

山内 和人

大阪大学大学院工学研究科・教授

コヒーレントX線による走査透過X線顕微鏡システムの構築と分析科学への応用

§1. 研究実施の概要

X線顕微鏡には、ナノプローブを試料上で走査し、走査点ごとに得られた信号を画像化する走査型X線顕微鏡と、比較的広い領域にコヒーレントX線を照射し、そこから発生する回折光を取得しフーリエ光学にもとづいてレンズレスに画像化する回折顕微鏡の2つの方法がある。当該研究グループは、光学素子開発の立場から、長年に亘ってX線顕微鏡の高度化に携わり、両方の顕微鏡において、共に10nmを切る世界最高分解能(Nature Phys, 2010、Nano Lett, 2010)を達成してきた。本研究は、全反射を利用したナノ精度の形状可変アダプティブ鏡によって、色収差のない視野可変型の集光光学系を構築し、走査型X線顕微鏡と回折顕微鏡の機能を併せ持つ走査透過X線顕微鏡システムの実現を目指すものである。さらに、本顕微鏡システムの生命科学分野への展開として、広範ながんに治療効果が認められる白金(Pt)製剤の作用機序の解明を試みる。

22年度は、目標とする顕微鏡システムの開発とその医学応用を軌道に乗せるために、要素技術の確立を中心として、アダプティブ鏡の設計と光学系の検討、新規像回復アルゴリズムの検討、Pt製剤標的分子の同定法の確立、Pt製剤の細胞内機序の解明を進めた。

23年度からは、2枚のアダプティブ鏡を用いたKB集光システムの開発を足掛かりとし、提案する顕微鏡システムの構築を進める予定である。また、白金製剤の作用機序解明の第一歩として、既存のX線顕微鏡と生化学的手法を用いて解析を進める。本顕微鏡が完成次第、詳細な観察・解析へと移行する。

§2. 研究実施体制

(1)「山内」グループ

- ① 研究分担グループ長: 山内 和人 (大阪大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・アダプティブ鏡の設計・開発

・シミュレーションによる新規集光光学系の検討

(2)「西野」グループ

① 研究分担グループ長:西野 吉則 (北海道大学電子科学研究所、教授)

② 研究項目

- ・コヒーレントX線イメージングアルゴリズム開発
- ・集光ユニットの開発

(3)「志村」グループ

① 研究分担グループ長:志村 まり(国立国際医療研究センター、室長)

② 研究項目

- ・走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)による電気泳動ゲルでの蛋白質含有元素の可視化

(4)「前島」グループ

① 研究分担グループ長:前島一博 (国立遺伝学研究所、教授)

② 研究項目

- ・正常細胞・がん細胞のシスプラチン処理の実験
- ・ICP-MSを用いた細胞核へのシスプラチンの取り込みの解析

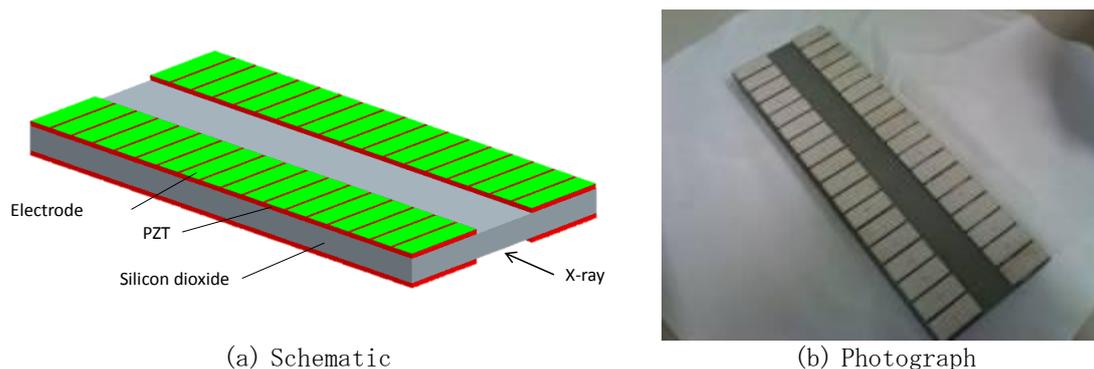
§3. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(4-1)に対応する)

本年度は、目標とする顕微鏡システムの開発とその医学応用を軌道に乗せるために、要素技術の確立を進めた。具体的には、①アダプティブ鏡の設計と光学系の検討、②新規像回復アルゴリズムの検討、③Pt 製剤標的分子の同定法の確立、④Pt 製剤の細胞内機序の解明 を行った。

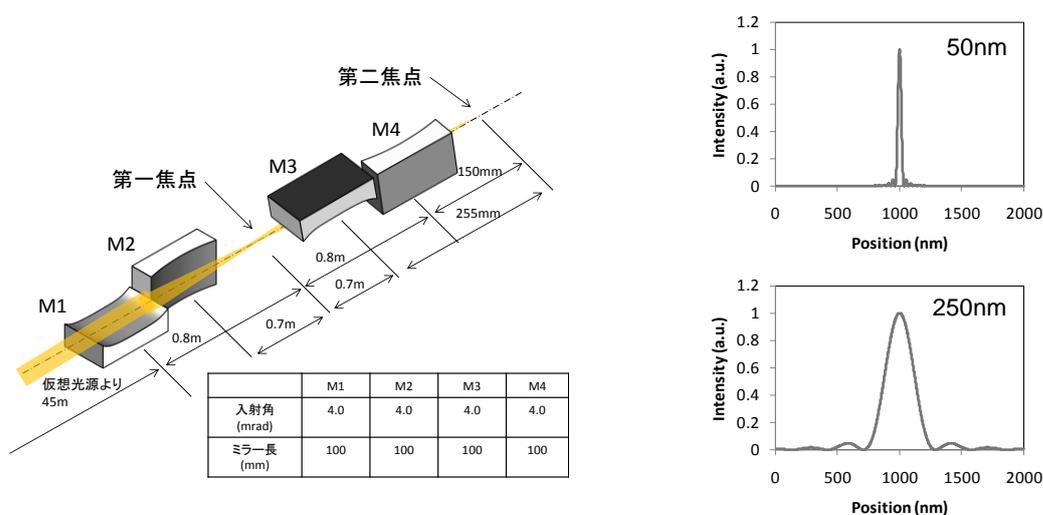
①アダプティブ鏡の設計と光学系の検討(山内チーム)

形状誤差 2nm 以下の精度で自由曲面を自在に作製可能なアダプティブ鏡の実現を目指し、有限要素シミュレーションによるアダプティブ鏡の高精度解析を行った。有限要素解析では、1Åの精度保証ができるように、モデルの確立と分割メッシュ数の最適化を行った。これによって、隣合うピエゾアクチュエータ間に生じる形状誤差を1Åの精度で正確に予想することが可能となり、コヒーレントX線を扱う際に問題となるスペックルノイズの抑制を考慮したミラー設計が可能となった。この手法を用いて基板厚さ、ピエゾアクチュエータの枚数、大きさ、周期、電極の形を検討し、実際にバイモルフ型アダプティブ鏡の試作を行った(図1)。



(a) Schematic (b) Photograph

図1 試作したバイモルフ型アダプティブ鏡



(a) ミラー配置 (b) 予想される典型的な集光ビーム

図2 設計した集光光学系

開発する光学系は、アダプティブ鏡 4 枚で構成される複雑な光学系であるため、最適設計やアライメント誤差解析にはシミュレーション技術が必要不可欠である。幾何光学・波動光学に基づいたシミュレーションによって、光学系の最適設計を進めるとともに、実際にどの程度のアライメント精度が要求されるかを検討した。図2に設計した光学系を示す。ミラーを±30μm 変形させることで、ビームサイズを 50nm~500nm まで変化させられることを 1 次元波動光学シミュレーションで確認した。

②新規像回復アルゴリズムの検討(西野チーム)

回折顕微鏡において、空間的に広がった試料(一般的に、回折顕微鏡では孤立した試料以外には像回復が難しい。孤立していない試料を測定するには、試料を走査しながら回折パターンを取得するタイコグラフィと呼ばれる手法が一般的に用いられる。)であっても 1 度の測定で試料像を再構成できる新規像回復アルゴリズムを検討した。本年度は、理想的な集光ビームで試料を照明した場合において像回復アルゴリズムのデモンストレーションを行った。この結果、一つの回折パターンデータから試料像を再構成することに成功した。これにより、空間的に広がった試料であっても、試料位置を走査することなくイメージングできる、新しいX線イメージング手法に道筋を付けた。

また、HeNe レーザーや光学素子、ステージ類を導入し、可視光の実験システムで本手法の原理検証実験や光学系配置条件の探索を行う準備を整えた。さらに、本課題にかかわる種々のシミュレーションや解析のための計算(波動光学シミュレーションや像回復計算)を高速に実行するために、数値計算に最適化されたグラフィックカード(448コア)を 2 枚搭載した計算機を導入し、高速な並列計算を実現できる環境を整えた。

③Pt 製剤標的分子の同定法の確立(志村チーム)

X 線顕微鏡で細胞内の白金製剤を可視化することに加え、生化学的な手法を併せて活用することで、Pt 製剤が標的とする蛋白質の同定を目指している。同定を行うために、生化学の分野で頻用されている電気泳動法(蛋白質の電気的な性質や大きさで分離する手法)と蛍光 X 線分析を組み合わせた新しい測定系を提案した。本研究では、等電点或いは native-gel 電気泳動(蛋白質を変性させることなく電気泳動する手法)で分離された蛋白質を走査型蛍光X線顕微鏡によって可視化することで、個々の蛋白質がどのような元素を含有しているかを調べる測定系の確立を進めている。これによって Pt 製剤が結合した蛋白質を特定し、Pt 製剤の作用機序解明につなげる。

本年度は、既知の元素結合蛋白質(CuZnSOD、MnSOD、Metallothionein)について含有元素を調べた。電気泳動を行った後に、水分除去のため凍結乾燥を行った。SPring-8 BL29XUL(第1ハッチ)に実験システム(図3)を組み上げ、15keVのX線を用いて元素マッピングを行った(走査ステップ:600μm/ステップ、露光時間:6sec/ステップ)。この結果、蛍光X線分析を用いた蛋白質結合元素の可視化が可能であることを確認した。しかし、ゲル自体のバックグラウンドが高く、検出感度に改善の余地が残されていることが分かった。検出感度改善のために新たに SXFM専用ゲルの開発を進めている。現在、薄い高分子膜の上に直接ポリアクリルアミドを重合す

ることに成功し、蛋白質電気泳動が可能となった。これにより、バックグラウンドの低下が期待され感度向上が図れると思われる。

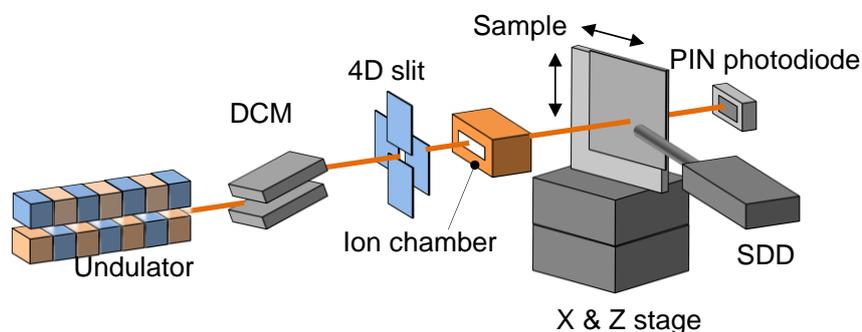


図3 走査型蛍光X線顕微鏡

④Pt 製剤の細胞内機序の解明(前島チーム)

Pt 製剤の一種であるシスプラチン($\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$)は DNA と結合し、その合成を阻害することで抗ガン作用を示すとされているが、その作用機序はよくわかっていない。本研究では、X 線顕微鏡を用いて白金の細胞内元素分布を調べることで作用機序解明を目指している。第一歩として、細胞内に取り込まれた Pt 含有量を ICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析装置)によって調べ、X 線顕微鏡のための試料作製の準備を進めた。

試料として、増殖しているヒト正常細胞 (TIG-1)、増殖が停止したヒト正常細胞 (TIG-1)、増殖が活発なヒトガン細胞(HeLa)という 3 種類の異なる細胞を用意し、シスプラチンの取り込み量を調べた。また、細胞を界面活性剤(Triton X-100)で処理することで、細胞の核分画を調製し、シスプラチンが細胞質と核のどちらに多く取り込まれているのかも併せて調べた。その結果、細胞に取り込まれたシスプラチンの 80%~90%は細胞質に存在しており、核にはわずかな量しか取り込まれていないことが明らかになった。また、増殖状態の異なるヒト正常細胞間でのシスプラチンの取り込み量を比較すると、細胞増殖が起こっているヒト正常細胞の方が多くのシスプラチンを取り込んでいた。しかしながら、細胞増殖能の高いガン細胞と比較すると正常細胞の方が多くのシスプラチンを取り込んでいるため、シスプラチンの細胞への取り込みと細胞増殖との関係については現時点では結論できていない。今後、より詳細な実験を行うとともに、X 線顕微鏡に最適な細胞試料(細胞周期、Pt 取り込み量、細胞株など)の作製を進め、作用機序解明につなげていきたいと考えている。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Hideaki Takata and Kazuhiro Maeshima, “Irregular folding of nucleosomes in the cell (Comment)”, *Physics of Life Reviews*, vol. 8, pp.51-52, 2011. (DOI: 10.1016/j.plrev.2011.01.004.)
2. Kazuhiro Maeshima, Saera Hihara, and Hideaki Takata, “New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibres?” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 75. (in press)

(4-4) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)