

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成 22 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

山内 和人

大阪大学大学院 工学研究科 教授

走査透過X線顕微鏡システムの実現と分析科学への応用

§1. 研究実施体制

(1)「山内」グループ

- ① 研究代表者: 山内 和人 (大阪大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - (ア) 大変形アダプティブ鏡の試作
 - (イ) 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) 集光ユニットの開発
 - (イ) コヒーレントX線イメージングアルゴリズム開発

(3)「志村」グループ

- ① 研究代表者: 志村 まり (国立国際医療研究センター研究所難治性疾患研究部難治性疾患研究室、室長)
- ② 研究項目
 - (ア) 走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)による白金製剤の細胞内局在分析
 - (イ) 走査型蛍光X線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

- 研究分担グループ長: 前島 一博 (国立遺伝学研究所、教授)
- ① 研究項目
 - (ア) 新しい白金製剤コンプレックス2の細胞に与える影響の解析

- (イ) 放射光先端光源を用いた分裂期染色体や間期クロマチンの構造解析
- (ウ) 新しい白金製剤コンプレックス2の細胞内局在の放射光によるイメージング

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本年度は、昨年度に確立した各要素技術の高度化を進めた。また、昨年度に引き続き顕微鏡システムの開発を進めた。具体的には、①大変形タイプのアダプティブ鏡の試作、②アダプティブKB集光システムの開発とその高度化、③新規像回復アルゴリズムの開発、④クロマチン構造におけるPt製剤取り込み量の調査とPt製剤の細胞内局在観察、⑤放射光X線を用いた染色体やクロマチンの構造解析、⑥Pt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新規像回復アルゴリズムの開発(西野チーム)

アダプティブKB光学系により実現される集光ビームを用いた、回折顕微鏡の新規像回復アルゴリズムの詳細な検討・高精度化を行った。昨年度までに非孤立状態の試料を、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、像回復が可能であることを確認している。今年度は更に、計測試料に濃度ムラが存在するなどより現実に近い条件であっても、オーバーサンプリング比等のパラメータを適切に設定することにより試料像回復が可能であることを示した(図3)(論文投稿中)。

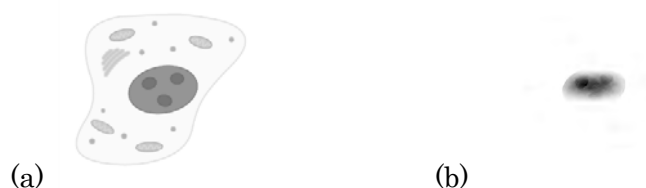


図3 回折顕微鏡のシミュレーション結果
(a)仮定した試料像 (b)再構成試料像

②クロマチン構造におけるPt製剤取り込み量の調査とPt製剤の細胞内局在観察(前島チーム、志村チーム)

白金製剤シスプラチンは「切れ味鋭い」抗がん剤として広く使われている。しかしながら、シスプラチンも様々な腫瘍に対して万能ではなく、耐性腫瘍の存在も危惧されている。このため、シスプラチンとは異なる動態をもつ白金製剤の登場が望ましい。私たちは新しい白金製剤コンプレックス2に注目し、その細胞内動態、作用機序の解明のため、さまざまな解析をおこなった。まず、コンプレックス2の細胞内局在を、放射光を用いた走査X線顕微鏡によって調べた。その結果、細胞の核を含め広範囲に局在が見られた。さらにコンプレックス2で処理した細胞の細胞周期に対する影響を調べた結果、DNA複製期に障害が見られた。さらに、コンプレックス2にシスプラチンとは異なり、クロマチンを凝縮させる活性があることを見出した。この凝縮活性がDNA複製を阻害する可能性が示唆された。

③放射光 X 線を用いた染色体やクロマチンの構造解析(前島チーム)

長いゲノム DNA がどのようにして細胞中に収納されているのかはまだ不明であり、生物学の重要課題である。昨年度の研究で、私たちは放射光を用いた X 線散乱解析をヒト分裂期染色体に対しておこない、ヒト染色体は、30-nm クロマチン線維よりもむしろヌクレオソーム線維の不規則な折り畳みによって構築されていることを示した。本年度、放射光での X 線散乱解析により、このような不規則な構造は細胞の間期クロマチンにおいても存在していることが分かった(11)。この結果は、間期と分裂期細胞のクロマチン構造の類似性を示している。このような不規則な収納は、物理的な束縛が少ないため、個々のヌクレオソームが動ける余地も増え、遺伝情報の検索にとっては便利なことが多いと考えられる。実際、私たちは生きた細胞の中で、このヌクレオソームの動き(ゆらぎ)を観察することに成功した(13)。さらに、細胞内のヌクレオソームのゆらぎは、タンパク質の運動と DNA へのアクセスの両面において重要であることがわかった(12)。

④Pt 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と考える。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。白金製剤の細胞内標的の解明は、白金製剤各種の主作用、副作用機序を明らかすると考える。本研究で確立した複数の手法は、以降、新規白金製剤の開発に応用できると考える。そこで、等電点或いは native-gel 電気泳動ゲルを用いた、Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence (SPAX)を提案した。本手法は金属結合タンパク質の結合金属を検出することができる。本年度は、本手法の検出下限向上とその評価を進めた。最適な native-gel フィルムを作製することで、白金製剤(Pt)が結合した血液中蛋白質の分析において、検出限界 80 fg を達成した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. S. Matsuyama, H. Yokoyama, R. Fukui, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, W. Yashiro, A. Momose, T. Ishikawa, and K. Yamauchi, Wavefront measurement for a hard-X-ray nanobeam using single-grating interferometry, *Optics Express*, 20 (2012) 24977-24986. (DOI: 10.1364/OE.20.024977)
2. S. Matsuyama, A. Matsunaga, S. Sakamoto, Y. Iida, Y. Suzuki, Y. Ishizaka, K.

- Yamauchi, T. Ishikawa and M. Shimura, “Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence”, *Metallomics*, in press. (DOI: 10.1039/c3mt20266f)
3. T. Kimura, S. Matsuyama, K. Yamauchi, Y. Nishino, “Coherent x-ray zoom condenser lens for diffractive and scanning microscopy”, *Optics Express*, in press.
 4. H. Nakamori, S. Matsuyama, S. Imai, T. Kimura, Y. Sano, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, T. Ishikawa, K. Yamauchi, “X-ray nanofocusing using a piezoelectric deformable mirror and at-wavelength metrology methods”, *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. A*, in press. (DOI: 10.1016/j.nima.2012.11.059)
 5. S. Matsuyama, T. Kimura, H. Nakamori, S. Imai, Y. Sano, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, T. Ishikawa, K. Yamauchi, “Development of piezoelectric deformable mirror for hard X-ray nanofocusing”, *Proc. SPIE 8503* (2012) 850303. (DOI: 10.1117/12.930276)
 6. H. Yumoto, H. Mimura, T. Koyama, S. Matsuyama, K. Tono, T. Togashi, Y. Inubushi, T. Sato, T. Tanaka, T. Kimura, H. Yokoyama, J. Kim, Y. Sano, Y. Hachisu, M. Yabashi, H. Ohashi, H. Ohmori, T. Ishikawa and K. Yamauchi, “Focusing of X-ray free-electron laser pulses with reflective optics”, *Nature Photonics*, 7 (2012) 43-47. (DOI: 10.1038/nphoton.2012.306)
 7. H. Nakamori, S. Matsuyama, S. Imai, T. Kimura, Y. Sano, Y. Kohmura, K. Tamasaku, M. Yabashi, T. Ishikawa, and K. Yamauchi, “Development of an ultraprecise piezoelectric deformable mirror for adaptive X-ray optics”, *Key Engineering Materials*, 523-524 (2012) 50-53. (DOI: 10.4028 /www.scientific.net/ KEM.523-524.50)
 8. Y. Joti, T. Hikima, Y. Nishino, F. Kamada, S. Hihara, H. Takata, T. Ishikawa and K. Maeshima, “Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber”, *Nucleus* 3 (2012) 404–410. (DOI: 10.4161/nucl.21222)
 9. J. Pérez and Y. Nishino, “Advances in X-ray scattering: from solution SAXS to achievements with coherent beams”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22 (2012) 670–678. (DOI: 10.1016/j.sbi.2012.07.014)

10. Shang, W.H., Hori, T., Martins, N.M., Toyoda, A., Misu, S., Monma, N., Hiratani, I., Maeshima, K., Ikeo, K., Fujiyama, A., Kimura, H., Earnshaw, W.C., and Fukagawa, T. (2013). “Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres”, *Dev Cell*. in press. (DOI: 10.1016/j.devcel.2013.02.009)
11. Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., Nagai, T., Maeshima, K. “Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells”, *Cell Reports* 2 (2012) 1645-1656. (DOI: 10.1016/j.celrep.2012.11.008)
12. Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., Maeshima, K. “Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber”, *Nucleus* 3(5) (2012) 404-410. (DOI: 10.4161/nucl.21222)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)