

X F E L コヒーレント回折イメージング実験手法の開発と 細胞イメージングへの応用

平成 29 年度

小林 周

報告番号	○甲 乙 第	号	氏 名	小林 周
主論文題名： XFEL コヒーレント回折イメージング実験手法の開発と細胞イメージングへの応用				
(内容の要旨) 生物の最も基本的な単位である細胞は、細胞核や葉緑体といった細胞小器官をもっており、さらにその内外には膨大な水分子と共にタンパク質や核酸、脂質など生体分子を含んでいる。これらは μm から nm の複雑な空間階層構造を有しており、その機能構造を真に理解するためには、細胞丸ごとを空間階層に隔たりなく可視化する必要がある。コヒーレント X 線回折イメージング(Coherent X-ray diffraction Imaging: CXDI)は、 μm サイズの非結晶試料を数十 nm 分解能で解析することが可能で、これまで電子顕微鏡と光学顕微鏡による解析が困難であった空間階層領域の橋渡しをする構造解析手法として期待されている。 CXDI 実験では、試料に空間コヒーレンスの高い X 線を入射して得られる回折パターンに位相回復法を適用し、X線入射方向に対する投影電子密度像を回復する。X線自由電子レーザー(X-ray free electron laser: XFEL)は、超高輝度かつ超短パルス光源であるため、CXDI 実験の入射光源として理想的であり、パルス 1 ショットで、放射線損傷のない構造を回折パターンとして記録できる。しかし、照射後に試料はクーロン爆発を起こして破壊されるので、同一試料から複数の回折パターンを取得することは不可能であり、トモグラフィーによって三次元電子密度分布を可視化することはできない。近年、計算機実験において、同一の試料であるが異なる個体の投影電子密度像から三次元構造を回復できることが示された[Kodama & Nakasako., <i>Phys. Rev. E</i> 84 , 021902 (2011)]。しかしながら、この手法を適用するためには膨大量の回折パターンを計測する必要があった。 研究室では、真空環境下で多数の試料粒子を散布した薄膜を XFEL パルス毎に並進させ、新鮮な試料を照射野に連続的に提供する実験方式を採用しているため、並進速度及び試料の交換効率が回折パターン取得効率を左右する。加えて真空中で、水和環境が必須である細胞試料の機能構造を維持しなければならない。また、XFEL を用いた CXDI 実験では、ビームストッパーや検出器の飽和により回折パターンの極小角領域にデータ欠損が生じる。極小角領域は、試料概形に関する情報を含むため、像回復効率が低下することがしばしばであった。 回折パターン計測効率を向上させるために高速並進ステージが実装されたクライオ試料固定照射装置の利用において、同装置の制御ソフトウェアの開発と細胞試料を凍結水和状態とする試料調整手法を確立することで、およそ 80 時間で 90~160 万枚の回折パターンを取得できるようになった。質の高い回折パターンからは、シアノバクテリアや酵母の細胞核の投影電子密度像が $\sim 100 \text{ nm}$ の分解能で得られた。また、回折パターンの中心対称性を考慮した新規暗視野位相回復法を開発することにより、極小角領域を大きく欠損した回折パターンにおいても像回復が可能となることを示した。これらの計測・解析技術を用いて細胞や細胞小器官の投影電子密度像が大量に得られるようになった。本研究ではこれらをシアノバクテリアの三次元構造解析に適用した。				

Thesis Abstract

No. _____

Registration Number	<input checked="" type="checkbox"/> “KOU” <input type="checkbox"/> “OTSU” No. _____ *Office use only	Name	Amane Kobayashi
Thesis Title Development of measurement techniques in coherent X-ray diffraction imaging utilizing XFEL and its application for imaging biological cells			
Thesis Summary <p>Biological cell is a basic unit of all known living organisms, and are composed of cellular organelles such as a nucleus, a chloroplast, and so on. Inside and outside the organelles, there are numerous numbers of biological molecules such as proteins, nucleic acids, and lipids, which are immersed in water. Biological cells have complicated and hierarchical structures with resolution range from micrometer to nanometer. One of ultimate goals of cell biology is the visualization of whole structures of cells at a resolution without gaps between the spatial hierarchies. Coherent X-ray diffraction imaging (CXDI) has the potential to visualize whole cellular structures at a resolution of a few tens of nanometers, and is expected to bridge the resolution gaps inaccessible for both light microscopy and transmission electron microscopy.</p> <p>In CXDI experiments, an isolated specimen particle is irradiated by an X-ray beam with high transverse coherence. From the Fraunhofer diffraction pattern recorded by an area detector, the electron density map of the particle projected along the direction of incident X-ray is reconstructed by using the phase-retrieval algorithms. Recently, X-ray free electron laser (XFEL) sources, which provide very intense X-rays with almost coherent pulses at the duration of tens fs, have been utilized in CXDI experiments. However, single XFEL pulses destroy the specimen particles at the atomic level through the Coulomb explosion after the diffraction from the particles occurs. Therefore, it is impossible to visualize a three-dimensional (3D) electron density map from one specimen particle by tomography experiments. In recent years, a protocol was proposed for reconstructing the 3D electron density map from a number of projection electron density maps of particles in various orientations against the directions of incident X-ray beams [Kodama & Nakasako, <i>Phys. Rev. E</i> 84, 021902 (2011)]. Toward utilizing the method, a huge number of diffraction patterns must be efficiently collected in CXDI experiments using XFEL pulses (XFEL-CXDI).</p> <p>In our Laboratory, we developed a diffractometer with a high-speed translation stage to provide fresh specimen particles into the irradiation area by raster scan against trains of XFEL pulses under vacuum condition. To enable the collection of a huge number of diffraction patterns, the author developed the motion control and scheduling software of the diffractometer. In addition, to keep functional structures of biological specimens in the vacuum environment, the author developed methods for preparing frozen-hydrated biological specimens. As a result, these developments allow us to collect 0.9~1.6 million diffraction patterns within 80 hours. From the high quality diffraction patterns, the projection structures of biological specimens, such as cyanobacterial cells and nuclei of yeast, were visualized at resolutions of ~100 nm. Furthermore, to efficiently reconstruct electron density maps from diffraction patterns missing data in the small-angle regions due to a beam stopper and the saturation of the area detector, the author proposed a phase-retrieval method using the Friedel centro-symmetry in diffraction patterns as the constraint. These experimental and theoretical methods made XFEL-CXDI more effective to visualize the structures of biological cells and cellular organelles. In addition, the author applied the XFEL-CXDI methods to 3D structural analyses of cyanobacterial cells.</p>			