

共同利用研究ハイライト

走査型軟X線顕微鏡 (STXM) による定量的生体分子イメージングの進歩

伊藤 敦 東海大学工学部原子力工学科 教授

1. はじめに

軟X線顕微鏡の生体試料の微細構造観察における期待として、高分解能で厚い試料をそのまま観察できること、水の窓と呼ばれる生体分子の吸収にくらべて水の吸収が少ないエネルギー領域を用いれば、水を含んだ試料も高いコントラストで観察できる、などが認識されてきた。ただし、厚いと言っても1ミクロン程度、また水を含んだ試料は特別な試料ホルダーに装着し、真空中に維持しなければならない。一方、観察対象の生体試料条件により柔軟に対応できる硬X線イメージングが、近年分解能やコントラストを向上させてきている。このような状況において、C, N, Oの軽元素からなる有機高分子、生体分子を対象として、これら元素吸収端での吸収端近傍微細構造 (NEXAFS) を利用した分子イメージング (顕微分光法) は、依然として他の手段では困難な軟X線特有の技術である。現在最も広く用いられている光学系は、ゾーンプレートによって集光されたマイクロビームで試料上を走査する走査型軟X線顕微鏡 (STXM) である。STXMにより分子を特定して画像化する分析顕微鏡は、高分子産業などの応用分野はいうまでもなく、基礎科学の分野でも今後大いに役立つものと期待される。定性的分析から定量的分析へはポリマーにおいてProf. Hitchcockらによって進められたが、構成成分が既知のポリマーと比べて、多様なしかも未知の構成分子を含む生体試料については、DNAと蛋白質の定性的な分布の違

いを示した報告しかない。ここでは生体試料での分子の定量的イメージングに関する我々の新たな試みについて紹介したい。

2. 染色体、細胞の核酸及び蛋白質分子間の分離イメージング

DNAと蛋白質の分離について、我々は以前よりC吸収端よりN吸収端のNEXAFS利用がより有効と考えていた。図1に示すようにDNAの特徴的なピークが低エネルギー側に存在するためである。DNA特有のピークを核酸の定量的分布解析に利用する方法の開発が篠原邦夫博士を中心に進められた。概略は、試料画像のエネルギースタック (NEXAFSの各エネルギーで取得された画像の集合体) からDNA量のスタックを差し引くことで、図1の高エネルギー側のピークは蛋白質のみとなる。DNAと同様の手順で蛋白質スタックを作成しさらに差し引く、という逐次的な

方法で未知の分子の存在と量を求める手法を開発した。さらに、N吸収端ばかりでなく、C及びO吸収端での画像のエネルギースタックすべてを結合させたスタック、およびN,C,O吸収端での生体分子NEXAFSを結合させたスタック、吸収スペクトルに対し上記手順を実行することによって、Nを持たない分子の存在も確認する工夫を行った。

生体試料観察では、まず軟X線が十分透過する薄い染色体を用い、DNAと蛋白質の定量的分布を報告した。蛋白質と対照的にDNAが染色体上で離散的分布を示すこと、DNAと蛋白質の量比は従来の全体量における比とほぼ一致することが明らかとなった^[1] (図2)。

ついでDNA差分画像を求める前に特異値分解 (SVD) 法を適用することにより、同じ核酸分子であるDNAとRNAの分離が可能となった。これらの分子は、N吸収端のNEXAFSでは類似

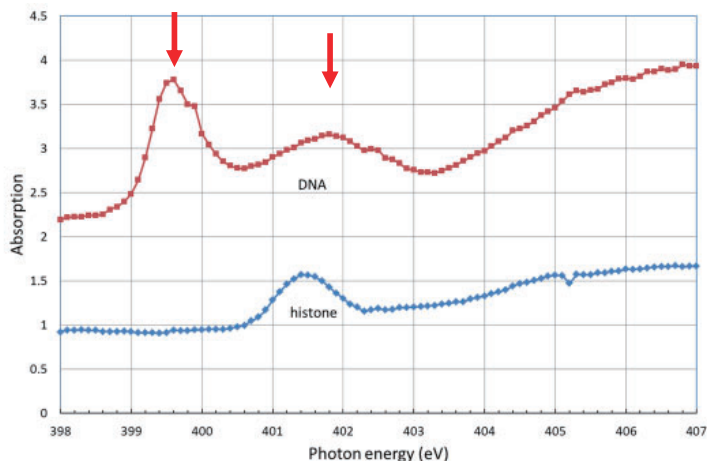


図1 DNAとヒストン蛋白質の窒素K吸収端でのNEXAFS。DNAにはピークが2つあり (矢印)、高エネルギー側のピークはヒストンとほぼ重なっている。

のプロファイルを示すが、C吸収端でわずかに異なることから分離できたと考えられる。この手法を培養細胞に適用し、核内にDNA、細胞質にRNAと異なる分布が示された^[2]。また染色体においても、RNAの分布はDNAと異なり、染色体周辺に存在するという新たな知見が得られた^[3]。さらに、同じ蛋白質でもヒストンとそれ以外の蛋白質の分離も可能であった。このように同じ種類の分子の識別、それらの定量的分布解析は、これまでのDNAと蛋白質の定性的分離から飛躍的な進歩をとげたと考えている。

3. 将来の展望

核酸、蛋白質分子間での分子種を識別できることは、軟X線顕微鏡の医学、生物学応用への広範な適用性を強く示すものである。しかし、本手法を細胞、

さらにアポトーシスを起こしている単離核へと適用する過程で問題点も明らかとなった^[3]。細胞や単離核はそのまま観察するには部分的に厚すぎ、X線の透過が限られる。切片化した試料も試みる必要があるだろう。これらの問題を解決した先には、X線の透過性を生かした試料そのままでのコンピュータ断層撮影法(CT)観察によって、3次元で分子分布を求めるといった展開が期待できる。STXMによるCT観察の試みはすでに大東琢治博士によって進められている^[4]。

4. おわりに

本研究はSTXMが常設されているラインではじめて実現することができた。また、担当者のサポートも大きい。今後、CTなど先進的な技術開発と並行して、マニュアル等を充実させ、多くの

分野の研究者、技術者が分析手段としてルーチンに利用できるような装置として発展するよう希望したい。



いとう・あつし
1983年東京大学大学院理学系研究科物理学専門課程修了。理学博士。1985年米国アルゴンヌ国立研究所ポスドク、1987年東京都臨床医学総合研究所研究員、1994年東海大学工学部原子力工学科助教授、2002年より同学科教授。軟X線顕微鏡の生物・医学応用、放射線の生物影響の研究に従事。

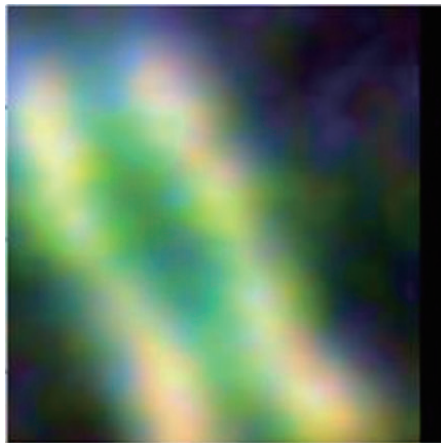


図2 チャイニーズハムスターCHO細胞の染色体におけるDNAとヒストンの分布。DNA：赤、ヒストン：緑。DNAとヒストンの共存領域は黄色となる。(UVSOR Activity Report, 2017より)

参考文献

- [1] K. Shinohara et al., *Ultramicrosc.*, **194**, 1 (2018).
- [2] K. Shinohara et al., *J. X-Ray Sci. Technol.*, **26**, 877 (2018).
- [3] K. Shinohara et al., *Cells*, **8**, 164 (2019).
- [4] T. Ohigashi et al., *J. Phys. Conf. Ser.*, **849**, 012044 (2017).