無視できない場合、 $F_w(\vec{S})$ の寄与と $F_P(\vec{S})$ との干渉項によって、真空中の試料粒子とは異なる回折パターンが生じ、粒子の構造解析に不可欠な第一項のみを取り出せない。また、試料中の溶媒重心と粒子重心を制御することはできないし、それらが常に一致している保証もない。

上記を示す簡単な例として、電子密度 ρ_0 の方形領域 A と電子密度が $\Delta\rho$ だけ余剰な方形領域 B で形成された二成分試料 (Fig. 4(a)) の回折パターンを考える。領域 A の構造因子を $F_A(S_x, S_y)$ 、領域 B の余剰電子密度に由来する構造因子を $F_B(S_x, S_y)$ とすると、二領域の重心が一致した試料 1 と領域 B が軸方向に Δ 移動した試料 2 では、回折強度の干渉項が異なる。

$$\begin{aligned} I_1(S_x, S_y) &= |F_A(S_x, S_y)|^2 + |F_B(S_x, S_y)|^2 \\ &\quad + 2F_A(S_x, S_y)F_B(S_x, S_y) \\ I_2(S_x, S_y) &= |F_A(S_x, S_y)|^2 + |F_B(S_x, S_y)|^2 \\ &\quad + 2F_A(S_x, S_y)F_B(S_x, S_y) \\ &\quad \times \exp[2\pi i S_x \Delta] \exp[2\pi i S_y \Delta] \\ F_A(S_x, S_y) &= \rho_0 (2L)^2 \frac{\sin(2\pi S_x L)}{2\pi S_x L} \frac{\sin(2\pi S_y L)}{2\pi S_y L} \\ F_B(S_x, S_y) &= \Delta\rho (2a)^2 \frac{\sin(2\pi S_x a)}{2\pi S_x a} \frac{\sin(2\pi S_y a)}{2\pi S_y a} \end{aligned} \quad (5-2)$$

その結果、common line 法 (Fig. 3(c)) による逆空間での構造振幅分布の再構成は不可能となる。

我々は、この問題を解決して溶媒中粒子の電子密度を得るべく、位相回復法⁴⁾と単粒子三次元再構成法¹³⁾を組み合わせた新しい構造解析スキームを考案した²³⁾。ここでは、まず、X 線構造解析で利用されることの無い単粒子三次元再構成法を概説し、次に、具体的なシミュレーション結果を交えながら新スキームを解説する。

5.1 単粒子解析における三次元再構成

単粒子解析は、生体超分子複合体などの電子顕微鏡像の解析を行う際に広く用いられている三次元再構成手法である¹³⁾。加速電圧 200–300 keV の電子顕微鏡では、弱位相物質の電子顕微鏡像を電子線入射伝播ベクトル方向への静電ポテンシャルの投影像と見做すことができる¹³⁾。単粒子解析では、様々な方向から観測した多数の粒子投影像に対して、投影定理に依拠した common line 法によって投影像内粒子の相対配向を決定し、Fourier Reconstruction (FR) 法²⁴⁾などで三次元像を再構成する。

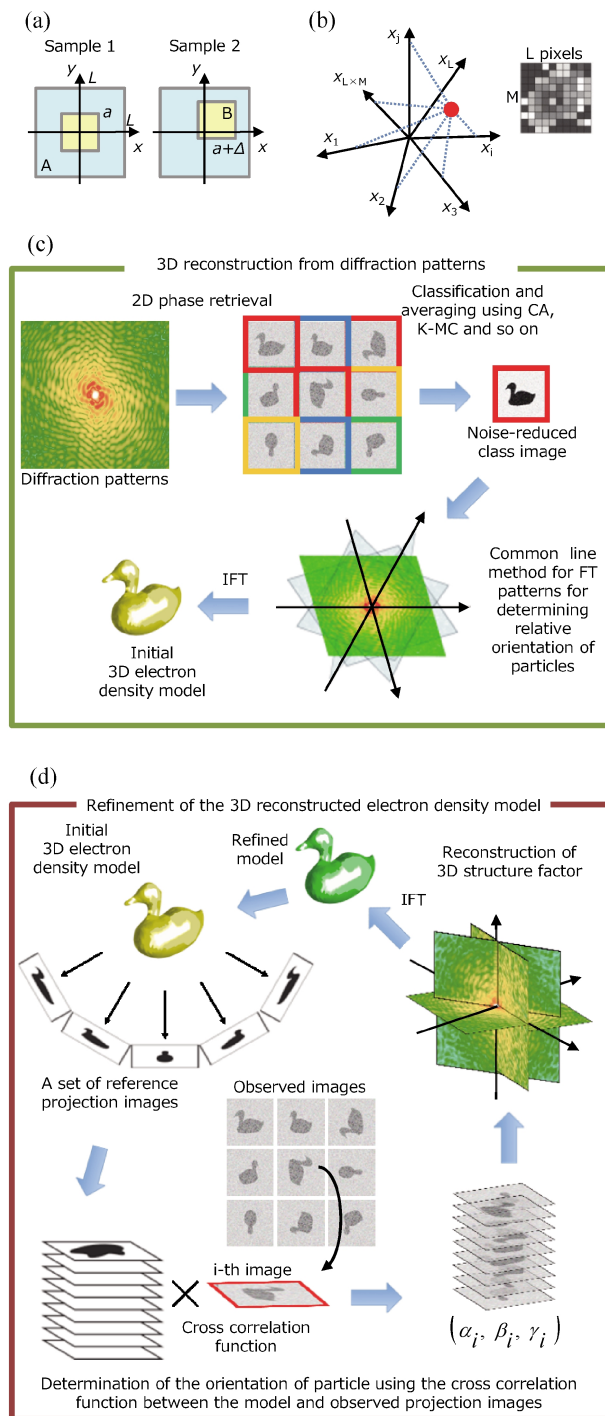


Fig. 4 (Color online) Theoretical background of three-dimensional reconstruction method for single particle used in the present study. (a) Example demonstrating the significant difference in diffraction patterns caused by the positional shift of inner particle in a medium. (b) An image of $L \times M$ pixels is expressed as a point in the $L \times M$ -dimensional hyper space by treating the density of each pixel as variable. (c) Schematic illustrations of multiple data analysis applied for classification-averaging and three-dimensional Fourier reconstruction using the common line method in reciprocal space. (d) Refinement of reconstructed density model using the projection matching method.

観測される投影像にはノイズが混在するため、多変量解析 (Multiple Data Analysis) によって、ある角度範囲で同じ配向と見做せる粒子の投影像の組“クラス”に分類し、平均操作によって雑音を低減した試料投影像を得る²⁵⁾。この際、粒子投影像を含む $L \times M$ ピクセルの画像 1 枚を、各ピクセルの密度を変数として、 $J=L \times M$ 次元超空間の一点と見做す (Fig. 4(b))。N 枚の画像を得た場合、データ全体を、ピクセル番号を列、画像番号を行とする行列

$$\Psi = \begin{pmatrix} \psi_{11} & \cdots & \psi_{1J} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_{N1} & \cdots & \psi_{NJ} \end{pmatrix} \quad (5-3)$$

として表す。この行列の特徴付けには、以下の多次元空間での固有値問題を取り扱う Correspondence Analysis (CA) を利用する。

$$\begin{aligned} \Psi^T \Psi \mathbf{M} \mathbf{u} &= \lambda \mathbf{u} \\ \mathbf{M} &= \begin{pmatrix} m_{11} & & 0 \\ & \ddots & \\ 0 & & m_{NJ} \end{pmatrix}, m_{ij} = 1 \left/ \sum_i^N \psi_{ij} \right. \\ \mathbf{N} &= \begin{pmatrix} n_{11} & & 0 \\ & \ddots & \\ 0 & & n_{NJ} \end{pmatrix}, n_{ii} = 1 \left/ \sum_j^J \psi_{ij} \right. \end{aligned} \quad (5-4)$$

CA では、対角行列 \mathbf{M} によって各画像の規格化、対角行列 \mathbf{N} によって各ピクセル電子密度の規格化を施した後で固有値方程式を解く。これによって、画像間コントラストの影響を受けない分類が可能になる。固有値がある閾値を超えている固有ベクトルを新たな基底として、低次元空間での主軸を用いて系を特徴づける (Fig. 4(c))。

低次元空間でのクラス分けには、K-Means Clustering (KMC) を用い、高次元空間で記述される観測点を、その接近度に応じて K 個のクラスに分ける。数学的には、空間的に近い物体同士がどれだけ同一のクラスに振り分けられているかの指標となる

$$V = \sum_{i=1}^K \sum_{x_j \in S_i} (x_j - \mu_i)^2 \quad (5-5)$$

を最小化することになる。ここで、 K はクラス総数、 S_i は i 番目のクラス領域、 μ_i は i 番目のクラスの重心、 x_j は S_i クラスに含まれる観測点の座標である。KMC クラス内の類似画像を重ね合わせて平均化し、ノイズを低減する。さらに、画像の回転自由度を考慮するためは、一旦決定された平均化・クラス分け画像を回転させながら各画像との相互相関係数を計算する。相関係数が高ければ平均化・クラス分け画像がさらに精密化されるので、各画像の回転角

が安定化するまでこの過程を繰り返す。

平均化後、配向決定した投影像から FR 法にて三次元再構成を行う。FR 法は、投影定理を直接利用した三次元再構成であり、画像の FT パターンに対する common line によって配向を決め、逆空間の任意点の構造因子を補間して²⁶⁾構造因子分布を再構成後、その FT から三次元電子密度を得る。一度の試行で得られるモデルは正確さに欠けるので、初期モデルを projection matching 法¹³⁾などによって精密化する (Fig. 4(d))。与えられた初期構造から計算される投影像に対して、各観測投影像の相互相関関数を計算し、最大相関を与える Euler 角 (α, β, γ) 及び座標によって粒子配向を更新して、FR 法と同様な処理で新たな三次元構造を再構成するサイクルを繰り返す。

三次元再構成における分解能の評価には、Fourier Shell Correlation (FSC)²⁷⁾

$$FSC(S') = \frac{\text{Re} \sum_{|S| \in S'} F_1(\vec{S}) \cdot F_2^*(\vec{S})}{\sqrt{\sum_{|S| \in S'} |F_1(\vec{S})|^2 \sum_{|S| \in S'} |F_2(\vec{S})|^2}} \quad (5-6)$$

を用いる。 $F_1(\vec{S})$ と $F_2(\vec{S})$ は、データを二分割して再構成される二つのモデルの三次元構造因子である。 $FSC(S')$ が $0.143 (= 1/7)$ となる S' の逆数を分解能とするが、これは X 線結晶構造解析における位相の確からしさの指標である figure-of-merit において、位相の不確かさが 60 度程度であることに対応する。

以下に述べるシミュレーションにおいては、これら多変量解析による画像処理や三次元再構成を纏めた電子顕微鏡用単粒子構造解析プログラムパッケージ EMAN²⁸⁾を使用した。

5.2 溶媒包埋粒子の構造解析 1—Poisson ノイズを想定しない場合

我々は、溶媒包埋粒子の構造解析に向け、回折パターンから位相回復した投影像を得、溶媒電子密度を除去後に、単粒子解析三次元再構成法を適用するというプロトコルを考案した²³⁾。このプロトコルの実用性を検討するため、まず、回折パターン記録時の Poisson ノイズを考慮しないシミュレーションを、非対称な形状と明確なドメイン構造を有した protein disulfide isomerase (PDI)²⁹⁾ に対して行った (Fig. 5)。

異なる配向にある真空中の PDI について (Fig. 5(a)), 0.21 nm 分解能での回折パターン $I(S_x, S_y, S_z = 0)$ 10000 枚を OS 比 4 で計算した。

$$\begin{aligned} I(S_x, S_y, 0) &= F^*(S_x, S_y, 0) \cdot F(S_x, S_y, 0) \\ F(S_x, S_y, 0) &= \sum_j f_j(\sqrt{S_x^2 + S_y^2}) \exp[2\pi i(S_x r_{jx} + S_y r_{jy})] \end{aligned} \quad (5-7)$$

ここで、 j 番目原子の位置を \vec{r}_j , 原子散乱因子を $f_j(S)$ である。回折パターンには、タンパク質の大きさを反映した

スペックルパターンが現れ (Fig. 5(d)), HIO-SW 位相回復によって回折パターンから二次元投影像を回復した。0.21 nm 分解能での実空間三次元再構成に必要とされる縮退の無い投影角度数の組みは6842なので、使用した投影像数は十分と言える。クラス分けと平均化を経て三次元再

構成法により、FSC 推定分解能0.21 nm の電子密度モデルが構築できた (Fig. 5(f))。この真空中シミュレーションにより、構造振幅分布の再構成を経ることなく、新しいプロトコルで構造解析ができることが示された。

次に、直径12.6 nm の球状液滴にタンパク質分子1個が含まれる場合の構造解析を試みた (Fig. 5(b))。液滴は、陽な TIP3P 水分子モデル³⁰で埋め尽くされた立方体から適当に切りだすので、同じ水分子配置の液滴は無い。また、液滴に埋め込むタンパク質分子の X 線ビームに対する配向に重複は無く、タンパク質水和における水素結合の幾何学³¹に基づいてタンパク質表面に接近しすぎた水分子を除いた。タンパク質分子を含む液滴を10000個用意し、真空中のシミュレーションと同様に回折パターンを計算した。溶媒領域の回折強度への寄与はタンパク質分子単独の場合の約100倍となり、小角強度プロファイル (Fig. 5(d)中の赤線)は、半径 D と密度 ρ_0 をもつ球の散乱関数³²

$$I(S) = \left[4\pi D^3 \rho_0 \left\{ \frac{\sin(2\pi SD) - 2\pi SD \cos(2\pi SD)}{(2\pi SD)^3} \right\} \right]^2 \quad (5-8)$$

で近似できた。実際、散乱強度極小位置から $D = 12.6$ nm と見積もられた。どのパターンでも球状液滴の散乱関数が現れ、また、Fig. 4(a)と(5-2)で解説した分子の位置変化があるため、任意の2枚の回折パターンで common line を探すことは不可能であった。

HIO-SW 位相回復で得た投影図には、溶媒領域電子密度の寄与が主であり、PDI 電子密度の検出は容易でない。(5-8)式と小角回折プロファイルから求めた球半径と密度 ρ_0 を用い、水球の投影電子密度が

$$\rho_{\text{water}}(x, y) = 2\rho_0 \sqrt{D^2 - x^2 - y^2} \quad (5-9)$$

と表わせることを利用して、これを像回復パターンから差し引くと、かすかに PDI の電子密度を確認できるようになる。この処理を施す前後での投影像電子密度のプロファイルの変化を Fig. 5(e)に示した。この低コントラスト投影像に対して、粗視化と高空間周波数ノイズ除去に有効な

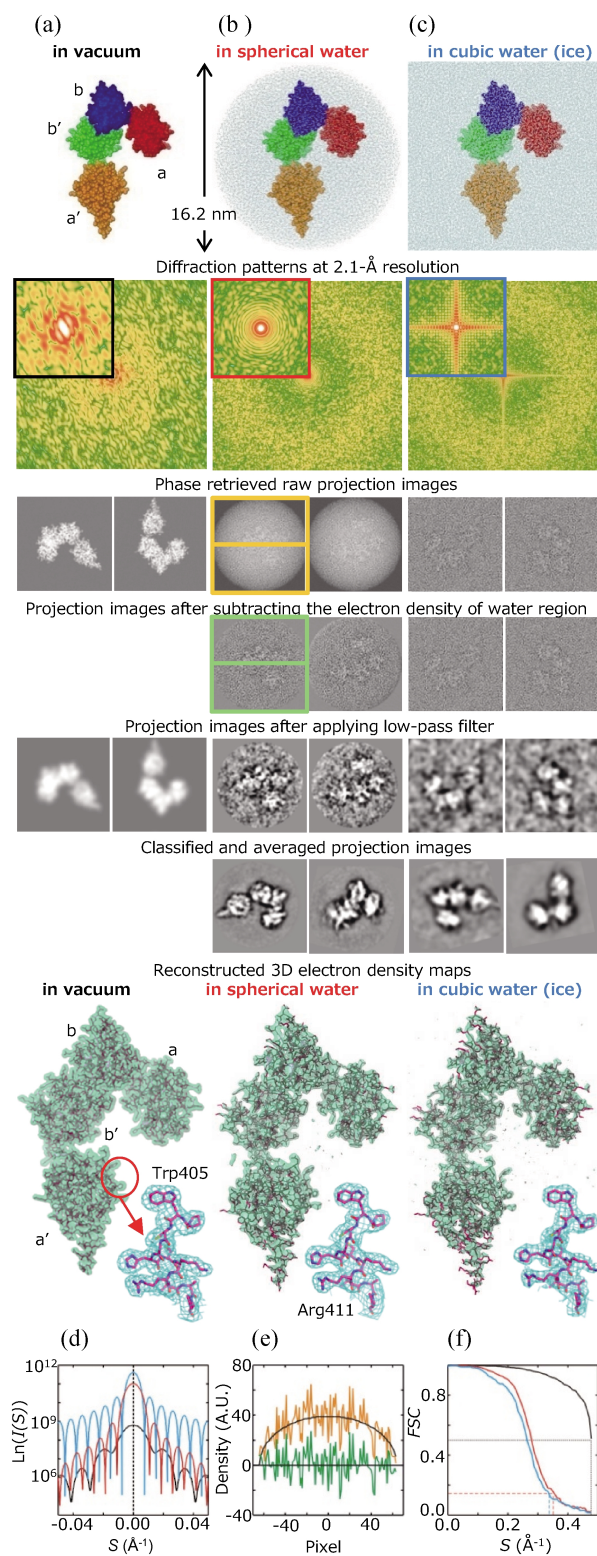


Fig. 5 (Color online) Course of structure analysis for particles in solvent by the combinational use of HIO-SW phase retrieval, density modification and three-dimensional structure analysis for single particle²³. Simulations for particle in vacuum (a), in spherical-shaped water drop (b), and in cubic-shaped vitreous ice (c). Small-angle diffraction patterns are shown in the magnified view at 0.83 nm resolution. The line profiles of the in-vacuum, in-sphere and in-cube simulations are plotted as black, red, blue lines, respectively (d). (e) Line profiles of electron density before (orange) and after (green) density modification. The effective resolution of each electron density model is estimated using the FSC function (f).

ローパス・フィルターを施してPDI像のコントラストを高めた結果、CAとKMCによるクラス分けが可能となり、平均化された画像から初期電子密度を構築できた。さらに、5.1節で述べた構造精密化を、溶媒電子密度減算した投影画像に対して行い、最終モデルを得ている。このモデルの実効的分解能は、FSCより0.28 nmと推定された(Fig. 5(f))。真空中に比べて有効分解能が悪化する原因として、溶媒電子密度減算によってタンパク質分子表面構造の詳細が失われ、分子配向の見積りに曖昧さが生じることが挙げられる。

三番目に、ガラス状氷包埋試料を想定し、一辺16.2 nmの立方体水箱に埋め込まれたPDIに対する構造解析を試みた(Fig. 5(c))。回折パターン赤道・子午線上の小角強度プロファイル(Fig. 5(d) 中の青線)は、一辺 D 密度 ρ_0 の正方形物体からの回折関数¹¹⁾

$$I(S_x, S_y) = \left[4A^2 \rho_0^2 \frac{\sin(2\pi S_x D)}{2\pi S_x D} \frac{\sin(2\pi S_y D)}{2\pi S_y D} \right]^2 \quad (5-9)$$

で良く近似され、プロファイルの極小位置等から D と ρ_0 が推定された。HIO-SW位相回復から ρ_0 を減算後、液滴の場合と同様にローパス・フィルターを施した像はクラス分け可能であり、平均化画像からの初期モデルに構造精密化を施し、有効分解能0.29 nm(Fig. 5(f))の電子密度モデルを得た。

5.3 溶媒包埋粒子の構造解析 2—Poisson ノイズを考慮した場合

前節では、新規構造解析プロトコルが溶媒中粒子の立体構造解析に有効であることが示された。ここでは、より現実的な実験時のX線検出で生じるPoisson ノイズを考慮したシミュレーション結果について記述する²³⁾。

真空中(Fig. 6(a))では、入射強度が 10^{21} から 10^{19} に2桁減少すると、位相回復投影像の詳細が失われ、粒子配向決定に不定性が生じて、0.21 nm分解能データにもかかわらず、FSC有効分解能は0.52 nmと大きく悪化した。一方で、入射強度 10^{21} の場合には、ノイズを考慮していない Fig. 5(a) と同等の電子密度モデルが0.21 nmの有効分解能で再構成できた。

液滴(Fig. 6(b))では、真空中に比べてノイズの影響がさらに顕著であった。入射強度 10^{20} では、有効分解能0.31 nmで三次元再構成が可能であったが、入射強度が1桁減少しただけで、位相回復投影像がクラス分け困難な程度に劣化し、2回回転対称を持つ虚像が三次元再構成に残った。このような点を改善するには、位相回復アルゴリズムでの高速FTルーチンの改良、ノイズに強い実空間拘束条件の導入などが不可欠である。

一方で、これら一連のシミュレーションは、入射X線強度さえ十分であれば、Poisson ノイズに打ち克って溶媒

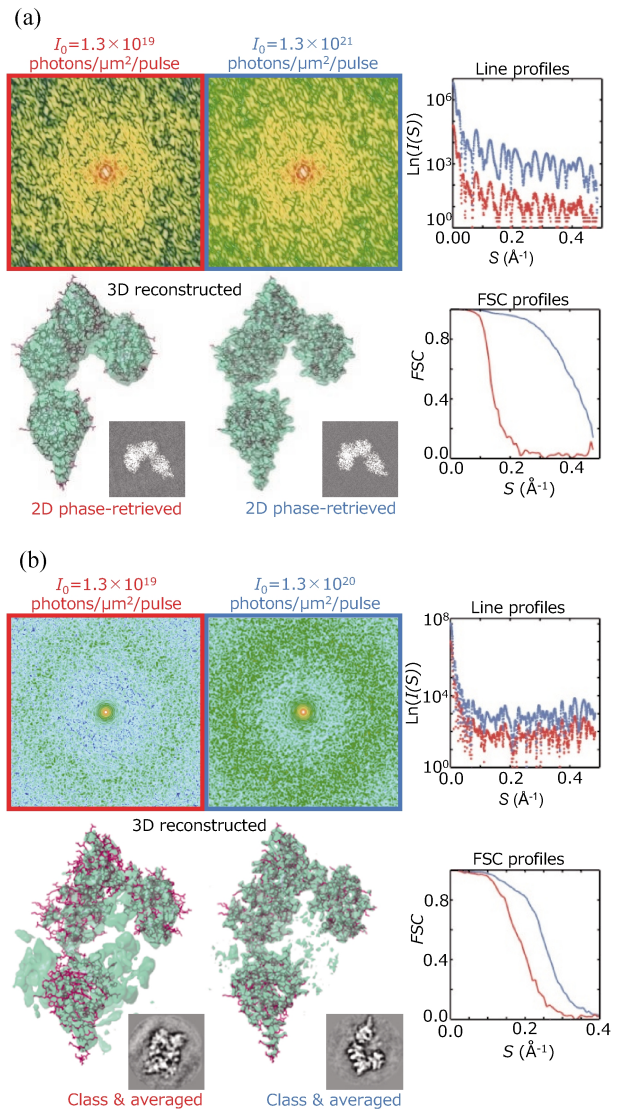


Fig. 6 (Color online) Influences of Poisson noise in detecting X-ray diffraction patterns on the reconstructed three-dimensional electron density model in the in-vacuum (a) and the in-solvent (b) simulations²³⁾.

包埋粒子の三次元構造解析が可能であることを強く示唆するものであった。

6. 生体分子複合体粒子の構造解析

XFELパルスに対してランダムな配向の生体分子を射出し、数十万枚単粒子回折パターンを取得して生体分子の三次元構造解析が可能ではないかという提案がなされた¹⁷⁾。しかし、(2-1)でも述べたように電子のX線散乱断面面積が極めて小さいため、現状のXFEL光源では、生体分子1個からの回折パターンを記録するのは殆ど不可能と考えられる。例として、分子質量1 MDaのタンパク質超分子集合体を想定し、その原点散乱強度を次式を用いて見積もる。

$$I_{\text{elec}}(\vec{S}=0) = r_e^2 \left(\frac{\lambda}{\sigma a} \right)^2 \left| \bar{\rho}_{\text{mol}} \frac{V_M M_M}{N_A} \right|^2 \times I_{\text{incident}} \quad (6-1)$$

タンパク質分子の平均電子密度 $\bar{\rho}_{\text{mol}}$ ($= 0.4 \text{ e}/\text{\AA}^3$), 偏比容 V_M ($= 0.74 \text{ cm}^3/\text{g}$), Avogadro 数 N_A ($= 6.0 \times 10^{23}/\text{mol}$), 古典電子半径 r_e ($= 2.82 \times 10^{-12} \text{ mm}$), 分子質量 (M_M) $1 \times 10^6 \text{ g/mol}$, 分子サイズ (α) 10 nm , X 線波長 (λ) 0.1 nm , OS 比 (σ) 2 とすると入射強度 I_{incident} が $10^{12} \text{ photons}/\mu\text{m}^2/\text{pulse}$ の場合には, 原点散乱強度 $I_{\text{elec}}(\vec{S}=0)$ は, $50 \text{ photons}/\text{pulse}$ でしかない。高分解能を目指すのであれば, この入射強度では足りず, 原子散乱因子の高分解能での振る舞いを考慮すれば, 少なくとも 10^4 倍の I_{incident} の増強が不可欠である。ここでは, この結果を踏まえ, 現実的なビームサイズ, 試料形態や検出器性能を考慮しながら, 溶媒中粒子の構造解析プロトコルを拡張した超分子複合体の nm 分解能構造解析の可能性を議論する³³⁾。

今回のシミュレーションで対象とした生体超分子は, リボソーム粒子 (70S リボソーム) の構成要素でメッセンジャー RNA の遺伝暗号にしたがってポリペプチド合成をおこなう 50S リボソームサブユニット³⁴⁾である。同サブユニット 229 個を $500 \times 500 \times 50 \text{ nm}^3$ のアモルファス氷薄膜に埋包した試料を考える (Fig. 7(a))³³⁾。この試料は, 膨大な水分子を含むので, 試料全体の散乱断面積は十分大きい。試料面に垂直に X 線を入射した場合の回折パターンは, i 番目の生体超分子の構造因子を $F_{Pi}(\vec{S})$, 溶媒領域の構造因子を $F_W(\vec{S})$ として,

$$I(\vec{S}) = I_{\text{incident}} r_e^2 \left(\frac{\lambda}{\sigma A} \right)^2 \left[\left| \sum_i^{N_p} \sum_j^{N_p} F_{Pi}(\vec{S})^* F_{Pj}(\vec{S}) \right|^2 + |F_W(\vec{S})|^2 + \left\{ \sum_i^{N_p} F_{Pi}(\vec{S}) \right\}^* \cdot F_W(\vec{S}) + \left\{ \sum_j^{N_p} F_{Pj}(\vec{S}) \right\} \cdot F_W(\vec{S})^* \right] \quad (6-2)$$

で与えられる。この場合, 試料サイズ A は粒子の大きさではなく, 氷薄膜の大きさ 500 nm である点に注意する。第 7 節で説明する Ewald 球の問題を考慮し, 分解能 0.8 nm までの回折パターンに対して構造解析シミュレーションを行った。 0.8 nm 分解能での構造解析に必要な配置の異なる 50S サブユニット 1832 個を用意し, 8 枚の氷薄膜に 229 個ずつ, 生化学実験で調整可能な濃度 (46 mg/ml) で散布した。試料 1 枚には, 約 4.3 億個の水分子と, 2.1 千万個の 50S サブユニット原子が含まれている。

OS 比 4 で Poisson ノイズを考慮した場合, 0.8 nm 分解能で構造解析するには, $I_{\text{incident}} = 5 \times 10^{16} \text{ photons}/500 \times 500 \text{ nm}^2/\text{pulse}$ の入射強度が必要であった。氷膜の回折パターンには, Fig. 5(c) よりさらに細かい矩形開口由来のスペckルが現れた。HIO-SW 位相回復によって得た 8 枚の氷薄膜投影像から 1832 個の 50S サブユニット投影像を得て, 第 5 節の手順に従って 3.2 nm 分解能で初期モデル

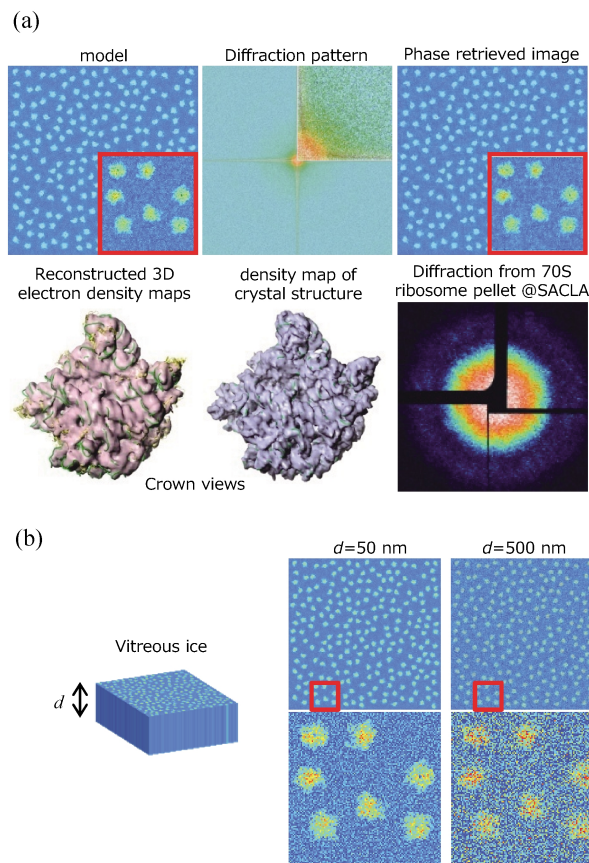


Fig. 7 (Color online) (a) Structure analysis protocol for macromolecular assemblies embedded in vitreous ice³³⁾. In this case, 229 50S ribosomal subunit particles in $500 \times 500 \times 50 \text{ nm}^3$ vitreous ice plate. From 1832 images of 50S subunit oriented variously to incident X-ray, a three-dimensional electron density model at a resolution of 0.8 nm is reconstructed. Diffraction pattern of 70S ribosome collected at SACLA suggested difficulties to perform the proposed protocol. (b) Electron density contrast between 50S ribosomal subunit and vitreous ice region became worse when the thickness of the ice reaches to approximately 10-fold of the size of 50S subunit.

構築した。分解能を $3.2, 1.6, 0.8 \text{ nm}$ と徐々に上げながら精密化を施し, FSC 有効分解能 0.8 nm の最終電子密度モデルを得た。モデルは, 結晶構造から計算した 0.8 nm 分解能の電子密度図と良い一致を示した。特に, Crown view と呼ばれる配向で眺めた場合, Crown の先端を形成する 50S リボソーム主構成要素である 5S ribosomal RNA の特徴的な二重螺旋構造, 50S リボソームのペプチジルトランスフェラーゼ反応で合成されたポリペプチド鎖が通り抜けるトンネル等, 構造上の特徴が良く再現されていた。最近, 70S リボソームの高濃度試料を作成して SACLA にてこの様な実験が可能かを調べ始めている (Fig. 7(a) 右下図)。

回復された三次元電子密度では, Fig. 5-6 の溶媒中のシミュレーションと同様, 粒子外縁部に存在する ribosome タンパク質の電子密度が一部欠落していた。投影電子密度

では、溶媒領域内電子密度分布の揺らぎが投影方向へ積算され、粒子電子密度にも足し込まれてしまう (Fig. 7(b))。その結果、氷領域の電子密度変動が氷厚さ伴って増大し、20 nm サイズの50S サブユニットを500 nm の氷に入れて投影電子密度を眺めると、50S サブユニットの特徴が大きく損なわれる。

本シミュレーション結果から、湿度制御装置等^{16,20)}を用いて厚さ制御して作成した氷薄膜試料に対して十分な強度のXFEL パルスが照射できれば、超分子複合体の極微量試料懸濁液から、低分解能構造解析を可能とする回折強度データを数十回程度の露光で収集できることが明らかとなった。

7. XFEL における構造解析の展開

溶媒包埋粒子の構造解析については、実践的な部分も含めて、前2節にて提案した方法を用いて解決できそうである。一方で、CXDI には、構造解析の上で解決してゆくべき問題が幾つか残されている。この節では、XFEL で得られる回折パターンの像回復での問題点やその解決策と将来的な展望について纏めた。

7.1 暗視野位相回復

CXDI 実験では、入射 X 線に対するビームストップ、寄生散乱ストッパー、検出器素子の張り合わせギャップといった幾何学的要因や検出器の飽和等によって、原点および低角度領域の回折パターンを記録できない (Fig. 1)。試料外形に関する情報を含む低角度領域の回折振幅が失われていると、従来の HIO-SW 位相回復法では、サポート領域を正確に決定することが難しく、信頼できる像回復が困難になる。この様な CXDI パターンからの像回復問題を克服するため、高角領域の構造振幅のみから、試料の外形を推定する dark-field phase retrieval (暗視野位相回復法) が提案され、実験データの解析に用いられ始めた³⁵⁾。高角領域の回折振幅も試料粒子電子密度全体の FT に由来するので、試料全体像に関する情報を含み、原理的には、高角領域データのみからの像回復は不可能ではない。ここではその理論の概要と、我々の作成した暗視野位相回復ソフトウェアの適用例からその有効性を考えてみたい。

高角領域データのみを用いた像回復のために、構造因子に高角領域のみ選択可能なマスク関数 $M(\vec{S})$ を乗じる。コンボリューション定理により、マスク関数と構造因子の積を IFT すると、電子密度分布とマスク関数を IFT した関数 $m(\vec{r})$ の畳み込みとなる。

$$\rho_{\text{dark}}(\vec{r}) = \text{IFT}[M(\vec{S}) \times F(\vec{S})] = m(\vec{r}) \otimes \rho(\vec{r}) \quad (7-1)$$

実用上、外縁部が急峻なマスク関数を使用すると、IFT した実空間関数に Gibbs 現象が生じてサポート形状推定を困難にするので、外縁部が滑らかに零に漸近するマスク

関数として Gaussian が用いられている。

$$M(\vec{S}) = \exp[-(\vec{S} - \vec{\alpha})^2 \chi^2 / 2]$$

$$\text{IFT}[M(\vec{S})] = \exp\left(-\frac{2\pi^2 \vec{r}^2}{\chi^2}\right) \exp(-2\pi i \vec{r} \cdot \vec{\alpha}) \quad (7-2)$$

ここで、 $\vec{\alpha}$ は回折パターン中でのマスク関数の中心位置、 χ はマスク関数の標準偏差である。暗視野像は複素数として再生されるため、HIO 実空間拘束条件では実部と虚部の両方を考慮する。暗視野位相回復では、構造振幅情報がマスク領域に限定され、高角領域回折強度の減少による Poisson ノイズの影響が顕著になる。これらに対応するため、ノイズに強い実空間拘束条件が提案されている³⁶⁾。

$$\rho_{k+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho'_k(\vec{r}) & \in \text{Support} \\ \rho_k(\vec{r}) - \beta \rho'_k(\vec{r}) & \notin \text{Support} \cap |\rho'_k(\vec{r})| > 3\delta_{\text{noise}} \\ 0 & \notin \text{Support} \cap |\rho'_k(\vec{r})| \leq 3\delta_{\text{noise}} \end{cases} \quad (7-3)$$

ここで閾値 δ_{noise} は、Poisson 統計に従って回折強度を評価することで決定する。

PDI の0.21 nm 分解能までの回折パターン (Fig. 8(a)) にマスク関数を乗じ、高角の暗視野領域のみを残した (Fig. 8(b))。このマスクパターンに暗視野位相回復を施すと、Fig. 8(c)の電子密度を得ることができた。さらに、この電子密度を初期サポートとし、原点付近が欠損した Fig. 8(a)のパターンに対して HIO-SW 位相回復を施した結果、Fig. 8(d)の投影電子密度が再生できた。

大きな試料や第6節に示した照射野に多数の粒子が存在

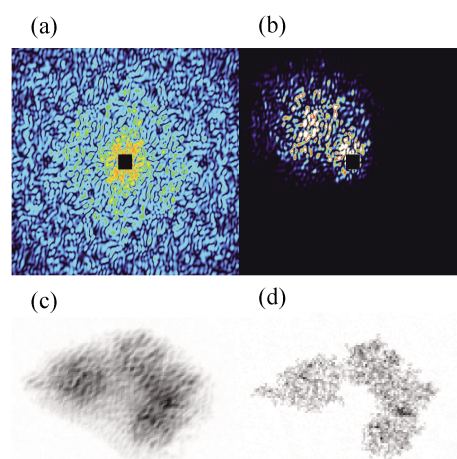


Fig. 8 (Color online) Dark-field phase retrieval method is a useful to obtain the initial support shape for HIO-SW calculation. Original diffraction pattern from PDI (a) is masked by a Gaussian (b). The dark-field phase retrieval applied to the masked pattern gave a Gaussian-smearing projection density (c) to be used as the starting model in the HIO-SW phase retrieval for the diffraction pattern in panel (a). The final projection map displays structural details of PDI.

在する試料からの回折パターンでは、スペックルサイズが小さくなるため、中心およびその周辺のスペックルを観測することが技術的にも困難である。そのような場合、暗視野位相回復法が実用上たいへん有効であると考えられる。我々は、現在、ガウス関数を用いた暗視野位相回復について、スペックルサイズ、分解能や制御パラメーター等の変化がどのように位相回復結果に影響を及ぼすかを検討しており、より使い勝手の良い暗視野位相回復法の構築を目指している。

7.2 Ewald 球に関わる問題

5, 6 節の解析では、投影定理を利用するため、入射 X 線伝播ベクトルに垂直な面の回折パターンからの画像回復を主として取り扱ってきた。しかし、実験では Ewald 球と交差した回折強度分布が回折パターンとして観測される (Fig. 9(a)) ので、以下の幾何学的考察が常に不可欠である。X 線入射方向の試料サイズが A の場合、Ewald 球面上の点 S_{obs} と $S_z=0$ 平面間の距離 (Fig. 9(a) 内の赤太線) が $1/2A$ よりも大きくなると、投影定理を適用することが困難になり、像回復される電子密度を投影像と近似することが困難となる。例えば、 A が 20 nm の粒子に対して 0.1 nm の X 線を用いる場合、投影定理を用いた解析は 1 nm 程度までの小角回折パターンに制限される。数 nm 波長の X 線は、試料の散乱断面積を高めるためには有利であるが、Ewald 球の半径が小さくなるために、投影定理の利用範囲が狭まる (Fig. 9(b))。

XFEL を用いた回折実験は破壊実験であり、1 個の粒子に対するトモグラフィーが不可能なことから、できれば、1 ショットでの回折パターンから高い分解能で三次元構造を回復したい。実際、理想的解析に向けた、いささか強引な解析方法が提案された³⁷⁾。長波長 X 線などを用いた構造研究への応用がなされているが、様々な批判を浴びている。

ここでは、この問題を解析的に考えてみたい。Ewald 球面上の回折強度と粒子の電子密度の関係は、以下の 2 点についての考察が必要である。

- (1) Ewald 球面上の構造振幅のみからの構造因子推定
- (2) Ewald 球面上構造因子の IFT で得られる電子密度と粒子の電子密度との関係

我々は、これらの問題について解析的な考察を試みてきたが、(1)については未だ明るい見通しが立っていない。(2)に関しては解析的理論展開が可能であり、粒子の電子密度 $\rho(\vec{r})$ と Ewald 球面上の構造因子から計算される電子密度 $\rho_{\text{Ewald}}(\vec{r})$ (Fig. 9(b)) は、Hermit 行列 $\mathbf{H}(r, r')$ を用いて $\rho_{\text{Ewald}}(\vec{r}) = \mathbf{H}(r, r')\rho(r')$ のように関係づけが可能であるが、十分な分解能までデータ収集を行う必要がある。(1)の問題については、投影定理を仮定した解析と同様、HIO-SW を用いた計算機によるアプローチが無難なようである。

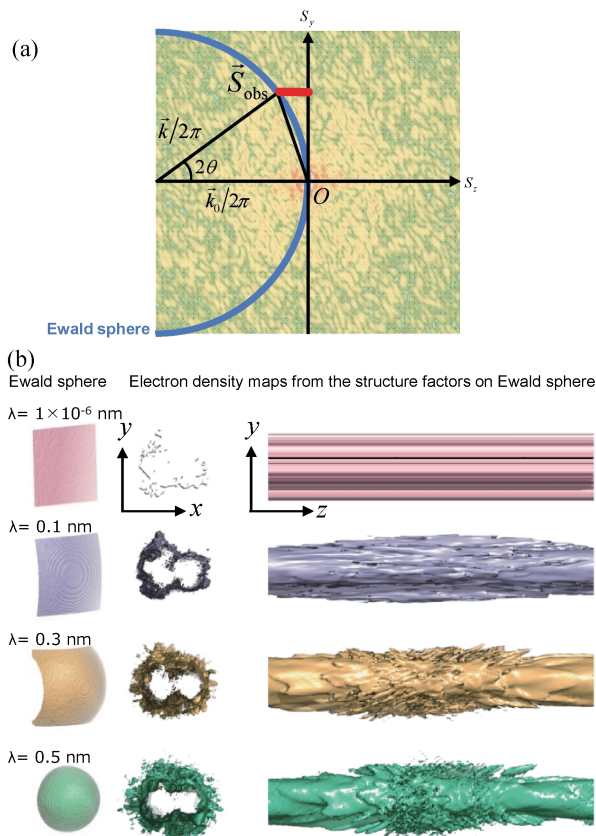


Fig. 9 (Color online) (a) Geometrical condition in elastic scattering and Ewald sphere. The cyan-colored line indicates the reciprocal distance between the plane normal to incident X-ray and Ewald sphere. (b) Variety of the Ewald sphere depending on wavelength of X-ray. For PDI molecule, the IFT of structure factor on Ewald sphere is calculated numerically and visualized.

7.3 マニフォールドによるダイナミクス・スナップショットの統合

XFEL を用いた実験は破壊実験であるため、1 つの粒子に何度も照射出来ず、従って多数の粒子を氷包埋するなどして、それぞれの粒子に順番に XFEL を照射する事になる。Fig. 7(a) の実験において、氷薄膜内の粒子が互いに異なる配向および構造をとる場合考えてみたい。各回折パターンから、ある方向から見た粒子のスナップショットが得られると考えられる。よって、膨大な数の回折パターンから回復される像を整理・統合することで、粒子のダイナミクスを調べることができるとも考えられる。

多変量解析 (5.1 参照) を用いると、構造が大きく異なる分子が混在しても、2 つのクラスに分けることができた (Fig. 10(a))。一方、微妙に異なる構造が複数含まれる場合、非常に多数のクラス分けが必要であり、クラス間の関係が不明のため、得られた多数のクラスからダイナミクスを調べる事はほぼ不可能であろう。このような場合、“マニフォールド” の概念³⁸⁻⁴⁰⁾ を用いれば粒子のダイナミクスを明らかにできるかもしれないと考えられ始めた。“マ

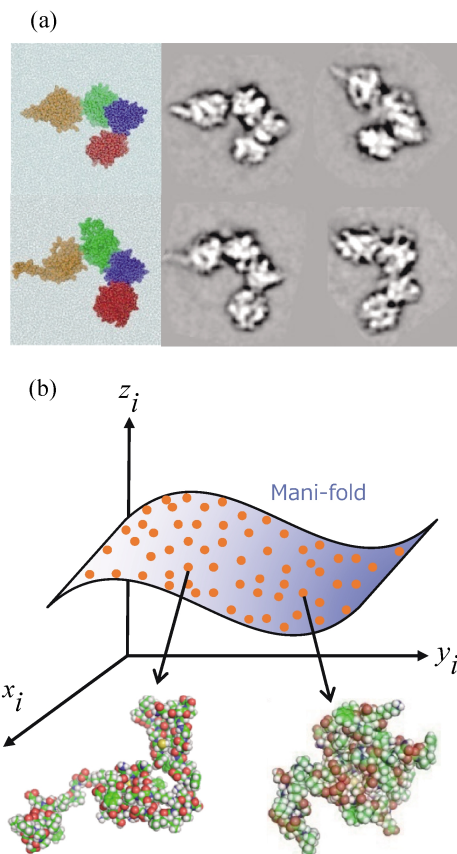


Fig. 10 (Color online) (a) The classification and averaging protocol is able to distinguish PDI molecules in two different conformations^{29,42} in the in-vacuum simulation. (b) Schematic illustration of manifold in multi-dimensional space used to describe the dynamics of molecular systems.

ニフォールド”を用いると、例えば、完成したパラパラ漫画を前後の関係が判らないようにバラバラにした後、画像を解析データをもとに元のパラパラ漫画を再構成できる。

マニフォールドの概念を、 N 原子で構成されるタンパク質のダイナミクスを例に考えてみる。**Fig. 10 (b)**のように各原子の (x, y, z) 座標で張られる $3N$ 次元空間（配位空間）を考える。タンパク質のある構造は、配位空間中の1点として与えられる。ここで原子間の結合により、すべての点は配位空間中のある拘束空間上に存在すると考えられる。この拘束空間のことをマニフォールドと呼ぶ。注目すべき事は、タンパク質の構造変化はマニフォールド上の点の移動に対応することである。従って何らかの方法でマニフォールドを特徴付けられれば、タンパク質のダイナミクスを調べることが可能となる。特徴付けを行う方法として Isomap³⁸, Diffusion Map³⁹などがある。また配位空間に限らず、例えば2次元回折データの各ピクセルにおける散乱強度を軸とする空間中でもマニフォールドを考えることが出来る⁴⁰。

我々は現在、マニフォールドの概念を利用した多数の2次元回折データから系のダイナミクスを調べる方法の構築

に向け研究を進めている。タンパク質に限らず、細胞など様々な系に適用出来る一般的な方法の構築を目指している。XFEL では数多くのスナップショットが測定されると想定されるので、スーパーコンピュータ「京」のような大規模計算機との連携も重要であろう。マニフォールドを用いた2次元回折データの新しい解析方法が完成すれば、新しい生命科学および計算科学が見えてくるのではないかと考えている。

謝辞

本稿に記した装置開発と実験には、文部科学省 XFEL 利用推進および重点戦略課題研究、特定領域研究、新学術領域研究、日本学術振興会の基盤研究（A）、挑戦的萌芽研究、および、理化学研究所からの SACLA 利用装置提案課題の支援を受けました。**Fig. 1, 3, 7**に示した実験結果は、SPring-8 理研ビームライン利用課題（課題番号 20110006）および SACLA 利用研究課題（課題番号 2012A8006）で得られました。

参考文献

- 1) J. Miao, D. Sayre and H. N. Chapman: J. Opt. Soc. Am. A **15**, 1662 (1998).
- 2) J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz and D. Sayre: Nature **400**, 342 (1999).
- 3) J. Miao, T. Ishikawa, Q. Shen and T. Earnest: Annu. Rev. Phys. Chem. **59**, 387 (2008).
- 4) J. R. Fienup: Appl. Opt. **21**, 2758 (1982).
- 5) C. Song, *et al.*: Phys. Rev. Lett. **101**, 158101 (2008).
- 6) Y. Nishino, *et al.*: Phys. Rev. Lett. **102**, 018101 (2009).
- 7) H. Jiang, *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 11234 (2010).
- 8) Y. Takahashi, *et al.*: Phys. Rev. B **80**, 054103 (2009).
- 9) http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/chousa/shinkou/022/attach/1308353.htm
- 10) 砂川重信：理論電磁気学第二版（紀伊國屋書店，1973）。
- 11) M. Born and E. Wolf: Principles of Optics 7th (expanded) edition (Cambridge University Press, Cambridge, 1999).
- 12) J. Drenth: Principles of Protein X-ray Crystallography (Springer-Verlag, New York, 1994).
- 13) J. Frank: Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies (Oxford University Press, Oxford, 2006).
- 14) R. Barakat and G. Newsam: J. Math. Phys. **25**, 3190 (1984).
- 15) S. Marchesini, *et al.*: Phys. Rev. B. **68**, 140101 (2003).
- 16) Y. Takayama and M. Nakasako: Rev. Sci. Instrum. **83** 054301 (2012).
- 17) J. Miao, K. O. Hodgson and D. Sayre: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 6641 (2001).
- 18) R. A. Crowther, D. J. DeRosier and A. Klug: Proc. R. Soc. Lond. **317**, 319 (1970).
- 19) R. Neutze, *et al.*: Nature **406**, 752 (2000).
- 20) 中迫雅由ら：レーザー研究 **40**, 680 (2012).
- 21) U. Weierstall, *et al.*: Exp. Fluids **44**, 675 (2008).
- 22) 中迫雅由ら：Optronics **31**, 101 (2012).
- 23) W. Kodama and M. Nakasako: Phys. Rev. E **84**, 021902 (2011).
- 24) M. Radermacher, *et al.*: Biophys. J. **61**, 936 (1992).

- 25) L. Lebert, A. Maurineau and K. M. Warwick: "Multivariate Descriptive Statistical Analysis" (Wiley, New York, 1984).
- 26) P. Penczek, R. Renka and H. Schomberg: *J. Opt. Soc. Am.* **21**, 499–509 (2004).
- 27) P. B. Rosenthal and R. Henderson: *J. Mol. Biol.* **333**, 721 (2003).
- 28) S. J. Ludtke, P. R. Baldwin and W. Chiu: *J. Struct. Biol.* **128**, 82 (1999).
- 29) G. Tian, *et al.*: *Cell* **124**, 61 (2006).
- 30) W. L. Jorgensen, *et al.*: *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
- 31) M. Nakasako: *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* **359**, 1191 (2004).
- 32) O. Glatter and O. Kratky: *Small-angle X-ray Scattering* (Academic Press, London, 1980).
- 33) 荳口友隆, 中迫雅由: 第25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 (2012年1月) 8P126.
- 34) T. M. Schmeing, *et al.*: *Mol. Cell* **20**, 437 (2005).
- 35) A. V. Martin, *et al.*: *Opt. Express* **20**, 13501–13512 (2012).
- 36) A. V. Martin, *et al.*: *Opt. Express* **20**, 16650–16661 (2012).
- 37) K. S. Raines, *et al.*: *Nature* **463**, 214 (2010).
- 38) J. B. Tenenbaum, V. de Silva and J. C. Langford: *Science* **290**, 2319 (2000).
- 39) R. R. Coifman and S. Lafon: *Appl. Comput. Harmon. Anal.* **21**, 5 (2006).
- 40) R. Fung, V. Shneerson, D. K. Saldin and A. Ourmazd: *Nat. Phys.* **5**, 64 (2008).
- 41) K. Tamasaku, *et al.*: *Nucl. Instrum. Meth. A* **467–468**, 686 (2001).
- 42) G. Tian, *et al.*: *J. Biol. Chem.* **283**, 33630 (2008).

著者紹介



中迫雅由

慶應義塾大学理工学部物理学科教授，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター基盤研究部客員主管研究員

E-mail: nakasako@phys.keio.ac.jp

専門：X線ナノイメージング

【略歴】

1990年，東北大学大学院理学研究科物理学第二専攻博士後期課程単位取得退学。

1990年，東京大学・薬学部・助手。1994年，理化学研究所・研究員。1997年，東京大学分子細胞生物学研究所講師。1996-1999年，JST さきがけ兼務研究員。2002年，慶應義塾大学理工学部物理学科助教授。2005年より現職。趣味は旧仮面ライダーカード収集。



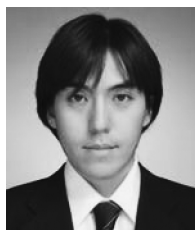
児玉 渉

2011年慶應義塾大学大学院基礎理工学専攻物理学専修修士課程修了



坂本啓太

2010年 慶應義塾大学大学院基礎理工学専攻物理学専修修士課程修了



笠口友隆

慶應義塾大学理工学部物理学科，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター基盤研究部客員研究員

E-mail: oroguchi@phys.keio.ac.jp

専門：生物物理

【略歴】

2007年，横浜市立大学生体超分子システム科学専攻博士研究員。2011年，慶應義塾大学理工学部物理学科助教。



吉留 崇

横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科特任助教

E-mail: t4yoshidome@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

専門：物理学，生物物理学，統計物理学，液体論

【略歴】

2007年，京都大学エネルギー理工学研究科博士研究員。2009年，京都大学エネルギー理工学研究科特定助教。2012年より現職。



高山裕貴

慶應義塾大学大学院基礎理工学専攻物理学専修博士3年，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター基盤研究部研修生

専門：X線回折イメージング

【略歴】

2010年，慶應義塾大学大学院基礎理工学専攻物理学専修修士課程修了。趣味はドイツロックとこびとづかん。



池口満徳

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科准教授，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター基盤研究部客員研究員

E-mail: ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

専門：生体分子シミュレーション

【略歴】

1994年，東京大学大学院農学系研究科博士課程修了。1994年，東京大学農学部助手。2001年，横浜市立大学大学院総合理学研究科助教授。2009年より現職。



小林 周

慶應義塾大学理工学部物理学科4年，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター基盤研究部研修生

専門：X線回折イメージング

Development and prospect of theory in coherent X-ray diffraction imaging

Masayoshi NAKASAKO^{1,2}, Tomotaka OROGUCHI^{1,2}, Yuki TAKAYAMA^{1,2},
Amane KOBAYASHI^{1,2}, Wataru KODAMA¹, Keita SAKAMOTO¹,
Takashi YOSHIDOME³, Mitsunori Ikeguchi³

¹Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Keio University
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Kanagawa, Yokohama 223-8522, Japan

²Infrastructure Research Group, Synchrotron Radiation Research Center, Harima Institute, RIKEN
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan

³Department of Supramolecular Biology, Yokohama City University
1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Abstract Coherent X-ray diffraction imaging is an useful technique to visualize the three-dimensional structures of non-crystalline particles, which have not been crystallized. The projection structures of sample particles are obtained only from the structure amplitudes of diffraction patterns, and the three-dimensional structures are reconstructed from tomography experiments. In this review, we revisit the structure analysis theories specific to this technique. In addition, we introduce our protocol, which is developed for structure analyses of particles/molecules embedded in water drops and vitreous ice. We also summarize problems to be solved for future application of this technique.