

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

- ・アダプティブ鏡の試作
- ・アダプティブ KB システムの開発

### (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

- ・アダプティブ KB システムの開発
- ・コヒーレント X 線イメージングアルゴリズムの開発

### (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研究所、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

## § 2. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(3-1)に対応する)

本年度は、昨年度に引き続き顕微鏡システムの開発とその医学応用のための要素技術の確立を進めた。具体的には、①アダプティブ鏡の試作、②アダプティブ KB システムの開発、③新規像回復アルゴリズムの開発、④Pt 製剤の細胞への取り込み条件の検討と細胞内局在観察、⑤Pt 製剤標的分子の同定のための新しい分析手法の確立 を行った。

### ① アダプティブ鏡の試作(山内チーム)

反射 X 線に発生するスペックルを抑える必要から、その原因となる高空間周波数域の変形誤差のない新しい構造の形状可変ミラーを提案・作製した。本形状可変ミラーは、圧電素子上に成膜によって作製された電極を複数個持つものである。各電極に電圧を印可することでガラス基板を任意の形状に変形できる。実際に計算(有限要素シミュレーション)と実験(干渉計による計測)によって変形誤差がどの程度発生するか調べたところ、双方の結果は一致し、基板中央のミラー領域では、高空間周波数域の変形誤差が完全に抑えられることを確認した(図 1)。また、多数の電極に電圧印可する電源システムとそれをコントロールするソフトウェアを開発し、任意の形状に形状可変ミラーを変形させられる準備を整えた。

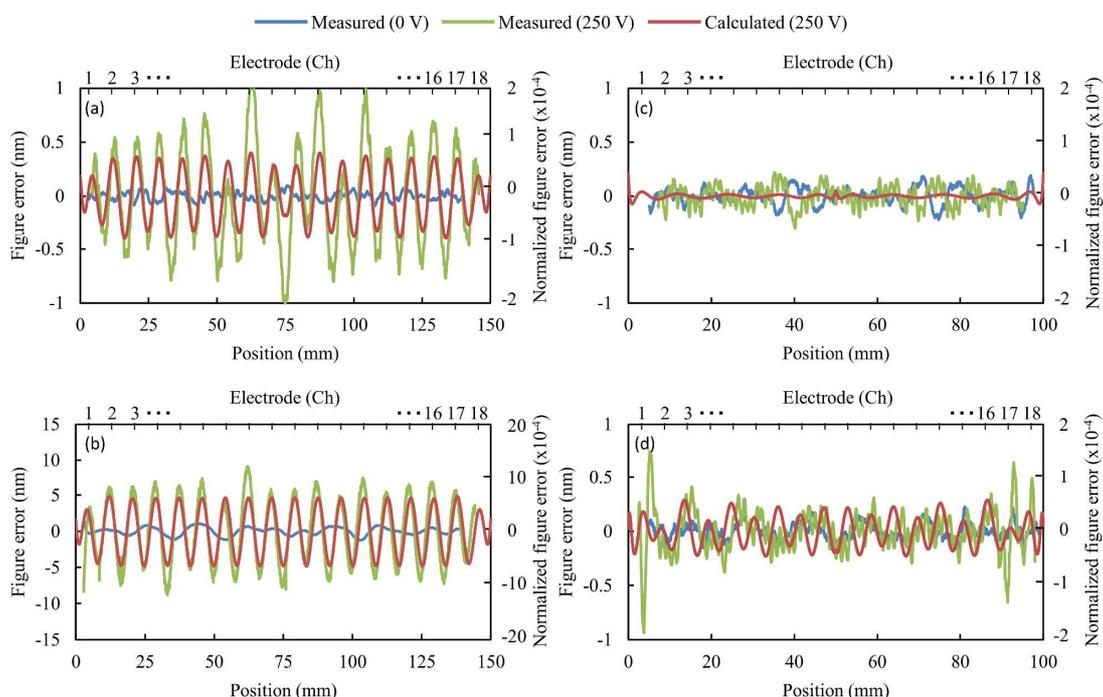


図 1 計算と実験によって得られた高空間周波数成分の変形誤差。(a)(b)従来型形状可変ミラー、(c)(d)新しく開発した形状可変ミラー。(a)(c)基板中央、(b)(d)圧電素子直上。新型かつ基板中では変形誤差は全く生じなかった。

## ②アダプティブ KB システムの開発(山内チーム・西野チーム)

アダプティブ KB システムを構築するために、2 枚の形状可変ミラーをアライメント可能なミラーマニピュレータの設計・開発をした。設計のために GPU を使った高速な 2 次元波動光学シミュレータを開発した(448 コアを用いた並列化計算, 従来比 20 倍の高速化)。これによってアライメントに必要となる許容アライメント誤差を解析し、最適なアライメントシステムを設計・開発を行った。

2 枚の形状可変ミラーを搭載したアダプティブ KB システムの性能評価を SPring-8 BL29XUL にて実施した。実験中のミラー形状は不明とし、ミラー自体の変形再現性と X 線を用いた最終調整のみ(干渉計等の形状計測法は一切用いていない)で楕円形状への変形を試みた。この結果、図 2 に示す半値幅 120nm の X 線集光に成功した。また、最終調整後のミラーの変形誤差は約 2nm 程度であると見積もられ、これは回折限界集光に必要な目標値をクリアしていた。本実験によって、形状可変ミラーの高精度変形、ミラーマニピュレータの正常動作を確認すると共に、形状可変ミラー集光手順の確立が完了した。形状可変ミラーの集光技術が確立できたことで、今後、ミラー枚数が 4 枚に増えたとしても同様のシステム・手順によって理想的な集光が行えるめどが立った。

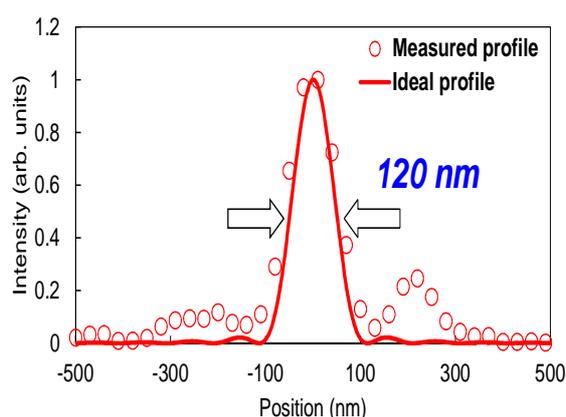


図 2 形状可変ミラーによる X 線集光. 1 次元集光において 120nm(FWHM)を達成した。

## ③新規像回復アルゴリズムの開発(西野チーム)

本光学系で実現される集光ビームを用いた回折顕微鏡の新規アルゴリズムの検討を行った。回折顕微鏡では、通常、孤立していない空間的に広がった試料を、一つのコヒーレント回折パターンから像再構成することは難しい。新規アルゴリズムでは、2 個の集光点を持つ本光学系の特徴を利用して、X 線集光ビームの照射関数を制御することによって、試料を擬似的に孤立していると思わせる状態にして問題解決を試みた。

## ④Pt 製剤の細胞への取り込み条件の検討と細胞内局在観察(前島チーム)

シスプラチンに代表される白金製剤は 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。私たちは、まず、細胞に対するシスプラ

チンの影響を理解するために、細胞周期依存的に蛍光が変化するヒト HeLa 細胞を用いて、シスプラチン処理した細胞の生細胞イメージングをおこなった。その結果、細胞は S/G2 期で停止し、死んでいくことがわかった。

白金製剤は 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。このため、クロマチン構造がシスプラチンの DNA 結合にどのような影響をおよぼすのかはとても重要である。このため、クロマチンを凝縮・脱凝縮させた状態でシスプラチンと反応させ、シスプラチンの DNA 結合量の変化を ICP-MS を用いて定量した。その結果、クロマチンが脱凝縮するとシスプラチンの結合量が有意に増加した。このことは、クロマチンが脱凝縮し、オープンになるにつれ、シスプラチンが DNA にアタックしやすくなることを意味する。この知見は、シスプラチンの抗ガン作用を高めるためには、クロマチンを脱凝縮させるのが効果的であることを意味する。実際の治療においても、HDAC 阻害剤など、クロマチンを脱凝縮させる薬剤との併用が有効である可能性が示唆された。

#### ⑤Pt 製剤標的分子の同定のための新しい分析手法の確立(志村チーム)

細胞内元素分布を可視化するのみでなく、元素が関連する蛋白質を同定することで、より生体での元素の機能や役割が明らかになる。本研究では、抗がん剤のうち汎用される白金製剤の細胞内標的蛋白質や核酸について、本プロジェクトで開発中の X 線顕微鏡システムでの細胞内元素イメージングおよび生化学的手法により明らかにする。本年度は、(i)高分子フィルム上に重合した native-gel 電気泳動ゲルの蛍光 X 線分析による微量金属イメージング法の構築と(ii)白金製剤結合蛋白質の同定を進めた。

(i)電気泳動ゲルの蛍光 X 線分析を高感度に行うために、バックグラウンドが低い素材である高分子膜上にポリアクリルアミドゲル(4%)を重合した泳動ゲルを作製した。金(Au)が結合した粗精製蛋白質 (Au 相当量 50 ng) を泳動し、分離された Au 結合蛋白質を蛍光 X 線分析によって検出(図 3)したところ、元素結合蛋白質を意味するバンドのイメージングが可能となった。

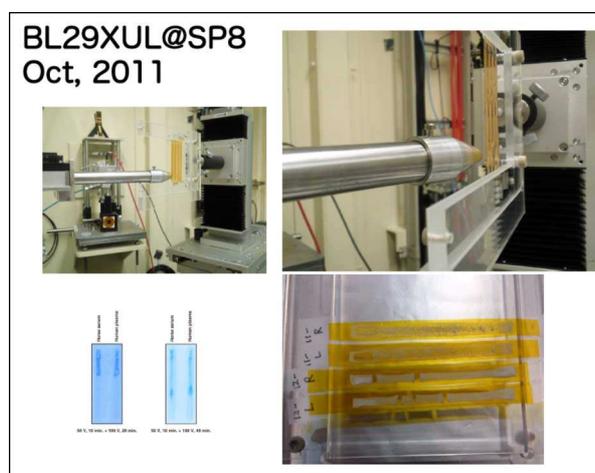


図 3 Au 結合蛋白質の蛍光 X 線分析。上段が実験装置，下段が用いた泳動ゲル。

(ii)白金製剤の作用機序解明のために HPLC-ICP-MS によって、各種白金製剤と、蛋白質や核酸との結合の有無を調べた。この結果、白金製剤は様々な蛋白質等に強弱が異なる状態で結合していることを明らかにした。薬剤耐性にはいくつかの機序が知られているが、排除など解毒機構を有する蛋白質と抗がん剤との結合は高いことが知られている。したがって、HPLC-ICP-MS で得られた結合の高い蛋白質群には薬剤耐性誘導候補因子が含まれる可能性が高いと考える。現在、薬剤耐性を獲得した細胞での解析を準備している。HPLC-ICP-MS の応用として、発がんモデル動物を用いて病態の原因因子のひとつと考えられる蛋白質の同定に成功した。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- [1] H. Nakamori, S. Matsuyama, S. Imai, T. Kimura, Y. Sano, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, T. Ishikawa and K. Yamauchi, “Experimental and simulation study of undesirable short-period deformation in piezoelectric deformable X-ray mirrors”, *Review of Scientific Instruments* (Accepted).
- [2] Y. Nishino, M. Eltsov, Y. Joti, K. Ito, H. Takata, Y. Takahashi, S. Hihara, A. S. Frangakis, N. Imamoto, T. Ishikawa and K. Maeshima, “Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure”, *EMBO J.* 31(7), pp. 1644-1653, 2012 (DOI: 10.1038/emboj.2012.35)
- [3] H. Takata, and K. Maeshima, “Irregular folding of nucleosomes in the cell”, *Physics of Life Reviews* 8, pp.51-52, (2011). (DOI: 10.1016/j.plrev.2011.01.005).
- [4] K. Maeshima, S. Hihara, H. Takata, “New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers?” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75, pp.439-444, 2011. (DOI: 10.1101/sqb.2010.75.034)
- [5] Y. Takahashi, A. Suzuki, N. Zettsu, Y. Kohmura, Y. Senba, H. Ohashi, K. Yamauchi, T. Ishikawa, “Towards High-Resolution Ptychographic X-ray Diffraction Microscopy”, *Physical Review B* 83, p.214109, 2011 (DOI: 10.1103/PhysRevB.83.214109)
- [6] Y. Takahashi, A. Suzuki, N. Zettsu, Y. Kohmura, K. Yamauchi, T. Ishikawa, “Multiscale element mapping of buried structures by ptychographic x-ray diffraction microscopy using anomalous scattering”, *Applied Physics Letters* 99, p.131905, 2011 (DOI: 10.1063/1.3644396)
- [7] K. Yamauchi, H. Mimura, T. Kimura, H. Yumoto, S. Handa, S. Matsuyama, K. Arima, Y. Sano, K. Yamamura, K. Inagaki, H. Nakamori, J. Kim, K. Tamasaku, Y. Nishino, M. Yabashi, T. Ishikawa, “Single-nanometer focusing of hard x-rays by

Kirkpatrick–Baez mirrors”, *Journal of Physics: Condensed Matter* 23, p.394206, 2011 (DOI: 10.1088/0953-8984/23/39/394206)

- [8] H. Mimura, T. Kimura, H. Yumoto, H. Yokoyama, H. Nakamori, S. Matsuyama, K. Tamasaku, Y. Nishino, M. Yabashi, T. Ishikawa and K. Yamauchi, “One-dimensional sub-10-nm hard X-ray focusing using laterally graded multilayer mirror” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Reserch A* 635(1), pp.S16-S18, 2011 (10.1016/j.nima.2010.11.047)
- [9] S. Matsuyama, N. Kidani, H. Mimura, Y. Sano, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, T. Ishikawa and K. Yamauchi, “Hard-X-ray imaging optics based on four aspherical mirrors with 50 nm resolution”, *Optics Express* (Accepted).
- [10] H. Nakamori, S. Matsuyama, S. Imai, T. Kimura, Y. Sano, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, T. Ishikawa and K. Yamauchi, “Development of ultraprecise piezoelectric deformable mirror for adaptive X-ray optics”, *Key Engineering Materials* (Submitted).

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)