

# 生物細胞の低温 X 線回折イメージング

中迫雅由<sup>1,2</sup>, 高山裕貴<sup>1,2,\*</sup>, 小林 周<sup>1,2</sup>, 山本隆寛<sup>1,2</sup>, 大出真央<sup>1,2</sup>,  
岡島公司<sup>1,2</sup>, 笠口友隆<sup>1,2</sup>, 山本雅貴<sup>2</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター放射光利用システム開発研究部門  
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

\*現所属 兵庫県立大学大学院物質理学研究科 X 線光学分野 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

## 要旨

X 線回折イメージングは、結晶化が原理的に不可能な生体非結晶粒子の立体構造解析に適した手法である。回折パターンからは、入射 X 線方向への粒子の投影構造が得られ、さらに、トモグラフィー実験によって三次元電子密度を再構成できる。X 線の透過性により、電子顕微鏡では観察できない 500 nm 以上の大きさを持つ生体粒子の内部構造全体を、超解像顕微鏡を超える分解能で観察可能である。本稿では、X 線回折イメージングによる細胞などの三次元構造解析に焦点を当てながら、現在の実験及び解析方法の到達点を示す。

## 1. はじめに

大きさ 1~10  $\mu\text{m}$  程度の生物細胞は、高度かつ多階層的に組織化された細胞内小器官で構成され、その機能空間内には生命現象の素過程を担う生体分子が集積されている。現代生物学は、遺伝子産物である生体分子の機能、構造、ダイナミクスや細胞内動態を可視化することで、様々な時空間階層についての理解を進め、細胞における生命現象発露のスキームを理解しようと発展してきた。その過程で、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡などのレンズを用いるイメージング手法が大きな貢献をなしてきた。

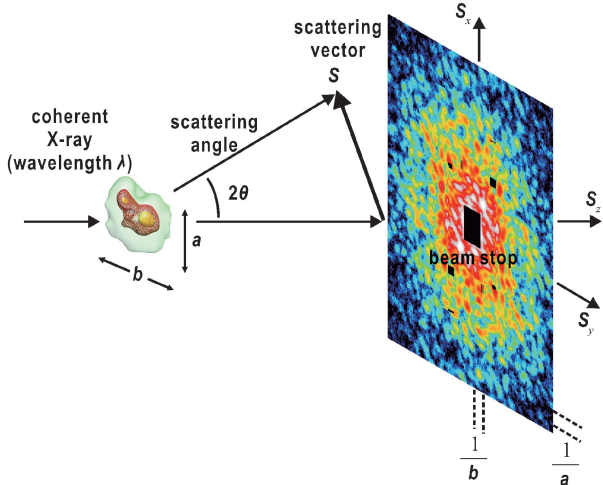
蛍光顕微鏡やその発展型である超解像顕微鏡では、特定の生体分子に結合させた蛍光色素分子や蛍光蛋白質からの蛍光発光を観測し、測定イメージに対する演算を通じて回折限界を超えた測定が可能となっている<sup>1)</sup>。しかしながら、蛍光分子ラベルした数種類の標的分子の位置のみが高い解像度で得られるものの、細胞全体を同じ分解能で眺めているわけではない。透過型電子顕微鏡では、200-300 keV の運動エネルギーを持つ電子を試料に照射し、弾性散乱電子波を結像させることで、試料の実像を得る<sup>2)</sup>。しかしながら、電子線の透過性は低く、また、多重散乱を起こしやすいため、信頼のおける試料の厚さは 100 nm 程度となっており、細胞の内部構造を観察する場合には、架橋剤処理した細胞をレジンなどで固定後、超薄切片化する必要がある<sup>3)</sup>。

これら洗練されたイメージング手法を用いても、直接観察が困難な空間階層が存在する。例えば、細胞核内での核酸の格納形態を数十ナノメートル分解能で直接可視化することは現在でも困難であり、核内での核酸分布や細胞分裂

期の染色体形成メカニズムには、依然として不明な点が多い<sup>4)</sup>。また、細胞内での化学信号伝達が分子衝突のみで行われているのか、あるいは、予め生体分子が集積された形で進行するのかといった素朴な問題も未解明である。細胞や細胞内小器官全体を、加工や修飾なしに、数十 nm の解像度で可視化できるイメージング技術があれば、これらの問いに答えることができる可能性がある。

本稿で取り上げる X 線回折イメージング (X-ray diffraction imaging: XDI) は、1999 年に実証実験がなされた新しい構造解析法である<sup>5,6)</sup>。XDI 実験では、高い空間コヒーレンスを持つ X 線 (理想的には、単色平面波) を試料粒子に照射し、高い空間分解能を持つ検出器で得られる回折パターンの構造振幅から、反復的位相回復法<sup>7)</sup>を用いて、粒子の入射 X 線方向への投影電子密度を復元する (Fig. 1)。透過性の高い短波長 X 線を用いる場合、XDI は、電子顕微鏡の適用範囲を超えた厚みをもつ細胞丸ごとの三次元構造を、非侵襲かつ光学顕微鏡で到達不可能な解像度で可視化できる可能性がある<sup>8)</sup>。

現在、コヒーレント X 線は SPring-8 のような第三世代シンクロトロン放射光施設や X 線自由電子レーザー (X-ray free electron laser: XFEL) 施設で利用できるようになった。シンクロトロン放射光 (synchrotron radiation: SR) を用いる実験では、試料を低温に保つことで放射線損傷を低減しながら、トモグラフィーによって細胞一個の三次元構造を 100 nm を超える分解能で可視化できる<sup>9)</sup>。また、XFEL を用いる場合には、試料が XFEL パルスで破壊されるものの<sup>10)</sup>、入射 X 線に対して様々な配向にある試料粒子を大量に用意し、XFEL パルスに対して試料粒子を次々に投入することで、それら粒子に共通



**Fig. 1** (Color online) A Schematic illustration of XDI experiment. A spatially isolated specimen particle is irradiated by X-rays with the high spatial coherence. A beam stop is placed in front of an area detector to absorb the direct X-ray beam. The diffraction pattern is composed of a number of speckle peaks. The sizes of speckle peaks are approximately the reciprocal of particle sizes viewed along the direction of the incident X-ray beam. The magnitude of scattering vector is defined as  $S = 2 \sin \theta / \lambda$ .

な三次元電子密度分布を描き出すことができるようになってきている<sup>11)</sup>。本稿では、我々が過去10年にわたって独自に開発してきた技術及び解析手法<sup>8)</sup>を用いた、SR-XDIやXFEL-XDIによる生物細胞構造解析の現状を紹介する。

## 2. XDIによる細胞の三次元構造解析

### 2.1 XDI実験<sup>8)</sup>

単色平面波X線を物質に照射すると、その電場によって物質内の電子が振動運動し、入射X線と同じ波長のX線が生じる(双極子放射)。双極子放射波(散乱波)は、Maxwell方程式の線形性に従って足し合わされ、照射領域の物質内電子密度分布に起因した‘スペックル(speckle)’と呼ばれる細かな干渉縞が生じる(Fig. 1)。波長 $\lambda$ 、強度 $I_0$ の単色平面波X線を試料に入射した場合、試料から十分遠い距離 $R$ において、回折角 $2\theta$ の散乱ベクトル $\mathbf{S}$ で観測される回折強度 $I(\mathbf{S})$ は、次式で与えられる。

$$I(\mathbf{S}) = I_0 r_e^2 \left( \frac{\lambda}{\sigma A} \right)^2 F^*(\mathbf{S}) F(\mathbf{S}) \frac{P}{R^2}$$

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

ここで、 $r_e$ は古典電子半径( $2.8179 \times 10^{-15}$  m)、 $\sigma$ は後述するオーバーサンプリング比、 $P$ は入射波の偏光因子である。 $F(\mathbf{S})$ は構造因子で、X線照射野にある粒子の電子密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ のFourier変換として表される。構造因子

$F(\mathbf{S})$ は、構造振幅 $|F(\mathbf{S})|$ と位相 $\alpha(\mathbf{S})$ で記述されるが、実験では回折強度しか観測できないため、構造因子の逆Fourier変換によって電子密度分布を再構成するには、測定で失われた位相を知る必要がある(構造解析における位相問題)。また、双極子放射は見かけ上弾性散乱であり、入射伝播ベクトルと散乱伝播ベクトルの大きさが等しくなるため、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)と交差する強度分布に限られる。単色X線を用いる実験では、試料を入射X線に対して回転することでEwald球と逆空間強度分布の交差を変化させて、強度分布を測定する。

### 2.2 入射X線強度と分解能

古典電子半径に由来する試料の散乱断面積の小ささを克服するには十分な強度を持つ入射X線を用いる必要がある。現在、生物細胞試料について50 nm程度の分解能までのスペックル回折パターンを得たい場合、数十～数百秒の露光が可能なシンクロトロン放射光実験では、数マイクロンサイズの細胞を、またシングルショットで粒子が壊れてしまうSACLAでは、集光XFEL強度とパルスの断面積(半値幅で $1.5 \mu\text{m}$ 程度)の制限から、 $\sim 1 \mu\text{m}$ 程度の粒子が必要となっている。

XDI実証実験に続いて、2001年に、XFELとXDIを組み合わせることで蛋白質分子の単粒子構造解析が可能になるというシミュレーションが報告された<sup>12)</sup>。同論文では、入射X線強度に関する記述があいまいであったことから、今日でもなお、XFELを用いて蛋白質分子の単粒子解析が可能と考える研究者がいる。ここでは、その可能性について検討しておきたい。波長0.1 nm、オーバーサンプリング比4の条件下で、分子量30万の蛋白質分子複合体(サイズ10 nm)の構造解析を可能とする回折パターン取得に必要な入射X線強度を、式(1)を用いて見積もる。複合体の総電子数は $2 \times 10^5$ 程度であり、距離を1とした前方散乱強度は、

$$I(0) = I_0 (2.8 \times 10^{-6} \text{ nm})^2 \frac{0.1 \text{ nm} \times 0.1 \text{ nm}}{4 \times 10 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}} \left| 2 \times 10^5 \right|^2 \frac{1}{\text{nm}^2}$$

$$= I_0 \times 7.84 \times 10^{-6}$$

となる。この分子の立体構造を0.2 nm程度の分解能で解析する場合を考える。散乱強度が蛋白質を構成する原子の原子散乱因子の散乱角依存性に起因して、高い分解能で回折強度が大きく減衰することから、前方散乱では $10^6$ 程度のX線が望まれる。これを実現するには、分子1個の断面積 $100 \text{ nm}^2$ に $10^{11}$ 以上の入射X線光子( $10^{11}/100 \text{ nm}^2 = 10^{15}/10^6 \text{ nm}^2$ )が必要である。現在、SACLAのBL3EH4で利用できる光子数は $10^{10}/10^6 \text{ nm}^2$ 程度なので、試料に入射するX線光子数を5~6桁増強させることが必要になる。そのため、現状、巨大な蛋白質や蛋白質複合体の

構造解析は、近年大きな発展を遂げた透過型電子顕微鏡を用いて行うことが主流となっている。

単純に光子数を増強させるだけではなく、超強光子場による原子損傷についても配慮する必要がある。現状の XFEL を用いる結晶解析においては、XFEL 照射で得られる回折パターンから予想される原子散乱因子が理論値に比べて小さいという指摘がある<sup>13)</sup>。完全な Diffraction before destruction 実現のためには、現状の 10 fs 程度より十分に短いパルス幅が必要になるであろう。波長 0.1 nm の 10 fs パルスの場合、古典的には、約 3000 回の電子振動による双極子放射が発生しているが、パルス幅を極端に短くした場合、そもそも Thomson 散乱が起こるのかという時間幅にまで達するかもしれない。

### 2.3 位相回復の概要

細胞などの XDI 実験では、Ewald 球を平面と見做すことができる極小角領域で回折パターンを記録しているので、構造振幅と電子密度の間には、投影定理<sup>14)</sup>が成り立つ。投影定理によれば、三次元電子密度の投影像の二次元 Fourier 変換は、逆空間原点を通過する一断面となる。

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

$$\rho_P(x, y) = \int_z \rho(x, y, z) dz \quad (2)$$

よって、逆空間原点を通り入射方向に垂直な平面の構造因子  $F(S_x, S_y)$  は、試料粒子内電子密度分布  $\rho(r)$  を入射方向 ( $S_z$ ) に投影した電子密度  $\rho_P(x, y)$  の Fourier 変換となる。

ビーム照射野に完浴された試料粒子の投影電子密度  $\rho_P(x, y)$  を  $N_x \times N_y$  ピクセル (ピクセルサイズ、あるいは解像度  $\Delta x, \Delta y$ ) で書き表す場合、散乱ベクトル ( $S_x, S_y$ ) で指定される検出器上の任意ピクセルで観測される構造振幅は

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

と与えられる。いろいろな ( $S_x, S_y$ ) で構造振幅を測定し、連立方程式数 (検出器ピクセル数) が  $N_x \times N_y$  以上であれば、 $\rho_P(x, y)$  を求めることができる。試料粒子に異常散乱原子が含まれないか、あるいは、その吸収端から遠く離れたエネルギーをもつ X 線を用いる場合、回折パターンの Friedel 対称性 ( $|I(\mathbf{S})| = |I(-\mathbf{S})|$ ) によって、方程式数は  $\left( \frac{N_x \times N_y}{2} \right)$  となる。これに対して、回折パターンを、 $S_x$  方向に  $\sigma_x (\sigma_x > 1)$  倍かつ  $S_y$  方向に  $\sigma_y (\sigma_y > 1)$  倍で測定する場合、

$$\sigma = \sigma_x \sigma_y > 2 \quad (4)$$

であれば、中心対称性に起因する情報欠落を補って、投影電子密度を得ることができる。この条件を oversampling (OS) 条件、 $\sigma$  を OS 比と呼ぶ<sup>15)</sup>。

XDI の構造解析では、OS 条件で得た構造振幅に反復的位相回復アルゴリズム<sup>7)</sup>を適用することで投影電子密度を再生している。同アルゴリズムでは、実空間と逆空間を Fourier 変換と逆 Fourier 変換によって交互に往来しながら、算出された投影電子密度や構造振幅に拘束条件 (constraint) を課して投影電子密度を回復する。計算された投影電子密度の中で粒子が存在する領域 (support) に対する拘束条件のかけ方が異なるアルゴリズムが提案されている。本来、粒子のみが電子密度を持つため、粒子投影像形状を support とすることで位相回復速度や精度の改善が見込まれる。この点を積極的に考慮したのが Shrink-wrap (SW) アルゴリズムである<sup>16)</sup>。我々の場合、hybrid-input-output (HIO) アルゴリズム<sup>7)</sup>による反復的位相回復計算サイクル中で SW によって動的に最適サポート領域を更新する位相回復プログラムを用いている<sup>17)</sup>。

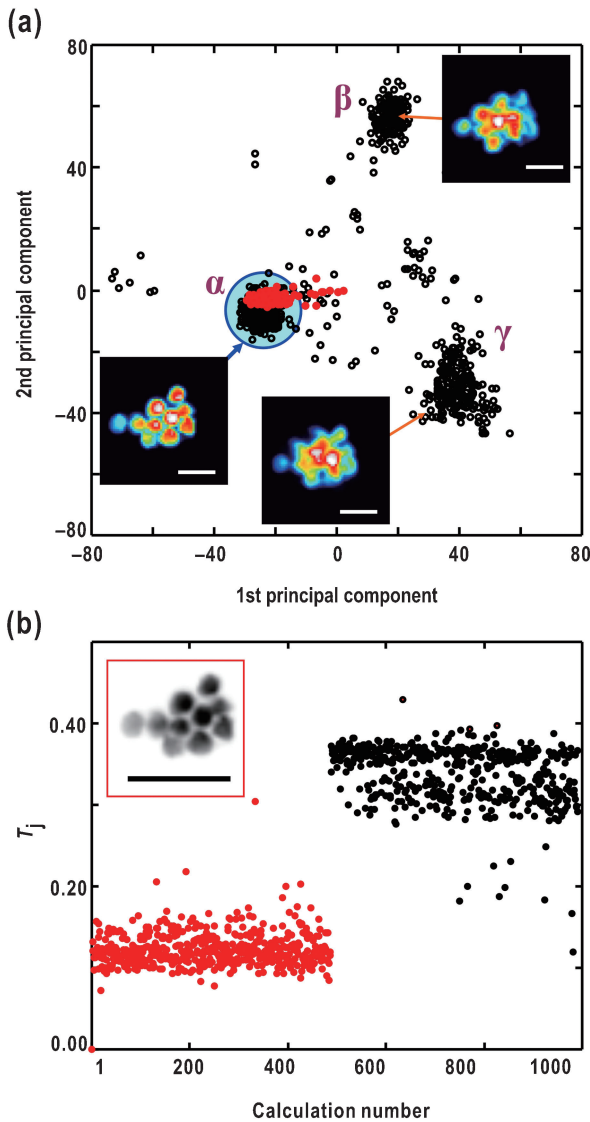
回折強度が弱くノイズを多く含む生体粒子等の回折パターンからの位相回復の確からしさを向上させるため、Oversampling smoothness (OSS) アルゴリズム<sup>18)</sup>が考案された。このアルゴリズムでは、ノイズの影響を排除するために、散乱ベクトル長が大きいほど強度が減衰するようなフィルタを施し、ノイズが少ない低角領域に重みをもたせる。位相回復サイクルの初期段階では HIO アルゴリズムと似た処理を施し、サイクルが進むにつれてフィルタを変化させる。

### 2.4 位相回復投影電子密度の選択

実験で得られる回折パターンには、ビームストップによる前方散乱とその周辺スペックルの欠損、強い回折 X 線に対する検出器の飽和、X 線検出における Poisson ノイズが生じている。このため、一度の位相回復計算で得られる電子密度は、必ずしも正しいものであるとは限らない。そのため、実験で得られる回折パターンに対しては、1000 回程度の独立した位相回復計算を行い、その中から最も確からしいものを選択する必要がある。

#### 2.4.1 主成分分析と分類<sup>19)</sup>

反復的位相回復で得られた投影電子密度が  $L \times M$  ピクセルの画像である場合、各ピクセルの電子密度を変数とすれば、一枚の投影電子密度は  $J = L \times M$  次元の画像超空間の一点として表現できるので、独立した位相回復計算で得た  $N$  枚 (通常 1000 枚) の画像は、ピクセル番号を列、画像番号を行とする行列で表現される。



**Fig. 2** (Color online) (a) A result of the multivariate analysis for 1,000 projection electron density maps retrieved from a diffraction pattern of ten gold colloidal particles with the diameter of 250 nm. After principal component analysis, each density map is represented as a point in the plane spanned by the two principal components (black dots). Among three major clusters labeled  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , only cluster  $\alpha$  give the correct projection electron density maps. The red dots indicate maps selected by the Manhattan distance analysis in panel (b). (b) The Manhattan distance of 999 projection maps calculated for a most probable one. The red dots indicate the Manhattan distance values of correct maps shown in the inset, while the black dots are those of failed calculations. In most cases, the retrieved maps with the Manhattan distance smaller than 0.2 are probable. When the maps were represented in the plane of the two principal components in panel (a), they overlap to the most probable cluster  $\alpha$ . Panels are reused from [doi: 10.1107/S1600577517008396] after modification with permission from The International Union of Crystallography

$$\Psi = \begin{pmatrix} \psi_{11} & \dots & \psi_{1J} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_{M1} & \dots & \psi_{MJ} \end{pmatrix} \quad (5)$$

この行列に対する主成分分析により、低次元主成分空間での電子密度図の分布を可視化し、K-means clustering法によって電子密度図を分類後、最もふさわしいものを選択する (Fig. 2(a)).

実験で得られた回折パターンについては、まず、確からしいサポートを探すべく、独立したHIO-SW位相回復計算で得られる1000枚の投影電子密度に対して上記の多変量解析プロトコルによって、最も確からしいサポートを定める。次に、このサポートに対してOSSによる1000回の独立した位相回復計算を行い、多変量解析プロトコルによって尤もらしい内部構造を探索する。二段階の解析では、計2000回におよぶ位相回復計算を行う。分類されたクラスの中から、スペックルパターンから推定される粒子サイズ、結晶学的R因子、phase retrieval transfer function (PRTF) やクラスを構成する画像数等を頼りに、細胞試料らしいものを選択する。

#### 2.4.2 Manhattan 距離を用いる電子密度図の選択<sup>20)</sup>

主成分分析とクラスタリングによる電子密度図を分類しても、指標が良好で出現頻度が高いクラスが必ずしも正しい電子密度図を与えるわけではない。このため、多変量解析は、回復された電子密度図の分類には適するが、最終的な成否の判定を自動で行うには難がある。

以下の規格化された Manhattan 距離 (以下では、単に Manhattan 距離と呼ぶ) が位相回復の成否を判定するのに有効であることが明らかになり、生体粒子の回折パターンからの位相回復にも適用されつつある。二つの投影電子密度に対して Manhattan 距離は以下のように定義される。

$$T_{ij} = \frac{\sum_{x,y} |\rho_i(x,y) - \rho_j(x,y)|}{\sum_{x,y} |\rho_i(x,y) + \rho_j(x,y)|} \quad (6)$$

これは、二つの電子密度を構成するピクセルごとに、電子密度の差異を足し合わせ、二つの電子密度図の総電子数で規格化したものである。

個々の形状やサイズが予め判っている金属材料粒子のクラスターからの回折パターンに対して位相回復を行ってみると、正しい電子密度同士の Manhattan 距離は0.2以下の値となるのに対して、間違った電子密度図同志、あるいは、正しい電子密度図と間違った電子密度図の組が与える Manhattan 距離は、0.4-0.9の大きな値になることが経験的に明らかになった。これは、ほぼ正しい位相の組から計算される投影電子密度は相互に類似しているが、不正解の

投影電子密度は大きく異なることを示唆している (Fig. 2 (b))。

通常、二つの電子密度の相似性を評価する場合、相関係数を用いることが多い。相関係数は、画像空間における画像点を表現する多次元ベクトルの内積に相当しており、細かな電子密度図の差異よりは、ベクトルの向きが似ているかどうかを反映している。それに対して、Manhattan 距離は、電子密度の細かな差異を反映し、相関係数が高い場合でも異なる画像として認識できると考えられる。多変量解析で次元削減された主成分ベクトル平面から選択される確からしい電子密度図の集団と、小さな Manhattan 距離を与える組がほぼ一致することから (Fig. 2(a))、一つの回折パターンに対する多数回の位相回復電子密度について相互に規格化された Manhattan 距離を計算すれば、正しい電子密度の組を自動で推定できるであろう。

## 2.5 三次元電子密度の再構成

試料粒子が、入射 X 線に対して、その特徴的構造を眺めることのできる特別な配向にある場合、試料の三次元構造について何らかの推定をなすことは可能である<sup>21,22)</sup>。しかしながら、そのような特別な場合を除いて、粒子の立体構造に言及するには、三次元電子密度が不可欠である。このために、入射伝播ベクトルに対して様々な配向にある粒子の回折パターンを多数取得する必要がある。最初に提案された XDI での構造解析では、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して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とされていた<sup>12)</sup>。

我々は、スペックルパターンが、試料の微細な変化に頼る敏感であることを考慮して、各回折パターンから投影電子密度を回復し、電子顕微鏡で開発された単粒子解析<sup>14,23)</sup>を用いて三次元電子密度を再構成するという手順も提案している<sup>17)</sup>。SR トモグラフィ実験では、単一の試料粒子を回転させながら回折パターンを得、それぞれの回折パターンについて位相回復によって投影電子密度図を得、従来の三次元位相回復法や back-projection 法<sup>14)</sup>を用いて三次元電子密度図を再構成する。

試料粒子が一度の照射によって破壊されてしまう XFEL-XDI 実験では、粒子の均一性を担保したうえで、試料粒子を薄膜上に散布後、スキャンによって回折パターンを得る (5.2 参照)。粒子の薄膜上での配向はランダムであると考えられるので、どの方向から粒子に X 線が照射されたのかを common line 法<sup>14)</sup>によって決定して Fourier Reconstruction 法<sup>14)</sup>などで三次元像を再構成する。一度の試行で得る初期モデルはかなり大雑把なものであるため、projection matching 法<sup>14)</sup>などによって配向を精密化し、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。

再構成された電子密度図の有効分解能は、以下で定義さ

れる Fourier Shell Correlation (FSC)<sup>14)</sup>

$$FSC(S) = \frac{Re \sum_{S' \in S} F_1(S') \cdot F_2^*(S')}{\sqrt{\sum_{S' \in S} |F_1(S')|^2 \sum_{S' \in S} |F_2(S')|^2}} \quad (7)$$

を用いる。 $F_1(S')$ 、 $F_2(S')$ 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  $S$  を分解能とする場合が多い。これは位相の不確かさが60度程度であることに対応する<sup>24)</sup>。

## 3. 低温 XDI 実験用凍結水和試料作製

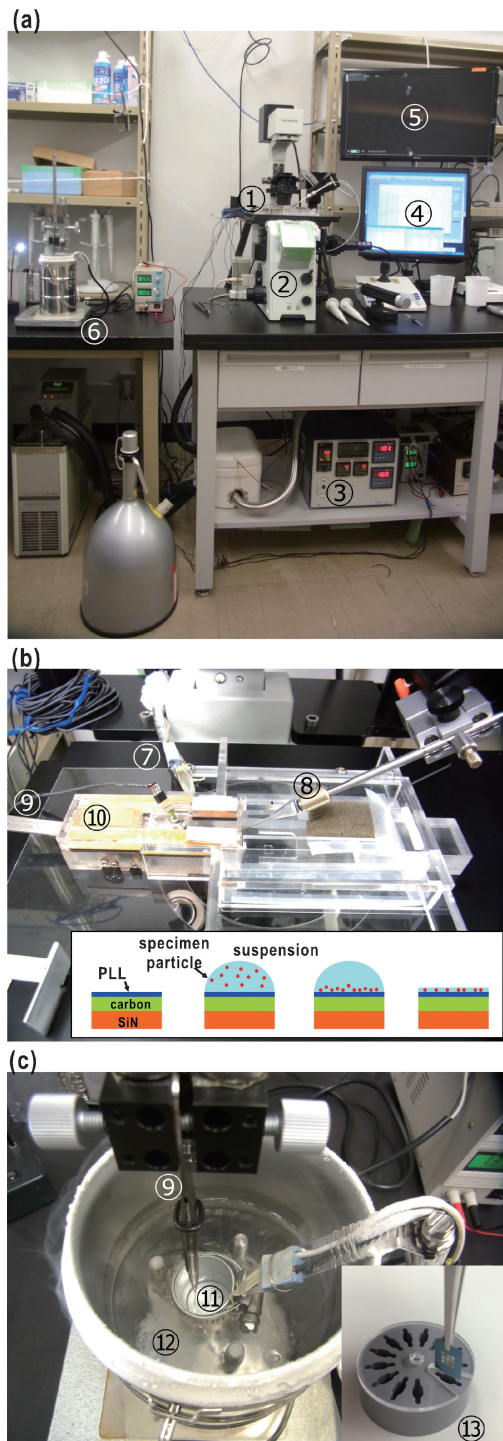
### 3.1 低温 XDI 実験はなぜ必要か？

XDI は、室温下真空中に置かれた細胞やオルガネラの構造解析に適用されてきた<sup>25,26)</sup>。散乱断面積の小さな細胞等の生体試料に対する X 線回折実験では、試料を真空中に設置し、空気からの散乱や空気による吸収を低減させることが要求される。しかし、真空中に置かれた生体粒子は、乾燥、低圧下の発泡や断熱膨張などにより、生来の構造破壊が生じる可能性が高い。さらに放射線損傷を受けるために、得られた電子密度分布に生物学的価値があると考えるのは難しい。室温湿潤環境下での測定も試みられているものの<sup>27)</sup>、放射線損傷による二次的破壊産物を見ることになる。このような問題を克服するには、試料粒子を非破壊的に低温凍結し、低温下で回折実験を実施可能な回折装置や試料作製方法の開発が必要である。

蛋白質の低温 X 線結晶構造解析や電子顕微鏡観察で示されてきたように、急速凍結によって、水和凍結状態の生体試料が作成できることから、水和凍結試料を作成すれば、低温真空環境で回折実験を行える。医学分野での凍結保存細胞を用いた人工授精や、分子生物学分野での細胞凍結保存などで明らかにされているように、凍結細胞が室温に戻ると、生命活動を再開できることから、急速凍結は細胞の生命活動を一時的に停止していると考えられる。細胞は、時々刻々その構造や形態を細胞周期に応じて変化させているので、低温凍結は、特定の状態にある大量の細胞の活動を一時停止して XDI 実験に供するには頗る有効な方法であると言える。

### 3.2 湿潤環境下での水和凍結試料作製

生体試料粒子は大きくても10 μm であるため、試料作製時の乾燥防止措置は極めて重要である。これまでに開発した蛋白質結晶用の湿度制御技術<sup>28)</sup>を拡張し、湿度制御空気環境下で、試料粒子を取り扱いながら低温凍結可能なシステムを構築した<sup>29)</sup> (Fig. 3(a))。窒化珪素膜のような薄膜に試料粒子を吸着させ、余剰な溶媒をブロッティングと湿度制御下での蒸散によって最小化し、試料の乾燥を防ぎ



**Fig. 3** (Color online) (a) A system for preparing specimens for XDI experiments at cryogenic temperature. The system is composed of humidity controlling chamber (1), light microscopy (2), moist air generator (3), monitors (4, 5) and liquid ethane cooling device (6). (b) The humidity controlling chamber is composed of a tube supplying moist air (7), micro-injector mounted on a micro-manipulator (8), pincette (9), pincette carrier (10). The inset illustrates the specimen preparation for XFEL-XDI experiments. (c) A flash-cooling device (9) fixed to a slider is plunged into liquid ethane (11) produced inside an aluminum cup cooled by liquid nitrogen (12). Cooled specimen disks are put into storage container (13) in liquid nitrogen.

ながら液体エタン冷却装置によって粒子試料を薄膜ごと急速凍結する。試料粒子担体として使用する窒化珪素膜は疎水性が高く、細胞等を十分に吸着できないため、真空蒸着装置を用いて炭素薄膜を成膜後、ポリリジン層を塗布して、細胞試料への親和性を高めておく (Fig. 3(b))<sup>30)</sup>。

トモグラフィー実験用には、試料粒子一個をマイクロキャピラリーに吸引し、シリコンフレームに張られた窒化珪素薄膜の中心付近に置く。余剰な溶媒を微細な濾紙やマイクロキャピラリーで取り除き、さらに、相対湿度を下げて、余剰な水分を蒸散させ<sup>29)</sup>、実験での試料位置確認を容易にするために、シリコンフレームに対する相対位置を記録する。もともと、試料溶媒の緩衝液濃度は低いので、これによって細胞試料等が浸透圧変化で収縮することは無い。ただし、培養温度と作業を行う温度での温度差による細胞の劣化を防ぐために、細胞を作業温度で培養して、予め馴らしておく必要がある。XFEL-XDI 実験では、試料粒子の懸濁液を薄膜上に滴下し、粒子がポリリジン層へ吸着したところを見計らって余剰な水分を除去する。試料板周辺の湿度を KCl 溶液等で保ちながら特製シャーレに移し、スピナーで余剰な液を除く方法が簡便で迅速である。

試料の冷却では、薄膜を含む試料板全体を冷却するので、低温窒素ガスに比べて冷却速度が勝る液体エタンを用いる (Fig. 3(c))。液体エタンは、温熱物体を入れても発泡せず、熱伝達率が高い。冷却効率は投入速度に依存し、リアガイドを用いて 1 m/s 程度の速さで試料を液体エタン中に投入すると、200 K/10 ms 程度の冷却速度が得られる。急速凍結やその後の試料取り扱いでは、エタンの凝固点 (90 K) が液体窒素温度よりも高いことや、デューワー内での温度分布などに注意を要する。凍結後は、試料を液体エタンから持ち上げ、動作距離が長い望遠鏡を用いて試料の凍結状態を確認する。凍結した試料板は専用の塩化ビニル製保存容器に挿入して保存するが、試料保存室は、試料板の薄膜面が接触壁面に接触することが無いように加工する (Fig. 3(c))。

### 3.3 回折装置真空槽への搬送<sup>8,31,32)</sup>

XDI 実験では、次項以降で述べる低温試料固定照射装置を利用している。装置は、試料を大気中から  $10^{-4}$  Pa 程度に保たれた回折装置の真空槽へ搬入するため、ロード・ロック・チャンバーを備えている<sup>31,32)</sup>。凍結試料は、液体窒素中で専用ホルダーに固定し、液体窒素中からロード・ロック・チャンバーへの移動では、昇温と結霜を避けるための専用キャリアを用いる<sup>31,32)</sup>。キャリアは、運搬用フレームと、フレーム内への外気の侵入を防ぐ遮蔽で構成され、遮蔽を液体窒素中や真空中で開放操作して、ホルダーの着脱を行う。液体窒素中で試料ホルダーを装填後に遮蔽を閉じたキャリアを、大気開放状態のロード・ロック・チャンバーに設置する。チャンバー内を真空にし、結

露の心配がなくなったところで遮蔽を上げ、真空槽とチャンパー間のゲート・バルブを開放し、直線導入機を改造した搬送ロボットが、試料ホルダーを低温試料ステージに搬送・設置・後退する<sup>31,32)</sup>。

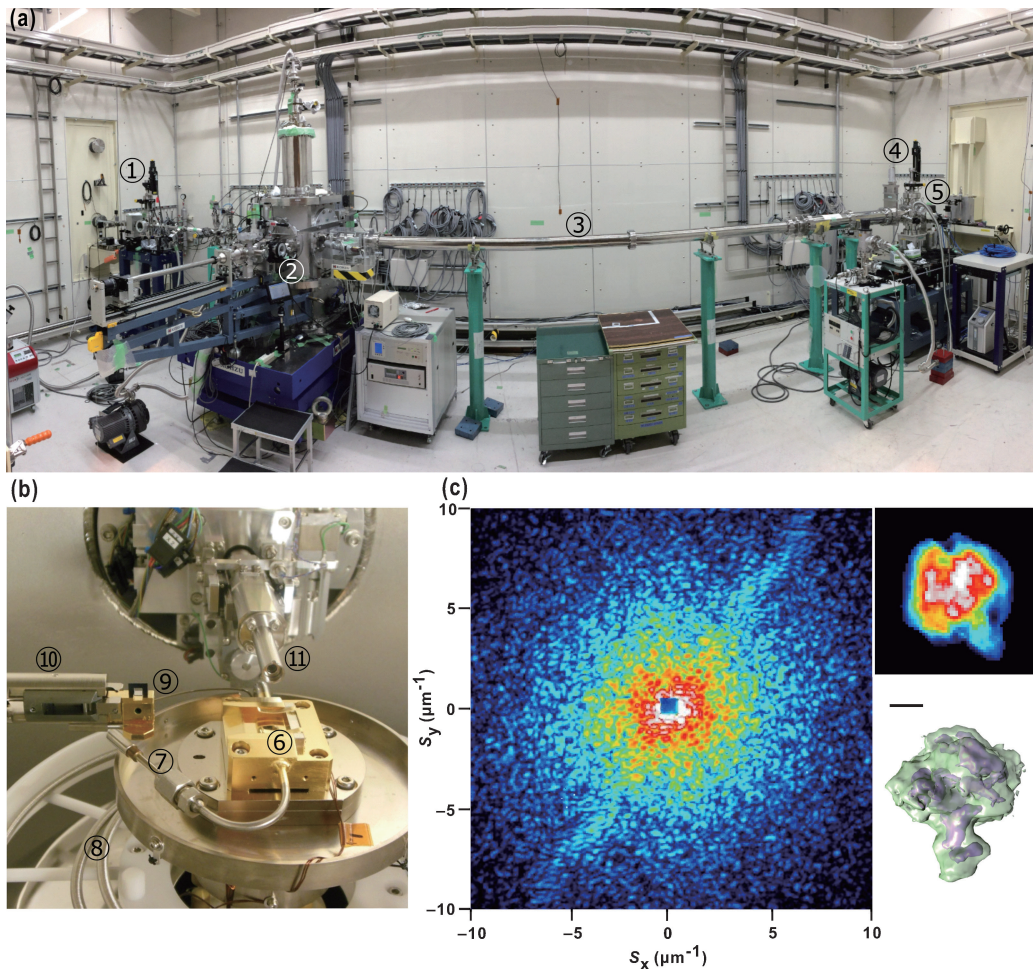
#### 4. 放射光 X 線を用いる低温トモグラフィー XDI 実験<sup>8,31)</sup>

ここでは、SPring-8 の BL29XUL<sup>33)</sup>での低温試料固定照射装置『壽壺号』<sup>31)</sup>を用いた低温トモグラフィー XDI 実験を紹介する (Fig. 4)。実験では、試料を低温に保つことにより、放射線損傷を大きく低減しながら、一個の細胞試料を長時間測定できる。そのため、試料を入射 X 線に対

して少しずつ回転させながら回折パターンを露光して (トモグラフィー)、各配向での回折パターンを得ることで細胞の三次元電子密度を再構成する。

##### 4.1 低温試料固定照射装置<sup>8,31)</sup>

同装置の真空槽内には、液体窒素を溜めて試料を低温に保つための低温ポット、低温ポットの回転と並進制御を行うための精密ゴニオメーター (回転軸上に水平二軸と垂直一軸で構成)、大気中から真空中に冷却試料を結露や温度上昇なしに真空槽内に輸送するためのロード・ロック・チャンパーと直線導入機、低温ステージに液体窒素供給するデュワー、上流光学系からの寄生散乱を低減させるための二組のシリコン製スリット、試料位置を視認するための望



**Fig. 4** (Color online) (a) A view of experimental setup for tomography XDI at BL29XU of SPring-8. Devices from the left (upstream) to right (downstream) are a chamber of pinhole to produce spatially coherent X-ray beam (1), KOTOBUKI-1 diffraction apparatus (2), vacuum pipe (3), a chamber of beam stop (4), and a pixel array detector (5). (b) Inside the vacuum chamber of the apparatus, a cryogenic pot (6) is mounted on a goniometer. Liquid nitrogen is supplied by a cupronickel capillary (7) and evacuated from the pot through a flexible tube (8) connected to a vacuum pump outside the vacuum chamber. A cooled specimen holder (9) is delivered from a load-lock chamber to the pot by using a transfer rod with claws and folk at the tip (10). Parasitic scattering from upstream optics are reduced by a slit placed near the specimen (11). (c) A diffraction pattern from a single bacterium cell. The upper right panel shows a projection electron density map retrieved directly from the diffraction amplitude alone. By applying the single particle analysis for more than 100 projection maps, the three-dimensional structure of a bacterium cell is reconstructed at a resolution of 130 nm (lower right). The scale bar indicates 1  $\mu\text{m}$ .

遠鏡二台、X線ビームに対して装置全体を位置調整するための定盤から構成されている (Fig. 4(a))。低温ポットに液体窒素を供給するキュープロニッケル・キャピラリー管や、外部の真空ポンプに接続してポットを減圧するためのフレキシブル排気パイプは、回転に伴うストレスがポットと配管の双方に伝わらないように渦巻き状にポット周辺に配置してある。

#### 4.2 光学系の調整<sup>8)</sup>

実験では、回折強度の入射 X 線波長依存性や検出器の量子効率を考慮して、エネルギー 5.5 keV の X 線 (波長 0.225 nm) をモノクロメーターによって選択し、モノクロメーターからの高調波を 2 枚の X 線ミラーによって低減する。SPring-8 で得られる X 線は、ほぼカオス光であるため、試料位置上流約 1.95 m に、直径 38  $\mu\text{m}$  のピンホールを設置し、そこから得られる回折パターン中心付近の波面が揃った (高空間コヒーレンス) 領域に試料を置いて回折パターンを収集する<sup>31)</sup>。ビームプロファイルと波面の様子は、予め、Fresnel-Kirchhoff 積分方程式<sup>34)</sup>を用いて予測し、ナイフ・エッジ・スキャンでビームプロファイルを測定して、高コヒーレンス領域を見定める。生体試料の実験に先立ち、立方体形状の酸化銅粒子からの回折パターンを露光し、ピンホールで得られる X 線ビームの空間コヒーレンスを確認する。

測定領域は極小角散乱であるため、ダイレクト・ビーム近傍のバックグラウンドおよび上流光学系からの寄生散乱を二組のスリットで低減する。試料位置で  $3.1 \times 10^9$  X 線光子/ $20 \mu\text{m}^2/\text{s}$  程度の X 線強度を利用できるが、この X 線強度では、後述のトモグラフィー実験での試料の放射線損傷は十分に小さい。カメラ長は約 6 m であり、 $1 \times 1 \text{ mm}^2$  角のビームストップをピクセルアレイ検出器 EIGER (Dectris 社) の前に置くことで、 $0.22 \mu\text{m}^{-1}$  (実空間分解能  $4.4 \mu\text{m}$ ) から  $50 \mu\text{m}^{-1}$  (20 nm) までの回折パターンを記録する。

#### 4.3 トモグラフィー XDI 実験<sup>8)</sup>

試料作製時に顕微鏡下で記録した試料位置を頼りに、動作距離の長い望遠鏡で視認しながら、低温ポットに搬送された試料板上の試料粒子をビーム位置に移動させる。ステージを鉛直及び水平方向にスキャンしながら 1 秒露光で回折パターンを得、最適な露光位置を決定して構造解析用露光を行う。試料高さでのゴニオメーターの回転に伴う回転軸由来の揺動を考慮し、 $1.5 \sim 3.0$  度程度の回転毎に、最適な露光位置に試料を置くことを繰り返す。露光時間は試料粒子サイズに依存するが、 $6 \mu\text{m}$  程度の細胞 1 個の場合、60 s (5 s 露光 12 frames) で、 $1/30 \text{ nm}^{-1}$  分解能までのスペックルパターンを信号対雑音比 3 以上で露光している。 $6 \mu\text{m}$  程度の細胞を 600 秒露光した場合には、 $1/20 \text{ nm}^{-1}$  分解能までのスペックルパターンを記録することが

可能である。

一例として、分裂期にある真核細胞バクテリアからの回折パターンを示す (Fig. 4(c))。個々のスペックルが明瞭に分離できており、高い空間コヒーレンスを持つ X 線を入射できたことが判る。寄生散乱の除去と小さなビームストップを用いて、極小角までの回折パターンを得ることができるので、比較的容易にその場で正解像を回復できる。図に示した約 130 nm 分解能での電子密度には、葉緑体や核に由来すると考えられる電子密度が見いだされた。

投影電子密度一枚では、細胞内の構造を十分に議論することは困難なため、トモグラフィー CXDI 実験によって、三次元電子密度を得る。低温ポットは  $\pm 170^\circ$  の範囲で回転可能であり、 $1.5^\circ$  ないし  $3^\circ$  の角度ステップで回折パターンを収集することで、100 nm 程度の分解能で三次元電子密度の再構成に成功している<sup>35)</sup>。得られた三次元電子密度図には、核や葉緑体に対応する 3 つの房が認められた。さらに高分解能の回折パターンを取り込んで細胞丸ごとの構造を 50 nm 以上の分解能で議論できると期待されている。

シンクロトロン放射光を用いた構造解析における分解能の限界について議論がなされており、その限界は 10 nm であろうとされている<sup>36)</sup>。現在の実験条件では、 $6 \mu\text{m}$  サイズの細胞について、2700 s 露光で 20 nm を超える領域までスペックルパターンを得ることができるので、今後、その限界に迫れる可能性がある。

## 5. X 線自由電子レーザーを用いる低温 CXDI 実験<sup>8)</sup>

SR 光とは異なり、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<sup>10)</sup>。 $10^{10-11}$  photons/ $4 \mu\text{m}^2/\text{pulse}$  程度の X 線を用いる SACLA での CXDI 実験では、形状既知粒子の回折パターンから予想される電子密度が回復されるため、電子が双極子放射を生じ、原子が壊れる前に回折が生じる (diffraction before destroy) と考えられる<sup>37)</sup>。このように、XFEL を用いた XDI 実験は破壊的測定であるため、試料粒子を順次照射野に投入し、30 Hz で供給される XFEL パルスを漏らさずに利用できる回折装置が必要となる。得られる回折パターンからは、試料粒子個々の投影電子密度が得られるが、それらから再構成される三次元電子密度は、多数粒子の平均構造となる点が、SR-XDI 実験とは異なる。

### 5.1 回折装置<sup>8,32)</sup>

我々は XFEL-XDI 実験用低温試料固定照射装置『高砂六号』<sup>78)</sup>を開発・実用化し、SACLA の BL3<sup>38)</sup> EH4 にて実験を行ってきた (Fig. 5(a))。この装置は、基本的に壽



巻号と同様な構成であるが、30 Hz で供給される XFEL パルスをもれなく利用するために、低温ポットは、最大  $50 \mu\text{m}/33 \text{ms}$  の速さでのスキャンが可能な高速並進ステージに搭載されている。また、真空槽への試料交換回数を減らすため、低温保持しながら一度に12個の試料ホルダーを真空槽内に設置できるコンテナを用い、真空槽内にはコンテナを常に液体窒素温度程度に保つための専用低温ポットを設置してある (Fig. 5(b))。

X 線回折パターンは2台の MPCCD 検出器<sup>39)</sup>で記録する。生体粒子試料からの回折パターン記録には広いダイナミックレンジが要求される。そのため、1台の検出器を試料下流1.6 m に設置して広角領域の回折パターンを記録し、もう一台の MPCCD 検出器を3.2 m 下流に設置し、その直前に  $2.5 \times 2.5 \text{mm}^2$  のビームストップ、アルミニウム製アテネーターの順に設置して、極小角領域の回折パターンを記録している (Fig. 5(a))。この構成により、検出器単体では狭いダイナミックレンジを拡大している<sup>32)</sup>。

### 5.2 光学系調整<sup>8,31,32)</sup>

エネルギー5.5 keV の X 線 (波長0.225 nm) を、KB ミラーによって約  $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$  程度のサイズに集光して<sup>40)</sup>、試料粒子に照射する。X 線強度は  $10^{10} \text{photons}/2 \times 2 \mu\text{m}^2/\text{pulse}$  程度となる。上流光学系からの寄生散乱を、集光位置直近上流においたシリコンブレードを調整して極力低減すれば、ビームストップ周辺の寄生散乱 X 線光子数を100 X 線光子/pixel 程度の測定に影響しないレベルまで低下させ、約500 nm の小角分解能を実現できる<sup>41)</sup>。しかしながら、現在の KB 集光光学系の設計値からは、これ以上の小角分解能の向上は難しい。多くの細胞試料では、極小角のスペックルパターンが欠損するため、SR-XDI 実験に比べて位相回復が困難となり、2.4で述べたような解析手法が必要となる。実際、一回のビームタイムで得られた良質な回折パターンの位相回復には、スーパーコンピュータを用いて数か月を要している。

測定に先立っては、静電分注装置によって一様に散布した金コロイド粒子からの回折パターンを記録し、XFEL パルス毎のコヒーレンスがほぼ完全であることを確認する。この解析では、Speckle Visibility Spectroscopy<sup>42)</sup>において正しく空間コヒーレンスを評価できる理論を用いる<sup>43)</sup>。これまでのところ、KB ミラーを適切に調整すれば、試料位置での集光 XFEL パルスの空間コヒーレンスはほぼ完全であった。

### 5.3 測定と構造解析<sup>8,41)</sup>

集光 XFEL パルスは、一度の入射で試料粒子を破壊し、さらに、集光ビームの裾野が鉛直方向、水平方向に十字状  $20 \mu\text{m}$  程度に伸びて、周辺にも放射線損傷をもたらす<sup>43)</sup>。常に新鮮な試料粒子を集光位置に供給するために、 $25 \mu\text{m}/33 \text{ms}$  以上の速さで窒化珪素膜を高速並進移動さ

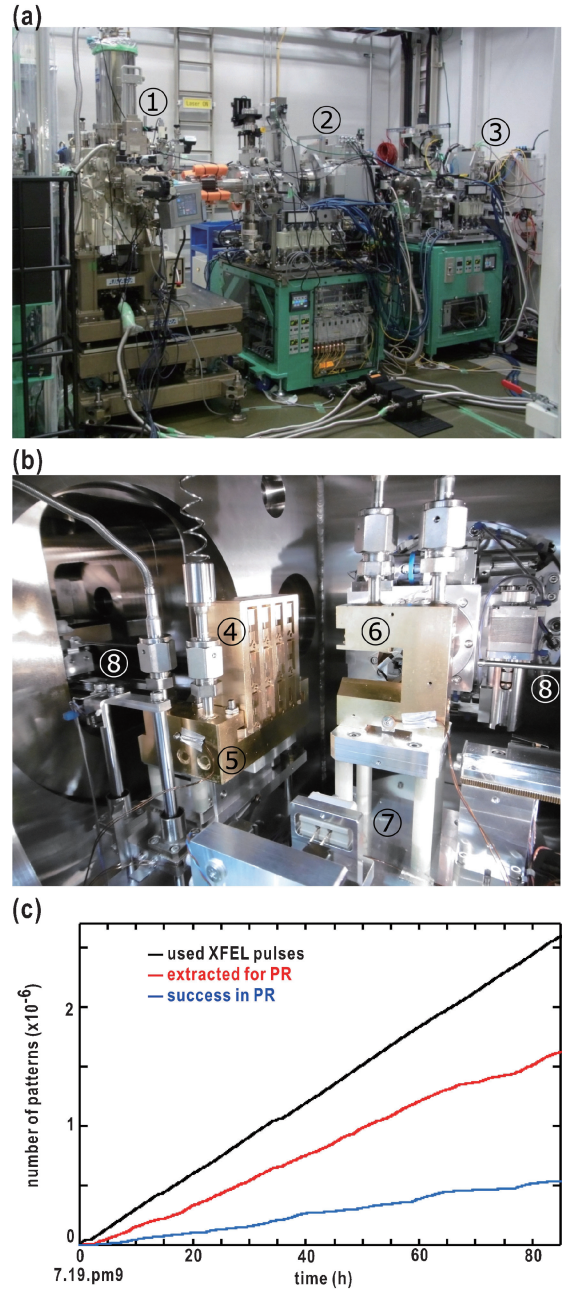
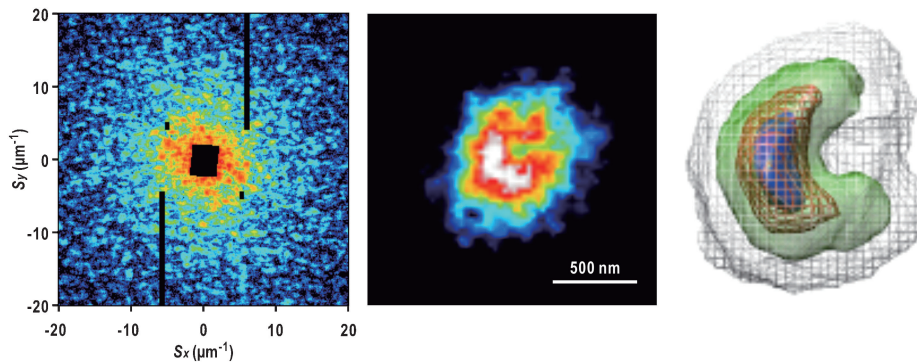


Fig. 5 (Color online) (a) A view of XFEL-XDI experiment at BL3 of SACLA. Devices from the left (upstream) to the right (downstream) are the TAKASAGO-6 diffraction apparatus (1), the MPCCD-Octal detector (2), and the MPCCD-Dual detector (3). (b) A view inside the vacuum chamber of the apparatus. A cooled container carrying 12 specimen holders (4) are delivered from the load-lock chamber to a pot (5) to maintain the temperature of the container. Each specimen holder is mounted to or dismantled from the pot (6) on the fast-translation stage (7) by using two stick devices located behind the two pots (8). (c) The time course of the cumulative number of XFEL shots used (black line) in a beam time. The automatic data processing suite extract tentatively diffraction patterns with signal-to-noise ratios better than a threshold value (red line). The number of diffraction patterns, the electron density maps from which converged in the phase retrieval (PR) calculations, is less than 20% (blue line) of the total number of XFEL pulses used.



**Fig. 6** (Color online) A diffraction pattern (left), a projection electron density map retrieved from the diffraction pattern (center) and a reconstructed three-dimensional density map (right) of cyanobacteria cell. The left and center panels are reused from [doi: 10.1107/S1600577516007736] after modification with permission from The International Union of Crystallography

せる。9枚の窒化珪素薄膜窓を持つ試料板12枚について、スキャン露光を行えば、試料ホルダー交換やカセット装填作業を含めて、1時間で平均31000ショットのXFELパルスを利用できる (Fig. 5(c))。大量の回折パターンの処理には、独自に開発したデータ処理ソフトウェア・スイツ『四天王』等を用いる<sup>44,45)</sup>。これまでに、アミロイド<sup>41,46)</sup>、真核細胞バクテリアの葉緑体<sup>21,22)</sup>、出芽酵母の細胞核<sup>41,47)</sup>、シアノバクテリア<sup>30,48)</sup>等を測定した。

ここでは、細胞試料に対する実験例として、シアノバクテリアからの回折パターンを示す (Fig. 6)。生物学の共生説によれば、シアノバクテリアが他の生物と融合して原始的な真核バクテリアが誕生したと考えられている。真核細胞バクテリアの葉緑体に対するXFEL-XDI実験から、C字型をしたチラコイド膜の集積体を見出しているが<sup>21)</sup>。シアノバクテリアがそのような真核細胞バクテリアの葉緑体に転化したとすれば、シアノバクテリアも同様の葉緑体構造が存在すると期待される。しかし、シアノバクテリア丸ごとの構造をありのままに解明する技術が無く、進化的相関を物質分布の観点から調べることはなされてこなかった。

培養したシアノバクテリア懸濁液の動的光散乱から、シアノバクテリアの大きさが、集光XFELビームに完浴できることが明らかとなったので<sup>30)</sup>、シアノバクテリア細胞を窒化珪素膜に散布凍結して実験に供した。Fig. 6に示したような回折パターンを収集し、良質な投影電子密度図884枚から、有効分解能150 nm 分解能で三次元電子密度図を再構成した<sup>48)</sup>。再構成されたシアノバクテリアの大きさは750 nm程度であり、測定前に動的光散乱法で調べた流体力学的粒子サイズ (760 nm) とよく一致する<sup>30)</sup>。内部の電子密度分布は非一様で、大まかには厚みのあるC型形状を呈していた。また、C型の電子密度分布の中心付近には電子密度の高い大きさ200 nm程度の楕円状領域が存在した。C型形状部分は、真核細胞バクテリアの葉緑体と形状や大きさが酷似していた。

## 6. おわりに

CXDIはまだ未成熟な段階にあり、特に、X線自由電子レーザーを用いたCXDIでは、位相回復における問題<sup>19,49,50)</sup>や、異なる個体からの構造情報に関する検討<sup>51)</sup>が必要である。シンクロトン放射光を用いた低温CXDIトモグラフィ実験からは、超解像顕微鏡のデータを凌駕する構造情報が細胞やオルガネラに対して得ることができるようになってきた。位相拡張や照射線量<sup>52)</sup>、得られる三次元電子密度の精密化のための理論構築が必要であるものの、現在の技術を更に高度化することで、バイオイメージングの新たな展開が期待される。

## 謝辞

回折パターンの処理や位相回復では、慶應義塾大学の関口優希博士、橋本早紀氏が作成したソフトウェアを用いた。装置製作で御助力いただいた株式会社理学相原精機、仁木工芸株式会社、神津精機株式会社に謝意を表します。SPring-8での回折実験では、理化学研究所の香村芳樹博士に、SACLAでの実験では、登野健介博士、亀島敬博士、城地保昌博士、犬伏雄一博士、金徹坤氏をはじめとするSACLAエンジニアリングサポートチームに御助力を頂いた。低温XDI実験技術の開発及び構造解析は、文部科学省からのX線自由電子レーザーキーテクノロジー課題、X線自由電子レーザー利用重点課題、日本学術振興会からの新学術領域研究 (jp23120525, jp25120725)、萌芽研究 (jp17654084, jp24654140)、基盤研究 (A) (jp16H02218) の支援を受け、SPring-8 RIKEN BLビームタイム (Proposal Nos. 20090097, 20100035, 20110006, 20140096, 20150098, 20160084)、SACLAビームタイム (Proposal Nos. 2012A8005, 2012B803, 2013A8043, 2013B8049, 2014A8033, 2014B8052, 2015A8051, 2015B8049, 2016A8048, 2016B8064, 2017A8015) において実施した。位相回復計算をはじめとする構造解析には、

SACLA の mini-K スーパーコンピューターを用いた。

### 参考文献

- 1) 船津高志編：生命科学を拓く新しい光技術 共立出版 (1999).
- 2) 藤本豊土, 山本章嗣監修：電子顕微鏡で読み解く生命の謎 秀潤社 (2008).
- 3) A. W. Roberds and U. B. Sleytr: "Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy" in "Practical Methods in Electron Microscopy" vol. 10 (ed. by Glauret), Elsevier Amsterdam (1985).
- 4) Z. Duan *et al.*: Nature **465**, 363 (2010).
- 5) J. Miao, D. Sayre and H. N. Chapman: J. Opt. Soc. Am. **A15**, 1662 (1998).
- 6) J. Miao *et al.*: Nature **400**, 342 (1999), 中迫ら：放射光学会誌 **26**, 11 (2013).
- 7) J. R. Fienup: Appl. Opt. **21**, 2758 (1982).
- 8) M. Nakasako: "X-ray diffraction imaging of biological cells" Springer (2018).
- 9) J. A. Rodriguez *et al.*: IUCr J. **2**, 575 (2015).
- 10) R. Neutze *et al.*: Nature **406**, 752 (2000).
- 11) T. Ekerberg *et al.*: Phys. Rev. Lett. **114**, 098102 (2015).
- 12) J. Miao, K. O. Hodgson and D. Sayre: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 6641 (2001).
- 13) J. Wang: Protein Science **25**, 1585 (2016).
- 14) J. Frank: Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies (Oxford University Press, Oxford, 2006).
- 15) J. Miao *et al.*: Phys. Rev. B **67**, 174104 (2003).
- 16) S. Marchesini, H. He, H. N. Chapman, S. P. Hau-Riege, A. Noy, M. R. Howells, U. Weierstall and J. C. H. Spence: Phys. Rev. B. **68**, 140101 (2003).
- 17) W. Kodama and M. Nakasako: Phys. Rev. E **84**, 021902 (2011); T. Oroguchi and M. Nakasako: Phys. Rev. E **87**, 022712 (2013).
- 18) J. A. Rodriguez *et al.*: J. Appl. Cryst. **46**, 312 (2013).
- 19) Y. Sekiguchi, T. Oroguchi and M. Nakasako: J. Synchrotron Rad. **23**, 312 (2016).
- 20) Y. Sekiguchi *et al.*: J. Synchrotron Rad. **24**, 1024 (2017).
- 21) Y. Takayama *et al.*: Plant Cell Physiol. **56**, 1272 (2015).
- 22) Y. Sekiguchi *et al.*: Chapter 15 in Cyanidioschyzon merolae: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology (Ed. T. Kuroiwa, *et al.*) Springer Tokyo in press.
- 23) R. A. Crowther, D. J. DeRosier and A. Klug: Proc. R. Soc. Lond. **317**, 319 (1970).
- 24) P. B. Rosenthal and R. Henderson: J. Mol. Biol. **333**, 721 (2003).
- 25) Y. Nishino *et al.*: Phys. Rev. Lett. **102**, 018101 (2009).
- 26) H. Jiang *et al.*: PNAS **107**, 11234 (2010).
- 27) C. Song *et al.*: Biophys. J. **107**, 1074 (2014).
- 28) Y. Takayama and M. Nakasako: Phys. Chem. **159**, 237 (2011).
- 29) Y. Takayama and M. Nakasako: Rev. Sci. Instrum. **83**, 054301 (2012).
- 30) A. Kobayashi *et al.*: J. Synchrotron Rad. **23**, 975 (2016).
- 31) M. Nakasako *et al.*: Rev. Sci. Instrum. **84**, 093705 (2013).
- 32) A. Kobayashi *et al.*: Rev. Sci. Instrum. **87**, 053109 (2016).
- 33) K. Tamasaku *et al.*: Nucl. Instrum. Meth. **A467-468**, 686 (2001).
- 34) M. Born and E. Wolf: Principles of Optics 7th (expanded) edition (Cambridge University Press, Cambridge, 1999).
- 35) 小林ら 第31回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2018年1月) 9P085.
- 36) M. R. Howells *et al.*: J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. **170**, 4 (2009).
- 37) Chapman *et al.*: Nat. Phys. **2**, 839 (2006).
- 38) K. Tono *et al.*: New J. Phys. **15**, 083035 (2013).
- 39) T. Kameshima *et al.*: Rev. Sci. Instrum. **85**, 033110 (2014).
- 40) H. Yumoto *et al.*: Nat. Photon. **7**, 43 (2013).
- 41) T. Oroguchi *et al.*: J. Phys. **B48**, 184003 (2015).
- 42) C. Gutt *et al.*: Phys. Rev. Lett. **108**, 024801 (2012).
- 43) A. Kobayashi *et al.*: Sci. Rep. **8**, 831 (2018).
- 44) Y. Sekiguchi, T. Oroguchi, Y. Takayama and M. Nakasako: J. Synchrotron Rad. **21**, 600 (2014).
- 45) Y. Sekiguchi *et al.*: J. Synchrotron Rad. **21**, 1378 (2014).
- 46) H. Kameda *et al.*: J. Biochem. (Tokyo) **161**, 55 (2017).
- 47) 山本ら：第31回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2018年1月) 10P005.
- 48) 小林ら：第30回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2017年1月) 4D001.
- 49) A. Kobayashi *et al.*: Opt. Exp. **22**, 27892 (2014).
- 50) Y. Takayama *et al.*: Sci. Rep. **5**, 8074 (2015).
- 51) T. Yoshidome *et al.*: Phys. Rev. E **92**, 032710 (2015).
- 52) R. Henderson: Q. Rev. Biophys. **28**, 171 (1995).

## 著者紹介



### 中迫雅由

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

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

専門：細胞の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助教授。2005年より現職。趣味は宇宙戦艦ヤマト2199，旧仮面ライダーカード収集。



### 大出真央

慶應義塾大学理工学研究科博士課程2年，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター研修生

専門：生体高分子のイメージング



### 岡島公司

慶應義塾大学理工学部物理学特任助教，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター客員研究員

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

専門：植物の光形態形成

#### 【略歴】

2006年，東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士課程修了。2006年，大阪府立大学プロジェクト研究教員，2015年から現職。



### 高山裕貴

兵庫県立大学大学院物質理学研究科X線光学分野 助教，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター客員研究員

E-mail: takayama@sci.u-hyogo.ac.jp

専門：X線回折イメージング

#### 【略歴】

2013年，慶應義塾大学理工学研究科博士課程修了。2013年，理化学研究所基礎科学特別研究員。2016年より現職。



### 笠口友隆

慶應義塾大学理工学部物理学専任講師，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター客員研究員

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

専門：計算生物物理

#### 【略歴】

2007年，東京大学大学院理学研究科物理学専攻博士課程修了。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助教授。2015年より現職。



### 小林 周

理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター基礎科学特別研究員

E-mail: amane.kobayashi@riken.jp

専門：X線回折イメージング

#### 【略歴】

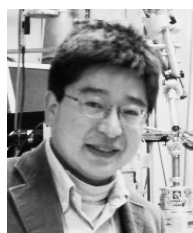
2018年，慶應義塾大学理工学研究科博士課程修了。



### 山本隆寛

慶應義塾大学理工学研究科修士課程2年，理化学研究所播磨研究所放射光科学研究センター研修生

専門：X線回折イメージング



### 山本雅貴

理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター放射光利用システム開発研究部門部門長

E-mail: yamamoto@riken.jp

専門：第三及び第四世代放射光を用いた生体分子・粒子に対するX線回折実験技術および構造解析方法の開発

#### 【略歴】

1991年，大阪大学大学院理学研究科高分子専攻博士後期課程修了。1991年，理化学研究所研究員。2004年，理化学研究所播磨研究所研究技術開発室室長，2008年より現職。2005年より兵庫県立大学大学院生命理学研究科客員教授。趣味は近隣散歩，鉄道。

# X-ray diffraction imaging of biological cells at low temperature

Masayoshi NAKASAKO<sup>1,2</sup>, Yuki TAKAYAMA<sup>1,2\*</sup>, Amane KOBAYASHI<sup>1,2</sup>,  
Takahiro YAMAMOTO<sup>1,2</sup>, Mao OIDE<sup>1,2</sup>, Koji OKAJIMA<sup>1,2</sup>,  
Tomotaka OROGUCHI<sup>1,2</sup>, Masaki YAMAMOTO<sup>2</sup>

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

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

\*present address

Graduate School of Material Science, University of Hyogo, 3-2-1 Kouto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo  
678-1297, Japan

**Abstract** X-ray diffraction imaging is used to visualize the structures of biological non-crystalline particles without chemical labeling and sectioning. The projection structures of specimen particles are retrieved from the structure amplitudes of diffraction patterns. Furthermore, the three-dimensional structures are reconstructed from tomography experiments. Due to the penetration power of X-rays with short wavelength, X-ray diffraction imaging allows us to visualize the structures of cells with the dimensions more than 500 nm at resolution better than 100 nm. In this review, we report the current status of our X-ray diffraction imaging experiments and structure analyses.