

X線顕微鏡ラボ

(X-ray Microscopy Lab.)

研究項目：X線顕微鏡による細胞内小器官の動的構造の研究

研究期間：平成9年度～13年度

1. 当該研究の背景

1.1 X線顕微鏡の研究開発の歴史

現在、生物の微細構造を観察するために一般的に用いられているのは、光学顕微鏡と電子顕微鏡である。光学顕微鏡は生きている試料をそのまま観察することができるのが特徴である。試料の染色や固定を行い特定の含有物や微細構造を際立たせることにより、得られる像のコントラストをあげることもできる。可視光を用いた観察は、試料の損傷が少ないことが長所であるが、分解能は200nmにとどまる。また、可視光が透過できない試料は見るができない。

電子顕微鏡は電子線を照射するので、試料を真空中に保持する必要がある。また、電子線は物質透過性が良くないため、試料を固定したのち樹脂に抱埋し超薄切片にスライスする必要がある。得られる電子顕微鏡像のコントラストをあげるために重金属で試料を染色することも必要である。このため、電子顕微鏡では、生きている試料を観察することはできない。さらに、こうした試料作成の過程で生じる試料の変性変形の可能性を考慮に入れておかなければならない。電子顕微鏡で生物試料を観察する場合、分解能は数nmである。

X線には、波長が可視光線よりも短い、試料透過性が高い、元素に特有の吸収端を持つなどの特徴がある。特に波長が数nmの軟X線領域には、酸素と炭素のX線吸収端がそれぞれ2.3nmと4.4nmに位置している。これらの吸収端の間の波長領域では、炭素によるX線の吸収が酸素による吸収を一桁上回っている。これはタンパク質や核酸などの主だった構成元素である炭素によるX線の吸収が、水分子を構成している酸素による吸収を一桁上回っている事を意味している。水の酸素の吸収に邪魔されることなく生物を構成している炭素による吸収を画像化することのできるこの波長領域は「水の窓」と呼ばれている。「水の窓」の波長領域の軟X線を用いた軟X線顕微鏡は、生きている試料を光学顕微

鏡よりも高分解能で観察できる装置として関心が寄せられている。

X線顕微鏡の歴史は古く、1895年にX線が発見されてまもなく、X線顕微鏡作成の試みが始められたがうまくいかなかった。可視光線のように屈折に基づくレンズができないなど、技術的に困難な問題が多数あったためである。試料をX線感光性乾板の上に密着させて置き、X線露光を行う密着法も試みられたが、使用できるX線線感光材料の粒子サイズが大きすぎるため、細胞などの微細構造を観察するX線顕微鏡法には適さなかった。このためX線顕微鏡の研究は停滞し、20世紀半ばに電子顕微鏡が発明されると高分解能観察ができる装置として普及した。軟X線顕微鏡の研究が再び活発になったのは、集積回路の作成のためのリソグラフィなどの微細加工技術が発展し、X線顕微鏡研究開発のために利用できる周辺技術が発展した1980年代以降の比較的最近のことであり、現在も研究・開発が進められている。

1.2 X線顕微鏡とは？

生物試料の観察ができる軟X線顕微鏡には、幾つかのタイプがある。結像型X線顕微鏡は、フレネルゾーンプレートや多層膜ミラーなどのX線光学素子を用いて拡大X線像を結ばせる。ゾーンプレートは、回折格子の溝を同心円状に配列したもので、格子の間の幅を中心から外側に向かうにしたがって狭くすることにより、それぞれの格子で回折されたX線が光軸上の一点に集光するように設計されているもので、作成にはリソグラフィなど精度の高い微細加工技術の発展が必要であった。密着型X線顕微鏡は、X線光学素子は使わずに試料をX線感光材料の上に密着させて露光し原寸大のX線像を得る。試料をX線源とX線感光材料の間に置き試料の拡大投影像を得る投影型X線顕微鏡、X線ビームで試料を走査する走査型X線顕微鏡などもある。

X線源には、連続照射線源としてシンクロトロン放射

光,フラッシュX線源としてレーザー生成プラズマが用いられる。また,金属薄膜に電子線を照射させて得られるX線も投影型X線顕微鏡のX線源として用いられている。X線像の記録には,CCDカメラやX線感光性のポリマーの膜,電子ズーム管,写真フィルム等が使われる。

放射光を光源とするゾーンプレートを使った結像型X線顕微鏡は,ドイツのゲッチンゲン,アメリカのパークレーや日本では立命館大学に設置されている。放射光を光源とするこれらの装置では,X線像を得るために必要な露光時間が数秒から数十秒であり,水の中で生きている試料の観察に相当であるとはいえない。

この際に問題となるのがX線照射による試料の損傷とそれがX線像におよぼす影響である。きれいなX線像を得るために必要なX線量は,生物に損傷をひき起こすとされる線量の1000~10000倍であるため,照射するX線がひき起こす試料の損傷は無視できず,生物試料を観察する場合の重要な問題点になっている。

試料に吸収されたX線のエネルギーは,熱エネルギーに変わる。試料の温度上昇をひき起こし,そのため試料は変性し形態的变化が生じる。このため露光時間が長いと,試料の変性による形態的变化も同時にX線像に記録されることになり,得られたX線像の質は著しく低下する。きれいなX線像を得るためには,試料自体の損傷を抑える工夫や試料の損傷・変型がX線像に与える影響を抑える工夫が必要である。そのための工夫として,露光時間の長い放射光を用いたX線顕微鏡では試料を液体ヘリウム温度に冷却した水中に抱埋し,X線露光にともなう熱変性による試料の損傷を防ぐことも行われているが,生きている試料の観察には利用できない。

1.3 密着型フラッシュX線顕微鏡の利点

X線照射による試料の損傷をさけることができないとすれば,きれいなX線像を得るためには,X線照射による試料の変性変形の影響がX線像にあたえる影響を少なくしなければならない。試料に吸収されたX線が熱に変わり,X線像の乱れの原因となる試料の熱変性や膨張をひき起こすには一定の時間がかかるので,フラッシュ露光に要する時間が試料の熱変性や引き続いておきる熱膨張過程の定数とくらべて十分に短ければ,X線照射による試料の熱変性・熱膨張過程が

始まる前に,X線像を撮り終えることができる。近年の大出力レーザーの開発により,レーザー生成プラズマを点X線源として利用することが可能となった。レーザーから出されるパルス光をレンズで集光して金属などの標的にあてると,局所的に温度が数百万度にまで上昇しプラズマが生成され,そこからX線が放射される。プラズマの寿命は短いので,このX線源はフラッシュ光源として働く。

当所ではこの点に着目して,大出力レーザーを用いて放射光のかわりにレーザー生成プラズマをX線源に用いた密着型フラッシュX線顕微鏡を開発した。このX線顕微鏡の特徴は,X線照射時間が数100ピコ秒から数ナノ秒と短いため,X線照射による生物試料の変性が始まる前にX線像を撮り終えることができ,水中を動いている試料でも観察できる点にある。また,密着型X線顕微鏡像を読み出すのに,従来行われていたように,X線感光性ポリマーであるPMMAの薄膜上に形成されたレリーフ状のX線像のレプリカを作成してそれを電子顕微鏡で観察するのではなく,原子間力顕微鏡を用いてPMMAの上のレリーフ状のX線像を直接に読み出すとともに拡大する方法を導入した¹⁾。当所で始めた原子間力顕微鏡を用いて密着型X線顕微鏡像を読み出す方法は,世界的に幅広く利用されている。さらに小型レーザーを用いてX線顕微鏡を卓上型のものとすることによって,加速器施設や大出力レーザー施設を必要とせず生物学者の実験室レベルでX線顕微鏡による試料の観察を行うことを可能にした。

これにより,平成10年度茨城県科学技術振興財団つくば奨励賞を受賞した。

2. これまでの研究経過と現状

先に述べたような背景のもとで当所で研究開発を進めてきたレーザー生成プラズマをX線源として用いる密着型フラッシュX線顕微鏡は,光学顕微鏡より高分解能(約30nm)で水中の生きている細胞が観察出来る特徴をもつ。

生きている細胞の観察について光学顕微鏡像とX線顕微鏡像との比較のため,X線顕微鏡の視野内の同一試料の蛍光顕微鏡像を観察することができるように,蛍光顕微鏡をX線顕微鏡に組み込んだシステムを構成した。これにより,X線顕微鏡像に顕われている特定の

イメージが細胞内のどの細胞器官によるものであるのかを同定することが可能になった。

また、電子顕微鏡像との比較では、形態が特徴的であるイモリの精子を用いて、臨界点乾燥を行った試料の走査型電子顕微鏡像と水中で生きている試料のX線顕微鏡像との比較を行った。精子の構造は、ミトコンドリアのように水分に豊んだ組織は走査型電子顕微鏡像ではやや縮んで見えたが、X線顕微鏡像で見られる形態的特徴が走査型電子顕微鏡像でも同様に観察された。これらの結果から、フラッシュ露光をもちいれれば、X線顕微鏡で水の中で生きている状態での精子や細胞などの形態的特徴を観察することができることが明らかになった。これまで走査型電子顕微鏡観察試料の作成に用いられ、光学顕微鏡像との比較で「生きている状態での形態的特徴を比較的よく保持している」と考えられてきた臨界点乾燥法が、生きている状態での試料の状態をよく反映していることをX線顕微鏡法により確認した。

培養細胞に関しては、シリコン基板上にスピンコートしたX線感光ポリマーであるPMMA層の上でPC12細胞を培養し軸索の伸展を誘導させたのちX線顕微鏡

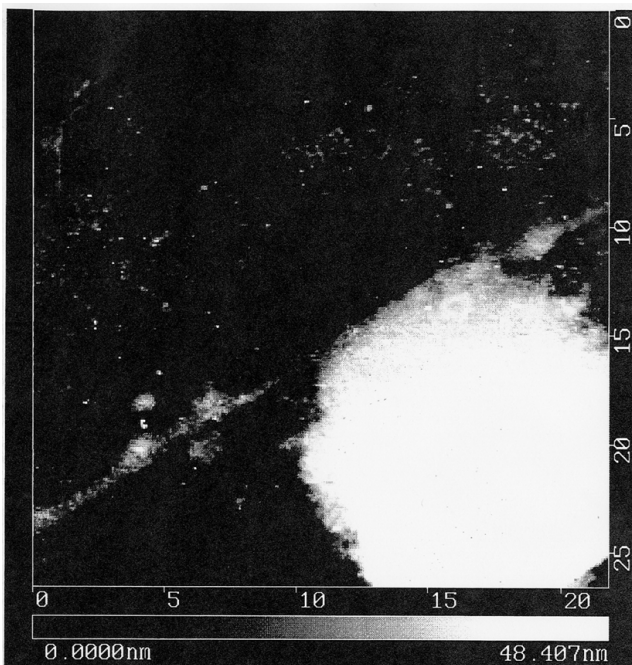


図1 PC12細胞のX線顕微鏡像。シリコン基板上にスピンコートされたPMMA上で培養されたPC12細胞をそのまま試料に用いて得られたX線像を原子間力顕微鏡で拡大したもの。細胞から伸長した軸索上にパリコシティ様の結節が観察される。

で観察を行い、伸長した軸索上にパリコシティ様の結節を観察した(図1)。

細胞の動的構造変化を観察するために、外部刺激により誘導される数十秒程度の時定数をもつ細胞の構造変化の観察例として、好中球の形態変化の観察を行い、密着型フラッシュX線顕微鏡システムを用いて細胞の動的構造変化を観察する事ができることを示した。こうした目的のために装置の利便性をさらに高めるには、視野選択の自由度を増すことが重要である。また、試料が生きている状態と固定・乾燥された状態とでのX線顕微鏡像の比較を行うために、 β -ブチルアルコールを用いた凍結乾燥法により試料を作成し観察した結果、固定剤の影響がX線顕微鏡像に現れる場合があることが判明した。これに関連して、X線顕微鏡像と電子顕微鏡像との比較のための共同研究を始めた。

3. 予測される波及効果

本研究に先行する研究も含めて当所で開発を進めてきた密着型フラッシュX線顕微鏡システムの研究開発は、ゾーンプレートの作成など微細加工技術を必要とするX線光学素子を用いることなく、またX線源もこれまでのようにシンクロトロンや大出力レーザーなどのような大掛かりな装置を必要とせず卓上サイズのレーザーの利用を可能にし、X線像の読み出しにおいても電子顕微鏡にかえて原子間力顕微鏡を利用する新たな方式を提案することで、これまででは一般的ではなかったX線顕微鏡を、ラボサイズの装置とすることに成功した²⁾。

4. 今後の研究展開の方向

軟X線顕微鏡は開発途上にある装置である。現在稼働している装置は、世界的にみても極めて限られている。X線顕微鏡で得られるX線像が投影像であるため光学顕微鏡や電子顕微鏡と比べて画像の解釈が複雑になってしまう難点がある。しかしながら、固定・染色・脱水といった透過型電子顕微鏡の試料作成過程で壊れてしまう構造でも水の中で生きている状態のまま観察できるので、こうした利点をどのように活かす事ができるのか検討をすすめたい。

参考文献

- 1) T. Tomie, H. Shimizu, T. Majima, M. Yamada, T. Kanayama, H. Kondo, M. Yano and M. Ono, "Three-dimensional readout of flash X-ray images of living sperm in water", Science 252, 691-693 (1991)
- 2) T. Majima, H. Shimizu and T. Tomie, "Recent advances in soft X-ray microscopy for living specimens", Bioimages 7, 59-67 (1999)

当該研究担当者等

1) ラボ構成員(総数4名)

職員(3名) 眞島利和* ,山田雅弘(超分子部) ,富江敏尚
(エネルギー部) ,

職員以外(1名) 清水秀明(超分子部併任)

2) その他の研究協力者

三浦永祐(エネルギー部) ,廣島洋(電子デバイス
部) ,金山敏彦(産業領域融合技術研究所)

安部眞一(熊本大学理学部) ,田中滋康(静岡大学理
学部) ,新井孝夫(東京理科大学理工学部) ,A.Stead ,
T.Ford ,A.Pag(ロンドン大学ロイヤルホロウェイ校
生物科学部)

* ラボリーダー