

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

学位論文 博士（理学）

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

指導教員 中迫 雅由 教授

平成 29 年度

慶應義塾大学大学院 理工学研究科
基礎理工学専攻 物理学専修

小林 周

論文要旨

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., *Phys. Rev. E* 84, 021902 (2011)]。しかしながら、この手法を適用するためには膨大な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。

目次

第一章	序論	
1.1	細胞の空間階層構造とその可視化技術	1
1.2	コヒーレント X 線回折イメージング	5
1.3	X 線自由電子レーザーを用いたコヒーレント X 線回折イメージングの計測・解析手法の現状	6
1.3.1	1 ショット回折パターン計測技術	6
1.3.2	三次元電子密度分布の可視化	9
1.4	X 線自由電子レーザーを用いたコヒーレント X 線回折イメージングにおける課題	10
1.4.1	回折パターン計測技術における課題	11
1.4.2	位相回復における課題	11
1.5	本研究の概要と章立て	13
第二章	コヒーレント X 線回折イメージングの原理	
2.1	電子による X 線の散乱	14
2.2	電子による散乱 X 線の干渉	16
2.3	物質による X 線の回折	17
2.3.1	電子密度分布と構造因子	17
2.3.2	Friedel 対称性	19
2.3.3	Ewald 球	19
2.3.4	非結晶試料からの回折強度	21
2.4	回折パターンからの電子密度像回復	23
2.4.1	オーバーサンプリング	24
2.4.2	反復的位相回復アルゴリズム	26
2.4.3	Shrink Wrap (SW) アルゴリズム	28
2.4.4	Oversampling Smoothness(OSS) アルゴリズム	30
2.4.5	位相回復の収束度評価	30
2.4.6	回復した投影電子密度像の有効分解能	32
2.4.7	回復像の妥当性の評価	34

2.5	光のコヒーレンス	34
第三章	SACLA における XFEL-CXDI 実験	
3.1	X 線自由電子レーザーの概要	38
3.1.1	電子の加速と圧縮	38
3.1.2	アンジュレーターによる X 線の放射	40
3.1.3	自発放射とコヒーレント放射	41
3.1.4	電子のマイクロバンチング	42
3.1.5	自己増幅自発放射方式による XFEL 発振	43
3.1.6	一般のレーザーと X 線自由電子レーザーの比較	44
	SACLA で供給される XFEL パルスの性質	45
3.2	SACLA の概要	47
3.3	CXDI 実験で利用する集光光学系と検出器	48
3.3.1	K-B ミラー	48
3.3.2	MPCCD 検出器	51
3.4	細胞の CXDI 実験に適した X 線波長	51
第四章	クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の制御ソフトウェアの開発	
4.1	クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の開発経緯	53
4.2	クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の構成	55
4.2.1	凍結水と試料を運搬するための試料ホルダー	56
4.2.2	低温ポット	57
4.2.3	高速ラスタースキャンステージ	58
4.2.4	プログラマブルロジックコントローラー	60
4.2.5	試料ホルダーの真空槽への搬送機構	61
4.2.6	試料ホルダーの位置決め機構	64
4.2.7	寄生散乱除去スリット	66
4.2.8	精密定盤	67
4.3	制御ソフトウェア	67
4.3.1	制御システム構成	68
4.3.2	開発環境	71

4.3.3	グラフィカルユーザーインターフェース	72
4.3.4	Manual Control: 各ステッピングモーターの制御と PIN photodiode を用いた X 線強度測定	73
4.3.5	Wire scan: ナイフエッジスキャン	77
4.3.6	Sample mount: 試料ホルダーの交換とラスタースキャン範囲の指定	80
4.3.7	Data Collection: ラスタースキャン	84
4.4	フーコーテスト、ナイフエッジスキャン、L 字シリコンフレームによって調整された XFEL パルスの性質	86
第五章 試料粒子散布手法の開発		
5.1	試料粒子散布・照射用薄膜	91
5.1.1	炭素薄膜	91
5.1.2	エポキシ樹脂薄膜	92
5.1.3	窒化シリコン膜	94
5.1.4	大面積分割窒化シリコン膜	97
5.1.5	薄膜からの回折パターン	98
5.2	金属材料粒子の散布	99
5.2.1	酸化銅キューブ	99
5.2.2	金コロイド粒子	101
5.3	細胞試料の散布と凍結	103
第六章 高砂六号と試料粒子散布手法を用いた XFEL-CXDI 実験		
6.1	光学系のセットアップと回折データ解析の方法	106
6.1.1	光学系のセットアップ	106
6.1.2	回折データ解析	107
6.2	結果	107
6.2.1	XFEL パルスの利用効率	107
6.2.2	XFEL パルスの試料粒子へのヒット率	110
6.2.3	薄膜上に残る培養液の量が細胞試料の回折パターンに与える影響	116

6.2.4	シアノバクテリアのサイズ分布と投影構造	120
6.2.5	六方晶氷からの回折	123
6.2.6	非結晶試料の投影構造	124
6.3	考察	127
6.3.1	ブロッティングの改善	127
6.3.2	PLL 局所的処理による良質な回折パターンの取得効率の改善	129
6.3.3	凍結処理および真空環境による試料サイズの変化	131
6.3.4	投影電子密度像のコントラスト	131
第七章 Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法		
7.1	Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法の開発	134
7.1.1	暗視野位相回復法の概要	134
7.1.2	Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法の原理	136
7.1.3	暗視野位相回復法を用いた像回復シミュレーション	140
7.1.4	XFEL-CXDI 実験データへの Fs-DFPR の適用	149
7.1.5	考察	153
7.2	ガウシアンマスクによって得られる自己相関関数を用いた応用	158
7.2.1	暗視野自己相関関数の導入	159
7.2.2	暗視野自己相関関数のドーナツ型マスク自動処理法への応用	161
7.2.3	回折パターンに寄与するビームサイズ評価への応用	166
7.3	展望	167
第八章 細胞の三次元構造解析に向けた将来展望		
8.1	XFEL-CXDI による三次元構造解析の概要	169
8.2	シアノバクテリアの XFEL-CXDI 実験	171
8.2.1	シアノバクテリア <i>Prochlorococcus</i>	171
8.2.2	シアノバクテリアの細胞周期解析	172
8.2.3	試料作製と回折パターン測定、回折データ解析	174
8.3	シアノバクテリアの三次元構造解析	176
8.3.1	単粒子解析ソフトウェア EMAN による三次元再構成	176
8.3.2	シアノバクテリアの三次元構造	178

8.3.3	議論	178
第九章	結語	185
付録		
A	エポキシ樹脂薄膜の作製方法	187
B	シアノバクテリアのフローサイトメトリー	188
謝辞		190
参考文献		192

略語一覧

- a.u. : arbitrary unit
- PBS : Phosphate buffered saline / リン酸緩衝生理食塩水
- BFPR : Bright-field phase retrieval / 明視野位相回復。暗視野像を初期モデルにマスクが適用されていない回折パターンより電子密度像を回復する操作。
- BL : beamline / ビームライン
- CCD : charge-coupled device / 荷電結合素子
- CPU : central processing unit
- CXDI : coherent x-ray diffraction imaging / コヒーレント X 線回折イメージング
- DFPR : Dark-field phase retrieval / Martin らによる暗視野位相回復法[Martin *et al.*, 2012b]
- EH : experimental hutch / 実験ハッチ
- FSC : Fourier shell correlation
- Fs-DFPR: Dark-field phase retrieval under the constraint of the Friedel's symmetry/ Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法。
- FT : Fourier 変換
- FT⁻¹ : 逆 Fourier 変換
- FWHM : full width at half maximum
- GUI : graphical user interface / グラフィカルユーザーインターフェース
- HIO : hybrid input-output
- HPC : high-performance computer
- K-B : Kirkpatrick-Baez / K-B ミラー
- MPCCD: multi-port charge-coupled device
- OS : oversampling / オーバーサンプリング
- OSS : oversampling smoothness
- PC : personal computer
- PD : PIN photodiode / ピンフォトダイオード
- PDB : protein data bank
- PDI : protein disulfide isomerase
- PLC : Programmable Logic Controller
- PLL : poly-L-lysine
- PRTF : phase-retrieval transfer function
- PSF : point spread function / 点広がり関数

S/N : signal-to-noise ratio / 信号対雑音比
SEM : scanning electron microscope / 走査型電子顕微鏡
SVS : speckle visibility spectroscopy
SW : shrink-wrap
XFEL : x-ray free-electron laser / X線自由電子レーザー

第一章 序論

本章では、まず、物質の構造を可視化する種々の技術に触れ、本研究で主題とするコヒーレント X 線回折イメージングの位置づけについて述べる。その後、コヒーレント X 線回折イメージングの概要とその実験手法及び実験データの解析手法の現状を記し、これを発展させるための課題を提起する。最後に、本論文の概要と章立てを説明する。

1.1 細胞の空間階層構造とその可視化技術

生物の最も基本的な構成単位である細胞はマイクロメートルサイズで、その中には細胞核や葉緑体、ミトコンドリアといった細胞内小器官があり、さらにその内外には膨大な水分子と共にタンパク質など数~数十 nm サイズの生体分子が存在する(図 1-1)。このように細胞は多様な空間階層構造を有しており、構造ごとの各々の働きが複雑に作用し合うことによって、生命現象を支えている。そのため、真に細胞の機能構造を理解するためには、複雑な空間階層丸ごとを数~数十 nm 分解能で可視化する必要があり、様々な可視化技術が開発されてきた(表 1-1)。

蛍光顕微鏡は、数 μm の細胞丸ごとを観察することができる可視化技術である。試料に対して蛍光色素による染色や、蛍光タンパク質を誘導する遺伝子を導入することで、観察対象となる特定の領域を観察することができる。また、光軸方向の焦点位置を操作することで、三次元的な分布を可視化することができる。しかし、プローブである可視光の回折限界により達成可能な分解能は面内方向で 200 nm、深さ方向に至っては 500 nm に制限される[Schermelleh *et al.*, 2010]。近年、超解像顕微鏡の登場によって、この回折限界を超越した数十 nm の分解能が達成されたが[Betzig *et al.*, 2006; Moerner & Kador, 1989; Hell & Kroug, 1995]、これは蛍光発光点の位置分解能であり、細胞の全体像をとらえることはできない。また、励起光として、強力なレーザーで試料を走査するため、観察中に試料が破壊されてしまう恐れがある[Waldchen *et al.*, 2015]。さらに、蛍光物質を導入する際にはグルタルアルデヒドなどによって化学固定を要する場合があり、生理環境下での機能構造を見ることができているのかという疑問がある。

透過型電子顕微鏡は、波長の短い電子線をプローブとして使用するため、数 nm~数 Å の高分解能での観察が可能である。しかしながら、電子線は、静電ポテンシャルとの

強い相互作用に起因して、透過力が弱く、多重散乱を起こしやすいため、100 nm を超える厚みの試料の内部構造を可視化することは困難である。そのため、厚みの大きい細胞試料の内部構造を透視することが非常に困難である。細胞試料を薄片化して観察する方法があるが、試料本来の構造を乱さずに加工することは難しい [Al-Amoudi *et al.*, 2005]。また、薄片化する際には化学固定や重金属ラベリングが必要で、蛍光顕微鏡と同様に細胞の機能構造が維持されている保証はない。

厚い試料を高分解能で透視するためには、X 線をプローブとする構造解析手法が適している。X 線を試料に入射すると X 線の電場によって試料中の電子が揺さぶられ、そこから再び X 線が放射される。電子より放射された X 線は試料中の電子密度分布に依存して干渉パターンが生じる。干渉パターン（回折パターン）の X 線強度を観測し、干渉波の位相を観測データから回復できれば、電子密度分布を復元することができる。さらに、顕微鏡法のようにレンズ収差に惑わされることない。しかしながら、X 線と電子の相互作用は、電子の X 線に対する全散乱断面積が 10^{-29} m^2 程度であることからわかるように、観測強度は極めて小さい。そこで、X 線結晶構造解析では、試料粒子を結晶として整列させることで、強い Bragg ピーク(表 1-1(c))が得られて信号対雑音比 (signal to noise ratio: S/N 比)が向上させている [Drenth, 2007]。また、極低温に保つことで X 線吸収によって生じる放射線損傷を低減させることが可能である [Garman & Schneider, 1997; Garman & Owen, 2006; Nakasako, 2004]。これまで、低温 X 線結晶構造解析を用いて多くのタンパク質及びその酵素反応において不可欠な水と水分子の分布が可視化されてきた。しかし、大きく長距離秩序を保てない試料の結晶化は難しく、現状で結晶化可能な試料粒子の大きさは 100 nm ほどである。

三種類の代表的な微細構造可視化技術について、それぞれが解析可能な空間スケールを図 1-1 のように考慮すると、可視化困難な空間階層領域が存在することがわかる。この空間階層ギャップの橋渡しとなり得る可視化技術が本研究で主題とするコヒーレント X 線回折イメージング (coherent X-ray diffraction imaging: CXDI) である(図 1-2, 表 1-1(d))。X 線結晶構造解析では微小な散乱断面積を増大させるために試料の結晶化を行ったが、CXDI では、第三世代放射光施設や X 線自由電子レーザー施設で利用できる高強度かつ可干渉(コヒーレント)な X 線を光源とし、空間的に孤立した非結晶試料(単粒子試料)に入射することで、S/N 比の良い鮮明な干渉縞を有する回折パターンを得る。さらに、試料に施す処理はそのまま、あるいは低温凍結するだけであり、細胞の機能構造を維持することができる。以上のような理由から、CXDI では、マイクロメートルサ

サイズの厚みの大きい細胞試料を数十 nm の高分解能で解析することが可能になると期待されている。

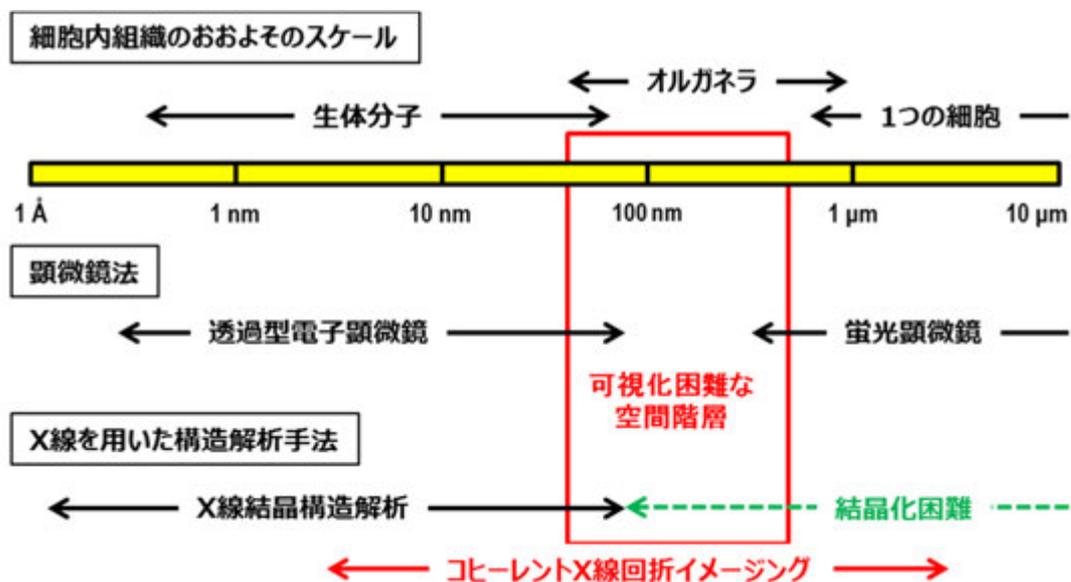


図 1-1 表 1-1 に示す可視化技術によってとらえることができる空間階層スケール。上段に細胞内組織のおおよそのスケール、中段に顕微鏡法の解析対象階層領域、下段に X 線を用いた構造解析手法の解析対象階層領域を示す。光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、X 線結晶構造解析で可視化が困難な空間階層領域を赤色枠で示した。

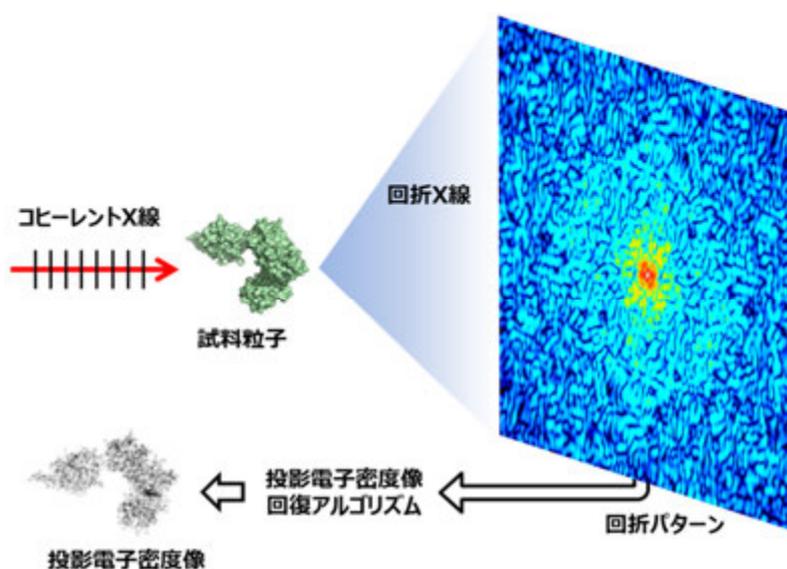
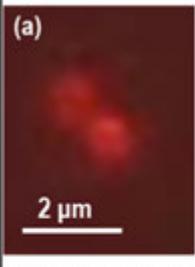
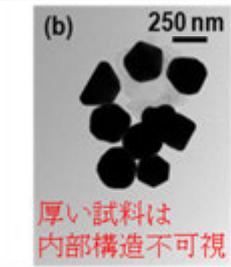
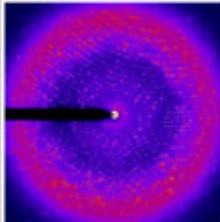
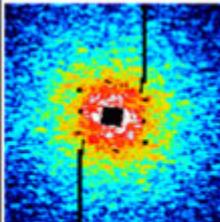


図 1-2 コヒーレント X 線回折イメージングの概要

表 1-1 代表的な微細構造可視化技術

可視化技術	顕微鏡法		X線回折イメージング	
	蛍光顕微鏡	透過型電子顕微鏡	X線結晶構造解析	コヒーレントX線回折イメージング
プローブ	可視光	電子線	X線	コヒーレントX線
透過力	強い	弱い	強い	強い
試料の形態	非結晶	非結晶	結晶	非結晶
見えるもの	蛍光発光点	静電ポテンシャル	電子密度分布	電子密度分布
試料処理	蛍光ラベル(固定)	固定・重金属ラベル、薄片化	そのまま/低温凍結	そのまま/低温凍結
放射線損傷	強い	強い	低温下で低減可能	XFELを利用すれば“無”
レンズ収差	有	有	無	無
達成可能分解能	面内:200 nm 深さ:500 nm	数 Å	約1 Å	全方位: 数十 nm
観測データ				
	実空間試料像	実空間試料像	逆空間回折パターン	逆空間回折パターン

観測対象の試料は、シアノバクテリア *Synechococcus* strain NIES-971(a),
(d)、金コロイド粒子(b)、グルタミン酸脱水素酵素(c)である。

1.2 コヒーレント X 線回折イメージング

図 1-2 にて、CXDI 実験の概要を説明する。孤立したマイクロメートルサイズの非結晶試料粒子に空間コヒーレンスの高い X 線を入射し、その回折 X 線の強度を十分遠方に配置した検出器によって Fraunhofer 回折パターンを観測する(Far-field 近似)。回折強度はエネルギーの“大きさ“であるため、回折パターンからは、物質の構造情報を反映する回折 X 線の位相が消失している。そこで、回折パターンを空間的に十分に細かくサンプリングし、位相回復アルゴリズムを適用することによって、X 線入射方向に投影した電子密度像を得る。位相回復の可能性は、古くより示唆されており [Sayre, 1952]、1980 年前後に反復計算によって位相回復を行う有効なアルゴリズムが開発された [Fienup, 1978; Fienup, 1982]。これを端緒に、今日では、実験データからの位相回復がより容易になるよう工夫された高度なアルゴリズムが提案されている [Shapiro *et al.*, 2005; Luke, 2005; Miao *et al.*, 2006; Nishino *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2012a; Rodriguez *et al.*, 2013]。

1.1 節で述べたように CXDI 実験で強度の高い回折 X 線を得るには、十分に高強度の X 線光源が必要となるが、これは第三代放射光施設の登場によって可能となった。最初に単粒子試料からの回折パターンが測定されたのは、1999 年のことであり、金ナノドット文字列の回折パターンのみから、反復的位相回復アルゴリズムによって投影電子密度像が再構成できることが実証された [Miao *et al.*, 1999]。その後も金属・生物試料について多くの回折パターンが計測・解析されてきた。例えば、比較的散乱断面積の大きい金粒子 [Robinson *et al.*, 2001; Chapman *et al.*, 2006a; Nakasako *et al.*, 2013] やニッケル製のテストパターン [Miao *et al.*, 2002]、タングステン製のテストパターン [Lima *et al.*, 2009] は、主に計測・解析手法の妥当性を確かめるために用いられている。生体粒子に関しては、大腸菌 [Miao *et al.*, 2003a]、ヘルペスウイルス [Song *et al.*, 2008]、放射線耐性細菌 [Lima *et al.*, 2009]、ネズミの細胞核 [Song *et al.*, 2014]、ヒト染色体 [Nishino *et al.*, 2009]、分裂酵母 [Jiang *et al.*, 2010]、ホウレンソウ葉緑体 [Takayama & Nakasako., 2012; Nakasako *et al.*, 2013]、出芽酵母 [Nam *et al.*, 2013]、シアノバクテリア [Nam *et al.*, 2013]、磁性細菌 [Fan *et al.*, 2015]、トキソプラズマ [Rodriguez *et al.*, 2015] から、それぞれ 20~60 nm の空間分解能情報を有する回折パターンを記録して、投影電子密度の再構成に成功している。これらの中には、真空中室温下で試料を回転させて複数の配向情報を取得し、三次元構造を回復するトモグラフィー実験を行っている

研究もあるが[Miao *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2014; Nishino *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010]、一つの試料に対して数万秒単位の X 線露光時間を必要とするため、X 線吸収による放射線損傷[Marchesini *et al.*, 2003a; Shen *et al.*, 2004; Howells *et al.*, 2009]を無視できない。

近年、X 線自由電子レーザー(X-ray free electron laser: XFEL)施設の供用開始により第三世代放射光の 10 億倍という超高輝度 X 線を利用できるようになった。XFEL は、数十フェムト秒の極超短パルス中に 10^{10-11} photons もの X 線光子を供給できるため、パルス 1 ショットで S/N 比良く回折パターンが計測できる。そのため、第三世代放射光施設で問題となっている長時間露光による放射線損傷を無視して試料構造を解析することが可能であることがシミュレーション[Neutze *et al.*, 2000]及び XFEL を用いたタンパク質の X 線結晶構造解析[Hirata *et al.*, 2014; Suga *et al.*, 2015]から示唆されている。現在、稼働している XFEL 施設は米国の Linac Coherent Light Source[Emma *et al.*, 2010]と日本の SACLA(SPring-8 Angstrom Compact electron LAsEr)[Ishikawa *et al.*, 2012]で、両施設では、CXDI による 1 ショット回折パターンの計測・解析が盛んに行われている。例えば、短時間に大量の回折パターンが得られることを利用して、金属粒子の動径分布解析に適用されたり [Takahashi *et al.*, 2013; Sekiguchi *et al.*, 2014a]、アミロイド線維の形態的特徴を統計的に評価されている[Kameda *et al.*, 2016]。生体粒子については、ミミウイルス[Seibert *et al.*, 2011]、原始紅藻類の葉緑体[Takayama *et al.*, 2015; Nakasako *et al.*, 2013]、磁性細菌[Oroguchi *et al.*, 2015]、出芽酵母の細胞核[Oroguchi *et al.*, 2015]、シアノバクテリア[Oroguchi *et al.*, 2015; van der Schot *et al.*, 2015]、*Microbacterium lacticum* という耐熱菌[Kimura *et al.*, 2014]の 1 ショット回折パターンから有効分解能が数十 nm の投影電子密度像が得られている。いずれも 1 μm 程度の大きさの細胞または細胞内小器官で、これまでの構造解析手法では得られなかった構造的特徴が観察されるようになった。

1.3 X 線自由電子レーザーを用いたコヒーレント X 線回折イメージングの計測・解析手法の現状

本節では、XFEL を用いた CXDI(XFEL-CXDI)実験及び解析の現状について述べ、本研究の意義を考える。

1.3.1 1 ショット回折パターンの計測技術

前節で述べたように XFEL は、その超高輝度特性のため、パルス 1 ショットで回折パターンを取得することができる。しかし、超強力光子場によって、試料を構成する原子は回折波を生じてすぐに、電子が剥ぎ取られ、その結果残された正の電荷間のクーロン反発により破壊される(クーロン爆発)[Neutze *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2006b]。そのため、X 線照射野に連続して新しい試料を供給する回折パターン計測技術が必要となる。

照射野に常に新鮮な試料粒子を供給する技術は、大きく分けて試料飛翔法と試料固定走査法の二つが提案されてきた。飛翔法は、試料粒子を XFEL パルス照射野に噴射する方式であり(図 1-3(a), (b))、固定走査法は、試料粒子を X 線回折能の低い薄膜などに吸着させ、XFEL パルスに対して試料を走査するものである(図 1-3(c), (d))。飛翔法では試料を含む液を用意すれば、回折実験前の試料調整の手間は少ない。しかし、試料粒子サイズと大差ないビームサイズの XFEL を試料粒子に照射させることが非常に難しく、その確率は 0.1%程度であるという報告がある[Yoon *et al.*, 2011]。固定走査法では、窒化シリコン薄膜のような支持媒体に無数に試料粒子を固定させてあるため、XFEL が試料に当たる確率が高く 30%以上の照射率が達成されている[Nakasako *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2016a]。

前述したように CXDI の大きな測定対象として生物細胞があるが、細胞試料の CXDI 実験を行うためには、回折実験中においても生理条件下での構造を維持させる必要がある。CXDI 実験は、小さな散乱断面積しか有しない試料からの回折 X 線が空気による X 線吸収・散乱に埋もれないように真空中で行われる。飛翔法では、懸濁液で試料粒子を包埋したものを飛翔させる液体ジェット法があるが(図 1-3(a))、以下のような問題が指摘されている。例えば、入射 X 線が水球あるいは水柱面に mrad オーダーの入射角でかすめる場合、水の表面での全反射が生じ、検出器に大きな損傷を与える可能性がある。また、この反射強度が粒子からの回折パターンに重畳されて解析が不可能となる。これを克服するために加圧したガスで液を絞りながらエアロゾル化し、懸濁液がほぼ完全に蒸発した瞬間に XFEL パルスを照射するエアロゾル法が提案・実用化されている(図 1-3(b)) [Seibert *et al.*, 2011; Loh *et al.*, 2012; Hantke *et al.*, 2014; van der Schot *et al.*, 2015]。しかしながら、真空中では、試料の断熱膨張や脱水などが生じていることが予想される[Nam *et al.*, 2016]。固定走査法では、細胞を含んだ懸濁液を封入したセルに XFEL パルスを照射するマイクロ液体封入アレイ法(図 1-3(c))[Kimura *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2015]と凍結水和試料固定照射法(図 1-3(d)) [Nakasako *et al.*, 2013; 中

迫ら, 2014; Kobayashi *et al.*, 2016a]がある。マイクロ液体封入アレイ法では、1ショットの照射でセルに穴が空き、懸濁液を留めておくことができなくなってしまうため、微小なセルを大量に並べた支持媒体を用意する必要があり、非常に高度な微細加工技術が要求される。そのため、一般的なユーザー利用には適さない。本研究で技術開発を行った凍結水和試料固定照射法では、世界的に広く利用されているクライオ電子顕微鏡での試料作製方法を踏襲し、ほとんど X 線散乱を起こさない薄膜上に細胞を吸着・散布し、薄膜ごと急速凍結することによって凍結水和状態にした試料を作製し[Dubochet *et al.*, 1988; 臼倉, 2008]、そこに XFEL パルスを照射する。タンパク質や菌体は低温凍結して保存することが多く、融解しても酵素反応や増殖活動を示すため、氷中でも液中と同じ機能構造を保っているといえる[Gibson & Khoury, 1986]。また、細胞に大量に含まれる水は氷であれば真空中での昇華が非常に遅いことが示唆されている[Dubochet *et al.*, 1988]。このように凍結水和試料固定照射法は生体試料の機能構造の維持が保証された手法である。

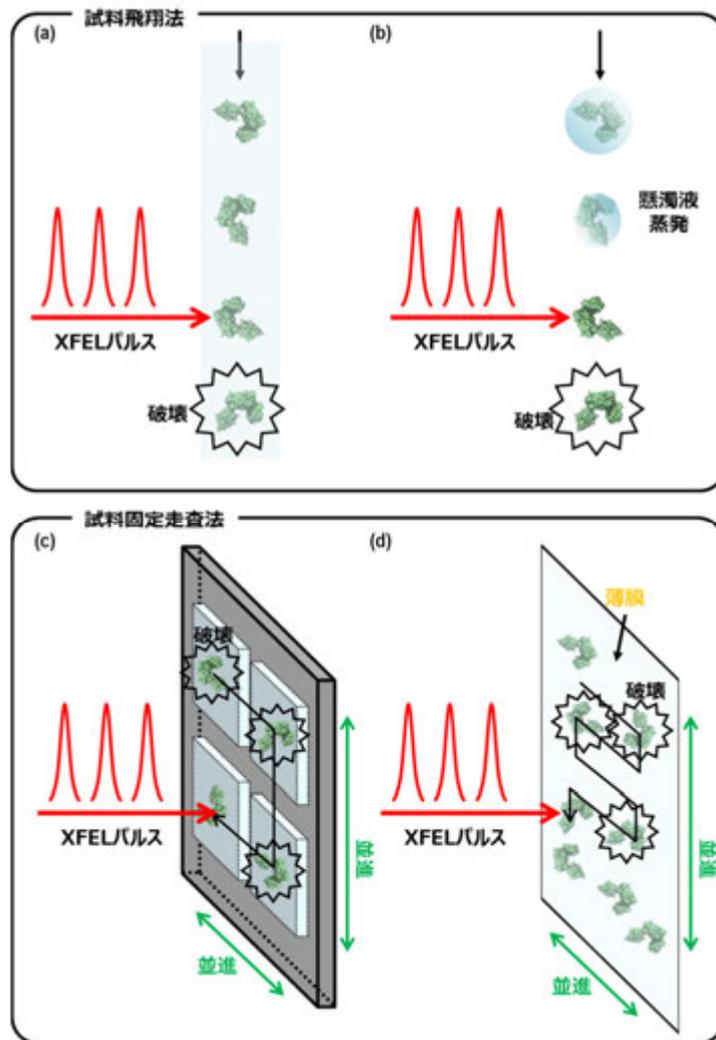


図 1-3 1 ショット回折パターン計測技術。(a)液体ジェット法 (b)エアロゾル法 (c)マイクロ液体封入アレイ法 (d)凍結試料固定照射法

1.3.2 三次元電子密度分布の可視化

前節で述べたように、試料は XFEL パルス 1 ショットで破壊されてしまう。そのため、一つの個体の試料から一枚の投影電子密度しか得られず、トモグラフィーによって三次元構造を可視化することはできない。しかし、異なる個体間で共通構造を有していれば、多数の個体の試料粒子に対して様々な X 線入射方向からの回折パターンを取得し、それぞれの相対的配向を決定することで三次元構造を復元することが可能である。回折パターンの相対的配向を決定する方法としては、Expansion Maximization Compression アルゴリズムがある [Loh & Elser, 2009; Loh *et al.*, 2010]。この手法を用いて、198 枚のミミウイルスからの二次元回折パターンから三次元回折パターンが構成

され、三次元位相回復によって 125 nm 分解能の三次元電子密度分布が得られている [Ekeberg *et al.*, 2015]。三次元電子密度分布を得るもう一つの方法としては、二次元回折パターンから投影電子密度像を回復した上で生体超分子複合体などの電子顕微鏡像の解析を行う際に広く用いられている単粒子解析法を導入することである(図 1-4)。単粒子解析法では、各粒子の投影電子密度像から逆投影を行い、三次元構造を回復することができる。逆投影の方向は投影定理に依拠して決定される [Crowther *et al.*, 1970]。XFEL を用いたタンパク質の CXDI 実験を想定した計算機実験では、単粒子解析法によって三次元電子密度分布を回復できることが示唆された [Kodama & Nakasako., 2011, Oroguchi & Nakasako., 2013]。本研究では、単粒子解析法を導入した三次元電子密度分布回復を目指す、この手法を XFEL-CXDI 実験において実行するためには、大量の回折パターンを収集し、さらに位相回復を介して大量の投影電子密度像を用意しなければならない。例えば、1 μm の球体の構造を 20 nm 分解能で三次元再構成を行うためには、配向に重複のない約 4000 枚もの投影電子密度像が必要となる。

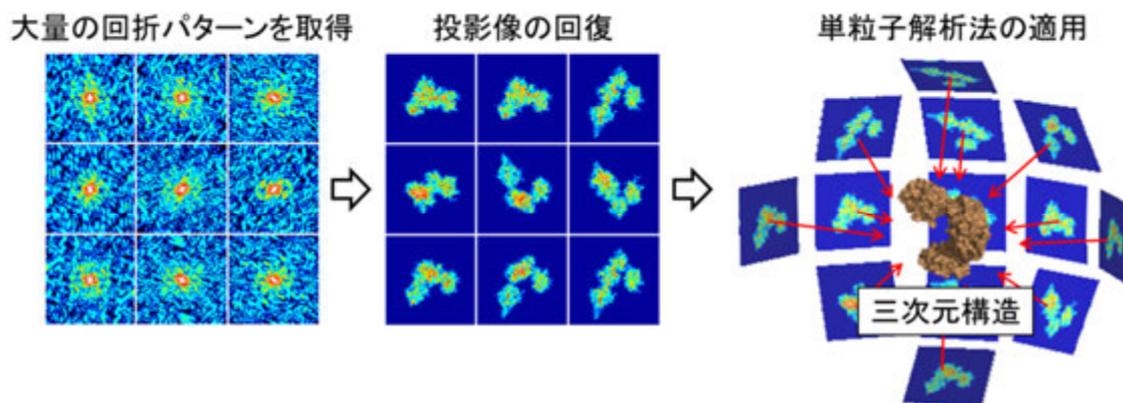


図 1-4 単粒子解析を導入した三次元電子密度分布回復法の概念図。

1.4 X 線自由電子レーザーを用いたコヒーレント X 線回折イメージングにおける課題

1.3.2 節では、大量の回折パターンを取得して投影電子密度像を回復することで生体粒子の投影構造だけでなく三次元構造を再構成できる可能性について述べた。本節では、これらを実現するために解決すべき課題について述べる。

1.4.1 回折パターン計測技術における課題

凍結水和試料固定法において、回折パターンの測定効率を左右するのは X 線パルス列に対する試料固定薄膜のスキャン速度と薄膜の交換回数及び所要時間である。従って、高い並進速度を維持するための回折装置及びこれを高効率で運用するための制御ソフトウェアが必須となる(図 1-5(a))。また、生体試料の機能構造を保持するためには、回折パターン測定時に試料の温度を極低温に保っていなければならない。さらに、試料の XFEL パルス照射位置(真空環境)への搬送を短時間に行えなければ、いくら試料への照射率が高くても、限られたビームタイムの中で、照射に充てる時間が減少し、回折パターンの取得効率は低下する。従って、XFEL パルス照射以外の操作を、簡便かつ効率的に行うシステムを整備する必要がある。

XFEL パルスの照射効率が向上すれば、回折実験前に大量の凍結水和試料を準備しなければならないため、系統的な試料調整プロトコルが必要である(図 1-5(a))。また、試料粒子への XFEL 照射率は、薄膜への粒子散布方法に依存する。どのような散布方法が最も効率よく質の良い回折パターンを取得することができるのか検討しなければならない。

1.4.2 位相回復における課題

大量の投影電子密度を用意するためには、回折パターンから効率的に位相回復を行う必要がある。これまでに、既存の位相回復アルゴリズムを利用して大量に位相回復を実行する自動データ処理スキームが構築されているが [Sekiguchi *et al.*, 2014a; Sekiguchi *et al.*, 2014b; 2016; 2017]、位相回復には致命的な問題がいくつか残っている。その一つが極小角領域における回折データの欠損である。

XFEL-CXDI 実験では、回折パターンを余すことなく計測できるわけではなく、実際には、検出器の破壊防止のため、試料を透過してそのまま直進する高強度な X 線(ダイレクトビーム)が入射される領域に、ビームストッパーを配置する(図 1-5 (b))。さらに、回折角が極めて小さい領域(極小角領域)では、回折 X 線の強度が大きく、検出器の検出光子数限界を超えて飽和し、正確な回折データが得られないことがある。XFEL パルスが 1 ショットでも照射されると試料は破壊されるため、回折パターンは一回しか計測することができず、極小角領域に欠損が生じた回折データに対して位相回復を行わざるを得ない(図 1-5 (b))。しかし、極小角領域の回折データには、試料の概形に関する情報が

含まれているため、通常の位相回復アルゴリズムでは回復成功率が極端に低下する。試料の散布密度にも依るが、取得した回折パターンのうち 10%~20%もの回折パターンが検出器の飽和によってデータ欠損を起こすことがあり [Sekiguchi *et al.*, 2014a; Kobayashi *et al.*, 2016a]、極小角領域のデータ欠損に対して耐性の高い位相回復法の開発が必要不可欠となる。

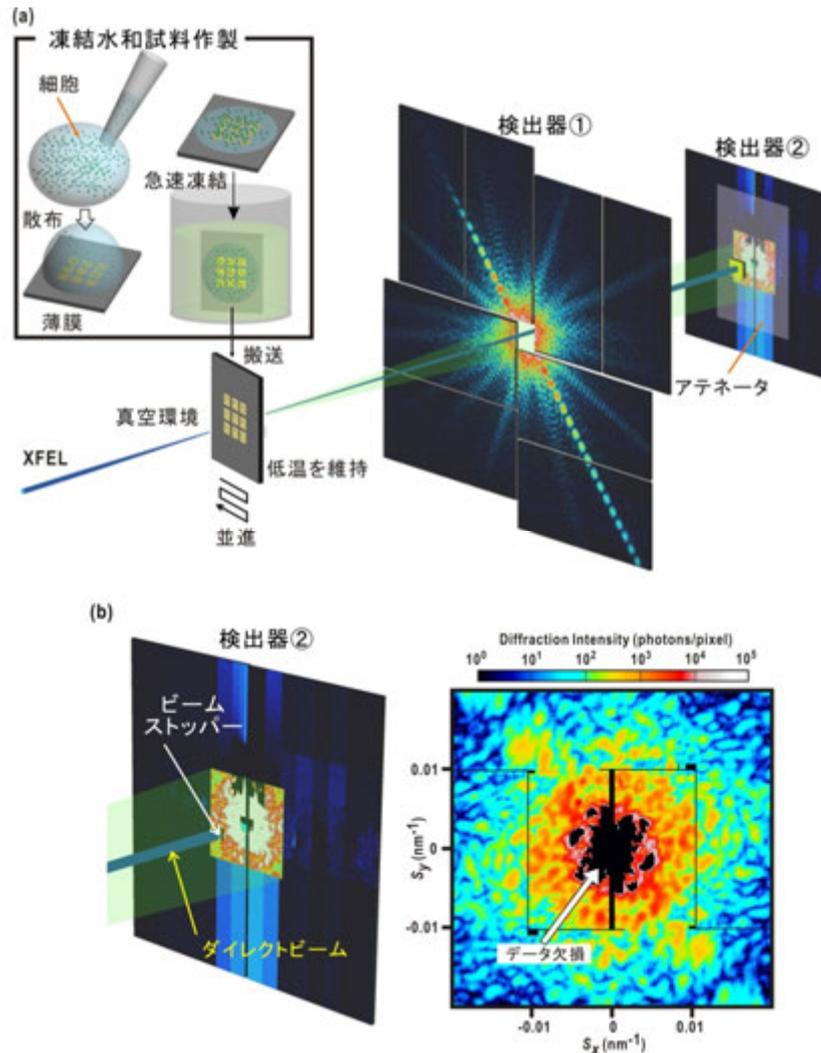


図 1-5 (a) SACLA における XFEL-CXDI 実験の概念図。まず、凍結水和試料を回折実験前に大量に準備する。回折実験は真空環境で行う。回折パターンはタンデムに配置された 2 台の検出器によって観測される。XFEL 入射方向に対して最下流にある検出器の前にアテネータを配置することでダイナミックレンジを広くとる工夫が施されている。(b) 最下流の検出器の拡大図(左)と XFEL-CXDI 実験で観測された回折パターンの極小角領域(右)。黒色で塗りつぶされた領域がビームストッパー及び検出器の飽和によってデータ欠損が生じた領域である。

1.5 本研究の概要と章立て

本研究では、XFEL-CXDI 実験を用いた物質の三次元電子密度可視化技術の確立に向けて、1.4 節で取り上げた課題の解決に取り組んだ。1.4.1 節で述べた課題に対しては、試料固定法による回折パターン計測の基盤となる装置「クライオ試料固定照射装置」の調整及び制御ソフトウェアの開発を行った[Kobayashi *et al.*, 2016a]。さらに、細胞の凍結水和試料作製プロトコルを確立した[Kobayashi *et al.*, 2016b]。1.4.2 節で述べた課題に対しては、近年、Martin らによって提案された暗視野位相回復法[Martin *et al.*, 2012b]に対して、回折パターンの中心対称性(Friedel 対称性)を考慮した拘束条件を用いて、極小角領域データ欠損の大きい回折パターンの位相回復を可能とする新規暗視野位相回復法を考案・実用化した[Kobayashi *et al.*, 2014]。

本論文では、まず、位相回復アルゴリズムまで含めた CXDI の原理(第二章)と XFEL 施設 SACLA における XFEL パルスの性質を考慮した XFEL-CXDI 実験の手順(第三章)について記す。本論文の骨子となるクライオ試料固定照射装置の制御ソフトウェア開発、凍結水和試料作製法、Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復を、それぞれ、第四、第五、第六章にて記述する。第七章では、開発した計測・解析技術を用いたシアノバクテリア細胞の三次元構造解析に関する助走的研究について報告し、第八章において、研究を総括する。

第二章 コヒーレント X 線回折イメージングの原理

X 線を物質に入射すると、主に、物質中の電子が X 線を散乱する。物質中には多数の電子が含まれており、それぞれで散乱された X 線は足し合わされ、回折 X 線として伝播する。回折 X 線は、入射 X 線の性質と物質中の電子密度分布に大きく影響される。本章では、電子による X 線の散乱・干渉についてまとめ、回折パターンと物質中の電子密度分布との関係をまとめ[Attwood, 1999; Als-Nielsen & McMorrow, 2011]、回折データから電子密度分布を求める解析手法について説明する。

2.1 電子による X 線の散乱

電子は加速度運動をする際に電磁波を放射する。電子からの双極子放射によって生じる電場成分は、時刻 t に \vec{n} 方向に十分遠方の観測点 \vec{R} において、Maxwell 方程式から遅延ポテンシャルを用いて以下のように与えられる。

$$\vec{E}_s(\vec{R}, t) = \frac{e}{4\pi\epsilon_0 c^2} \cdot \frac{\vec{n} \times (\vec{n} \times \vec{a}(t - |\vec{R}|/c))}{|\vec{R}|} \quad (2.1)$$

ここで、 \vec{a} は電子の加速度、 e は電気素量、 ϵ_0 は真空の誘電率、 c は真空中の光速である。磁場成分の大きさは電場成分に比べて $1/c$ と小さいので無視する。上式では、X 線散乱は、入射 X 線の電場によって電子が加速度を受けて振動され、X 線を放射する現象であることを示している。また、電子の原子内での束縛エネルギーに比べて、入射 X 線のエネルギーが十分に大きい場合、原子内の電子は自由電子として取り扱うことができる。図 2-1 のように自由電子に対して X 線を入射する場合を考える。入射 X 線の電場を $\vec{E}_i(t)$ としたとき、質量 m_e の電子についての運動方程式は次式で表される。

$$\begin{aligned} m_e \vec{a}(t) &= -e \vec{E}_i(t) \\ \vec{E}_i(t) &= \vec{E}_0 \exp(i\omega t + \alpha) \end{aligned} \quad (2.2)$$

ここで、 \vec{E}_0 は振幅、 ω は角周波数、 α は初期位相である。加速度 \vec{a} について式(2.1)に代入すると、

$$\begin{aligned} \vec{E}_s(\vec{R}, t) &= -\vec{G} \exp\left(i\omega \left(t - \frac{|\vec{R}|}{c}\right) + \alpha\right), \\ \vec{G} &= r_e \frac{\vec{n} \times (\vec{n} \times \vec{E}_0)}{|\vec{R}|}, \\ r_e &= \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e c^2} = 2.82 \times 10^{-15} \text{ m} : \text{古典電子半径} \end{aligned} \quad (2.3)$$

となる。入射 X 線の電場と比べると光子エネルギー（波長）に変化はなく、弾性散乱である。また、正負が反転している。これは、 $(-1) = \exp(i\pi)$ からわかるように、散乱前後で位相が π ずれるということである。さらに、入射方向と観測方向 \vec{n} のなす角(散乱角)を 2θ とおくと、振幅 \vec{G} の大きさは、

$$|\vec{G}| = r_e \frac{|\vec{E}_0| \cos 2\theta}{|\vec{R}|} \quad (2.4)$$

となり、散乱角 2θ が大きいほど振幅は小さくなることがわかる。このような散乱過程を Thomson 散乱という。

X 線の振動数は 10^{18} Hz に達するため、散乱 X 線の電場の位相を直接検出することはできない。実験では、以下の散乱 X 線の強度 I_e を検出器 1 pixel 内で積分した値を測定する。

$$I_e = \frac{1}{2\mu_0 c} \langle \vec{E}_s(\vec{R}, t)^2 \rangle_t \quad (2.5)$$

ここで、 μ_0 は真空の透磁率であり、 $\langle \rangle_t$ は時間平均を示す。上式に式(2.3)を代入すると

$$I_e = I_0 r_e^2 \frac{\cos^2 2\theta}{|\vec{R}|^2}, \quad I_0 = \frac{1}{2\mu_0 c} |\vec{E}_0|^2 \quad (2.6)$$

となる。 I_0 は入射 X 線の強度である。Thomson 散乱によって単位時間内に全空間に放射されるエネルギー I_{tot} は、式(2.6)を立体角積分することで得られ、

$$I_{\text{tot}} = I_0 \frac{8\pi}{3} r_e^2 = I_0 \sigma_T, \quad (2.7)$$

$$\sigma_T = 6.7 \times 10^{-29} \text{ m}^2$$

となる。ここで、 σ_T は Thomson 散乱の全散乱断面積と呼ばれ、電子による X 線散乱能が微弱であることを示している。同時に CXDI 実験で、signal to noise ratio (S/N 比) の良い回折強度を得るためには、入射 X 線の強度 I_0 を大きくしなければならないことを示している。

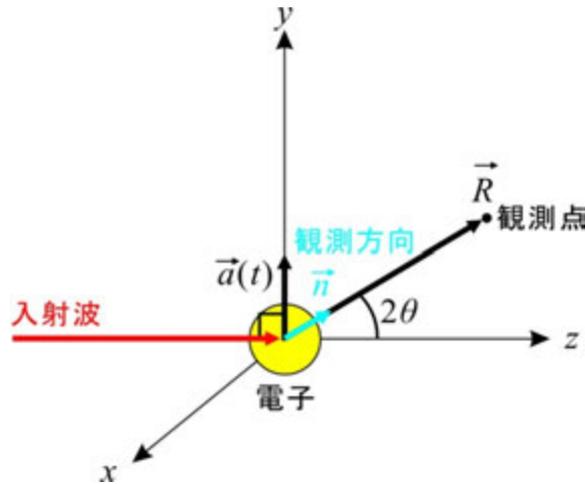


図 2-1 黄色球で示される電子に対して z 軸方向に X 線を入射する。散乱角 2θ は \vec{n} と入射方向 (z 軸) のなす角である。電子の加速度ベクトル $\vec{a}(t)$ は xy 平面上にある。

2.2 電子による散乱 X 線の干渉

入射 X 線が単色平面波であれば、複数の電子から生じる散乱 X 線は、Maxwell 方程式の線形性にしたがって干渉し合う。まず、簡単のため、図 2-2 のように相対位置 \vec{r} の 2 つの電子からの散乱 X 線の干渉を、十分遠方で観測することを考える (Fraunhofer 近似)。波長 λ の入射 X 線の波数ベクトル \vec{k}_0 、散乱角 2θ に関する散乱 X 線の波数ベクトルを \vec{k} とする。ここでは弾性散乱を仮定しているため、波数ベクトルの大きさは保存する。

$$|\vec{k}_0| = |\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.8)$$

図 2-2 の系では、散乱前後で光路差 $d = \vec{r} \cdot (\vec{k} - \vec{k}_0) / |\vec{k}_0|$ が生じるため、位相差 Δ が以下のように生じる。

$$\Delta = d \cdot |\vec{k}_0| = \vec{r} \cdot (\vec{k} - \vec{k}_0) = 2\pi \vec{r} \cdot \vec{S} \quad (2.9)$$

ここで、散乱ベクトル \vec{S} を以下のように定義した。

$$\vec{S} = \frac{\vec{k} - \vec{k}_0}{2\pi}, \quad |\vec{S}| = \frac{2\sin\theta}{\lambda} \quad (2.10)$$

先に進んでいる散乱 X 線の電場 $\vec{E}_s^{(1)}(\vec{R}, t)$ を式(2.3)であるとする、遅れている散乱 X 線の電場 $\vec{E}_s^{(2)}(\vec{R}, t)$ は、

$$\vec{E}_s^{(2)}(\vec{R}, t) = -\vec{G} \exp\left(i\omega\left(t - \frac{|\vec{R}|}{c}\right) + \alpha + 2\pi\vec{r} \cdot \vec{S}\right) \quad (2.11)$$

である。従って、十分遠方($|\vec{r}| \ll |\vec{R}|$)で観測する干渉 X 線の電場 $\vec{E}(\vec{R}, t)$ は、Fraunhofer 近似下で、

$$\begin{aligned} \vec{E}(\vec{R}, t) &= \vec{E}_s^{(1)}(\vec{R}, t) + \vec{E}_s^{(2)}(\vec{R}, t) \\ &= -\vec{G} \exp\left(i\omega\left(t - \frac{|\vec{R}|}{c}\right) + \alpha\right) \left[1 + \exp(2\pi\vec{r} \cdot \vec{S})\right] \end{aligned} \quad (2.12)$$

と書ける。

ここから多電子系に拡張するとことは容易で、

$$\vec{E}(\vec{R}, t) = -\vec{G} A(t) \sum_{j=0}^N \exp(2\pi\vec{r}_j \cdot \vec{S}), \quad A(t) = \exp\left(i\omega\left(t - \frac{|\vec{R}|}{c}\right) + \alpha\right) \quad (2.13)$$

となる。なお、 $j=0$ は自身に対する位置ベクトルである。

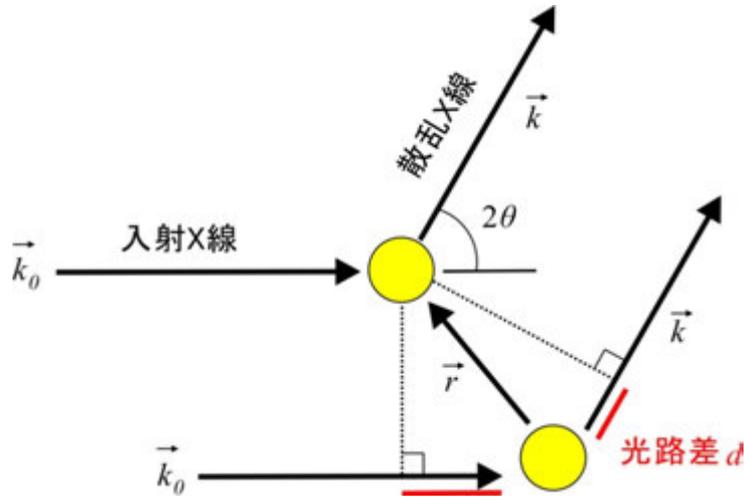


図 2-2 二つの電子からの散乱 X 線。赤線は光路差を示す。

2.3 物質による X 線の回折

2.3.1 電子密度分布と構造因子

電子密度分布を有する物質内の位置 \vec{r} の体積素片 dV から散乱される X 線を十分遠方で観測することを考える(Fraunhofer 近似)。観測される X 線の電場は、1 個の電子

の散乱 X 線の電場を $\vec{E}_s(\vec{R}, t)$ (式(2.3)) とすると $\vec{E}_s(\vec{R}, t) \rho_{\text{atom}}(\vec{r}) dV$ であり、これを物質全体について、重ね合わせればよいが、確率密度関数 $\rho_{\text{atom}}(\vec{r})$ は、連続関数であるので、原子からの X 線回折は、

$$\begin{aligned}\vec{E}(\vec{R}, t) &= \int \vec{E}_s(\vec{R}, t) \rho_{\text{atom}}(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}) dV \\ &= -\vec{G}A(t) f(\vec{S}), \\ f(\vec{S}) &= \int \rho_{\text{atom}}(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}) dV\end{aligned}\quad (2.14)$$

のように各電子からの散乱波の合成を積分で表すのが適当である。上式は、原子一個に入射する X 線によって、 \vec{S} 方向にどれだけの散乱波が生じるのかを示しており、 $f(\vec{S})$ は原子散乱因子と呼ばれる原子の電子密度分布で決定される量である。

さらに多原子で構成される分子や単粒子からの散乱についても同様の議論できる。多原子系全体の電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ を、原点から \vec{r}_j の位置にある j 番目の原子の電子密度分布 $\rho_{\text{atom},j}$ の重ね合わせとして以下のように表す。

$$\rho(\vec{r}) = \sum_j \rho_{\text{atom},j}(\vec{r} - \vec{r}_j) \quad (2.15)$$

式(2.14)において、 $\rho_{\text{atom}}(\vec{r})$ を $\rho(\vec{r})$ へと拡張すると、

$$\vec{E}(\vec{R}, t) = -\vec{G}A(t) F(\vec{S}), \quad F(\vec{S}) = \sum_j f_j(\vec{S}) \exp(2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}) \quad (2.16)$$

となる。 $F(\vec{S})$ は、構成される原子の原子散乱因子 $f(\vec{S})$ を全て足し合わせたもので構造因子と呼ぶ。数学的には、構造因子 $F(\vec{S})$ は物質の電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ の Fourier 変換となる。

$$F(\vec{S}) = \int \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}) d^3r \quad (2.17)$$

また、電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ は構造因子 $F(\vec{S})$ の逆 Fourier 変換として再現可能となる。

$$\rho(\vec{r}) = \int F(\vec{S}) \exp(-2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}) d^3S \quad (2.18)$$

電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ は \vec{r} を座標とした空間に分布するのに対して、構造因子 $F(\vec{S})$ は \vec{S} を座標とした空間に分布する。 \vec{S} の大きさ (式(2.10)) は散乱角に従って増大するため、 $|\vec{S}|$ の大きい領域を高角領域、小さい領域を低角または小角領域と呼ぶ。そして、 \vec{S} は、実空間距離 \vec{r} の逆数の次元をもち、高角領域は電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ の高分解能情報を、小角領域は低分解能情報を含む。電子密度が分布する領域を実空間と呼ぶのに対して、構造因子が分布する領域を逆空間と呼ぶ。

実験で観測できる単位時間あたりの回折 X 線の強度 $I(\vec{S})$ は、

$$I(\vec{S}) = \frac{1}{2\mu_0 c} \langle \vec{E}(\vec{R}, t)^2 \rangle_t = I_e |F(\vec{S})|^2,$$

$$I_e = I_0 r_e^2 \frac{\cos^2 2\theta}{|\vec{R}|^2} : \text{電子1つからの散乱X線の強度(式(2.6)),} \quad (2.19)$$

$$I_0 = \frac{1}{2\mu_0 c} |\vec{E}_0|^2 : \text{入射強度}$$

である。

構造因子 $F(\vec{S})$ を位相 $\phi(\vec{S})$ と振幅 $|F(\vec{S})|$ の項に分けて表現すると、

$$F(\vec{S}) = |F(\vec{S})| \exp(i\phi(\vec{S})) \quad (2.20)$$

である。電子密度像は、 $F(\vec{S})$ を逆 Fourier 変換すると得られるが (式(2.18))、回折強度は、式(2.19)のように構造振幅の絶対値の二乗に比例するため、振幅の情報は得られても、位相の情報が欠落する。これを位相問題と呼ぶ。

2.3.2 Friedel 対称性

電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ が実数であれば ($\rho(\vec{r}) = \rho(\vec{r})^*$)、 $-\vec{S}$ における回折強度 $I(-\vec{S})$ は、

$$I(-\vec{S}) = I_e F(-\vec{S})^* \cdot F(-\vec{S}) = I_e F(\vec{S}) \cdot F(\vec{S})^* = I(\vec{S}) \quad (2.21)$$

であり、逆空間原点と対称な座標 \vec{S} での強度と同じ値になるため、後述、図 2-4(a)のように中心対称性を有する。この対称性を特に Friedel 対称性と呼ぶ。ただし、X線の光子エネルギーが試料に吸収される効果を考慮すると、構造因子に虚数項が含まれるため、厳密には Friedel 対称性は成立しない。

2.3.3 Ewald 球

電子密度分布は連続関数であるので、その Fourier 変換である構造因子も連続関数である。しかし、散乱過程が弾性散乱である限り、二次元検出器で回折強度分布を測定する際には、以下のような理由で、散乱ベクトル \vec{S} の取り得る範囲、即ち空間分解能が制限されることを考慮しなければならない。

式(2.10)より、 \vec{S} は図 2-3(a)のように半径 $1/\lambda$ の仮想球面上に分布していることがわかる。この球面は反射球または Ewald 球と呼ばれる。回折強度を測定する実験では、平面検出器を用いているが、 $|\vec{S}|$ が大きくなると Ewald 球と逆空間を通り入射 X 線に垂直な面との距離が大きくなるため、Ewald 球を平面と見なすことが困難になることに注意しなければならない。図 2-3(b)のように散乱ベクトル $\vec{S} = (s_x, s_y, s_z = 0)$ とすると、Ewald 球と平面の間の距離 s_{sep} は幾何学的に以下のように求めることができる。

$$S_{\text{sep}} = \frac{1}{\lambda} - \left(\frac{1}{\lambda^2} - |\vec{S}|^2 \right)^{1/2} \quad (2.22)$$

この距離 S_{sep} が S_z 方向のスペックル(2.3.4 節にて後述)の大きさ D_z を上回ると平面検出器での計測ができなくなる。スペックルサイズ D_z は、後述の式(2.26)で求めることができる。 $S_z = 0$ で接する平面のとの逆空間距離を $1/\lambda$ 、試料の X 線入射方向に対する大きさ(試料の厚さ)を d_z とし、

$$D_z = \frac{\lambda \cdot (1/\lambda)}{d_z} = \frac{1}{d_z} \quad (2.23)$$

で与えられる。従って、Ewald 球面上にスペックルが分布しなくなるのは、 $S_{\text{sep}} \geq 1/d_z$ のときである。これより、 S_x, S_y の取り得る最大値 S_{max} は、

$$\frac{1}{\lambda} - \left(\frac{1}{\lambda^2} - S_{\text{max}}^2 \right)^{1/2} < \frac{1}{d_z} \quad (2.24)$$

に制限される。試料の厚み d_z が小さく(スペックルサイズが大きい)、X 線の波長 λ が短ければ(Ewald 球の半径が大きい)、Ewald 球の球面を平面に近似できる領域が大きくなる。

平面 ($S_z = 0$) に近似できる範囲で二次元回折パターンが得られると、式(2.17)の構造因子は、

$$F(S_x, S_y, S_z = 0) = \iint \left[\int \rho(x, y, z) dz \right] \exp(-2\pi i(S_x x + S_y y)) dx dy \quad (2.25)$$

となる。従って、回折パターンからは X 線入射方向に対して投影した電子密度分布が回復されることになる。以降、二次元回折パターンから回復される電子密度分布のことを(投影)電子密度像と呼ぶ。

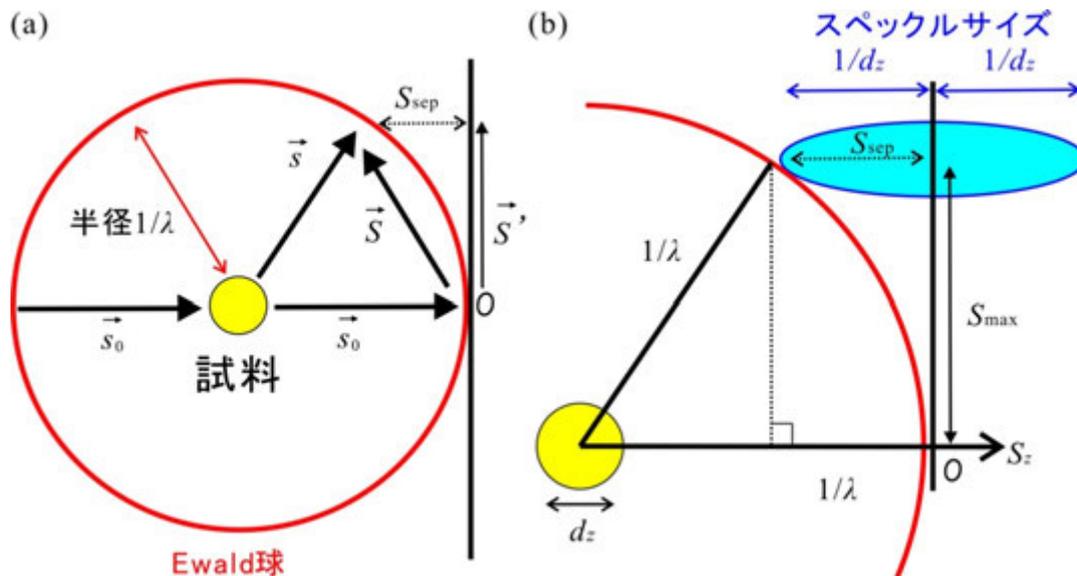


図 2-3 Ewald 球(赤球)は散乱体(黄球)を中心に半径 $1/\lambda$ である。(a) $|\vec{S}|$ が大きくなると点線部で示した Ewald 球と平面の距離 S_{sep} が大きく開くため、平面検出器上の \vec{S}' での回折強度の測定ができない。(b) Ewald 球の平面近似の限界。試料の厚みが d_z のとき、 $\vec{S} = (S_x, S_y, S_z = 0)$ で S_x, S_y の取り得る最大値 S_{max} は、 S_{sep} と S_z 方向のスペックルサイズ(青円) $2/d_z$ で与えられる。

2.3.4 非結晶試料からの回折強度

非結晶試料からの回折 X 線強度の \vec{S} に依存した分布(以降、回折パターンと呼ぶ)は、入射 X 線が単色平面波であれば、図 2-4(a)に示すような試料の電子密度分布を反映した鮮明な干渉縞となって現れる。干渉縞はブロードなピークを持った分布になっており、このピークは“シミ”のように見えるためスペックルと呼ばれる。スペックル一つは、干渉縞の谷から谷の二次元的な分布であり(図 2-4 (b)赤の点線部)、試料の大きさが反映される。また、その鮮明度 (visibility) は入射 X 線のコヒーレント度と密接な関係がある(後述、2.5 節)。

試料の大きさに依拠したスペックルの大きさを求めるために図 2-4(c)のような模式図を考える。入射方向に直交する方向の試料の大きさを d_x 、試料から検出平面までの距離を L とする。図 2-4(b)の赤点線部のように干渉縞が谷のとき、試料の端から生じる散乱波の干渉を考慮すれば、

$$\sin 2\theta = \frac{(n+1/2)\lambda}{d_x}, \quad n: \text{整数} \quad (2.26)$$

である。このとき原点 O からの距離は $l = L \tan 2\theta$ であり、 L が d_x に対して十分に大き

く、 2θ が小さい場合、 $\tan 2\theta \approx \sin 2\theta$ と近似できるため、 $l = L(n+1/2)\lambda/d_x$ となる。スペックルの大きさ D_x (以降、スペックルサイズ) は干渉縞の谷-谷間の距離なので、

$$D_x = \frac{\lambda L}{d_x} \quad (2.27)$$

と表される (図 2-4(c))。従って、スペックルサイズは、試料の大きさに反比例することがわかる。ただし、中心スペックルはこの 2 倍の $2D$ となる。なお、逆空間原点をピークとする中心スペックルより高角側へ第二スペックル、第三スペックル、第四スペックル... と表現する。

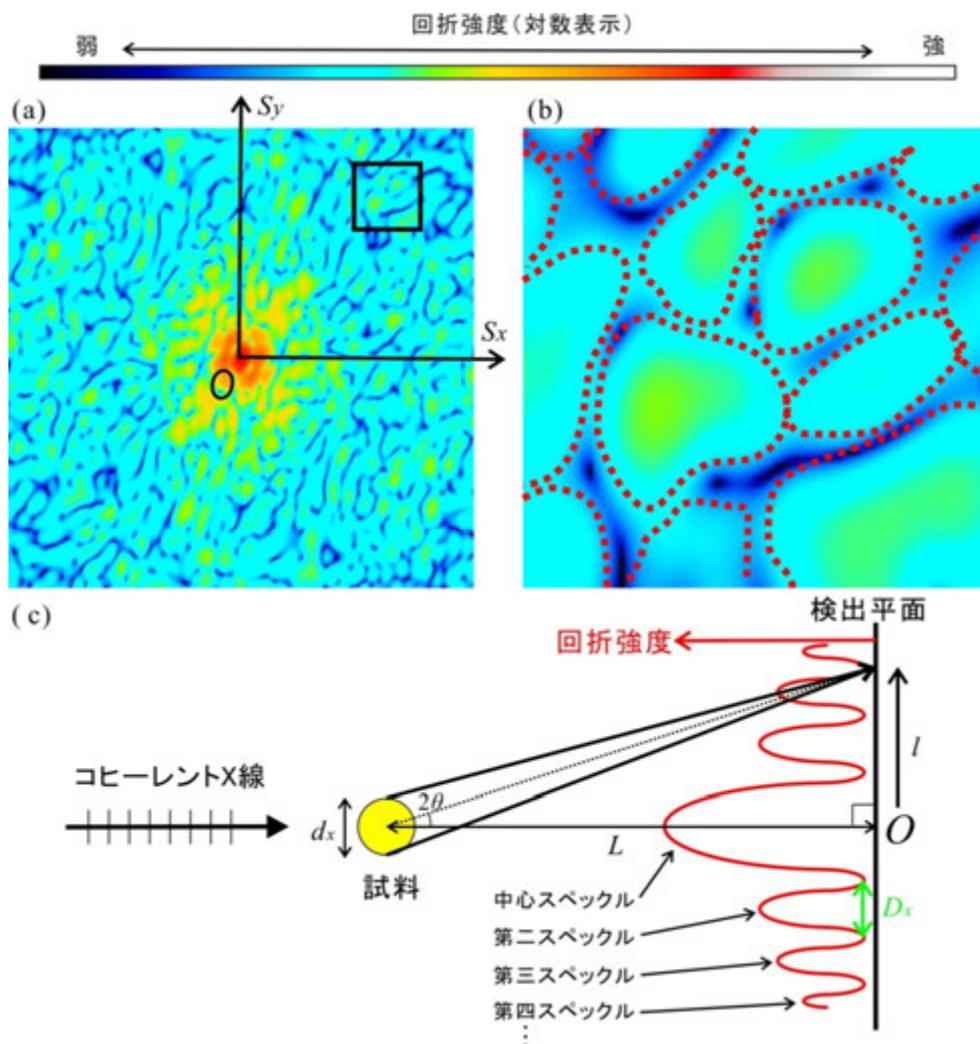


図 2-4 (a)スペックルパターンの例 (計算値)。パターンは原点 O を中心に点対称性を示す。(b) (a)の黒枠の領域の拡大図。スペックルを干渉縞の谷に沿うように赤の点線で囲った。(c)コヒーレント X 線を入射したときの試料の大きさとスペックルサイズの関係を示した模式図。

2.4 回折パターンからの電子密度像回復

位相情報は、電子密度像を復元する際に非常に重要な量であるため、位相回復が必要不可欠である。例えば、図 2-5 のような全く異なる 2 枚の画像を電子密度像とし、それらの Fourier 変換後に、位相と振幅を入れ替え、逆 Fourier 変換によって実空間に再構成すると、位相項が電子密度の再構成を支配していることが理解できる。

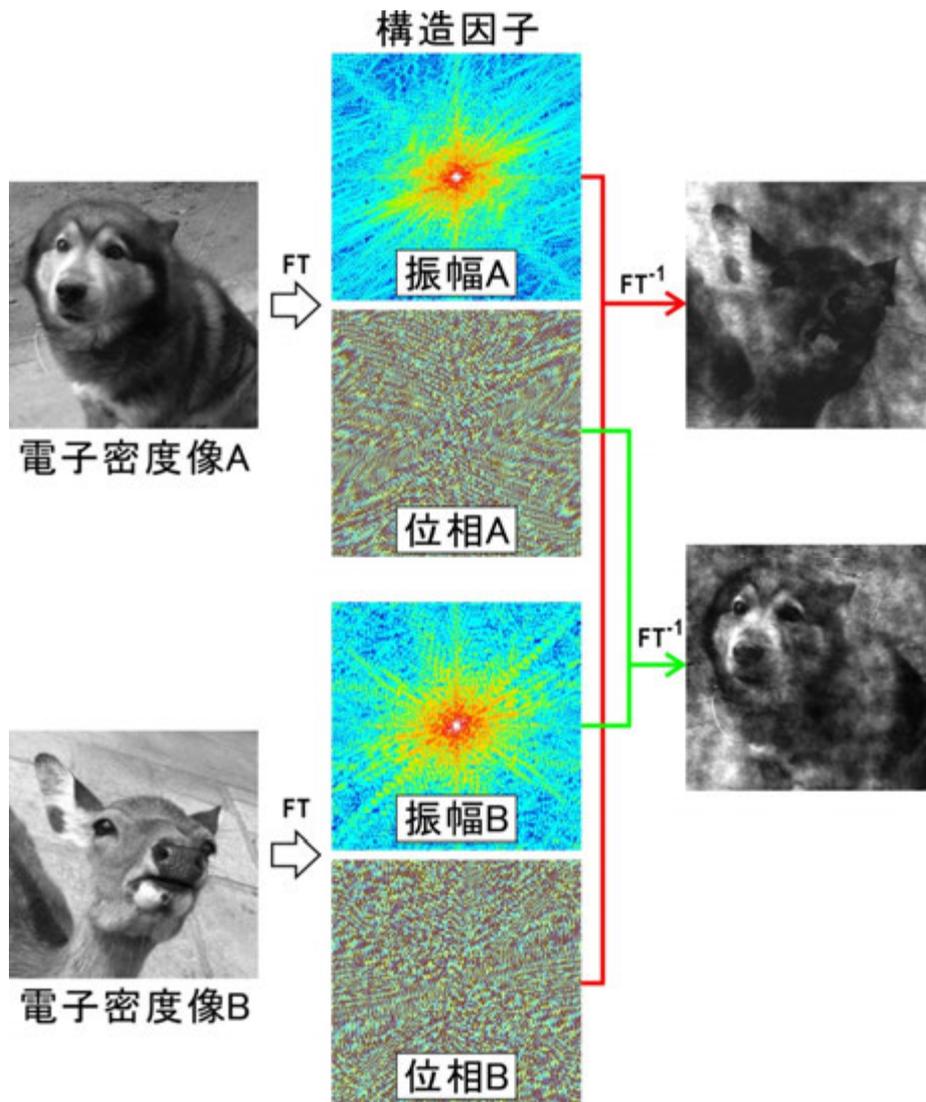


図 2-5 電子密度像 A と電子密度像 B から計算される構造因子を振幅と位相の情報を入れ換え、逆 Fourier 変換した。それぞれの画像は、位相を与えた画像の影響を強く受けている。FT は Fourier 変換、FT⁻¹ は逆 Fourier 変換を示す。電子密度像は、黒白表示で、黒であるほど電子密度が高い。

位相問題の解決に向けては、低分子結晶構造解析では直接法[Giacovazzo, 1998]が、また、蛋白質結晶構造解析では、重原子多重同型置換法[Crick & Magdoff, 1956; Blow and Crick, 1956]、多波長異常分散法[Phillips *et al.*, 1977; Hendrickson *et al.*, 1985]等が開発されてきた。前者では、原子分解能に至るデータを用いることに依拠して、統計的な考察によって位相決定を行う。後者では、重原子付加や異常散乱現象によって生じる回折強度の微小な変化から、実験的に位相を推定している。

これらとは異なり、CXDI では、高分解能データ収集や実験的な位相推定が不可能であるため、回折パターンから位相を回復することが、電子密度分布の投影像を得るための重要な課題となる。ここでは、CXDI で電子密度に再構成に用いられている反復的位相回復アルゴリズム[Gerchberg & Saxton, 1972; Fienup, 1982]の原理について述べる。

2.4.1 オーバーサンプリング

実験で観測できる構造振幅は、 $N_x \times N_y$ に離散化された試料の投影電子密度分布 $\rho(x, y)$ に対する離散的 Fourier 変換によって以下のように記述することができる。

$$|F(S_x, S_y)| = \left| \sum_{x=0}^{N_x-1} \sum_{y=0}^{N_y-1} \rho(x, y) \exp \left[2\pi i \left(S_x \frac{x}{N_x} + S_y \frac{y}{N_y} \right) \right] \right| \quad (2.28)$$

散乱ベクトル (S_x, S_y) は、検出器のピクセルを指定する。これは一組の連立方程式となるので、これを解くことで、原理的には、離散化された投影電子密度像を得ることができる。

図 2-6(a) に示すように、 $N_x \times N_y$ の情報量を持つ電子密度像 $\rho(x, y)$ からの回折パターンを $N_x \times N_y$ pixels の振幅 $|F(S_x, S_y)|$ として記録した場合、回折パターンには、Friedel 対称性(2.3.2 節)があるため、正味の情報量は、その半分の $(N_x \times N_y)/2$ となる(図 2-6(b))。この場合、式(2.28)の連立方程式の数が足りず、解を求めることが不可能である。方程式の数を増やすために、回折パターンを s_x 軸に沿って σ_x 倍、 s_y 軸に沿って σ_y 倍細かくサンプリングすると(図 2-6(c))、 $(\sigma_x N_x \times \sigma_y N_y)/2$ に増加するので(図 2-6(d))、この情報量が電子密度像の情報量より大きくなる、即ち、

$$\frac{\sigma_x N_x \times \sigma_y N_y}{2} \geq N_x \times N_y \quad (2.29)$$

$$\therefore \sigma_x \sigma_y \geq 2$$

という条件を満足すれば、式(2.27)を解くに足る方程式の数を満足する。このように情報量を補う操作をオーバーサンプリング(Oversampling: OS)と呼ぶ[Miao *et al.*, 2003b]。また、 $\sigma_x \sigma_y$ を OS 比、式(2.29)の条件を OS 条件と呼ぶ。概して、OS 比が高い方が電子密度回復の精度が向上すると言われている[Miao *et al.*, 2003b]。

次に実空間での OS の効果について述べる。散乱ベクトルの大きさが一定であれば、OS 比が高くても空間分解能は変わらず、電子密度像は $N_x \times N_y$ pixels のままである。しかし、実空間の見かけの情報量は $\sigma_x N_x \times \sigma_y N_y$ であるので、電子密度像の領域以外の領域に電子密度ゼロの領域が生じる(図 2-6(d))。従って OS 比は、電子密度像が存在する

領域の情報量と実空間領域全体の情報量の比になる。ここでは、特に電子密度像領域をサポート領域と呼ぶ。

オーバーサンプリングとは、回折パターンを細かくサンプリングすることであるが、さらに具体的には、スペckルを複数のピクセルで分割して記録することである[Miao *et al.*, 2008]。即ち、

$$\sigma_x = \frac{D_x}{\Delta} \quad (2.30)$$

のように OS 比は記述できる。ここで、 D_x はスペckルサイズ、 Δ はピクセルサイズである。式(2.30)にスペckルサイズを表す式(2.27)を代入すると、

$$\sigma_x = \frac{\lambda L}{d_x \Delta} \quad (2.31)$$

となる。 λ は波長、 L は試料から検出器までの距離(カメラ長)、 d_x は試料サイズである。従って、波長が長く、カメラ長が大きく、試料サイズが小さく、ピクセルサイズが小さい程、OS 比は大きくなる。実験で OS 条件を満足するためにはこれらの点に注意して光学系を設計しなければならない。

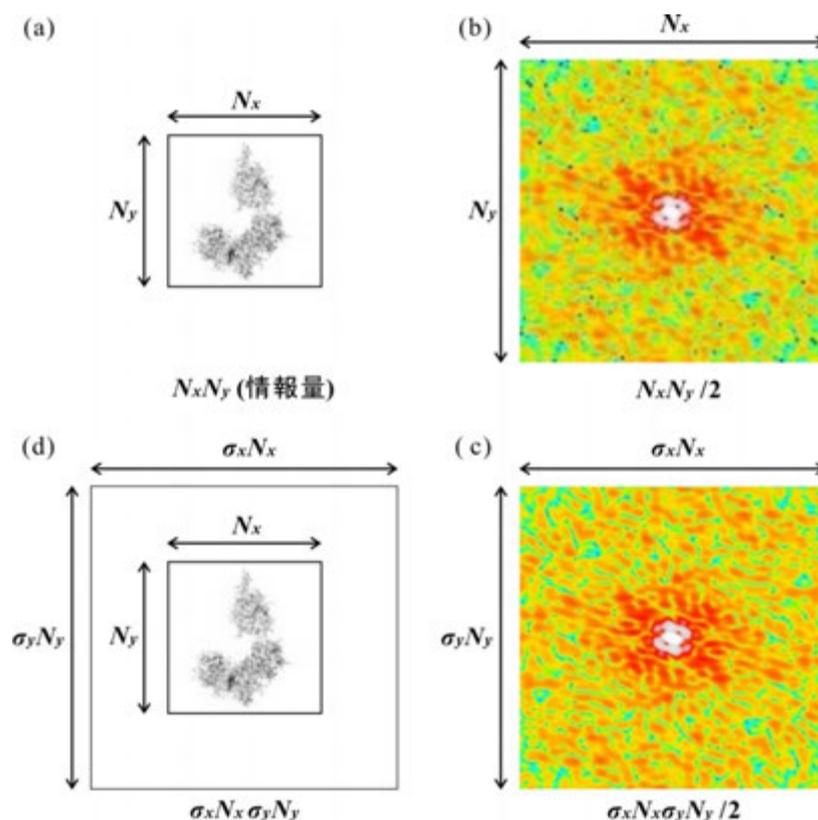


図 2-6 オーバーサンプリングの効果。(a) $N_x \times N_y$ の電子密度像。(b)(a)より計算された回折パターン。(c)オーバーサンプリングを適用した回折パターン。(b)よりピクセル分解能が高いパターンとなる。(d)オーバーサンプリングを経て得られる電子密度像。電子密度像及び回折パターン直下に正味の情報量を表示した。

2.4.2 反復的位相回復アルゴリズム

OS 条件を満足した回折パターンから連立方程式 (式(2.27)) を解き、電子密度像を回復するための反復的位相回復アルゴリズム (以下では、位相回復アルゴリズムと呼ぶ) について述べる。位相回復アルゴリズムの概念図を図 2-7 に示す。このアルゴリズムは、ランダムな電子密度像を初期モデルとして、実空間と逆空間を Fourier 変換・逆変換によって数千回程度往復し、失われた位相を徐々に回復する。実空間・逆空間ではそれぞれ拘束が課せられている。本研究で利用する Hybrid Input Output (HIO) アルゴリズム [Fienup, 1982] に則して具体的な操作を説明する。

HIO アルゴリズムは以下の手順 1-6 に従って実行される (図 2-7)。

1. ランダムな電子密度像を初期モデルとして、Fourier 変換し、構造因子 $G_n(\vec{S}) = |G_n(\vec{S})| \exp[i\alpha_n(\vec{S})]$ を得る。
2. **逆空間拘束** : $G_n(\vec{S})$ の振幅を実験で得られる既知の振幅 $|F(\vec{S})|$ に置換する。
3. 得られた構造因子 $G'_n(\vec{S}) = |F(\vec{S})| \exp[i\alpha_n(\vec{S})]$ を逆 Fourier 変換し、電子密度像 $\rho'_n(\vec{r})$ を得る。
4. **実空間拘束** : $\rho'_n(\vec{r})$ を以下のように演算し、電子密度像 $\rho_{n+1}(\vec{r})$ を得る。

$$\rho_{n+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho'_n(\vec{r}) & \in \text{support} \cap |\rho'_n(\vec{r})| \geq 0 \\ \rho_n(\vec{r}) - \beta \rho'_n(\vec{r}) & \text{otherwise} \end{cases} \quad (2.32)$$

ここで、 β は、1 に近い定数である。実空間拘束は、サポート領域以外の領域を 0 に漸近させる効果がある。

5. 手順 4 で得られた $\rho_{n+1}(\vec{r})$ を Fourier 変換し、構造因子 $G_{n+1}(\vec{S}) = |G_{n+1}(\vec{S})| \exp[i\alpha_{n+1}(\vec{S})]$ を得る。
6. 手順 2-5 を反復的に行う。

手順 1 及び手順 5 では、電子密度像 $\rho_n(\vec{r})$ を Fourier 変換して、

$$|G_n(S_x, S_y)| = \left| \sum_{x=0}^{\sigma_x N_x - 1} \sum_{y=0}^{\sigma_y N_y - 1} \rho_n(x, y) \exp \left[2\pi i \left(S_x \frac{x}{\sigma_x N_x} + S_y \frac{y}{\sigma_y N_y} \right) \right] \right| \quad (2.33)$$

を求め、手順 2 の逆空間拘束では、これを

$$\left| \sum_{x=0}^{\sigma_x N_x - 1} \sum_{y=0}^{\sigma_y N_y - 1} \rho_n(x, y) \exp \left[2\pi i \left(S_x \frac{x}{\sigma_x N_x} + S_y \frac{y}{\sigma_y N_y} \right) \right] \right| = |F(S_x, S_y)| \quad (2.34)$$

とした。従って、この操作は、それまでに求めた解 $\rho_n(\vec{r})$ を連立方程式 (式(2.28)) に代

入することに他ならない。反復的にこの操作が行われるため、その都度、解は逐次代入される。また、サポート領域以外の領域の電子密度は 0 であることが自明であるため (2.4.1 節)、手順 4 の実空間拘束は、サポート外の解を意図的に与える。実空間拘束及び逆空間拘束を付加することで、初めはランダムでも、ある一定の解に収束することが、Parseval の定理により保証されている [Fienup, 1982]。

サポート領域外の解が自明であるにもかかわらず、HIO では実空間拘束でのように完全に 0 とはしない (式(2.32)) が、間違っ了解 (局所的極小点) に停留することを防ぐ効果がある。反復的位相回復アルゴリズムは、HIO の他にも、実空間拘束を工夫したさまざまな手法が提案されている [Luke, 2005, Martin *et al.*, 2012a, Rodriguez *et al.*, 2013]。

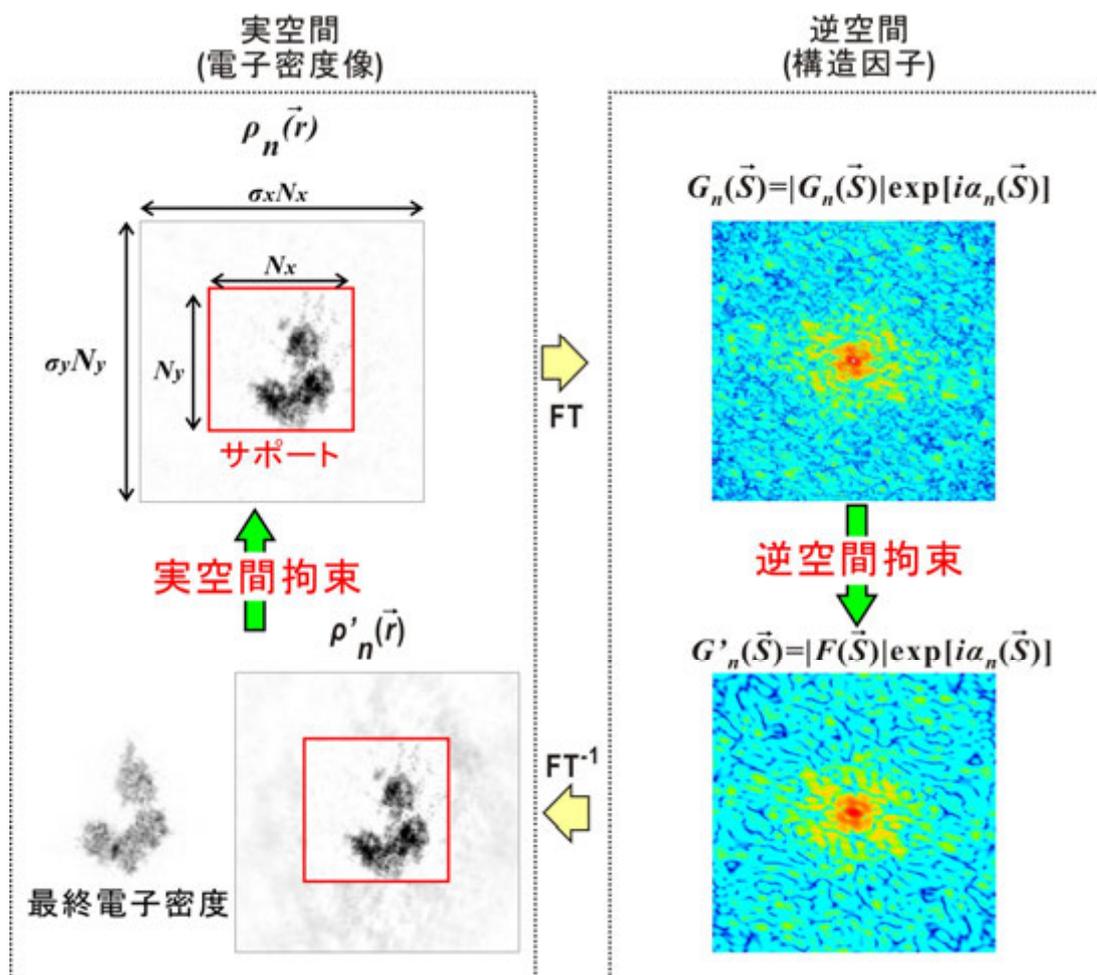


図 2-7 反復的位相回復法の模式図。 $\rho_n(\vec{r}), \rho'_n(\vec{r})$ は、電子密度、 $G_n(\vec{S}), G'_n(\vec{S})$ は構造因子、 $|F(\vec{S})|$ は実験で得られる振幅を示している。

2.4.3 Shrink Wrap (SW) アルゴリズム

サポート領域は、試料によっては、前出までの模式図(図 2-6、図 2-7)のように単なる四角形であるとは限らず、またその大きさも恣意的に決めるわけにはいかない場合がある。実空間拘束の効果を最大限活かすためには、試料の概形がサポート領域であることが望ましい。本研究では、サポート領域を決めるために HIO アルゴリズムに Shrink-Wrap(SW)アルゴリズム[Marchesini *et al.*, 2003b]を組み合わせた HIO+SW アルゴリズムを利用している。HIO+SW アルゴリズムは、以下の手順に従って実行される (図 2-8)。

1. 初期サポートは、以下のように回折強度 $I(\vec{S})$ を Fourier 変換して得られる自己相関関数より与えられる。

$$\int I(\vec{S}) \exp(2\pi i \vec{u} \cdot \vec{S}) d^2 S = \int \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r} + \vec{u}) d^2 r \quad (2.35)$$

自己相関関数より試料の最大長を見積もることができる (図 2-8(a))。

2. HIO による反復計算を一定回数実施した後、電子密度像に以下のガウス関数 $g(x,y)$ を畳み込んで、ローパスフィルターを施す (図 2-8(b))。

$$g(x,y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\varepsilon^2}} \exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{2\varepsilon^2}\right] \quad (2.36)$$

ガウス関数の標準偏差 ε が小さいほど、微細構造が平滑化される。

3. 手順 2 で得られた電子密度像で任意に与えた閾値以上の領域を新しいサポートとして採用する (図 2-8(b))。
4. 手順 2、3 を繰り返す(図 2-8(c))。手順 2 でローパスフィルターに用いるガウス関数の標準偏差 ε 、手順 3 で適用する閾値は、経験的に適当なものを与えている。

手順 3 のサポート領域の更新は、閾値を設けて電子密度の高い領域を切り出すことに相当する。しかし、位相回復の初段階で生じる、試料の存在すべきではない領域に分布する電子密度がしばしばサポート領域を乱す(図 2-8(b)右図①)。また、試料の電子密度が分布する領域でも電子密度が低いとサポート領域外として処理されてしまう(図 2-8(b)右図②)。手順 2 で施すローパスフィルター(式(2.36))は、電子密度像の輪郭を強調する効果があり、サポート領域の発散を緩和する。

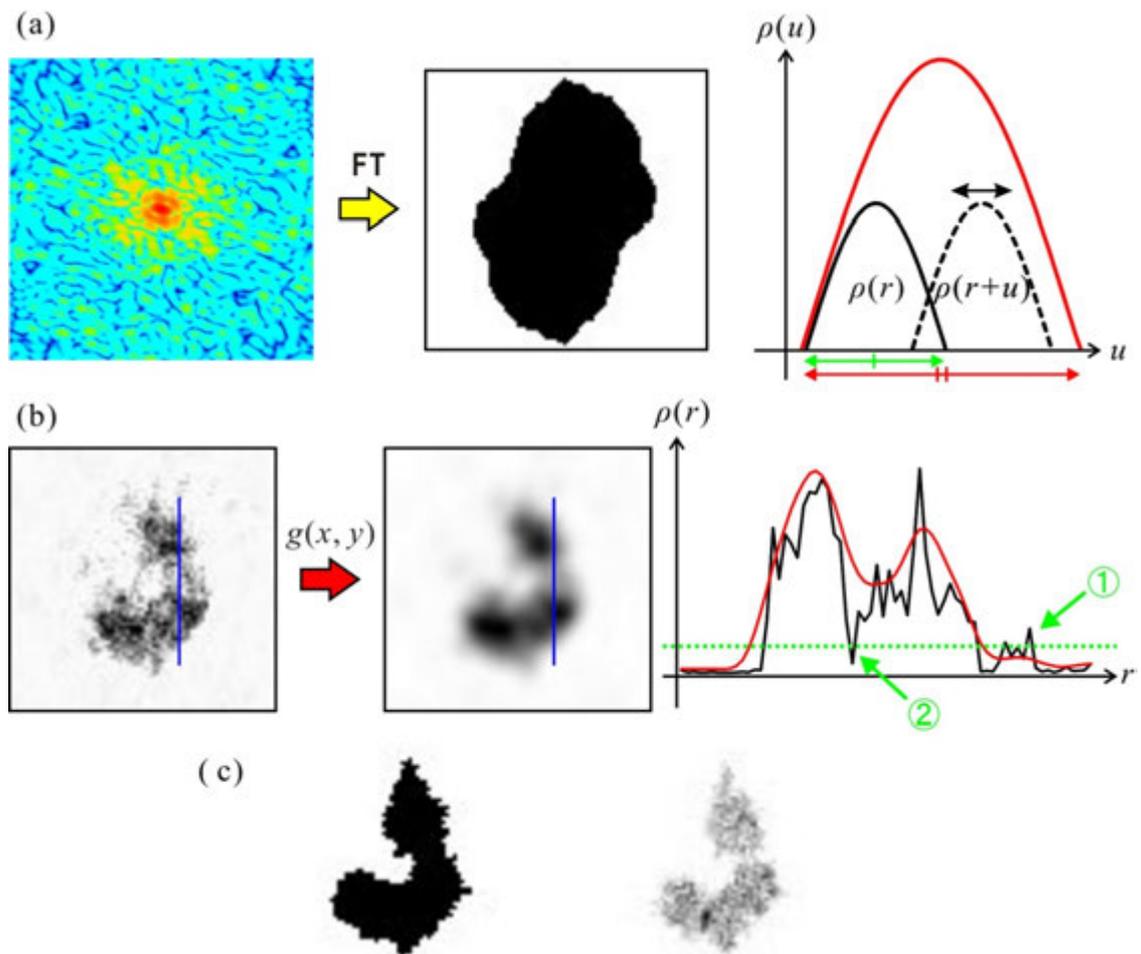


図 2-8 SW アルゴリズムの概要。(a)回折強度(左)を Fourier 変換(FT)して求めた自己相関関数より初期サポートを決定する(中央)。右は自己相関関数と試料長の関係を表した概念図である。自己相関関数は電子密度 $\rho(r)$ について自身を黒色実線矢印のように並進して足し込んだものである(赤色実線)。その大きさは、試料最大長(緑色実線矢印)の 2 倍になる(赤色実線矢印)。(b)回復中の電子密度像(左)にローパスフィルター $g(x,y)$ (式(2.4-8))を施した結果(中央)。右はローパスフィルター処理前(黒色実線)と処理後(赤色実線)の青線部のラインプロファイルである。 $g(x,y)$ によって、微細構造が平滑化されたことがわかる。これに緑色点線の閾値を任意に設けて、これ以上の値を持つ電子密度 $\rho(r)$ 領域を新しいサポートとして採用する。ローパスフィルターを施すことによって、本来の試料領域でない場所に存在する電子密度分布(①)の寄与を抑制し、試料領域内でも電子密度の低い領域(②)をサポート領域として採用することが可能である。(c) 1000 回の HIO 反復計算において、20 回毎にサポート領域を更新した結果得られたサポート(左)と電子密度(右)。サポートの形は SW によって、図 2-7 のような四角形の領域ではなく、試料概形となる。

2.4.4 Oversampling Smoothness(OSS) アルゴリズム

HIO+SW アルゴリズムで決定したサポートに対して実空間拘束を工夫した位相回復アルゴリズムを適用することによって、さらに微細構造まで回復することができる場合がある。その位相回復アルゴリズムの一つが **Oversampling smoothness (OSS)** [Rodriguez *et al.*, 2013]である。OSS では、実空間拘束条件として、

$$\rho''_{n+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho'_n(\vec{r}) & \in \text{support} \cap |\rho'_n(\vec{r})| \geq 0 \\ \rho_n(\vec{r}) - \beta \rho'_n(\vec{r}) & \notin \text{support} \cup |\rho'_n(\vec{r})| < 0 \end{cases} \quad (2.37)$$

と

$$\rho_{n+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho''_{n+1}(\vec{r}) & \in \text{support} \\ \rho''_{n+1}(\vec{r}) \otimes W(\vec{r}) & \notin \text{support} \end{cases} \quad (2.38)$$

の二つの式を用いる。なお、記号 \in は集合(ここではサポート)へ属する場合、 \notin は属していない場合を示す。記号 \cap は共通部分(かつ)を、 \cup は和集合(あるいは)を表す演算子である。また、 \otimes は畳み込みを示す。式(2.38)の $W(\vec{r})$ は、式(2.36)と同様のガウシアンローパスフィルターであり、以下のように与えられる。

$$W(\vec{r}) = \text{FT}^{-1} \left[\exp \left\{ -\frac{1}{2} \left(\frac{\vec{S}}{\eta} \right)^2 \right\} \right] \quad (2.39)$$

FT^{-1} は逆 Fourier 変換を示す。 η はローパスフィルターの強さを制御するパラメーターであり、位相回復計算が進むにつれ値を小さくし、低角領域の情報を強調して抽出する。サポート外にローパスフィルターを施すことによって、サポート外を0に近づけるというHIOの実空間拘束条件に加えて、サポート外は一定になるという拘束を課すことになる。そのため、一定の解への収束性が高く、微細な構造まで導くことが可能である[関口、2016]。しかしながら、HIO+SWより解の探索範囲が狭く、サポートに関する制約が厳しいため、SWアルゴリズムと併用してサポート領域を回復することには適していないとされている[関口、2016]。

2.4.5 位相回復の収束度評価

反復的位相回復アルゴリズムを用いれば、電子密度像は連立方程式(式(2.28))を満たす解に収束させることができる。ただし、確実に収束させるために必要な反復計算回数は、初期モデルなど様々なパラメーターに大きく依存する傾向にあり、これを理論的に導くことは難しい。そこで、収束したか否かを判断する指標が必要になる。ここ

では、どの程度、位相回復計算が収束したか評価するため、指標として結晶学的 R_F 因子 [Rodriguez *et al.*, 2013] とパラメーター γ [Miao *et al.*, 2003b] について説明する。ただし、 R_F 及び γ は収束性を評価するため、投影電子密度像が正しく回復されたことの必要条件であり、十分条件でないことに注意を払わねばならない。

R_F は、実験データより得られる振幅 $|F_{\text{obs}}(\vec{S})|$ と回復した電子密度像より計算して得られる振幅 $|F_{\text{cal}}(\vec{S})|$ を用いて、以下のように定義される。

$$R_F = \frac{\sum_{\vec{S}} \left| |F_{\text{obs}}(\vec{S})| - \kappa |F_{\text{cal}}(\vec{S})| \right|}{\sum_{\vec{S}} |F_{\text{obs}}(\vec{S})|}, \quad \kappa = \frac{\sum_{\vec{S}} |F_{\text{obs}}(\vec{S})| \cdot \sum_{\vec{S}} |F_{\text{cal}}(\vec{S})|}{\sum_{\vec{S}} |F_{\text{cal}}(\vec{S})|^2} \quad (2.40)$$

R_F は、 $|F_{\text{obs}}(\vec{S})|$ と $|F_{\text{cal}}(\vec{S})|$ の差を積算し、 $\sum_{\vec{S}} |F_{\text{obs}}(\vec{S})|$ で規格したものである。このとき κ は、 $|F_{\text{cal}}(\vec{S})|$ のスケールリングを行う。 $|F_{\text{cal}}(\vec{S})|$ が $|F_{\text{obs}}(\vec{S})|$ に近いとき、 R_F は小さな値となり、理想的には 0 になる。タンパク質の X 線結晶構造解析における構造精密化では R_F が 0.4 以下で、ペプチド鎖をトレース可能な電子密度図が得られる場合が多い。最終的な立体構造の精密化では、0.20 程度あるいはそれ以下になることが望ましい [Garib *et al.*, 2011]。

パラメーター γ は、電子密度像 $\rho(\vec{r})$ のサポート領域内外の電子密度の総和の比である。

$$\gamma = \frac{\sum_{\vec{r} \in \text{Support}} |\rho(\vec{r})|}{(\sigma - 1) \sum_{\vec{r} \in \text{Support}} |\rho(\vec{r})|} \quad (2.41)$$

ここで、 σ は、OS 比である。分母の $(\sigma - 1)$ によって、サポート領域外の情報量を考慮した重みづけがなされている。サポート領域外の電子密度は 0 になるはずなので、正しいサポート領域で電子密度像が収束すれば γ は小さな値となり、理想的には 0 になる。

図 2-9 は、像の収束具合を R_F と γ で追跡したものである。電子密度像がうまく収束すれば、これらの指標は、徐々に小さくなっていく。

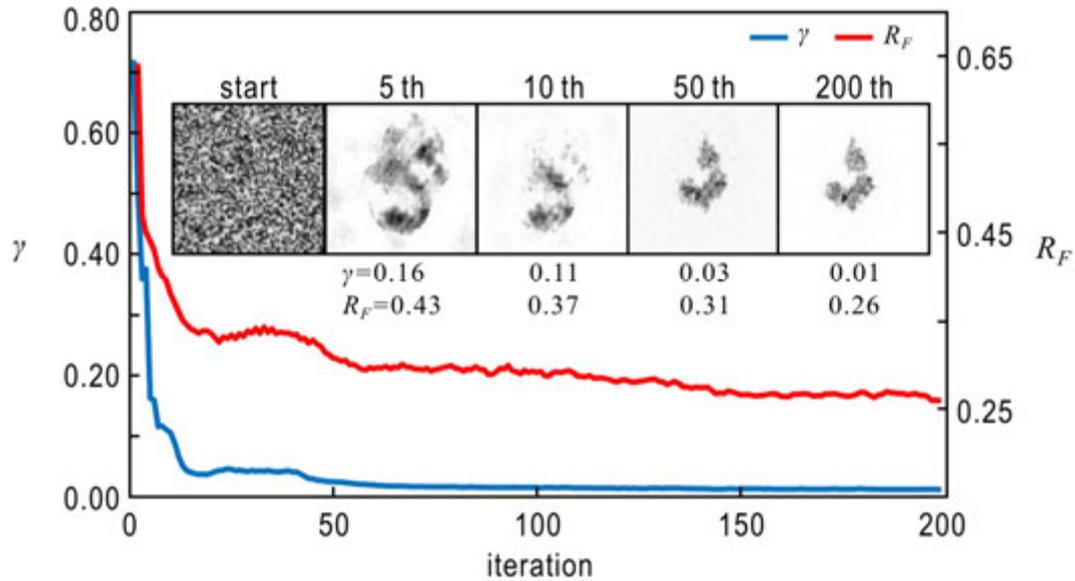


図 2-9 位相回復の収束とその指標 R_F 及び γ の振る舞い。グラフには HIO 計算回数(iteration)ごとに R_F (赤色)と γ (青色)の値をプロットした。iteration 中の電子密度像を位相回復初期のものから最終サイクルのものまでを適当に 5 つ選んだ。像の下に R_F と γ の値を示した。

2.4.6 回復した投影電子密度像の有効分解能

回復された投影電子密度像を与える位相を評価するパラメーターとして、Phase-retrieval transfer function (PRTF)が用いられている[Chapman *et al.*, 2006b]。PRTF は複数の異なる初期電子密度像から回復された像の平均像 (図 2-10(a)) の有効分解能を、平均像を構成する投影電子密度像の位相の分布から評価するパラメーターである。まず、 N 個の電子密度像のうち j 番目の位相 $\phi_j^{\text{cal}}(\vec{S})$ に対して

$$p(\vec{S}) = \frac{\left| \sum_{j=1}^N \exp[i\phi_j^{\text{cal}}(\vec{S})] \right|}{N} \quad (2.42)$$

を定義する。この関数 $p(\vec{S})$ は 0 から 1 までの値をとり、各像の間での位相の分布の広がりを実験することができる (図 2-10(b))。位相の分布が狭ければ、位相の信頼度は高く、正しく回復されたと判断する。仮に全ての像で位相が一致していれば、

$p(\vec{S})$ は1になる。PRTFは、以下のように $p(\vec{S})$ の散乱ベクトルの大きさ $|\vec{S}|$ について円環平均をとったものであり、分解能ごとに位相の分布の広がり进行评估する(図2-10(c))。

$$\text{PRTF}(|\vec{S}|) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} p(\vec{S}(\theta)) d\theta, \quad |\vec{S}(\theta)| = |\vec{S}| \quad (2.43)$$

ここで、 θ は $\vec{S}(\theta)$ の指す方位角である。古くからX線結晶構造解析や電子顕微鏡の分野で使用されてきた位相の信頼度を評価する指標 figure of merit [Blow & Crick, 1959]と関連付けることが可能で、PRTFが0.5以上であれば正しい像が回復されたと判断できる [Sekiguchi *et al.*, 2016; 関口, 2016]。従って、有効分解能はPRTFが0.5を示す散乱ベクトルの大きさから評価する(図2-10(d))。

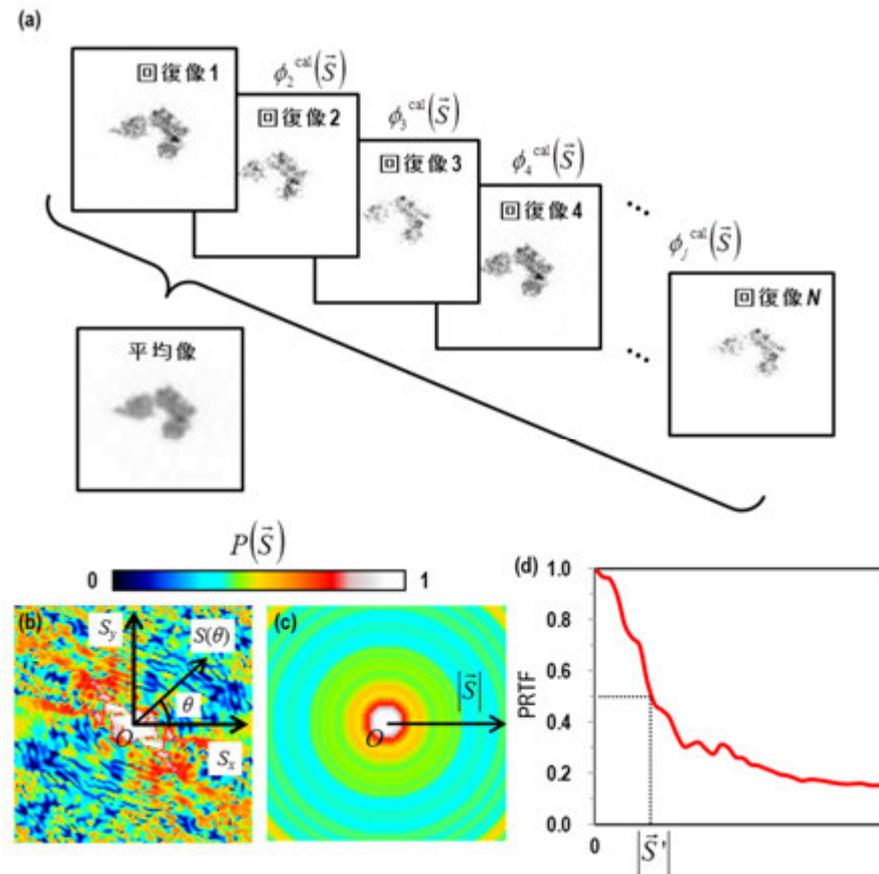


図 2-10 PRTF の計算方法。(a)初期電子密度像の異なる回復像の平均像(b) $p(\vec{S})$ (c) $p(\vec{S})$ の円環平均をとってPRFTを得る。(d) (c)のプロファイル。PRTF=0.5となる散乱ベクトルの大きさが $|\vec{S}|$ であった場合、有効分解能は $1/|\vec{S}|$ で与えられる。

2.4.7 回復像の妥当性の評価

異なる初期電子密度像ごとに回復電子密度像が異なる場合がある。特に実験で得られた回折パターンに対する位相回復では、スペックルサイズ、極小角領域のデータ欠損、S/N 比などに依存して回復電子密度像が一つに収束することは稀である。そのため、どの結果が正しい像を導いているのか判断しなければならない。一般的に、多くの位相回復計算を行い得られた像の中で、大部分を占める同じ系統の像があれば、その像が妥当であるとされている[Kimura *et al.*, 2014; van der Schot *et al.*, 2015]。しかしながら、妥当と思われる像を選択するためには、多くの位相回復試行で得られた回復電子密度像の特徴を定量的に評価し、分類する必要がある。そこで、主成分分析を利用して、大量の像を端的に分類できる特徴(主成分)を抽出する解析手法が考案された[Sekiguchi *et al.*, 2016; 関口, 2016]。本論文では、これを実装したプロトコルを ASURA という名前で記載する。

ASURA プロトコルでは位相回復計算を二段階に分けて行う。第一段階では 1,000 の初期電子密度像を与えて HIO+SW を行う。HIO+SW 計算終了後、得られた 1,000 の回復像について主成分分析を行い、主成分に従って回復像を特徴づける。この主成分を用いれば、各回復像がどの程度似ているのか定量的に評価することができる。次に、主成分について回復像を 10 のクラスに分類し、各クラスの中で回復像を平均化する。 R_f (2.4.5 節)から位相回復の収束が確認された平均像の中で、クラス内に配分された回復像の数が最も多い平均像を尤もらしい像として採用する。HIO+SW 計算では信頼度の高いサポートを決定する目的がある。

第二段階では、第一段階で得たサポートで 1,000 の初期電子密度像を与えて OSS を行い、第一段階と同様に主成分分析によって信頼度の高い電子密度像を求める。OSS ではサポート内の電子密度分布を微細構造まで回復する目的がある。ここで選んだ平均像を与えるクラスについて PRTF(2.4.6 節)により有効分解能を評価する。

2.5 光のコヒーレンス

X 線入射光源のスペクトル幅や光源サイズが有限であると、光源から伝播する波の位相はその発生点や波長に依存して変化するため、単色平面波の入射を仮定する回折理論は厳密には成立しない。CXDI 実験において非結晶粒子から図 2-4 のような鮮明なスペックルパターンを得るためには、入射 X 線の位相が空間的に揃っており、回折波の干渉が最大になる必要がある。

図 2-11 のように、ある準単色な光源より 2 つのピンホール \vec{r}_1 , \vec{r}_2 で回折された光波 E_1 , E_2 が、それぞれ距離 l_1 , l_2 離れたスクリーン上の点 \vec{S} で時刻 t に干渉した場合を考える。(なお、簡単のため、ピンホールスリットを回折光源としているが、Babinet の原理より、散乱体を電子とした図 2-2 のような状況でも同じ議論ができる[Born & Wolf, 1999]。) このとき、観測される強度 $\langle I(\vec{S}, t) \rangle_t$ は、

$$\begin{aligned} \langle I(\vec{S}, t) \rangle_t &= \langle \{K_1 E_1(\vec{r}_1, t-t_1) + K_2 E_2(\vec{r}_2, t-t_2)\} \{K_1 E_1(\vec{r}_1, t-t_1) + K_2 E_2(\vec{r}_2, t-t_2)\}^* \rangle_t \\ &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}|\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|\cos(\alpha_{12}(\tau) - \Delta) \\ \gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau) &= \frac{\langle E_1(\vec{r}_1, t+\tau)E_2^*(\vec{r}_2, t) \rangle_t}{\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}} \\ t_1 &= \frac{l_1}{c}, \quad t_2 = \frac{l_2}{c}, \quad \tau = t_2 - t_1, \quad c: \text{光速} \\ \alpha_{12}(\tau) &= \Delta + \arg[\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)], \quad \Delta = 2\pi\nu\tau \end{aligned} \quad (2.44)$$

となる[Born & Wolf, 1999]。ここで、 K_1 及び K_2 は回折波の方向依存性を表す因子である。 t_1 及び t_2 は、 \vec{r}_1 及び \vec{r}_2 を出た光が \vec{S} まで伝播するのに要する時間であり、 τ はその時間差である。また、 ν は振動数である。 I_1 , I_2 は、 \vec{r}_1 , \vec{r}_2 での強度であり、第三項が干渉項である。 $\gamma_{12}(\tau)$ は特に複素コヒーレント度と呼ばれ、その実数部 $\text{Re}[\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)] = |\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|\cos(\alpha_{12}(\tau) - \Delta)$ が光路差に起因する位相差 Δ によって強度分布に干渉縞を与える。コヒーレンスの度合い(コヒーレント度)は $|\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|$ で与えられ ($0 \leq |\gamma_{12}(\tau)| \leq 1$)、光路差に起因して時間 τ ずれた 2 光波の時間相関によって決まる。

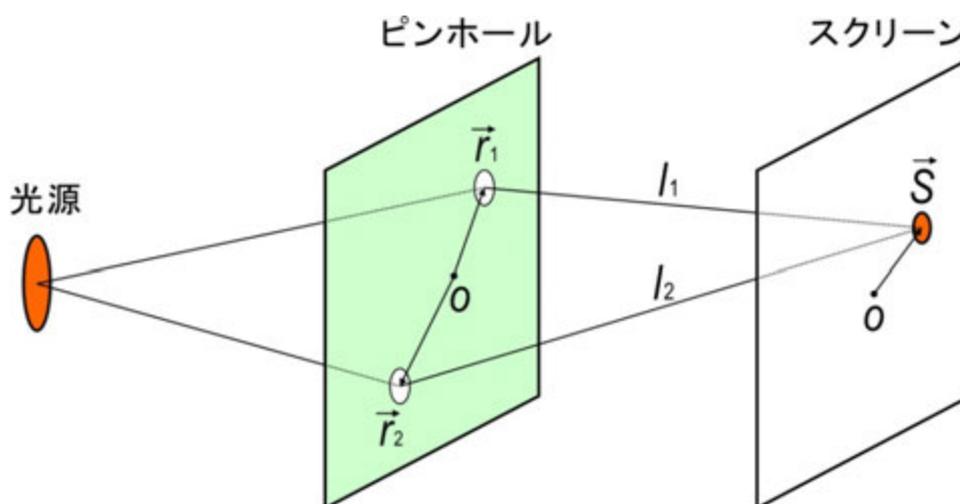


図 2-11 準単色光源に照らされたピンホール \vec{r}_1 及び \vec{r}_2 からの回折波をスクリーン上の点 \vec{S} で観測する。

$\langle I(\vec{s}, t) \rangle_t$ の大きさは、2 光波の位相差 Δ によって、最小値 I_{\min} から最大値 I_{\max} の範囲をとる。

$$I_{\max} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}|\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)| \quad (2.45)$$

$$I_{\min} = I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}|\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|$$

I_{\min} と I_{\max} を用いて、干渉縞がどの程度明瞭であるか量る指標 V を以下のように定義する。

$$V = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} = \frac{2\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}}{I_1 + I_2} |\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)| \quad (2.46)$$

$I_1 \approx I_2$ であれば、 $V \approx |\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|$ であり、コヒーレンスが干渉縞の明瞭さを直に反映する。 V は visibility (鮮明度) と呼ばれ、回折パターンよりコヒーレント度を測定する指標となる。図 2-12 では、コヒーレント度 $|\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|$ と干渉縞の明暗について概要を示した。 $|\gamma_{12}(\tau)|=1$ は完全コヒーレントであり、このとき I_{\min} は完全に 0 となり、 I_{\max} が強調されるため干渉縞は鮮明に映る。一方で $|\gamma_{12}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau)|=0$ のとき、2 光波は全く干渉せず(インコヒーレント)、干渉縞は観測されない。

ここで想定している光は準単色光であるため、スペクトル幅 $\Delta\nu$ が存在する。そのため、2 光波の光路差が大きいと時間差 τ の間に時間相関がなくなり、干渉が観測されなくなる。干渉が観測されなくなる光路差(コヒーレンス距離)は光速を c とすると、

$$l \approx \frac{c}{\Delta\nu} \quad (2.47)$$

で表される。このコヒーレンス距離を光速で割ったものがコヒーレンス時間であり、これに制限されるコヒーレンスを時間コヒーレンスと呼ぶ。

次に有限サイズ σ の光源を微小光源に分割し、それぞれがインコヒーレントに発光する場合を考える。このような光源をカオス光源という。光路差がコヒーレンス距離より十分に小さければ時間差 τ についての時間コヒーレンスは保たれるため、コヒーレント度は空間成分のみで表すことができる。つまり、入射光の波面が試料位置でどの程度の範囲で揃っているのかに依存する。これを空間コヒーレンスと呼ぶ。

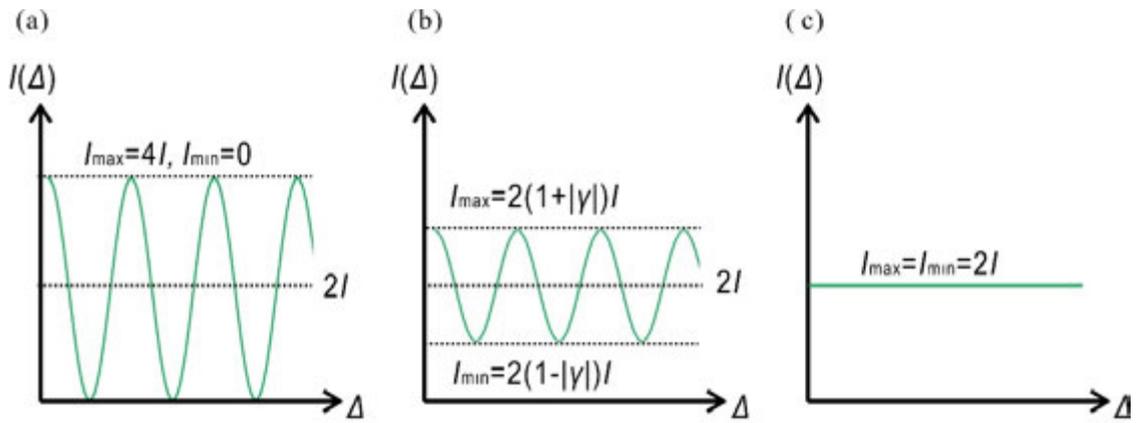


図 2-12 $I_1 = I_2 = I$ のときスクリーン上で観測される干渉縞の模式図。(a)完全コヒーレント $|\gamma_{12}(\tau)| = 1$ 。(b)部分コヒーレント $0 < |\gamma_{12}(\tau)| < 1$ 。(c)インコヒーレント $|\gamma_{12}(\tau)| = 0$

第三章 SACLA における XFEL-CXDI 実験

本章では、X線自由電子レーザーの概要、SACLA で提供される XFEL パルスの性質と CXDI 実験を行うための集光光学系及び検出器について述べ、細胞試料の CXDI 実験で使用するのに適当な XFEL パルスの波長について検討する。

3.1 X線自由電子レーザーの概要

本研究では、スペックル(干渉縞)の鮮明な Signal to noise ratio (S/N 比)の良い回折パターンを取得するため、光強度が強く空間コヒーレンスの高い光源として X線自由電子レーザー(X-ray Free Election Laser, XFEL)を用いた(図 3-1)。以下では、XFEL での X線パルス発生について述べる。

3.1.1 電子の加速と圧縮

まず、電子銃から X線発生のための電子バンチを生成する。輝度の高い X線を発生させるためには、電子バンチの実空間での位置広がりや運動量空間での広がりを小さく保つこと、即ち、電子バンチを圧縮する必要がある。電子は負の電荷を持つため、クーロン反発によって大量の電子を一定の密度を超えて狭い空間に収めることが難しい[宮島、2008]。そのため、電子バンチを高周波線型加速器によって加速する。

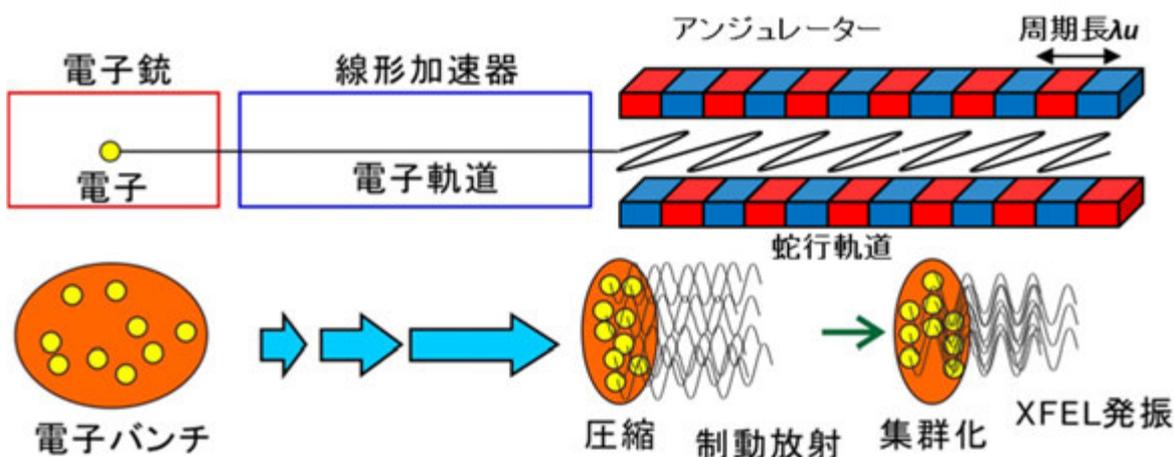


図 3-1 X線自由電子レーザーの発振の概要

速度 v で移動する半径 r 、電荷密度 ρ_e の電子バンチがつくる電場及び磁場は円筒対称性を持ち、進行方向では 0 になる。動径方向の電場を E_r 、円周方向の磁場を B_ϕ とすると、ガウスの法則、アンペールの法則より

$$E_r(r) = \frac{1}{2\epsilon_0} \rho_e r \quad (3.1)$$

$$B_\phi(r) = \frac{1}{2} \mu_0 \rho_e v r \quad (3.2)$$

となる。ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率、 μ_0 は真空の透磁率である。このような電場・磁場中の電子が受ける力 F_r は、

$$F_r = -\frac{1}{2} \frac{e}{\epsilon_0} \frac{\rho_e}{\gamma^2} r \quad (3.3)$$

となる。ここで、 $\gamma = 1/\sqrt{1-v^2/c^2}$ はローレンツ因子である。線型加速器によって光速 c 近くまで加速すれば、 $1/\gamma^2$ に比例する F_r が小さくなるため、電子バンチを狭い空間に圧縮することが可能となる。このような状態でバンチ圧縮を行う。

バンチ圧縮では、まず電子バンチの進行方向前方の電子のエネルギーを低くし、バンチ内でエネルギー変調を生じさせる。これらの電子をバンチコンプレッサーと呼ばれる、4つの偏向電磁石を用いたシケインに通す[田中隆次、2013] (図 3-2)。エネルギーの低い電子は偏向角が大きくなるため、シケインを通過する軌道が長くなり、シケイン通過後に合流する他のエネルギーの高い電子に近づく。その結果、バンチ圧縮が起こる。

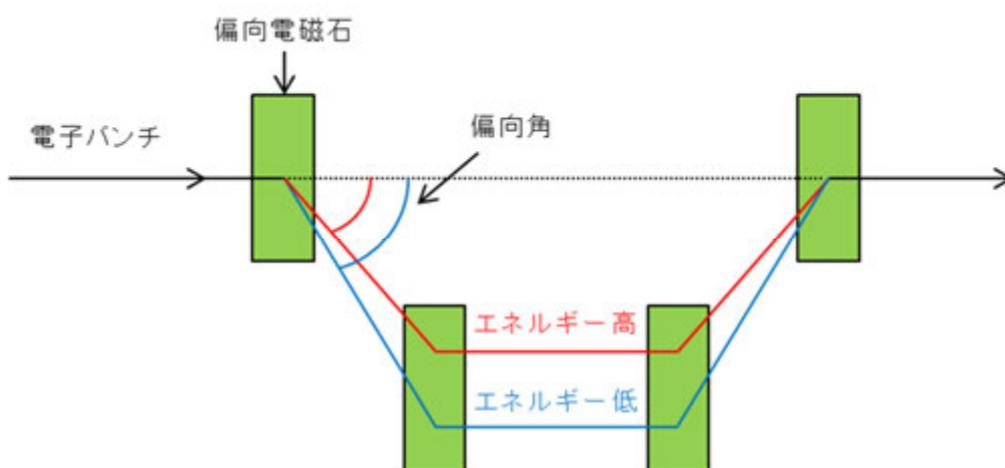


図 3-2 バンチコンプレッサー

3.1.2 アンジュレーターによる X 線の放射

次に圧縮された電子バンチをアンジュレーターと呼ばれる磁石列に入射する。基本的なアンジュレーターは図 3-3 のような構造をしている。S 極 N 極の磁石列の間に 90° に回転させた磁石を挟むため、周期長 λ_u は磁石 4 つ分の距離になる。

電子バンチの進行方法を z 軸に、磁石による磁場ベクトルの方向を y 軸にとる。アンジュレーターの磁石間の中心に電子が入射された場合、アンジュレーターが作り出す磁場分布 \vec{B} は以下のように記述される [Halbach, 1983; 田中隆次、2013]。

$$\vec{B} = (B_x, B_y, B_z) = (0, B_0 \cos k_u z, 0) \quad (3.4)$$

$k_u = 2\pi / \lambda_u$ はアンジュレーターの周期磁場の波数であり、 B_0 は磁石間の距離 g によって決まる磁場振幅である。アンジュレーターの作り出す磁場中の電子 1 つの運動方程式は、

$$\frac{d\vec{p}}{dt} = -e\vec{v} \times \vec{B} \quad (3.5)$$

となる。 \vec{p} は電子の運動量であるが、光速に近い速さを持つことから、

$$\vec{p} = \gamma m \vec{v} \quad (3.6)$$

となる。

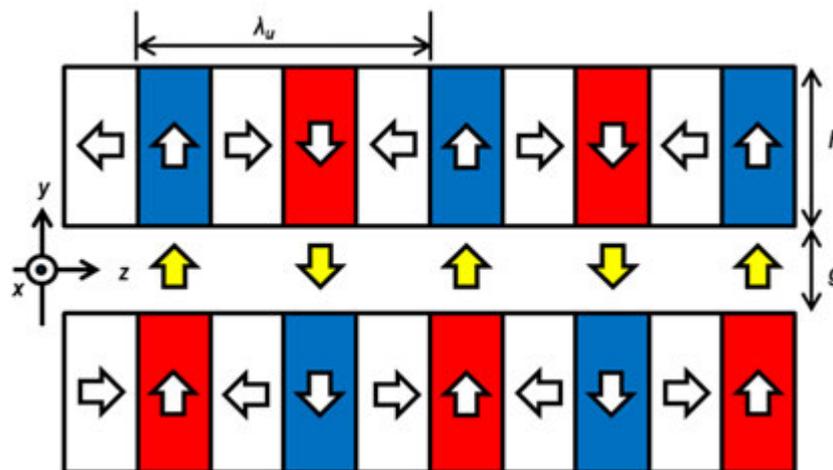


図 3-3 アンジュレーターの構造。白矢印は磁化の方向を、黄色矢印は磁場の方向を示す。電子バンチは z 軸方向に進むことを想定している。 $y = 0$ が磁石間の中心となる。

ここで m は電子の質量である。 x 成分に関して運動方程式を解くと、

$$x = -\frac{\lambda_u K}{2\pi\gamma} \cos k_u z, \quad K = \frac{eB_0 \lambda_u}{2\pi mc} \quad (3.7)$$

となる。ここで、 K は偏向定数と呼ばれる無次元のパラメーターでアンジュレーター
の磁場強度を示す。上式からわかるように、電子はアンジュレーター中を進みながら x
方向に正弦波軌道を描いて振動することがわかる。

x 方向に正弦波軌道を描く電子は制動放射によって X 線を発生させる。発生する X 線
の波長 λ は以下のようなになる[田中隆次, 2013]。

$$\lambda = \frac{\lambda_u}{2\gamma^2} \left(1 + \frac{K^2}{2} \right) \quad (3.8)$$

波長を変更する際には、アンジュレーター周期長、電子の加速エネルギー、アンジュレ
ーターの磁石間のギャップの広さを調整すればよい。また、波長の幅 $\Delta\lambda/\lambda$ は、磁石列
の繰り返し数 N_u を用いて、

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \frac{1}{N_u} \quad (3.9)$$

とかける。したがってアンジュレーターから得られる光の単色性は、磁石の繰り返し数
が多くなるほど向上する。

3.1.3 自発放射とコヒーレント放射

電子バンチの分布の大きさ(バンチ長)が発生する X 線波長 λ よりも十分に大きな時、
電子同士が互いに相関なく X 線を放射するため、光は粒子(光子)として積算されていく
ことになる。電子の数が N であるとする、得られる放射光の強度は、電子 1 つから
放射される X 線の N 倍になる。このような放射の過程を自発放射と言う(図 3-4 (a))。
一方、バンチ長が波長よりも短い場合、電子から発生した光は「波」としてコヒーレン
トに積算され(図 3-4 (b))、電場振幅が N 倍になるように増幅される。光の強度は電場
振幅の絶対値の二乗に比例するため、電子 1 つの放出される場合の N^2 倍の強度が得ら
れる。これをコヒーレント放射と呼ぶ[田中隆次, 2013]。しかし、X 線領域でコヒーレ
ント放射を達成するには、電子バンチを X 線波長以下の Å オーダーに圧縮する必要が
あるが容易ではない。

バンチ長が波長よりも長い場合でもコヒーレント放射が起こる条件がある。それは
図 3-4 (c)のように電子の分布が規則的に局在化している場合である。このように一定の
間隔で局在化した電子の塊をマイクロバンチと呼ぶ。マイクロバンチ内の電子は、アン

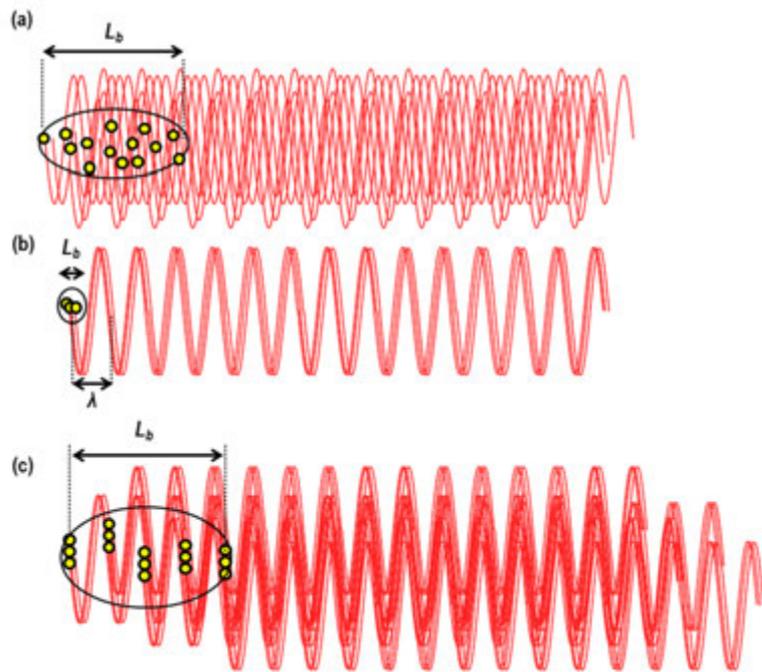


図 3-4 (a) バンチ長 L_b が λ より大きい時、自発放射となる。(b) L_b が λ より小さい時、コヒーレント放射となる。(c) 電子バンチが波長 λ に等しい距離だけにおいて形成されるマイクロバンチングが起きると、発生した放射光がコヒーレントに足しあわされることになり、擬似的なコヒーレント放射を行うようになる。

ジュレーターの磁場を感じて振動し、互いに相関を持って放射し、コヒーレントに足しあわされることになる。

3.1.4 電子のマイクロバンチング

マイクロバンチがアンジュレーター内で形成される過程について説明する。図 3-5(a) は、ある時刻において、既に発生していた放射光による磁場 B_w により、 x 方向に振動している電子が受けるローレンツ力の様子を表している。黄色の丸で表された電子はローレンツ力を受けることで、磁場が 0 となる方向に移動することになる。この力によってマイクロバンチングが起こる。図 3-5(a) の状態から電子がアンジュレーターの周期長の半分 ($\lambda_u/2$) 進むと、アンジュレーター磁場が反転するために、電子の x 方向の速度方向は反転する (図 3-5(b))。電子の z 軸方向へ進む速度 v は光速よりも僅かに遅いため、電子が $\lambda_u/2$ 進む間に、X 線磁場は $\lambda_u/2$ よりも距離 l だけ前方に進んでいることになる。

$$l \approx \frac{\lambda}{2} \quad (3.10)$$

従って、磁場の向きも反転するため、図 3-5(a)と同じく、磁場が 0 となる節に電子が集まるようにローレンツ力が働く。同様の議論をすれば、アンジュレーター中を電子が進んでいる間、マイクロバンチングが起きる方向で電子に Lorentz 力がかかり続けることになる[Margaritondo & Rebernik Ribic, 2011]。

3.1.5 自己増幅自発放射方式による XFEL 発振

マイクロバンチングを起こすには、磁場 B_w が初めに存在しなければならない(図 3-5(a))。つまり、この磁場 B_w を与える種光が必要となる。アンジュレーター内で電子が完全に一様に分布している場合は、個々の電子から放出される光の電場は完全に打ち消し合い、光は放出されない。しかし、実際には電子の分布には一定の揺らぎがあり、密に分布している領域と疎に分布している領域がある。 B_w はこのような密度の揺らぎによって、アンジュレーターの入り口付近で僅かに偏って放出された光によって与えられ、マイクロバンチングを形成し、疑似的なコヒーレント放射を起こす。このような発振方式を自己増幅自発放射という。

XFEL は、最大の増幅率を持つ基本空間モードの光が顕著に増幅されるため、これ以外の空間モードの光は相対的に低下する。基本空間モードの光はガウシアンであるため、アンジュレーターの出口付近で波面の位相変化がほぼ 1 モードに支配された空間コヒーレンスの高いレーザー光となる。一方で、自己増幅自発放射方式による XFEL 発信では電子バンチの密度揺らぎを起源とする自発光であるため、多数の時間モードを持ち、完全な時間コヒーレンスは実現しない。

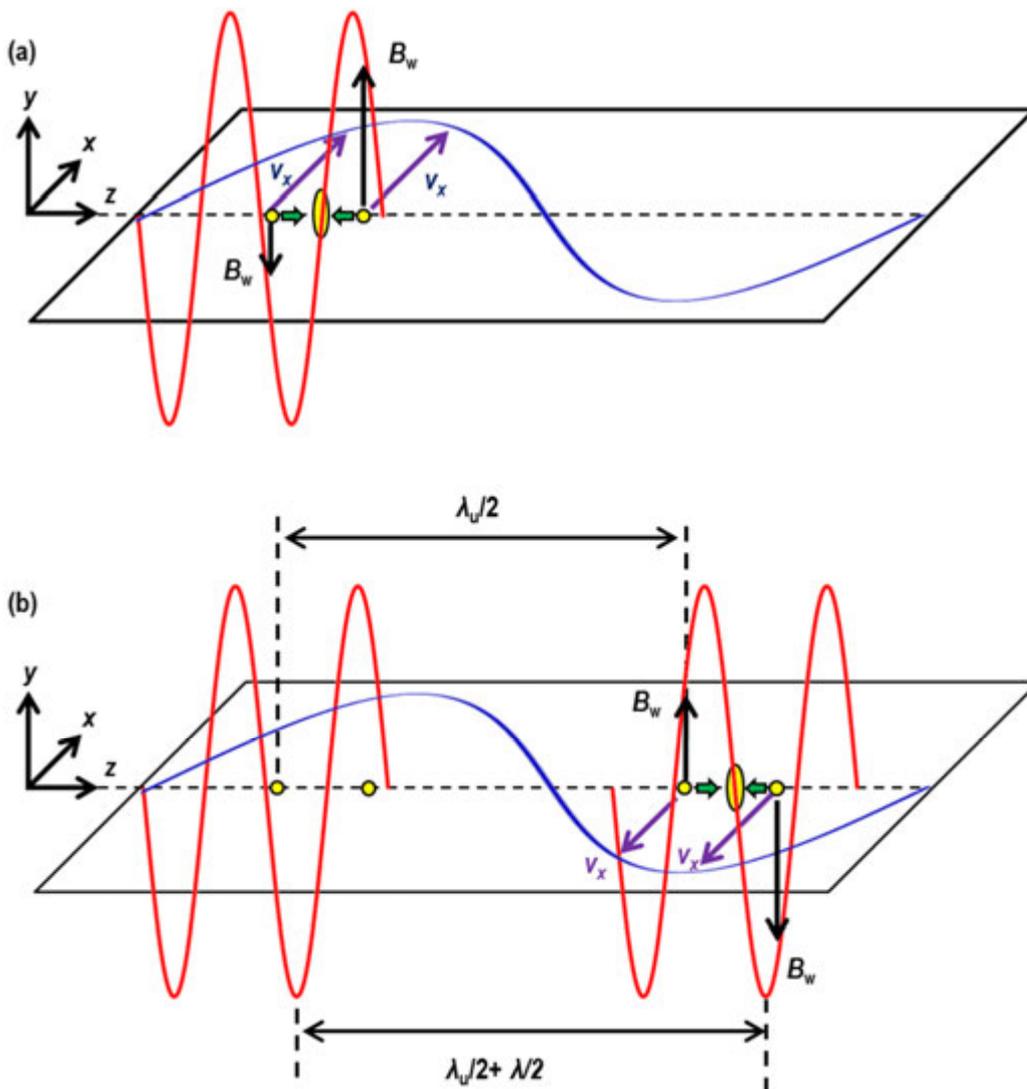


図 3-5 (a)発生した X 線と電子の間に働くローレンツ力 (緑矢印) (b)アンジュレータ長を半分電子が進んだ場合に働くローレンツ力 (緑矢印)

3.1.6 一般のレーザーと X 線自由電子レーザーの比較

X 線自由電子レーザー(X-ray free electron laser)は“レーザー”と銘打っているが、厳密には一般のレーザーとは異なる。この節では、一般のレーザーの発振原理について触れ、XFEL との違いについて簡単に述べる。

一般のレーザー(laser)は、Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (輻射の誘導放出による光増幅)の頭文字から名付けられた装置であり、原子や分子の誘導放出を利用して光を発振する[霜田、1983]。レーザー発振器(図 3-6)は、共振器とその中に設置された媒質で構成される。共振器は 2 枚の向かい合った鏡で構成され、波長が鏡間の長さの整数分の一となる光は、鏡間を繰り返して往復し、定常波を形

成するようになっている。共振器の中の媒質はエネルギーを与えられて励起する(ポンピング)ことで、反転分布を形成し、高いエネルギー状態の原子が多くなる。この反転分布した媒質中に、高いエネルギー状態と低いエネルギー状態の差に対応する振動数を持った光(種光)が入ると、誘導放出が起こり、光強度が増幅される。特に光が共振器で定常波を形成している場合には、再帰的に増幅が行われる。共振器の2枚の鏡のうち1枚を、一部の光を透過するようしておけば、増幅された光の一部を取り出すことができる。このような一般のレーザーとX線自由電子レーザーの違いを表3-1にまとめた。

XFELの場合は、電子の加速エネルギーまたはアンジュレータギャップを調整することで磁場の強さを制御し、得られる放射光の中心波長をある程度の範囲で自由に、連続的に変えることができる。一方、一般のレーザーの波長は、”高いエネルギー状態と低いエネルギー状態の差に対応する振動数を持った光”と記述したように、エネルギー準位の差のエネルギーに対応したものに限定される。

X線はあらゆる物質に対する屈折率が1よりも極わずかに小さい値をとるため、図3-6のように垂直にX線を鏡面に入射しても反射せず、一般のレーザーのような共振器を作ることができない。

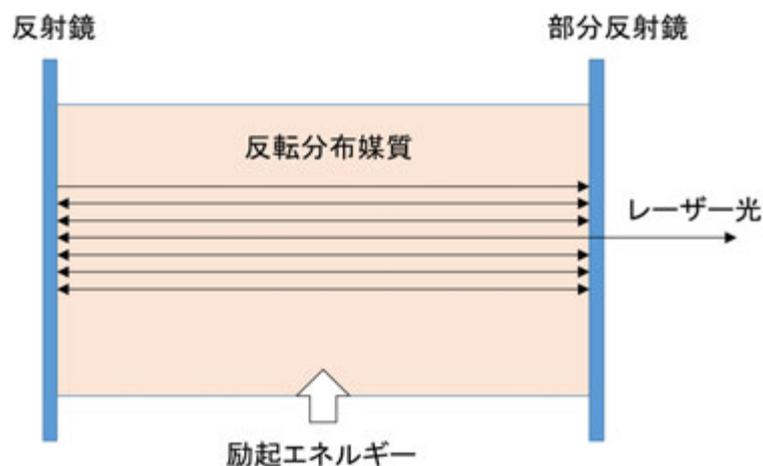


図 3-6 レーザーの構図

表 3-1 一般のレーザーと X 線自由電子レーザーの違い

項目	一般のレーザー	X 線自由電子レーザー
発振波長	媒質のエネルギー準位 によって決まる	ある程度の範囲で 自由に変えられる
共振器	向かい合った 2 枚の鏡	なし
レーザー 媒質	固体、液体、気体、 半導体など	電子
励起エネルギー供給源	光、放電、化学反応、 電流の注入など	線形加速器
種光	自然放出光	自発放射光
得られる光	時間・空間的にコヒーレント 連続光・短パルス光	空間的にのみコヒーレント 短パルス光

光に対しエネルギーを供給し、増幅を行うレーザー媒質は、一般のレーザーの場合、アンモニアガス(メーザー[Gordon *et al.*, 1955])やルビー[Maiman, 1960]、半導体(半導体レーザー)といった固体や気体など様々なものがある。一方、X 線自由電子レーザーの場合、放射光にエネルギーを供給するのは電子であるが“自由電子“であり、原子に束縛されていないため、エネルギー準位などは存在せず、また、反転分布などの概念もないため、一般のレーザーと同じ役割を担っているわけではない。

媒質が固体の場合や液体の場合、光を入射することで励起エネルギーが供給される。気体媒質の場合は、グロー放電やアーク放電により、半導体レーザーの場合は、電流を流すことでポンピングが行われる。自由電子レーザーの場合、線形加速器が電子にエネルギーを供給する(3.1.1 節)。

誘導放出による増幅が行われる最初の光は、自然放出光(高エネルギー状態の原子が不安定であるために低エネルギー状態に際に放出する光)である。一方、自己増幅自発放射方式の X 線自由電子レーザーの場合、大量の電子から発する自発放射光の電磁場が、電子の空間分布の偏りから僅かに残り、この磁場により電子のマイクロバンチングが始まる(3.1.4 節)。

X 線自由電子レーザーは、高い空間コヒーレンスを持つが、時間コヒーレンスは悪い(3.1.5 節)。一方で、一般のレーザーでは、誘導放出により得られる光の位相が空間的に揃い、かつ準位間のエネルギー差で放出波長が決まるため、高い単色性を持つ。即ち、高い時間コヒーレンスと空間コヒーレンスを有している。

3.2 SACLA の概要

SACLA(SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser)は、第三世代放射光施設 SPring-8 の敷地内に建設された XFEL 施設であり、400 m の線型加速器と 90 m のアンジュレーターと最下流の実験ホールから構成され、その全長は700 mである(図3-7) [Ishikawa *et al.*, 2012; Yabashi *et al.*, 2015; 田中均, 2013; Inubushi *et al.*, 2012]。電子銃にて 500 keV で取り出された電子は、加速管内で加速された後、バンチコンプレッサーで進行方向に圧縮されて密度が高められる。電子バンチのエネルギーは線型加速器の末端で、約 8 GeV に達し、そのままアンジュレーターに入射される。出射できる XFEL の波長 0.3~0.06 nm (光子エネルギー: 4.0~20 keV) は、式(3.7)及び式(3.8)のようにアンジュレーターの周期長、偏向定数(アンジュレーター磁石列間のギャップ)、電子の加速エネルギーで制御される。

電子バンチは、繰り返し周波数 30 Hz で供給されるので、XFEL パルスも 1 秒間に 30 shots 利用可能である。XFEL パルスの実験ハッチへの供給は、パルスセクターで制御される。ただし、XFEL パルスは、自己増幅自発放射過程で生成されるので、電子バンチの密度揺らぎによってパルスごとの強度の変動が~10%となっている。

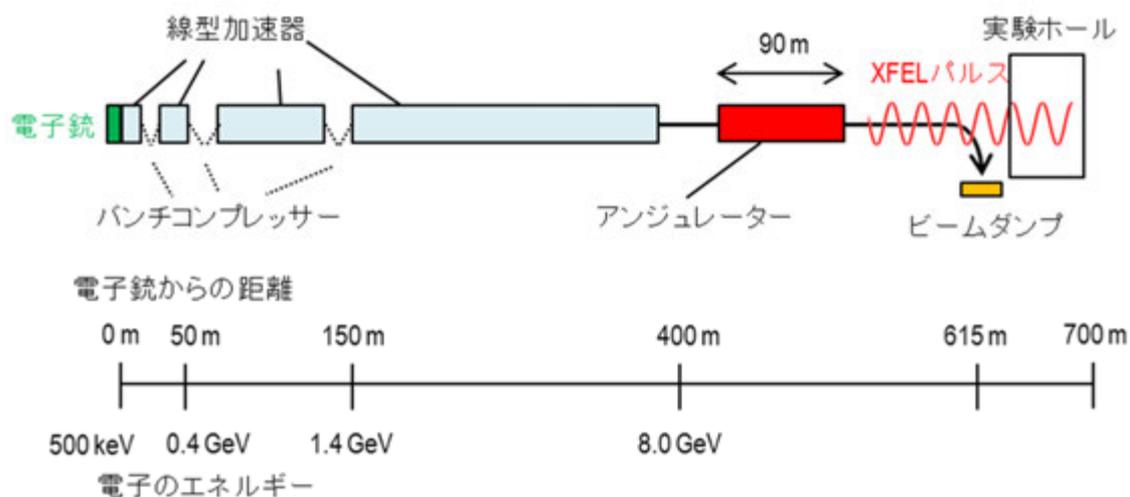


図 3-7 SACLA における電子銃、線型加速器、アンジュレーター、実験ホールの配置とスケール

3.3 CXDI 実験で利用する集光光学系と検出器

3.3.1 K-B ミラーによる集光と集光調整方法

CXDI 実験では X 線入射光源の強度を高めるため、XFEL パルスを Kirkpatrick-Baez(K-B)ミラー[Yumoto *et al.*, 2013]を用いて集光している (図 3-8)。 $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ 程度の幅を持つ XFEL を集光すると、垂直・水平方向で約 $2 \mu\text{m}$ (FWHM) に絞られ、その強度は $10^{10-11} \text{ photons}/4 \mu\text{m}^2/10 \text{ fs pulse}$ に達する。集光点に試料粒子をすると、単一パルスで破壊されるが、破壊される前に X 線回折が生じる (Diffraction before destruction) [Neutze *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2006b]。集光プロファイルは、垂直・水平集光を行うミラーの焦点距離を L 、 x, y をそれぞれ水平・垂直方向の焦点面での座標とすると、以下のように sinc 関数で与えられる。

$$I(x, y) = I_0 \text{sinc}^2\left(\frac{\pi x a}{L \lambda}\right) \text{sinc}^2\left(\frac{\pi y b}{L \lambda}\right) \quad (3.11)$$

ここで、 a, b はそれぞれ水平方向と垂直方向の開口サイズ、 I_0 ビームプロファイル中心の強度、 λ は波長である。

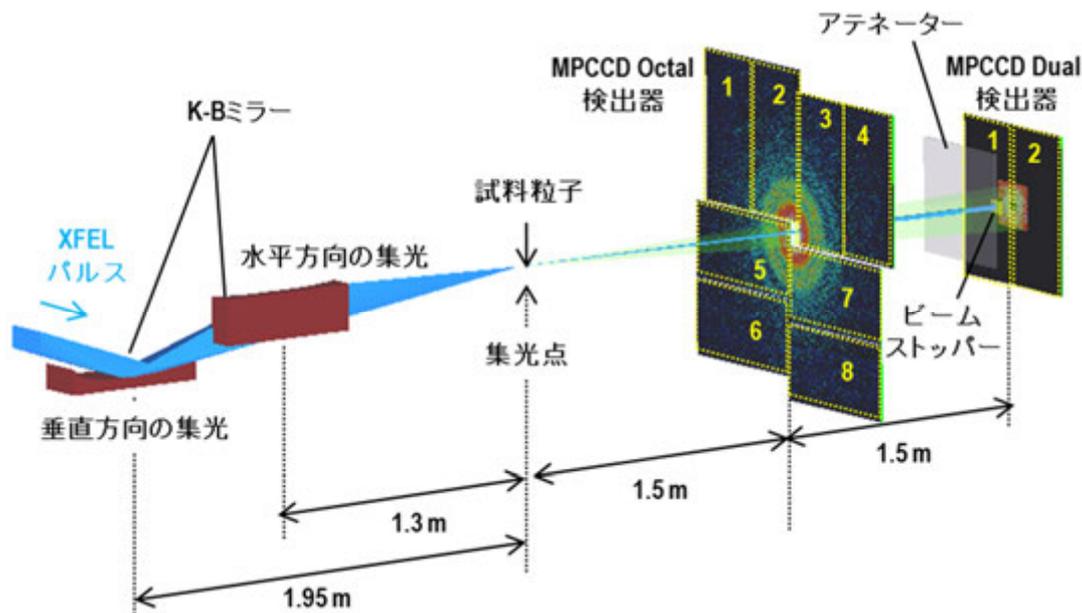


図 3-8 K-B ミラーと MPCCCD 検出器を用いた回折実験の模式図。垂直方向の集光ミラーの焦点距離は 1.55 m 、水平方向の集光ミラーの焦点距離は 2.00 m である。ミラーへの入射角は水平・垂直ミラーでそれぞれ $1.50 \text{ mrad} \cdot 1.55 \text{ mrad}$ である。

回折装置の試料粒子が K-B ミラーの焦点に位置しているかを確認するために、フーコーテストを行う。フーコーテストでは、試料位置で集光サイズより十分に大きい太さのワイヤーをビームに接触させ、検出器でビームの強度分布の振る舞いを見る(図 3-9)。なお、XFEL パルスを検出器に直接入射すると検出器が破壊されてしまうため、シリコンやアルミニウム製のアテネーターを用いて十分に減衰させた XFEL パルスを用いる。

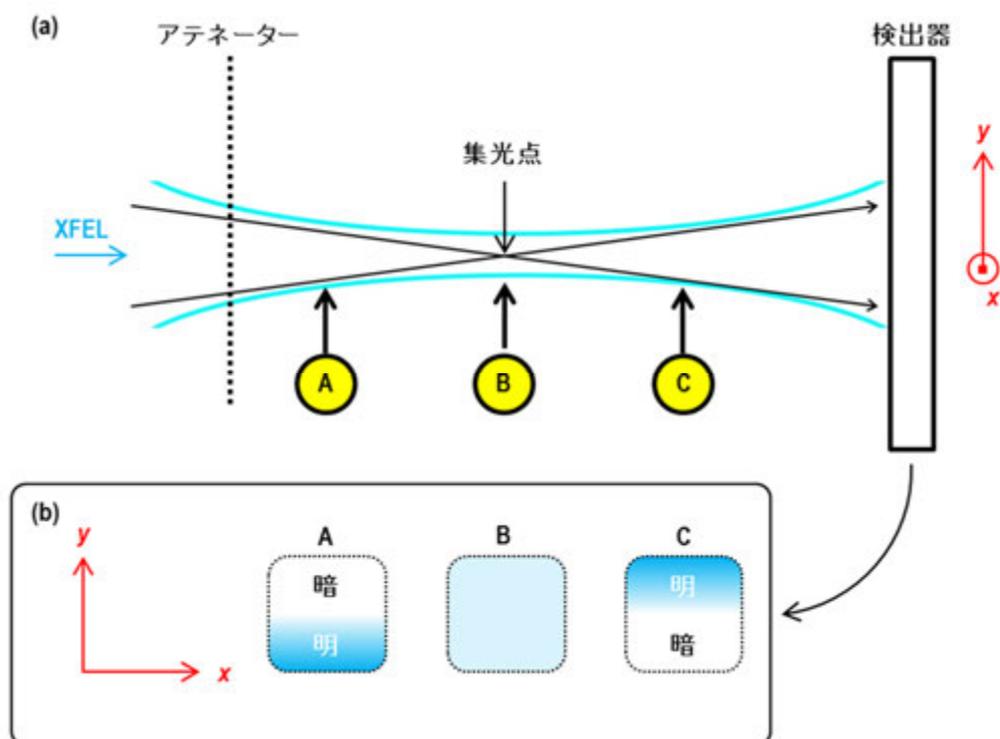


図 3-9 フーコーテストの模式図。(a)黄色円はワイヤーの断面を示す。集光点より下流側 A、集光点付近 B、下流側 C よりワイヤーをビームに接触させる。(b)A~C の位置でワイヤーを接触させたときに検出器に記録されるビームの強度分布。ワイヤーが集光点より上流側にある場合(A)、検出器に写るビームは接触させた方向と逆方向から暗くなる。ワイヤーが集光点より下流側にある場合(C)は接触させた方向と同じ方向かビームが暗くなる。ワイヤーが集光点付近にある場合(B)は、接触と同時に全体が暗くなる。この振る舞いを利用して、水平方向・垂直方向それぞれで試料粒子位置に焦点を結ぶように集光ミラーの見込角を微調整する。

集光点でのビームプロファイルは、ナイフエッジスキャンによって測定する (図 3-10(a))。ナイフエッジスキャンでは一定の刻み幅でワイヤーをビームに接触させ、その都度、ワイヤーに遮られていない XFEL パルスの強度をワイヤーより下流に設けた PIN photodiode (PD) によって測定する (図 3-10(b))。得られたプロファイルを一階微分すればビームプロファイルを求めることができる (図 3-10(c))。水平・垂直のビームプロファイルを観察し、大きさ・形状に異変があれば、K-B ミラーを再調整する。ナイフエッジスキャンの際もフォーコートテストと同様に PD が破壊されないように XFEL パルスをアテネーターで十分に減衰させる。

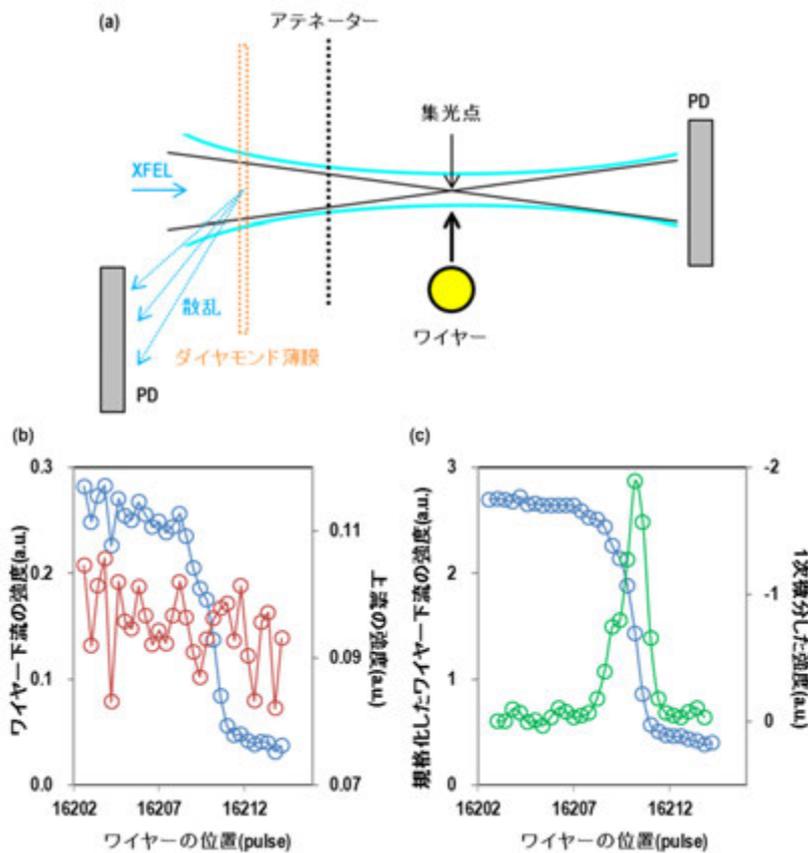


図 3-10 (a)ナイフエッジスキャンの模式図。(b)青色マーカーはワイヤー下流の光の強度である。XFEL パルスの強度は、パルス毎に大きく変動するため、揺らぎの大きいプロファイルが得られる。そこで、赤色マーカーのようにワイヤーより上流での強度をダイヤモンド薄膜から散乱した X 線強度を測定し [Tono *et al.*, 2013]、強度変動を規格化する。(c)上流の強度で規格化したワイヤー下流の強度 (青色マーカー) とこれを 1 次微分して得られたビームプロファイル(緑色マーカー)。

3.3.2 MPCCD 検出器

本研究では、Multi-Port Charge-Coupled Device (MPCCD)検出器[Kameshima *et al.*, 2014]を用いて回折パターンを記録した。試料を照射野に効率よく提供することができれば、MPCCD 検出器では、最大で 30 Hz のサイクルで回折強度を測定しなければならないため、1 枚の検出器センサに読み出しポートを 8 列備えて読み出しを高速化している。一枚の検出器パネルは、サイズは $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ のピクセルが 512×1024 pixels で構成される。1 pixel あたり、16 bit の精度で電荷を検出することができる [Kameshima *et al.*, 2014]。検出器の量子効率 4.5 keV で最も高く、波長の長い X 線を用いた方が S/N 比の良い回折強度測定が期待できる。

回折パターンは、この検出器センサを複数組み合わせさせた MPCCD Octal 検出器及び MPCCD Dual 検出器を用いて測定する (図 3-8)。MPCCD Octal 検出器は 8 枚の検出器パネルを用いて広い散乱角範囲を測定する。回折強度が強いと、CCD 半導体素子中で光電効果によって発生する電子が 1 pixel 内に蓄積できる量を超えてしまう(飽和)。飽和したピクセルで検出される電荷量は実際に入射された X 線光子数と相関がなくなるため、正確な強度は測定できない。MPCCD 検出器では $2,500 \text{ photons/pixel}$ (5.5 keV) 以上で飽和する。極小角の回折強度は特に強いいため、検出器の中心を開口とし、検出対象から除外している。開口サイズは最大 9 mm までの範囲で自由に変えることができる。開口を抜けた極小角領域の回折パターンは 2 枚の検出器パネルで構成される MPCCD Dual 検出器で記録する。広いダイナミックレンジを確保するため、MPCCD Dual 検出器前にアルミニウム製のアテネーターを設置し、回折強度を減衰させて検出器ピクセルの飽和を防ぐ。

1 枚のパネルあたり、 $512 \text{ pixels} \times 1024 \text{ pixels} \times 16 \text{ bit} = 1.0 \text{ Mbyte}$ のデータ量であり、回折パターンを記録する計 10 枚のパネルでは、 $1.0 \text{ Mbyte} \times 10 \text{ panels} = 10 \text{ Mbyte}$ になる。30 Hz でのデータ転送速度 $30 \text{ Hz} \times 10 \text{ Mbyte} = 300 \text{ Mbyte/s}$ が必要となるのに対して、SACLA でのデータ記録システムは、 $5 \text{ Gbit/s} = 625 \text{ Mbyte/s}$ の転送が可能である [Yamaga *et al.*, 2012]。転送後、16 bit のデータは、32 bit に変換され、SACLA のサーバーにストレージされる [Kameshima *et al.*, 2014]。

3.4 細胞試料の CXDI 実験に適した X 線波長

SACLA では、波長 $0.3 \sim 0.06 \text{ nm}$ (光子エネルギー: $4.0 \sim 20 \text{ keV}$) を選択できる。

ここでは、細胞等の生体試料に対する CXDI 実験に適した波長を検討する。検出器の各ピクセルで観測されることを考慮すると、回折強度 $I(\vec{S})$ は、

$$I(\vec{S}) = I_0 r_e^2 \frac{\lambda^2}{\sigma D} |F(\vec{S})|^2 \quad (3.12)$$

となり、入射強度 I_0 に比例し、X 線波長 λ の自乗に依存する [Oroguchi & Nakasako, 2013]。これに対し、MPCCD 検出器の量子効率、4.5 keV の X 線に対して最高となる(3.3.2 節)。また、細胞試料は自身の体積の 6 割以上の水を含んでいるため、水について吸収の影響を考慮しなければならない。試料に異常散乱原子が含まれない場合、吸収係数は波長 λ の三乗に比例して大きくなる [Als-Nielse & McMorro, 2011]。このように波長の長短を選択する上でトレードオフが存在する。上記の要因を検討し、また、ビームラインでの利用実績も含め、本研究では 5.5 keV (波長 0.23 nm) の XFEL を細胞の CXDI 実験に用いた。

5.5 keV X 線の大気圧での空気に対する線吸収係数は、およそ $3.6 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ と大きく [Hubbell & Seltzer, 1996]、大気中では X 線の吸収や散乱によって、観察できる回折パターンの S/N 比が大きく低下するため、CXDI 実験は真空中で行う必要がある。そのため、大気中の試料を真空中に搬送する技術、真空中での生物試料の水和環境保持等を担保する技術が必要となる。真空中への試料搬送技術の詳細については第四章で、真空中での回折実験を行うための試料調製については第五章で説明する。

第四章 クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の制御ソフトウェアの開発

XFEL-CXDI 実験において短時間に大量の回折パターンを測定することを目指して、理化学研究所の山本、慶應義塾大学の中迫と理学相原精機によって、クライオ試料固定照射装置「高砂六号」が設計・製作された。高砂六号は、XFEL パルスに対して薄膜試料を高速でラスターキャンするための並進ステージ及び高効率で試料交換を行うための機構が備わっており、大量の回折パターンを短時間で収集できると期待された。しかし、これらを効率的に機能させるためには、数十に及ぶステップングモーターや、X線強度モニター用の PIN photodiodeなどをまとめて制御するとともに、目的に応じて制御順序を管理しなければならない。本研究では、クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の実用化に不可欠な制御ソフトウェアの開発と実装を行い、動作試験を行いながら、目標とする照射装置の性能を達成した[Kobayashi *et al.*, 2016a]。本章では、まず装置構成について述べ、開発した制御ソフトウェアの詳細を説明する。

4.1 クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の開発経緯

クライオ試料固定照射装置は凍結水和試料を極低温に保ちつつ、X線照射野に位置決めし、回折パターンを測定する回折装置である。最初のクライオ試料固定照射装置は、SPring-8 において CXDI トモグラフィー実験を行うことを主たる目的として開発された「壽壺号」と呼ばれる装置であった[Nakasako *et al.*, 2013]。この装置では、精密位置調整ステージによって位置分解能 25 nm で試料の位置決めが行えるため、SPring-8 にて入射光の芯を正確に試料粒子に合わせることができる。また、極低温での測定中にもステージが振動しないため、長時間の露光中に照射野から試料が外れることなく回折パターンを測定することができた [Takayama & Nakasako, 2012; Nakasako *et al.*, 2013]。照射位置と試料の高い位置決め精度から、当初、SACLA での XFEL-CXDI 実験においても同装置を運用することとなったが、XFEL パルス 1 ショットで 20 μm の範囲にわたって試料が損傷されることが確認され、照射野に新鮮な試料を提供するために、次の照射までに 25 μm 試料を移動させる実験方式(ラスターキャン)が採用された。しかしながら、高い位置分解能を有するステージでは並進移動速度に限界があり、

SACLA では本来 XFEL パルスサイクルを 30 Hz で射出できるところを 1 ないし 2 Hz に間引いて実験せざるを得なかった。また、トモグラフィー用の試料散布薄膜の面積が小さく、さらに試料粒子が XFEL パルスの 1 ショット照射で壊されてしまうため、低温凍結試料の交換を頻繁にしなければならなかった。これらの問題点を解決して、XFEL パルスを可能な限り効率的に利用するためには、主に試料の高速並進移動、試料交換回数の低減などが不可欠であった。

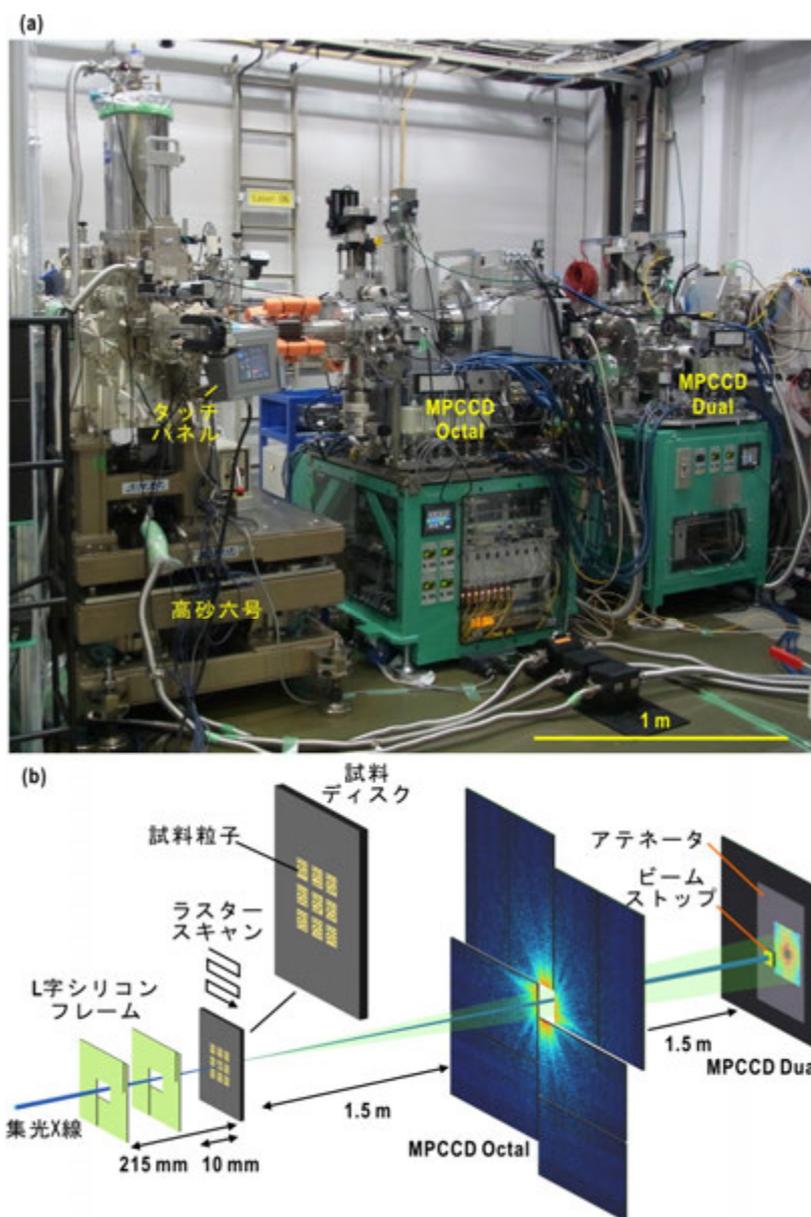


図 4-1 実験ハッチ内の写真(a)と高砂六号を用いた CXDI 実験の模式図(b)

4.2 クライオ試料固定照射装置「高砂六号」の構成

図 4-2 に装置構成の模式図を示す。主な構成要素は、低温凍結試料の温度保持用液体窒素溜りポット、低温ポットを搭載して高速ラスタースキャンを可能とするための高速並進移動ステージ、凍結水和試料を機械的に真空層へ搬入するための試料ホルダー、12個の試料ホルダーを一度に搬送するためのカセットコンテナ、カセットコンテナを大気中から真空槽に移動させるための専用のキャリア及びロードロック・チャンバー、光軸に対する光学系の位置調整に用いる精密定盤、寄生散乱を除去するためのスリット、PIN photodiode (PD)、望遠鏡である。

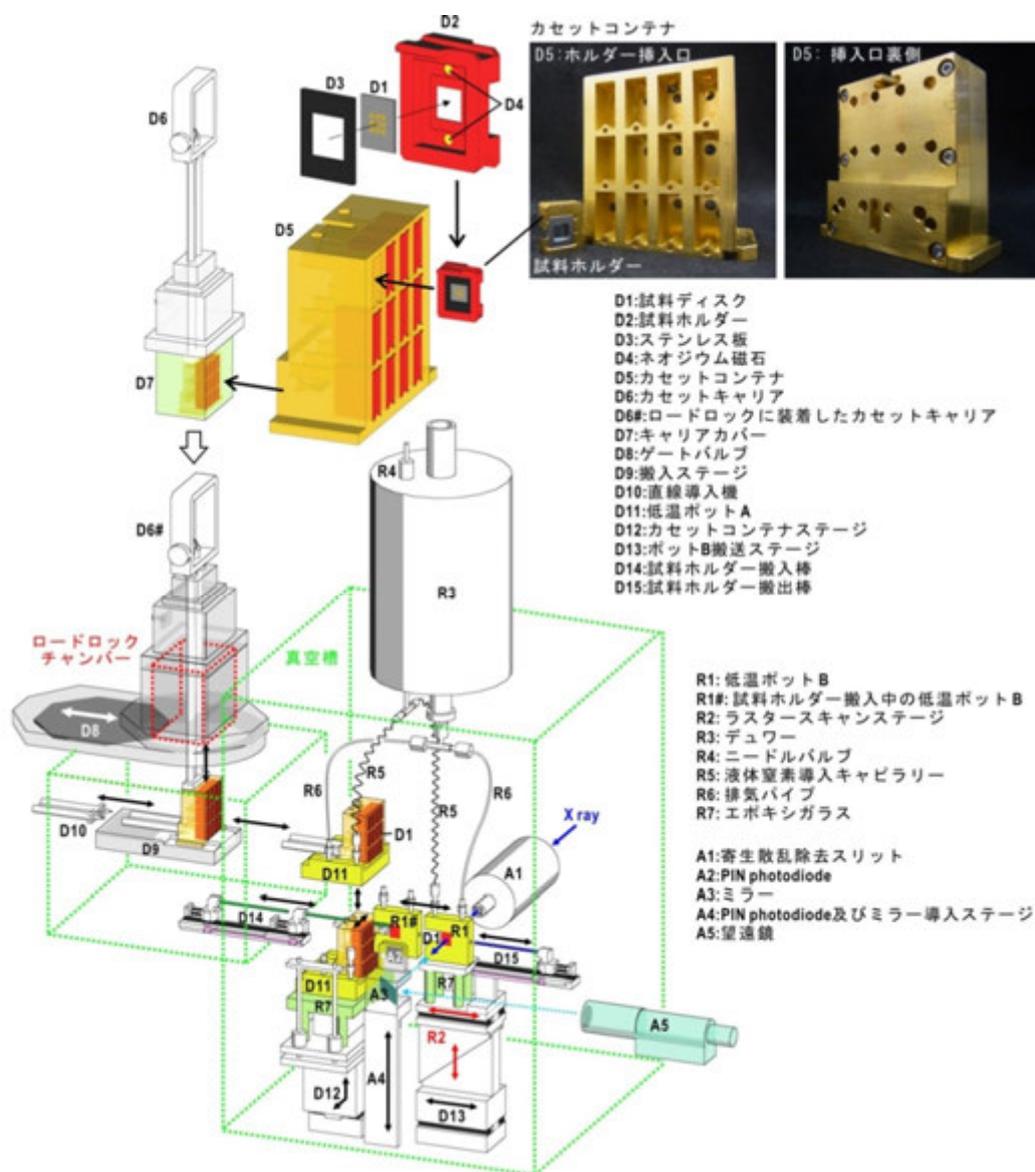


図 4-2 高砂六号を構成する装置の模式図

4.2.1 凍結水和試料を運搬するための試料ホルダー

試料ディスクは試験的な計測の際には、クライオ電子顕微鏡で用いられるフレームサイズ 3 mm ϕ に支持される薄膜を用いている (図 4-3(a))。さらに、一回のラスタースキャンで大量の回折パターンを測定するために、フレームサイズ 10 \times 8 mm 2 、膜サイズ 1 \times 1 mm 2 、膜厚 100 nm の窒化シリコン膜が 9 窓ある大面積試料ディスクを設計・製作した(図 4-3(b), Norcada, Canada)。これらの上に試料粒子を散布し、液体エタンを用いて急速凍結する。薄膜及び試料調整方法については、第五章で詳細を述べる。

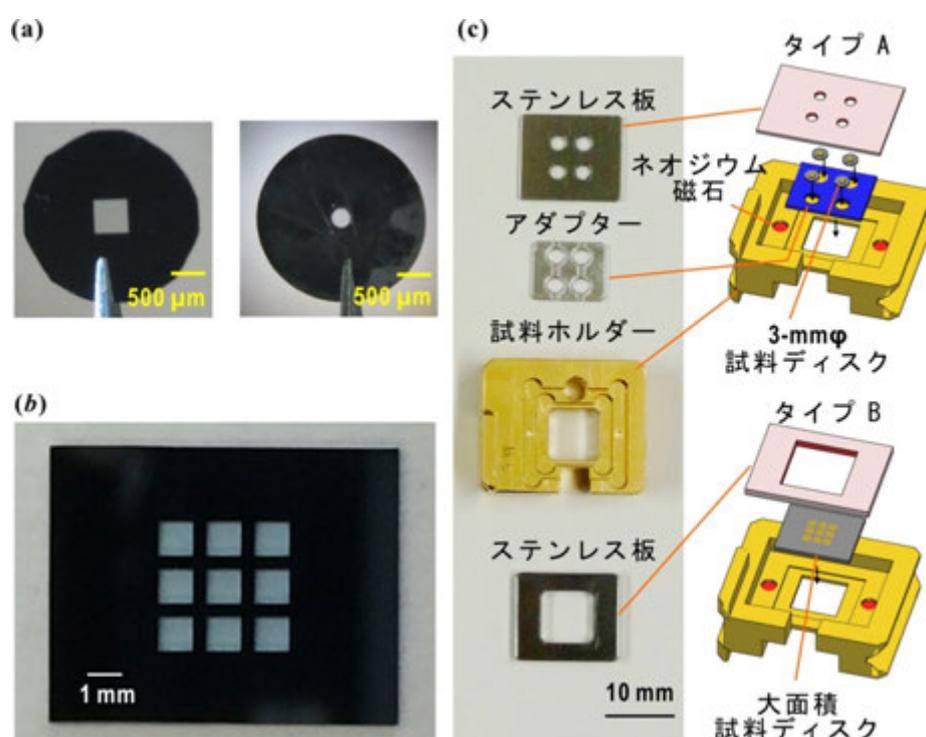


図 4-3 (a)3 mm ϕ の大きさの試料ディスク。左はシリコン製フレームに張られた 500 \times 500 μm^2 の窒化シリコン膜(Norcada, Canada)、右はモリブデン製フレーム(Okenshoji, Japan)に張られた 300 $\mu\text{m}\phi$ の炭素膜である。(b) 1 \times 1 mm 2 の窒化シリコン膜が 9 窓ある大面積試料ディスク (c) 3 mm ϕ の大きさの試料ディスクを固定する試料ホルダー4 を一括して固定する試料ホルダー(上、タイプ A)と大面積試料ディスクを固定する試料ホルダー(下、タイプ B)。タイプ A、タイプ B は同じ型の試料ホルダーで、アダプターを付け替えて使用する。

急速凍結した試料ディスクは回折実験の前に、専用の試料ホルダーに装着する。試料ホルダーは、壽壺号のものを参考に、本研究でホルダー設置部分を新たに設計した。試料ホルダーは、熱伝導率の高い無酸素銅からの切削加工によって製作し、酸化を防ぐために金メッキを施している。図 4-3(c)で示されるタイプ A の試料ホルダーでは、四穴のアダプターを用いて、3 mm ϕ の試料ディスクを四つ装着する。試料ホルダーの内部には 1.5 mm ϕ ×3 mm のネオジウム磁石が二つ埋め込まれており、これらの磁力と 7×7 mm² のステンレス鋼の板を用いて試料ディスクを固定する。大面積試料ディスクも磁力による固定によって試料ホルダーに装着する (図 4-3(c)、タイプ B)。

装着の操作は温度上昇・大気中の水分の付着を防ぐため、液体窒素中で、十分に冷却したピンセットで取り扱う。この際、ネオジウム磁石による固定は非常に容易であり、試料ディスク 1 枚につき 15 秒ほどの短時間で装着作業を完了することができる。

4.2.2 低温ポット

凍結水和試料を低温に保つために、高砂六号の真空層内には二つの低温ポットが搭載されている。一つは、カセットコンテナを、もう一つはカセットコンテナから搬出された試料ホルダーを冷却するために用いる。ここでは、前者を低温ポット A、後者を低温ポット B と呼ぶことにする (図 4-4)。ポット内部には容量 7 mL の空洞があり真空層上部に設置したデュワー(容量 6 L, Cryo Industry, USA)からキャピラリーを通して液体窒素を供給し貯めることができる。ポット内の空洞は、排気パイプを介して接続されたスクロールポンプによって 10⁻¹ Pa に減圧され、蒸発冷却効果や沸点降下によって低温ポットは 66 K にまで冷却される。低温ポットは、試料ホルダーと同じく金メッキを施した無酸素銅製であり、ポットに接触するカセットコンテナ及び試料ホルダーも 100 K 以下に維持することができる。

液体窒素の消費率は、二つの低温ポットを冷却し続けた場合に 0.45 L/h である。低温ポットの温度は、表面に接続した熱電対によってモニターする。両低温ポットは、デュワーに液体窒素充填を開始してから 2 時間以内に 77 K 以下に冷却することができる。その後、7~10 時間毎にデュワーへの液体窒素補充を行えば、3 日以上低温に維持することができる。

低温ポット A の下部にはカセットを搬送・搬出するための並進ステージ、低温ポット B の下部には高速ラスタースキャンを行うための並進ステージが備わっている。これらのステージからの熱伝導を防ぐためにステージとの間に断熱材としてエポキシガ

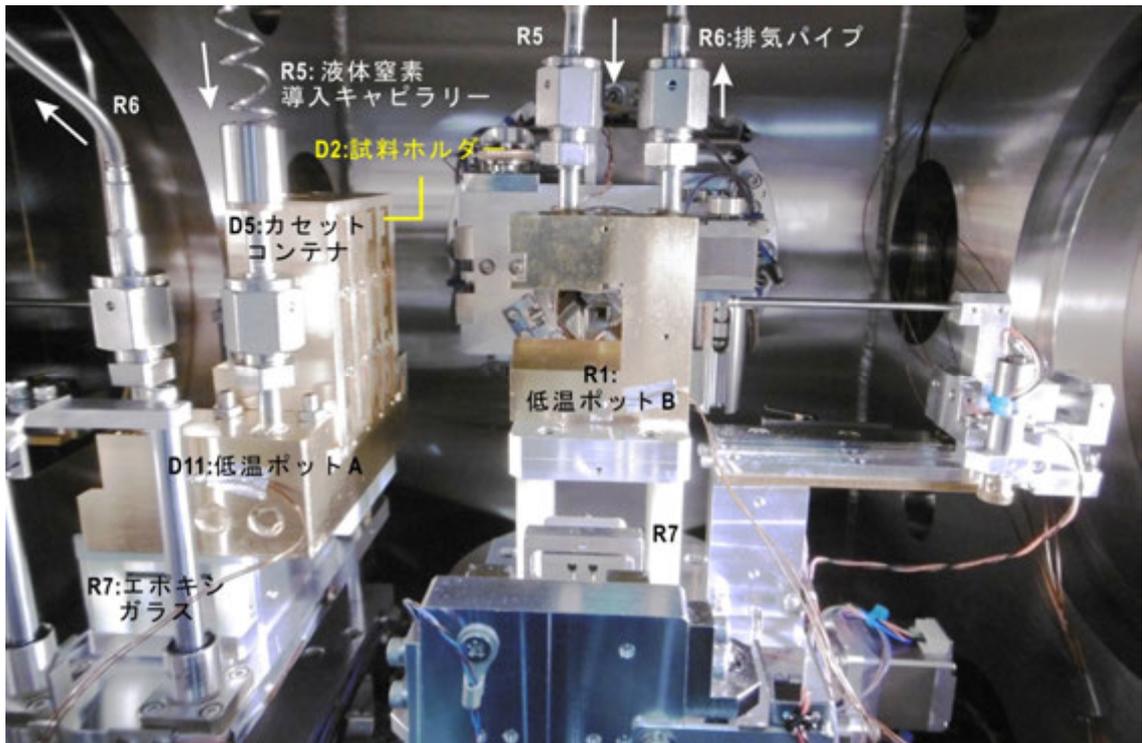


図 4-4 真空槽内部の写真。アルファベット記号は図 4-2 と同じである。

ラス製の板（低温ポット A 下部）及び四本の柱（低温ポット B 下部）が設けてられている。

なお、低温ポットは、理化学研究所の山本と慶應義塾大学の中迫が設計し、理学相原精機によって製作された。冷却試験は理化学研究所の高山が実施した。

4.2.3 高速ラスタースキャンステージ

ラスタースキャンでは、XFEL パルスが 1 ショット照射された後、そこから 25 μm 離れた次の照射位置へ試料ディスクを並進させるという操作を繰り返す。高砂六号では、まず水平方向にスキャンし、垂直方向に 1 ステップ(25 μm)だけ並進した後、水平方向スキャンを再開するという方式を採用している。SACLA では 30 Hz のサイクルで XFEL パルスが照射されるため、試料ディスクを 25 $\mu\text{m}/33 \text{ ms}$ (= 758 $\mu\text{m}/\text{s}$)で停止及び並進を実行しなければならない。高砂六号には、この並進速度を達成するために高速並進ステージが搭載されている（図 4-5(a)）。以降、このステージを高速ラスタースキャンと呼ぶ。

水平方向の並進ではボールガイドで動作方向を定めたステージをステッピングモーターで動作させる。水平方向ステージは、30 mm の動作範囲を位置分解能 0.2 μm 、最

高速度 6 mm/s で動作させることができる。水平方向ステージの下部には、傾斜のあるブロックがあり、これをステッピングモーターで水平方向に押し出すことで垂直方向の並進が行われる。垂直方向ステージは、動作範囲が 10 mm で、位置分解能は 0.27 μm 、最高速度は 3 mm/s である。

なお、高速ラスタースキャンステージの設計及び製作は、理化学研究所の山本と理学相原精機によって行われた。

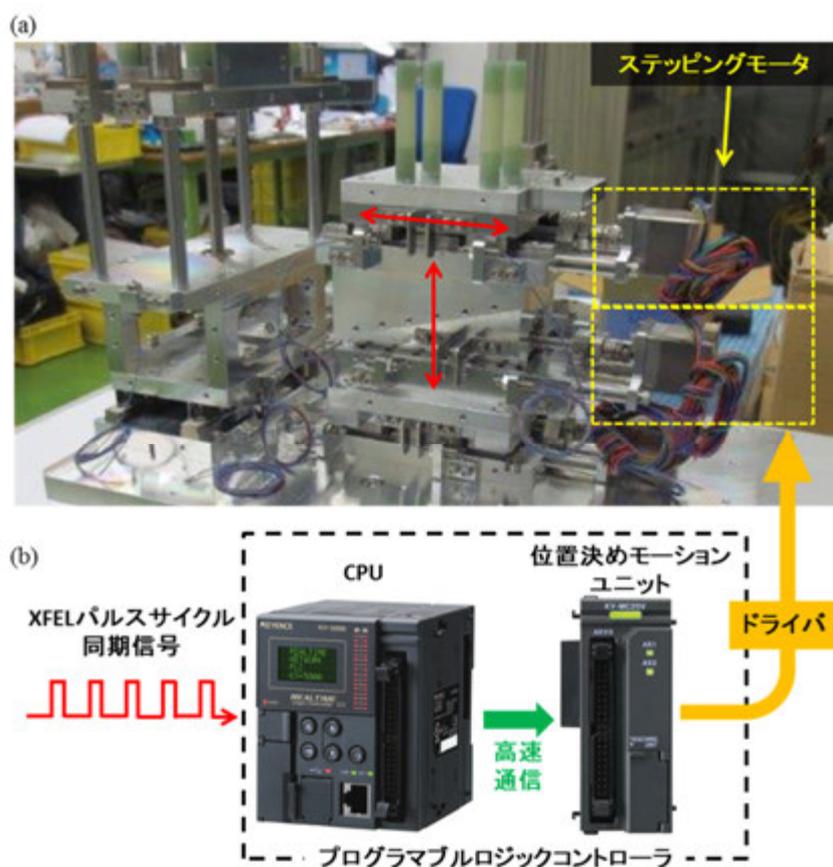


図 4-5 高砂六号の高速ラスタースキャンステージ。(a)真空槽に設置する前に撮影した高速ラスタースキャンステージの写真。動作方向(赤色矢印)に 2 つのステッピングモーターで駆動させる。(b)プログラマブルロジックコントローラ(PLC)を用いた低温ポッドステージ制御システムの概念図。XFEL パルスサイクル同期信号をイベントトリガーとしてコントローラに入力すると内部の CPU に実装された制御プログラムから位置決めモーションユニットに並進命令が送られ、制御シーケンスが実行される。ドライバがステッピングモーターにパルス信号を発信することでラスタースキャンステージが動作する。

4.2.4 プログラマブルロジックコントローラー

前節で説明したような高速ラスタースキャンを行うためには、ステージの性能だけではなく、XFEL パルスサイクル同期信号 30 Hz のイベントトリガーに対応した高速応答性も重要である。この場合、応答性とは、イベントトリガーの受信からドライバへ動作命令が発動するまでに要する時間を指す。この時間が $(30 \text{ Hz})^{-1} = 33 \text{ ms}$ より遅いと動作する前に次のイベントトリガーを取りこぼすことになる。このような事態をさけるため、高砂六号では、応答性に優れたプログラマブルロジックコントローラー (Programmable Logic Controller: PLC) が採用された (図 4-5(b))。

PLC は、独立した Central Processing Unit (CPU) を持っており、ラダー言語 KV STUDIO (KEYENCE, USA) で記述される制御プログラムを実装することで、他のコンピュータシステムを介することなく、単独で制御シーケンスを実行することができる。その結果、制御システムと実行回路との通信によるタイムラグがなくなる。さらに、ラスタースキャン・パスウェイの各並進ステージ座標とステッピングモーターの駆動条件 (加速度、走査速度、減速度など) を予め記録する位置決めモーション・ユニットが付属しており、ドライバに送る命令言語を移動毎に一つずつ組む手間が省かれる。高砂六号のラスタースキャン制御に用いられている PLC の CPU (KV-5000, KEYENCE, USA) と位置決めモーション・ユニット (KV-MC20V, KEYENCE, USA) の性能を表 4-1 に示す。この環境では、ラスタースキャン 1 ステップの命令をドライバに送るために約 650 μs の時間を要する。これは約 1,500 Hz の応答周波数に相当する。従って、SACLA のパルスサイクル 30 Hz に余裕をもって対応できる。これにドライバのパルス発信周波数 $500 \times 10^3 \text{ pulse/s}$ を加味すれば、最大で約 10 cm/s の速度が達成されるが、実際には供給される電力や回転角分解能によってステッピングモーターの駆動力が制限されるため困難である。高砂で用いるラスタースキャンステージであれば、設計上最大で 50 $\mu\text{m}/33 \text{ ms}$ の速度を達成できることが確認されている。即ち、パルスサイクル 30 Hz で、試料が損傷を受ける範囲より十分照射野を離れたラスタースキャン幅 25 μm の運転は十分に可能である。

表 4-1 高砂六号に用いられている PLC(KV-5000)の CPU 及び位置決めモーションユニット(KV-MC20V)の性能

CPU	
イベントトリガー入力応答周波数	100 kHz
制御シーケンス実行速度	6×10^4 steps/ms
実装シーケンス数	26×10^4 steps
位置決めモーション・ユニット	
入力応答時間	25 μ s
起動時間	0.6 ms
出力応答時間	10 μ s

4.2.5 試料ホルダーの真空槽への搬送機構

試料ディスクを装填した試料ホルダーは、装填場所である液体窒素中から高砂六号真空槽へ搬送する。この搬送機構は、中迫が壽壺号で採用したロードロック・チャンバー方式を拡張したもので、理化学研究所の山本と慶應義塾大学の中迫によって発案され、理学相原精機が設計・製作を行った。

まず、液体窒素中で試料ホルダーをカセットコンテナに装填する。カセットコンテナには、V字型のガイドがついた穴が設けられており、この穴に試料ホルダーをわずかなあそびを残して滑らかに挿入することができる。カセットコンテナには、最大で 12 個装填することが可能で、一度に大量の試料を真空槽へ搬送することができる。液体窒素中でのピンセットを用いての試料ホルダーの装填は容易で、6 分程度で 12 個の試料ホルダーを全てカセットコンテナに装填することができる。

液体窒素からカセットコンテナ引き上げて運搬する際には、専用のキャリアを用いる。このキャリアには、先端にガイドとなる針と鍵がついた導入棒があり、これがカセットコンテナの上部にあいた穴に合致し、鍵が回転することで保持することができる。保持されたカセットコンテナは上方に引き上げることができる (図 4-6)。引き上げと同時にカセットコンテナは、キャリアのカバーの中に収まるので、速やかに操作すれば、大気との接触による温度上昇・水分の付着を防ぐことができる。以上の行程は、約 3 分あれば、完了することができる。

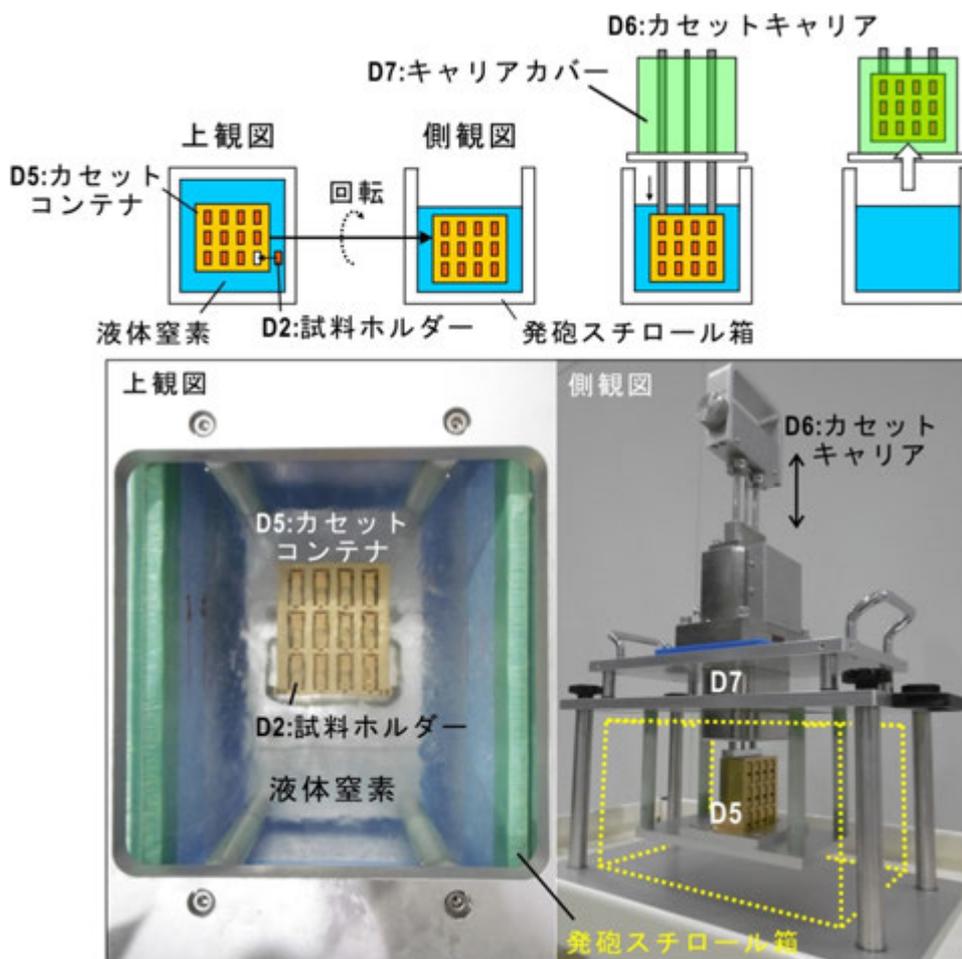


図 4-6 キャリアによるカセットの引き上げ。アルファベット記号は図 4-2 と同じである。

図 4-7(a)に真空槽への搬送の凡その手順を示す。カセットコンテナを真空槽に導入する際には、まずスクロールポンプに接続したロードロック・チャンバーまでキャリアを運搬し、キャリアのカバー内を真空引きする。真空度が 10^{-2} Pa まで達したらメインの真空槽とを隔てるゲートバルブを開き、搬入ステージまでカセットコンテナを下ろし、鍵を解除し、導入棒をカバーまで回収する (図 4-7(b))。カセットコンテナは水平方向に動作する直線導入機によって、低温ポット A まで搬送される。直線導入機の先端にもキャリアと同様のガイド針と鍵がついており、カセットコンテナ側面に空いた穴と合致させることでカセットコンテナを保持することができる。また、搬入ステージと低温ポット A に備えられたストッパーが直線導入機の先端が出入される際にカセットコンテナを固定し、運搬路からの脱線を防ぐ。ストッパーはラッチになっており、直線導入機の鍵と同期させることで、カセットコンテナを持ちだす際には解除することができる。

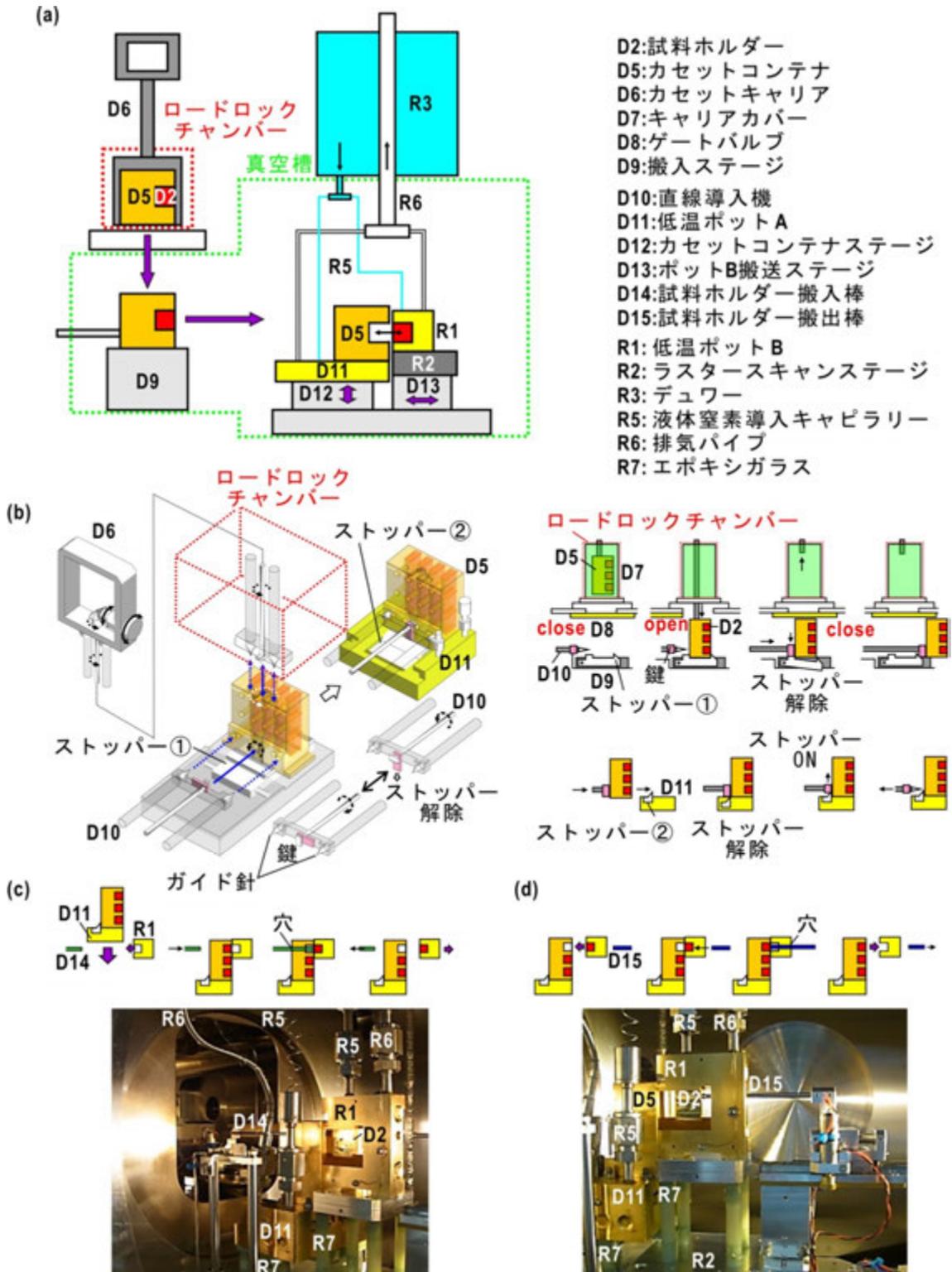


図 4-7 試料の真空槽への搬入。(a) 搬入の手順。アルファベット記号は図 4-2 と同じである。(b) カセットコンテナの搬入ステージから低温ポット A への搬送。(c) 試料ホルダーの低温ポット B への搬送。(d) 試料ホルダーの回収。

次に試料ホルダーをカセットコンテナから低温ポット B へ搬送する (図 4-7(c))。低温ポット B はコの字型をしており、カセットコンテナの試料ホルダーを収める穴と同じ V 字型のガイドに沿って試料ホルダーが収まる。まず、カセットコンテナを乗せた低温ポット A 下部のステージとラスタースキャンを行う高速ステージ下部のステージを用いて、カセットコンテナ内の目的の試料ホルダー一つに低温ポット B の位置を合わせる。その後、カセットコンテナに空いた穴を通して棒で押し出すことで試料ホルダーを低温ポット B へ搬送する。ラスタースキャンが終了したら、低温ポット B に空いた穴を通して棒で押し戻すことで試料ホルダーをカセットコンテナへ回収する (図 4-7(d))。これを 12 個の試料ホルダーについてそれぞれ行う。

表 4-3 に試料搬送に要する時間を示す。回折パターン収集時の時間を除けば、12 個の試料ホルダーを低温ポット B へ搬送に要する時間は約 25 分になる。

表 4-3 試料ディスクの真空槽への搬送に要する時間

作業名	所要時間(s)
キャリアを用いてカセットコンテナをロードロック・チャンバーに設置(図 4-7(b))	30
カセットコンテナを低温ポット A へ搬送 (図 4-7(b))	30
1 つの試料ホルダーを低温ポット B へ搬入または搬出 (図 4-7(c), (d))	60

4.2.6 試料ホルダーの位置決め機構

低温ポット B の X 線光路下流に PIN photodiode (PD) とミラーを導入する垂直並進ステージが備わっている。PD はクーロン爆発によって破壊されないように、ビームラインに設置された減衰板を用いて十分に減衰した XFEL パルスの強度を測定する。主に、低温ポット B に金ワイヤーを搬入し、ナイフエッジスキャンする際に用いる。ミラーを光路に設置すれば、反射によって低温ポット B に搬入した試料ディスクを望遠鏡(UWZ400F, Union Optical, Japan)によって観察することができる (図 4-8)。望遠鏡には倍率調整ステージが備えられており、低倍率で試料ディスクの全体像を観察することが可能で、高倍率では最高分解能 7 μm で観察することができる。

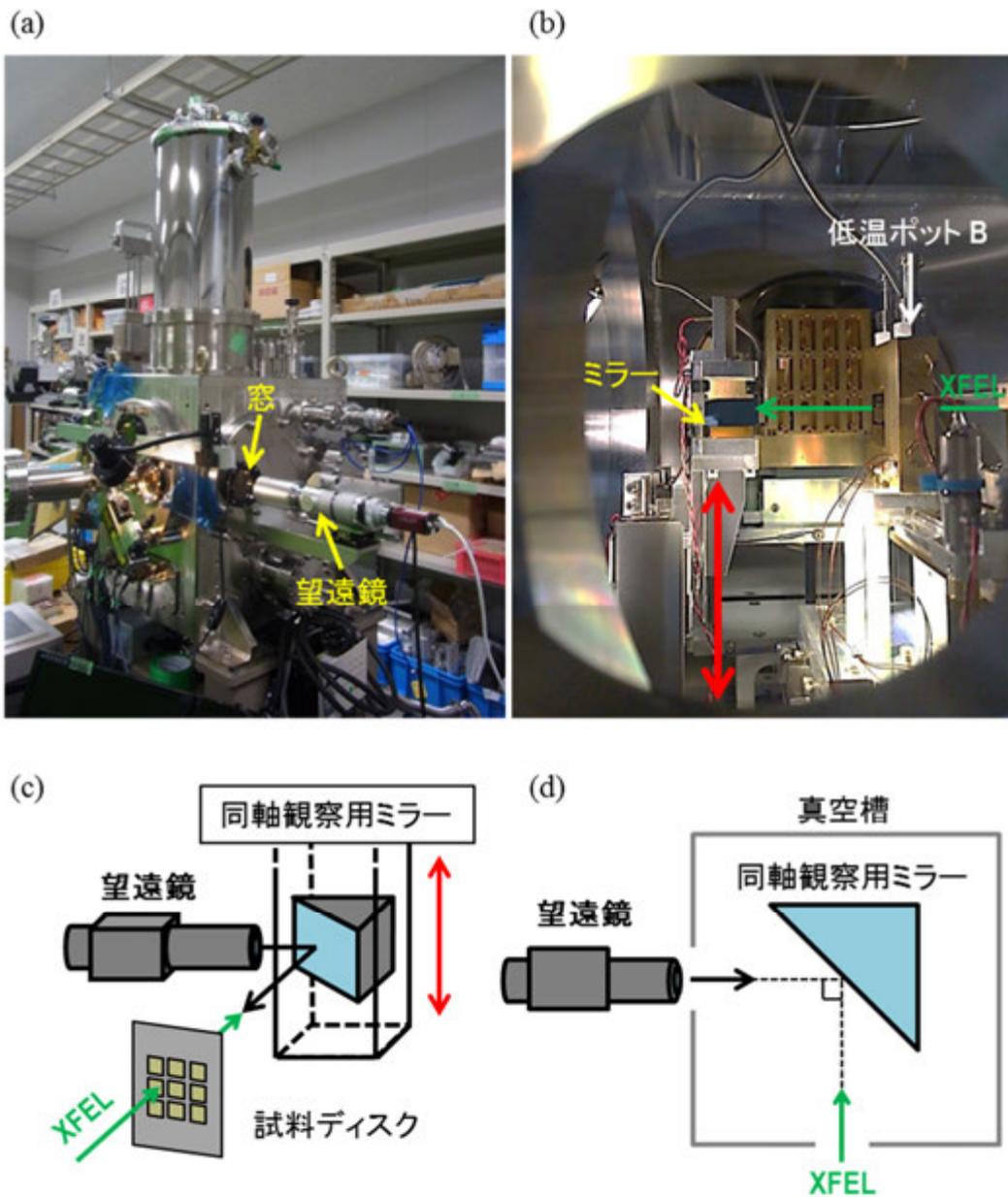


図 4-8 望遠鏡による試料ディスクの観察。(a)真空槽外部より撮影した望遠鏡。真空槽に設けられた窓から内部を観察する。図の左方向が下流側になる。(b)(a)の窓より撮影した写真。望遠鏡の観察方向には、光学ミラーが斜め 45°に配置されており試料ポット側、即ち XFEL 下流側から光軸に沿って観察することができる。(c)望遠鏡観察を表した模式図。試料ディスクを観察するときは、XFEL 光軸(緑色矢印)と同軸観察することが可能。(d)は(c)の様子を、真空槽直上より見た図である。

4.2.7 寄生散乱除去スリット

XFEL 集光点から上流に設けた二組の L 字シリコンフレームを用いて、上流の光学系からの回折光など試料からの回折パターンを乱す寄生散乱を除去している（図 4-9(a)）。フレームの素材であるシリコンは、本研究における CXDI 実験で用いる 5.5 keV の X 線に対する散乱能は小さく、また、十分に吸収することができる。二つの L 字フレームは光軸方向からみて直交するように配置され、スリットを構成しており、上下左右からフレームを光軸に接近させる（図 4-1）。合計 4 つの L 字フレームはそれぞれステッピングモーターで駆動するステージによって水平・垂直方向に位置分解能 40 nm で並進することができる。フレームの厚みは、最大で 500 μm であり、先端に向かうほど傾斜 (35.3°) によって薄くなる。1 組のスリットは試料位置から 10 mm 上流であり、 ± 30 mm の焦点深度内に配置した (4-9(b))。もう一組は、試料位置から 215 mm 上流に配置した。

二組の L 字フレームの大きさや配置は、壽壺号で使用したものを応用した。スリットは慶應義塾大学の中迫によって設計され、購入したシリコンフレームの切削加工は株式会社ディスコで行われた。スリットを動作させるステージは、壽壺号と高砂六号用に理化学研究所の山本と中迫によって基本設計がなされ、理学相原精機で設計・製作された。

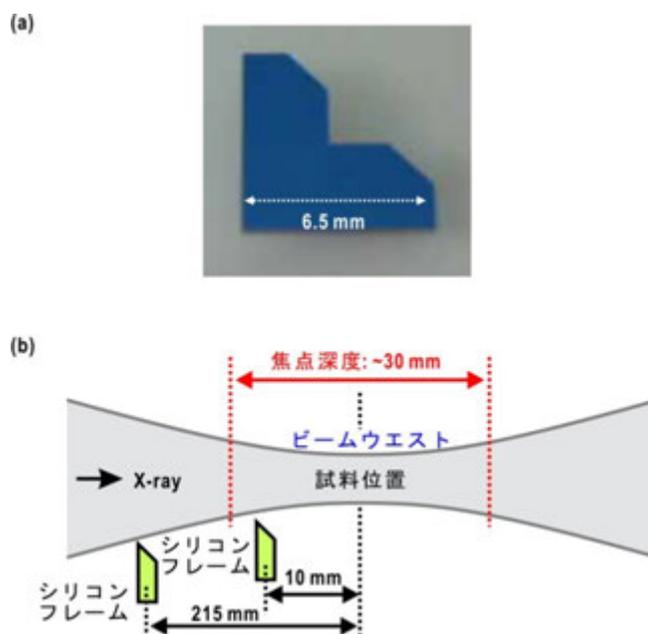


図 4-9 寄生散乱除去スリット (a) L 字シリコンフレームの写真
(b) 試料位置に対する L 字シリコンフレームの配置。

4.2.8 精密定盤

精密定盤を用いて、ラスタースキャンステージの動作範囲のおおよそ中心に XFEL パルスが通過するように真空槽の位置を制御する。精密定盤は、山本によって概念設計され神津精機で製作された壽壱号のものを踏襲して、理学相原精機で製作された。精密定盤は、二つの鉛直動作軸と、水平動作軸および回転動作軸で構成される。二つの鉛直動作軸は真空槽の上流・下流に1つずつ配置されており、動作範囲 40 mm を 0.3 μm の位置分解能で動作する。二つを同期して動作させることで高さを調節し、それぞれ独立で動作させることでステージスキャン平面と X 線光軸について、鉛直方向の直交性を調節することができる。水平動作軸は動作範囲 40 mm を 1 μm の位置分解能で動作できる。回転ステージは、ステージスキャン平面と X 線光軸について、水平方向の直交性を 4°の動作範囲で 0.0001°の分解能で調整する。

4.3 制御ソフトウェア

4.2 節で述べたように高砂六号には、XFEL-CXDI 実験を行う上で優れたハードウェアが搭載されている。しかしながら、高砂六号のハードウェアは 23 個のステップングモーターで作動する並進・回転ステージ、PD、望遠鏡などの制御器・計測器で構成されており、これらを有機的に連携させながら動作させないかぎり、効率的な XFEL-CXDI 実験の実現は困難である。また、装置単体の制御に加えて XFEL パルス制御システムなど、SACLA 施設側の装置に関する制御・通信が必要となるため、制御信号の取り扱いは、さらに複雑になる。また、XFEL-CXDI 実験では、高砂六号を鉛製の防御壁で覆われた実験ハッチ内に搬入し、X 線使用時には外部から操作しなければならない(図 4-10(a), (b))。本研究では、これらのハードウェアの十分に活用するために、多数の制御器・計測器をまとめて管理する制御ソフトウェアを開発した。また、煩雑な操作を要求しないユーザーフレンドリーな GUI(Graphical user interface) を目指した。

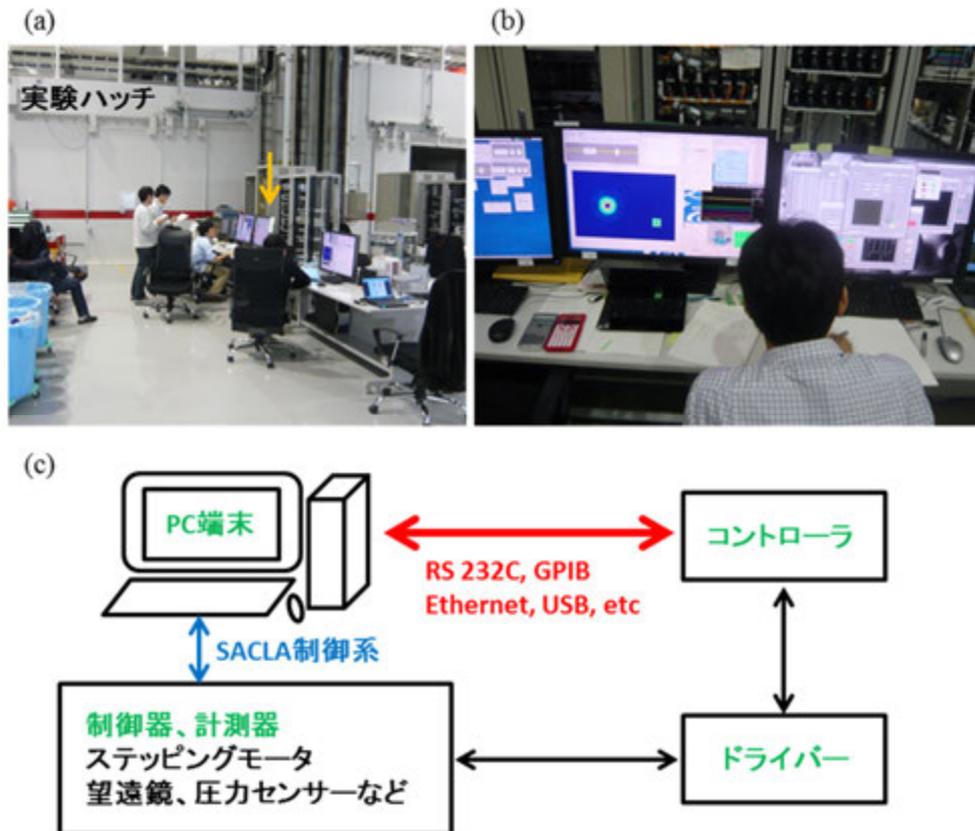


図 4-10 (a)SACLA での XFEL-CXDI 実験の様子。(b)(a)の橙色矢印にある制御 PC 端末。実験者は XFEL を実験ハッチ内に通すときはここで計測を行う。(c) 矢印で示した通信部は機器によってさまざまな規格を採用されているが、赤色矢印で示した PC とコントローラの通信部は、近年のどの PC にもコネクタ接続できるように整理されている。青色矢印は SACLA で管理されている制御系と通信を示す。

4.3.1 制御システム構成

図 4-10(c) に制御器を動作させるまでの通信経路を示す。ユーザーがパーソナルコンピュータ(PC)などのインターフェースから制御器あるいは計測器へ働きかける際には、必ずコントローラと呼ばれる制御回路を仲介する。コントローラは、インターフェースから送信したコマンドを機械語に翻訳し、ドライバに送る。ドライバは受け取った機械語に従って制御部に電圧パルスを供給し、駆動させる。また、制御部の状態をコントローラにフィードバックし、それを実験者がインターフェースを通して受信することもできる。PC・コントローラ間の通信規格は、コントローラとの相性や通信頻度によって適切なものを選択する。SACLA における実験では、高砂六号以外のビー

ムライン上の光学機器を操作するため、施設が管理する制御系に対してネットワークを介して信号を送受信する。

複雑な制御が必要となる状況は大きく二つに分けることができる。一つは、カセットコンテナを真空槽へ搬送・搬出するときである。このときの作業場所は、実験ハッチ内の装置の近くになる。凍結試料の場合、手早く真空槽へ移さなければならないため、PC 端末より扱いやすく、かつ作業スペースの確保が簡易なコンパクトなインターフェースが望ましい。高砂六号では試料ホルダー搬送・搬出にタッチパネル式インターフェース(Digital Electronics Corporation, Japan)が採用された。もう一つの状況は、ナイフエッジスキャンやラスタースキャンなど XFEL パルスを高砂六号に通して、光源調整や回折パターン収集を行うときである。このときは、実験ハッチ外の PC 端末より制御を行う。

高砂六号で用いるインターフェースから制御部までの制御システム構成を図 4-11 に示す。本研究で開発した制御ソフトウェア名は、多数の制御器を扱い、大量の回折パターンを収集することを目的とするため、“千手”とした。制御ソフトウェアは大きく分けて4つのサブプログラムで構成される(千手-1, -2, -3, -4)。千手-1は、PM16C-04XDL コントローラー(Tsuji denshi, Japan)を介して高砂六号内にある光学素子の位置を制御する。PM16C-04XDL は、専用のコマンドを送受信することで、ステッピングモーターのモーションコントロールを行うことができる。千手-1によって制御されるデバイスは、寄生散乱除去スリット、望遠鏡倍率調整軸、精密定盤、PD 及びミラー導入ステージである。千手-2, -3, -4 では、二つの PLC, KV-5500 及び KV-5000(KEYENCE, USA)を仲介して、カセットコンテナ・試料ホルダーを搬入出する並進ステージ群とラスタースキャンステージを制御する。

KV5500 は、カセットコンテナをロードロック・チャンバーから低温ポット A へ搬入出及び、試料ホルダーのカセットコンテナから低温ポット B への搬入出を制御する。千手-2 は、実験ハッチ外の PC から KV5500 のラダープログラムを呼び出し、それぞれのシーケンスを実行することができる。実験ハッチ内のタッチパネルからもシーケンスのステータスを確認しながら実行することができる。なお、ラダープログラムは理学相原精機によって作成された。

高速並進ステージによるラスタースキャンは、KV5000 によって制御される。千手-3 では、試料ディスクの望遠鏡観察によって指定した範囲についてスキャン座標を計算し、KV5500 に入力する。ラスタースキャンは、SACLA 制御系から出力される XFEL パル

スと同期したイベントトリガーが KV5500 に入力されることで始まる。

千手-4 では、KV5500 を介してワイヤーを乗せたラスタースキャンステージを制御し、ワイヤーによって遮られる XFEL パルスの強度を PD のシグナルとして受信することでナイフエッジスキャンを行う。

制御 PC と PM16C-04XDL コントローラーの通信では GPIB-USB^{*1} を、KV5000 及び KV5500、SACLA 制御系、望遠鏡画像を PC 端末で表示するための CCD カメラ (Manta G-125B, Allied Vision Technologies, USA) との通信では Ethernet^{*2} を採用している。

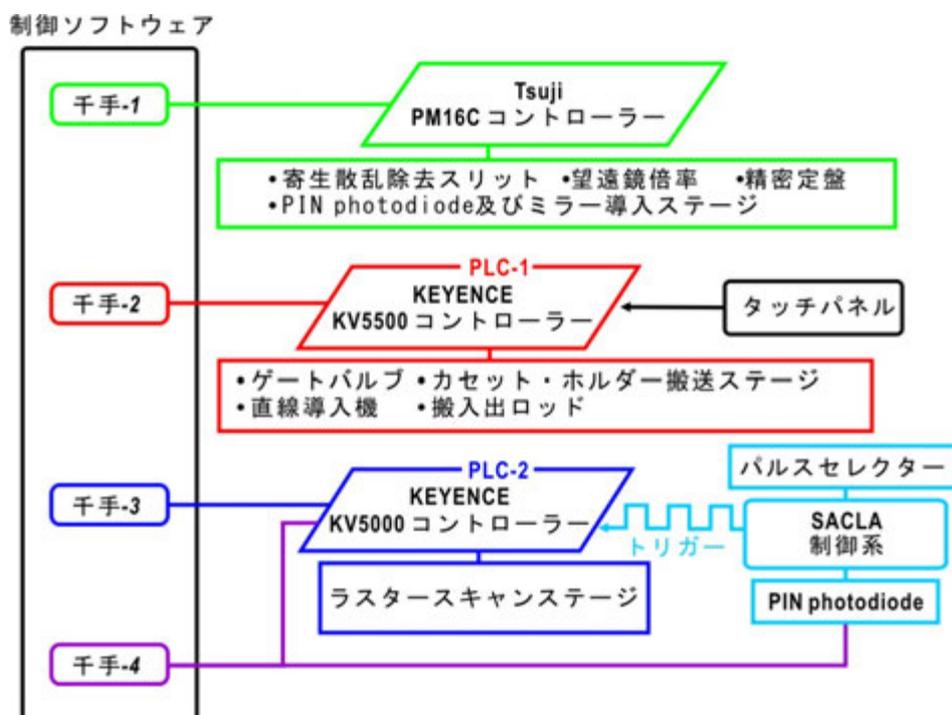


図 4-11 制御ソフトウェア・コントローラー・制御器・測定器間の制御システム構成

^{*1} GPIB は、General Purpose Interface Bus の略称。8 bit の並列伝送が可能で、比較的高速に通信を行うことができる。一台の PC で複数の機器を制御可能。USB は Universal Serial Bus の略称で、ホストとなる機器とその周辺機器とのデータ転送が容易に行える。GPIB-USB は、GPIB のコネクタが PC になくても GPIB 通信が行える点で利便性が高い。

^{*2} LAN(Local Area Network の略)で最も使用されている。高速通信で最大で 100 Gbps の規格もある。制御器どうしのネットワーク構築が簡単。

4.3.2 開発環境

ほとんどの計測・制御ハードウェアには、専用のソフトウェアまたは制御コマンドが付属している場合が多く、それらは指定のデバイスにしか対応していない。高砂六号の制御システム構成においては、PLC(KV5500, KV5000)のみに対応したラダー言語 KV STUDIO で実装されたソフトウェア、PM16C-04XDL の専用コマンド等がこれに相当する。さらに、SACLA 制御系で管理されるデバイスは、施設側から提供される API(Application Programming Interface)を介して制御しなければならない。これらをまとめて管理し、複数のハードウェアを同時に制御するために、開発言語 LabVIEW(Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench, National Instruments, USA)を用いた制御ソフトウェア開発を行うことにした。LabVIEW は、さまざまなドライバソフトウェアを扱っており、データ集録デバイス、スタンドアロン計測器、モジュール式計測器、モーションコントローラーとモータードライバ、画像処理ハードウェアなど複数のタイプの計測器、バス、センサーをシームレスに統合することができる。Fortran や C のように“テキスト“によってプログラミングを行うのではなく、任意の演算を行う関数がアイコンとして用意されており、これらをグラフィカルに”配線“し、ワークフローを作成することでプログラミングがなされる。Graphical user interface (GUI)の作成はワークフローと同時進行で作成することができる。このようなグラフィカルプログラミングが行える言語は G 言語と呼ばれる。G 言語ではグラフィカルアイコンを配線するだけで、データタイプやループ、イベント処理、変数、再帰呼び出し、オブジェクト指向プログラミングなど基準構造を一括して構築することができるため、テキストベースのプログラミング言語より高水準言語といえる。

図 4-12 に PC 端末側の制御ソフトウェアのプログラム構成を示す。LabVIEW で実装したソフトウェアから PLC 内のラダープログラムを呼び出す際には、KV COM+ Library(KEYENCE, USA)を用いる。KV COM+ Library は、PC 端末から PLC のメモリー領域にアクセスするためのプラグイン用のライブラリである。ラダープログラムによって指定されたメモリー領域には、ラスターキャンステージの座標情報や実行・停止フラグが格納されており、これを PC 端末から読み書きすることで、ラダープログラムに従ったシーケンスを実行することができる。PM16C-04XDL へのコマンド送受信は、LabVIEW に標準で用意されている GPIB 関数を利用した。望遠鏡の CCD カメラとは、ドライバソフトウェア NI Vision Acquisition Software(National Instruments,

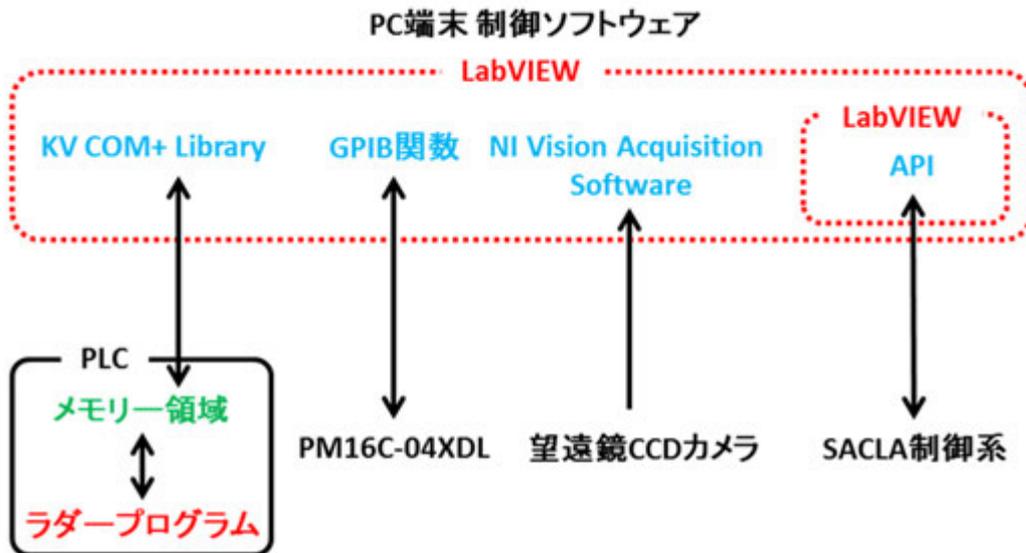


図 4-12 PC 端末における制御ソフトウェアのプログラム構成

USA)を用いて、PC 端末に表示した。SACLA 制御系と通信するための API は、LabVIEW で実装されたものが施設側から提供されているため、これをサブプログラムとして利用した。

4.3.3 グラフィカルユーザーインターフェース

SACLA での XFEL-CXDI 実験では、回折パターン取得までに様々なステップを踏む必要があり、各行程での作業に用いる制御器・測定器の数は実験者が把握できる量を超えてしまう。前節の制御システムでは、コントローラーを仲介することによって、膨大な数の制御器を制御 PC 端末にまとめている。しかし、目的の動作を制御器に行わせるためには、コントローラーに膨大量の制御コマンドを送らなければならない。コマンドを一つ一つインターフェースより打ち込む作業は、非常に煩雑である。そのため、コマンドを一括してコントローラーに送信するための上位の制御プログラムが必要である。さらに、実験で必要とされる動作自体が膨大な数なので、動作目的に応じてコマンドを編集し、順序立てて実行可能なグラフィカルユーザーインターフェース(Graphical user interface: GUI)が求められる。

本研究を遂行するにあたり、図 4-11 の制御システム構成に従って、作業別に 4 種類の GUI パネルを作成した。一つ目は、高砂六号内の任意のステッピングモーターを一つずつ操作するための Manual Control パネルである。二つ目はナイフエッジスキャンを行うための Wire scan パネル、三つ目は試料ホルダーを搬入出し、望遠鏡観察を行う



図 4-13 タブを用いたパネル分け。一つの GUI であっても、赤色点線で囲ったタブをマウスでクリックすることで、別の操作を行うパネルを自由に行き来できる。例えば、黄色字 A に Manual Control, B に Sample mount & Centering, C に Data Collection の操作を行うパネルを展開することができる。

ための Sample mount パネル、四つ目はラスタースキャンを行うための Data collection パネルである。四種類の GUI パネルは、様々な作業が混在しないようタブを利用して作業環境を切り換えることにした(図 4-13)。以下では、それぞれの GUI の仕様及び制御プロセスの詳細について説明する。

4.3.4 Manual Control: 各ステッピングモーターの制御と PIN photodiode を用いた X 線強度測定

Manual Control パネルを図 4-14 に示す。基本の操作は、モーターの現在位置の確認と絶対位置移動、移動量を指定して行う相対位置移動である。Manual Control の主な役割は、精密定盤の調整、四枚の L 字シリコンスリットによる寄生散乱除去の他に、PD の導入である。ここで、制御するステッピングモーターの数は、合計 16 個に達する。誤って異なるモーターを選択してしまわないように、高砂六号の真空槽内部にある光学系を模したイラストを用意し、メニューバーで選択した制御対象であるステージをカラー表示することで、どのステージを制御しているのか実験者に視覚的にとらえることが可能な GUI を作成した。さらに、絶対位置移動や相対位置移動の際にどの方向にステージを動作させているのか明示するため、正の方向、即ち、ステッピングモーターを時計回り(CW 方向)に回転させたときにステージが動作する方向をイラスト内にて矢印で示した。PD の導入は、青色のインジケータで確認できるようにデザインした(図 4-14)。PD で受信した信号の強度も Manual Control パネルで確認する。

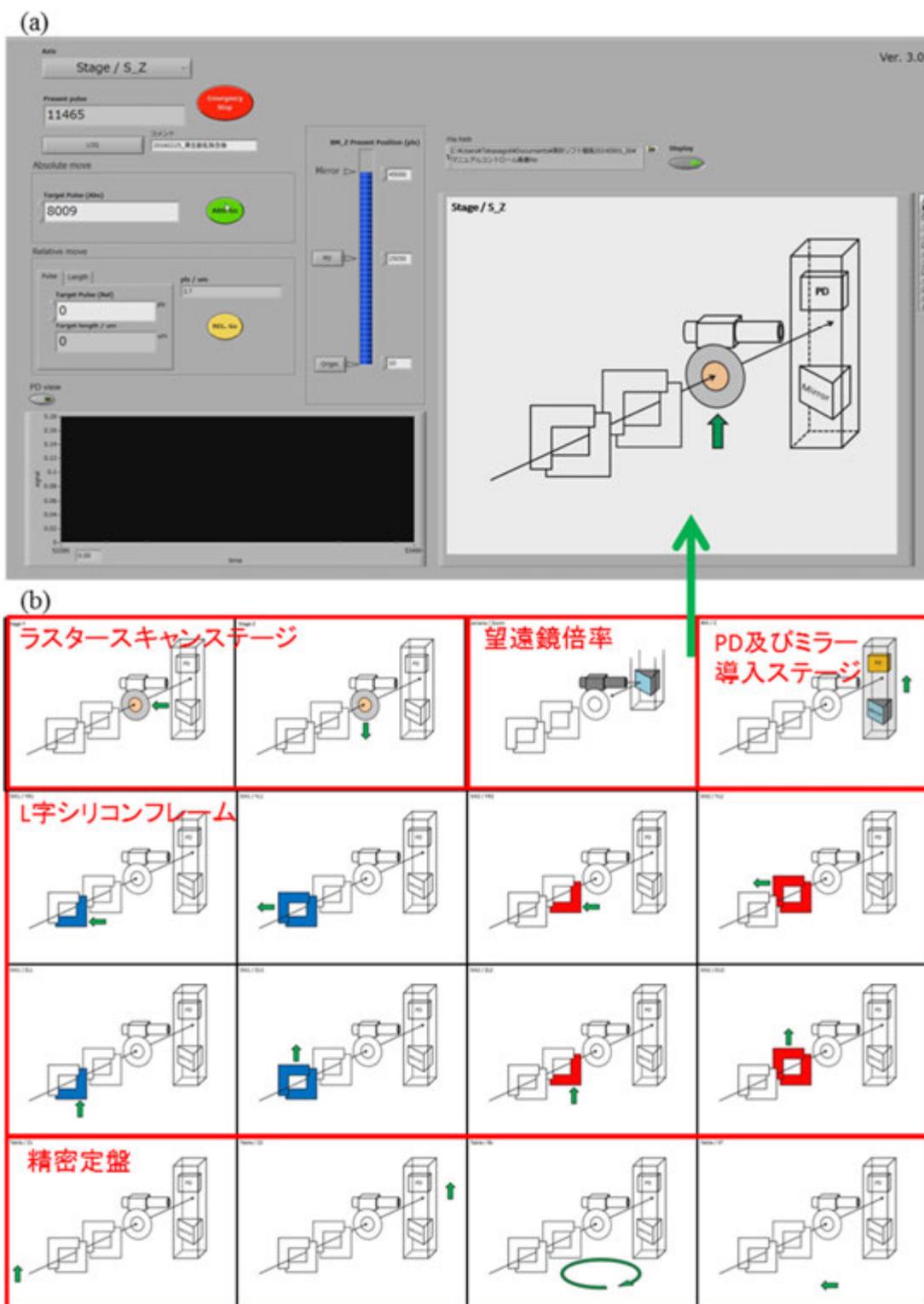


図 4-14 (a)Manual Control パネル。(b) 操作しているデバイスのイラスト。緑矢印が CW 方向

図 4-15 に Manual Control パネルで行う操作の通信経路を示す。L 字シリコンスリット、精密定盤、PD 及びミラー導入ステージ、望遠鏡倍率の合計 14 個のステッピングモーターは PM16C-04XDL コントローラー(Tsuji denshi, Japan)で、ラスタースキャンステージの 2 個のモーターは PLC である KV5000 コントローラー(KEYENCE, USA)で制御する。4.3.1 節でも述べたように、各ステッピングモーターに一つずつドライバが備えられており、モーターへ電圧パルス供給を行う。図 4-15 中のドライバに割り当てられた名称は、各モーターの制御部に対応している(表 4-4)。

表 4-4 各制御器に割り当てられたステッピングモーター

制御器	ステッピングモーター	動作
L 字シリコンフレーム	Slit1 / YL1	水平並進
	Slit1 / ZU1	垂直並進
	Slit1 / YR1	水平開口
	Slit1 / ZL1	垂直開口
	Slit2 / YL2	水平並進
	Slit2 / ZU2	垂直並進
	Slit2 / YR2	水平開口
	Slit2 / ZL2	垂直開口
精密定盤	Table / Z1	上流側 垂直並進
	Table / Z2	下流側 垂直並進
	Table / XT	水平並進
	Table / θz	回転
PD 及びミラー導入ステージ	BM / Z	垂直並進
望遠鏡倍率	Camera / Zoom	倍率調整
ラスタースキャンステージ	Stage / S_Y	水平並進
	Stage / S_Z	垂直並進

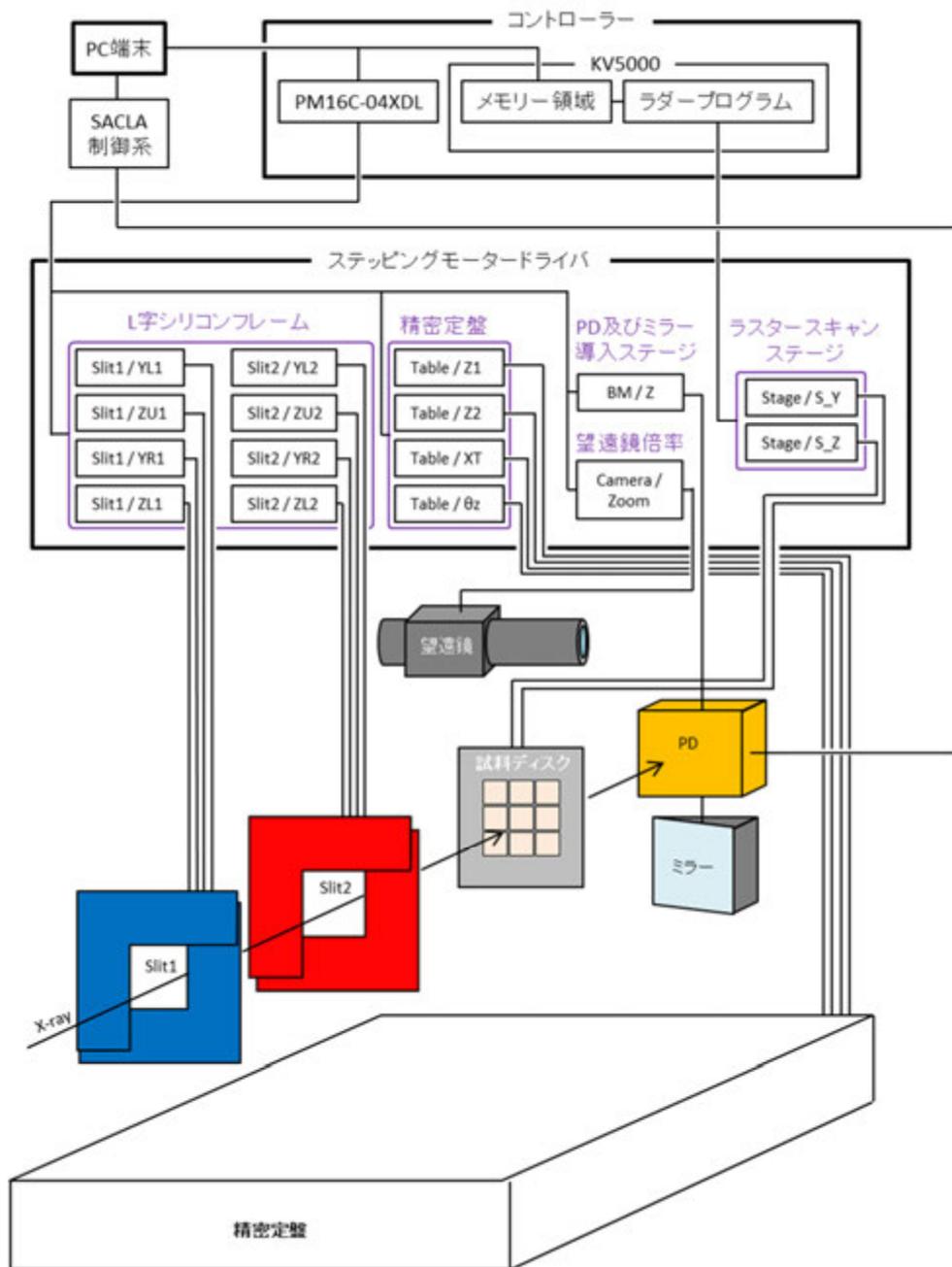


図 4-15 Manual Control での PC 端末から制御器までの通信経路

ステッピングモーターの動作制御は図 4-16 に示す流れに従って実行する。制御対象となるステッピングモーターの指定はコントローラ内部でそれぞれ割り振られたチャンネルを参照する。絶対位置移動あるいは相対位置移動を行っている最中に想定外の事態が発生した場合に対応できるように、緊急停止を可能とした。

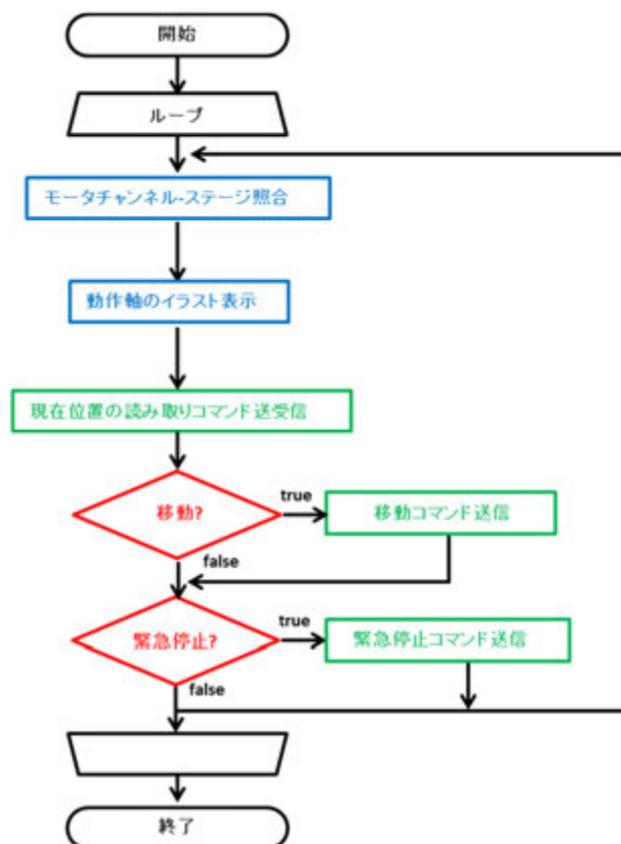


図 4-16 ステッピングモーター制御のフローチャート

4.3.5 Wire scan: ナイフエッジスキャン

Wire scan パネル (図 4-17) では、ナイフエッジスキャンを行うため、金ワイヤーを乗せたスキャンステージを 1 ステップずつ並進させ、ワイヤーに遮られずに通過する XFEL パルスの強度を PD で観測する(第三章 3.3.1 節)。このパネルに移る前に PD は Manual Control パネルにて X 線光路に事前に導入しておく必要がある。パネルでは、スキャンステージの位置に対応した強度プロファイルをグラフ表示し、確認することができる (図 4-17 赤線)。また、XFEL パルスの強度揺らぎを規格化するためにワイヤーより上流の強度をビームモニター[Tono *et al.*, 2013]を用いて観測する (図 4-17 白線)。スキャンステップ及びステップ数の指定、水平・垂直のナイフエッジスキャン方向の切換もこのパネル上で行う。

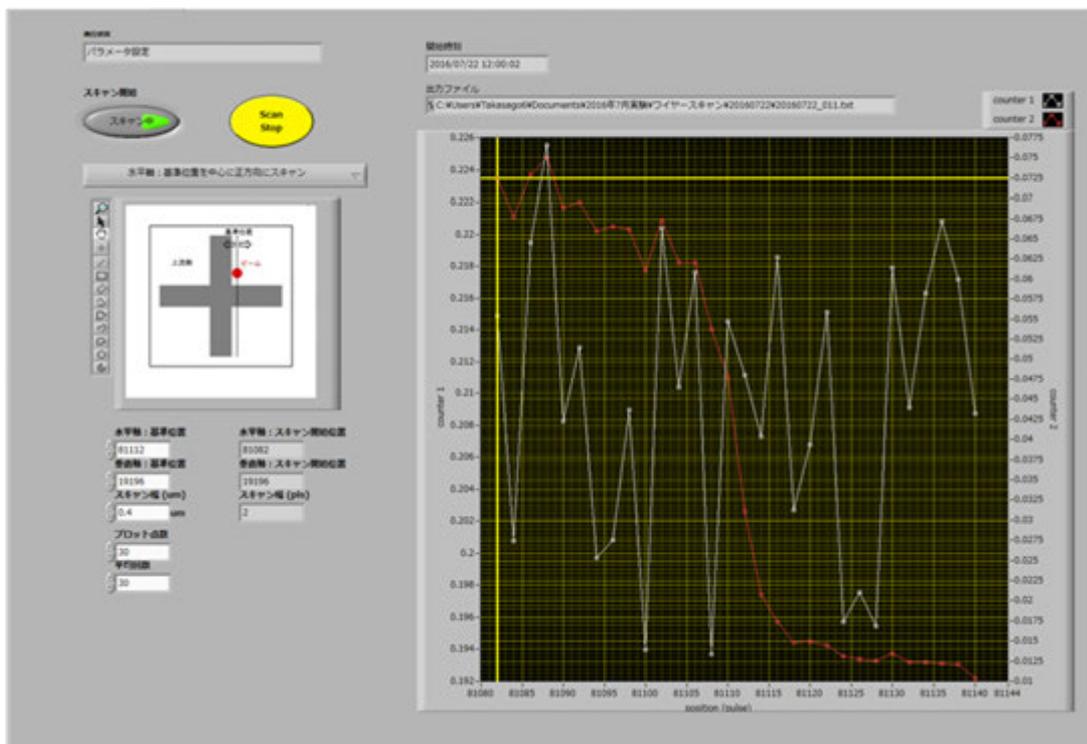


図 4-17 Wire scan パネル。グラフ中の赤線はワイヤー下流の PD で測定した強度プロファイル、白線は上流のビームモニターで測定した強度揺らぎである。

図 4-18 は、ナイフエッジスキャンに必要な制御器と PC 端末から制御器までの通信の流れを示している。ワイヤー下流の PD 及び上流の強度をビームモニター[Tono *et al.*, 2013]での強度は SACL A 制御系から受信する。図 4-19 はナイフエッジスキャンのフローチャートである。スキャンステージを動作させるステッピングモーターとの通信は Sample mount パネルと同じだが(図 4-18)、手動で移動コマンドを送信するのではなく、PD でのビーム強度の測定ごとに自動で 1 ステップずつモーターを駆動させる。

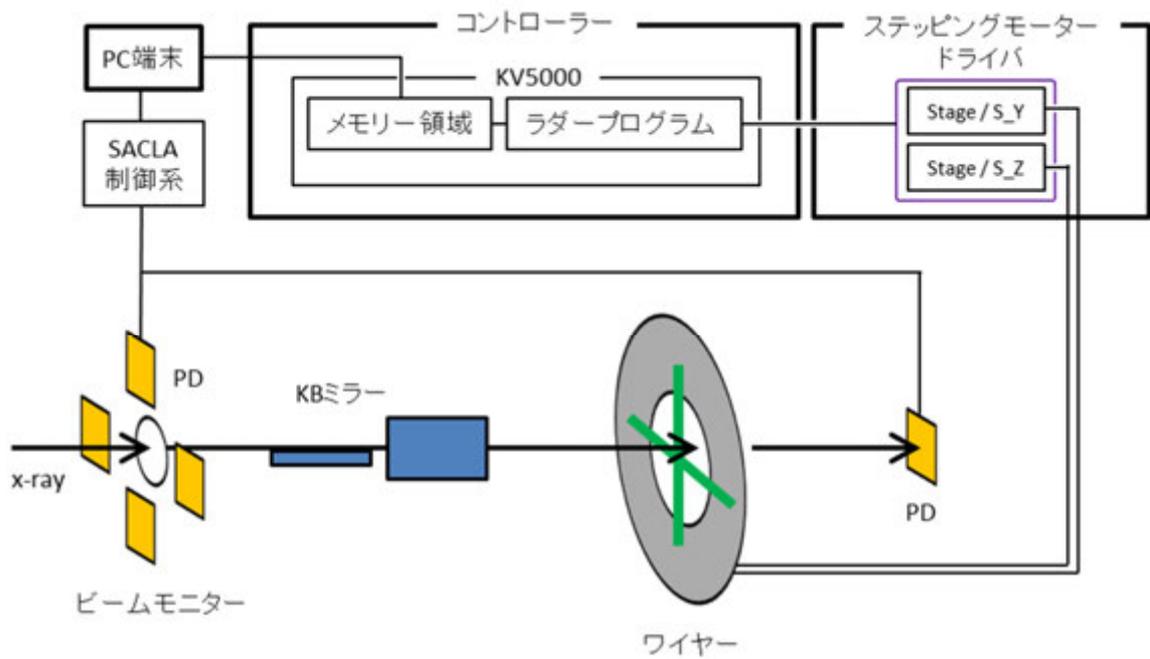


図 4-18 Wire Scan パネルでの PC 端末から制御器までの通信経路。

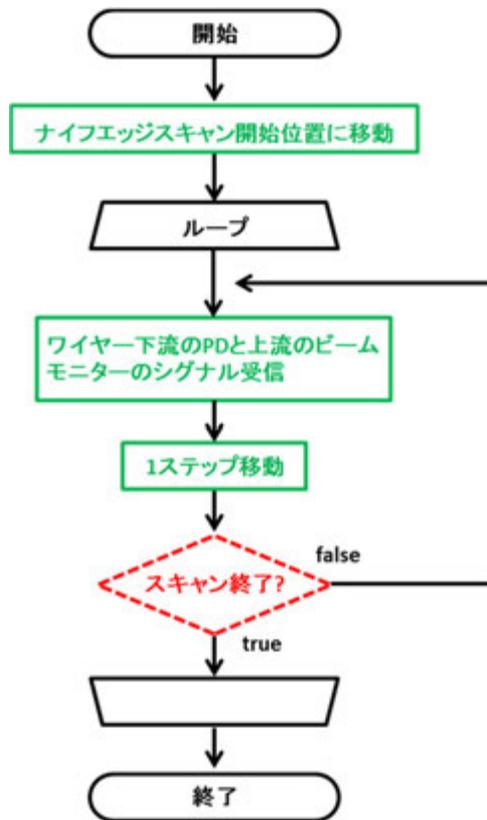


図 4-19 ナイフエッジスキャンのフローチャート

4.3.6 Sample mount: 試料ホルダーの交換とラスタースキャン範囲の指定

試料ホルダーの交換とラスタースキャン範囲の指定を行う GUI, Sample mount パネルを図 4-20(a)に示す。4.2.5 節で述べたように試料ホルダーの交換は低温ポット A へ搬送されたカセットコンテナの位置調整を行うステージと低温ポット B の位置調整を行うステージ、搬入棒及び搬出棒を用いて行う(図 4-21)。目的とする試料ホルダーのカセットコンテナから低温ポット B への搬送は、カセットコンテナと図 4-20(a)の模式図中の 12 個のボタンによってスロットを選択して実行される。図 4-22(a)に搬入出の順序を示す。ラダープログラムの搬入シーケンスが実行されると、低温ポット B に試料ホルダーがマウントされたことが PLC のメモリーに領域に記憶されるため、誤って二つ試料ホルダーがマウントされることはない。

次に、搬送された試料ホルダー及び試料ディスクの望遠鏡観察を行うため、模式図中のサブパネル”BM Z control”のボタンを用いてミラーを導入する。ミラーの位置は、Manual Control パネルと同様にインジケーターでモニターできる。望遠鏡像は CCD カメラを介して(図 4-21)、同パネル上で 100 ms ごとにスナップショットで確認できる。望遠鏡の倍率は同パネルで変更されると、PM16C-04XDL コントローラーを仲介して倍率調整用のステッピングモーターが駆動する(図 4-21, 図 4-22(b))。

次に、望遠鏡像上で ROI (region of interest)を指定し、ラスタースキャンを行う範囲を指定する(図 4-20 (a), (b))。図 4-20(a)の模式図中のボタンをクリックすることで指定した ROI についてラスタースキャン範囲をラスタースキャンステージの座標として記録する(図 4-22(b))。大面積試料ディスク(図 4-3(b))については、薄膜の数・大きさ位置が決まっているので(4.2.1 節)、基準となる左上の薄膜の左上のコーナーの一点を定め、9つの薄膜の全範囲を一括で指定する。3分もあれば、望遠鏡の導入も含めて、ラスタースキャン範囲を決定することができる。

また、薄膜の傾きについても対応できる仕様とした(図 4-20 (c))。この機能は、特に円形で試料ホルダーに装着する際に傾きが定まらない 3 mmφ の試料ディスク(図 4-3(a)) のラスタースキャン範囲を指定する際に有用である。

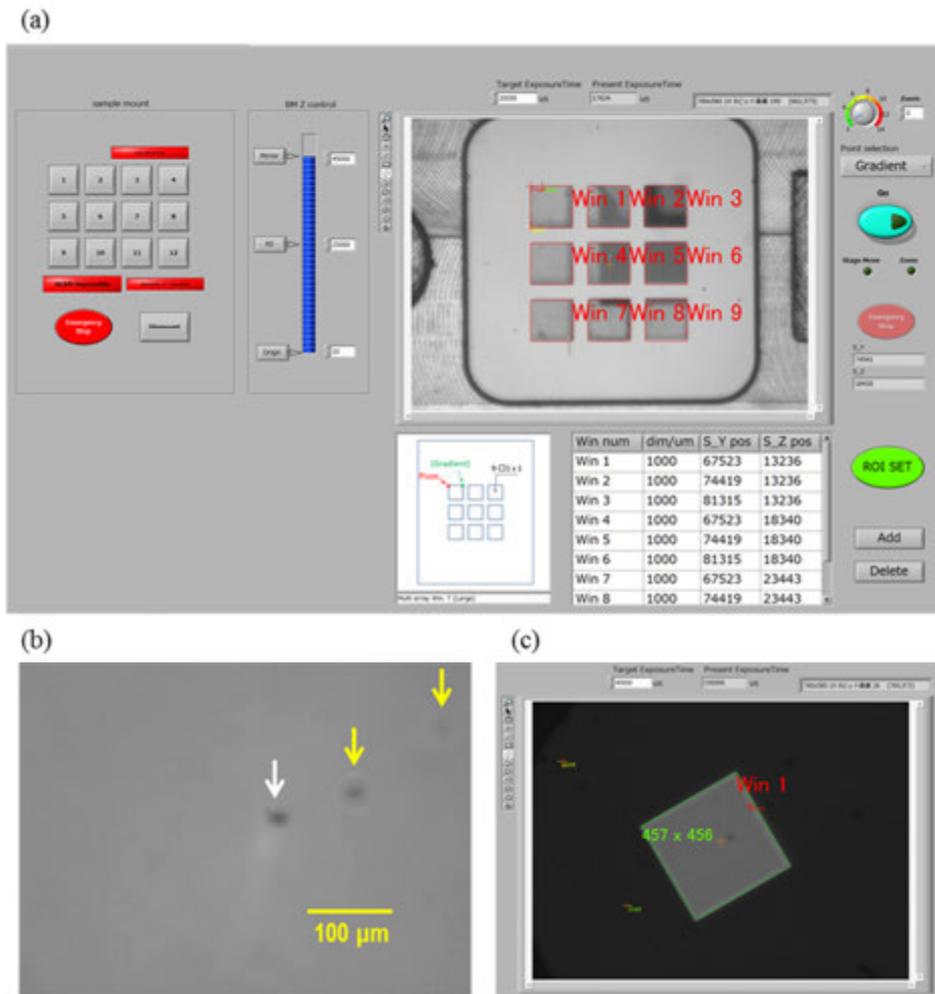


図 4-20 (a)Sample mount パネル。サブパネルは左から順番に、試料ホルダーの搬入出 (Sample mount)、ミラー導入ステージのインジケータ(BM Z control)、望遠鏡画像である。望遠鏡像には試料ディスクの 9 つの薄膜が写っている。ラスタースキャン範囲指定箇所は、赤枠で表示される。(b) XFEL パルス 1 ショットを窒化シリコン薄膜に照射して生じた穴の望遠鏡画像 (白矢印)。望遠鏡像のどの位置に XFEL パルスが照射されるのか照射実験に先立って調べることで、ラスタースキャンを行う範囲を望遠鏡上で決定することができる。焦点の合っていない黄矢印で示される黒点はレンズに付着したゴミである。(c) 3 mmφ の試料ディスクの薄膜のラスタースキャン範囲の指定。

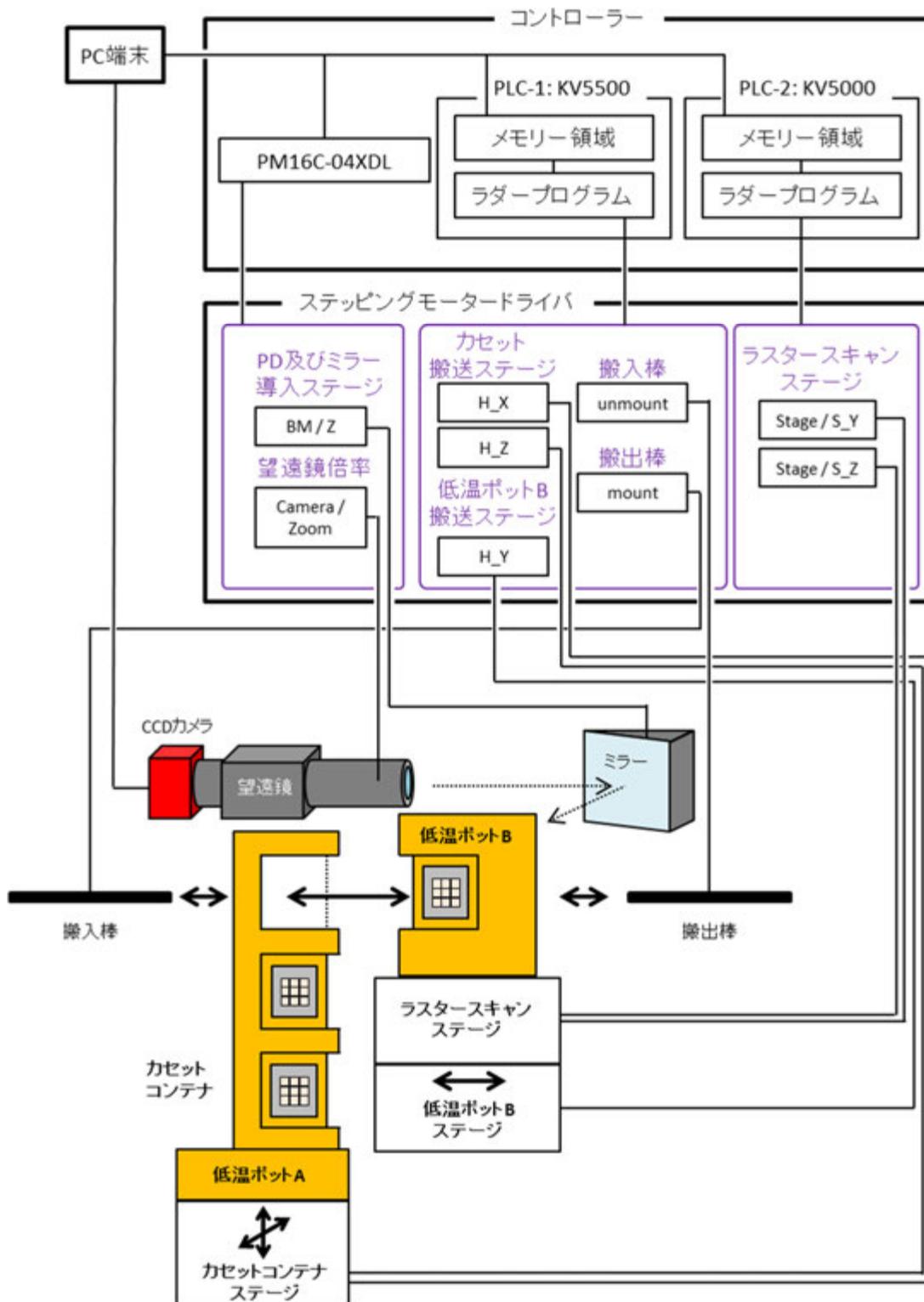


図 4-21 Sample mount での PC 端末から制御器までの通信経路。
 ドライバに割り当てられた名称については表 4-5 に示す。

表 4-5 試料ホルダー交換に関するステージに割り当てられたステッピングモーター

制御器	ステッピングモーター	動作
カセットコンテナステージ	H_X	光軸方向並進
	H_Z	垂直並進
低温ポット B ステージ	H_Y	水平並進
搬入棒	mount	水平並進
搬出棒	unmount	水平並進

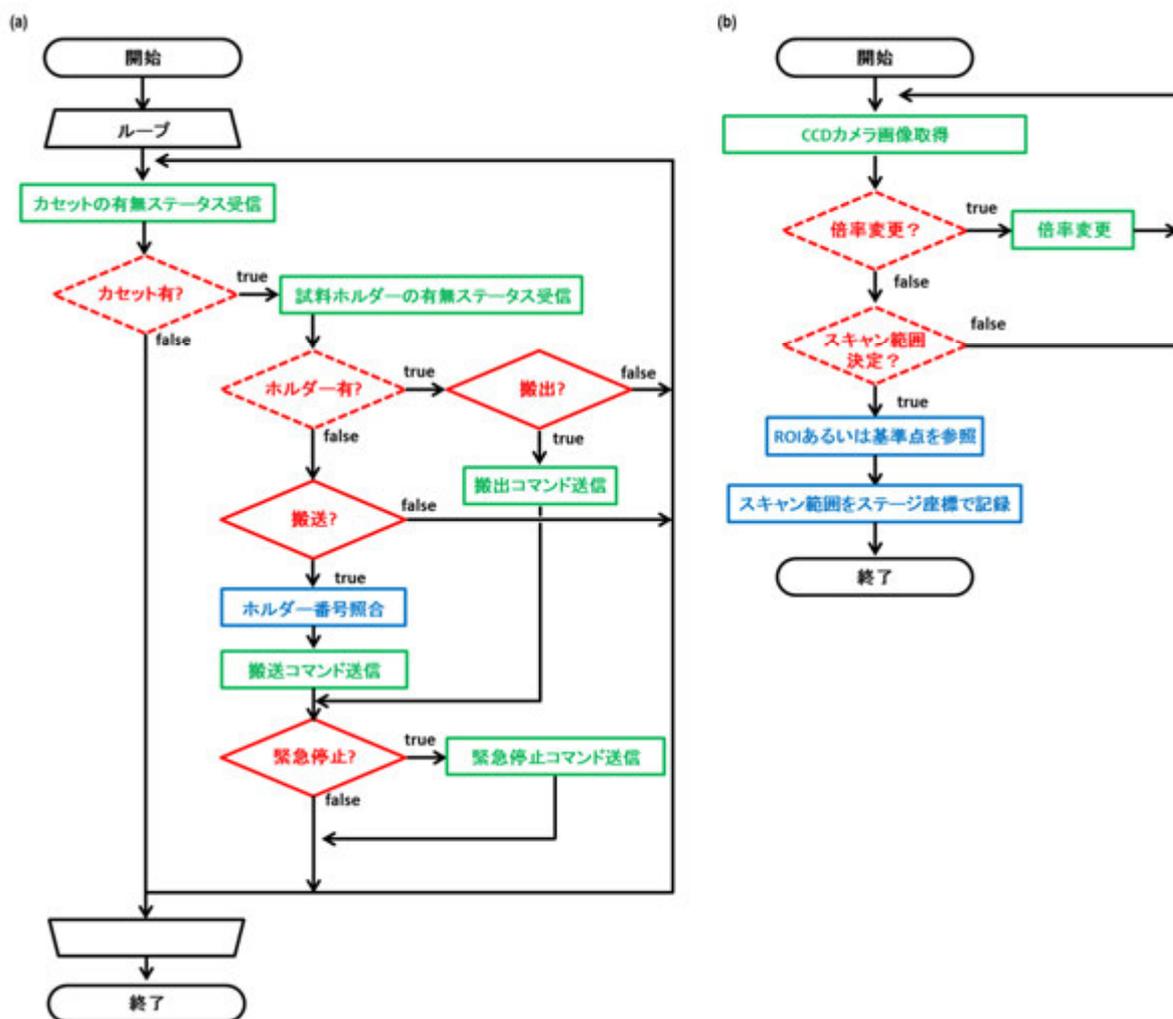


図 4-22 試料ホルダー交換のフローチャート(a)とラスタースキャン範囲指定のフローチャート(b)

4.3.7 Data Collection: ラスタースキャン

図 4-23 に Data Collection パネルを、図 4-24 に PC 端末から制御器までの通信経路を、図 4-25 にラスタースキャンのフローチャートを示す。このパネルを起動すると、Sample mount パネルで指定したラスタースキャン範囲がグラフ表示される。ラスタースキャンの前に、試料ディスク上の薄膜に対して、スキャンステップ(照射位置の間隔。デフォルトで 25 μm)、フレームマージン、試料名をパネル内のリスト中に書き込む。Sample mount パネルで指定した薄膜の範囲全てをラスタースキャンすると、薄膜を支持するフレームに XFEL パルスが照射される恐れがあるため、フレームマージン (フレームからスキャン範囲までの距離) によってスキャン範囲を絞る。ここで指定した試料名は、ストレージされた検出器データに付随して記録される。スキャンステップとフレームマージンによって決まったスキャン範囲に対してスキャン座標が計算され、グラフ上に表示される。後は、ボタンひとつでパルスセクターが開き、XFEL パルスが照射されると共にパルスサイクルに同期したイベントトリガーが SACLA 制御系から PLC に入力され、ステージはトリガーごとにステップを刻む(図 4-24)。同時に MPCCD 検出器に記録命令を送信し、検出器データがストレージされる。この間、ラスタースキャンステージの現在位置をグラフ表示によってモニターすることができる。一枚の薄膜のラスタースキャンが終わるとパルスセクターが閉じ、SACLA 制御系からのイベントトリガーの出力及び検出器データの記録も停止する。9 枚の薄膜がある大面積試料ディスク (図 4-3(b)) の場合、自動で次の薄膜のスキャン開始位置へ移動し、上記と同じプロセスでラスタースキャンを再開する。

大面積試料ディスクは、1 mm 四方の薄膜 1 枚に対して、スキャンステップ 25 μm 、フレームマージン 50 μm とした場合、スキャン範囲は 900 μm 四方となり、 $37 \times 37 = 1,369$ points のスキャン座標が求まる。Sample mount パネルからの一連の操作で、9 枚の薄膜に対して 12,321 points のスキャン座標を決定することが可能である。

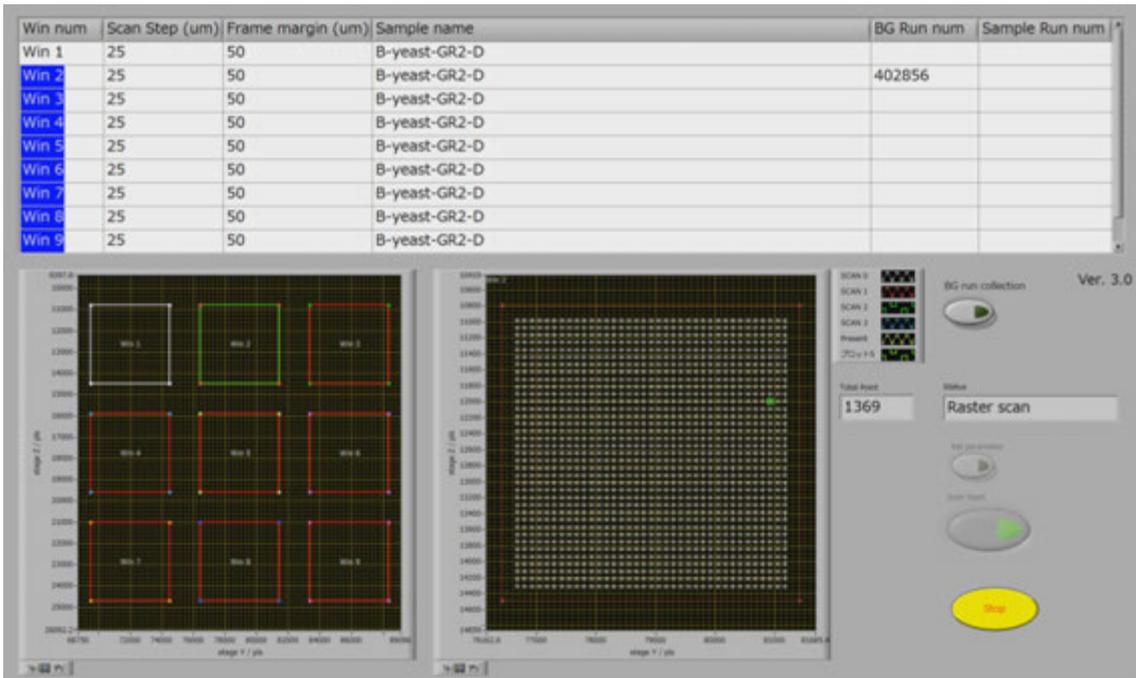


図 4-23 Data collection パネル。上段のサブパネルでは、9 枚の薄膜に対してそれぞれスキャンステップ、フレームマージン、試料名を指定する。下段左のグラフは、Sample mount パネルで指定したスキャン範囲である。下段右のグラフは、ラスタースキャン中の薄膜の範囲（赤枠）とスキャン座標（白点）、ラスタースキャンステージの現在位置（緑点）を表示する。

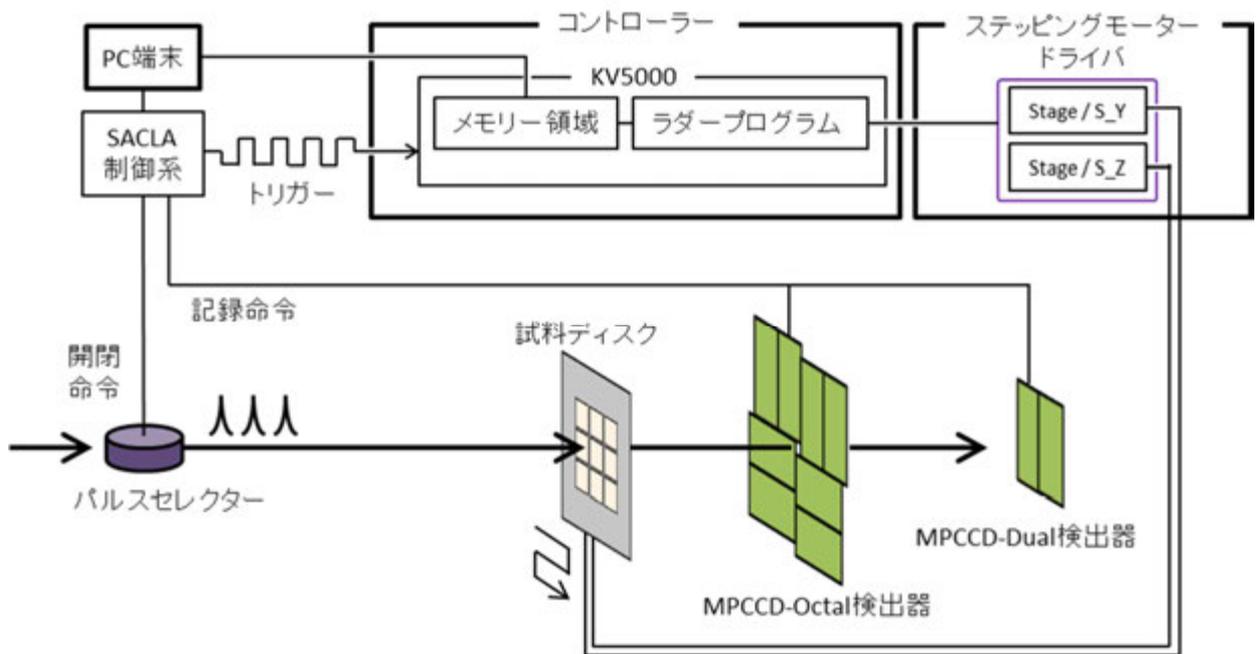


図 4-24 Data collection における PC 端末から制御器までの通信経路

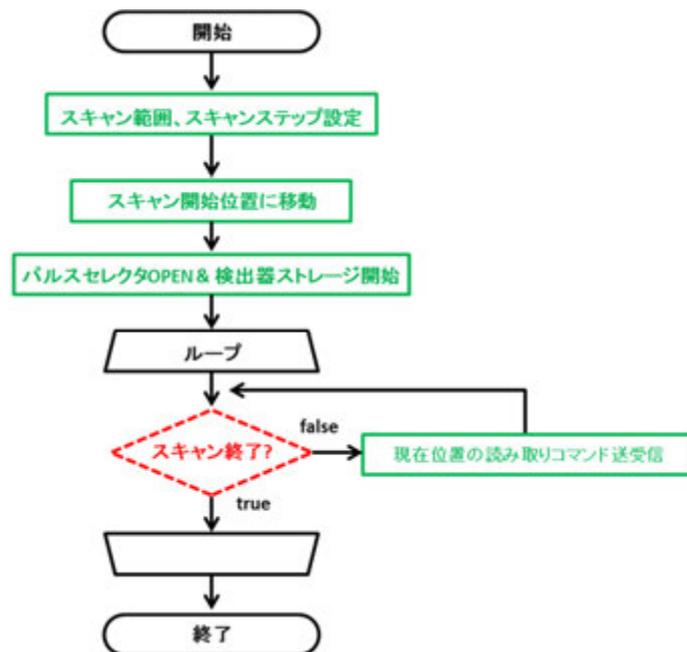


図 4-25 Data collection のフローチャート

4.4 フーコーテスト、ナイフエッジスキャン、L字シリコンフレームによって調整されたXFELパルスの性質

高砂六号は、SACLAのビームラインBL3の実験ハッチEH3あるいはEH4に搬入し、XFEL-CXDI実験を行った。使用したX線の波長は0.225 nm (5.5 keV)である。こ

れを K-B ミラー[Yumoto *et al.*, 2013]によって、集光サイズ $\sim 2 \mu\text{m}$ に集光した。集光点での XFEL パルスの強度は、 10^{10-11} photons/ ~ 10 fs pulse である。K-B ミラーの集光距離は、垂直方向が 1950 mm, 水平距離が 1300 mm である。この集光距離に合わせて高砂六号を設置し、高さ方向も含め、精密定盤によって微調整した。次に、光学ハッチ内のアテネーターを用いて XFEL パルスを 0.02%まで減衰させた上で、水平・垂直方向に張られた直径 $50 \mu\text{m}$ の金製のワイヤーを用いてフォーコートを行い(第三章 3.3.1 節)、スキャンステージの試料搬入位置にビームウエストが定まるように K-B ミラーを調整した。その後、同じワイヤーを用いて、水平・垂直方向のナイフエッジスキャンを行い、ビームプロファイルを測定した。ナイフエッジスキャンによって得られた集光 XFEL パルスのプロファイルを図 4-25 に示す。プロファイルを 1 次微分し、集光 XFEL パルスの強度分布を確認すると、集光 XFEL パルスの大きさは、プロファイルをガウス関数と近似して FWHM(full width at half maximum)で水平・垂直方向ともに $1.5\sim 2.1 \mu\text{m}$ であることがわかった。その後、1 日 1 回の頻度でナイフエッジスキャンを行い、プロファイルに変化がないか確認したところ、2 日間は集光位置及びプロファイル形状に安定性が認められた。なお、ナイフエッジスキャン際には PD が破壊されないように、アテネーターを用いて XFEL パルスを 0.03%に減衰させた。

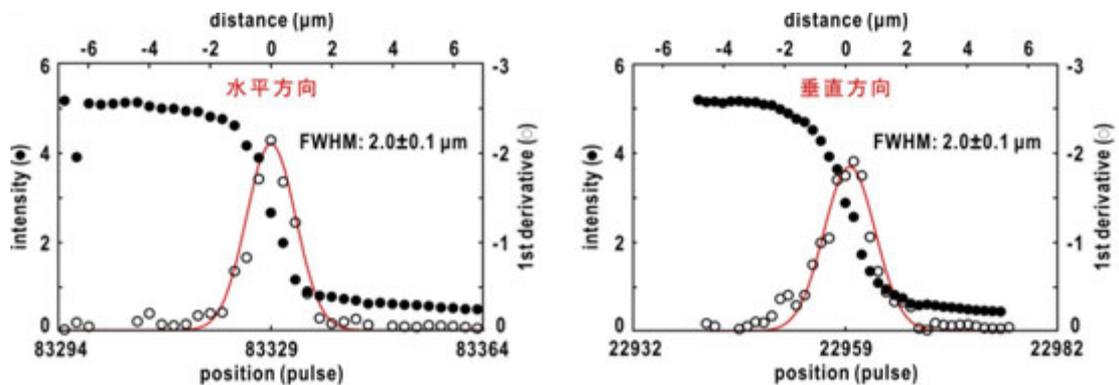


図 4-25 ナイフエッジスキャンによって得られたプロファイル (黒丸) と 1 次微分プロファイル(白丸)。赤線のようにガウス関数フィッティングし、集光サイズの FWHM を求めた。スキャンステップは、水平方向 $0.4 \mu\text{m}$ 、垂直方向 $0.27 \mu\text{m}$ として、 $10\sim 16 \mu\text{m}$ の範囲をスキャンした。

直径約 50 nm の金コロイド粒子を 40~50 /1×1 μm² の高密度で散布した薄膜に XFEL パルス照射すると、図 4-26(a), (b) のようにクーロン爆発によって生じた穴と十字に沿って金コロイド粒子が薄膜から消失していることが確認された。穴の大きさは直径 3~5 μm、十字エリアの大きさは、穴の中心から水平方向で~13 μm、垂直方向で~10 μm であった。この十字の形状は K-B ミラーの集光プロファイルが以下の理論式で示すように sinc 関数で特徴づけられることから説明できる。

$$I(x, y) = I_0 \text{sinc}^2\left(\frac{\pi x a}{L \lambda}\right) \text{sinc}^2\left(\frac{\pi y b}{L \lambda}\right) \quad (4.1) \text{ (第三章 式(3.11)を再録)}$$

ここで、 x, y をそれぞれ水平・垂直方向の焦点面での座標、 a, b はそれぞれ水平方向と垂直方向の開口サイズ、 I_0 ビームプロファイル中心の強度、 λ は波長である。式(4.1)で計算した集光プロファイルの特徴は、照射痕の十字の先端の金コロイド粒子の有無の繰り返しパターンから確認できる(図 4-26(c))。ビーム中心位置から 10 μm 以上離れた領域に確認される上記のような特徴は、ナイフエッジスキャンのビームプロファイル測定では評価することができない(図 4-25)。というのは、ナイフエッジスキャンではアテネーターによって XFEL パルスを著しく減衰させており、ビーム中心から離れた領域の強度は PIN photodiode を用いた測定ではノイズに埋もれて検出できないためである。

金コロイド粒子が消失している領域内の試料粒子は XFEL 照射によって損傷を被っているため、次の照射位置からは、外さなければならない。スキャンステップを 50 μm とし、ラスタースキャンすると、図 4-26(a) のように照射位置が等間隔に格子状に並んでいることが確認されたことから、30 Hz の XFEL パルスサイクルにラスタースキャンステージがもれなく同期しているとの確証を得た。スキャンステップを 25 μm とすれば、次照射位置の試料粒子は XFEL パルスによって損傷されないことが確認できた。

試料位置より上流に 215 mm に設置した L 字シリコンフレームによるスリット開口を約 500 μm、ビームウエスト内に設置したフレームによるスリット開口を約 200 μm とし、それぞれの開口中心に XFEL パルスが通過するようにフレームの位置調整を行うと、小角領域に移る寄生散乱を 20 photons/pixel まで抑えることができた(図 4-27)。サブミクロンサイズの試料粒子からの回折強度は、同じ小角領域で、10⁴ photons/pixel を超えるので、寄生散乱の強度は無視できるほど十分に小さいといえる。

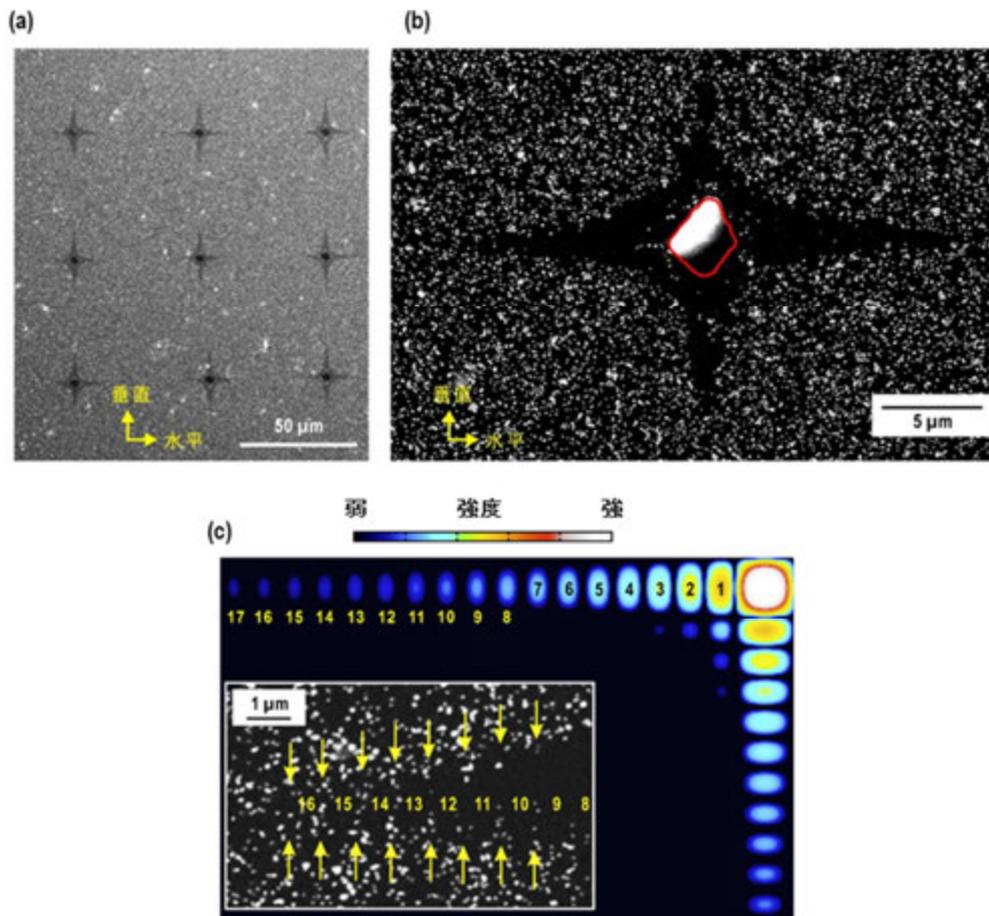


図 4-26 (a) 金コロイド粒子を高密度で散布した薄膜に XFEL パルスを照射した後に観察した SEM 像。白い無数の粒子が金コロイドである。(b) パルス 1 ショットによって生じた照射痕の SEM 像の拡大図。赤線内は穴になっており、それ以外の黒く映っている場所には薄膜は存在するが金コロイド粒子が消失している。(c) 理論式(式(4.1))で計算されるビームプロファイルと十字の照射痕の先端部分を拡大した SEM 像の比較。SEM 像中の黄色矢印は金コロイド粒子が消失せず残っている位置を示している。金コロイド粒子が消失している領域は数字で示す sinc 関数のピークの強度プロファイルに相当する光が照射されたと考えられる。

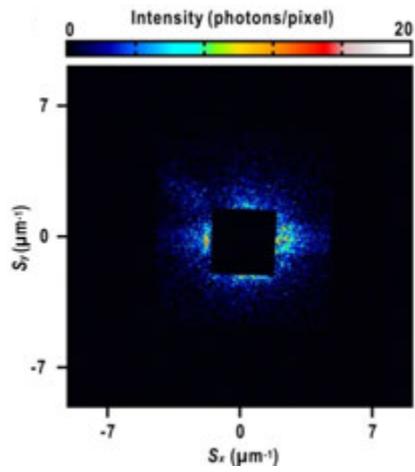


図 4-27 L 字シリコンフレームによって低減された寄生散乱。集光点より 3 m 下流に設置した MPCCD-Dual 検出器で記録した。中心の矩形の黒い領域は、ビームストップによって生じた影である。

第五章 試料粒子散布手法の開発

第四章で述べた高砂六号を開発した専用制御ソフトウェアで運転し、かつ、高い数密度で試料粒子を散布した薄膜を XFEL パルスに対してスキャンすることで、30 Hz で供給される XFEL パルスを漏れなく利用することが可能となる。そのためには、試料散布に適した薄膜の探索、装置や XFEL パルスの評価に利用する金属ナノ材料粒子の散布方法、細胞や細胞内小器官等の生体粒子に乾燥ダメージを与えることなく散布・凍結する方法を開発する必要がある。本章では、薄膜の探索、薄膜への試料散布方法、実際の XFEL-CXDI 実験による薄膜や調製試料の評価結果について記述する [Kobayashi *et al.*, 2016b]。

5.1 試料粒子散布・照射用薄膜

CXDI 実験に用いる生体試料等を散布、保持して XFEL パルスに対してスキャンを行うための薄膜は以下のような要件を満足する必要がある。

- (1) 生体粒子の散乱断面積は金属に比べて小さいため、試料を散布するための薄膜は、低バックグラウンド散乱であること。
- (2) 生体試料を真空中に設置して回折パターンを記録するために、試料を急速凍結によって水和凍結状態にするので、試料を散布する薄膜は、急速凍結による急激な温度変化に対して十分な耐性を持つこと。
- (3) 薄膜は、高湿度制御環境中での試料散布に対して、余剰な試料懸濁溶液の除去が可能な力学的強度を有すること。
- (4) 試料交換回数を低減できれば、ビームタイムを有効に活用できるので、一つの試料膜で十分多数の XFEL パルスを用いた回折パターン収集ができるように、薄膜は大面積化が可能であること。

これら要件について、薄膜の素材や厚み、面積などを検討しながら、報告されている薄膜、市販されている薄膜について調査を行うとともに、生体試料粒子を薄膜に吸着させる化学的な処理について検討を行った。

5.1.1 炭素薄膜

炭素薄膜を用いる技術は、高山らによって第三世代放射光を用いる CXDI 実験で確立

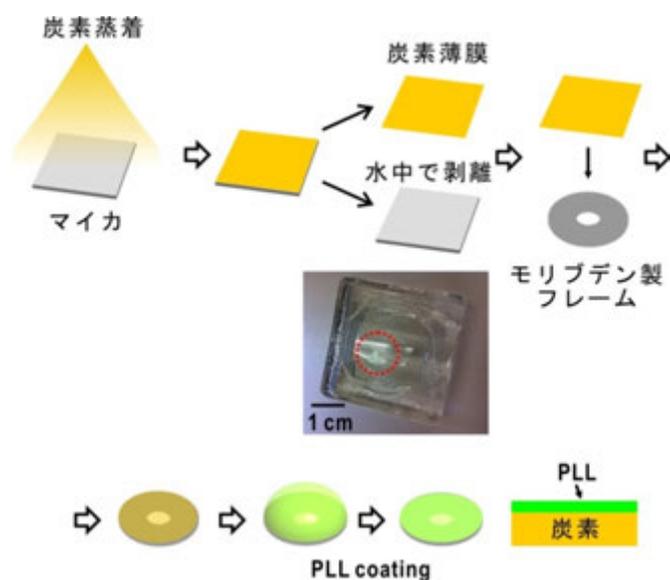


図 5-1 炭素薄膜の調整の手順 [Takayama & Nakasako, 2012]。写真は水中での薄膜の剥離の様子を表している。点線赤丸内に水面に浮遊する薄膜がある。

されていた [Takayama & Nakasako, 2012] (図 5-1)。厚さ 30 nm 程度の炭素薄膜は (1) の要件を十分に満足し、低温凍結耐性が電子顕微鏡観察において実証されている。また、poly-L-lysine (PLL) コーティングで、高い疎水性を示す炭素膜に親水的表面を有する細胞等を吸着する技術も開発された。しかしながら、炭素薄膜は破れやすいため、成膜の歩留まりが悪く、大面積化と大量生産には不向きであると判断された。

5.1.2 エポキシ樹脂薄膜

次に、渡邊と国武によって報告されたエポキシ樹脂薄膜の利用を試みた。この薄膜は、エポキシ基を有する poly[(*o*-cresyl glycidyl ether)-*co*-formaldehyde] (分子量 $M_n=780$) と、アミノ基を持つ polyethylenimine (分子量 $M_n=25,000$) の 2 種類の高分子をクロロフォルム溶液中で 1:1 の質量比で混合して合成される [Watanabe & Kunitake, 2007]。エポキシ基とアミノ基が架橋することで高分子鎖のネットワークが形成され、高い強度を示す (作製方法の詳細については付録を参照)。

エポキシ樹脂薄膜は、剥離剤を塗布したシリコンウェハー上で作製し、エポキシ膜をモリブデン製フレーム (Okenshoji, Japan) に張り付けて試料散布用薄膜とした。膜材料濃度を溶媒に対して変化させることで、厚み 20 nm~200 nm の成膜が可能となる。膜厚は、SEM (TM3000, Hitachi High Technologies, Japan) あるいは、原子間力顕微鏡

(SP400, Seiko Instruments, Japan)を用いて確認した。エポキシ膜表面は架橋せずに残ったアミノ基によって、親水性に保たれているため、炭素薄膜のように親水化処理は不要である。

作製されたエポキシ樹脂薄膜を光学顕微鏡で観察するとともに、その回折パターンをXFEL-CXDI 実験において測定したところ、透過光学顕微鏡像や回折パターンがその厚みに大きく依存することが明らかとなった。例えば、厚さ約 20 nm のエポキシ樹脂薄膜では、顕微鏡によって 200 nm 程の黒点が視認でき、回折パターンには、逆空間での分解能 $8 \mu\text{m}^{-1}$ まで特有のスペックルパターンが 10-20 photons/pixel の強度で現れた(図 5-2(a))。厚さが増すに連れて、顕微鏡像の黒点が観察できなくなり、回折パターン中のスペックルも強度が弱くなる傾向にあった。この結果は、高分子の架橋に局所的な強弱があり、それに依存した構造物が厚さ~20 nm 薄膜に顕著に現れるためではないかと予想された (図 5-2 (b))。一方、膜厚が増すと、構造物は積み重なって顕微鏡像ではコントラストが無くなり、XFEL パルス入射方向に構造物が積層することで、そのスペックルパターンはビームストップ領域に限定されたと推察された。

エポキシ樹脂薄膜では、XFEL パルス照射によって炭素薄膜や窒化シリコン膜に生じる亀裂が生じにくいことも明らかになった。一方、手作業で薄膜を金属フレームに張り付けているために歩留まりが悪く、この点を改善しなければ、実用性が低い状況にある。しかしながら、強度、XFEL パルスによる破れが生じにくい点、低温耐性を鑑みた場合、100~200 nm 程度の厚さを有するエポキシ樹脂膜は、XFEL-CXDI 実験における試料粒子展散布用薄膜として十分な性能を有していることから、今後、継続して生産性を高める工夫を施す価値があると考えられた。

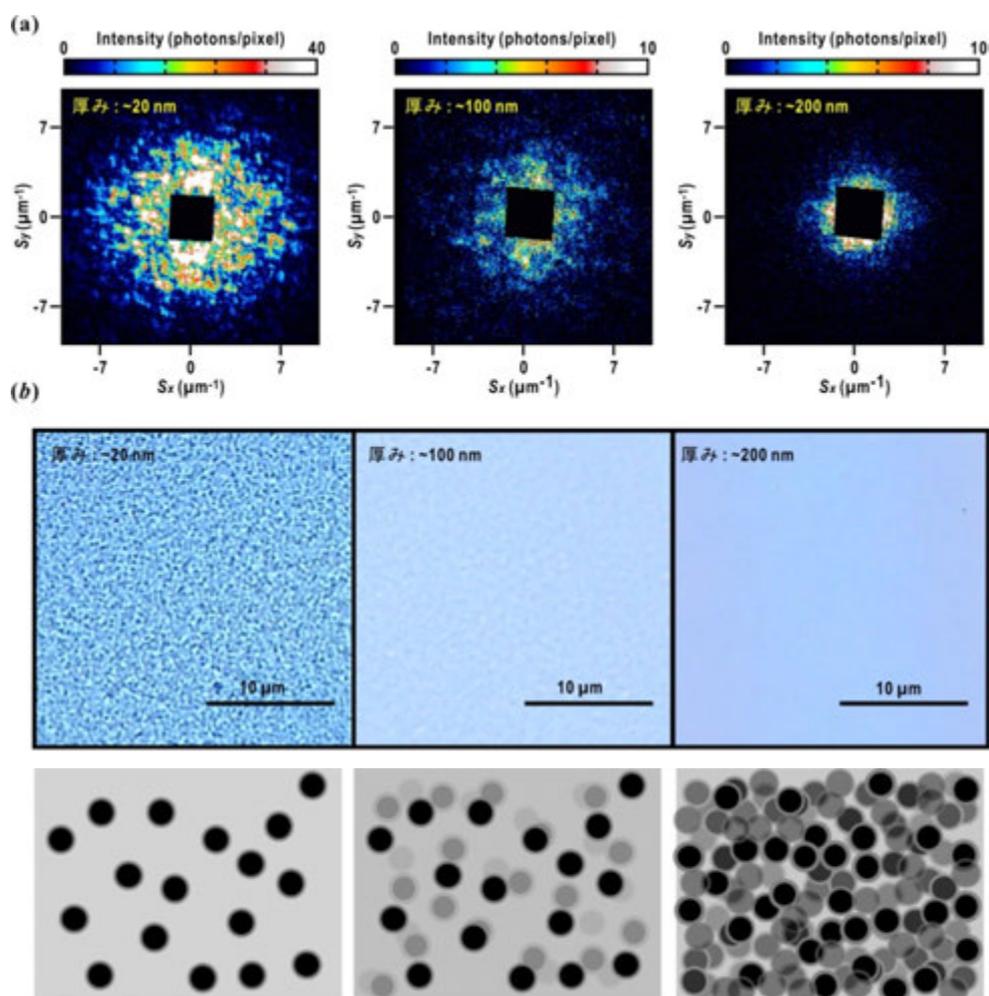


図 5-2 (a)エポキシ膜の回折パターン。左から厚み~20 nm, ~100 nm, ~200 nm の膜である。(b)エポキシ膜の光学顕微鏡像。膜表面からの透過像を観察した。(c)膜の厚みが増加した場合に予想される強架橋箇所の一様性の変化を表す模式図

5.1.3 窒化シリコン膜

窒化シリコン（結晶）薄膜は、CXDI 実験で良く用いられる試料散布用薄膜であり、第三世代放射光を用いた CXDI 実験に用いられてきた。厚さ 100 nm、面積 $3 \times 3 \text{ mm}^2$ の窒化シリコン薄膜窓を有する珪素フレームが市販されており、これまでに、染色体に対する第三世代放射光 CXDI 実験[Nishino *et al.*, 2009]や金属材料粒子に対する XFEL-CXDI 実験に用いられてきた実績がある[Takahashi *et al.* 2013; Sekiguchi *et al.* 2014]。良質な結晶であるため、小角領域への回折・散乱はほとんど認められず、低バックグラウンドの薄膜であると言える。また、液体エタンによるシリコン製フレーム

ごとの急速凍結によって、薄膜が破れることは無く、液体窒素中での保存も問題がないことが確かめられた。厚さを制御した高品質の窒化シリコン膜が市販されているので、安定な実験を実施するには、窒化シリコン膜が前述の炭素薄膜やエポキシ樹脂膜より優れていると判断された。

しかし、窒化シリコン膜にも問題が無いわけではない。窒化シリコン膜は疎水性が強いので、生体試料を直接吸着させることができない。この問題は、炭素薄膜での経験をもとに解決した。まず、厚さ 15 nm 程度になるように、炭素薄膜を蒸着形成する。さらに、炭素表面に高濃度の PLL 水溶液を滴下し、窒化シリコン膜にも生体粒子が吸着できるようにした (図 5-3(a))。この PLL 処理薄膜に試料粒子を散布した場合、粒子はランダムに吸着する (図 5-3(b))。

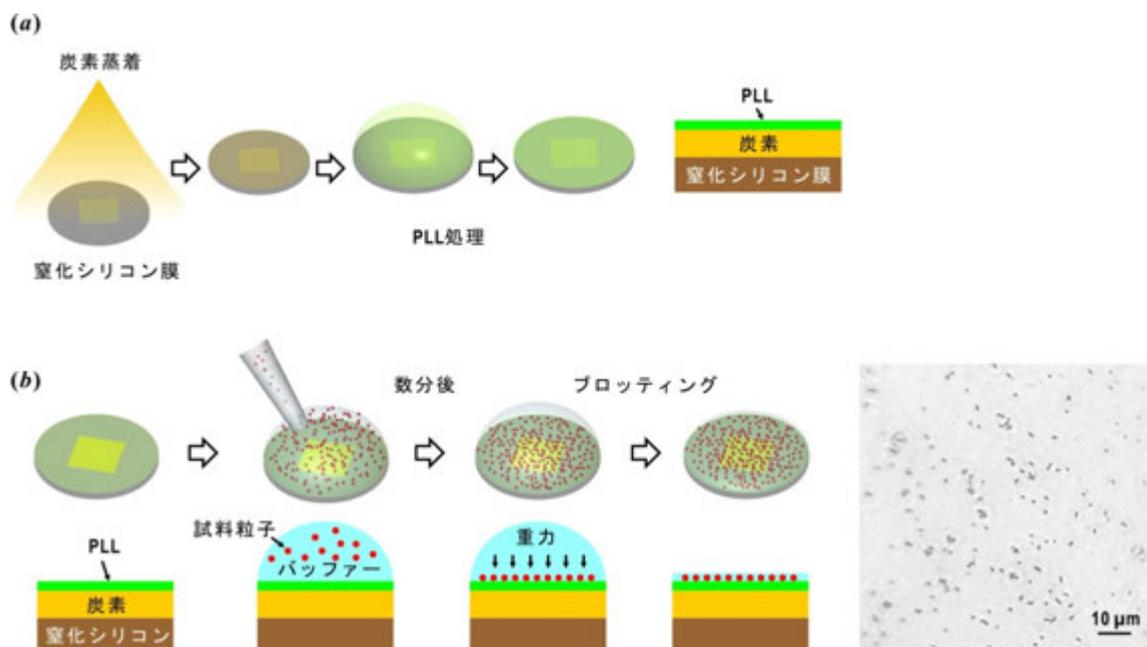


図 5-3 (a)窒化シリコン膜の親水化の手順。窒化シリコン膜に直接 PLL 処置しないのは、窒化シリコンと PLL が強固に接着しないためである。(b) 一面に PLL 処理した薄膜への細胞試料の散布手順。右の画像は散布したシアノバクテリア *Prochlorococcus strain* NIES-2087 (National Institute for Environmental Studies)の光学顕微鏡像である。黒点に見えるものがシアノバクテリアである。

PLL 処理を施さなければ窒化シリコン膜には生体試料粒子が吸着できないという点を逆にとり、生体試料粒子を吸着させたい場所だけに PLL 処理を施せば、吸着位置を制御することが可能である。後述の静電成膜装置 PDS-D01 と 6.4 μm 間隔に格子状に 3 $\mu\text{m}\phi$ の穴の空いた厚み 200 nm の窒化シリコン膜(Norcada, Canada)を利用することで、炭素蒸着した窒化シリコン膜上に PLL 吸着サイトを格子状に修飾することが可能となった (図 5-4(a))。このような処理を施した薄膜に試料粒子を散布すると、粒子も格子状に吸着させることができた (図 5-4(b))。

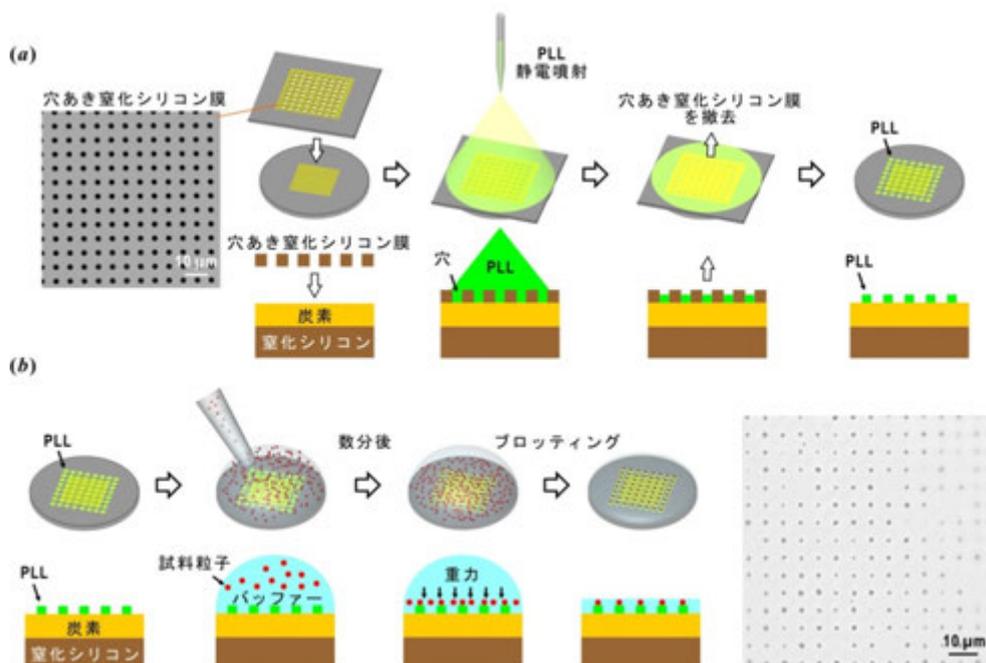


図 5-4 (a)穴あき窒化シリコン膜を用いた PLL 格子状スポット形成の手順。まず、薄膜上に穴あき窒化シリコン膜を被せる。これらを静電噴射装置の基板に設置し、内径 60 μm のキャピラリーから 0.1 mg/mL の PLL 水溶液を噴射する。このとき、PLL は穴しか通過できない。その後、穴あき窒化シリコン膜を除けば、穴の空いた場所だけに PLL が修飾される。(b)アレイ格子状スポット処理を施した薄膜への細胞試料の散布手順。右の画像は散布したシアノバクテリアの光学顕微鏡像である。

5.1.4 大面積分割窒化シリコン膜

窒化シリコン薄膜は上記のような分子修飾によって生体粒子の吸着モードを変えることができるという利点がある一方で、XFEL パルス照射により、薄膜が破壊され、しばしば、膜全体に亀裂が生じるという問題があった(図 5-5)。窒化シリコン薄膜は結晶であるため、XFEL パルス照射によって生じる穴から、しばしば、結晶の劈開面等に沿って亀裂が生じ、膜が破断されることがある。このような状況では、スキャンによるデータ収集が不可能となり、試料膜を交換せざるを得ない。このため、窒化シリコン膜の大面積化は、コスト面でも効率面でも避けざるを得ない。

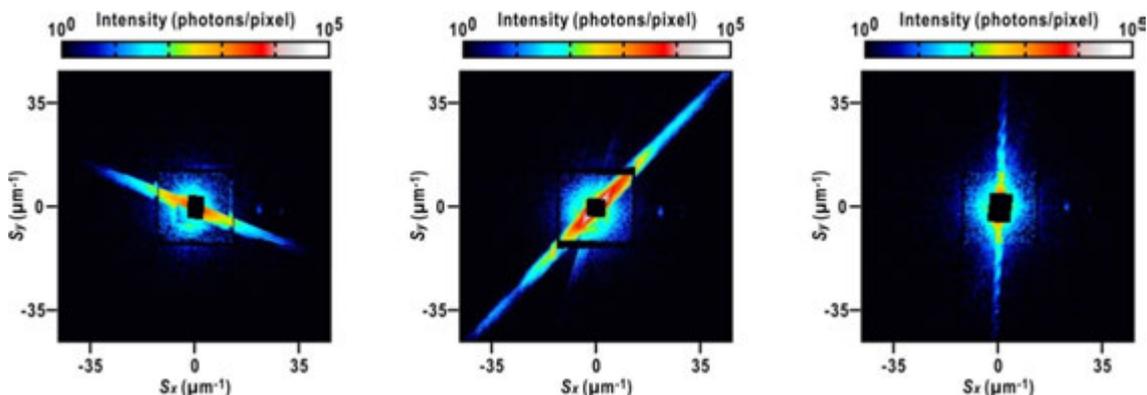


図 5-5 窒化シリコン膜の亀裂に起因した強いストリークパターン。亀裂の大きさは左から順に、 $\sim 90\text{nm}$ 、 $\sim 100\text{nm}$ 、 $\sim 300\text{nm}$ と推測された。パターン中心の矩形の黒色領域はビームストッパーによって生じた影である。

これに代わって、本研究では、大面積膜を分割して、一枚のシリコンフレームに作製することとした。このようにすれば、XFEL パルスを一枚の大面積膜と同程度利用できる。また、XFEL パルスによって膜に亀裂が生じたとしても、それは分割された一枚だけの損傷となって、他に影響がないという利点がある。このような分割された大面積薄膜を用いれば、スキャン開始場所を制御ソフトウェアで順次指定するだけで、ほぼ自動でデータ収集を効率的に行えることとなる。

大面積薄膜を分割した窒化シリコン膜は市販されていないため、図 5-6 のような 9 枚の $1 \times 1\text{mm}^2$ 窒化シリコン膜窓を持つシリコンフレームを設計し、Canada の Norcada 社に依頼して作製した。

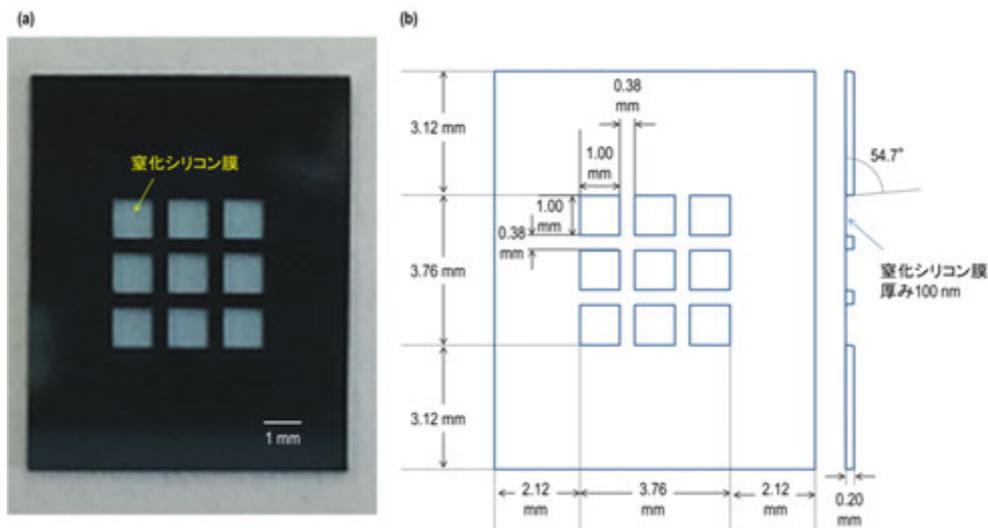


図 5-6 大面積分割窒化シリコン膜の写真(a)と図面(b)

第四章で述べたように、このフレームを用いて、 $25\ \mu\text{m}$ ステップでスキャンを行う場合、一つの窓では、両端に $50\ \mu\text{m}$ の余裕を見て、 $37 \times 37 = 1,369$ 点の照射が可能であり、九つの窓全部では、 $12,321$ 点の照射が可能となる。 $30\ \text{Hz}$ でスキャンする場合、窓間の移動を考慮すれば、一枚のフレームのスキャンに $1,000$ 秒程度を要する。また、高砂六号では、 12 個のフレーム(合計 147.852 点の照射点)を、カセットコンテナを用いて一度に真空槽内に設置し、低温を保ちながら試料交換が可能となっているため、真空槽に設置する試料交換は、おおよそ 4.4 時間に一度となる。このため、試料交換に要する時間が少なくなって、ビームタイムを有効に利用できるようになる。

5.1.5 薄膜からの回折パターン

炭素薄膜と窒化シリコン膜からの回折を上流の光学系からの寄生散乱と比較した(図 5-7 (a))。炭素薄膜及び窒化シリコン膜の回折強度は $3\ \mu\text{m}^{-1}$ の極小角領域に $5\ \text{photons/pixel}$ 程度であり、 $5\ \mu\text{m}^{-1}$ より高角にはほとんど観測されなかった(図 5-7 (b), (c))。また、PLLによる回折もほとんど確認されなかった(図 5-7 (d))。ビームストップの間近で $20\ \text{photons/pixel}$ の回折強度を観測することもあるが、寄生散乱と大差なく、同じ領域で $10^4\ \text{photons/pixel}$ 以上を観測する細胞試料からの回折強度に比べれば十分に小さい。

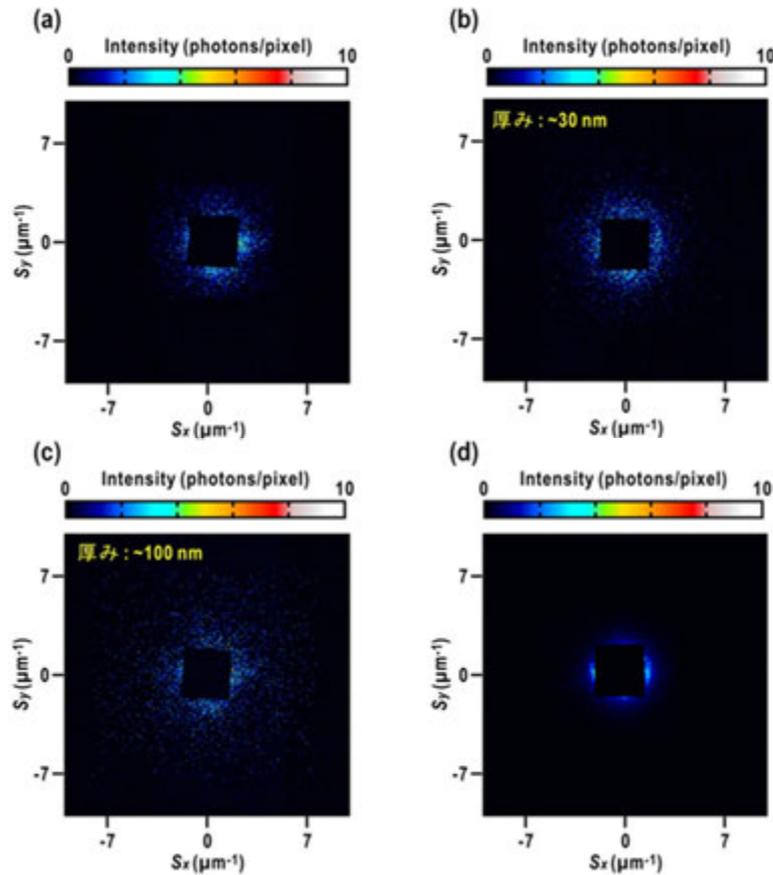


図 5-7 (a)寄生散乱 (b)炭素薄膜の回折パターン (c)窒化シリコン膜の回折パターン (d)PLL 処理した窒化シリコン膜の回折パターン。
100 枚の平均をとった。

5.2 金属材料粒子の散布

5.2.1 酸化銅キューブ

XFEL-CXDI 実験においては、生体試料からの回折パターン収集に先立って、金属材料粒子の回折パターンを収集する。その一つは、立方体形状を有する酸化銅粒子[Kuo *et al.* 2007]の回折パターンであり、その特徴的な回折パターンを用いて、2つの MPCCD 検出器のカメラ長、相対的な角度ずれ、ピクセルサイズの変換等の検出器パラメータを決定する [Sekiguchi *et al.*, 2014a]。

酸化銅キューブは、すでに報告されている手順に従って調製し、調製溶液中に懸濁する。この調製溶液には、酸化銅、アスコルビン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、水酸化ナトリウム等が含まれ、イオン性の高い液体となっているので、後述の静電成膜装置を用いた散布が不可能なので、マイクロピペットを用いて窒化シリコン薄膜上に滴下する。

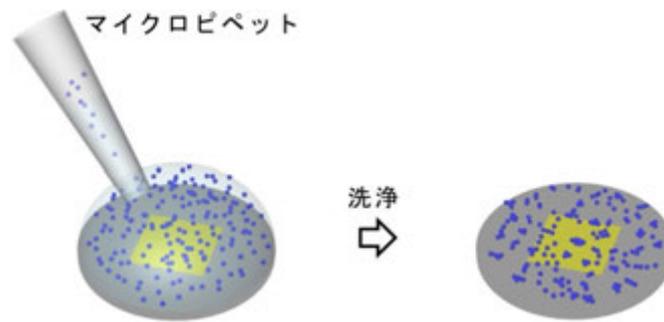


図 5-8 マイクロピペットによる散布

懸濁液滴下後は、重力で粒子が沈降し、膜に吸着するのを待ち、超純水で洗い流す（図 5-8）。粒子の散布密度は、キューブ粒子懸濁液の薄膜への滴下時間を 3~5 分とすることで、薄膜上 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ に 5~8 個の粒子となるように調整した。散布数密度は、SEM(TM3000, Hitachi High-Technologies, Japan)を用いて確認した。

図 5-9 に薄膜に散布した酸化銅キューブの SEM 像を示す。蒸留水での洗浄後に自然乾燥によって試料を作製しているため、酸化銅キューブの凝集体が散見されるが、単粒子で吸着している粒子も見られ、XFEL パルスに対する試料スキャンによって、カメラパラメーター算出に必要な単一酸化銅粒子からの回折パターン取得が期待できる。実際、このような散布試料に XFEL パルスを照射すると、検出器パラメーターが決定できる単粒子からの回折パターンは、全体の 31%に達した。

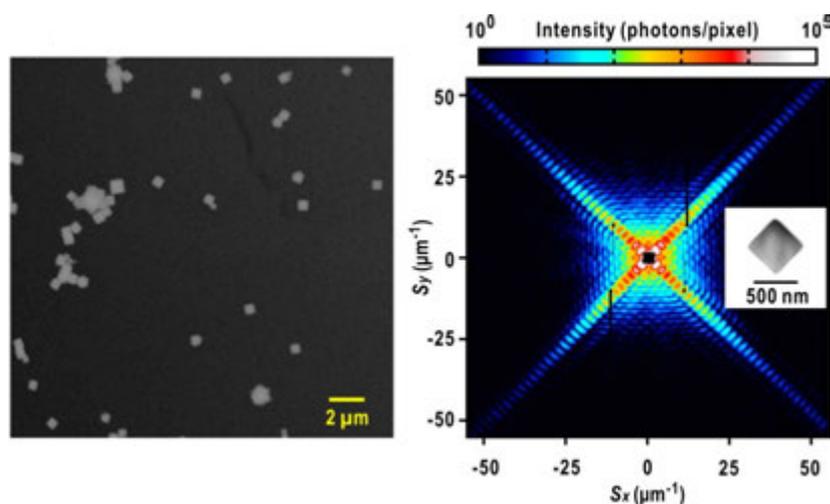


図 5-9 薄膜へ散布した酸化銅キューブの SEM 像(左)と単粒子からの回折パターン。回折パターンの差し込み図は回復した投影電子密度像である。

5.2.1 金コロイド粒子

生体試料の測定前には、直径約 50 nm の金コロイド粒子を窒化シリコン薄膜上に一様に散布した試料を用い、第四章 4.4 節で述べたように集光した XFEL パルスによってどれ程の領域が損傷されるのか SEM で確認する。

British Biocell International Solutions (UK)から購入した金コロイド粒子は蒸留水に懸濁されており、静電成膜装置を用いて窒化シリコン薄膜への一様散布を行う(図 5-10)。静電成膜装置は、前節の PLL 散布でも利用しているが、以下で簡単に原理を紹介しておく [Oliver, 2004]。静電成膜装置では、試料懸濁液をキャピラリーに注入して電極を挿入し、高電圧によって正に帯電させる。一方、成膜対象を設置する基板は負に帯電させる。キャピラリーと基板間に数 kV 程度の電位差を印加すると、キャピラリーから液滴が吐出するようになる。吐出した液滴は全体が正に帯電しているため、電荷反発により、連鎖的に微粒子へと分裂してゆく。その過程では散布大量粒子も凝集を形成することなく、離れ離れになって成膜対象の窒化シリコン膜に到達する。このような現象は静電噴射と呼ばれ、一様な膜厚の形成に役立っている。

本研究では静電成膜装置として、PDS-D01(Hamamatsu Nano Technology, Japan)を用いた(図 5-11)。用いたキャピラリーは内径 24 μm で、その中に挿入した電極と基板間には 5 kV の電圧を印加した。キャピラリーの先端から試料ディスクまでの距離を約 10 mm とした場合、粒子数密度 50 粒子/ $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ を達成するには 20 分を要する。このとき、懸濁液中の金粒子が重力によってキャピラリーの先端に沈降し根詰まりを起

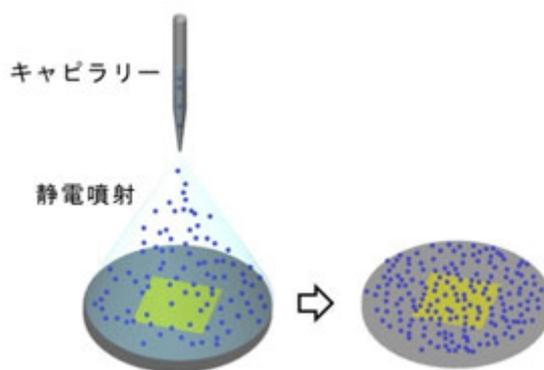


図 5-10 静電噴射による試料散布

こす。これを回避するために、キャピラリーをシリコンチューブによってシリンジに接続し、その間に超音波洗浄器と遠沈管を加工した振動子を取り付けた。この工夫によって、数分に一回の頻度で懸濁液をシリンジで吸い上げ、超音波処理によって粒子を分散させてキャピラリーの目詰まりを防止しながら、一様散布を継続することができた。

静電成膜装置を用いて金コロイド粒子を散布した窒化シリコン薄膜の走査電子顕微鏡像を図 5-12 に示す。金コロイド粒子がほぼ一様に散布されており、大規模な粒子の凝集はほとんど見られず、照射痕の観察や SVS 解析を行うのに十分な高密度散布が可能となった。このような試料に FWHM 2.0 μm の XFEL パルス照射した結果、多数の金コロイド粒子からの回折 X 線の干渉で生じる細かなスペckルパターンが観察できた(図 5-12)。また、一様高密度で散布されているために、全照射 XFEL パルスにおいて、同様の回折パターンが観測することができている。XFEL 照射後に膜表面を SEM 観察すれば、薄膜及び金コロイド粒子の消失範囲からビーム形やダメージを被る範囲の大きさを評価することができた (第四章 4.4 節参照)。

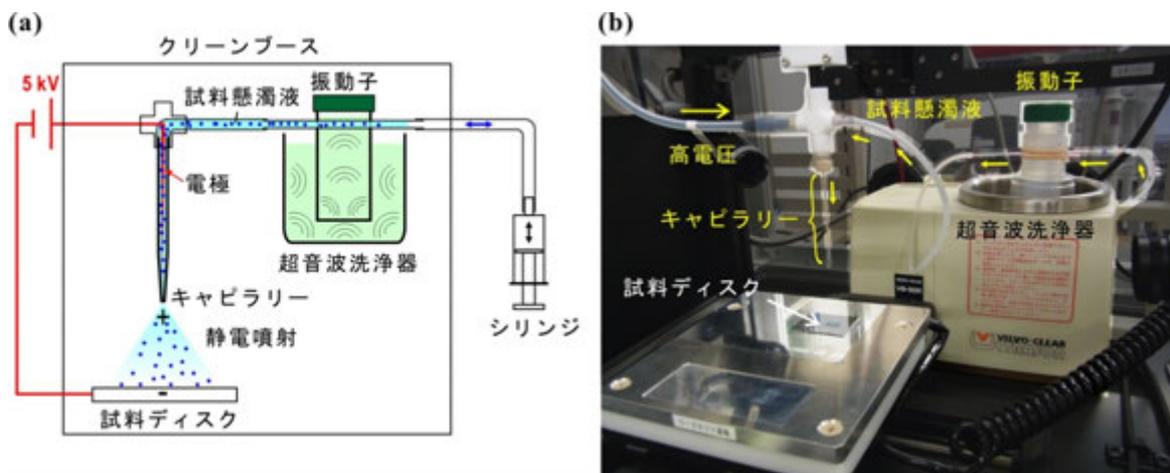


図 5-11 金コロイド粒子を散布する静電成膜装置の模式図(a)と装置内部の写真(b)

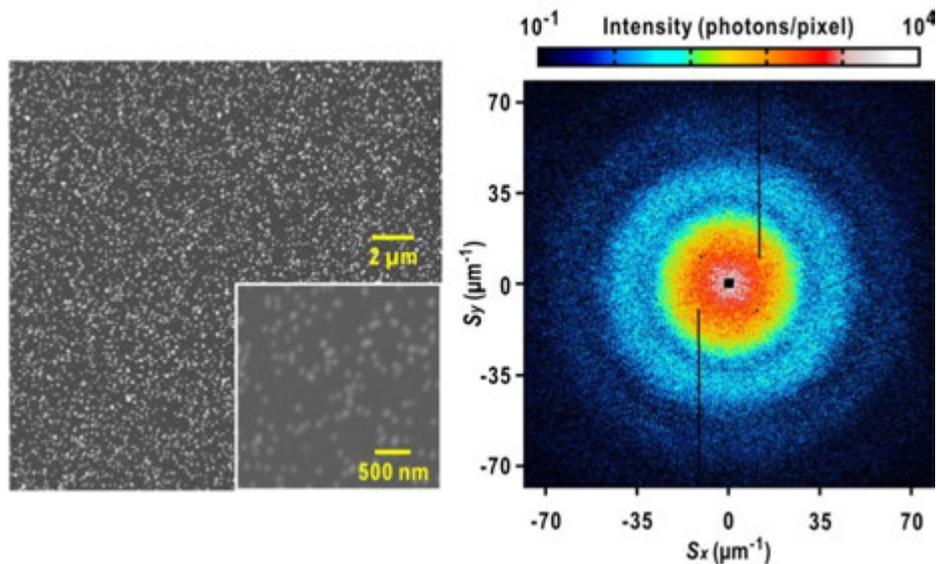


図 5-12 薄膜上に静電成膜装置を用いて高密度に散布した金コロイド粒子の SEM 像(左)と照射野に存在する多数の金コロイド粒子の回折パターン(右)。SEM 像中の白い点が金コロイド粒子である。

5.3 細胞試料の散布と凍結

クライオ試料固定照射装置「高砂六号」では、生体試料を真空中で観察するため、試料を水和凍結状態にする必要がある。試料作製では、炭素蒸着及び PLL 処理した窒化シリコン薄膜に細胞や細胞内小器官などの生体粒子試料を室温下で散布する。その際には、粒子の乾燥を防ぐことが不可欠である。本研究では、高山らが開発した湿度制御試料作製装置と液体エタン急速冷却装置[Takayama & Nakasako, 2012]を用いて試料の作製を行った(図 5-13(a))。液体エタンは冷却時に液体窒素のようにバブリングを起こさないため、試料を ~ 3700 K/s 程度の温度変化で急速冷却することが可能である。

細胞を乾燥から守るため、湿度制御試料作製装置には、水蒸気発生装置(HUM-1, RIGAKU, Japan)からシリコンチューブを経由して高湿度空気が供給され、試料作製チャンバー内の相対湿度を 90%rh 以上に保持することが可能である。同装置は、光学顕微鏡(IX71, Olympus, Japan)の試料ステージに固定されており、併設した湿度制御チャンバー内で散布作業を行う(図 5-13(b)) [Takayama & Nakasako, 2012]。装置には試料散布薄膜のフレーム(試料ディスク)を保持したピンセットを装着するための専用ホルダーを設置する。細胞試料を大面積分割窒化シリコン薄膜へ散布する際には、試料粒子懸濁液を約 5 μ L 滴下し、重力によって膜表面に沈降して、PLL 膜に吸着するまで数分待機する(図 5-3(b), 図 5-4(b))。その後、余剰な保護液をウィック紙(MiTeGen, USA)あるいは濾紙(Whatman, USA)で除去する(図 5-8(b))。望ましいと思われる液量にな

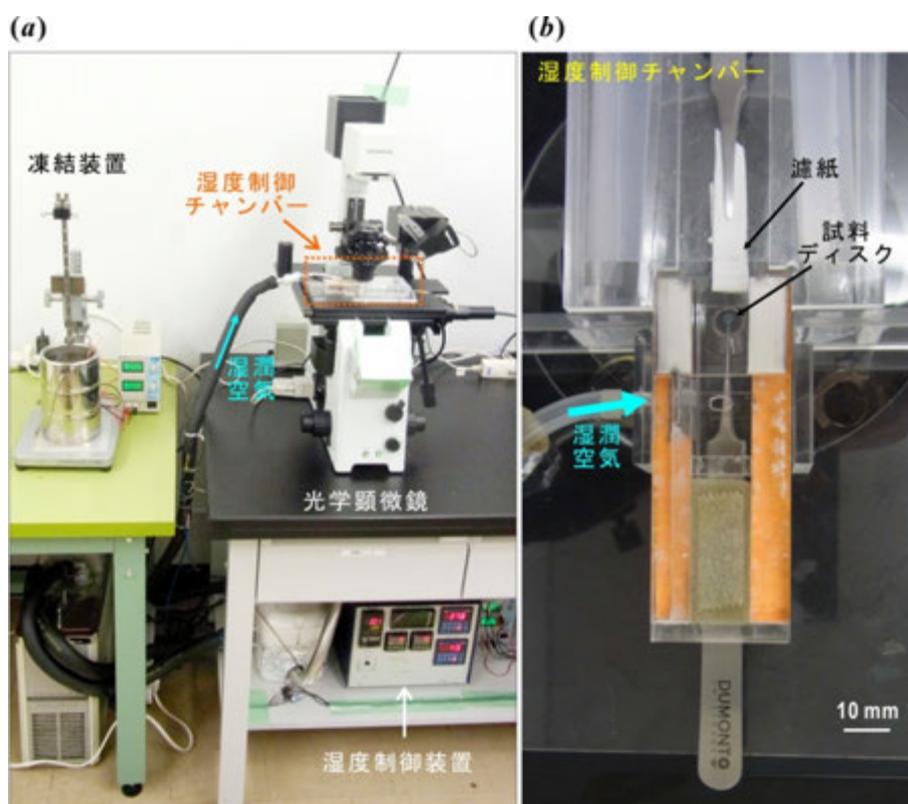


図 5-13 (a)細胞試料の散布・凍結するための装置一式。(b)湿度制御チャンバーの拡大写真

ったことを光学顕微鏡で確認後、ピンセットホルダーを湿度制御試料作製装置から取り外し、顕微鏡の脇に設置した液体エタン凍結装置まで速やかに運搬し、ホルダーを取り外して液体エタン中に落下させて急速凍結する (図 5-13(a))。

液体エタン凍結装置は、ピンセットを固定して落下させるプランジャーブロック、摩擦を最小限にしてプランジャーブロックを落下させるリニアガイド、液体エタンを作製するための液体窒素デューワーで構成される。液体エタンは、液体窒素中に設置し、77 K に冷却されたアルミ製の容器にエタンガスを吹き付けることで作製する。ただし、液体エタンの凝固点 (90 K) は、液体窒素の沸点より高いため、そのまま放置すると固体エタンになってしまう。これを防ぐために、7 Ω の電熱線ヒーター (Sakaguchi Dennetsu, Japan) に 24 V 印加して発熱させ、液体状態を保つ。

凍結した試料は、液体窒素中で、本研究用に設計し Yasuda shoten (Japan)に製作を依頼した塩化ビニル製の試料保存コンテナに収納する（図 5-13(b)）。塩化ビニルは熱収縮が小さく、液体窒素中に投入しても割れることは無い。コンテナには無色透明なアクリル製の回転スライド式カバーを用いている。このカバーは、試料を設置する部分だけにアクセスできるので、氷の混入を極力防ぐことができる。また、運搬中に試料ディスクの落下を防ぐとともにコンテナ内部の試料ディスクの有無を確認することができる。各収納部は、窒化シリコン膜と壁が接することが無いように設計してある。コンテナは、試料収納後に液体窒素中に保存し、ビームタイム直前にドライシッパーに移し、宅急便で SACLA まで運搬して実験に使用する。

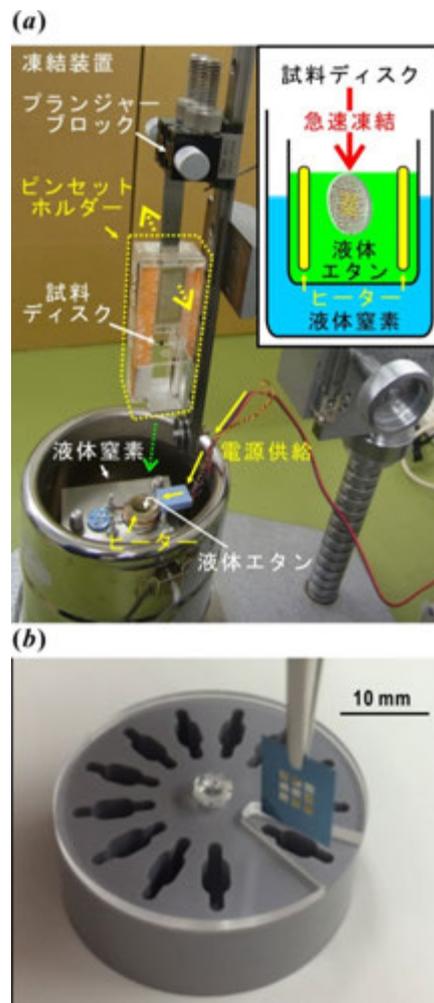


図 5-13 (a)凍結装置の拡大写真
(b)大面積分割窒化シリコン膜を保管・運搬するための試料保存コンテナ。

第六章 高砂六号と試料粒子散布手法を用いた XFEL-CXDI

実験

高砂六号(第四章)と薄膜散布試料作製方法(第五章)を用いて、XFEL-CXDI 実験を行った。本章では、高砂六号を用いて得られる回折パターン測定効率について報告すると共に[Kobayashi *et al.*, 2016a]、生体粒子試料に関して試料作製が回折パターンに与える影響について議論する[Kobayashi *et al.*, 2016b]。

6.1 光学系のセットアップと回折データ解析の方法

6.1.1 光学系のセットアップ

第四章 4.4 節で述べたように、5.5 keV XFEL パルスに対して、フォーコーテスト及びナイフエッジスキャンによって KB ミラー集光調整後、L 字シリコンフレームを用いて寄生散乱を低減した。

回折パターンは、2 台の multi-port CCD (MPCCD) 検出器で測定した。1 つは 8 つの CCD センサーから構成される MPCCD-Octal 検出器で、試料位置より 1.5 m 下流に設置した。小角領域は矩形の開口となっており、開口サイズは可動で 4 mm~9 mm を選択でき、6-190 nm 分解能領域の回折パターンを記録した。MPCCD-Octal 検出器の開口を通過した回折強度は、試料位置より 3 m 下流に設置した MPCCD-Dual 検出器で測定した。MPCCD-Dual 検出器は 2 つの CCD センサーで構成される。MPCCD-Dual 検出器前には、一辺 2 mm の鉛ビームストップを置いて透過 X 線の検出器への到達を防いだ。寄生散乱の低減により、約 500 nm までの小角分解能を達成することができた。MPCCD 検出器の 1 pixel (pixel size: 50×50 μm^2) に 2.5×10^3 photons を超える強度の 5.5 keV X 線が入ると、ダイナミックレンジを超えて計数値が飽和してしまう。特に、小角領域の回折 X 線の強度は非常に大きく、飽和を防ぐために、アルミニウム製アテネーターを置き、試料からの小角回折強度に応じて厚さを適宜変更しながら、小角回折強度を減衰させた。アテネーターは、15~100 μm (5.5 keV X 線の透過率:56~2.2%) の厚みのものが 5 種類用意し、試料ごとに切り替えて使用した。

これまでのビームタイム申請で採択された SACLA でのビームタイムは、半年に一度

の 3.5 日であった。ビームタイムでは、最初の数時間で、フーコーテスト、ナイフエッジスキャン、寄生散乱除去を行う。まず、最初の 6 時間程を要して、酸化銅キューブや金コロイド粒子の回折パターンを室温で測定した(第五章 5.2 節)。その後、液体窒素をデュワーに充填して低温ポットを冷却後、酵母細胞核やシアノバクテリアなどの生体粒子凍結水和試料の回折パターンを記録した。

6.1.2 回折データ解析

ラスタースキャンによって測定された回折パターンは、自動解析プログラム G-SITTENNO [Sekiguchi *et al.*, 2014a; 2014b]によって処理した。G-SITTENNO は、ラスタースキャンが完了した直後から、暗電流バックグラウンドの減算、Friedel 中心対称性の評価、二つの MPCCD 検出器で同時に記録された回折パターン統合を、順次自動処理する。統合された回折パターンに対して、ASURA [Sekiguchi *et al.*, 2016]を用いて、投影電子密度像を回復した。G-SITTENNO による自動データ処理は、SACLA が管理するスーパーコンピューターシステム SACLA-HPC (Intel Xeon(R)CPU X5690(3.47GHz/core)を 960 コアで構成)上で、また、ASURA による位相回復等の一連の計算は、ミニ京スーパーコンピューターシステム(Fujitsu SPARC64™IXfx CPU(1.848GHz/core)を 6144 コアで構成)上で行った。

6.2 結果

6.2.1 XFEL パルスの利用効率

図 6-1 (a)に 2017 年 7 月の XFEL-CXDI 実験の時刻に対して使用した XFEL パルス数の積算値を示す。積算値の傾きが XFEL パルスの利用効率を示している。例えば、デュワーへの液体窒素の充填及び低温ポットの冷却やナイフエッジスキャン、検出器のトラブル復旧の際は、回折パターンを測定しないため、この傾きは 0 になるが、これらの作業以外の時刻では、傾きに大きな変化は見られない。制御ソフトウェアの完備によって、高砂六号を高効率で運用できていることを示している。

図 6-1 (a)の下図のように拡大して表示すると各々の作業で費やす時間を確認することができる。真空槽への試料の搬入出や望遠鏡を用いてのラスタースキャン範囲の指定、ナイフエッジスキャン、液体窒素の補充の作業以外にも時間を費やしていることがわかる。例えば、G-SITTENNO [Sekiguchi *et al.*, 2014b]で出力された回折データを確認し、

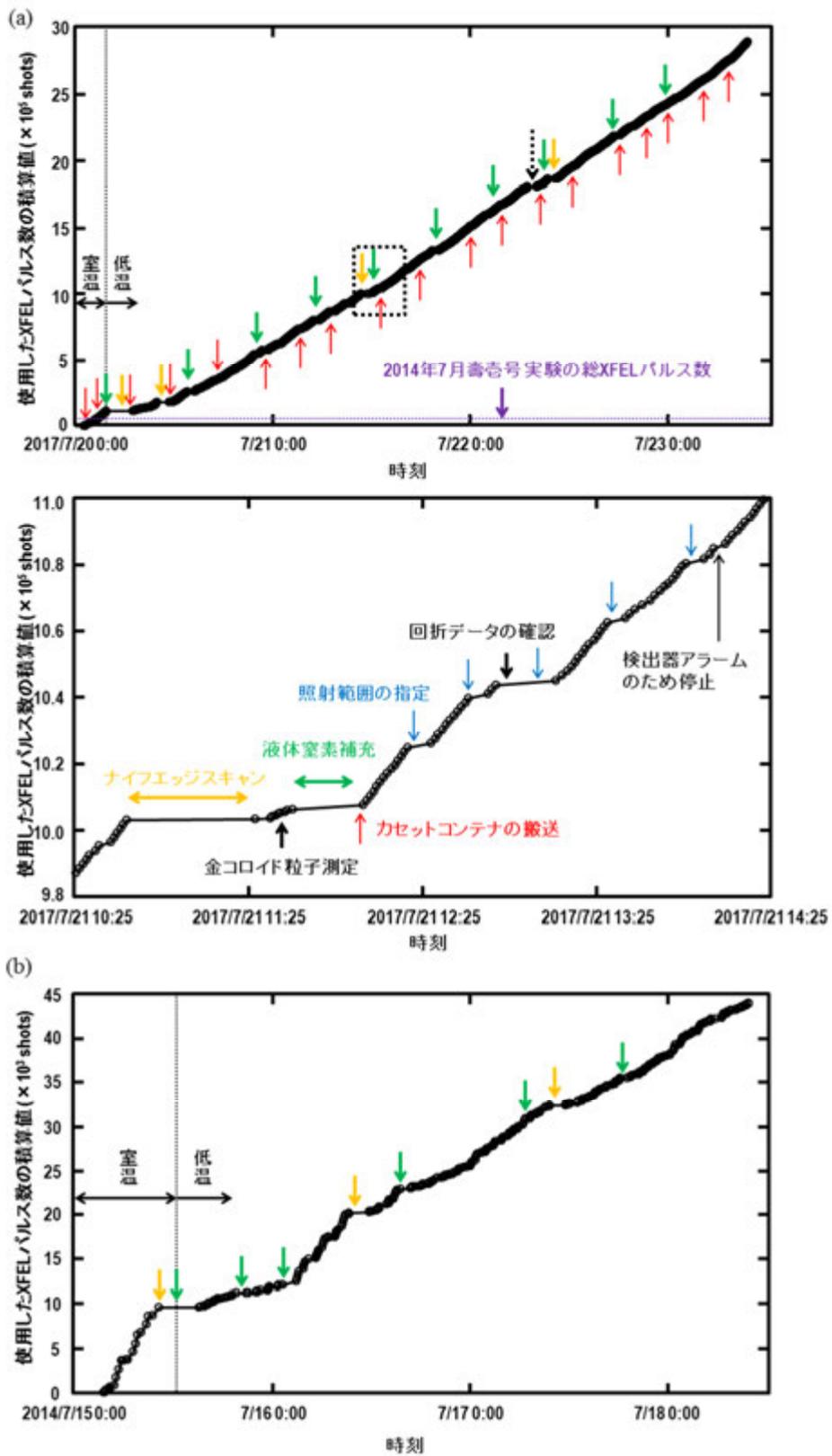


図 6-1 (図説は次のページへ)

(図 6-1 の図説) (a) 上図は 2017 年 7 月に高砂六号を用いた XFEL-CXDI 実験において使用した XFEL パルス数積算値。緑、橙、赤の矢印は、それぞれ、液体窒素デュワー充填、ナイフエッジスキャン、真空槽への試料搬送を示す。点線黒矢印は検出器のトラブルがあった時刻を示す。下図は上図の点線枠の付近 4 時間分を拡大したものである。望遠鏡を用いての XFEL 照射範囲の指定の作業では、薄膜の表面に多量の氷が残っていないかすべての薄膜で確認する。この作業を怠ると検出器に分厚い氷による回折強度が照射され、検出器を痛めてしまう恐れがある。“回折データの確認”は適当なアテネーターを検討するために時間をとった。検出器は飽和した回折データが連続して観測するとアラームを発する。アラームが鳴った場合、スキャンは制御ソフトウェアで停止する。(b) 2014 年 7 月に実施された壽壺号を用いての XFEL-CXDI 実験において使用した XFEL パルス数の時刻に対する積算値。矢印の示す位置及び色は(a)と同じであるが、試料の真空槽への搬送(赤矢印)については頻度が多いため省略した。

アテネーターなどの測定条件を検討する時間も含まれる。また、検出器やビームラインの光学系の調整が安定しない場合、XFEL 照射を停止せざるを得ない場合もある。このビームタイムでは、約 80 時間で 2,902,539 shots の XFEL パルスを使用しており、ビームタイム中に供給される全 XFEL パルス(30 Hz×80 h)の 34%を利用したことになる。

比較のため、SACLA 利用開始時に運用していた前世代機『壽壺号』(中迫と山本によって開発)について、同様の積算パルス数を図 6-1 (b)に示した。壽壺号では、液体窒素からの試料マウント作業が必要な低温実験において、XFEL パルス利用効率が室温と比較して約 24%低下している。それに対して、高砂六号では、カセットコンテナと効率的な試料ホルダー交換を可能とする制御ソフトウェア(「Sample mount パネル」、第四章 4.3.6 節)によって、低温でも室温と大差ない XFEL パルス使用効率が達成できている。

単位時間あたりの XFEL パルス利用効率の点に着目すれば、高砂六号の導入による効率的な XFEL パルス利用がより鮮明となる。高砂六号における一時間あたりの XFEL パルス使用効率、試料からの回折パターンの取得効率は、壽壺号と比較して 22~71 倍

となっている。その結果、高砂六号は、壽壺号で利用したビームタイム中の XFEL パルス総数を 1 時間半程度で利用できている (図 6-1 (a))。試料の散布数密度にも依存するが、回折パターンの取得率は 14~83 倍に向上している。大面積試料ディスク(第四章 4.2.1 節, 第五章 5.1.4 節))を主流とした 2016 年 2 月実験以降では、総 XFEL パルス数が 6~9 倍に増加した。

6.2.2 XFEL パルスの試料粒子へのヒット率

照射したすべての XFEL パルスについて、試料からの回折パターンが得られるわけではない。なぜなら、図 6-2(a)のように試料粒子は薄膜上でランダムな位置に吸着しており、一定の照射間隔でスキャンする場合、照射野に試料粒子が必ず入るわけではないためである。また、照射野に入る試料粒子の数は 1 つとは限らない。さらに、ビームプロファイルは強度が一様な平面波ではないため(第四章 4.4 節 図 4-25)、照射野の中心に試料粒子が配置している場合と比べて照射野の裾野に試料粒子が配置している場合は回折強度が小さくなる(図 6-2(b))。以上のような観点から本研究で取得される回折データについて以下のように 5 つに分類できると予想した。

1. **[single (high quality)]** 単粒子が照射野の中心に配置しており、S/N 比良く回折強度が得られている回折パターン。
2. **[single (low quality)]** 単粒子に XFEL パルスがヒットしているが、照射野の裾野に配置されているため、回折強度が弱く、S/N 比が悪い。高角領域はシグナルがノイズに埋もれてしまうため、分解能の高い投影電子密度像は回復できない。
3. **[aggregation]** 照射野に複数の粒子が凝集して存在している場合に得られる回折パターン。凝集体は散乱断面積が大きいため、S/N 比の良い回折パターンが得られる。また、スペックルサイズ $D_x = \frac{\lambda L}{d_x}$ (第二章 2.3.4 節 式(2.27), λ :波長, L :カメラ長) は、試料サイズ d_x の大きい凝集体の場合、単粒子からの回折パターンより小さくなる。
4. **[saturation]** 検出器が飽和を起こすほど回折強度が強い回折パターン。照射野の中心に凝集体が配置している場合、著しく回折強度が強くなる。同じ粒子数(同じスペックルサイズ)でも aggregation と saturation どちらの可能性もある。
5. **[miss]** 照射野に試料粒子が存在しない。回折強度は極めて弱くなる。

表 6-1 各ビームタイムにおける試料数と測定効率

ビームタイム	2014年7月	2015年3月	2015年7月	2016年2月	2016年7月	2017年2月	2017年7月
回折装置	壽巻号	高砂六号	高砂六号	高砂六号	高砂六号	高砂六号	高砂六号
パルスサイクル	1 Hz	10 Hz ¹	30 Hz	30 Hz	30 Hz	30 Hz	30 Hz
試料の真空槽への搬送回数	113	23	15	18	19	18	19
搬送した試料ホルダーの数	113	266	153	192	202	194	209
φ3 mm の試料ディスク	113	266	438	6	6	6	0
大面積試料ディスク		0	32	186	196	188	209
ラスタースキャンの回数	467	1182	1197	1479	2056	2099	2225
使用した XFEL パルス数	44,841	212,793	314,528	1,938,225	2,592,100	2,464,396	2,902,539
試料からの回折パターン の枚数	25,185	52,488	158,823	930,055	1,621,216	1,285,720	993,292
1時間あたりの XFEL パルス数 (最大値)	630	14,199	21,969	31,144	37,061	33,375	45,077
1時間あたりの 回折パターンの取得数 ²	332	4,746	11,990	20,984	26,997	24,350	27,605

¹ 2015年3月の実験では試験段階にあったため、10 Hz のパルスサイクルで運転していた。

² $25 \mu\text{m}^{-1}$ より高分解能領域に 4 photons 以上のピクセルが 3 つ以上を観測した検出器データを試料からの回折パターンとしている[関口, 2016]。

本研究で得られた回折データについても回折強度や分解能について分類し、どれほどの割合で解析に足る回折パターンが得れるのか調べた。金属材料試料として平均サイズ 300 nm 程度の酸化銅キューブ、低温測定細胞試料として大きさ約 1 μm の酵母細胞核を用いた。酸化銅キューブは、第五章 5.2.1 節の方法に従って、薄膜上 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ に 5~8 個の粒子となるように散布した。酵母細胞核については *Saccharomyces cerevisiae* strain BY4741 (MATa, haploid) から Szent-Gyorgi & Isenberg と Shimizu らのプロトコル[Szent-Gyorgi & Isenberg, 1983; Shimizu *et al.*, 1991]に従って単離した細胞核を、第五章 5.3 節で述べた手順に従って、密度 5~8 粒子/ $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ となるように散布した。

回折パターンは強度やスペックルサイズ(第二章 式(2.20))を考慮して以上のように 5 つのクラスに分類した。まず、経験から[関口, 2016]、 $25 \mu\text{m}^{-1}$ より高分解能領域に 4 photons 上のピクセルを 3 つ以上観測し、回折パターン上の全てのピクセルの値を積算した総回折強度が 10^5 photons を超える回折パターンを hit クラス、回折強度の小さいその他のデータは、試料に XFEL パルスが照射されなかったものと考え、miss クラスとした。さらに、hit クラスの回折パターンは、図 6-2(c), (d)のように high-quality single-hit, low-quality single-hit, aggregation-hit, saturation-hit の四クラスに分類した。酸化銅キューブの単粒子であれば、矩形開口の Fraunhofer 回折パターンが現れるため、single-hit/ aggregation-hit の判定は容易である。酵母細胞核に関しては、蛍光顕微鏡観察で大きさが約 1 μm であることがわかっているため[関口, 2016]、単粒子に XFEL パルスが照射された際に生じる回折パターンの予想されるスペックルサイズ約 $1 \mu\text{m}^{-1}$ を指標とし、single-hit/ aggregation-hit の判定を行った。high-quality または low-quality single-hit は、単粒子に XFEL パルスが当たった回折パターンで、その中で、観測された回折強度が特に大きいものを high-quality クラスとした。saturation-hit は、検出器が測定できる限界(5.5 keV の X 線の場合、 2.5×10^3 photons/pixel)以上の回折強度が入射され、飽和したピクセルが 30 pixels 以上ある回折パターンである。saturation-hit に分類される回折パターンは、総回折強度が、他クラスの回折パターンに比べて 1 桁ほど大きかった(表 6-2)。

図 6-2(e)及び(f)は、それぞれ、酸化銅キューブ及び酵母細胞核について、ラスタースキャン中の連続した 1000 shots における回折パターンの分類結果であり、表 6-2 には、クラスごとに回折パターン上の全ピクセルの強度値を積算した総回折強度を示す。ただし、saturation-hit については飽和したピクセルの値を 0 として計算した総回折強度を示している。

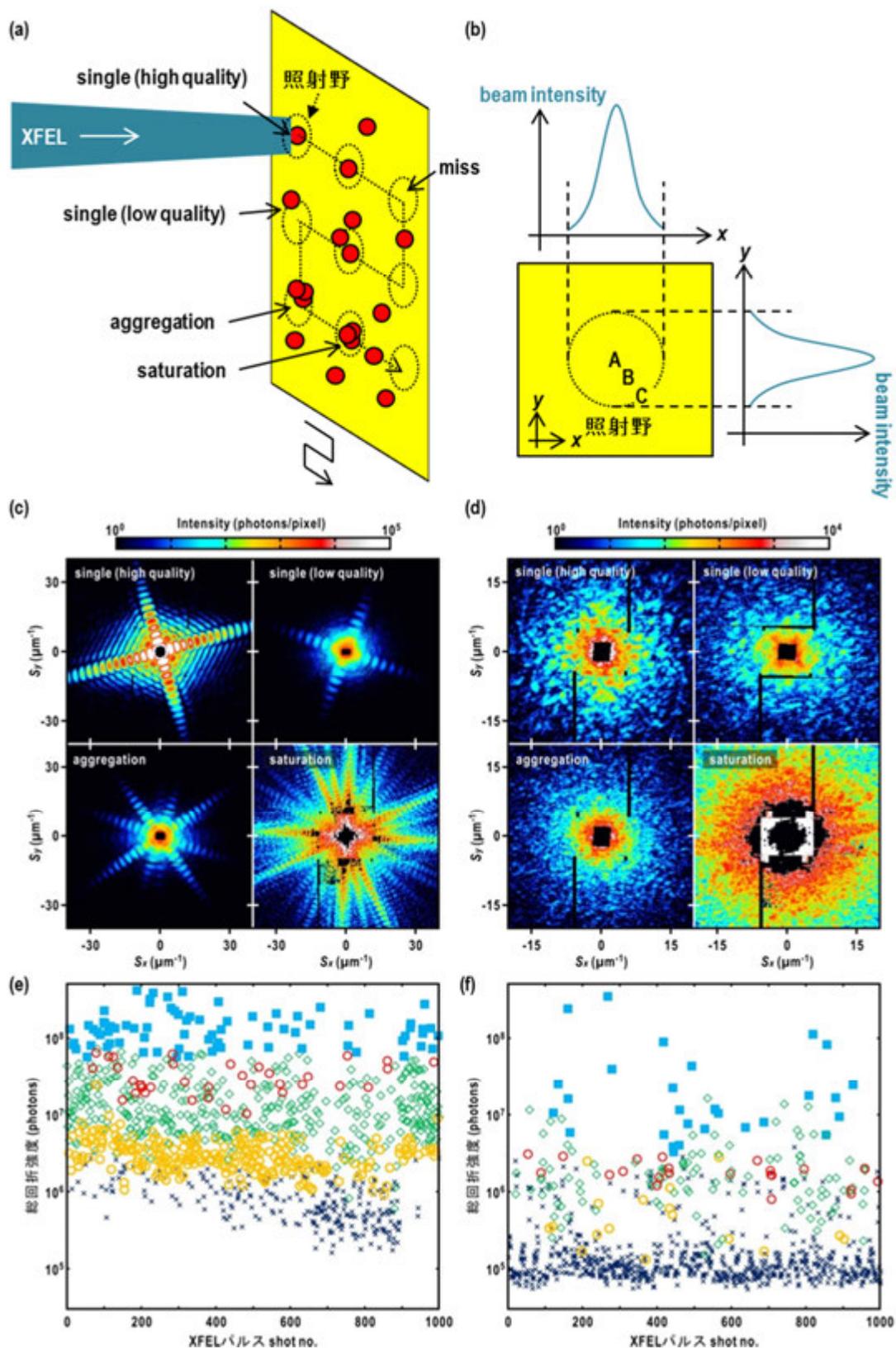


図 6-2(a) 薄膜にランダムに散布された試料粒子に対して XFEL パルスをスキャンする様子を示した模式図。(図説の続きは次ページへ)

(図 6-2 の図説続き)(b)照射野と試料粒子の相対配置による入射強度の強弱を説明した模式図。位置 A, B, C の順に入射強度が強くなり、回折強度も強くなると考えられる。酸化銅キューブ(c)と酵母細胞核(d)について回折パターンを分類した。ラスターキャン中の連続した 1000 shots に対する総回折強度を酸化銅キューブ(e)と酵母細胞核(f)についてプロットした。紺マーカーは miss、赤マーカーは high-quality single-hit、橙マーカーは low-quality single-hit、緑マーカーは aggregation-hit、青マーカーは saturation-hit を示す。

図 6-2 (c)の 700-900 番目のショットでは miss クラスが多く、試料散布数密度の低い領域をスキャンしたためと考えられた。一方、900 shot 以降のように、ほとんど全ての XFEL パルスが試料粒子にヒットする領域では、散布数密度が高いと思われる。酸化銅キューブは、散乱断面積が大きく、酵母細胞核に比べて hit クラスに分類される割合が高い (表 6-2)。一方、大きさが約 1 μm の酵母細胞核が、プロファイルの FWHM が約 2 μm の XFEL パルス中に完浴する確率が低く、high-quality single-hit 回折パターンは 3.1%である。high-quality single-hit クラスの回折パターン取得数を増やすためには、母数を増やすことが一つの解決策であり、短時間で大量の XFEL パルスを照射することができる高砂六号の有用性は高い。

表 6-2 回折パターンの全てのピクセルの値を積算した総回折強度の範囲と分類ごとの割合

試料	酸化銅キューブ	酵母細胞核
XFEL パルス数	21984	111743
測定時間 ¹ (min)	12	62
Miss % / intensity range ^a (photons)	26.7 / 0.2-2.5 $\times 10^6$	64.7 / 0.04-2.8 $\times 10^6$
Hit % / intensity range (photons)	62.9 / 0.1-5.5 $\times 10^7$	14.1 / 0.1-1.6 $\times 10^7$
Saturation % / intensity range (photons)	10.4 / 0.7-4.1 $\times 10^8$	21.2 / 0.4-3.4 $\times 10^8$
High quality % / intensity range (photons)	5.2 / 1.1-5.6 $\times 10^7$	3.1 / 0.1-0.3 $\times 10^7$

¹ 試料ディスクの装着・交換の時間も含まれる。

4 photons 以上のピクセルを三つ以上観測した最高角領域を最高分解能として、総回折強度との相関をとった (図 6-3)。最高分解能が大きくなれば、当然、総回折強度も大きくなることが予想される。実際、図 6-3 (a)傾き①のように酸化銅キューブで、その相関関係が確認された。しかし、最高分解能が $40 \mu\text{m}^{-1}$ を超えると saturation-hit が増加して、飽和ピクセルの強度が反映されないため、総回折強度は小さ目に見積もられる (図 6-3 (a)傾き②)。High-quality single-hit は、ちょうどこの変化が生じる領域に分布しており、少しでも回折強度が大きくなれば、saturation-hit に転じる可能性が高い。酵母細胞核については、 $50 \mu\text{m}^{-1}$ 以上の高い分解能領域まで回折強度を観測できたとしても、検出器飽和によるデータ欠損によって位相回復が困難な回折パターンとなってしまう。一つの対策として、ダイナミックレンジの広い検出器を用いることができれば、現在 saturation-hit となっている回折パターンが high-quality single-hit となり、良好な回折パターンの割合を向上させることが期待できる。例えば、近年開発された SOPHIAS (Silicon-On-Insulator Photon imaging Array Sensor) は 5.5 keV の X 線を 7×10^6 photons/pixel (ピクセルサイズ $30 \times 30 \mu\text{m}^2$) まで測定することが可能である [Hatsui *et al.*, 2013]。しかしながら、図 6-3 の二次元ヒストグラムマップが示すように miss や aggregation-hit の割合は高く、単粒子に XFEL パルスが照射されるよう対策を講じる必要があるだろう。

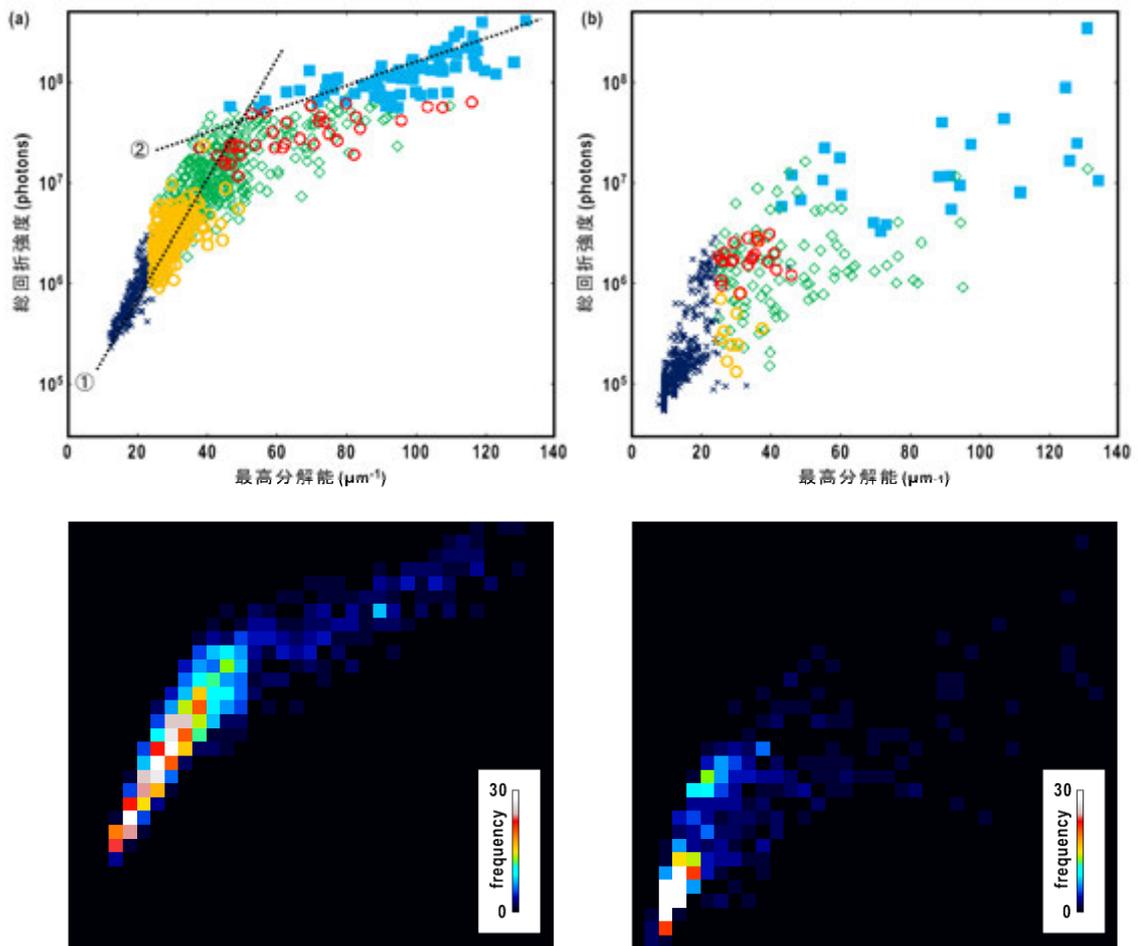


図 6-3 XFEL パルス 1000 shots 中の酸化銅キューブ(a)と酵母細胞核(b)における総回折強度と最高分解能の関係。最高分解能は 4 photons 以上のピクセルを 3 つ以上観測した回折データ領域で最も高角の領域である。図 6-2 と同じく、紺マーカーは miss、赤マーカーは high-quality single-hit、橙マーカーは low-quality single-hit、緑マーカーは aggregation-hit、青マーカーは saturation-hit を示す。下段はそれぞれの二次元ヒストグラムマップである。

6.2.3 薄膜上に残る培養液の量が細胞試料の回折パターンに与える影響

シアノバクテリア *Prochlorococcus* strain NIES-2087 (National Institute for Environmental Studies) を細胞試料として用い、試料作製法を評価した。国立環境研究所にて、培養液 PRO-99 (Moore *et al.*, 2007) で培養された菌株を、研究室に届いたその日あるいは翌日に散布・凍結した。薄膜上での散布密度は、約 5~8 個/10×10 μm² となるように、遠心操作によって培養液中の細胞の濃度及び懸濁液滴下時間を調整した。

シアノバクテリアの大きさは光学顕微鏡下で $1\ \mu\text{m}$ 弱であることがわかっているが、さらに統計学的なサイズ分布を評価するため、動的光散乱法による測定を Zetasizer Nano S (Malvern, UK)を用いて行った。

図 6-4(a)は、細胞の厚みと同程度の液厚となるように培養液を取り除いた薄膜試料からの回折パターンである。スペックルサイズは、散乱ベクトルの大きさを約 $1.3\ \mu\text{m}^{-1}$ であり、実空間で約 $780\ \text{nm}$ の大きさの粒子からのものであると解釈できる。この大きさは、光学顕微鏡下で観察されるシアノバクテリアと同程度である。同じ薄膜試料から同様の回折パターンが複数取得されたことから、適切な液量であったと考えられる。この薄膜試料をスキャンし得られたすべての回折パターン 14,512 枚について、逆空間分解能が $40\ \mu\text{m}^{-1}$ 以下の全ピクセルの強度値を積算した総回折強度と、4 photons 以上のピクセルを 3 つ以上観測できた最高角領域を最高分解能として、それらの頻度分布を求めた。その結果、総回折強度は 10^5 photons、最高分解能は $\sim 50\ \text{nm}$ の回折パターンが多く分布することがわかった。

故意に乾燥させ、培養液がほとんど残っていない状態で凍結した薄膜試料では、回折パターンのスペックルサイズが大きく、回復像は $300\ \text{nm} \times 90\ \text{nm}$ の楕円形であった (図 6-4(b))。これは、適切量で調整した試料の回折パターンから得られた回復像 (図 6-4(a)) の半分以下の大きさである。さらに、電子顕微鏡で得られる *Prochlorococcus* strain MIT9313 の像 [Grassucci *et al.*, 2007] と形・大きさが異なる。スキャンで得られた 93 枚の回折パターンの多くは総回折強度が 10^4 photons と小さく、最高分解能は $100\ \text{nm}$ と低かった。この結果は、乾燥による散乱断面積の低下、乾燥に伴う収縮に起因すると考えられた。

培養液残量が多い場合、適切液量試料に比べて場合と比べ、回折パターンのスペックルサイズが $1/3$ に減少した (図 6-4(c))。液量が増加した分、散乱断面積も大きくなるため、総回折強度は、適切液量試料 (図 6-4(a)) と比べて 10-1000 倍に増大し、1,019 枚の回折パターンのほとんどが、最高分解能 $20\ \text{nm}$ までスペックルパターンを与えた。スペックルサイズから大きな物体に XFEL パルスが照射されたことがわかるが、これは複数の細胞が液膜中で重なって頻繁に照射されるようになったものと考えられる。また、培養液自体からの回折も強くなることから、不均一な液厚は細胞試料の回折パターンに影響すると考えられる。このような回折パターンは OS 比が小さく、位相回復がほぼ不可能であった。

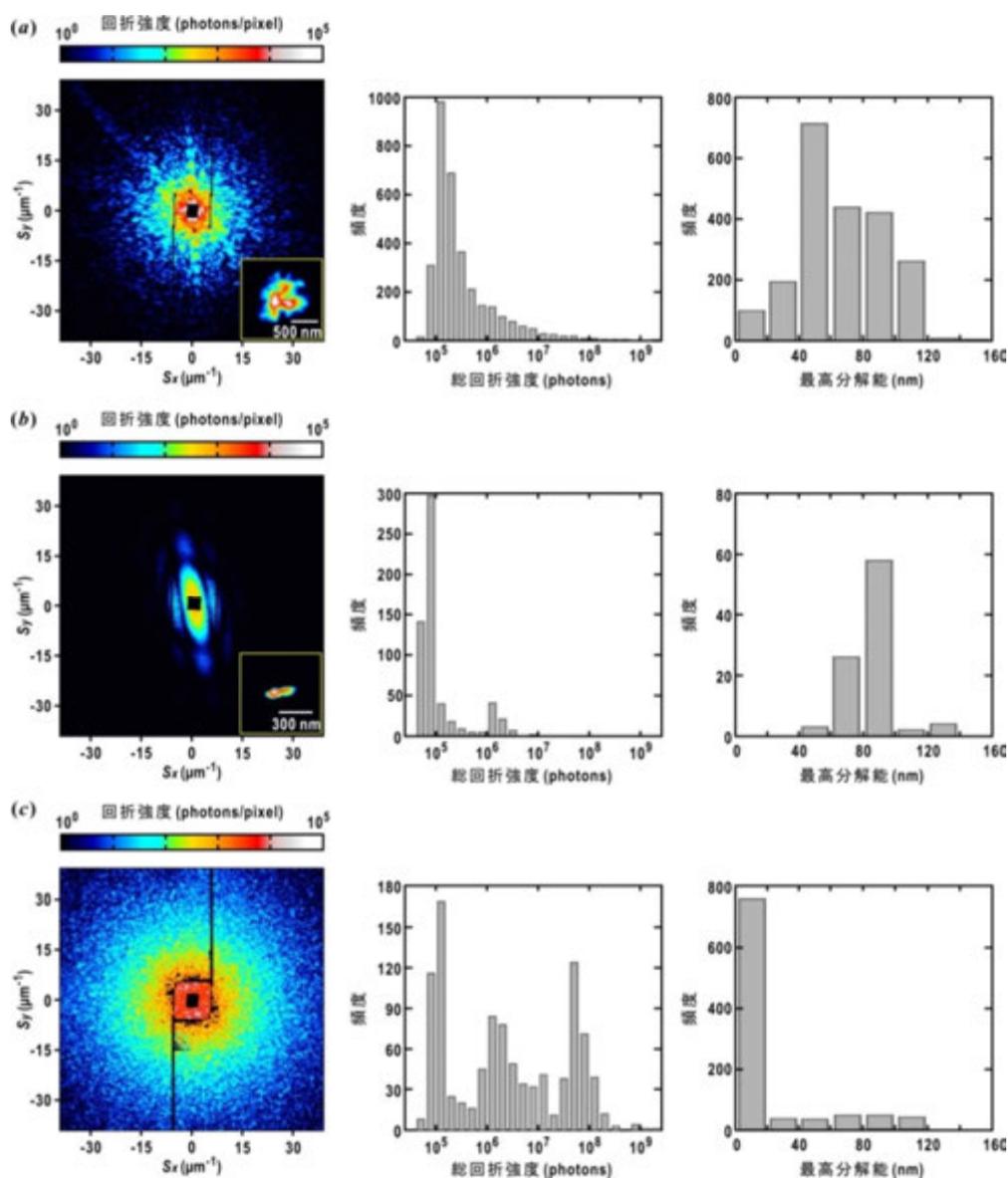


図 6-4 シアノバクテリアの回折パターン (左)、回折パターンの総回折強度 (中央) 及び最高分解能 (右) に対する統計分布。薄膜に残った培養液の量について、それぞれ適切な液量の場合(a)、乾燥して液が残っていない場合(b)、多量な場合(c)である。(a), (b)の回折パターン中の差し込み図は、それぞれのパターンから回復した投影電子密度像である。回折パターン及び回復像のパラメータは表 6-3 に示す。

生体粒子をランダムに散布した薄膜試料の場合(図 6-5(a))、S/N 比が良好で像回復に値する図 6-4 (a)のような回折パターンの割合は 1.2%の割合で得られた。一方、PLL 局所的処理により 6.4 μm の間隔で格子状に散布した薄膜に 25 μm のスキャン幅で XFEL パルスを照射した場合(図 6-5 (b))、その割合は 2.4%に改善された。また、格子状散布

した薄膜からは図 6-4 (c)のように培養液量が余剰に残ることで生じる回折パターンはほとんど観測されなかった。これは、薄膜上の PLL 非結合疎水性領域では、培養液が撥水されるためと考えられる。実際、培養液を容易に除去できることを確認している。また、一点の PLL 処理範囲が $3\ \mu\text{m}$ 以下と限定されるため、複数凝集した細胞からの回折パターンはほとんど得られない。従って、PLL 局所的処理による格子状試料散布は、良質な回折パターンをより多く測定できる試料散布方法といえる。

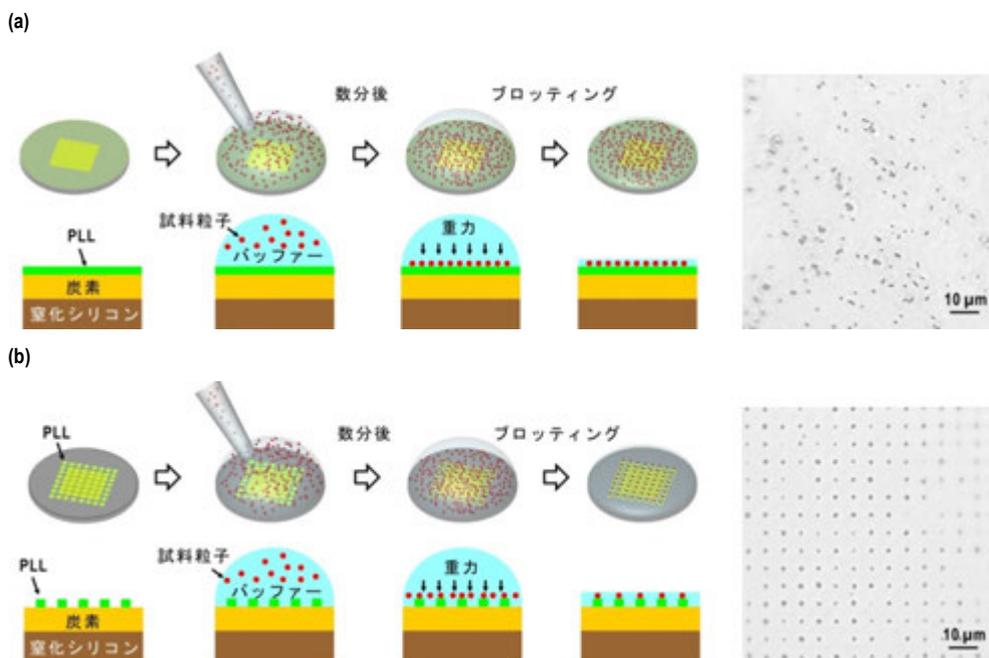


図 6-5 (第五章 図 5-3 , 図 5-4 の再録) (a)一面に PLL 処理した薄膜への細胞試料の散布手順。右は散布したシアノバクテリアの光学顕微鏡像。シアノバクテリアの吸着位置はランダムである。(b) アレイ格子状のスポットに PLL 処理した薄膜への細胞試料の散布手順。シアノバクテリアは格子状に整列する。

表 6-3 図 6-4 の回折パターンと回復像のパラメータ

回折パターン	図 6-4 (a)	図 6-4 (b)
$C_{\text{sym}}^{\text{a}}$	0.85	0.46
最高分解能 ^b (nm)	20.0	50.1
ASURA で決定した最頻のクラス内の所属投影像数	204	212
OS 比 ^c	14.1	321.3
R_{F}^{d}	0.31	0.34
PRTF で評価した有効分解能 (nm)	136.9	18.2

$$^{\text{a}} C_{\text{sym}} = (E - O)/(E + O), \quad E = \sum_{x,y} [I_0(x,y) + I_{\text{sym}}(-x,-y)]^2, \quad O = \sum_{x,y} [I_0(x,y) - I_{\text{sym}}(-x,-y)]^2$$

ここで、 $I_0(x,y)$ は 100×100 pixels の ROI 中の回折強度であり、 $I_{\text{sym}}(-x,-y)$ は Friedel 対となる ROI 中の回折強度である。完全に対象であれば、 C_{sym} は 1 になる [Sekiguchi *et al.*, 2014a]。

^b 4 photons 以上のピクセルを 3 つ以上観測した回折データ領域で最も高角の領域の示す分解能

^c OS 比は回復像のピクセル数と回折パターンのピクセル数の比で算出した。

^d $R_{\text{F}} = \Sigma \|F_{\text{obs}}\| - K \|F_{\text{calc}}\| / \Sigma \|F_{\text{obs}}\|$ 。 $|F_{\text{calc}}|$ は回復像から計算される構造振幅である。
 $|F_{\text{obs}}|$ は実験で得られた回折強度から計算される構造振幅である。 K はスケール係数である。

6.2.4 シアノバクテリアのサイズ分布と投影構造

図 6-4(a)、図 6-6(a)-(c) のようなスペックルサイズ、総回折強度、最高分解能においてシアノバクテリアを解析する上で良質な回折パターンから、位相回復プロトコル ASURA [Sekiguchi *et al.*, 2016] によって 63 枚の投影電子密度像が得られた。有効分解能は PRTF (第二章 2.4.6 節) の評価で 150 nm よりも高い分解能であった(表 6-4)。

図 6-6(a)-(c) の回復像は、概形は 0.3-0.4 a.u. の電子密度の範囲で区切られ、円形あるいは楕円形をしている。その内部は 0.4-1.0 a.u. で分布しており、~500 nm の大きさの C 字型構造が確認された。このように C 字型の構造が確認できるものが 63 枚中 10 枚あった。この領域はクライオ電子顕微鏡観察で得られた静電ポテンシャルマップ [Ting

et al., 2007]と比較すると、チラコイド膜に相当する分布であると推定された。シアノバクテリアの機能構造に関する考察は、三次元構造について言及する第八章で後述する。

次に図 6-7(a)に示すような手順で 63 枚の投影電子密度像についてサイズを測定した。

1. 投影電子密度像の 0.25 a.u.を閾値として、これより大きい電子密度領域を 1、小さい領域を 0 とする(二値化)。
2. 二値化した領域の面積(ピクセル数)を測定。面積を A_s とおく。
3. 測定した面積と同じ面積の円の直径 $d = \sqrt{4A_s/\pi}$ を投影電子密度のサイズとする。

図 6-7(b)は、上記の方法で求めたシアノバクテリアの投影電子密度像のサイズ分布である。この分布からシアノバクテリアの大きさは、 775 ± 38 nm と算出され、動的光散乱で測定した培養液中のシアノバクテリアのサイズ分布 (780 ± 230 nm) の範囲内であるとともに、光学顕微鏡で得られたシアノバクテリア像の大きさと整合した(図 6-7(c))。

表 6-4 図 6-6 の回折パターンと回復像のパラメータ

回折パターン	図 6-6 (a)	図 6-6 (b)	図 6-6(c)
C_{sym}	0.86	0.81	0.74
最高分解能 (nm)	13.5	17.6	28.7
ASURA で決定した最頻のクラス内の所属 投影像数	194	167	138
OS 比	11.1	14.6	15.8
R_F	0.33	0.32	0.36
PRTF で評価した有効分解能 (nm)	126.4	99.6	137

パラメータの詳細は、表 6-3 を参照。

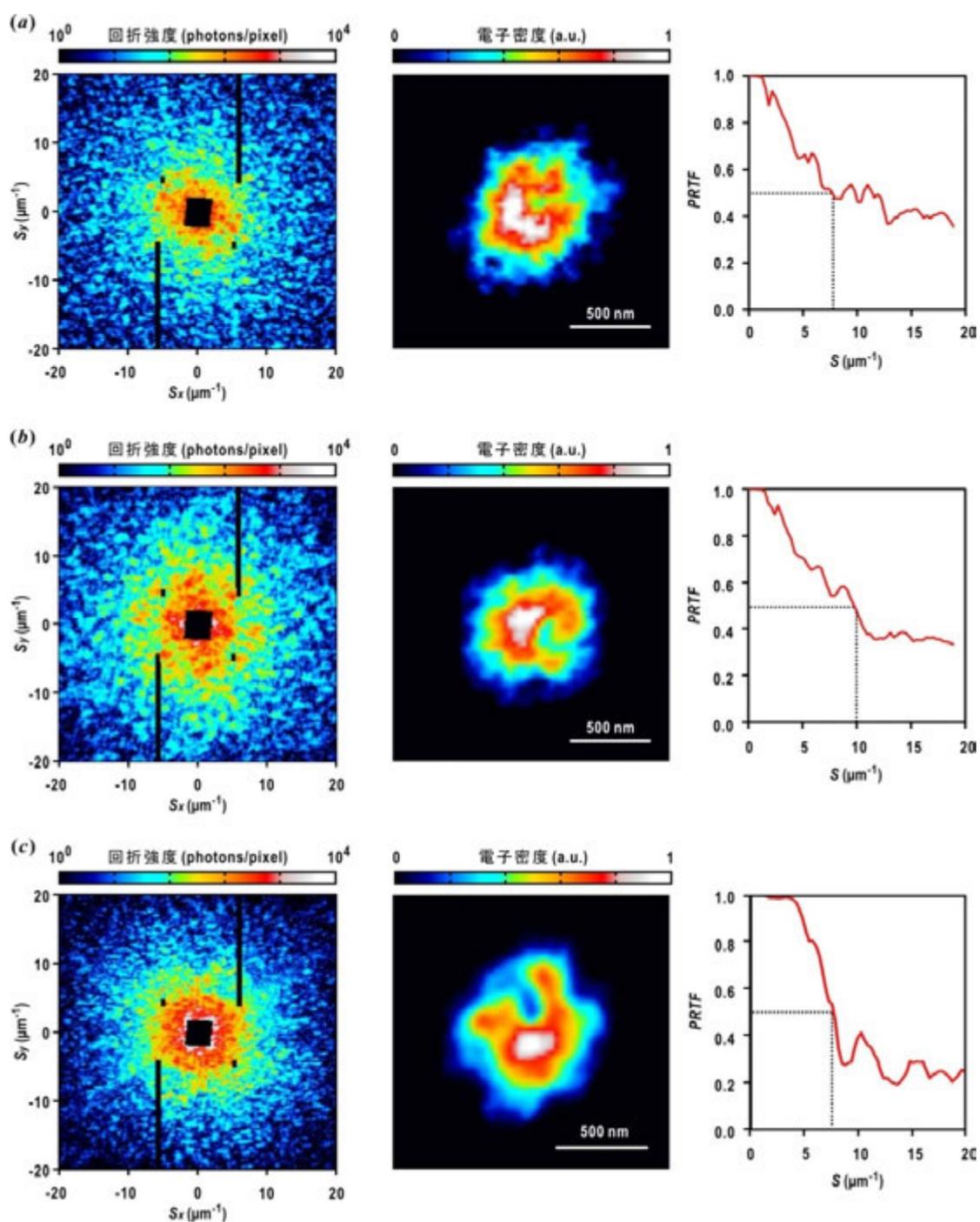


図 6-6 (a), (b), (c)シアノバクテリアの代表的な回折パターン（左）と回復した投影電子密度像（中央）、PRTF（右）。回折パターン及び投影電子密度像のパラメータは、表 6-4 に示す。

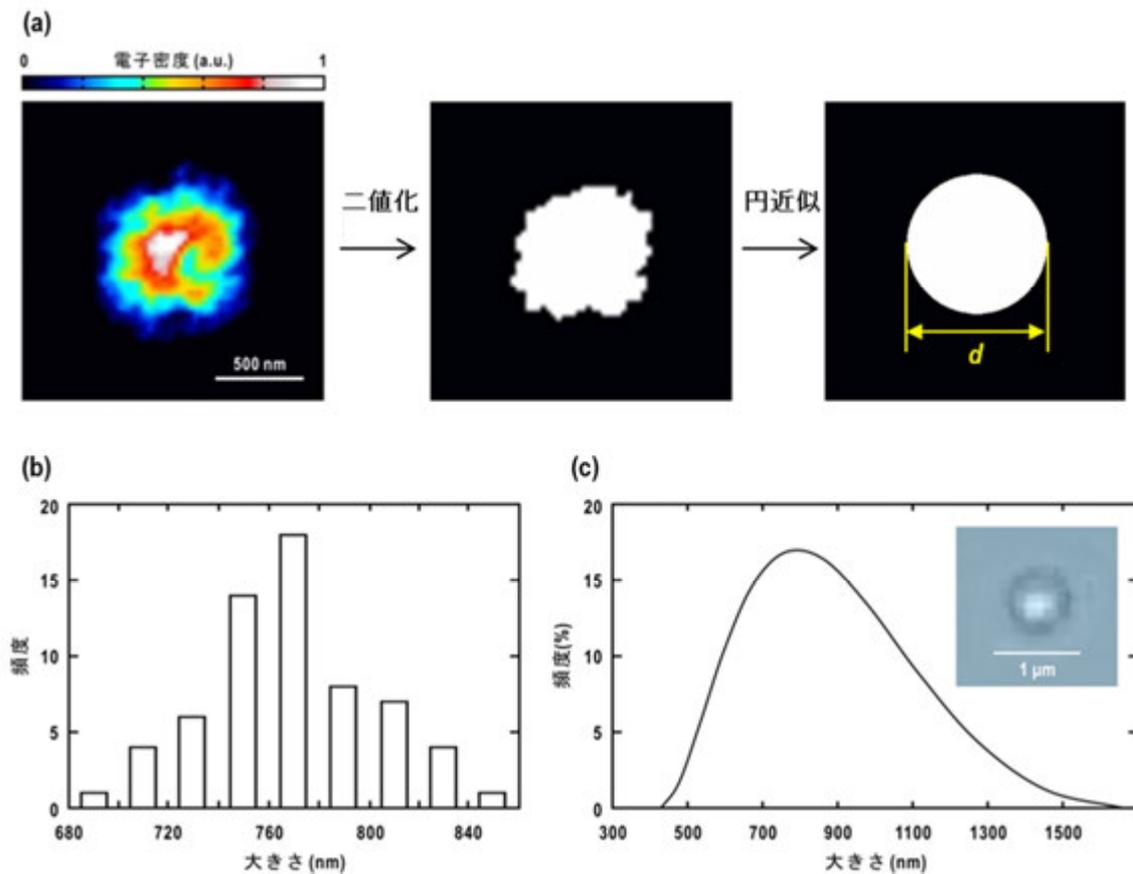


図 6-7 (a) サイズ測定の手順。左から投影電子密度像、0.25 a.u.を閾値として二値化した像、二値化像の面積を持つ円である。(b)63 枚の投影電子密度像のサイズ分布 (c) 動的散乱法にて測定した培養液中のシアノバクテリアのサイズ分布。差し込み図はシアノバクテリアの細胞一つの光学顕微鏡像。

6.2.5 六方晶氷からの回折

図 6-8 は、約 550 nm の大きさを持つ六方晶氷からの回折パターンである。凍結試料では、氷のガラス転移温度以上 (150-180 K) となる温度上昇や、大気中の水分付着によって生じるが、このような回折パターンは 2014 年及び 2015 年のビームタイム中に測定した回折パターンの中に 0.003%未満と非常に少なかった。従って、本研究で開発した凍結水和試料作製手法、および、第四章で述べた液体窒素から真空槽までの試料搬送方法、真空槽内での低温保持のいずれにおいても、六方晶氷の生成を十分に防いでいるといえる。

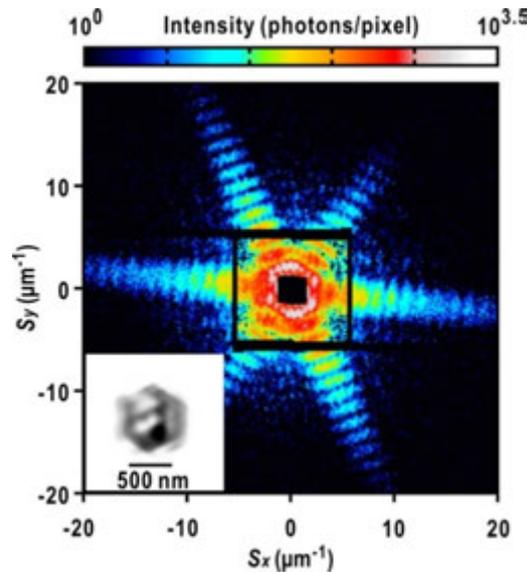


図 6-8 六方晶氷の回折パターンと回復投影電子密度像

6.2.6 非結晶試料の投影構造

図 6-9(a), (b)は S/N 比の良い金属材料試料の回折パターンから回復した投影電子密度像である。Friedel 対称性を評価する C_{sym} (表 6-5 注釈参照)が 0.8 以上を示し、PRTF の評価される有効分解能は 60 nm よりも高い (表 6-5)。酸化銅キューブの投影電子密度像には、250 ~400 nm のキューブ粒子が三つ凝集した像が現れた(図 6-9 (a))。また、1 つが約 200 nm の金コロイド粒子(British Biocell International Solutions, UK)を散布した薄膜に XFEL パルスを照射して得られた回折パターンについて位相回復したところ、四つの金コロイド粒子と思われる投影電子密度像が現れた(図 6-9 (b))。いずれの投影電子密度像も、密度分布に空間的な揺らぎが観察される。酸化銅キューブでは、粒子の組成のほぼ 100%が Cu_2O であり [Kuo, *et al.*, 2007]、金コロイド粒子についても Au のみで構成されることが考えられるため、このような密度変調は元素固有の電子密度の差異によって生じているために現れているのではないと考えられる。また、SEM 観察では、表面に顕著な凹凸はみられない(第五章 図 5-9)。従って、金属粒子の内部に空洞が生じており、投影電子密度像ではこれが密度ムラとなって現れていると推測した。数百 nm の厚みをもった金属粒子に電子線を透過させることはできないため、透過電子顕微鏡を用いた観察では上記のような議論はできない。図 6-9 (a), (b)のように内部構造の空間的な揺らぎが観察できるという点で、CXDI が金属粒子の内部の構造解析に適していることが判る。大きな粒子ほど、X 線入射方向の投影散乱断面積が大きいため、金属材料試

料では大きい凝集体から S/N 比の良い回折パターンが頻繁に得られる。このような回折パターンを位相回復すれば、20 nm 程度の高分解能(表 6-5)で金属材料粒子の内部構造について議論が可能となるだろう。

図 6-9 (c)に、酵母細胞核の回折パターンと投影電子密度像を示す。回折パターンは $20 \mu\text{m}^{-1}$ までスペックルを明瞭に確認することができる。投影電子密度像は、 $1 \mu\text{m} \times 0.8 \mu\text{m}$ の楕円形を呈し、電子顕微鏡で観察された薄片化された出芽酵母内の細胞核の静電ポテンシャルマップの形・大きさと合致する[Wei *et al.*, 2012]。回復像の内部に見える 50 nm~150 nm の 2, 3 つの高電子密度領域は、DNA が高密度で集積した領域や、DNA と RNA が複合的に集合している核小体と考えられる。

細胞試料でも金属材料試料のように凝集体であれば S/N 比の良い回折パターンが得られる。しかし、OS 比が小さいために位相回復が非常に難しくなる。ビーム中心と空間的に孤立した単粒子の位置を一致させることが望まれるが、人為的にマイクロメートルサイズのビームと粒子の中心を一致させることは困難であるため、確率的照射では、母数を増加させることで良好な回折パターン数を増加させることが不可欠である。その点で、高砂六号及び試料散布方法は、現状可能な最善の方法であると考えられる。

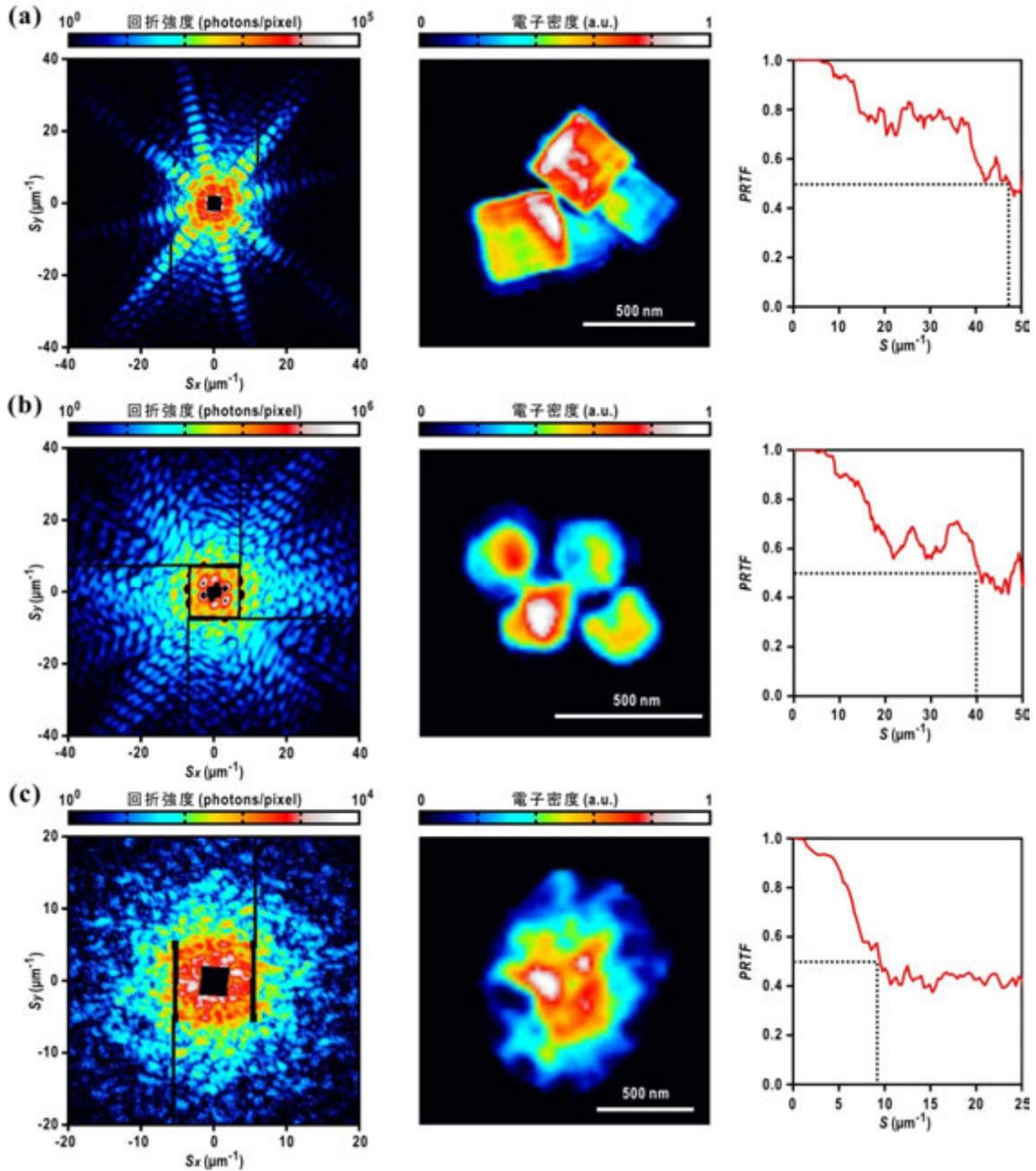


図 6-9 酸化銅キューブの凝集体(a)、一つが ~ 250 nm の金コロイド粒子の凝集体(b)、酵母細胞核の単粒子(c)の回折パターン (左) と回復した投影電子密度像 (中央)、PRTF (右)。回折パターン及び投影電子密度像のパラメータは、表 6-5 に示す。

表 6-5 回折パターンと回復像のパラメータ

回折パターン	図 6-9 (a)	図 6-9 (b)	図 6-9 (c)
C_{sym}^a	0.84	0.97	0.63
最高分解能 (nm)	13.5	15.1	35.7
ASURA で決定した最頻のクラス内の所属投影像数	135	236	162
OS 比	22.7	38.3	18.7
R_F	0.21	0.20	0.36
PRTF で評価した有効分解能 (nm)	21.1	24.6	107

$$^a C_{\text{sym}} = (E - O) / (E + O), \quad E = \sum_{x,y} [I_0(x,y) + I_{\text{sym}}(-x,-y)]^2, \quad O = \sum_{x,y} [I_0(x,y) - I_{\text{sym}}(-x,-y)]^2$$

ここで、 $I_0(x, y)$ は 100×100 pixels の ROI 中の回折強度であり、 $I_{\text{sym}}(-x, -y)$ は Friedel 対となる ROI 中の回折強度である。完全に対象であれば、 C_{sym} は 1 になる [Sekiguchi *et al.*, 2014a]。

パラメータの詳細は、表 6-3 を参照。

6.3 考察

6.3.1 ブロッチングの改善

図 6-4 にて典型例を示したように、残液量によって回折パターンが変化することが明らかとなった。液量の調整は濾紙やウィック紙によるブロッチングであるが、薄膜との距離や近づけ方によって微妙な差異が生じる。特に、大面積シリコンフレームは膜領域全ての液を吸水するのが難しい。現在は濾紙を実験者みずからの手を用いて操作しているが、こうした差異を制御し、良質な回折パターンを大量に得るためには専用機器の導入が必要になるだろう。また、濾紙やウィック紙を使用しないブロッチング方法がこうした問題を解決するかもしれない。

この問題の改善策として、スピナーを用いた余剰水溶液の除去と簡易凍結装置を考案した。スピナーでは、その高速回転で生じる遠心力を用いて培養液を薄く広げることが可能である。試料ディスクを 2,000~4,000 rpm で回転させるため、シリコンチューブを通して湿度制御装置から湿潤空気を送ることは難しい。そこで、硫酸カリウム飽和水溶液を含んだスポンジを入れた試料湿潤環境保持のためのプラスチックシャーレを作成した (図 6-10(a))。シャーレを密閉すれば、内部は相対湿度 97% に保たれる [Rockland, 1960]。大面積試料ディスクはシャーレ密閉と同時にスポンジブロッ

クで固定される。シャーレごとスピナー(MS-A100, Mikasa, Japan)で回転させることで、余剰の溶液を取り除く(図 6-10(b))。シャーレが透明なので散布密度や液厚を光学顕微鏡を用いて確認することができるという利点もある。これを用いれば、回転数と回転時間によって遠心力を調整し、液厚を制御することが可能である。特に粘性の強いバッファー液に懸濁される酵母細胞核の試料作製には大きく貢献している[関口、2016]。凍結の際は、筒状のガイドに沿って試料ディスクを液体エタンへ速やかに投下する(図 6-10 (c))。投下に先立って液体エタン容器の底に柄杓を設置しておけば凍結後ピンセットを用いた回収が容易であった。

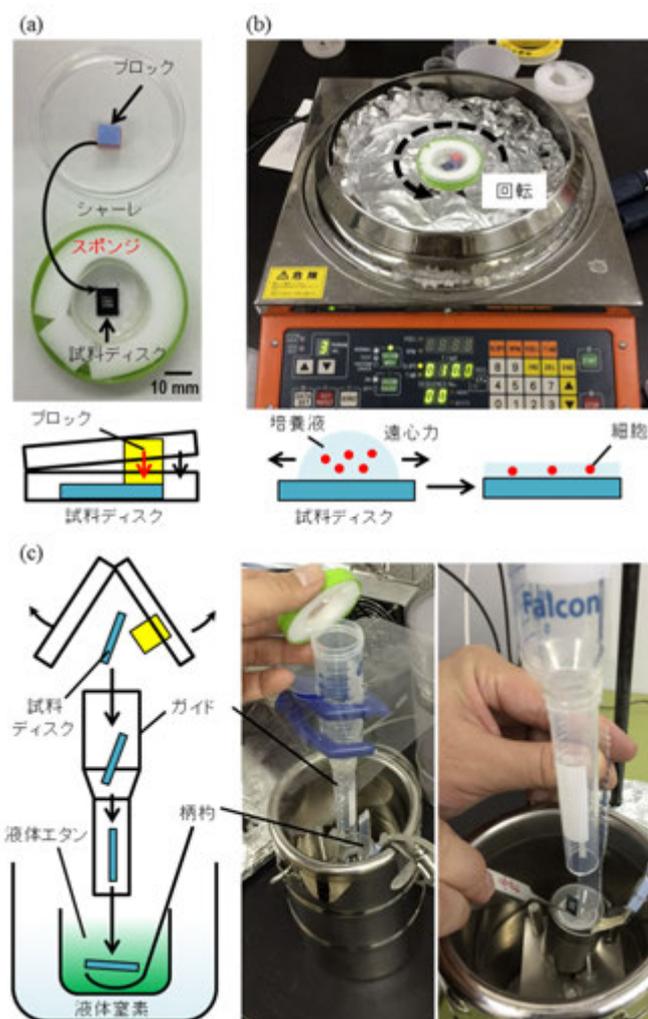


図 6-10 スピナーを用いたブロッティング方法 (a) プラスチックシャーレを基礎とした試料セル (b) スピナーに設置した試料セル (c) 遠沈管を加工して作製したガイドと柄杓から構成される凍結装置

6.3.2 PLL 局所的処理による良質な回折パターンの取得効率の改善

薄膜へ PLL の局所的処理を施し、細胞を格子状に配置する散布手法では、余剰な液を除去し、良質な回折パターンの取得効率を 2 倍向上させたが、依然、その割合は数%に留まっている。PLL 処理された一点に凝集体が吸着する確率が低いと考えられるため、XFEL パルスが照射されれば、多くは単粒子の回折パターンが観測されるはずである。従って、XFEL パルスの PLL 処理箇所への照射率が悪いことが回折パターン取得率の低さにつながっていると考えられる。

一つの方策は、ラスタースキャン座標を試料粒子に合わせることである。ラスタースキャン範囲は本研究で開発した高砂六号制御ソフトウェアから薄膜を望遠鏡観察し、ROI (region of interest) で指定できる (第四章 4.3.3 節)。図 6-11(a) は格子状に並んだシアノバクテリアの細胞の望遠鏡画像である。理想的には、格子の間隔とラスタースキャンステップを合わせて、スキャン開始位置をどれか一点指定すればほぼ 100% の確率で XFEL パルスが試料に照射されるはずである。しかしながら、現状では、ほぼ 100% XFEL パルスが試料にヒットしないという事態も生じている。こうした事態を避けるためには以下のような点について“狙い撃つ”精度を向上させる必要がある。

1. 現在使用している望遠鏡(UWZ400F, Union Optical, Japan)では 1 μm 程度の大きさの細胞がぼやけて 5~7 μm に写ってしまうため(図 6-11(a))、精密なスキャン開始位置の指定ができない。分解能の高い顕微鏡を位置調整に用いる必要がある。
2. 図 6-11(b) は PLL 局所的処理薄膜に 50 nm 金コロイド粒子を散布した後に観察した SEM 像である。金コロイド粒子が付着している範囲は、 $2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。従って、2.0 μm の範囲で試料粒子は吸着位置に自由度があるため、光子の間隔に従ってスキャンしても照射野の中心に粒子が配置されているとは限らない。マスクの穴を現状の直径 3 μm から 1 μm ほどの大きさに変更すべきかもしれない。
3. ラスタースキャンステージの位置分解能は水平方向で 0.2 μm 、垂直方向で 0.27 μm であるが、位置再現性はバックラッシュやモーメント剛性(ピッチング、ヨーイング、ローリング)によって位置分解能より悪化する。位置再現性は位置分解能が細かくなれば、改善するが並進速度が低下する。
4. 大面積窒化シリコン薄膜は、フレーム形状は矩形であるが、ある程度回転の自由度がある。例えば、10 μrad でも傾くと水平方向に 1 mm の範囲スキャンすれば、垂

直方向に $10\ \mu\text{m}$ もずれてしまう。薄膜を試料ホルダーに装着する際に μrad の精度で傾きを調整することはほぼ不可能なので、低温ポットに搬送してから、傾きを補正するための回転ステージが必要となるかもしれない。

以上のように、“狙い撃ち”を実現するためには加工精度や位置調整に非常に高い精度を要する。また、調整に要する時間も生じるため、現状では、PLL 格子間隔とスキャン幅を合わせず、確率的に単粒子からの回折パターンを収集する方法が最善であると思われる。

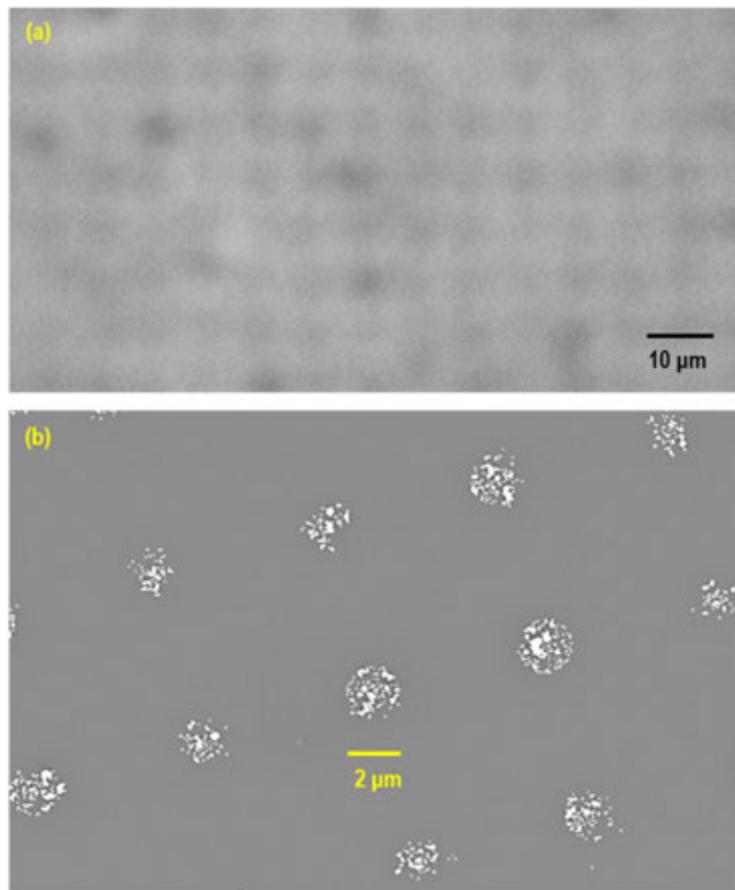


図 6-11 (a) PLL 居所的処理によって格子状に散布したシアノバクテリアの望遠鏡画像。黒色に見える場所に細胞が付着している。(b) PLL 居所的処理後の薄膜に $50\ \text{nm}$ の金コロイド粒子を散布した際の SEM 像。PLL が処理されている範囲を判定できる。

6.3.3 凍結処理および真空環境による試料サイズの変化

細胞は体積の 60-70%の水を含んでいる。室温で真空環境下に晒せば、水の沸騰やその際に生じる発泡によって細胞内の構造は壊れてしまう。対して、アモルファス氷に包埋された凍結水和試料であれば、 $\sim 10^{-4}$ Pa の真空下でも耐えられる。細胞内の細胞質基質の熱収縮率はアモルファス氷とほとんど変わらない。蛋白質の線熱膨張係数は $2.5 \times 10^6 / \text{K}$ ということが X 線結晶構造解析で示されている [Nakasako, 1999]。これらを考慮すれば、細胞試料の熱収縮は無視できるほど小さいと考えられる。実際、本研究では、この知見について、シアノバクテリアの凍結水和試料の回復像のサイズ分布が動的光散乱法で求めた結果と一致していたことから確証を得ている (図 6-7)。

生体試料の XFEL-CXDI 実験方式には、照射野に新鮮な試料を提供するためにノズルから噴射した試料懸濁液に XFEL パルス照射する液体ジェット法 [Kassemeyer, 2014] やエアロゾル中に流した試料に XFEL パルス照射する手法 [Seibert *et al.*, 2011; van der Schot *et al.*, 2015] がある。これらの手法は真空中での細胞内の水の沸騰やバブリングによる試料へのダメージが危惧される。これらに対して、試料懸濁液を封じたセルをラスタースキャンする実験方式では、セルが真空に耐えるため、室温で液中の生体試料の回折データを測定することができる [Kimura *et al.*, 2014]。しかし、生体試料の構造は生命活動によって時々刻々と変化するため、試料調整から回折実験までの期間中に細胞周期など可視化したいある特定の状態にとどめておくことが難しい。本研究における凍結水和試料をラスタースキャンする実験方式では、凍結することで試料調整時のままの状態を回折実験まで保つことができるため、安定した状態の試料を大量に準備することが可能である。

6.3.4 投影電子密度像のコントラスト

凍結水和状態のシアノバクテリアの投影電子密度像は細胞概形より内部の C 字型の電子密度分布の方が鮮明に可視化されている (図 6-4(a), 図 6-6 (a)-(c))。一方で、乾燥したシアノバクテリアの投影電子密度像が概形とそれ以外の領域の境界をはっきりと区切ることができる (図 6-4(b))。また、エアロゾル法で測定された真空中のシアノバクテリアの投影電子密度像 [van der Schot *et al.*, 2015] にも概形の輪郭が明瞭にみえることが確認されている。このように、像の見え方は試料が液中に存在するか真空中に存在するかで異なる。これは、試料とその周りの領域の電子密度比によってコントラストのつきかたが変わるためであると考えられる。

試料とバッファ液と電子密度比によるコントラストの変化は X 線小角散乱法分野で議論されてきた [Ibel & Stuhrmann, 1975]。図 6-12 には、細胞が真空中、バッファ液中に存在する場合の細胞内外の物質による電子密度のコントラストがどのように変化するのかを模式的に示した。バッファ液と細胞試料の電子密度を区別して考えると電子密度分布 $\rho(\vec{r})$ は以下のように記述できる。

$$\rho(\vec{r}) = \rho_{\text{sol}} + \rho_{\text{ex}}(\vec{r}) \quad (6.1)$$

ここで、 ρ_{sol} はバッファ液の電子密度である。 $\rho_{\text{ex}}(\vec{r})$ はバッファ液を除いた細胞の電子密度分布であり、以下のように書ける。

$$\rho_{\text{ex}}(\vec{r}) = \Delta\rho \rho_{\text{c}}(\vec{r}) + \rho_{\text{F}}(\vec{r}), \quad \Delta\rho = \bar{\rho} - \rho_{\text{sol}} \quad (6.2)$$

ここで、 $\rho_{\text{c}}(\vec{r})$ は細胞の外形を表す関数で、細胞の内側の領域は 1、外部は 0 である。 $\rho_{\text{F}}(\vec{r})$ は平均電子密度 $\bar{\rho}$ を差し引いた細胞内の電子密度分布である。 $\rho(\vec{r})$ のフーリエ変換 (FT) に比例する回折強度 $I(\vec{S})$ は、

$$I(\vec{S}) \propto |\text{FT}[\rho(\vec{r})]|^2 = |\text{FT}[\rho_{\text{sol}}] + \text{FT}[\rho_{\text{ex}}(\vec{r})]|^2 \quad (6.3)$$

$$\text{FT}[\rho_{\text{sol}}] = 2\pi\rho_{\text{sol}}\delta(\vec{S}) \quad (6.4)$$

$$|\text{FT}[\rho_{\text{ex}}]|^2 = \Delta\rho^2 |F_{\text{c}}(\vec{S})|^2 + \Delta\rho F_{\text{c}}^*(\vec{S}) F_{\text{F}}(\vec{S}) + \Delta\rho F_{\text{F}}^*(\vec{r}) F_{\text{c}}(\vec{S}) + |F_{\text{F}}(\vec{S})|^2 \quad (6.5)$$

である。式(6.4)の $\delta(\vec{S})$ はデルタ関数であり、 $\vec{S} = \vec{0}$ のときしか値をとらない。従って、バッファ液自体の回折強度はビームストップに隠れる。位相回復アルゴリズムでは実空間拘束条件においてサポート領域外(バッファ液が存在するはずの領域)をほぼ 0 とするため(第二章 2.4.2 節 式(2.27))、回復される投影電子密度像は $\rho_{\text{ex}}(\vec{r})$ となる。式(6.5)において、 $F_{\text{c}}(\vec{S})$ は $\rho_{\text{c}}(\vec{r})$ の構造因子、 $F_{\text{F}}(\vec{S})$ は $\rho_{\text{F}}(\vec{r})$ の構造因子である。真空中に細胞が存在する場合、外形情報 $\rho_{\text{c}}(\vec{r})$ が回折パターンに寄与することになるが、バッファ液に囲まれていると、 $\Delta\rho$ が ρ_{sol} によって小さくなり(式(6.2))、 $\rho_{\text{c}}(\vec{r})$ の寄与が低下する。その結果、式(6.5)は、

$$|\text{FT}[\rho_{\text{ex}}]|^2 \approx |F_{\text{F}}(\vec{S})|^2 \quad (6.6)$$

となり、細胞内部の電子密度分布の変動 $\rho_{\text{F}}(\vec{r})$ が回折パターンに大きく寄与することになる。このような現象は平均電子密度 $\bar{\rho}$ とバッファ液の電子密度 ρ_{sol} の比が小さいと顕著にあらわれる。細胞試料では、 $\bar{\rho}$ を決める核酸やタンパク質の平均電子密度がそれ

ぞれ $0.55 \text{ e}/\text{\AA}^3$ 及び $0.42 \text{ e}/\text{\AA}^3$ であるのに対して、 ρ_{sol} に対応する水は $0.33 \text{ e}/\text{\AA}^3$ と顕著に小さいわけではない[Stuhrmann & Miller, 1978; Svergun *et al.*, 2013]。従って、水と細胞内の物質の電子密度比は小さいために、バッファ液を十分に含んだシアノバクテリアの投影電子密度像 (図 6-4(a), 図 6-6 (a)-(c)) は、内部の電子密度分布の方がコントラスト良く可視化されたものと解釈することができる。内部の C 字型の分布は、タンパク質の集まったチラコイド膜の形が強調されて見えていると捉えるのが適当である。

本研究で開発した凍結水和試料作製方法は、細胞内部の電子密度分布を鮮明に可視化することに長けている。もしバッファ液の電子密度を制御できれば、対象の組織のコントラストを改善することができるだろう。

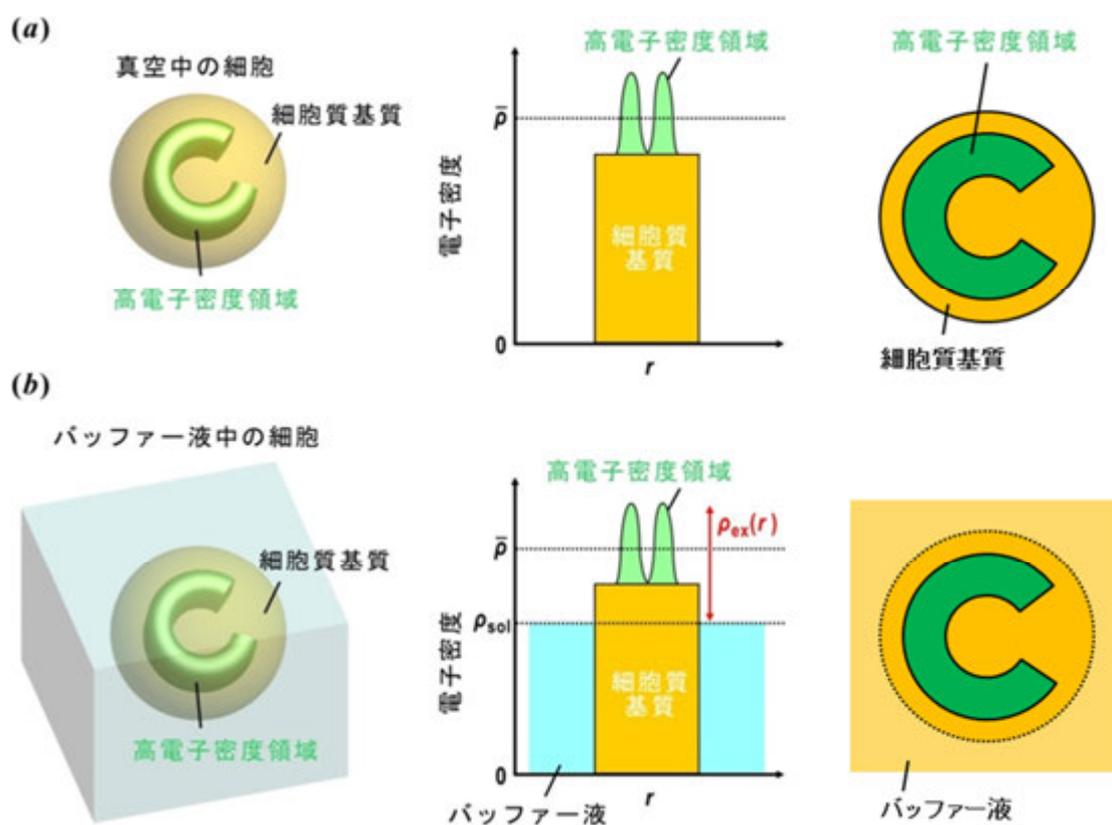


図 6-12 (a) 真空中の細胞内外の物質の電子密度コントラスト。(b) バッファ液中の細胞内外の物質の電子密度コントラスト。イラストはバッファ液を立方体として描いているが、実際は薄膜一面に広範囲に分布する。右図は投影電子密度像がバッファ液によって細胞外形の輪郭が不明瞭になる様子を示す模式図である。

第七章 Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法

XFEL-CXDI 実験では、ビームストップによって前方散乱 X 線強度の測定が不可能であり、さらに、検出器の飽和(第三章 3.3.2 節)によって、小角散乱領域の欠損が発生することがしばしばである。このような場合、従来の位相回復法によって、投影電子密度を得ることは極めて困難である。このような困難さを改善することを目的として、本研究では、Friedel 対称性を拘束条件とする新規暗視野位相回復法を考案した。

本章では、まず、暗視野位相回復法の概要を述べ、次に、先行研究[Martin *et al.*, 2012b]によって開発された暗視野位相回復法の原理を紹介する。さらに、本研究で提案する Friedel 対称性を拘束条件とした新規暗視野位相回復法の原理を示す[Kobayashi *et al.*, 2014]。新規暗視野位相回復法を、タンパク質一分子をモデルとした位相回復シミュレーションで評価し、XFEL-CXDI 実験データに対して適用して、同回復法の有効性を検証した。最後に、本手法の利点及び限界を考察し、将来展開に向けて自動像回復処理法を検討する。

7.1 Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法の開発

7.1.1 暗視野位相回復法の概要

顕微鏡分野では、可視化手法に大きく分けて、物質を透過したプローブを観測する方法と、物質からの散乱・回折あるいは蛍光プローブを観測する方法の二種類がある。前者によって可視化される像を明視野像、後者によって可視化される像を暗視野像と言う。明視野像は、物質中のプローブと相互作用を密に起こす箇所が暗く、その周辺は明るく映る。そのため、プローブの空間的広がりによってコントラストが付きにくいのが欠点である[Pluta, 1988]。暗視野像は、その逆で物質中のプローブと相互作用を密に起こす箇所が明るく、その周辺は暗く映るため、コントラストが改善される[Pluta, 1989]。

暗視野像再生の利用例として、走査型電子顕微鏡における、Annular Dark Field Detector と呼ばれる環状の検出器の利用が挙げられる[Jesson & Pennycook, 1995]。この手法では、収束電子線を試料に対して走査し、試料の透過電子線を環状検出器の検出領域のない中心部に通過させる。観測対象が散乱電子線だけに限られるので、検出すべ

き信号のダイナミックレンジは狭くなり、S/N 比の良いデータを取得することが可能である。酢酸ウラニルとベンゼンテトラカルボン酸を反応させた際の生成物を対象として行った実験では、単一原子列の高いコントラストで像再生することができ、ウラン原子（原子間距離約 0.13 nm）を明確に解像する分解能が達成された[Crewe *et al.*, 1970]。また、近年、目覚ましい発展を見せている超解像光学顕微鏡法の根源となる蛍光顕微鏡法も暗視野像の可視化技術である[Moerner & Kador, 1989]。

暗視野像再生型微鏡法概念を CXDI に取り入れた位相回復手法が暗視野位相回復法であり、電子顕微鏡分野での Annular Dark Field Detector のように、高角領域の回折データを用いて、位相回復を行う。ただし実験では、検出器等に細工を施すのではなく、位相回復計算において、高角領域にハイパスフィルター（あるいはバンドパスフィルター）を施す(図 7-1)。CXDI 実験では、前方散乱 X 線の測定が不可能なため、これが位相回復の妨げとなってきたが、それに対して、前方散乱 X 線を必要としない暗視野位相回復法であれば、極小角領域のデータ欠損の影響を無視することが可能である。また、同法の適用には実験形態を現状から変える必要がないため、データ解析手法の開発のみとなる。

なお、“回折”パターンより位相を回復する CXDI は、もとより暗視野像回復法と言えるが、本論文では、便宜上、従来法で回復される投影電子密度像を明視野像、暗視野位相回復法による回復される像を暗視野像と呼ぶことにする。

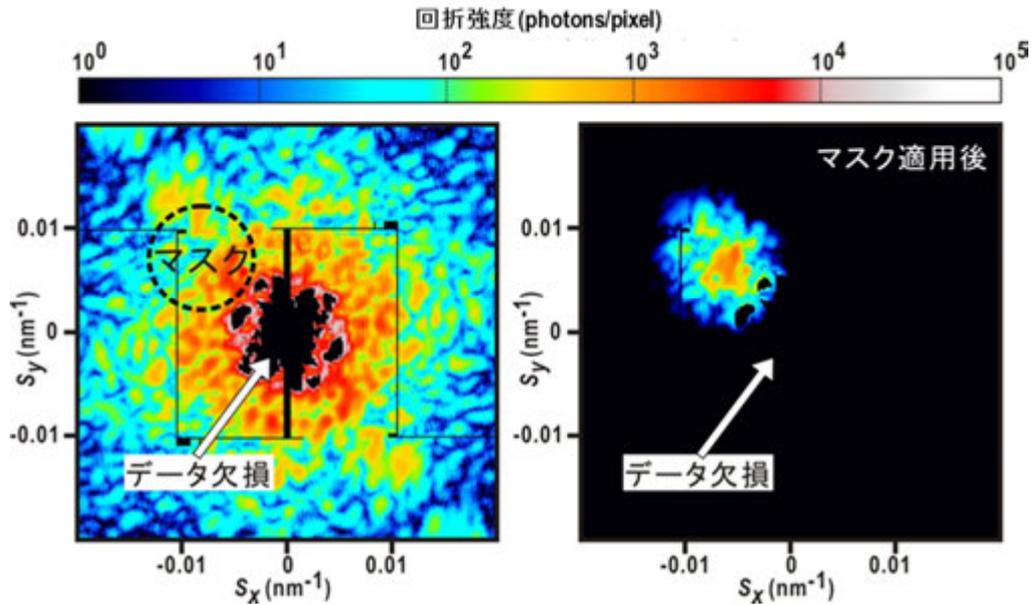


図 7-1 CXDI における暗視野位相回復法の概要(D)。左は、CXDI 実験で観測された極小角領域にデータ欠損が生じた回折パターンの一例である。暗視野位相回復法では点線円で示した領域を抽出するマスクを適用することによって、右のような回折パターンを作成し、これに対して位相回復を適用する。マスクを施した回折パターンには、欠損が生じた領域のデータが含まれない。

7.1.2 Friedel 対称性を拘束条件とした暗視野位相回復法の原理

ここでは、まず、先行研究[Martin *et al.*, 2012b]によって開発された暗視野位相回復法(Dark-field phase retrieval : DFPR)の原理について述べ、その後、Friedel 対称性を拘束条件とした新しい暗視野位相回復法(Dark-field phase retrieval under the constraint of the Friedel symmetry: Fs-DFPR)の原理と、この手法を用いた解析プログラムの実装方法について説明する。

7.1.2-1 DFPR

測定対象粒子には、異常散乱原子が含まれないと仮定し、その実数電子密度像を $\rho(\vec{r})$ とする。

$$\rho(\vec{r}) = \text{FT}^{-1} \left[F(\vec{S}) \right], F(\vec{S}): \text{構造因子}, \text{FT}^{-1}: \text{逆Fourier 変換} \quad (7.1)$$

DFPR では、高角領域に以下のガウシアンマスク $M(\vec{S})$ を乗じる。

$$M(\vec{s}) = \exp\left[-(\vec{s} - \vec{\alpha})^2 \chi^2 / 2\right] \quad (7.2)$$

ここで、 \vec{s} は、散乱ベクトル、 $\vec{\alpha}$ はガウシアンマスクのピークの位置、 χ はマスクの広がり決定するパラメータである (図 7-2)。このようなマスクを回折パターンに施すと、欠損領域付近の回折強度は大きく低減される。ガウシアンマスクを施した回折パターンから復元される電子密度像(暗視野像) $\rho_{\text{dark}}(\vec{r})$ は、以下のようにマスク関数 $M(\vec{s})$ の逆 Fourier 変換を、Point spread function (PSF) として、元の投影電子密度に畳み込んだものとなる。

$$\begin{aligned} \rho_{\text{dark}}(\vec{r}) &= \text{FT}^{-1}\left[M(\vec{s}) \cdot F(\vec{s})\right] \\ &= \text{FT}^{-1}\left[M(\vec{s})\right] \otimes \text{FT}^{-1}\left[F(\vec{s})\right] \\ &= \exp\left(-\frac{2\pi^2 \vec{r}^2}{\chi^2}\right) \exp(-2\pi i \vec{r} \cdot \vec{\alpha}) \otimes \rho(\vec{r}) \end{aligned} \quad (7.3)$$

PSF が複素数となるため、 $\rho_{\text{dark}}(\vec{r})$ も複素数となる。以降、便宜上、 $M(\vec{s})$ を“単一マスク”と呼ぶ。もし、 $M(\vec{s})$ が極小角領域を不連続に切り出すステップ関数の場合、PSF には、Fourier カットオフ成分が生じ、 $\rho_{\text{dark}}(\vec{r})$ にはフリッジが現れる (Gibbs 現象) [Gibbs, 1899]。そのため、DFPR ではガウシアンマスクのように、欠損領域を滑らかに 0 に減衰させるマスク関数を用いることが重要である。

Martin らは、この手法によって、試料の概形情報が直に反映される極小角領域に回折データがなくても、煤粒子の位相回復が可能であったと報告している [Martin *et al.*, 2012b]。これは、構造因子と電子密度分布の Fourier 変換の関係(第二章 式(2.17))が保証するように、構造因子が電子密度全体の足し合わせであるため、高角領域の回折データだけでも試料全体の電子密度情報を内包することに起因している。高角領域の回折データで回復される微細構造の配置を正しく並び替えることで試料概形を再現していると考えられることができる。

7.1.2-2 Fs-DFPR

異常散乱がない場合、試料からの回折は、Friedel 中心対称性を満足する(第二章 2.3.2 節)。回折パターンが記録できる領域 S_{max} は、第二章 2.3.3 節で示したように、試料の厚み d_z と Ewald 球の曲率、即ち X 線の波長 λ によって以下のように決まる。

$$\frac{1}{\lambda} - \left(\frac{1}{\lambda^2} - S_{\text{max}}^2\right)^{1/2} < \frac{1}{d_z} \quad (7.4) \quad (\text{第二章 式(2.24)再録})$$

波長 0.225 nm (5.5 keV) の X 線を用いた場合、約 1 μm の球体の細胞試料では、11 nm 分解能まで Friedel 対称性を満足する回折パターンを記録することができる。S/N 比良

く回折強度を測定できる回折パターン領域は 25~50 nm 程度の分解能にとどまるため (第六章 6.2.2 節 図 6-2(d))、細胞試料の回折パターンについては全体で Friedel 対称性が満足される。このことに依拠して、本研究では、回折パターンの Friedel 中心対称性を位相回復の拘束条件とする新規暗視野位相回復法 (dark field phase retrieval method under the constraint of the Friedel's symmetry: Fs-DFPR) を考案した。以下にその原理を述べる。

Fs-DFPR では、以下の 2 つの対称対となる単一マスク $M(+\vec{S})$ 、 $M(-\vec{S})$ を足し込んだ“対称型マスク” $M_{\text{sym}}(\vec{S})$ (図 7-2) を用いる。

$$M_{\text{sym}}(\vec{S}) = M(+\vec{S}) + M(-\vec{S}) = \exp\left[-\frac{(\vec{S}-\vec{\alpha})^2}{\chi^2}\right] + \exp\left[-\frac{(\vec{S}+\vec{\alpha})^2}{\chi^2}\right] \quad (7.5)$$

対称型マスク $M_{\text{sym}}(\vec{S})$ より復元される暗視野像 $\rho_{\text{dark}}^{\text{sym}}(\vec{r})$ は、

$$\rho_{\text{dark}}^{\text{sym}}(\vec{r}) = 2 \exp\left(-\frac{2\pi^2 \vec{r}^2}{\chi^2}\right) \cos(2\pi \vec{r} \cdot \vec{\alpha}) \otimes \rho(\vec{r}) \quad (7.6)$$

となる。DFPR とは異なり、対称型マスクに起因して、PSF は実数となり、暗視野電子密度 $\rho_{\text{dark}}^{\text{sym}}(\vec{r})$ も実数となる。

Martin ら [Martin *et al.*, 2012b] によると、大きなマスクほど位相回復の際に参照する回折データ量を増加させることが可能で、暗視野像の回復効率が向上することが示唆されている。そこで、本研究では、以下のような大きな対称型マスク $M_{\text{donut}}(\vec{S})$ を作成した。

$$M_{\text{donut}}(\vec{S}) = \int_{|\vec{\alpha}|} M(\vec{S}) d\vec{\alpha} \quad (7.7)$$

$M_{\text{donut}}(\vec{S})$ は、逆空間原点より一定値 $|\vec{\alpha}|$ 離れた位置がピークとなる単一マスク $M(\vec{S})$ を全て並べ、足し込んだマスクである、同時に、以下のように対称型マスク $M_{\text{sym}}(\vec{S})$ を用いて表現可能で、Friedel 対称性を満足する。

$$M_{\text{donut}}(\vec{S}) = \frac{1}{2} \int_{|\vec{\alpha}|} M_{\text{sym}}(\vec{S}) d\vec{\alpha} \quad (7.8)$$

$M_{\text{donut}}(\vec{S})$ は、外観が図 7-2 のように円環状になるため、以降、“ドーナツ型マスク”と呼ぶ。

CXDI 実験では、検出器の光子検出の際にポアソンノイズが生じるため、厳密には Friedel 対称性を満足することはない。そこで、本研究では、Fs-DFPR のポアソンノイズに対する耐性も評価することとした。

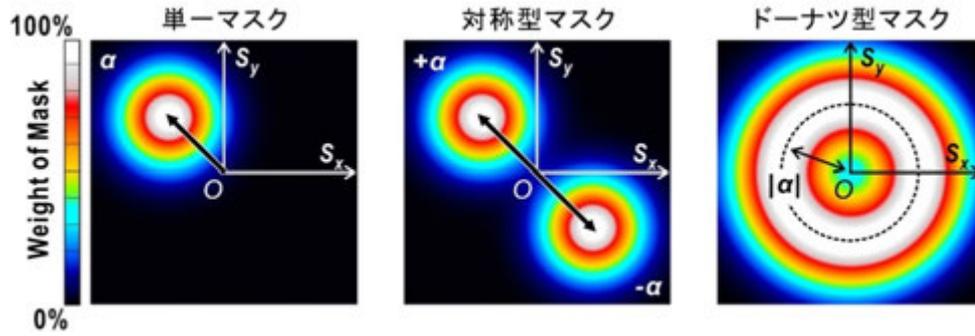


図 7-2 マスクの種類。左が DFPR に用いる単一マスク。中央及び右のマスクは Fs-DFPR で用いる。

7.1.2-3 暗視野位相回復法の実装

Fs-DFPR 及び DFPR は、反復的位相回復アルゴリズム(第二章 2.4.2 節)に実装することが可能である。本研究では、反復的位相回復アルゴリズム HIO に改良を加えて、マスク処理を行った回折パターンより暗視野像回復を試みた。

DFPR では、以下の HIO 反復計算において、実空間拘束条件を実数部・虚数部両方に適用した。

$$\rho_{k+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho'_k(\vec{r}) & \in \text{support} \\ \rho_k(\vec{r}) - \beta \rho'_k(\vec{r}) & \text{otherwise} \end{cases} \quad (7.9)$$

ここで、 $\rho_k(\vec{r})$ は、 k 回目の HIO 反復計算後の暗視野像であり、 $\rho'_k(\vec{r})$ は、 $\rho_k(\vec{r})$ より計算される位相とマスク処理した構造振幅を逆 Fourier 変換した実空間像である。 β は、HIO 反復計算中、0.9 に固定した。式(7.9)の実空間拘束によって得られる実空間像 $\rho_{k+1}(\vec{r})$ を次サイクルの暗視野像とした。対して、Fs-DFPR では、式(7.6)より、暗視野像は実数となるため、虚数部は 0 とし、式 7.9)の拘束は実数部のみに付加した。

本研究では、極小角領域が欠損した回折パターンより電子密度像を回復するため、研究室で独自に開発された HIO-SW 実装型位相回復ソフトウェア“ZOCHO” [Kodama & Nakasako, 2011; Oroguchi & Nakasako, 2013; Sekiguchi *et al.*, 2014a]を改変し、DFPR 及び Fs-DFPR を実装した。

改変した位相回復ソフトウェアでは、二つの段階を経て、電子密度像を回復する (図 7-3)。第一段階では、マスクが施された回折パターンより DFPR または Fs-DFPR を実行し、暗視野像を回復する。第二段階では、暗視野像を初期電子密度像および初期サポートとして、マスクを施していない回折パターンに対して HIO-SW を適用し、投影電子密度像を回復する。以降、便宜上、第二段階を明視野位相回復(Bright-field phase retrieval: BFPR)と呼ぶことにする。

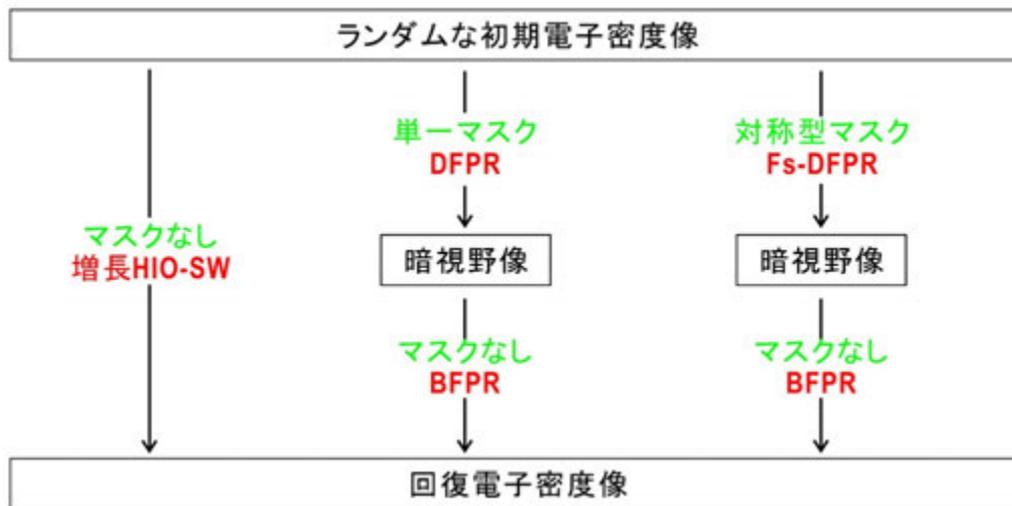


図 7-3 Fs-DFPR の実装方法。従来、ランダムな電子密度像を初期電子密度として直接位相回復を行っていたが(左)、DFPR(中央)及び Fs-DFPR(右)は、マスク処理された回折パターンより暗視野像を回復するプロセスを挟んで電子密度像を回復する。

7.1.3 暗視野位相回復法を用いた像回復シミュレーション

Fs-DFPR の有効性を評価するため、まず、位相回復シミュレーションを行った。ここでは、シミュレーションに用いた回折パターンの作成方法、位相回復の手順について述べ、シミュレーションの結果をまとめた。

7.1.3-1 回折パターンの作成

シミュレーションでは、概形の特徴が明確で慶應義塾大学中迫研究室で計算機実験が行われた実績[Kodama & Nakasako, 2011]のある Protein Disulfide Isomerase (PDI, Protein Data Bank accession code 2B5E) [Tian *et al.*, 2006]の立体構造モデルより回折パターンを作成した。PDI は、約 4 nm の大きさを持つ四つの thioredoxin fold ドメインで構成され、分子概形はアルファベットの”J”字型を呈する(図 7-4 (a))。

図 7-4 (a) の z 軸を X 線入射方向とし、以下の式に従って回折強度 $I(\vec{s})$ を計算した。

$$I(\vec{s}) = I_{\text{incident}} r_e^2 \left(\frac{\lambda}{\sigma A} \right)^2 F(\vec{s}) F^*(\vec{s}), \quad \vec{s} = (s_x, s_y, s_z = 0) \quad (7.10)$$

I_{incident} は、入射 X 線の強度、 r_e は古典電子半径、 λ は入射 X 線の波長、 σ は、オーバ

ーサンプリング比、 A は投影面における試料サイズ、 $F(\vec{S})$ は構造因子である。ポアソンノイズによる影響を評価することを考慮して、入射強度 I_{incident} は、 9.39×10^{27} 、 9.39×10^{26} 、 9.39×10^{25} photons/ $\mu\text{m}^2/\text{pulse}$ の三つの場合を想定した。オーバーサンプリング比 σ は、PDIのサイズを $A = 13.2$ nm とし、 S_x 軸、 S_y 軸に沿ってそれぞれ $8 \times 8 = 64$ とした。構造因子 $F(\vec{S})$ は、原子散乱因子 $f_j(\vec{S})$ の足し合わせであり(第二章 式(2.16))、以下のように計算した。

$$F(\vec{S}) = \sum_j f_j(\vec{S}) \exp(2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}) \quad (7.11)$$

$$f_j(\vec{S}) = \sum_{k=1}^4 a_{jk} \exp(-b_{jk} \vec{S} / 4) + c \quad (7.12)$$

a_{jk} , b_{jk} 及び c は、各原子種の原子散乱因子に固有の定数であり、*INTERNATIONAL TABLE FOR X-RAY CRYSTALLOGRAPHY Vol. IV* [Ibers & Hamilton, 1974]を参照した。

計算によって得られた回折パターンを図 7-4 (b)に示す。回折パターンの画像サイズは 1024×1024 pixels で、コーナーでの分解能 0.15 nm である(図 7-4 (b))。この分解能で、Friedel 対称性を満足する回折パターンの観測限界(7.1.2-2 節)を考慮すれば、PDIの厚みを 12.8 nm として、波長 λ は、 0.003 nm を想定していることになるので、計算した回折パターン領域であれば、十分 Friedel 対称性を満足する。

実験を模倣するため、回折パターンに対してポアソンノイズを付加した。Numerical Recipes [William *et al.*, 1996]を参考に Tausworthe 法による一様乱数から、Rejection Method を利用してポアソンノイズを発生させた。以降、入射強度が小さいパターンから順に Noise Level 1 (NL1), NL2, NL3 と呼ぶ。回折パターンのラインプロファイルは、図 7-4(c)のようになり、入射強度が大きい NL1 に対して 2 桁減衰した NL3 では、ノイズによってプロファイルに不連続な箇所が多数現れた。

シミュレーションでは、暗視野位相回復法の位相回復効率を評価するため、回折パターンの極小角領域を故意に欠損させた図 7-4(d)。欠損領域の大きさは、第二スペックルまで欠損させた Cut2、第五スペックルまで欠損させた Cut5、第七スペックルまで欠損させた Cut7 の 3 種類を用意した。

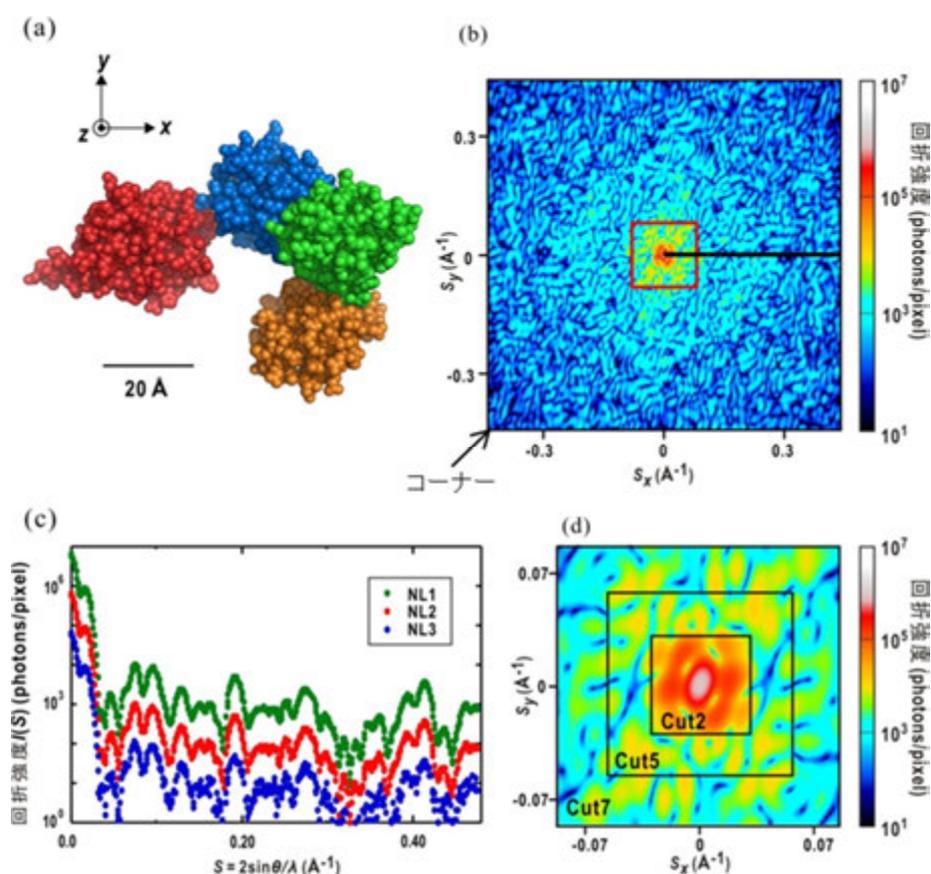


図 7-4 暗視野位相回復法を用いた位相回復シミュレーションで作成した回折パターン。(a) space fill モデル表示した PDI。シミュレーションに用いた回折パターンは、X 線が z 軸方向に入射したことを仮定している。(b)入射 X 線強度を 9.39×10^{27} photons/ μm^2 /pulse として計算された回折パターン。(c)緑色マーカー(NL1)は、(b)の黒色実線のプロファイルである。その他の 2 つのプロファイルは、入射 X 線強度が 9.39×10^{26} photons/ μm^2 /pulse としたとき(赤色マーカー, NL2)と 9.39×10^{25} photons/ μm^2 /pulse(青色マーカー, NL3)としたときのプロファイルである。これらラインプロファイルより回折強度が小さくなるほどポアソンノイズの影響が大きくなる様子が観察できる。(d)(a)の赤色実線で囲った 3 種類の欠損領域(Cut 2, Cut5, Cut7)。Cut 2 は第二スペックル、Cut 5 は第五スペックル、Cut 7 は第七スペックルまで欠損している。

7.1.3-2 マスク処理

作成した 9 種類(ポアソンノイズ 3 種類 \times 欠損規模 3 種類)の回折パターンに対して、以下の 3 種類のマスク[単一マスク、対称型マスク、ドーナツ型マスク]を用意した。

$$M(\vec{S}) = \exp\left[-(\vec{S} - \vec{\alpha})^2 \chi^2 / 2\right] \quad (\text{単一マスク、式 7.2})$$

$$M_{\text{sym}}(\vec{S}) = \exp\left[-(\vec{S} - \vec{\alpha})^2 \chi^2 / 2\right] + \exp\left[-(\vec{S} + \vec{\alpha})^2 \chi^2 / 2\right] \quad (\text{対称型マスク、式 7.5})$$

$$M_{\text{donut}}(\vec{S}) = \frac{1}{2} \int_{|\vec{\alpha}|} M_{\text{sym}}(\vec{S}) d\vec{\alpha} \quad (\text{ドーナツ型マスク、式 7.8})$$

いずれのマスクでも、パラメータ χ は、共通に 0.59 nm とした(図 7-5)。単一マスク、対称型マスクにおける $\vec{\alpha} = (\alpha_x, \alpha_y)$ は、 $(-2.0, 2.0) \text{ nm}^{-1}$ 、ドーナツ型マスクにおける $|\vec{\alpha}|$ が、 0.28 \AA^{-1} とした。適用したマスクは、およそ 1.4 nm^{-1} から 3.5 nm^{-1} の回折データを抽出する。

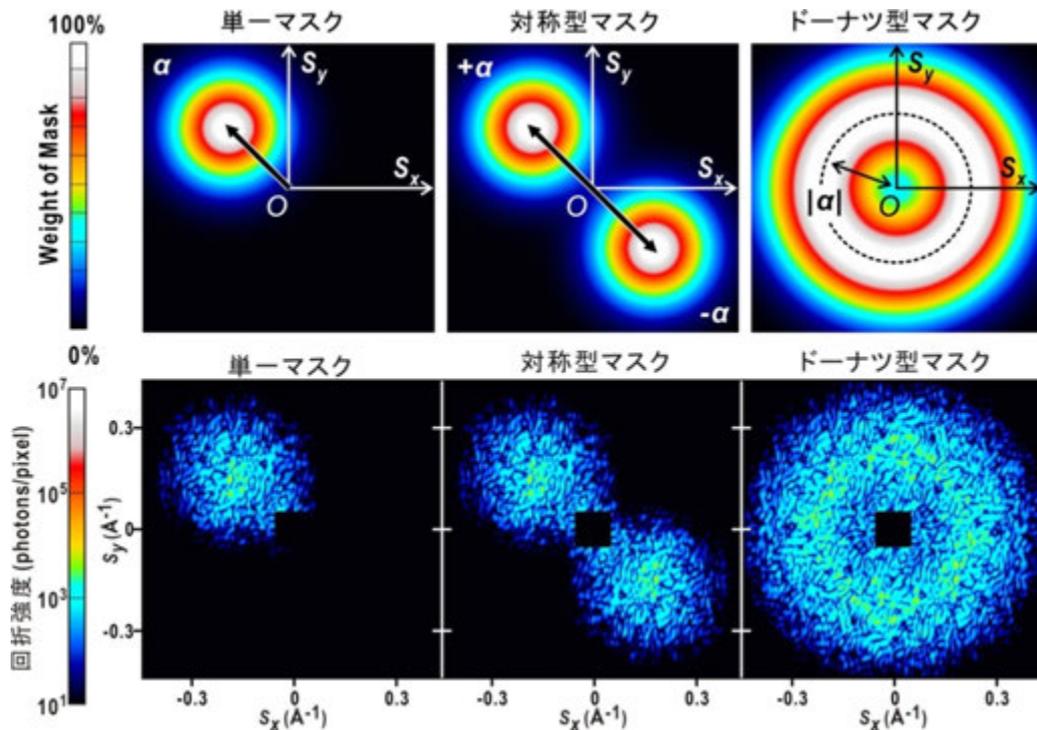


図 7-5 図 7-2(上図、再録)のマスク処理を施した回折パターン(下図)。図はポアソンノイズレベル NL1 の回折パターンにマスク処理したものである。

7.1.3-3 位相回復の手順

位相回復(7.1.2-3節参照)では、4種類の位相回復アルゴリズムを用いた。第一は、従来から用いてきた HIO-SW 位相回復であり、位相回復ソフトウェア“ZOCHO”[Kodama & Nakasako, 2011; Oroguchi & Nakasako, 2013; Sekiguchi *et al.*, 2014a]により、ランダムな電子密度像を初期モデルとして実行した。他三種類の位相回復は、単一マスクを用いた DFPR、対称型マスクあるいはドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR である。初期電子密度像は、ランダムなものを 10 種類用意し、初期サポートは回折パターンを Fourier 変換して得られる自己相関関数を二値化したものを使用した(第二章 2.4.3 節)。自己相関関数は、試料最大長の 2 倍となるため、初期サポートとしては適当である(第二章 図 2-8)。BFPR では、初期モデルに DFPR、Fs-DFPR によって回復された暗視野投影電子密度像を用いた。それぞれの位相回復計算では、100 回の HIO 反復計算毎に SW によってサポートを更新した(図 7-6)。100 回のサポート更新サイクルの後 1000 回の HIO 反復計算により、SW でのローパスフィルター(第二章 式(2.36))によって微細構造が鈍された電子密度像の精密化を試みた(図 7-6)。

位相回復計算には、SACLA に設置されているスーパーコンピュータシステム”SACLA-HPC”を利用した。SACLA-HPC には、クロック数 3.47 GHz の Intel Xeon CPU X5690 コアが 960 コア実装されており、内 60 コアを本シミュレーションに用いた。1つの電子密度像を回復するのに 1 コアを独立して実行した。全ての位相回復計算の施行数は 360 通り(ポアソンノイズ 3 種類 × 欠損規模 3 種類 × マスク 3 種類 × 初期電子密度像 10 種類)である。

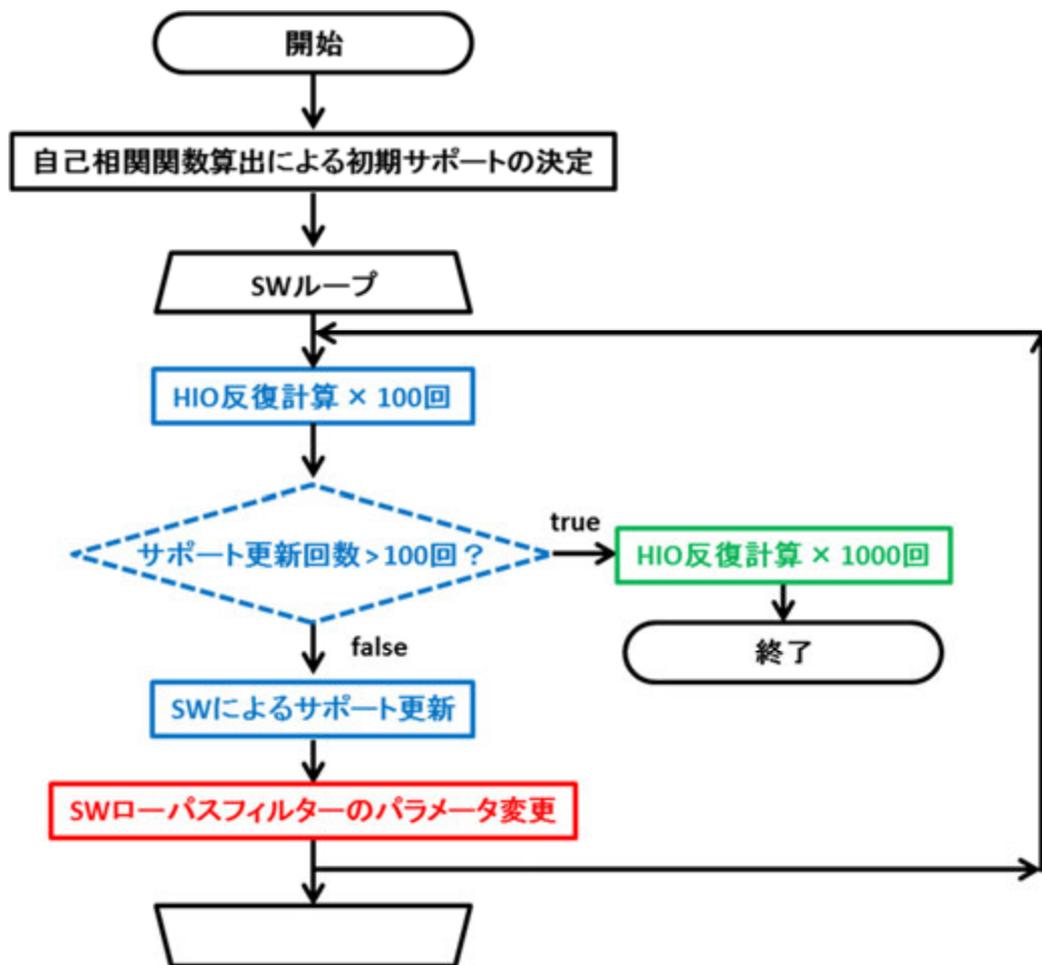


図 7-6 反復的像回復計算の手順。HIO 反復計算及び SW によるサポート更新は青色で示した。ただし、緑色の HIO 反復計算では、最後に更新されたサポートで、微細構造の精密化を行っている。赤色は、SW サポート更新時に施すガウス関数によるローパスフィルター(第二章 式(2.36))におけるパラメータ ε の変更を示す。 ε は、初期値を 2.0 とし、一回の SW ごとに 2% ずつ減少させ、平滑化の程度を緩和させていった。最終的に 0.9 となるまで減少させた。

7.1.3-4 暗視野位相回復法を用いた位相回復シミュレーション結果

本節では、Fs-DFPR を利用した位相回復シミュレーション結果について述べる。まず、回復された像に対して概形の特徴について解釈し、位相回復手法、欠損規模、ポアソンノイズごとに回復像の傾向を議論する。

DFPR 及び Fs-DFPR より回復された暗視野像は、位相回復に成功したものから失敗したものまで、様々な概形を有していた。PDI が”J”字型概形をもつので、回復された

暗視野像を四種類(Type A ~ Type D)に分類した(図 7-7(a))。PDI の概形をほぼ再現しているものを Type A、”J”字型を再現するもサポート面積が Type A に対して $\pm 10\%$ 程度の増減するものを Type B、”J”字の概形を再現しないが四ドメイン構造は確認できるものを Type C とした。Type D に分類されたものは、楕円形のサポートを有して PDI の形及び電子密度分布の特徴が一切見られないが、その大きさはおよそ PDI と一致していた。

四種類の暗視野像の出現頻度分布を図 7-7 (b)-(c)にまとめた。欠損規模 Cut2、ポアソンノイズレベル NL1, NL2 の回折パターンからは、DFPR, Fs-DFPR の全ての試行で Type A の暗視野電子密度像が得られた。欠損規模 Cut2、ポアソンノイズレベル NL3 では、単一マスクを用いた DFPR において Type A 及び Type B の像が回復されなかったが、対称型マスク及びドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR は、Type B に分類可能な電子密度像を与えた(図 7-7 (b))。

欠損規模 Cut5 のポアソンノイズレベル NL2, NL3 及び欠損規模 Cut7 の全ての回折パターンに対して、DFPR は無力であり、Type D の暗視野像しか与えなかった(図 7-7 (c), (d))。Fs-DFPR を用いた場合、欠損規模 Cut5 でポアソンノイズレベル NL2, NL3 条件下でも、Type B の回復が確認された。さらに、Fs-DFPR は、欠損規模 Cut7 のポアソンノイズレベル NL1, NL2 についても Type A 及び Type B の回復率が 82.5%に達した。最も位相回復が困難な欠損規模 Cut7、ポアソンノイズレベル NL3 の回折パターンでも Fs-DFPR は、50%確率で Type C の暗視野像を回復した。

これらの結果から、Fs-DFPR は従来法[Martin *et al.*, 2012b]に比べて、極小角領域の大規模欠損及びポアソンノイズの影響を大きく受けても、暗視野像の概形を正しく再現(再生)できることが明らかとなった。特に、ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR が最も多く、正しい暗視野電子密度像を与えることが判明した。

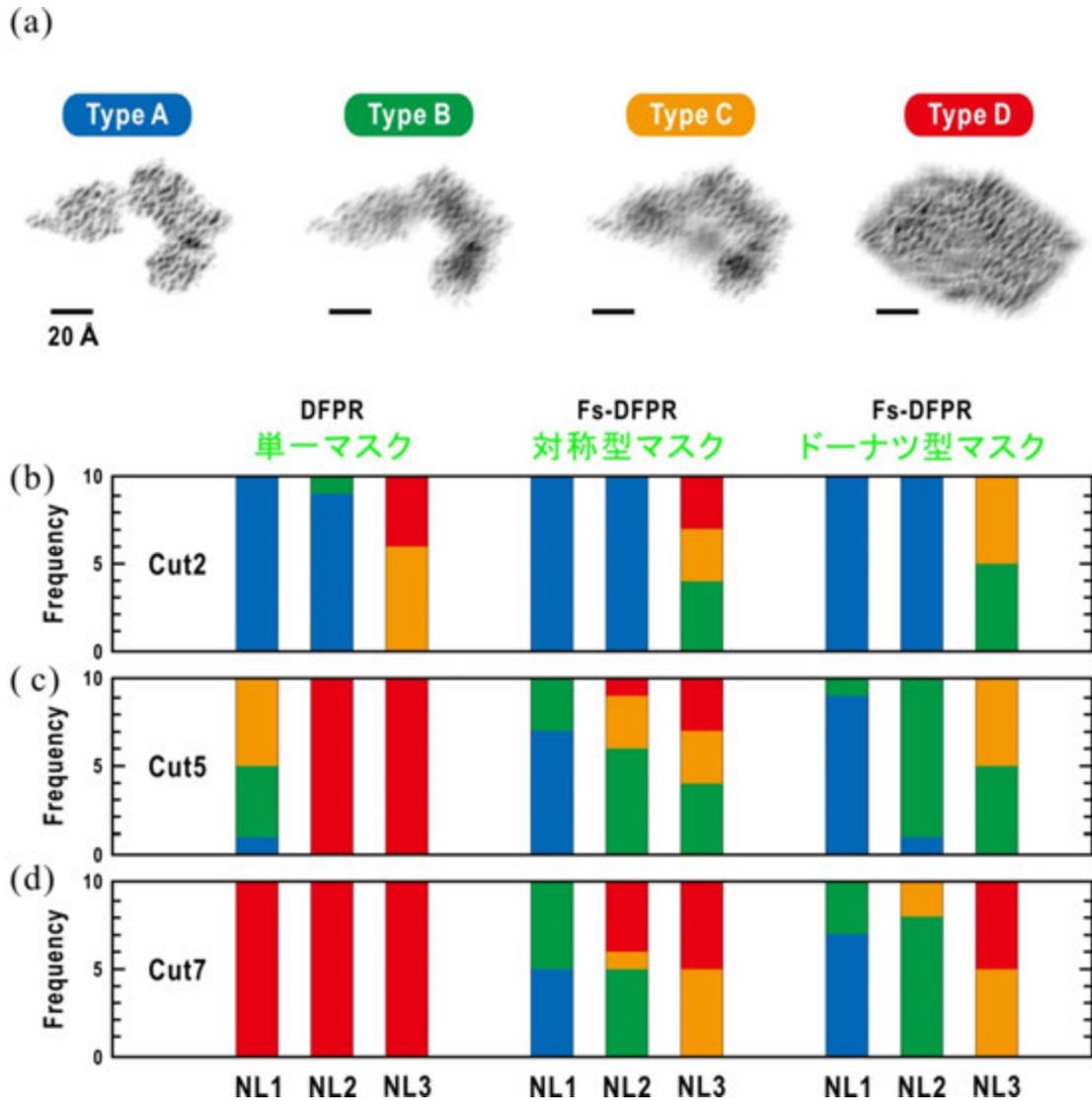


図 7-7 位相回復シミュレーションにおける暗視野像回復の結果。
 (a)Fs-DFPR 及び DFPR によって回復された Type A から D のタイプの暗視野像。スケールバーは 20 \AA である。(b)-(d)では欠損規模 Cut 2, Cut 5, Cut 7 の回折パターン毎に、(a)の分類基準で計数し、頻度分布をとった。それぞれの頻度分布で、位相回復法(単一マスクを適用した DFPR、対称型マスクを用いた Fs-DFPR、ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR)ごとに、さらにその中でポアソンノイズの規模(NL1, NL2, NL3)ごとに区切った。棒の色は、(a)のタイプを示したラベルの色と照合させている。

7.1.3-5 明視野像回復

明視野像回復 BFPR では、Fs-DFPR、DFPR によって回復された暗視野像を初期電子密度像・初期サポートとして、マスクが適用されていない回折パターンより電子密度像を回復する。また、従来法 “HIO-SW” では、ランダムな初期電子密度像より直接、電子密度像を回復した。各々の手法で回復された電子密度像は、PDI の”J”字型を示す像とそうでない像に分類された(図 7-8)。”J”字型を示す像に分類されるものには、PDI の概形をほぼ完全に再現しているもの(図 7-8(a)上図)に対してサポート面積が $\pm 10\%$ 程度の増減するものも含む(図 7-8(a)下図)。”J”字の概形を再現しない像には、四ドメイン構造は確認できるもの(図 7-8(b)上図)と、PDI の形及び電子密度分布の特徴が一切見られないが、その大きさはおよそ PDI と一致しているものがあった(図 7-8(b)下図)。

BFPR および増長 HIO-SW によって回復した像の中で概形が”J”字型に再現された像の数を表 7-1 に示す。増長 HIO-SW では、欠損規模 Cut2 の回折パターンのみ”J”字型の電子密度像が回復された。単一マスクを用いた DFPR から回復された暗視野像を初期モデルとした BFPR では、欠損規模 Cut7 のパターンからは正確に概形を再現した像の回復には至らなかった。欠損規模 Cut5 及び Cut7 のパターンからは、ドーナツ型マ

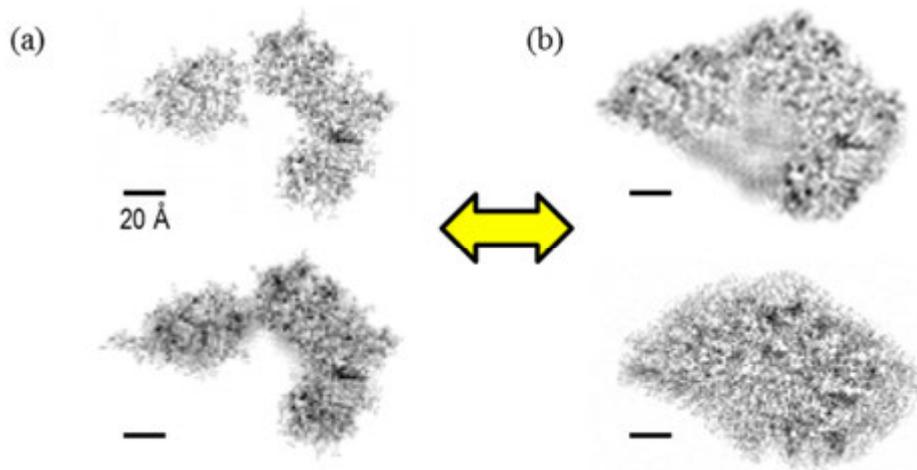


図 7-8 回復された電子密度像。(a)”J”字型を再現した像の例。上部は図 7-4 (a)の PDI の投影像にほぼ一致する。下部は”J”字型であるが、微細な電子密度分布が上部とは異なる。(b)”J”字型を再現しなかった像の例。上部は四ドメインが確認できるが、下部は確認できない。それぞれのスケールバーは 20 Å を示す。

スクを用いた **Fs-DFPR** → 対称型マスクを用いた **Fs-DFPR** → **DFPR**、より回復された暗視野像を初期電子密度とした **BFPR** の順に “J”字型像を多く回復した。

表 7-1 の傾向は、**BFPR** によって回復される電子密度像の概形再現度は、初期モデルとして用いた暗視野像に依存することを示している。また、概形再現度は、欠損規模、ポアソンノイズレベルにより左右されることがわかった。最も電子密度像の概形を再現したのは、ドーナツ型マスクを用いて回復された暗視野像を初期モデルとした **BFPR** であった。また、**Type C**、**Type D** の暗視野像から “J”字型の像を回復する場合も確認された。

表 7-1 ZOCHO HIO-SW 及び **BFPR** によって回復された J”字型電子密度像の数

回折パターン	ZOCHO HIO-SW	BFPR		
		暗視野像回復法		
		DFPR	対称型マスクを 用いた Fs-DFPR	ドーナツ型マスク を用いた Fs-DFPR
Cut2 of NL1 / NL2 / NL3	9 / 6 / 3	10 / 10 / 9	10 / 10 / 10	10 / 10 / 10
Cut5 of NL1 / NL2 / NL3	0 / 0 / 0	5 / 4 / 0	7 / 6 / 4	10 / 9 / 7
Cut7 of NL1 / NL2 / NL3	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	6 / 5 / 3	9 / 8 / 5

7.1.4 XFEL-CXDI 実験データへの **Fs-DFPR** の適用

実験データへの **Fs-DFPR** の有効性を評価するため、金コロイド粒子からの回折パターンを測定した。金コロイド粒子は散乱断面積が大きいと、高角領域まで **S/N** 比良く回折パターンが取得可能である [Nakasako *et al.*, 2013]。しかし、一方で、粒子凝集体に **XFEL** ビームが照射されると、想定外に強力な回折が生じるため、検出器の飽和により極小角領域が大きく欠損することがしばしばであり、こうした回折パターンからの像回復に **Fs-DFPR** の効力が期待される。この章では、試料作製法、**XFEL** 回折実験法及び回折データ処理、**Fs-DFPR** の適用結果について述べる。

7.1.4-1 XFEL-CXDI 実験及び回折データ処理

XFEL-CXDI 実験は、XFEL 施設 SACLA において、クライオ試料固定照射装置「壽壺号」[Nakasako *et al.*, 2013]を用いて行った。試料ディスクを真空槽へ搬送後、試料の位置に $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ に集光した波長 $0.225\ \text{nm}$ (光子エネルギー $5.5\ \text{keV}$) の XFEL パルス照射した。入射 X 線の強度は、およそ $10^{10}\ \text{photons}/2 \times 2\ \mu\text{m}^2/\text{pulse}$ (パルス幅 $10\ \text{fs}$) 程であった。金コロイド粒子の回折パターンは、タンデムに配置された 2 台の MPCCD 検出器によって取得した[Kameshima *et al.*, 2014]。試料位置より $1.6\ \text{m}$ 下流に配置された MPCCD Octal 検出器によって、 $210\ \text{nm}$ から $7\ \text{nm}$ 分解能の高角の回折パターンを、Octal 検出器よりさらに $1.6\ \text{m}$ 下流に配置された MPCCD Dual 検出器によって $500\ \text{nm}$ から $210\ \text{nm}$ 分解能の小角の回折パターンを取得した。Dual 検出器の前には、検出器飽和防止のためのアルミニウム製のアテネータ(波長 $0.225\ \text{nm}$ の X 線に対して透過率 14.8%)とダイレクトビームを遮断するための矩形 (大きさ $2\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$) のフライングビームストッパーが配置された。

2 台の検出器によって取得された回折パターンは、研究室で独自に開発された回折データ自動処理ソフトウェアスイート “G-SITENNO” [Sekiguchi *et al.*, 2014ab]によって統合された。統合の際には回折パターンの Friedel 対称性は以下の相関係数 C_{sym} を用いて定量的に評価した。

$$\begin{aligned} C_{\text{sym}} &= \frac{E - O}{E + O}, \\ E &= \sum_{x,y} [I_0(x,y) + I_{\text{sym}}(-x,-y)]^2, \\ O &= \sum_{x,y} [I_0(x,y) - I_{\text{sym}}(-x,-y)]^2 \end{aligned} \quad (7.13)$$

ここで、 $I_0(x,y)$ は、 $100 \times 100\ \text{pixels}$ の画像領域の回折強度データであり、 $I_{\text{sym}}(-x,-y)$ は、 $I_0(x,y)$ の Friedel 対に対応する画像領域の回折強度データである。Friedel 対称性が完全に成立するとき、 C_{sym} の値は 1 となる。

7.1.4-2 XFEL-CXDI 実験データへの Fs-DFPR 適用結果

取得された回折パターンの多くで、 $29\ \text{nm}$ の高分解能領域まで S/N 比良く回折強度を観測できたが、極小角領域では、検出器の飽和により、多大なデータ欠損が生じた。その典型例を図 7-9 に示す。これらの回折パターンは、MPCCD Dual 検出器で取得されるはずの全ての回折データ及び約 $9\ \mu\text{m}^{-1}$ の分解能領域までの MPCCD Octal 検出器

の回折データが失われていた(表 7-2)。スペックルの大きさ(第二章 式(2.27))より見積もられる欠損規模は、像回復シミュレーションにおける Cut5、Cut7 に相当した(表 7-2)。

統合された回折パターンより入射 X 線に対する投影電子密度像の回復を、ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR 及び BFPR によって試行した。位相回復のため、回折パターンは、 512×512 pixels にトリミングし、回折パターンの端で分解能 29 nm とした。なお、今回の実験条件で Friedel 対称性が保証される領域は、試料厚み 250 nm として 5.4 nm 分解能までである。

図 7-9 の回折パターンにドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR を適用した。適用した回折パターンの Friedel 対称性は C_{sym} (式(7.13)) の値で 0.89 以上であった (表 7-2)。回折パターンの S/N を考慮し、 $13 \mu\text{m}^{-1}$ から $27 \mu\text{m}^{-1}$ の分解能領域を主に参照するようマスクのパラメータ(式 7.8) χ を $0.13 \mu\text{m}$ 、 $|\alpha|$ を $20 \mu\text{m}^{-1}$ とした (図 7-2 (a), 図 7-9 (左図))。Fs-DFPR によって回復された暗視野像は、250 nm 強の直径を有する円形の集合体であった(図 7-9 (右図))。

さらに、BFPR で電子密度像を回復した(図 7-9(右図))。ここでは、OS 比 104 から 324 の範囲であった(表 7-2)。回復された電子密度像は、暗視野像での粒子配置をよく再現しており、加えて粒子外形に角が見られると共にその内部に電子密度の変化が見いだされた。暗視野像及び電子密度像は、回折実験前に取得された径 250 nm の金コロイド粒子の SEM 像と粒子数、配置共に一致した(図 7-9(右図))。一方で従来法 ZOCHO HIO-SW では金コロイド粒子特有の円形の電子密度分布は確認されなかった。回復像の γ と R_f を表 7-2 に示す。タンパク質の X 線結晶構造解析では R_f は、 ~ 0.3 で構造精密化の初期モデルとして適当であるとされる [Garib *et al.*, 2011]。従って、位相回復の収束度としては十分と判断した。

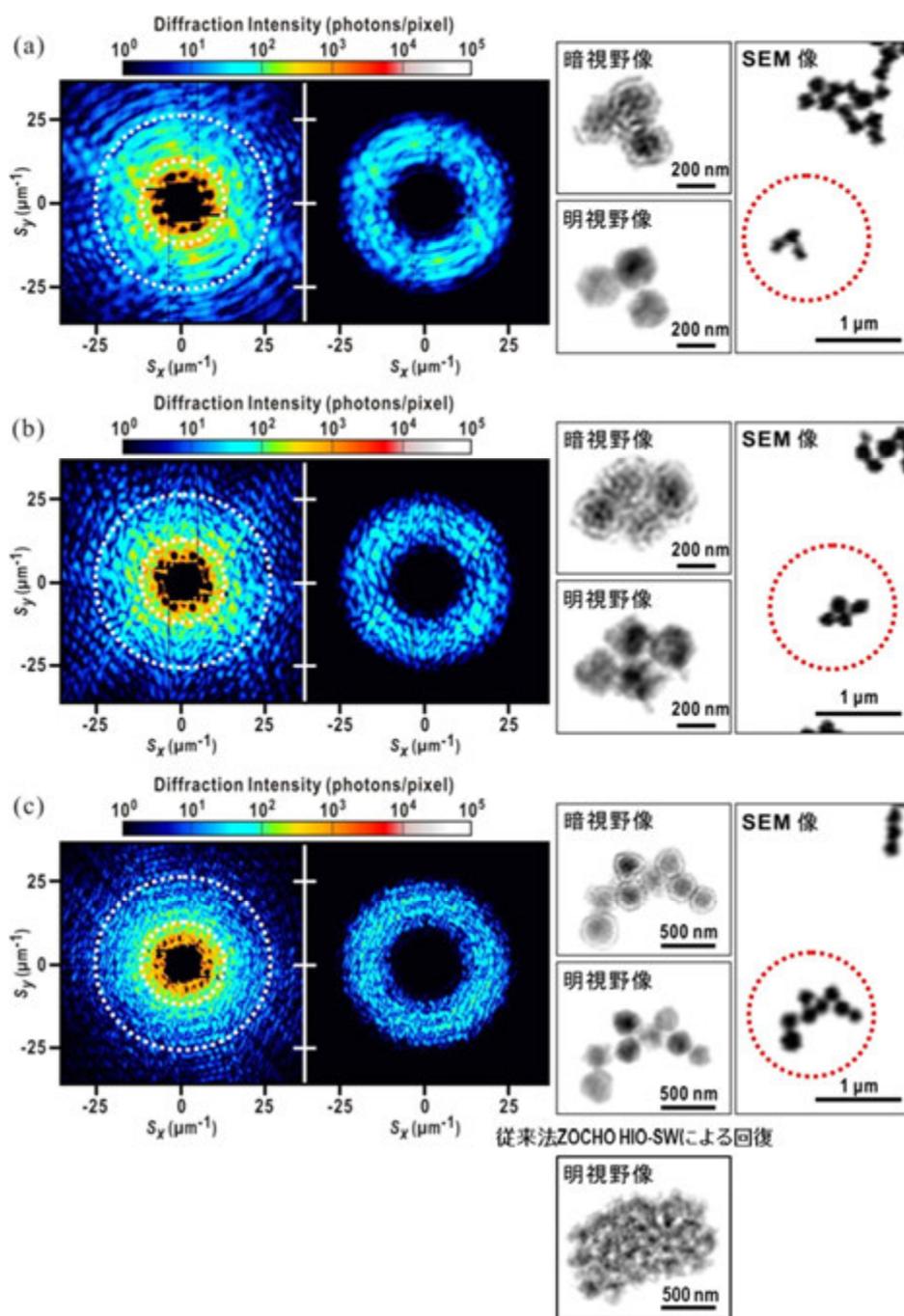


図 7-9 ドーナツ型マスクを用いた F_s -DFPR の XFEL-CXDI 実験データへの適用結果。(a)-(c)パネルはそれぞれ左から、実験で計測された回折パターン、白色点線の場所にドーナツ型マスク処理を行った回折パターン、回復像、SEM 像である。(a)-(c)のそれぞれの回折パターンからは 3 つ(a)、4 つ(b)、8 つ(c)の金コロイド粒子の電子密度像が回復された。これらは、赤色点線円で囲った SEM 像と概形の特徴がよく一致していた。(c)の最下部の電子密度像は従来法 ZOCHO HIO-SW によって回復された。

表 7-2 回折パターンの統計量と位相回復における指標

回折パターン	図 7-9(a)	図 7-9(b)	図 7-9(c)
回折パターンの統計量			
C_{sym} /パターン原点と ROI の中心間距離(μm^{-1})	0.89/15.2	0.90/15.2	0.94/14.6
欠損領域の分解能 (μm^{-1})	9.32	8.55	8.50
欠損されたスペックル	第五スペックルまで	第六スペックルまで	第七スペックルまで
像回復における指標			
OS 比 ^a	324	226	104
γ ^b	0.011	0.007	0.008
R_F ^c	0.241	0.240	0.245

^aOS 比は最後に更新されたサポートサイズと回折パターンのサイズの比で算出した。

$$^b \gamma = \frac{\sum_{\vec{r} \in \text{Support}} |\rho(\vec{r})|}{(\sigma - 1) \sum_{\vec{r} \in \text{Support}} |\rho(\vec{r})|}。 \sigma \text{ は OS 比である。}$$

^c $R_F = \sum \left(|F_{\text{obs}}| - K |F_{\text{calc}}| \right) / \sum |F_{\text{obs}}|$ 。 $|F_{\text{calc}}|$ は回復像から計算される構造振幅である。 $|F_{\text{obs}}|$ は実験で得られた回折強度から計算される構造振幅である。 K はスケール係数である。

7.1.5 考察

これまでの結果を踏まえ、Fs-DFPR を像回復に用いる利点と Fs-DFPR の適用限界について議論する。また、生体試料実験データへの応用についても検討した。

7.1.5-1 ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR の利点

まず、図 7-7 に示されるように、単一マスクを用いた DFPR より対称型マスクを用いた Fs-DFPR の方がより正確に暗視野像を回復した理由について議論する。図 7-5 のように対称型マスクが抽出する回折データ量は、単一マスクの倍である。しかし、対称型マスクを適用した回折パターンもまた Friedel 中心対称性を満足するため、正味の回折データ量は、単一マスクと変わらない。従って、単一マスクと対称型マスクの抽出す

る回折データ量の相違は、DFPR と Fs-DFPR で暗視野位相回復の成功率に影響を及ぼす主たる要因とは考え難い。この場合、Fs-DFPR の実数拘束が正確な暗視野像を回復する上で優位に働いたと考えるのが妥当である。DFPR では、虚数部・実数部両方を同時に回復させる必要があるが (7.1.2-1 節 式(7.3))、Fs-DFPR では実数部のみを回復させるため (式(7.6))、解くべき方程式の解 (第二章 式(2.28)) が半分となり、これが位相回復の収束性・信頼性を向上させたと考えられる。一般に、複素数像を回復するより実数の像を回復するほうが成功率は高いとされている[Miao *et al.*, 1998]。

正しい暗視野像の回復成功率に関しては、対称型マスクを用いた Fs-DFPR を凌いで、ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR が最も高かった(図 7-7)。両手法は、同じ実空間拘束条件が適用されているため、暗視野像回復効率の差異の原因は、それぞれで用いるマスクが抽出するデータ量であると考えられる。極小角領域が大きく欠損した実験データの位相回復においても、ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR では正確に金コロイド粒子の像概形を再現することに成功した (図 7-9)。Martin ら先行研究[Martin *et al.*, 2012b]では、大きなマスクを用いることでより良質の暗視野像が回復可能であることが報告されており、暗視野像の概形をより正確に再現するためにマスクの大型化が重要である。

位相回復の第二の手順である BFPR では、ドーナツ型マスクを用いて回復された暗視野像が初期モデルとして最適であるという結果を得た (表 7-1, 図 7-8)。さらに、欠損規模 Cut7、ポアソンノイズレベル NL3 という最も位相回復が困難な回折パターンからさえ、Type C や Type D の暗視野像を初期モデルとして”J”字型の概形を再現した電子密度像の回復が確認された (図 7-7, 表 7-1)。これは、概形を完全に再現していない暗視野像でも、BFPR において試料の大きさに関する情報を与えるため、全くランダムな初期モデルよりも比べて、回復成功率の向上につながったと考えられる。

7.1.5-2 Fs-DFPR の適用限界

ポアソンノイズの規模が NL3 にもなるとドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR であっても Type A の暗視野像を回復することができなかった(図 7-7)。これは Fs-DFPR がポアソンノイズに対して限界があることを示している。もとより、DFPR は回折強度が小さくなりがちな高角領域の回折データだけで位相回復を行うため、ポアソンノイズの影響を受けやすい。さらに、ポアソンノイズによって、Fs-DFPR を利用する際に必要不可欠な Friedel 対称性が破れることが位相回復を困難にする一つの要因として考えら

れる。厳密には、ポアソンノイズが含まれる実験データでは、Fs-DFPR を位相回復に用いることはできない。しかし、先の議論にもあったように、NL1, NL2 程度であれば、Fs-DFPR によって十分位相回復向上の効果があることがわかっている。C_{sym} が 0.9 程度で Friedel 対称性が少々破綻していても Fs-DFPR は有効に働く。そこで、どれほどポアソンノイズの規模が大きくなると、Fs-DFPR でも位相回復が困難になるのか定量的に評価する指標を考案した。

ここで、提案する指標は、以下のように定義される。

$$R_{S/N} = \frac{1}{n_{\text{pixel}}} \sum_{S_x, S_y \in \text{Shell}} \frac{I(S_x, S_y)}{\sqrt{I(S_x, S_y)}} \quad (7.14)$$

Shell は、ドーナツ型マスクの重みが 50%以上となる領域(図 7-9 白色点線)であり、n_{pixel} は Shell 内のピクセル数である。従って、この指標 R_{S/N} は、マスク処理で抽出されるデータ内の回折強度 I(S_x, S_y) とポアソンノイズの標準偏差である $\sqrt{I(S_x, S_y)}$ との比の平均値である。これが小さいほどポアソンノイズの影響が大きいと評価される。表 7-3 に位相回復シミュレーション及び XFEL-CXDI 実験データで用いた回折パターンの R_{S/N} を示す。位相回復シミュレーションでの NL3 を Fs-DFPR の限界と仮定すると、R_{S/N} が 4 以上でない位相回復が困難であることが予想される。このようにして、R_{S/N} を評価することで、Fs-DFPR が適用可能か否かを判断することもできる。実際には、R_{S/N} ≥ 4 ほど、高角領域まで高い S/N 比で回折強度が観測される場合は、極小角領域を大きく欠損することが多い。Fs-DFPR はこういった回折パターンからの位相回復に貢献するものと期待される。また、実用的には、R_{S/N} は、回折パターン全観測領域を評価するのではなく、マスクを処理が重点的に施される回折データ領域を評価する。そのため、マスクの配置方法によってポアソンノイズの評価が異なることを考慮すべきであろう。

今回は、位相回復アルゴリズムとして標準的な HIO に Fs-DFPR を実装したが、さらなる発展のために、ポアソンノイズの影響に高い耐久性を示すとされる新しい位相回復アルゴリズムを Fs-DFPR に取り入れれば、より位相回復性能向上が見込めるかも知れない。例えば、Martin らは、実空間拘束条件(第二章 式(2.32))を以下のように工夫することによって、ノイズによる影響が大きい回折パターンから位相回復効率が向上したと報告している [Martin et al., 2012a]。

$$\rho_{n+1}(\vec{r}) = \begin{cases} \rho_n'(\vec{r}) & \in \text{support} \\ \rho_n(\vec{r}) - \beta \rho_n'(\vec{r}) & \notin \text{support} \cap |\rho_n'(\vec{r})| > 3\sigma_{\text{noise}} \\ 0 & \notin \text{support} \cap |\rho_n'(\vec{r})| \leq 3\sigma_{\text{noise}} \end{cases} \quad (7.15)$$

$$\sigma_{\text{noise}} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_m \sigma_m^2(\sqrt{I})}, \quad \sigma_m^2(\sqrt{I}) = \begin{cases} \langle I_m \rangle & I_m \leq 0.2 \\ 0.5 & I_m < 0.2 \end{cases}$$

ここで、N は回折パターンを構成するピクセル数である。上記の実空間拘束条件では、ノイズレベル σ_{noise} を円環平均 $\langle I_m \rangle$ から見積もり、ある一定のノイズレベル以下の電子

密度については 0 に落とすことで、ノイズが位相回復計算に及ぼす影響を抑えている。このアルゴリズムは、本研究で開発した暗視野位相回復法の要となる実数拘束によって効力を失うことはない。従って、実空間拘束条件を式(7-9)から上記のものに変えるだけで、暗視野位相回復法に適用することが可能である。また、第二章 2.4.4 節で述べた OSS アルゴリズム[Rodriguez *et al.*, 2013]も同様に実空間拘束条件を式(2.37)、式(2.38)のように変更すれば暗視野位相回復法と組み合わせて利用することができる。

表 7-3 位相回復シミュレーション及び XFEL-CXDI 実験データにおける $R_{S/N}$

回折パターン	像回復シミュレーション [図 7-7]			実験データ		
	NL1	NL2	NL3	図 7-9 (a)	図 7-9 (b)	図 7-9 (c)
Shell	0.14-0.35 Å ⁻¹			13-27 μm ⁻¹ (図 7-9)		
$R_{S/N}$	29.45	9.38	3.17	4.13	5.29	6.36

7.1.5-3 生物試料実験データへの適用

XFEL-CXDI 実験データでは、金属試料(金コロイド粒子)に対する Fs-DFPR 位相回復の有効性を検討した。電子密度が高く散乱断面積が大きい金属試料の方が S/N 比の良い回折パターンになるためである。生体試料としては PDI を位相回復シミュレーションの標的としたが、金属試料に比べると軽元素で構成されており、サイズも小さい一分子であるため、十分 S/N 比の良い回折パターンを得るためには、入射 X 線強度は、最低でも 9.39×10^{25} photons/μm²/pulse 必要であり、現実の SACLA で供給される XFEL の強度には遠く及ばない。しかし、ミクロンサイズの大きな細胞のような生体試料であれば、現在の実験で得られる XFEL 入射強度 2.0×10^{10} photons/2 × 2 μm²/pulse で Fs-DFPR が適用可能な回折パターンを計測できるのか見積もりを立てた。

回折強度の規模の評価には、回折角 0° の $I(\vec{s} = \vec{0})$ が簡単である。位相回復シミュレーションの回折パターン作成時に用いた式(7.10)を用いて、

$$\begin{aligned}
 I(\vec{s} = \vec{0}) &= I_{\text{incident}} r_e^2 \left(\frac{\lambda}{\sigma d} \right)^2 |F(\vec{s} = \vec{0})|^2 \\
 &= I_{\text{incident}} r_e^2 \frac{\lambda^2}{\sigma} V d \tilde{\rho}^2
 \end{aligned}
 \tag{7.16}$$

が導かれる。ここで、 λ は波長、 σ は OS 比、 V 及び d は試料の体積及び厚み、 $\tilde{\rho}$ は試料の平均電子密度である。PDI の場合、 $I_{\text{incident}} = 9.39 \times 10^{25}$ photons/μm²/pulse, $\lambda = 0.003$ nm $V = 1.7 \times 10^4$ Å³, $d = 20$ Å, $\tilde{\rho} \approx 0.42$ e/Å³ である。このとき、式(7.16)を用いると、PDI から観測される $I_{\text{PDI}}(\vec{s} = \vec{0})$ は、

$$I_{\text{PDI}}(\vec{S}=\vec{0})=\frac{r_e^2}{\sigma}A$$

$$,A=9.39\times 10^{25}\text{ photons}/\mu\text{m}^2/\text{pulse}\cdot(0.003\text{ nm})^2\cdot 1.7\times 10^4\text{ \AA}^3\cdot 20\text{ \AA}\cdot(0.42\text{ e}/\text{\AA}^3)^2 \quad (7.17)$$

である。ここで、同じ平均電子密度 $\bar{\rho}$ 、同じ OS 比 σ で試料サイズが直径 2.0 μm (集光 XFEL ビームサイズと同じ)の球体へ大きくなった場合を考える。SACLA で用いている XFEL パルスと同じ波長 $\lambda = 0.225\text{ nm}$ の X 線を使用することを考慮すると、予想される回折強度 $I_{\text{sphere}}(\vec{S}=\vec{0})$ は、

$$I_{\text{sphere}}(\vec{S}=\vec{0})=I_{\text{incident}}\frac{r_e^2}{\sigma}B, B=(0.225\text{ nm})^2\cdot\frac{4\pi\cdot(1\mu\text{m})^3}{3}\cdot 2\mu\text{m}\cdot(0.42\text{ e}/\text{\AA}^3)^2 \quad (7.18)$$

である。この試料で、PDI の場合と同じ回折強度を観測する、即ち、 $I_{\text{sphere}}(\vec{S}=\vec{0})=I_{\text{PDI}}(\vec{S}=\vec{0})$ とするためには、入射 X 線強度 I_{incident} は、式(7.17)、式(7.18)より、

$$I_{\text{incident}}=\frac{\frac{r_e^2}{\sigma}A}{\frac{r_e^2}{\sigma}B}=6.78\times 10^{10}\text{ photons}/\mu\text{m}^2/\text{pulse} \quad (7.19)$$

が必要であると評価できる。この程度の I_{incident} であれば、SACLA で供給される XFEL パルスの強度($\sim 10^{10}\text{ photons}/2\times 2\mu\text{m}^2/\text{pulse}$)と同じオーダーである。従って、タンパク質程度の電子密度を持ったミクロンサイズの試料であれば、Fs-DFPR が適用可能な XFEL-CXDI 実験データが計測できる。

例えば、原始紅藻類 *Cyanidioschyzon merolae* より単離した葉緑体は、約 1.0 ~ 1.5 μm と大きいため、位相回復に十分な S/N 比が得られる。しかし、スペックルサイズは試料サイズに逆比例して小さくなるため(第二章 式(2.27))、ビームストッパー及び検出器の飽和で欠損されるスペックル数は金属試料に比べると多くなる。図 7-10 は、極小角領域が MPCCD Dual 検出器まで飽和によって欠損された回折パターンである。このパターンよりドーナツ型マスクによる Fs-DFPR 位相回復を試行すると、適当なサイズの電子密度像を回復することに成功した。したがって、ドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR は生体試料の実験データにおいても今後大いに位相回復で貢献するものと期待できる。

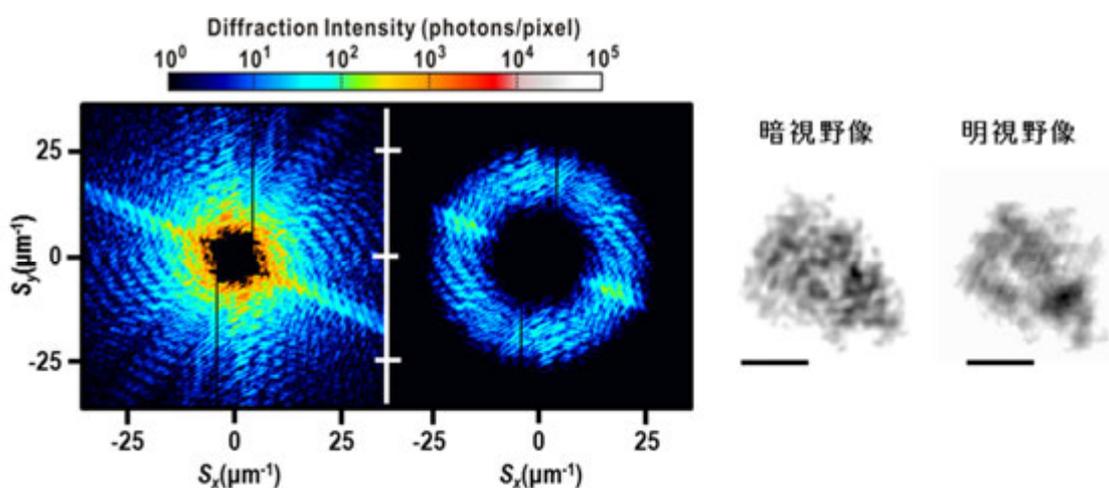


図 7-10 葉緑体からの回折パターンに Fs-DFPR を適用した結果。左より順に、葉緑体の回折パターン、ドーナツ型マスク処理を施した回折パターン、暗視野像、明視野像である。極小角領域を大きく欠損しているだけに R_{SN} は、5.01 と大きく、S/N 比の良好な回折データといえる。回復した電子密度像のスケールバーは 500 nm である。

7.2 ガウシアンマスクによって得られる自己相関関数を用いた応用

自己相関関数は、第二章 式(2.35)のように回折強度を Fourier 変換することで計算可能であるが、実験データは極小角領域を欠損しているため、欠損部周辺で回折強度が不連続になる。これを Fourier 変換すると Gibbs 現象によるフリッジが生じるため(図 7-11) [Gibbs, 1899]、試料サイズの大きさを正確に判定できないことがしばしばであった。本節では、前節で説明したガウシアンマスクを用いて自己相関関数を導き、暗視野位相回復法における自動マスク処理方法や回折パターンに寄与するビームサイズ判定への応用を検討した。

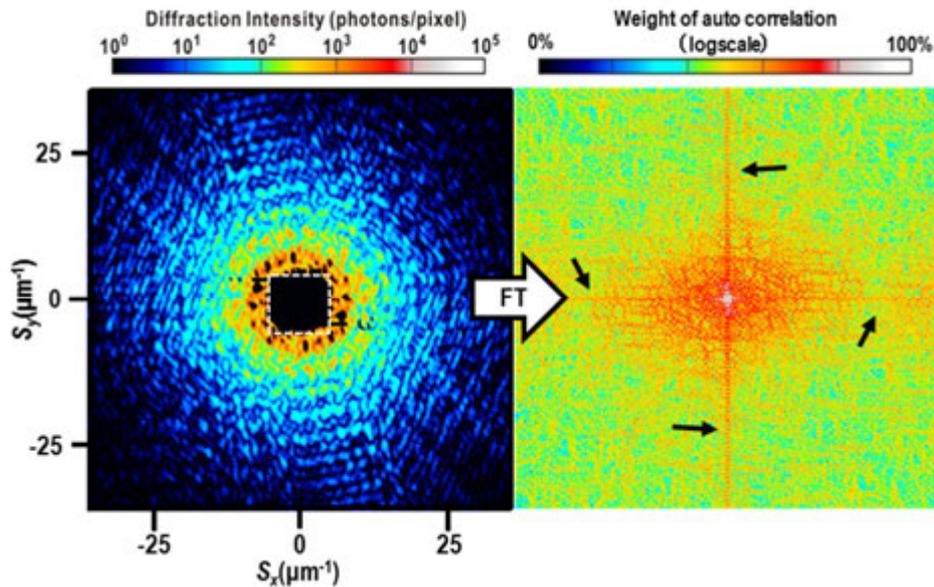


図 7-11 回折パターンを直に Fourier 変換(FT)すると極小角領域の不連続点(白点線部)によって自己相関関数には Gibbs 現象由来のフリンジが生じる(黒矢印)。

7.2.1 暗視野自己相関関数の導入

7.1 節のガウシアンマスクを回折パターンに処理すると、極小角領域の不連続領域を低減することができる。マスクを乗じた回折パターンの Fourier 変換で与えられる自己相関関数は以下のようなになる。

$$\int M(\vec{S})^2 I(\vec{S}) \exp(2\pi i \vec{u} \cdot \vec{S}) d^2 S = \int \rho_M(\vec{r}) \rho_M(\vec{r} + \vec{u}) d^2 r \quad (7.20)$$

$$, \rho_M(\vec{r}) = \text{FT}^{-1} [M(\vec{S})] \otimes \rho(\vec{r})$$

この自己相関関数に対して、試料由来の領域を抜き出すために、ある閾値を境に二値化する。この閾値はバックグラウンドノイズの影響を考慮して、自己相関関数の平均値と標準偏差の和とした。二値化した自己相関関数は、“モルフォロジー演算” [Rosenfeld & Kak, 1982] によって輪郭の鮮明化・平滑化を行った(図 7-12)。

モルフォロジー演算では、まず、二値化された自己相関関数の各ピクセルを中心とした円を置きその論理和(OR)をとる。これを膨張処理という。膨張処理された自己相関関数から、試料領域を囲う包絡線を処理プログラムで判別することが容易にできるようになる。最後に包絡線上に円をおいて論理否定(NOT)をとった。これを収縮処理という。ここでの収縮処理には膨張した分の面積を差し引く目的がある。このような過程を経て得られる領域を以降、便宜上、暗視野自己相関関数と呼ぶ。

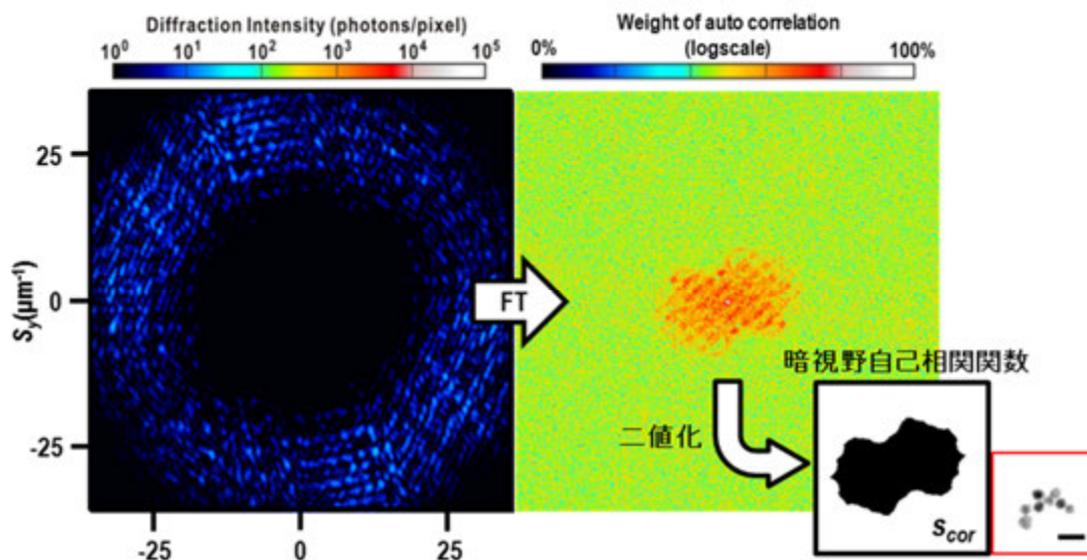


図 7-12 暗視野自己相関関数を求める方法。電子密度像(右下赤線で囲んだ像)が既知である図 7-9(c)のデータを例に説明する。図 7-11 の回折パターンの極小角領域でのデータの不連続性はドーナツ型マスク処理することで除去することができる(左)。これを Fourier 変換(FT)すると Gibbs 現象由来のフリッジのない暗視野自己相関関数を求めることができる(右)。二値化すると暗視野自己相関関数の面積 s_{cor} (黒塗りの領域)を求めることができる。電子密度像と比較するとあらゆる方向の試料長がおおよそ二倍となっており、試料サイズと相関があることが見てとれる。電子密度像のスケールバーは 500 nm で、暗視野自己相関関数の長さのスケールと合わせて表示した。なお、これらの操作は全自動で実行可能である。

膨張処理・収縮処理の際に置く円の大きさの決定方法について説明する。暗視野像は、マスクの逆 Fourier 変換と電子密度像との畳み込みであるため(式(7.3))、もとの電子密度像よりマスクの逆 Fourier 変換の分だけ膨張している。暗視野像の膨張分 W_{gauss} は、ドーナツ型マスクを構成するガウシアンマスクの半値全幅 F_{gauss} に依存して増減する。 W_{gauss} は二値化の際に用いた閾値 $C_{threshold}$ とその規格化のための自己相関関数の最大値 C_{max} を用いて、

$$W_{gauss} = 4 \frac{\sqrt{\ln(C_{threshold} / C_{max})^{-1} \ln 2}}{\pi} \cdot F_{gauss}^{-1} \quad (7.21)$$

と求めた。自己相関関数ではその倍の $2W_{gauss}$ 膨張していることになる。膨張処理は、空

孔さえ埋まれば良いので、適当に半径 W_{gauss} の円を採用した。この時点で膨張幅は $4W_{\text{gauss}}$ である。収縮処理では暗視野像の膨張分まで取り除きたいので、半径 $2W_{\text{gauss}}$ の円を採用した。

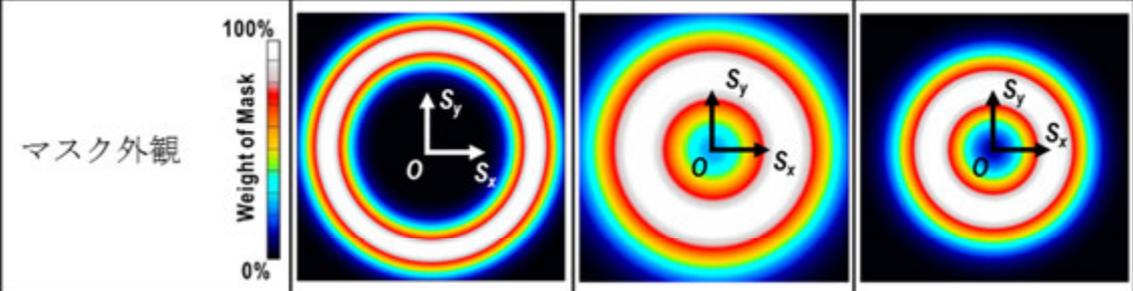
暗視野自己相関関数を求める際には、ドーナツ型マスクを用いる。暗視野位相回復法のようにマスクが抽出するデータ量を考慮する必要がないため、 I_{donut} (式(7.7))がほぼ 0 になるようなマスクを選出すればよい。そのため、自動処理は容易に行うことが可能である。暗視野自己相関関数は試料の最大長の 2 倍の長さを与える関数であり、試料形状がほぼ球体であれば、その面積は試料サイズのおよそ 4 倍になる。膨大量の回折データが取得できるようになった高砂六号を用いた XFEL-CXDI 実験では、暗視野自己相関関数の計算プロトコルを実装した自動処理ソフトウェアによって測定中にリアルタイムに試料サイズ分布を求めることができるようになっている[関口、2016]。

7.2.2 暗視野自己相関関数のドーナツ型マスク自動処理法への応用

2017 年現在、高砂六号を用いた XFEL-CXDI 実験では、一回のビームタイムで 100 万枚以上の回折パターンが取得される(第六章 6.2.1 節)。これらの中で検出器の飽和が生じるものは、10~20%程である。現段階では、Fs-DFPR の適用は人の手を介して実行されているが、膨大な数の回折パターンに対して、自動処理スキームの構築が必要不可欠である。

Fs-DFPR を自動化するにあたってボトルネックとなっているのは、ドーナツ型マスク処理の自動化である。表 7-4 にマスク処理において検討すべき要件をまとめた。第一に、極小角領域の強度を十分に減衰させなければならないが、検出器の飽和によって生じるデータ欠損領域の規模は、回折パターンごとに異なるため、これを自動で判断しなければならない。第二に、マスクサイズを大きくとって位相回復に必要な回折データ量を十分に確保することも重要である。一方で、マスクを大きし過ぎると先に述べた極小角領域の減衰が十分になされない。第三に、S/N 比の良い回折データ領域を抽出するようマスクの配置を考えなければならない。マスク内の S/N 比は 7.1.5-2 節で議論した R_{SN} (式(7.14))で評価可能である。S/N 比の良い領域は回折強度の大きい低角領域であるが、これだけ抽出するのでは、マスクサイズに制限をかけてしまう。このようなトレードオフがあるため、第一、第二、第三の条件をすべて最大限に満足させることは困難である。しかし、幸いなことにドーナツ型マスクの大きさ及び配置を決定するパラメータは、ガウシアンマスクの広がりと同様に原点からマスクピーク位置までの距離の 2 つと少なく、対称型マスクに比べると処理が比較的容易である。

表 7-4 マスク処理で検討すべき条件

マスク外観	
欠損領域の減衰	大
マスクサイズ	小
S/N	悪
	小
	大
	中
	良

ドーナツ型マスクは式(7-6)で定義され、二つのパラメータで制御される。回折パターンに適用する際の表 7-4 の要件を考慮するため、さらに、図 7-13 のパラメータを定義した。一つは欠損領域を評価する \bar{s}_{lack} である。 \bar{s}_{lack} は原点から回折強度が観測される最も小角のピクセルの座標である。次にドーナツ型マスクが抽出する回折データ領域である。マスク抽出が行われる領域は、マスクの重みの半値以上の領域として Shell 状になる(図 7-13)。ここで、原点から Shell の低角側までの距離を s_{low} 、広角側までの距離を s_{high} と定義した。これを用いて、マスクの面積 s_{donut} は、

$$s_{\text{donut}} = \pi(S_{\text{high}}^2 - S_{\text{low}}^2) \quad (7.22)$$

となる。

まずは、 \bar{s}_{lack} の自動判定方法について検討する。回折パターンには、スペックルによる強度揺らぎがあるものの、大域的には必ず極小角領域が最も回折強度が大きい。そのため、最も大きい回折強度 $I(\bar{s}_{\text{lack}})$ で簡単に \bar{s}_{lack} を判定でき、マスク $M_{\text{donut}}(\bar{s})$ (式(7.8)) による減衰は、

$$M_{\text{donut}}^2(\bar{s}_{\text{lack}}) \cdot I(\bar{s}_{\text{lack}}) \equiv I_{\text{donut}} \quad (7.23)$$

を測ることで評価できる。

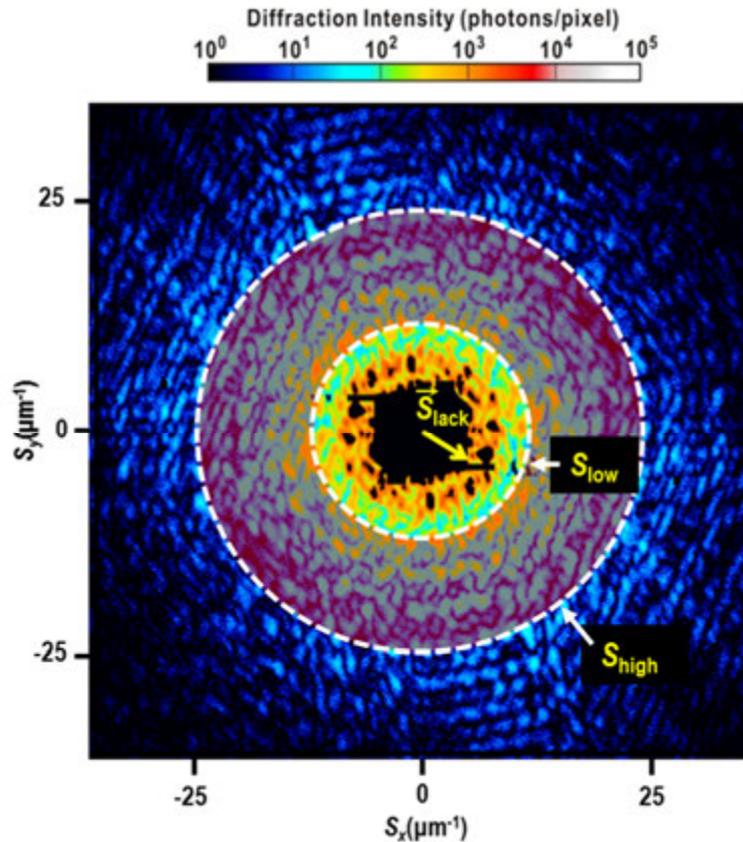


図 7-13 ドーナツ型マスク処理を決定するパラメータ。白色点線円の Shell で囲まれた半透明紫色の領域が、ドーナツ型マスクが回折データを抽出する領域である。

マスク処理を行えば、極小角領域欠損の影響低減と引き換えに回折データ量は減少する。位相回復に必要な回折データ量は、OS 条件によって決まっており(第二章 2.4.1 節)、これより回折データを減少しないようにする必要がある。マスクが抽出する回折パターンのピクセル数は、先に定義したように s_{donut} (式(7.22))とするが、OS 比を導くためには、試料サイズが既知でなければならない。そこで、試料サイズと相関のある暗視野自己相関関数を求めて OS 比を評価する。

暗視野自己相関関数の面積 s_{cor} より、試料サイズを評価することができる。これより、マスク処理を行った回折パターンにおける OS 比を独自に考案した指標 σ_{mask} によって評価する。

$$\sigma_{\text{mask}} = \frac{s_{\text{donut}}}{s_{\text{cor}}} \quad (7.24)$$

試料が一様な電子密度の球あるいは立方体といった単純な構造のものであれば、 s_{cor} は

試料サイズの4倍となるため、OS比 σ との関係は、 s_{pattern} を回折パターン全体のピクセル数として、

$$\sigma_{\text{mask}} = \frac{1}{4} \frac{s_{\text{donut}}}{s_{\text{pattern}}} \sigma \quad (7.25)$$

であり、OS比を定量的に評価する指標であることがわかる。

以上で自動ドーナツ型マスク処理に必要なパラメータ(I_{donut} , σ_{mask} , $R_{\text{S/N}}$)が決まったので、ここでは、これらをどのように用いるかを検討する。まず、回折パターンの大きさの範囲内であらゆるパラメータを変化させて膨大な種類のドーナツ型マスクを予め作成する。作成したマスクの数は、大きさ512 pixels×512 pixelsの回折パターン用に18,341となった。これを「ドーナツ型マスクバンク」とし、処理を高速にかつ簡易的に行うために用いる。

図7-14に自動マスク処理スキームの概念図を示す。このスキームを実行するために、2つのパラメータを設けた。一つは I_{donut} の目標値 I_{target} 、二つは σ_{mask} の閾値 $\sigma_{\text{threshold}}$ である。まず、 $I_{\text{donut}} \approx I_{\text{target}}$ となるマスクをドーナツ型マスクバンクより選び、それらの中で、 s_{high} (図7-14)が最も高角に位置するマスクより $\sigma_{\text{mask}} \geq \sigma_{\text{threshold}}$ の条件を満たすものについて $R_{\text{S/N}}$ を計算し、4以上(7.1.5-2節)であるものを位相回復に用いるマスクとして採用する。 $R_{\text{S/N}} < 4$ であった場合は、 s_{high} が高角にあるためにS/N比が悪い回折データ領域をマスクで取り込んでいる状況が考えられる。そこで、 s_{high} を低角側へシフトしたマスクを用いた。一方で、 s_{high} を低角にすると、マスクサイズ s_{donut} は減少し、 σ_{mask} は低くなる。あまりにもS/Nが悪い回折パターンであれば、 $\sigma_{\text{mask}} \geq \sigma_{\text{threshold}}$ の条件を満足できない。このような回折パターンの場合は、位相回復は不可能であると考え、破棄する。

以上のスキームを用いると、「Fs-DFPRの適用限界 $R_{\text{S/N}} \geq 4$ を満足する極力大きなマスク」を適用することになる。図7-15にこのスキームで、マスク処理を行い、Fs-DFPRを実行した例を示す。最適なマスク配置の条件は、要となるパラメータ I_{target} と $\sigma_{\text{threshold}}$ 及び初期電子密度を複数振り分け、大量に位相回復を行い、その結果を統計的に評価することで探索が可能となるであろう。

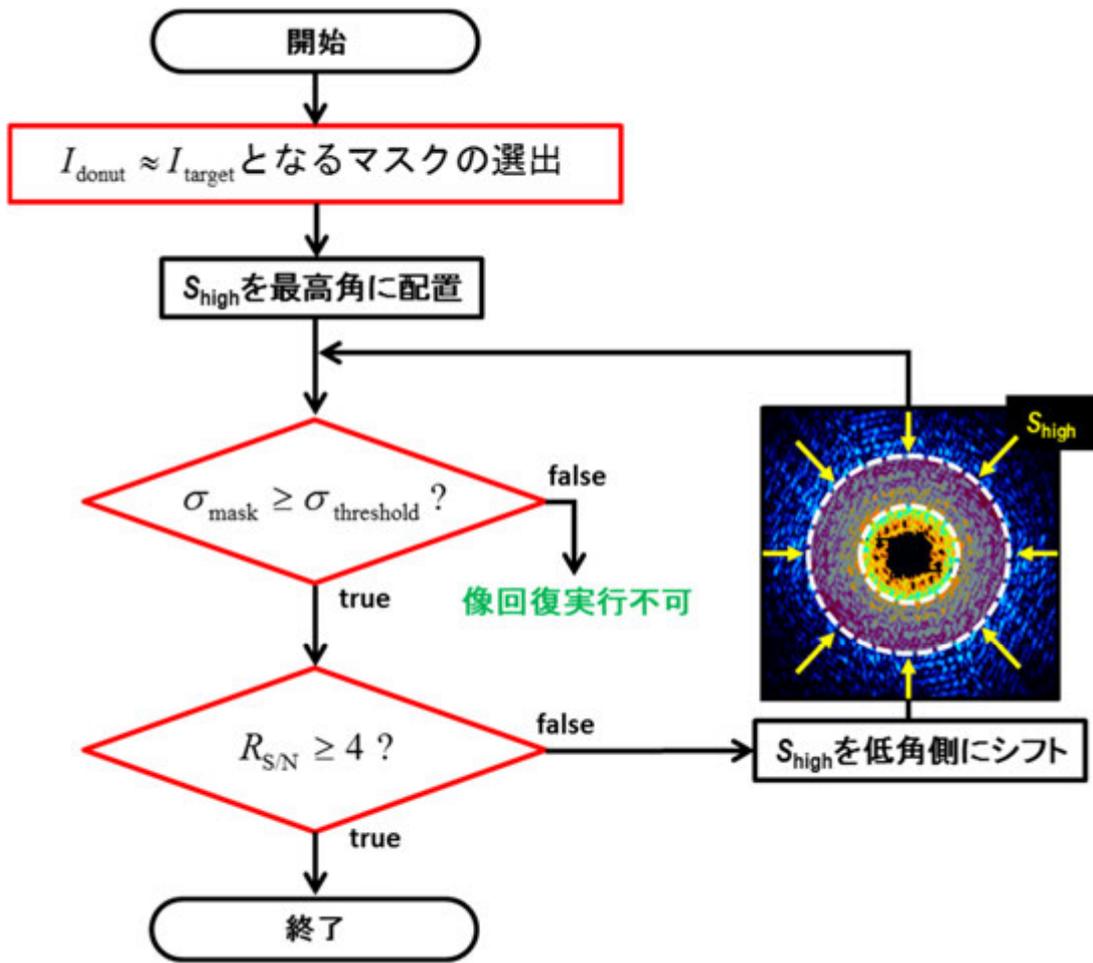


図 7-14 自動ドーナツ型マスク処理スキームを表した模式図。

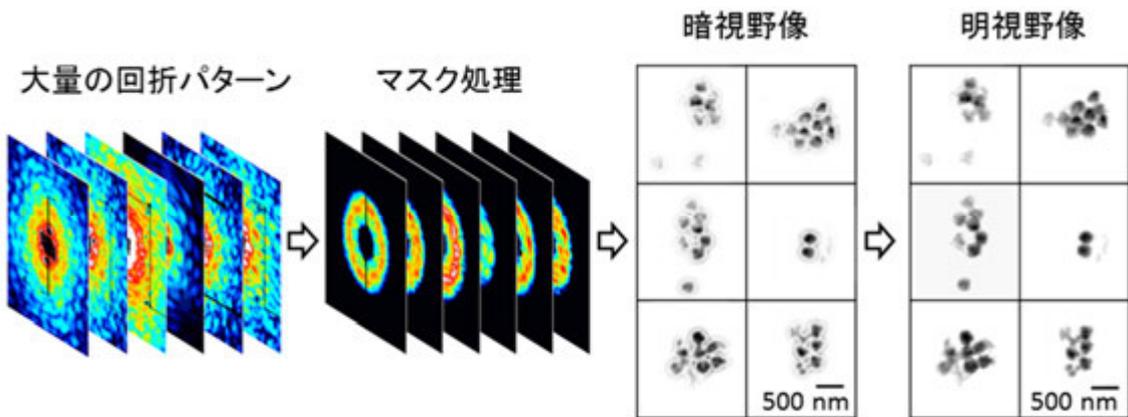


図 7-15 位相回復自動化の例。自動マスク処理のパラメータは $I_{\text{target}} = 10^{-3}$ 、 $\sigma_{\text{threshold}} = 10$ とした。試料は直径 250 nm 金コロイド粒子である。

7.2.3 回折パターンに寄与するビームサイズ評価への応用

第四章で記述したように、XFEL パルスのビームの大きさは、ナイフエッジスキャンによって測定され、おおよその大きさは FWHM で約 $2 \mu\text{m}$ である (第四章 4.4 節)。しかし、これは多数の XFEL パルスに関する平均であり、個々の XFEL パルスについては測定がなされていない。ここでは、暗視野自己相関関数を応用し、回折パターンに寄与する各 XFEL パルスの範囲を評価する方法を検討する。

自己相関関数の大きさをビームサイズに対応させるためには照射領域すべてを埋め尽くす試料を用意しなければならない。そこで XFEL パルスの性質を評価するために 50 粒子/ $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ の高密度で散布した 50 nm の金コロイド粒子の回折パターンで評価する (第五章 5.2.1 節)。薄膜全面に金コロイド粒子が散布されているため、ほぼ 100% の確率で図 7-16 (a) と同等の回折パターンが得られるため、XFEL ショットごとにビームサイズを評価することが可能である。

大きさ D のコロイド粒子の電子密度が一様に ρ_0 であるとする、多数の粒子からの回折強度 $I(\vec{S})$ は以下のように記述できる。

$$I(\vec{S}) \propto \left| \sum_n \exp(2\pi i \vec{L}_n \cdot \vec{S}) \right|^2 \cdot \left| \frac{4\pi}{3} D^3 \rho_0 \frac{J_1(2\pi SD)}{2\pi SD} \right|^2 \quad (7.26)$$

\vec{L}_n は金コロイド粒子の位置、 $J_1(x)$ は一次のベッセル関数である。回折パターンは後半の項によって同心円状のパターンになる。そこに前半の項によって細かいスペックルが生じる。計測される金コロイド粒子の回折パターンは、以上の式で説明できるパターンであった (図 7-16 (a))。スペックルサイズは、約 $0.44 \mu\text{m}^{-1}$ であった。

マスク抽出領域における回折データの S/N 比を良好なものとするため、同心円状パターンのピークとなる位置にドーナツ型マスクを乗じて (図 7-16(b))、暗視野自己相関関数を求めると (図 7-16(c))、暗視野自己相関関数はほぼ円形であり、垂直及び水平方向に同じ範囲であるというナイフエッジスキャンの結果を説明できた (第四章 4.4 節)。ビーム形状を円形として自己相関関数からビームの直径を計算した (図 7-16(d))。

図 7-16(e) は 1000 shots の XFEL パルスのサイズ分布である。ガウス分布と仮定すると、平均 $2.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であった。ビームプロファイルの中でもこの大きさの範囲が回折パターンに大きく寄与しているといえる。この範囲内に粒子が二つ以上存在する場合は、凝集体からの回折パターンとなるだろう。

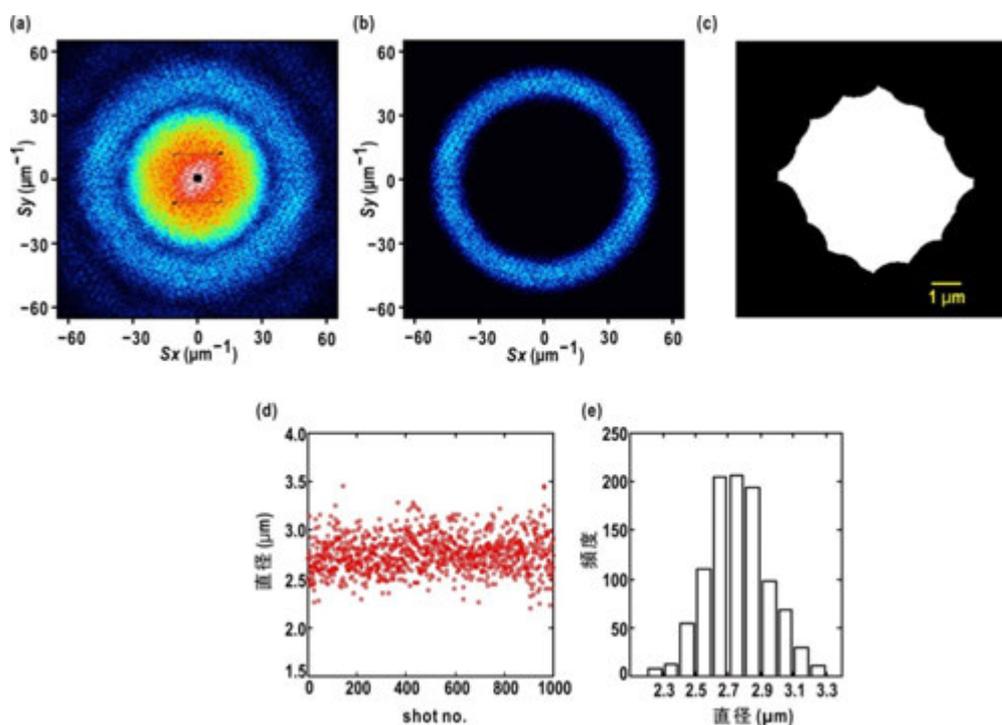


図7-16 (a)照射野を埋め尽くす50 nmの金コロイド粒子の回折パターン。(b)ドーナツ型マスクを乗じた回折パターン。(c)暗視野自己相関関数。XFELパルス毎のビームの直径(d)とそのサイズ分布(e)。

ビームプロファイルを FWHM 2 μm のガウス関数とすると、2.8 μm の範囲ではビームのピークの 26%以上の強度があり、ビーム強度の全体の 74%の強度を含んでいることになる。PIN photodiode で 0.02%に減衰させたビーム強度を 200 shots 測定し、減衰分を換算すると、ビーム強度全体で $10 \pm 0.5 \mu\text{J/pulse}$ (1.1×10^{10} photons/pulse)であった。従って、回折パターンに大きく寄与するのはこのうち約 7.4 $\mu\text{J/pulse}$ の強度ということになる。

現在では、金コロイド粒子の回折パターンにこの方法を適用し、細胞試料の XFEL-CXDI 実験に先立って SEM 像観察による照射痕の確認(第四章 4.4 節)だけでなく、ショットごとに回折パターンに寄与するビームサイズを評価している。

7.3 展望

これまで、回折パターンから試料の詳細な情報を得るためには位相回復を行うしかなく、位相回復のできない回折パターンは解析から除外する他なかった。暗視野位相回復法は位相回復できる回折パターンを増加させることができたといえるが、すべての回折

パターンに適用できるわけではない。暗視野自己相関関数は位相回復に先立って試料の大きさの情報を得ることができるため、回復像の成否判定に使用できるはずである。例えば、回復像の自己相関関数が暗視野自己相関関数にどれほど一致するか評価することである。

7.2.2 節のマスク処理の自動化だけでは、自動で位相回復処理を行うことはできない。位相回復アルゴリズムにおけるパラメータ群を最適なものを選択する必要があるためだ。これらの中には、今日まで恣意的・経験的に定めているものがあり、大量の回折パターンに臨機応変に対応するのが非常に困難な状況にある。例えば、SW の手順 3(第二章 2.4.2 節)で用いる閾値は、サポート領域の大きさをコントロールするが、小さな増減で位相回復の結果が様々に変化することが近年の解析で明らかになってきた。試料サイズを評価できる暗視野自己相関関数を参照データとして活用することで、試料ごとに最適なパラメータ設定を行い、位相回復効率をさらに向上させることができるのではないかと期待している。

第八章 細胞の三次元構造解析に向けた将来展望

回折装置の制御ソフトウェア（第四章）を開発し、効率的な計測に適合した試料調製方法を考案したことで（第五章）、回折パターンの測定効率が飛躍的に向上した（第六章）。また、すでに研究室で開発されていた位相回復プロトコル ASURA[Sekiguchi *et al.*, 2016]によって回復された投影電子密度像に高い信頼度が得られるようになった。本研究では、窒化シリコン薄膜に散布された生体試料粒子が、X 線入射方向に対して様々な配向きにあると考え、大量の回折パターンから得られる投影電子密度に対して、透過型電子顕微鏡で開発された単粒子解析を適用し、シアノバクテリアの細胞を対象とした三次元構造解析を試みた。

8.1 XFEL-CXDI による三次元構造解析の概要

SPring-8 など得られる第三世代放射光光源を用いた CXDI 実験では、三次元トモグラフィー構造解析が行われてきた[Chapman *et al.*, 2006b; Miao *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2005; Nishino *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2014; Gallagher-Jones *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2015]。トモグラフィー実験では、試料を回転させ、複数の配向で回折パターンを測定し、既知の配向に従って三次元再構成することができる。しかしながら、XFEL-CXDI 実験では、XFEL パルス 1 ショットで試料が破壊されてしまうため、同じ個体の試料粒子でトモグラフィーを行うことができない。XFEL-CXDI で得られる回折パターン及び投影電子密度像は、個体も異なれば、配向情報も未知である。そこで、各個体間の構造に大きな差がないことを前提条件として、それぞれの相対的な配向を推定する三次元再構成法を試みる。

XFEL-CXDI での三次元再構成については、二通りの方法が提案されている。第一の方法では、各回折パターンでの粒子の配向を推定して逆空間中での三次元回折パターンを再構成し、それに対して三次元位相回復法を適用して、三次元電子密度を回復する(図 8-1 (a))。この方法によって、ミミウイルスの三次元構造解析が行われたが[Ekeberg *et al.*, 2015]、三次元回折パターンを作成するためには 10%程度変動する入射強度を規格化しなければならない。なぜなら、入射強度 I_0 は、電子密度 $\rho(\vec{r})$ の総積算量(電子密度)に以下のように影響するためである。

$$\left| \int \rho(\vec{r}) d^3 r \right|^2 = \frac{I(\vec{S} = \vec{0})}{I_0 K} \quad (8.1)$$

ここで、 K は古典電子半径などを含む係数である。回折パターンを中心 $I(\vec{S}=\vec{0})$ は、ビームストッパーによって取得できないため、三次元回折パターンを作成する際に入射強度の変動による影響を考慮することは容易ではない。

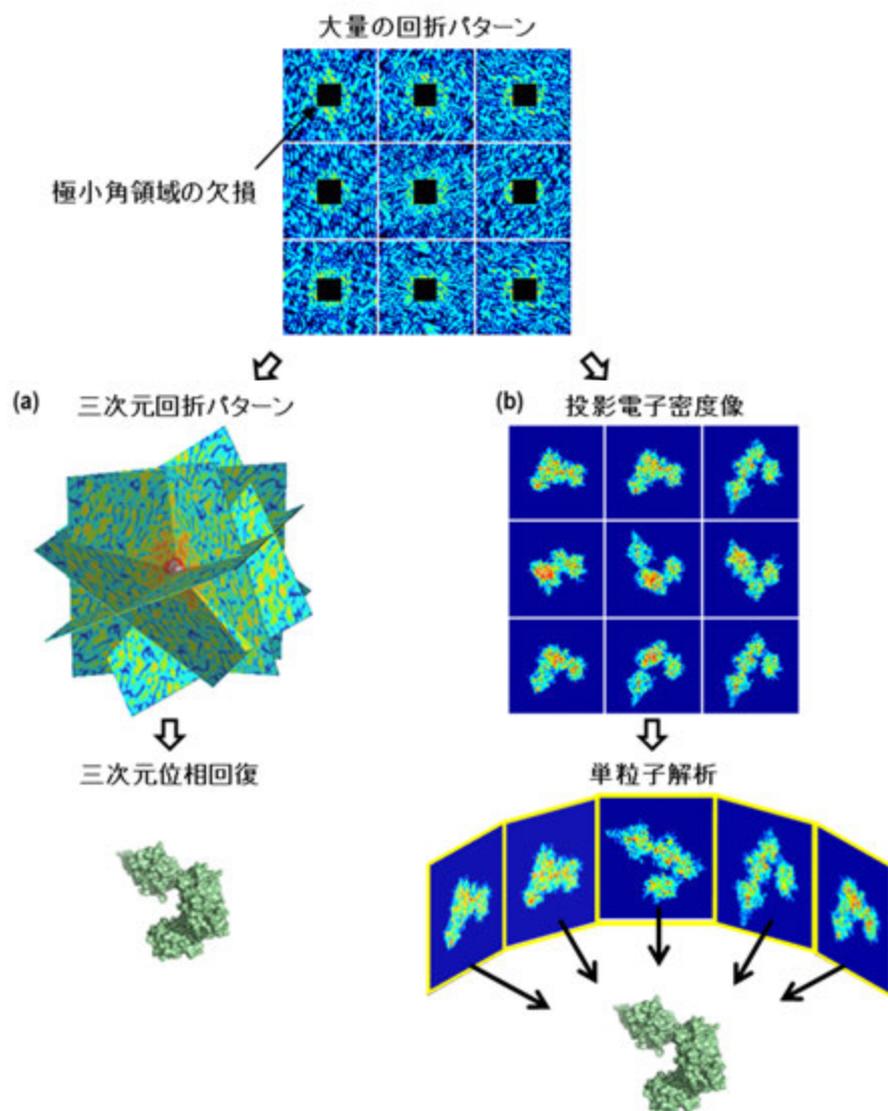


図 8-1 XFEL-CXDI における三次元再構成手法。(a)三次元の回折パターンを作成し、三次元位相回復によって三次元電子密度像を取得する方法。(b)投影電子密度を回復した後に単粒子解析によって、三次元電子密度像を再構成する方法。ここでは厳密に描写していないが、実験で得られる回折パターンは極小角領域が欠損している。

第二の方法では、各回折パターンから投影電子密度図を回復し、電子顕微鏡の分野で開発された単粒子解析法[Frank, 2006]を用いて投影像を三次元再構成する[Kodama & Nakasako, 2011; Oroguchi and Nakasako, 2013] (図 8-1 (b))。この手法では、投影電子密度像間で総電子密度が同じになるように規格化すれば、入射強度の変動による影響を無視することができる。XFEL-CXDI を想定した計算機実験において、タンパク質をモデル構造として、極小角領域の欠損やポアソンノイズを付加した回折データからの三次元電子密度回復に有効であることが実証されている[Kodama & Nakasako, 2011; Oroguchi and Nakasako, 2013]。本研究では、第二の方法を用いてシアノバクテリアの三次元構造を可視化することにした。

繰り返しになるが、以上の三次元再構成手法では各個体間の構造に多様性はないことが前提条件として使われる。クライオ電子顕微鏡[Dubochet *et al.*, 1988]における単粒子解析で適用されてきた試料の多くは、数 nm~数十 nm ほどの大きさのタンパク質であるが、今回はサブ μm サイズの細胞試料であるため、構造多様性は大きいと予想される。しかし、その構造多様性の大きさは今日に至るまでどれほどの構造多様性があるか数十 nm 分解能で評価されてはいない。XFEL-CXDI における三次元構造解析では千個単位での細胞の投影電子密度像を利用するので、細胞の構造多様性についても議論できる可能性がある。

8.2 シアノバクテリアの XFEL-CXDI 実験

8.2.1 シアノバクテリア *Prochlorococcus*

シアノバクテリアは個体数でいえば地球上で最も多く存在する光合成生物である。中でも単細胞性の *Synechococcus* 及び *Prochlorococcus* は、世界中どこにでも存在している。海洋性のもは個体数密度が水深 100 m においても $500\sim 2000 \times 10^6 \text{ cell/cm}^2$ の密度で分布していることが海洋資源調査で明らかとなっている[Partensky *et al.*, 1999]。27 億年前の地層からシアノバクテリアの積層物であるストロマタイトの化石が発見されており[Lepot *et al.*, 2008]、おおよそこの時期を境に大気中の酸素濃度が上昇し、好気性代謝を行う大きく複雑な器官をもった生物が登場したことから、地球史を刻む上でなくてはならない存在である。また、現在の植物細胞に見られる葉緑体の祖先生物であるとされることから[Reyes-Prieto *et al.*, 2007]、植物の進化学においても注目を集めている。構造学的研究も蛍光顕微鏡や電子顕微鏡において盛んに行われている[Vermaas *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 1979]。XFEL-CXDI 実験ではアメリカの XFEL

施設 LCLS において単細胞性シアノバクテリア *Synechococcus* から投影電子密度像が得られているが[Ting *et al.*, 2007; van der Schot *et al.*, 2014]、三次元構造の可視化は未だに達成されていない。本研究では、種が多数確認されているシアノバクテリアの中でも 1 μm 以下と最もサイズが小さく、光学顕微鏡など既存の可視化手法で内部分布を可視化することが難しい *Prochlorococcus* strain NIES-2087 (National Institute for Environmental Studies) を解析対象として選択した。なお、この種は第六章で標準試料として扱ったものと同じで、大きさが約 780 nm の球体であるということが動的光散乱法及び光学顕微鏡によって確認されており、本研究で実施された XFEL-CXDI 実験でも同程度の大きさの投影電子密度像が回復されることが確かめられている (6.2.4 節)。ほぼ球形の単細胞性なので薄膜に対して決まった配向に吸着せず、大量に回折パターンが得られれば、あらゆる配向情報を満足できると考えられる。

8.2.2 シアノバクテリアの細胞周期解析

シアノバクテリアに限らず、細胞には主に間期と呼ばれる期間と分裂期という期間が存在し、周期的にこれを繰り返すことで増殖する。大半の時間は間期であるとされるが、分裂期に至るまでに核酸量の変化と共に様々な構造を展開することが予想される。従って、培養液中に存在する多数の細胞間で構造に多様性が生じる可能性がある。まず、フローサイトメトリーによって間期・分裂期がそれぞれどれほどの割合で培養液中に存在するのか調べた。

フローサイトメトリーでは、細胞を細く絞ったシース流に導入し、そこに集光したレーザー光を照射することで、細胞 1 つの散乱あるいは蛍光強度を測定する [Conner, 1966]。細胞内の核酸を蛍光ラベルしておけば、細胞 1 つが持つ核酸量を定量的に評価することができる。シース流に連続的に細胞を流せば、培養液中の大量の細胞についての統計が得られる。本研究で取り上げるシアノバクテリアのフローサイトメトリーは、色素 SYTOX Green (Thermo Fisher, USA) を用い、Watanabe らの方法に従って実施した (詳細は付録参照) [Watanabe *et al.*, 2012]。

図 8-2(a) にフローサイトメトリー測定結果の一例を示す。横軸は核酸に結合した染色剤の蛍光強度であり、細胞内の核酸量と等価である。蛍光強度が 0 a.u. 付近と①35 a.u.、②70 a.u.、③95 a.u. をピークとする 4 つの集団が存在することがわかる。0 付近にある分布は、SYTOX Green が菌体測定時と同じ濃度で入った Phosphate buffered saline (PBS) 溶液だけで測定した場合にも確認されることから (図 8-2(b))、シアノバクテリア

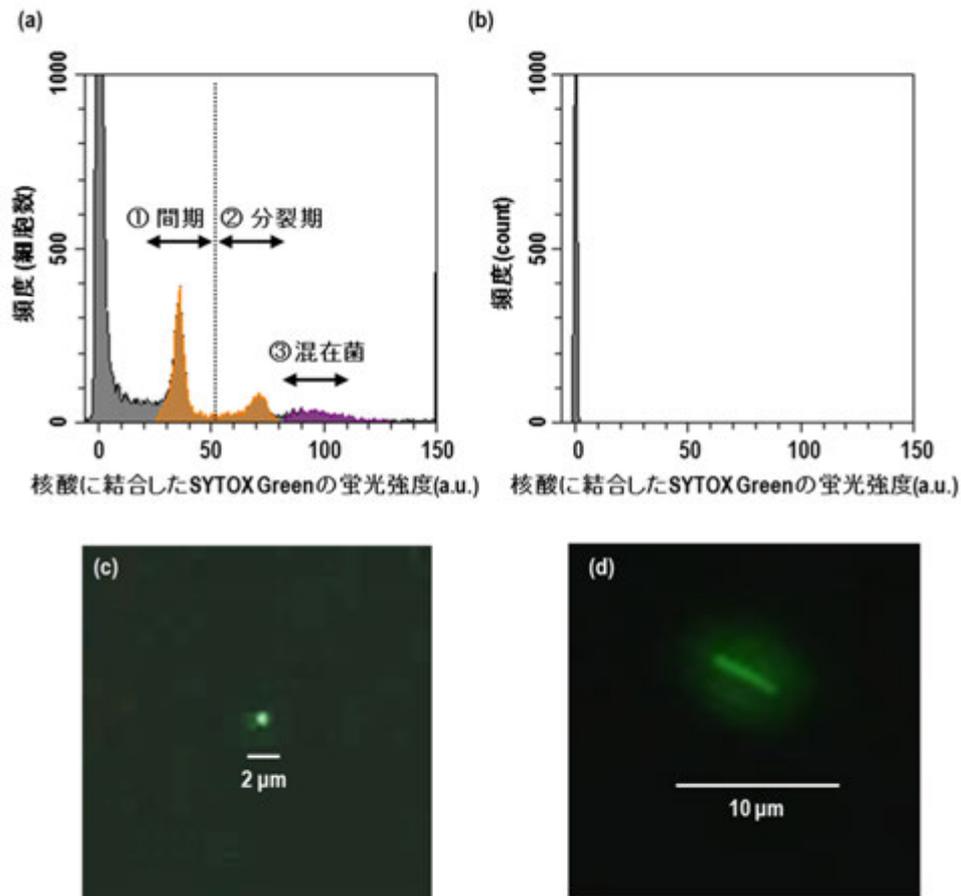


図 8-2 (a)シアノバクテリアが入った培養液のフローサイトメトリー。橙色で着色された分布がシアノバクテリア、紫色で着色された分布が混在菌を示す。(b)SYTOX Green の PBS 溶液のフローサイトメトリー。(c)シアノバクテリアの蛍光顕微鏡像。(d)混在菌の蛍光顕微鏡像。

の分布ではない。①と②の分布は蛍光強度の比から核酸量が 1:2 となる分布であり、これがシアノバクテリアの間期の細胞と、間期より 2 倍の核酸量を持った分裂期の細胞を示していると考えられる。

③の分布は核酸量が多いことからシアノバクテリアより大きな混在菌と考えられる。培養液を光学顕微鏡(IX71, Olympus, Japan)で SYTOX Green について蛍光観察したところ、シアノバクテリア (図 8-2(c)) と明らかに異なる桿菌が複数含まれていた (図 8-2(d))。この桿菌の大きさはシアノバクテリアの 6 倍以上あった。それぞれの菌体の割合はシアノバクテリアについては、①の間期の細胞が 54%、②の分裂期の細胞が 25% と評価できる。混在菌は、21%含まれていることが明らかとなった。

8.2.3 試料作製と回折パターン測定、回折データ解析

凍結水和試料作製については、第六章 6.2.3 節に記述した方法で行った。対象の菌体は、National Institute for Environmental Studies より購入し、届いた日あるいは翌日にフローサイトメトリーで間期：分裂期：混在菌の割合を評価し、その日の内に凍結水和試料を作製した。SACLA にて XFEL-CXDI 実験は第四章に記述した高砂六号を用いて行った。

計測された回折パターンは、G-SITENNO [Sekiguchi *et al.*, 2014a; Sekiguchi *et al.*, 2014b]によって用いて、暗電流データの減算、検出器データの統合及び Friedel 対称性の補間を行った。得られた回折パターンの中で、特に S/N 比が良く、シアノバクテリアの大きさ 780 nm に相当するスペックルサイズ約 $1.3 \mu\text{m}^{-1}$ のものを抽出した。この抽出の段階で培養液中に含まれる 6 μm 以上の混在菌からの回折パターンは除去されるはずである。投影電子密度像の回復については、エッジで 51.3 nm 分解能を示す角度領域までの回折パターンに対して、ASURA [Sekiguchi *et al.*, 2016]を適用した。表 8-1 に 2016 年 7 月と 2017 年 2 月の 2 回のビームタイムで行ったシアノバクテリアについて、フローサイトメトリーによる菌体の割合と回折パターン及び回復した投影電子密度像の統計を示す。おおよそ 100 nm~140 nm の有効分解能の投影像を各ビームタイムで 1000 枚弱ずつ取得することができた。総電子密度の変動は 2016 年 7 月実験で 21.6%、2017 年 2 月実験で 15.4%であった。

表 8-1 フローサイトメトリーによる菌体の割合とシアノバクテリアの回折パターン及び投影電子密度像の統計

ビームタイム	2016年7月	2017年2月
フローサイトメトリー		
間期：分裂期：混在菌 (%)	64 : 26 : 10	54 : 25 : 21
回折パターン		
総 XFEL ショット数 (shots)	239,895	144,198
S/N の良い回折パターンの数 ^a	180,237	108,149
スペックルサイズを指標に抽出した回折パターンの数	6,174	2,807
投影電子密度像		
回復できた投影像の数	916	817
ASURA で決定した最頻のクラス内の所属投影像数	175±48	181±52
R_F ^b	29.6±0.04	27.7±0.04
PRTF で評価した有効分解能 (nm)	109±32	117±33
総電子密度 (a.u.)	1678±259	1396±302

^a $25 \mu\text{m}^{-1}$ より高分解能領域に 4 photons 以上のピクセルを、3 つ以上を観測した検出器データを試料からの回折パターンとした [関口、2016]。

^b $R_F = \frac{\sum |F_{\text{obs}}| - K \sum |F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$ 。 $|F_{\text{calc}}|$ は回復像から計算される構造振幅である。 $|F_{\text{obs}}|$ は実験で得られた回折強度から計算される構造振幅である。 K はスケール係数である。

8.3 シアノバクテリアの三次元構造

8.3.1 単粒子解析ソフトウェア EMAN による三次元再構成

投影電子密度像の三次元再構成には単粒子解析ソフトウェア EMAN [Ludtke *et al.*, 1999]を用いた。具体的な手順については先行のシミュレーション研究[Kodama & Nakasako, 2011; Oroguchi and Nakasako, 2013]を踏襲した。単粒子試解析では、投影像から低分解能の初期構造を作成した後、構造精密化を行って高分解能を達成する。

まず、初期構造の作成では総電子密度で規格化した投影電子密度像に対して、*sinogram* によって凡その相対的配向を決定した[Frank, 2006]。*sinogram* は二次元投影像を一次元の線分へと投影したものである。総電子密度が同じなので、異なる配向の投影像でも共通する *sinogram* が必ずある。最低 3 枚の投影像で共通する *sinogram* が見つければ、相対的配向を決定することができる。ただし、投影像の微細構造によって *sinogram* の相関が下がり、共通の *sinogram* が見つからない事態を避けるため、投影像にローパスフィルターを施した。このような初期構造の作成プロトコルはソフトウェア EMAN に実装されており EMAN コマンドの *startAny* を用いて実行される。ローパスフィルターは *proc2d* コマンドを用いて、FWHM で $1.18 \mu\text{m}^{-1}$ のガウス関数を投影電子密度像に畳み込んだ。

構造精密化は、図 8-3 に示す *Projection matching* 法を用いて、以下の手順に従って実行される[Frank, 2006]。

1. 実験データから回復した投影電子密度像に FWHM で $1.18 \mu\text{m}^{-1}$ のガウス関数を畳み込むことでローパスフィルターを施す。
2. *sinogram* によって得られた初期構造から投影像を計算する。このときの投影方向を定める配向角は一定間隔に割り振る。
3. 実験データから回復した投影電子密度像 1 枚と計算によって得られた投影像の相関を計算する。最も高い相関を示す計算投影像の配向角を投影電子密度像の配向角として採用する。
4. 3 の操作を回復した投影電子密度像全てについて行い、配向角を決定する。
5. 決定した配向角で投影電子密度像を逆投影し、三次元構造を得る。
6. 得られた三次元構造について 2 の操作と同様に投影像を計算する。
7. 3~6 の操作を 8 回反復する。
8. ローパスフィルターとして畳み込むガウス関数 FWHM を $0.59 \mu\text{m}^{-1}$ 大きくして

(平滑化の度合いを小さくする)、投影電子密度像に適用する。

9. 3~8 の操作を 13 回反復する。

10. 最後にローパスフィルターを施していない投影電子密度像を用いて 3~6 の操作を 8 回反復し、微細構造まで再現した三次元構造を得る。

EMAN 環境では refine コマンドを用いた。ローパスフィルターは proc2d コマンドを用いた。

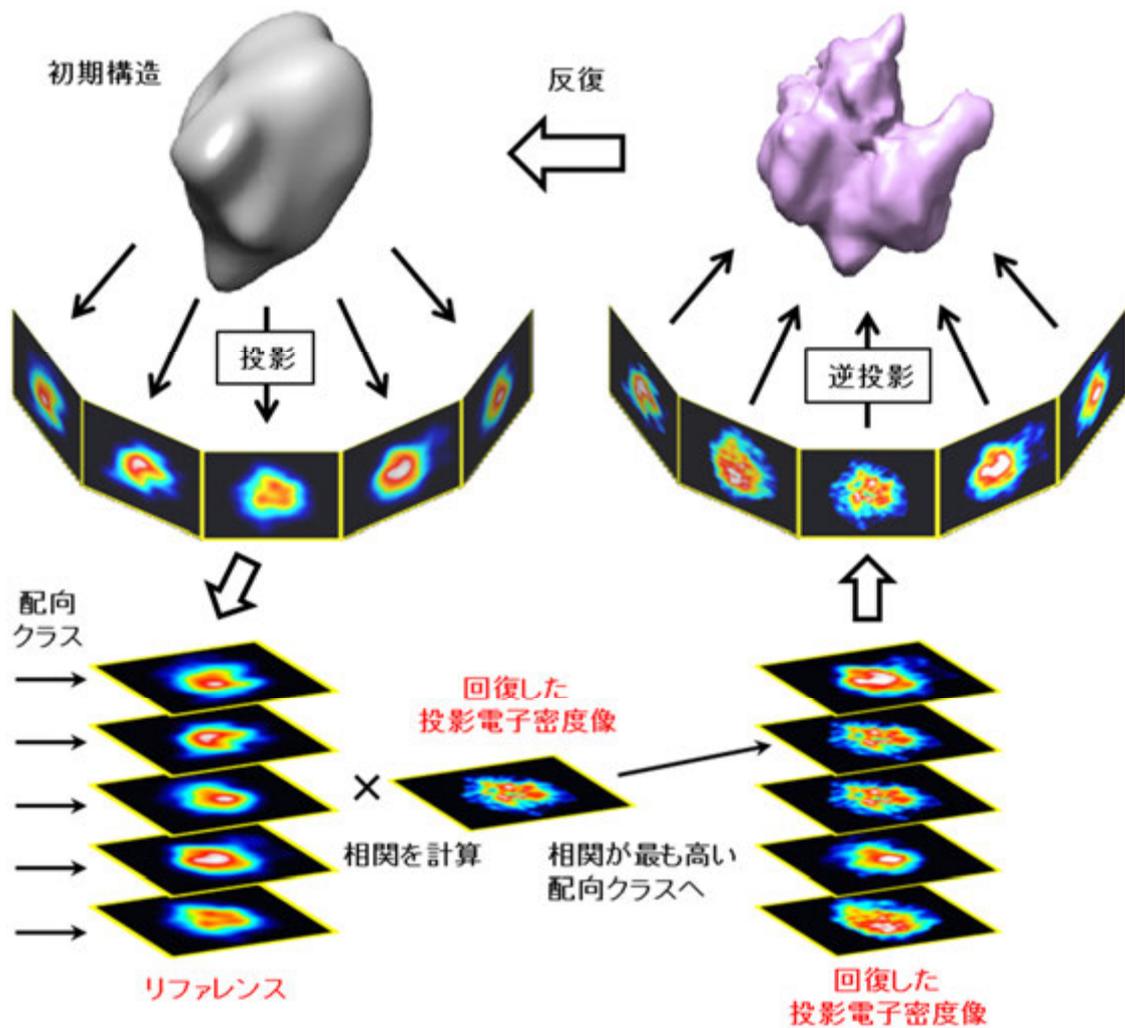


図 8-3 Projection matching 法の手順。文章中の 2~5 の操作を示している。

上記のようにして得られた三次元構造の有効分解能は、Fourier shell collation (FSC) を用いて評価した[van Heel & Schatz, 2005; Rosenthal & Henderson, 2003]。

$$\text{FSC}(S') = \frac{\sum_{\vec{S} \in S'} F_1(\vec{S}) \cdot F_2(\vec{S})}{\sqrt{\sum_{\vec{S} \in S'} |F_1(\vec{S})|^2 \cdot \sum_{\vec{S} \in S'} |F_2(\vec{S})|^2}} \quad (8.2)$$

投影電子密度像をランダムに 2 組に分割し、最終的に得られた三次元構造を初期構造として、それぞれの組の投影電子密度像で独立して構造精密化を行って得られる 2 つの構造の構造因子 $F_1(\vec{S})$ と $F_2(\vec{S})$ の相互相関が FCS となる。散乱ベクトルの大きさ S' ごとに得られる相関値が 0.5 以上であれば、2 つの構造が一致していると判断する [van Heel *et al.*, 1986]。本研究では、有効分解能を FSC が 0.5 を示す散乱ベクトルの大きさを評価した。FSC の計算は EMAN の `eotest` コマンドで実行した。

8.3.2 シアノバクテリアの三次元構造

2016 年 7 月実験では 916 枚の投影電子密度像から、2017 年 2 月実験では 817 枚の投影電子密度像から、それぞれ単粒子解析を用いて三次元構造を回復した (図 8-4(a), (b))。さらに、2016 年 7 月実験と 2017 年 2 月実験を合わせて 1,733 枚の投影電子密度像を再構成すると図 8-4(c)の三次元構造が得られた。投影像の配向分布は、おおよそどの配向にも割り振られており、極端な偏り方はしていなかった (図 8-4)。得られた三次元構造は、いずれのビームタイムのものもラグビーボール型の楕円形状をしていた。さらに外周に沿って包み込むように比較的高い電子密度領域の存在も共通していた (図 8-4 緑色表面)。この領域は約 760×530 nm であり、第六章で得た液中の動的光散乱法の結果と概ね合致する (第六章 6.2.4 節)。断面像を見ると、C 字様に高い電子密度領域が分布していた (図 8-4 下段)。これは投影電子密度像にもみられる傾向である (第六章 6.2.4 節 図 6-6)。また、C 字型の窪みとなっているところが空洞になっていた。C 字型の中心部には約 260×180 nm にわたって電子密度が特に高い領域があった。FSC から見積もった有効分解能は、2016 年 7 月及び 2017 年 2 月実験の三次元構造では 194 nm、2 ビームタイムを合わせて再構成した三次元構造では 161 nm であった (図 8-5)。

8.3.3 議論

ビームタイムで異なる 2 つのデータセットから独立して回復された 2 つの三次元構造

の特徴が似通っているという点では、得られた構造の信頼度は高いと考えられる (図 8-4 (a), (b))。2つのビームタイムの投影像を合わせて再構成しても同様の特徴をもった三次元構造が得られたことから (図 8-4 (c))、シアノバクテリアの凍結試料調整および回折実験を同じ条件で再現良く実施できたと考えても良いだろう。

次に、有効分解能と投影像の数の関係について述べる。ビームタイム一回分の 817 枚あるいは 916 枚の投影像から再構成された三次元構造より、2つを合わせて 1,733 枚とした方が有効分解能は向上した (図 8-5)。これは図 8-4 の配向分布からわかるように、枚数が増加することで配向情報も増えたことに依るものと考えられる。さらに多くの投影像が取得できて、投影電子密度像の有効分解能も向上すれば、三次元構造の有効分解能が改善するかもしれない。大きさ A の粒子について分解能 a で三次元構造を回復することを目的とした場合、必要な投影電子密度像の枚数 N は、直径 A の半球の表面を埋め尽くす $a \times a$ の微片の数で与えられる [Kodama & Nakasako, 2011]。

$$N = \frac{4\pi(A/2)^2 / 2}{a \times a} \quad (8.3)$$

仮に、シアノバクテリアについて、回折パターンのエッジの分解能である 51.3 nm の分解能を目指すのであれば、配向に重複のない 344 通りの配向情報が必要になる。

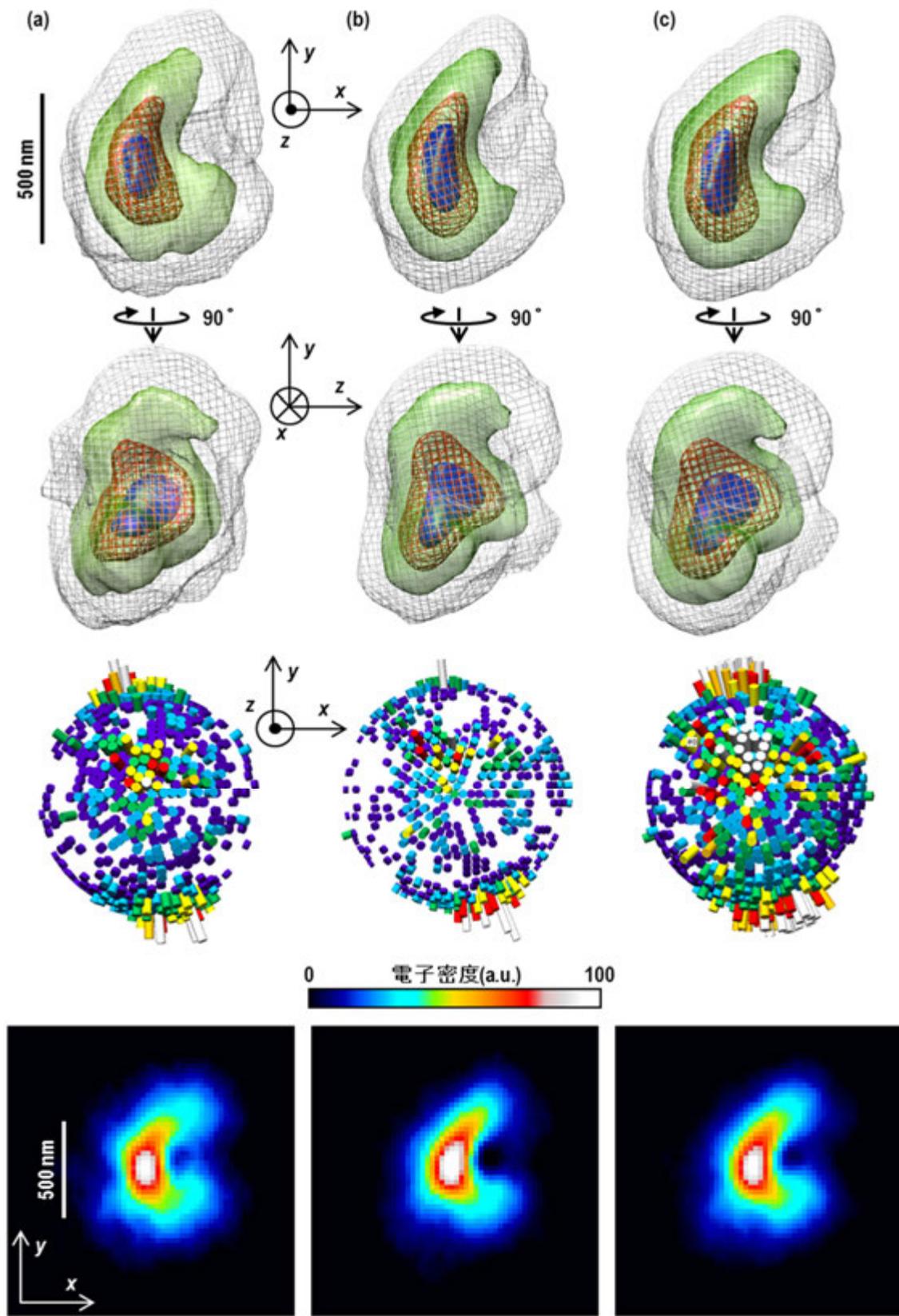


図 8-4 (図説は次ページ)

(図 8-4 の図説) 2016 年 7 月実験(a)、2017 年 2 月実験(b)、2016 年 7 月実験と 2017 年 2 月実験の実験データを合わせて回復されたシアノバクテリアの三次元構造(c)。上段より三次元構造、各々の配向に割り振られた投影像の枚数、断面像である。三次元構造の表示にはソフトウェア Chimera [Pettersen *et al.*, 2004]を用いた。三次元構造の白色メッシュ、緑色の表面、赤色メッシュ、青色の表面はそれぞれ最大電子密度の 25%、40%、60%、80%を区切っている。投影像の枚数は円柱の高さが高ければ多く、紫色が 1 枚、水色が 2 枚、緑色が 3 枚、黄色が 4 枚、橙色が 5 枚、赤色が 6 枚、白色が 7 枚以上割り振られたことを示す。

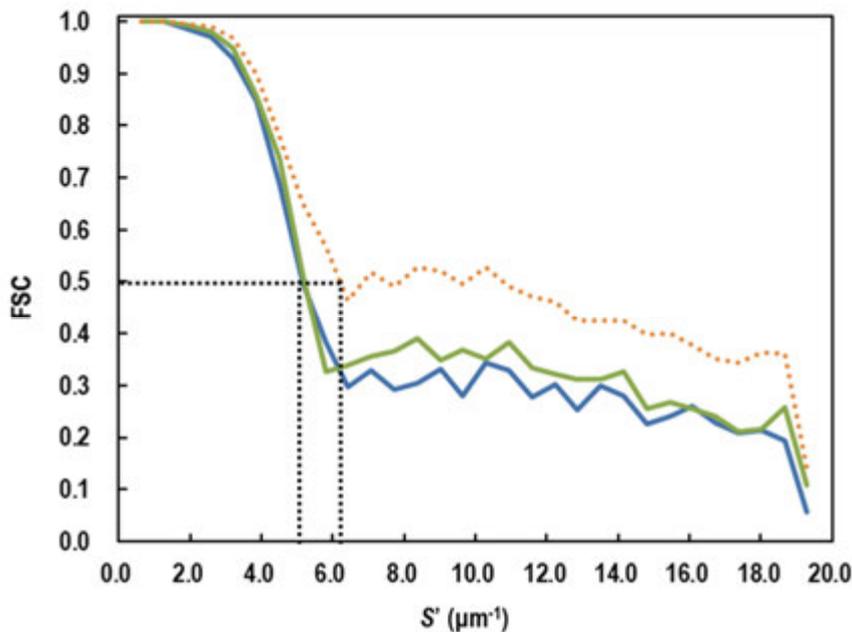


図 8-5 回復した三次元構造の FSC。青線が 2016 年 7 月、緑線が 2017 年 2 月、橙線が 2 ビームタイムの投影像を合わせて再構成した三次元構造の FSC である。

もし、投影像の数を増加させても今回以上に分解能が良くならない場合は、投影像の中での構造多様性が関係していると考えられる。混在菌は、回折パターンの抽出の際に除去されたと考えると、再構成に用いた投影像において、間期・分裂期の細胞周期による構造の多様性が考えられる。一般的に大部分の時間を間期の状態で過ごすため、間期の細胞の割合が高く、今回得られた三次元構造も間期の細胞の構造に近いと推測される。フローサイトメトリーの結果 (表 8-1) を考慮すれば得られた構造に、2016 年 7 月実

験では 29%、2017 年 2 月実験では 31%で分裂期の構造の影響が含まれていることになる。ただし、構造多様性が細胞周期のみに起因するとは限らないため、特定の周期の細胞の投影像だけで三次元再構成し、有効分解能が向上するか確かめる必要がある。そのためには、セルソーターで周期ごとに分取したり、ほぼすべての細胞で周期が揃うように同調培養を行って培養液中での特定の細胞だけが存在するように調整し、凍結水和試料を作製しなければならないだろう。あるいは、投影像間の相互情報を用いて時系列に沿って投影像を分類するマニフォールドラーニング[Schwander *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2014; Yoshidome *et al.*, 2015]を適用することができるかもしれない。

今回得られた三次元構造は、シアノバクテリアのおよそ 1,000 の個体の平均構造といえる。FSC の式(8.2)は、投影像の構造がどのスケールまで共通しているのかを評価していると解釈することができる。仮に、今回より投影像の枚数を増加させても FSC の示す結果が変わらなければ、シアノバクテリアの構造は 161 nm より小さな領域で個体差が生じていると判断することができるだろう。このような構造多様性の解析は、~50 nm の空間分解能情報を持った回折パターンを短時間に大量に測定できる XFEL-CXDI をおいて他にはない。

回復された三次元構造の概形は球体というよりはラグビーボールのような楕円形状をしていた。薄片化したシアノバクテリア *Prochlorococcus* の電子顕微鏡像[Ting *et al.*, 2007; Partensky *et al.*, 1999; Johnson & Sieburth., 1979]では、楕円形状の断面が見られるため、シアノバクテリアの概形としては正しいのかもしれない。しかしながら、第六章 6.3.4 節に記載したように氷との電子密度コントラストを考慮すれば、本研究で回復した構造は、概形より内部の物質分布が強調されることから、細胞形を正確に再現しているとは考えにくい。現に C 字型の窪みに空洞が存在するような光学顕微鏡像や電子顕微鏡像が得られていない。C 字型の窪みには氷とほとんど電子密度差のない物質で埋まっていると考えるのが妥当だろう。

C 字型の構造物は、原始紅藻類 *Cyanidioschyzon merolae* の葉緑体にも見られることが我々の行った XFEL-CXDI 実験および蛍光顕微鏡観察で確認されている[Takayama *et al.*, 2015]。 *Cyanidioschyzon merolae* は約 4 μm の大きさの単藻でゲノム解析から最も原始的な真核生物に分類されるため[Nozaki *et al.*, 2007]、葉緑体もより原始的な構造であると推測される。本研究は、原始の真核生物がシアノバクテリアと共生することで葉緑体を獲得したという細胞内共生説を構造学的な観点から初めて示唆したといえるのかもしれない。

電子顕微鏡像に見られるチラコイド膜の分布が C 字型であることから[Ting *et al.*, 2007]、回復した三次元構造にみられる C 字型構造はチラコイド膜に由来する分布であると推測できる。チラコイド膜には、細胞内物質の中で比較的電子密度比の高い多くのタンパク質が存在しており[van Wijk, 2004]、これが C 字型となって投影像及び三次元構造に現れたものと考えられる。これらのタンパク質の中には、光化学反応を司るものが複合体となって存在することから、光合成の効率はチラコイド膜の形状に大きく影響される。例えば、陸上に生息する高等植物は上方から降り注ぐ太陽光が良く当たるように膜が上向きに平行に重なった層状の構造(グラナ)をしていることが透過型電子顕微鏡などで確認されている[Yoshioka-Nishimura *et al.*, 2014]。一方で、シアノバクテリアや *Cyanidioschyzon merolae* は液中で太陽光に対してどの向きをとって効率良く光合成を行うため、チラコイド膜を C 字型形状にしていると考えられる。

球形のシアノバクテリアはそれ自体がレンズとなるため、光が外周の一箇所に集中する傾向があることが近年確認された[Schuergers *et al.*, 2016] (図 8-6)。高等植物では過剰に強い光を浴びると光合成に関係するタンパク質が移動すると共に積み重なったチラコイド膜の間隔が大きくなることが知られている[Yamamoto *et al.*, 2014]。シアノバクテリアの場合でも一点に集中した光が強すぎると膜構造が疎になるように変化が生じ、集光点での電子密度が低下し、これが C 字の窪みとして現れているのかもしれない。あるいは、強光ストレスから逃れるために集光点からチラコイド膜を離して配置している可能性もあるが、明確な走光性が確認されていない *Prochlorococcus* にこの論理を当てはめるのは強引かもしれない。

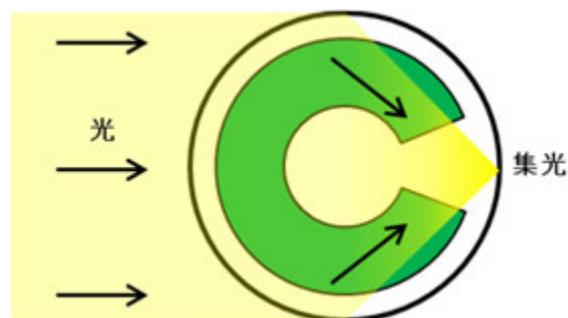


図 8-6 紙面左から光を照明したシアノバクテリア (断面)。球形の細胞がレンズとなって一点に光を集める。緑色の C 字型はチラコイド膜あるいは光合成に関係するタンパク質の分布

回復した三次元構造では C 字型の分布の中心に特に電子密度の高い領域があった(図 8-4 青色表面)。タンパク質($0.42 \text{ e}/\text{\AA}^3$)より電子密度の高い核酸($0.55 \text{ e}/\text{\AA}^3$)であると評価できるかもしれないが、原核生物であるシアノバクテリアには真核生物のように核膜によって核酸を収めていないため、核酸が高い密度で一箇所に集まっているとは限らない。核酸が少なくとも一辺 51.3 nm のボクセルを埋め尽くす程度に密に集まっていないとタンパク質との電子密度比を参考にして物質分布を議論することは難しい。というのも、タンパク質が核酸より密に集まっていれば、タンパク質の分布の方が高く表示されるからである。細胞内組織の詳細な分布について議論するためには、特定の組織だけを蛍光色素によって識別する蛍光顕微鏡と合わせて相補的に解析するのが良いだろう。

第九章 結語

本研究では、サブマイクロメートルサイズ細胞の内部構造を丸ごと可視化することを目標とし、XFEL-CXDI の計測・解析手法の開発に着手した。計測技術の開発では、回折パターンの取得効率の向上のため、高砂六号による回折実験の高度化(第四章)及び凍結水和試料作製プロトコルの確立(第五章)に取り組んだ。また、解析手法として暗視野位相回復法の開発(第七章)を行った。シアノバクテリアから 1 回のビームタイムに数百枚の投影像が得られるようになったため、三次元構造の解析に取り組んだ(第八章)。

高砂六号では、高速ラスタースキャン、高い試料交換効率、そして制御ソフトウェアによる作業効率化により、一回のビームタイムで約 250 万~300 万 shots の XFEL パルスの利用効率を実現した。しかしながら、すべての XFEL パルスに試料粒子がヒットするわけではなく、このうちの数%の割合でしか質の高い回折パターンが得られないことがわかった。この割合は試料調整法に依存するものと考えた。そこで、試料ディスクに対する散布数密度やバッファの液量を再現良く制御し、良質な回折パターンを測定するために最適な条件を探索できるシステムを構築した。このシステムを用いて作製された凍結水和細胞試料は大きさなど培養液中と比べてほとんど変化のない無損傷であることを XFEL-CXDI 実験で確かめた。また、細胞試料の周辺の氷によって電子密度コントラストが外周の形状より内部の物質分布の方に高く付くという知見が得られた。

位相回復効率の向上のために、第七章ではドーナツ型マスクを用いた Fs-DFPR を提案し、極小角領域におけるデータ欠損に耐性のある新しい位相回復アルゴリズムを開発した。また、Fs-DFPR の適用限界を評価することで、人の判断を介することなく自動でドーナツ型マスクを配置するアルゴリズムを考案した。各々のパラメータを調整し、主成分分析を取り入れた位相回復ソフトウェア ASURA[Sekiguchi *et al.*, 2016]に実装することで、高砂六号で得られる大量の回折パターンに適用することが可能となるであろう。

シアノバクテリア *Prochlorococcus* から回復された三次元構造(第八章)は、C字型の特徴を持っており、チラコイド膜の分布を示しているのではないかと推測された。また、多数の投影像から再構成される構造から、個体間の構造多様性を評価することができる可能性を示した。シアノバクテリアは様々な研究分野で種々の解析が行われているため、投影像の枚数及び分解能を向上させることができれば、さらに踏み込んだ生物学

的な議論ができるものと期待している。

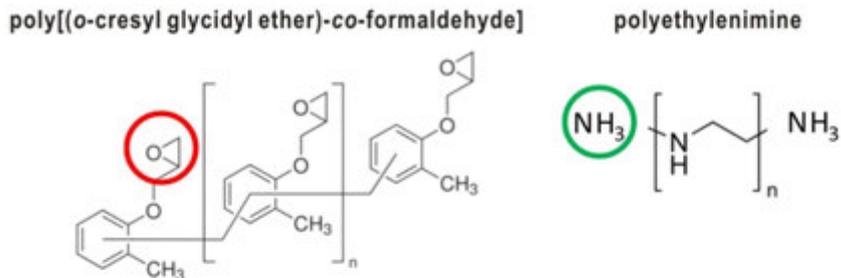
XFEL-CXDI は、光学顕微鏡法、透過型電子顕微鏡や X 線結晶構造解析では解析困難な空間階層構造の橋渡しとなり、これらのイメージング手法との相補的利用を通じて、新たな細胞イメージングの展開への寄与が期待される。本研究で開発した計測・解析手法が端緒となって、細胞試料のみならず、多岐分野にわたって物質の空間階層構造が明らかになることを期待して結びの言葉とする。

付録

A. エポキシ樹脂薄膜の作製方法

エポキシ樹脂薄膜の材料は、poly[(*o*-cresyl glycidyl ether)-*co*-formaldehyde](分子量 $M_n=780$, Sigma-Aldrich, USA) と polyethylenimine(分子量 $M_n=25,000$, Sigma-Aldrich, USA)の2種類の高分子をクロロホルム溶液中で質量比 1:1 で混合したものである[Watanabe & Kunitake, 2007]。前者がエポキシ基を持ち、これが後者のアミノ基と架橋することで高い強度を示す(図 A-1(a))。膜成形にはスピコーター(Opticoat MS-A100, MIKASA, Japan)を用いたスピコーティングによるウェットプロセスを採用した(図 A-1(b))。スピコーティングは、表面が平坦な基盤上に膜材料溶液を滴下し、回転させ、遠心力によって薄く引き伸ばす製法である。スピコーティングの遠心力とその回転時間によって膜厚が変わる。エポキシ膜の成膜の際には約 500 mL のクロロホルム溶液をシリコンウェハに滴下し、7,500 rpm(rotation per minute)で 60 s コートした。膜成形後、加熱温度を熱電対によるフィードバック制御で管理できるオーブン(BO-R65JB, MITSUBISHI, Japan)を用い、120 °Cで 5 分加熱し、2種類の高分子をより強固に架橋させた。その後、フレームに張膜するが、シリコンウェハに膜が張り付いているため、割らずにこれを剥離することは不可能である。そこで、5%となるようエタノールに溶解させた Poly(4-hydroxystyrene)(分子量 $M_n = 8000$, SIGMA ALDRICH, USA)を 3,000 rpm, 60 s でエポキシ膜より前にシリコンウェハにスピコーティング成膜した。Poly(4-hydroxystyrene)は、エタノールに可溶であるため、成膜後にシリコンウェハごとエタノールに浸けるとエポキシ膜だけを簡単に剥離することができた。液中に浮遊するエポキシ膜を炭素薄膜と同様にネオプレン吸着剤(Sigma-Aldrich, USA)処理したモリブデン製フレームに張り付けた。

(a)



(b)

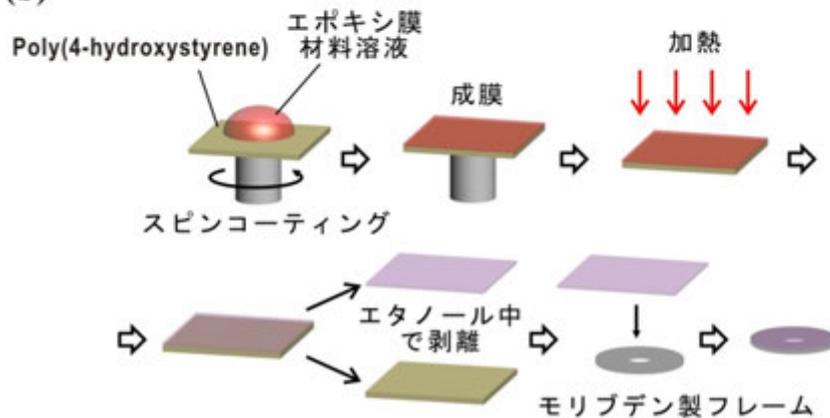


図 A-1 (a)エポキシ膜の材料の構造式。赤丸と緑丸で囲んでいる官能基はそれぞれエポキシ基とアミノ基である。(b)エポキシ膜の成膜の手順。

B. シアノバクテリアのフローサイトメトリー

フローサイトメトリーでは、細胞を細く絞ったシース流に導入し、そこに集光したレーザー光を照射することで、細胞 1 つの散乱あるいは蛍光強度を測定する [Conner, 1966]。細胞内の核酸を蛍光ラベルしておけば、細胞 1 つが持つ核酸量を定量的に評価することができる。シース流に連続的に細胞を流せば、培養液中の大量の細胞についての統計が得られる。本研究で取り上げるシアノバクテリアのフローサイトメトリーは Watanabe らの方法に従って以下の順序で実施した [Watanabe *et al.*, 2012]。

1. 菌体が入った培養液に体積比 0.1% となるように Tween20 (Sigma-Aldrich, USA) を加え、ボルテックスで懸濁する。

2. 1 の培養液に体積比 1%となるようグルタルアルデヒド(Sigma-Aldrich, USA)を加え懸濁する。
3. 4°Cで 30 分静置する。
4. 25,000 g で遠心し、菌体を落として、上清を除き、同量の PBS (リン酸緩衝生理食塩水 : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄)に置換した後、懸濁する。
5. 同様の遠心を再度行い、PBS で置換する。
6. 再度遠心を行い、上清を除いた後、液体窒素で凍結融解し、細胞壁を壊す。
7. 核酸に特異的に結合する染色剤 SYTOX Green (Invutrogen, Carlsbad, CA, USA) の 10 μM PBS 溶液を加え、懸濁後、4°Cの暗所で 12 時間程度静置する。
8. 7 に 50 倍量の PBS を加えた溶液についてフローサイトメーター CytoFLEX(Beckman Coulter, USA)を用いて、波長 488 nm のレーザーを励起光として照射し、核酸と結合した SYTOX Green からの蛍光(波長 525 nm)を測定した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた学内外の多くの方々、私を生活面より支えてくださった家族の方々に感謝致します。

SACLA での実験は、SACLA 利用研究課題(課題番号 2012A8022, 2012B8037, 2013A8043, 2013B8049, 2014A8033, 2014B8052 and 2015A8051, 2015B8049, 2016A8048, 2016B8064, 2017A8015)として実施されました。SACLA での XFEL-CXDI 実験及び試料調整は、理化学研究所の山本雅貴利用システム開発研究部門長、矢橋牧名ビームライン研究開発グループディレクター、米倉功治准主任研究員、初井宇記データ処理系開発チームリーダー、引間孝明博士、眞木(米倉)さおり博士、平田邦生博士、犬伏雄一博士、小野峻博士、桐原陽一博士、高山裕貴博士(2012 年度中迫研究室博士修了)、藤原嘉朗氏・金徹坤氏らエンジニアリングチームの方々、高輝度光科学研究センターの登野健介利用技術開発・整備チームリーダー、城地保昌高度データ解析チームリーダー、亀島敬博士、大阪大学の高橋幸生准教授、鈴木明大博士(2015 年度博士修了)、東京理科大学の松永幸大教授、乾弥生博士、加藤翔一氏(2013 年度修士修了)、和田一輝氏(2014 年度修士修了)、平川健氏(博士 2 年)、早稲田大学の胡桃坂仁志教授、市川雄一氏(2013 年度博士修了)、鳥取大学の河田康志教授、亀田啓博士(2016 年度博士修了)、福井直也氏(博士 2 年)、平川和哉氏(2013 年度修士修了)、岐阜大学の桑田一夫教授、山口圭一博士、理学相原精機の星貴彦氏、鳥塚康史氏、慶應義塾大学の中迫雅由教授、荳口友隆専任講師、岡島公司特任助教、関口優希博士(2016 年度中迫研究室博士修了)、中島真氏(2012 年度学士卒)、橋本早紀氏(2015 年度中迫研究室修士修了)、福田朝陽氏(2016 年度中迫研究室修士修了)、大出真央氏(博士 1 年)、田中公介氏(2014 年度学士卒)、山本隆寛氏(修士 1 年)、溝口陽太氏(学部 4 年)、山口祐輝氏(学部 4 年)らと共同で実施されました。特に、山本雅貴部長には、高砂六号の動作試験や制御ソフトウェアの整備方法の他、多岐にわたって実験のノウハウをご教示頂きました。また、私を理化学研究所研修生として頂くなど大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。

慶應義塾大学物理学科の能崎幸雄教授、同学科の渡邊紳一准教授、物理情報工学科の的場正憲教授にはご多忙の中、本博士論文の副査を勤めていただきました。多くの有意義なご意見を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

2012 年度中迫研究室を卒業された高山裕貴博士には在学時より、CXDI 実験におけ

る凍結試料作製から暗視野位相回復法の実装に至るまで、幅広くご助言して頂きました。また、播磨にて高砂六号の制御プログラムのコーディング時には夜遅くまで辛抱強く議論相手になって頂きました。また、CXDI 実験の準備のため、播磨へ出張した際には機器類の扱い方や調整方法について多くを学ばせて頂きました。心より感謝申し上げます。

暗視野位相回復法の開発では、坂本啓太氏(2009年修士修了)、児玉渉氏(2010年修士修了)、荳口友隆専任講師、関口優希博士が開発された HIO-SW による像回復ソフトウェアをご提供頂きました。特に、関口優希博士には、Fortran によるコーディングの他、大量に出力される画像ファイルの閲覧・整理方法などをご教示頂きました。

シアノバクテリアの扱い方については岡島公司特任助教より多大なるご助言を頂きました。さらに、東京理科大学の松永幸大教授、平川健氏には回復した三次元構造から得られる生物学的な知見についてご教授してくださいました。

毎週土曜日に行われるセミナーでは、中迫研究室の皆様に変にお世話になりました。凍結水和試料作製方法、高砂六号の制御パネルの設計、像回復法、シアノバクテリアの三次元構造回復は、皆様と議論することで飛躍的に改善していきました。

最後になりましたが、指導教員の中迫雅由教授には、本研究を進めるにあたり、様々なご助言と、辛抱強く熱心なご指導を賜りました。

皆様にここに深く感謝致します。

平成 30 年 3 月

慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻

中迫研究室

小林 周

参考文献

- Al-Amoudi, A., Studer, D., and Dubochet, J. (2005) "Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy", *J. Struct. Biol.* 150, 109-121.
- Als-Nielsen, J. & McMorrow, D. (2011): "Elements of Modern X-ray Physics Second Edition", Wiley., Hoboken.
- Attwood, D. (1999): "SOFT X-RAYS AND EXTREME ULTRAVIOLET RADIATION: Principles and Applications", Cambridge University Press., Cambridge.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sourgrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006) "Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution", *Science* 313, 1642-1645.
- Blow, D. M., and Crick, F. H. (1959) "The Treatment of Errors in the Isomorphous Replacement Method", *Acta Cryst.* 12, 794-802.
- Born, M. and Wolf, E. (1999) *Principles of Optics 7th (expanded) edition*, Cambridge University Press., Cambridge.
- Chapman, H. N., Barty, A., Marchesini, S., Noy, A., Hau-Riege, S. P., Cui, C., Howells, M. R., Rosen, R., He, H., Spence, J. C. H., Weierstall, U., Beetz, T., Jacobsen, C., and Shapiro, D. (2006a) "High-resolution *ab initio* three-dimensional x-ray diffraction microscopy", *J. Opt. Soc. Am. A* 23, 1179-1200.
- Chapman, H. N., Barty, A., Bogan, M., J., Boutet, S., Frank, M., Hau-riege, S. P., Marchesini, S., Woods, B. W., Bajt, S., Benner, W. H., London, R. A., Plönjes, E., Kuhlmann, M., Treusch, R., Düsterer, S., Tschentscher, T., Schneider, J. R., Spiller, E., Möller, T., Bostedt, C., Hoener, M., Shapiro, D. A., Hodgson, K. O., Van Der Spoel, D., Burmeister, F., Bergh, M., Caleman, C., Huidt, G., Seibert, M. M., Maia, F. R. N. C., Lee, R. W., Szöke, A., Timneanu, N., and Hajdu, J. (2006b) "Femtosecond diffractive imaging with a soft-X-ray free-electron laser", *Nat. Phys.* 2, 839-843.
- Conner, W. D. (1966) "An Inertial-Type Particle Separator for Collecting Large Samples", *Journal of the Air Pollution Control Association*, 16, 35-38.

- Crewe, A. V., Wall, J., and Langmore, J. (1970) "Visibility of Single Atoms", *Science*, 168, 1338-1340.
- Crick, F. H. C. & Magdoff, S. (1956) The Theory of the Method of Isomorphous Replacement for Protein Crystals. I. *Acta Cryst* 9, 901.
- Crowther, R. A., DeRosier, D. J., and Klug, A. (1970) "The Reconstruction of a Three-Dimensional Structure from Projections and its Application to Electron Microscopy", *Proc. R. Soc. Lond.* 317, 1530.
- Drenth, J. (2007) *Principles of Protein X-Ray Crystallography Third Edition*, Springer, New York.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.-J., Homo, J.-C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P. (1988) "Cryo-electron microscopy of verified specimens", *Q. Rev. Biophys.* 21, 129-228.
- Ekeberg, T., Svenda, M., Seibert, M. M., Abergel, C., Maia, F. R. N. C., Seltzer, V., DePonte, D. P., Aquila, A., Andreasson, J., Iwan, B., Jönsson, O., Westphal, D., Odić, D., Andersso, I., Barty, A., Liang, M., Martin, A. V., Gumprecht, L., Fleckenstein, H., Bajt, S., Barthelmess, M., Coppola, N., Claverie, J.-M., Loh, N. D., Bostedt, C., Bozek, J. D., Krzywinski, J., Messerschmidt, M., Bogan, M. J., Hampton, C. Y., Sierra, R. G., Frank, M., Shoeman, R. L., Lomb, L., Foucar, L., Epp, S. W., Rolles, D., Rudenko, A., Hartmann, R., Hartmann, A., Kimmel, N., Holl, P., Weidenspointner, G., Rudek, B., Erk, B., Kassemeyer, S., Schlichting, I., Strüder, L., Ullrich, J., Schmidt, C., Krasniqi, F., Hauser, G., Reich, C., Soltau, H., Schorb, S., Hirsemann, H., Wunderer, C., Graafsma, H., Chapman, H., and Hajdu, J. (2016) "Single-shot diffraction data from the Mimivirus particle using an X-ray free-electron laser", *Sci. Data* 3, 160060 (7 pages).
- Emma, P., Akre, R., Arthur, J., Bionta, R., Bostedt, C., Bozek, J., Brachmann, A., Bucksbaum, P., Coffee, R., Decker, F.-J., Ding, Y., Dowell, D., Edstrom, S., Fisher, A., Frisch, J., Gilevich, S., Hastings, J., Hays, G., Hering, Ph., Huang, Z., Iverson, R., Loos, H., Messerschmidt, M., Miahnahri, A., Moeller, S., Nuhn, H.-D., Pile, G., Ratner, D., Rzepiela, J., Schultz, D., Smith, T., Stefan, P., Tompkins, H., Turner, J., Welch, J., White, W., Wu, J., Yocky, G., and Galayda, J. (2010) "First lasing and operation of an ångstrom-wavelength free-electron laser", *Nat. Photon.* 4,

641-647.

- Fan, J., Sun, Z., Zhang, J., Huang, Q., Yao, S., Zong, Y., Kohmura, Y., Ishikawa, T., Liu, H., and Jiang, H. (2015) "Quantitative Imaging of Single Unstained Magnetotactic Bacteria by Coherent X-ray Diffraction Microscopy", *Anal. Chem.* **87**, 5849-5853.
- Fienup, J. R., (1978) "Reconstruction of an object from the modulus of its Fourier transform", *Opt. Lett.* **3**, 27-29.
- Fienup, J. R. (1982) "Phase retrieval algorithms: a comparison", *Appl. Opt.* **21**, 2758-2769.
- Frank, J. (2006) "Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies", Oxford University Press, New York.
- Gallagher-Jones, M., Bessho, Y., Kim, S., Park, J., Kim, S., Nam, D., Kim, C., Kim, Y., Noh, D. Y., Miyashita, O., Tama, F., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Tono, K., Kohmura, Y., Yabashi, M., Hasnain, S. S., Ishikawa, T., and Song, C. (2014) "Macromolecular structures probed by combining single-shot free-electron laser diffraction with synchrotron coherent X-ray imaging", *Nat. Commun.* **5**, 3798 (9 pages).
- Garib, N. M., Skubák, S., Andrey, A. L., Navraj, S. P., Steiner, A. S., Nicholls, N. A., Martyn, D. W., Fei, L., and Alexei, A. V. (2011) "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structure", *Biological Crystallography* **37**, 355-367.
- Garman, E. F., and Schneider, T. R. (1997) "Macromolecular Crystallography", *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237.
- Garman, E. F., and Owen, R. L. (2006) "Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography", *Acta Cryst.* **D62**, 32-47.
- Gerchberg, R. W., and Saxton, W. O. (1972) "A Practical Algorithm for the Determination of Phase from Image and Diffraction Plane Pictures", *Optik* **35**, 237-246.
- Giacovazzo, C. (1998) "Direct Phasing in Crystallography-Fundamentals and Applications" Oxford University Press, New York.
- Gibbs, J. W. (1899) "Fourier's Series", *Nature* **59**, 606-606.
- Gibson, L. F., and Houry, J. T. (1986) "Storage and survival of bacteria by ultra-freeze", *Lett. Appl. Microbiol.* **3**, 127-129.

- Gordon, J. P., Zeiger, H. J., and Townes, C. H. (1955) “The Maser—New Type of Microwave Amplifier, Frequency Standard, and Spectrometer”, *Phys. Rev.* **99**, 1264-1274.
- Grassucci, R. A., Taylor, D. J., and Frank, J. (2007) “Preparation of macromolecular complexes for cryo-electron microscopy”, *Nat. Protoc.* **2**, 3239-3246.
- Halboch, K. (1983) “Permanent magnet undulators”, *Le Journal de Physique Colloques* **44**, pp.C1-211-C1-216.
- Hantke, M. F., Hasse, D., Maia, F. R. N. C., Ekeberg, T., John, K., Svenda, M., Loh, N. D., Martin, A. V., Timneanu, N., Larsson, D. S. D., van der Schot, G., Carlsson, G. H., Ingelman, M., Andreasson, J., Westphal, D., Liang, M., Stellato, F., DePonte, D. P., Hartmann, R., Kimmel, N., Kirian, R. A., Seibert, M. M., Mühlig, Schorb, S., Ferguson, K., Bostedt, C., Carron, S., Bozek, J. D., Rolles, D., Rudenko, A., Epp, Sascha, Chapman, H. N., Barty, A., Hajdu, J., and Andersson I. (2014) “High-throughput imaging of heterogeneous cell organelles with an X-ray laser”, *Nat. Photon.* **8**, 943-949.
- Hatsui, T., Omodani, M., Kudo, T., Kobayashi, K., Imamura, T., Ohmoto, T., Iwata, A., Ono, S., Kirihara, Y., Kameshima, T., Kasai, H., Miura, N., Kuriyama, N., Okihara, M., Nagatomo, Y., Nagasaki, M., Watanabe, T., and Yabashi, M. (2013) “A direct-detection X-ray CMOS image sensor with 500 μm thick high resistivity silicon”, in Proceedings of International Image Sensor Workshop, Article Number 3.05.
- Hell, S. W. and Kroug, M. (1995) “Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit”, *Appl. Phys. B* **60**, 495-497.
- Hendrickson, W. A., Smith, J. L. & Sheriff, S. (1985) “Direct phase determination based on anomalous scattering” *Methods Enzymol.* **115**: 41–55.
- Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yano, N., Takemura, S., Kato, K., Hatanaka, M., Muramoto, K., Kawahara, T., Tsukihara, T., Yamashita, E., Tono, K., Ueno, G., Hikima, T., Murakami, H., Inubushi, Y., Yabashi, M., Ishikawa, T., Yamamoto, M., Ogura, T., Sugimoto, H., Shen, J.-R., Yoshikawa, S., and Ago, H. (2014) “Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL”, *Nat. Methods* **11**, 734-736.

- Howells, M. R., Beetz, T., Chapman, H. N., Cui, C., Holton, J. M., Jacobsen, C. J., Kirz, J., Lima, E., Marchesini, S., Miao, H., Sayre, D., Shapiro, D. A., Spence, J. C. H., and Starodub, D. (2009) "An assessment of the resolution limitation due to radiation-damage in X-ray diffraction microscopy", *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 170, 4-12.
- Huang, X., Nelson, J., Kirz, J., Lima, E., Marchesini, S., Miao, H., Neiman, A. M., Shapiro, D., Steinbrener, J., Stewart, A., Turner, J. J., and Jacobsen, C. (2009) "Soft X-Ray Diffraction Microscopy of a Frozen Hydrated Yeast Cell", *Phys. Rev. Lett.* 103, 198101 (4 pages).
- Hubbell, J. H. and Seltzer, S. M. "Tables of X-Ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients from 1 keV to 20 MeV for Elements Z = 1 to 92 and 48 Additional Substances of Dosimetric Interest*", <https://www.nist.gov/pml/x-ray-mass-attenuation-coefficients> (accessed: 2017-12-07)
- Ibel, K., and Stuhmann, H. B. (1975) "Comparison of neutron and X-ray scattering of dilute myoglobin solutions". *J. Mol. Biol.* 93, 255-265.
- Ibers, J. A., & Hamilton, W. C. (1964) "Dispersion corrections and crystal structure refinements", *Acta Cryst.* 14, 781-782.
- Inubushi, Y., Tono, K., Togashi, T., Sato, T., Hatsui, T., Kameshima, T., Togawa, K., Hara, T., Tanaka, T., Tanaka, H., Ishikawa, T., and Yabashi, M. (2012) "Determination of the Pulse Duration of an X-Ray Free Electron Laser Using Highly Resolved Single-Shot Spectra", *Phys. Rev. Lett.* 109, 144801 (4 pages).
- Ishikawa, T., Aoyagi, H., Asaka, T., Asano, Y., Azumi, N., Bizen, T., Ego, H., Fukami, K., Fukui, T., Furukawa, Y., Goto, S., Hanaki, H., Hara, T., Hasegawa, T., Hatsui, T., Higashiya, A., Hirono, T., Hosoda, N., Ishii, M., Inagaki, T., Inubushi, Y., Itoga, T., Joti, Y., Kago, M., Kameshima, T., Kimura, H., Kirihara, Y., Kiyomichi, A., Kobayashi, T., Kondo, C., Kubo, T., Maesaka, H., Marechal, X. M., Masuda, T., Matsubara, S., Matsumoto, T., Matsushita, T., Matsui, S., Nagasono, S., Nariyama, N., Ohashi, H., Ohata, T., Ohshima, T., Ono, S., Otake, Y., Saji, C., Sakurai, T., Sato, T., Sawada, K., Seike, T., Shirasawa, K., Sugimoto, T., Suzuki, S., Takahashi, S., Takebe, H., Takeshita, K., Tamasaku, K., Tanaka, H., Tanaka,

- R., Tanaka, T., Togashi, T., Togawa, K., Tokuhisa, A., Tomizawa, H., Tono, K., Wu, S., Yabashi, M., Yamaga, M., Yamashita, A., Yanagida, K., Zhang, C., Shintake, T., Kitamura, H. and Kumagai, N. (2012) "A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-ångström region", *Nat. Photon.* **6**, 540-544.
- Jesson, D. E., and Pennycook, S. J. (1995) "Incoherent imaging of crystals using thermally scattered electrons", *Proc. Roy. Soc. A* **449**, 273-293.
- Johnson, P. W., and Sieburth, J. M., (1979) "Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass", *Limnol, Oceanogr.* **24**, 935-940.
- Jiang, H., Song, C., Chen, C.-C., Xu, R., Raines, K. S., Fahimian, B. P., Lu, C.-H., Lee, T.-K., Nakashima, A., Urano, J., Ishikawa, T., Tamanoi, F., and Miao, J. (2010) "Quantitative 3D imaging of whole, unstained cells by using X-ray diffraction microscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 11234-11239.
- Joti, Y., Kameshima, T., Yamaga, M., Sugimoto, T., Okada, K., Abe, T., Furukawa, Y., Ohata, T., Tanaka, R., Hatsui, T., and Yabashi, M. (2015) "Data acquisition system for X-ray free-electron laser experiments at SACLA", *J. Synchrotron Rad.* **22**, 571-576.
- Kameda, H., Usugi, S., Kobayashi, M., Fukui, N., Lee, S., Hongo, K., Mizobata, T., Sekiguchi, Y., Masaki, Y., Kobayashi, A., Oroguchi, T., Nakasako, M., Takayama, Y., Yamamoto, M. and Kawata, Y. (2016) "Common structural features of toxic intermediates from α -synuclein and GroES fibrillogenesis detected using cryogenic coherent X-ray diffraction imaging", *J. Biochem.*, doi: 10.1093/jb/mvw052.
- Kameshima, T., Ono, S., Kudo, T., Ozaki, K., Kirihara, Y., Kobayashi, K., Inubushi, Y., Yabashi, M., Horigome, T., Holland, A., Holland, K., Burt, D., Murao, H. and Hatsui, T. (2014) "Development of an X-ray pixel detector with multi-port charge-coupled device for X-ray free-electron laser experiments", *Rev. Sci. Instrum.* **85**, 033110 (15 pages).
- Kassemeyer, S. (2014) "Ultrafast coherent diffractive imaging of nanoparticles using X-ray free-electron laser radiation" (Doctoral dissertation, Freie Universität Berlin).
- Kimura, T., Joti, Y., Shibuya, A., Song, C., Kim, S., Tono, K., Yabashi, M., Tamakoshi,

- M., Moriya, T., Oshima, T., Ishikawa, T., Bessho, Y., and Nishino, Y. (2014) "Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction", *Nat. Commun.* 5, 3052 (7 pages).
- Kobayashi, A., Sekiguchi, Y., Takayama, Y., Oroguchi, T., and Nakasako, M. (2014) "Dark-field phase retrieval under the constraint of the Friedel symmetry in coherent X-ray diffraction imaging", *Opt. Express* 22, 27892-27909.
- Kobayashi, A., Sekiguchi, Y., Takayama, Y., Oroguchi, T., Shirahama, K., Torizuka, Y., Manoda, M., Nakasako, M., and Yamamoto, M. (2016a) "TAKASAGO-6 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological non-crystalline particles using X-ray free electron laser at SACLA", *Rev. Sci. Instrum.* 87, 053109 (15 pages).
- Kobayashi, A., Sekiguchi, Y., Oroguchi, T., Okajima, K., Fukuda, A., Oide, M., Yamamoto, M. and Nakasako, M. (2016b) "Specimen preparation for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological cells and cellular organelles by using the X-ray free-electron laser at SACLA", *J. Synchrotron Rad.* 23, 975-989.
- Kodama, W. and Nakasako, M. (2011) "Application of a real-space three-dimensional image reconstruction method in the structural analysis of noncrystalline biological macromolecules enveloped by water in coherent x-ray diffraction microscopy", *Phys. Rev. E* 84, 021902 (15 pages).
- Kuo, C.-H., Chen, C.-H., and Huang, M. H. (2007), "Seed-Mediated Synthesis of Monodispersed Cu₂O Nanocubes with Five Different Size Ranges from 40 to 420 nm", *Adv. Funct. Mater.* 17, 3773-3780.
- Lax, M. (1951) "Multiple Scattering of Waves", *Rev. Mod. Phys.* 23, 287-310.
- Lepot, K., Benzerara, K., Brown Jr, G. E., and Philippot, P. (2008) "Microbially influenced formation of 2,724-million-year-old stromatolites", *nature geoscience* 1, 118-121.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013) "Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy", *Nature* 504, 107-112.
- Lima, E., Wiegart, L., Pernot, P., Howells, M., Timmins, J., Zontone, F., and Madsen, A. (2009) "Cryogenic X-Ray Diffraction Microscopy for Biological Samples", *Phys. Rev. Lett.* 103, 198102 (4 pages).

- Loh, N.-T. D., and Elser, V. (2009) “Reconstruction algorithm for single-particle diffraction imaging experiments”, *Phys. Rev. E* 80, 026705 (20 pages).
- Loh, N. D., Bogan, M. J., Elser, V., Barty, A., Boutet, S., Bajt, S., Hajdu, J., Ekeberg, T., Maia, F. R. N. C., Schulz, J., Seibert, M. M., Iwan, B., Timneanu, N., Marchesini, S., Schlichting, I., Shoeman, R. L., Lomb, L., Frank, M., Liang, M., and Chapman, H. N. (2010) “Cryptomography: Reconstructing 3D Fourier Intensities from Randomly Oriented Single-Shot Diffraction Patterns”, *Phys. Rev. Lett.* 104, 225501 (5 pages).
- Loh, N. D., Hampton, C. Y., Martin, A. V., Starodub, D., Sierra, R. G., Barty, A., Aquila, A., Schulz, J., Lomb, L., Steinbrener, J., Shoeman, R. L., Kassemeyer, S., Bostedt, C., Bozek, J., Epp, S. W., Erk, B., Harmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Rudek, B., Foucar, L., Kimmel, N., Weidenspointer, G., Hauser, G., Holl, P., Pedersoli, E., Liang, M., Hunter, M. M., Gumprecht, L., Coppola, N., Wunderer, C., Graafsma, H., Maia, F. R. N. C., Ekeberg, T., Hantke, M., Fleckenstein, H., Hirsemann, H., Nass, K., White, T., A., Tobias, H. J., Farquar, G. R., Benner, W. H., Hau-Riege, S. P., Reich, C., Hartmann, A., Soltau, H., Marchesini, S., Bajt, S., Barthelmess, M., Bucksbaum, P., Hodgson, K. O., Strüder, L., Ullrich, J., Frank, M., Schlichting, I., Chapman, H. N., Bogan, M. J. (2012) “Fractal morphology, imaging and mass spectrometry of single aerosol particles in flight”, *Nature* 486, 513-517.
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R., and Chiu, W. (1999) “EMAN: Semiautomated Software for High-Resolution Single-Particle Reconstructions”, *J. Struct. Biol.* 128, 82-97.
- Luke, D. R. (2005) “Relaxed averaged alternating reflections for diffraction imaging”, *Inv. Probl.* 21, 37-50.
- MacQueen, J. (1967) “Some methods for classification and analysis of multivariate observations”, In *Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability* (L. M. Le Cam and J. Neyman eds.), pp.281-297, University of California Press, Berkeley.
- Maiman, T. H. (1960) “Stimulated optical radiation in ruby”, *Nature* 187, 493.
- Marchesini, S., Chapman, H. N., Hau-Riege, S. P., London, R. A., Szoke, A., He, H., Howells, M. R., Padmore, H., Rosen, R., Spence, J. C. H., and Weierstall, U.

- (2003a) “Coherent X-ray diffractive imaging: applications and limitations”, *Opt. Express* 11, 2344-2353.
- Marchesini, S., He, H., Chapman, H. N., Hau-Riege, S. P., Noy, A., Howells, M. R., Weierstall, U., and Spence, J. C. H. (2003b) “X-ray image reconstruction from a diffraction pattern alone”, *Phys. Rev. B* 68, 140101(R) (4 pages).
- Margaritondo, G. and Rebernik Ribic, P. (2011) “A simplified description of X-ray free-electron lasers” *J. Synchrotron Rad.* 18, 101-108.
- Martin, A. V., Wang, F., Loh, N. D., Ekeberg, T., Maia, F. R. N. C., Hantke, M., van der Schot, G., Hampton, C. Y., Sierra, R. G., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Bostedt, C., Bozek, J. D., Coppola, N., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Frank, M., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hartmann, A., Hartmann, R., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Kassemeyer, S., Kimmel, N., Liang, M., Lomb, L., Marchesini, S., Nass, K., Pedersoli, E., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schulz, J., Shoeman, R. L., Soltau, H., Starodub, D., Steinbrener, J., Stellato, F., Strüder, L., Ullrich, J., Weidenspointner, G., White, T. A., Wunderer, C. B., Barty, A., Schlichting, I., Bogan, M. J., and Chapman, H. N. (2012a), “Noise-robust coherent diffractive imaging with a single diffraction pattern”, *Opt. Express* 20, 16650-16661.
- Martin, A. V., Loh, N. D., Hampton, C. Y., Sierra, R. G., Wang, F., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Bostedt, C., Bozek, J. D., Coppola, N., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Frank, M., Graafsma, H., Gumprecht, J., Hartmann, A., Hartmann, R., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Kassemeyer, S., Kimmel, N., Liang, M., Lomb, L., Maia, F. R. N. C., Marchesini, S., Nass, K., Pedersoli, E., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schulz, J., Shoeman, R. L., Soltau, H., Starodub, D., Steinbrener, J., Stellato, F., Strüder, L., Ullrich, J., Weidenspointner, G., White, T. A., Wunderer, C. B., Barty, A., Schlichting, I., Bogan, M. J., and Chapman, H. N. (2012b) “Femtosecond dark-field imaging with an X-ray free electron laser”, *Opt. Express* 20, 13501-13512.
- Miao, J., Sayre, D., and Chapman, H. N. (1998) “Phase retrieval from the magnitude of the Fourier transforms of nonperiodic objects”, *J. Opt. Soc. Am. A* 15, 1662-1669.

- Miao, J., Charalambous, P., Kirz, J., and Sayre, D. (1999) "Extending the methodology of X-ray crystallography to allow imaging of micrometre-sized non-crystalline specimens", *Nature* **400**, 342-344.
- Miao, J., Ishikawa, T., Johnson, B., Anderson, E. H., Lai, B. and Hodgson, K. O. (2002) "High Resolution 3D X-Ray Diffraction Microscopy", *Phys. Rev. Lett.* **89**, 088303 (4 pages).
- Miao, J., Hodgson, K. O., Ishikawa, T., Larabell, C. A., LeGros, M. A., and Nishino, Y. (2003a) "Imaging whole *Escherichia coli* bacteria by using single-particle x-ray diffraction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 110-112.
- Miao, J., Ishikawa, T., Anderson, E. H., and Hodgson, K. O. (2003b) "Phase retrieval of diffraction patterns from noncrystalline samples using the oversampling method", *Phys. Rev. B* **67**, 174104 (6 pages).
- Miao, J., Förster, F., and Levi, O. (2005) "Equally sloped tomography with oversampling reconstruction", *Phys. Rev. B* **72**, 052103 (4 pages).
- Miao, J., Chen, C.-C., Song, C., Nishino, Y., Kohmura, Y., Ishikawa, T., Ramunno-Johnson, D., Lee, T.-K., and Risbud, S. H. (2006) "Three-Dimensional GaN-Ga₂O₃ Core Shell Structure Revealed by X-Ray Diffraction Microscopy", *Phys. Rev. Lett.* **97**, 215503 (4 pages).
- Miao, J., Tetsuya, I., Shen, Q. & Earnset, T. (2008) Extending x-ray crystallography to allow the imaging of noncrystalline materials, cells, and single protein complexes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **59**, 387-410.
- Moerner, W. E. and Kador, L. (1989) "Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid", *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535-2538.
- Nakasako, M. (1999) "Large-scale networks of hydration water molecules around bovine β -trypsin revealed by cryogenic X-ray crystal structure analysis¹", *J. Mol. Biol.* **289**, 547-564.
- Nakasako, M. (2004) "Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 1191-1206.
- Nakasako, M., Takayama, Y., Oroguchi, T., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Shirahama, K., Yamamoto, M., Hikima, T., Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., Kohmura, Y., Inubushi, Y., Takahashi, Y., Suzuki, A., Matsunaga, S., Inui, Y., Tono, K.,

- Kameshima, T., Joti, Y. and Hoshi, T. (2013) “KOTOBUKI-1 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging”, *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 093705 (11 pages).
- Nam, D., Park, J., Gallagher-Jones, M., Kim, S., Kim, S., Kohmura, Y., Naitow, H., Kunishima, N., Yoshida, T., Ishikawa, T., and Song, C. (2013) “Imaging Fully Hydrated Whole Cells by Coherent X-Ray Diffraction Microscopy”, *Phys. Rev. Lett.* **110**, 098103 (5 pages).
- Nam, D., Kim, C., Kim, Y., Ebisu, T., Gallagher-Jones, M., Park, J., Kim, S., Kim, S., Tono, K., Noh, D. Y., Yabashi, M., Ishikawa, T., and Song, C. (2016) “Fixed target single-shot imaging of nanostructures using thin solid membranes at SACLA”, *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **49**, 034008 (5 pages).
- Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., and Hajdu, J. (2000) “Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses”, *Nature* **406**, 752-757.
- Nishino, Y., Takahashi, Y., Imamoto, N., Ishikawa, T., and Maeshima, K. (2009), “Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-Ray Diffraction”, *Phys. Rev. Lett.* **102**, 018101 (4 pages).
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Moruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, U., Tamura, K., Chung, S. J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., and Kuroiwa, T. (2007) “A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*”, *EMC Biol.* **5**, 28(8 pages).
- Oliver, W. (2004) “Electrohydrodynamic spraying - Transport, mass and heat transfer of charged droplets and their application to the deposition of thin functional films”, (phD thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Seitzerland, doi: 10.3929/ethz-a-004718257).
- Oroguchi, T., and Nakasako, M. (2013) “Three-dimensional structure determination protocol for noncrystalline biomolecules using x-ray free-electron laser diffraction imaging”, *Phys. Rev. E* **87**, 022712 (15 pages).
- Oroguchi, T., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Masaki, Y., Fukuda, A., Hashimoto, S., Nakasako, M., Ichikawa, Y., Kurumizaka, H., Shimizu, M., Inui, Y., Matsunaga,

- S., Kato, T., Namba, K., Yamaguchi, K., Kuwata, K., Kameda, H., Fukui, N., Kawata, Y., Kameshima, T., Takayama, Y., Yonekura, K., and Yamamoto, M. (2015) "Cryogenic coherent x-ray diffraction imaging for biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA", *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **48**, 184003 (11 pages).
- Partensky, F., Hess, W. R., and Vaultot, D. (1999) "Prochlorococcus, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 106-127.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) "UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612.
- Phillips, J. C., Wlodawer, A., Goodfellow, J. M., Watenpaugh, K. D., Sieker, L. C., Jensen, L. H. & Hodgson, K. O. (1977) "Applications of synchrotron radiation to protein crystallography. II. Anomalous scattering, absolute intensity and polarization" *Acta Cryst.* **A33**: 445-455.
- Pluta, M. (1988): "Advanced Light Microscopy, Vol. 1: Principles and Basic Properties: Principles and Basic Properties v. 1", Elsevier., Rotterdam.
- Pluta, M. (1989): "Advanced Light Microscopy: Specialized Methods vol. 2", Elsevier., Rotterdam.
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M., and Bhattacharya, D. (2007) "The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants", *Annual Rev. Gene.* **41**, 147-168.
- Robinson, I. K., Vartanyants, I. A., Williams, G. J., Pfeifer, M. A., and Pitney, J. A. (2001) "Reconstruction of the Shapes of Gold Nanocrystals Using Coherent X-Ray Diffraction", *Phys. Rev. Lett.* **87**, 195505.
- Rockland, L. B. (1960) "Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40°C.", *Anal. Chem.* **32**, 1375-1376.
- Rodriguez, J. A., Xu, R., Chen C.-C., Zou, Y., and Miao, J. (2013) "Oversampling smoothness: an effective algorithm for phase retrieval of noisy diffraction intensities", *J. Appl. Cryst.* **46**, 312-318.
- Rodriguez, J. A., Xu, R., Chen C.-C., Huang, Z., Jiang, H., Chen, A. L., Raines, K. S., Pryor, A. Jr., Nam, D., Wiegart, L., Bradley, P. J., and Miao, J. (2015)

- “Three-dimensional coherent X-ray diffractive imaging of whole frozen-hydrated cells”, *IUCrJ* **2**, 575-583.
- Rosenfeld, A., and Kak, A. (1982) “Digital Picture Processing, Volume 1 2nd Edition”, Elsevier., Rotterdam.
- Rosenthal, P. B., and Henderson, R. (2003) “Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryomicroscopy”, *J. Mol. Biol.* **333**, 721-745.
- Sayre, D. (1952) “Some implications of a theorem due to Shannon”, *Acta Cryst.* **5**, 843.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010) “A guide to super-resolution fluorescence microscopy”, *J. Cell Biol.* **190**, 165-175.
- Schwander, P., Fung, R., and Ourmazd, A. (2014) “Conformations of macromolecules and their complexes from heterogeneous datasets”, *Phil. Trans. R. Soc. B* **369**, 20130567 (8 pages).
- Schuerger N., Lenn, T., Kampmann, R., Meissner, M. V., Esteves, T., Temerinac-Ott, M., Korvink, J. G., Lowe, A. R., Mullineaux, C. W., and Wilde, A. (2016) “Cyanobacteria use micro-optics to sense light direction”, *eLife* (doi: 10.7554/eLife.12620).
- Seibert, M. M., Ekeberg, T., Maia, F. R. N. C., Svenda, M., Andreasson, J., Jonsson, O., Odić, D., Iwan, B., Rocker, A., Westphal, D., Hantke, M., DePonte, D. P., Barty, A., Schulz, J., Gumprecht, L., Coppola, N., Aquila, A., liang, M., White, T. A., Martin, A., Caleman, C., Stern, S., Abergel, C., Seltzer, V., Claverie, J. M., Bostedt, C., Bozek, J. D., Boutet, S., Miahnahri, A. A., Messerschmidt, M., Krzywinski, J., Williams, G., Hodgson, K. O., Barthelmess, M., Spence, J. C. H., Fromme, P, Weierstall, U., Kirian, R., Hunter, M., Doak, R. B., Marchesini, S., Hau-Riege, S. P., Frank, M., Shoeman, R. L., Lomb, L., Epp, S. W., Hartmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Schmidt, C., Foucar, L., Kimmel, N., Holl, P., Rudek, B., Erk, B., Homke, A., Reich, C., Pietschner, D., Weidenspointer, G., Struder, L., Hauser, G., Groke, H., Ullrich, J., Schlichting, I., Herrman, S., Schaller, G., Schopper, F., Soltau, H., Kuhnel, K. U., Andritschke, R., Schroter, C. D., Krasniqi, F., Bott, M., Schorb, S., Rupp, D., Adolph, M., Gorkhover, T., Hirsemann, H.,

- Potdevin, G., Graafsma, H., Nilsson, B., Chapman, H. N. and Hajdu, J. (2011) "Single mimivirus particles intercepted and imaged with an X-ray laser", *Nature* 470, 78-81.
- Sekiguchi, Y., Oroguchi, T., Takayama, T., and Nakasako, M. (2014a) "Data processing software suite *SITENNO* for coherent X-ray diffraction imaging using the X-ray free-electron laser SACLA", *J. Synchrotron Rad.* 21, 600-612.
- Sekiguchi, Y., Yamamoto, M., Oroguchi, T., Takayama, Y., Suzuki, S., and Nakasako, M. (2014b) "*IDATEN* and *G-SITENNO*: GUI-assisted software for coherent X-ray diffraction imaging experiments and data analyses at SACLA", *J. Synchrotron Rad.* 21, 1378-1383.
- Sekiguchi, Y., Oroguchi, T., and Nakasako, M. (2016) "Classification and assessment of retrieved electron density maps in coherent X-ray diffraction imaging using multivariate analysis", *J. Synchrotron Rad.* 23, 312-323.
- Sekiguchi, Y., Hashimoto, S., Kobayashi, A., Oroguchi, T., and Nakasako, M. ((2017) "A protocol for searching the most probable phase-retrieved maps in coherent X-ray diffraction imaging by exploiting the relationship between convergence of the retrieved phase and success of calculation", *J. Synchrotron Rad.* 24, 1024-1038.
- Shapiro, D., Thibault, P., Beetz, T., Elser, V., Howells, M., Jacobsen, C., Kirz, J., Lima, E., Miao, H., Neiman, A. M., and Sayre, D. (2005) "Biological imaging by soft x-ray diffraction microscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15343-15346.
- Shen, Q., Bazarov, I., and Thibault, P. (2004) "Diffractive imaging of nonperiodic materials with future coherent X-ray sources", *J. Synchrotron Rad.* 11, 432-438.
- Shimizu, M., Roth, S. Y., Szent-Gyorgyi, C., and Simpson, R. T., (1991) "Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the $\alpha 2$ operator in *Saccharomyces cerevisiae*", *The EMBO Journal* 10, 3033-3041.
- Song, C., Jiang, H., Mancuso, A., Amirbekian, B., Peng, L., Sun, R., Shah, S. S., Zhou, Z. H., Ishikawa, T., and Miao, J. (2008) "Quantitative Imaging of Single, Unstained Viruses with Coherent X-Rays", *Phys. Rev. Lett.* 101, 158101 (4 pages).
- Song, C., Takagi, M., Park, J., Xu, R., Gallagher-Jones, M., Imamoto, N., Ishikawa,

- T. (2014) “Analytic 3D Imaging of Mammalian Nucleus at Nanoscale Using Coherent X-Rays and Optical Fluorescence Microscopy”, *Biophys. J.* **107**, 1074-1081.
- Stuhrmann, H. B., and Miller, A. (1978) “Small-angle scattering of biological structures”, *J. Appl. Cryst.* **11**, 325-345.
- Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., and Shen, J.-R. (2015) “Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses”, *Nature* **517**, 99-103.
- Svergun, D. I., Koch, M. H., Timmins, P. A., and May, R. P. (2013) *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, Oxford University Press, New York.
- Szent-Gyorgyi, C., and Isenberg, I. (1983) “The organization of oligonucleosomes in yeast”, *Nucleic Acids. Res.* **11**, 3717-3736.
- Takahashi, Y., Suzuki, A., Zettsu, N., Oroguchi, T., Takayama, Y., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Yamamoto, M., and Nakasako, M. (2013) “Coherent Diffraction Imaging Analysis of Shape-Controlled Nanoparticles with Focused Hard X-ray Free-Electron Laser Pulses”, *Nano Lett.* **13**, 6028-6032.
- Takayama, Y. and Nakasako, M. (2012) “Humidity-controlled preparation of frozen-hydrated biological samples for cryogenic coherent x-ray diffraction microscopy”, *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 054301 (6 pages).
- Takayama, Y., Inui, Y., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Oroguchi, T., Yamamoto, M., Matsunaga, S., and Nakasako, M. (2015) “Coherent X-Ray Diffraction Imaging of Chloroplasts from *Cyanidioschyzon merolae* by Using X-Ray Free Electron Laser”, *Plant Cell Phys.* **56**, 1272-1286.
- Tian, G., Xiang, S., Noiva, R., Lennarz, W. J., and Schindelin, H. (2006) “The Crystal Structure of Yeast Protein Disulfide Isomerase Suggests Cooperativity between Its Active Sites”, *Cell* **124**, 61-73.
- Ting, C. S., Hsieh, C., Sundararaman, S., Mannella, C., and Marko, M. (2007) “Cryo-Electron Tomography Reveals the Comparative Three-Dimensional Architecture of *Prochlorococcus*, a Globally Important Marine Cyanobacterium”,

- J. Bacteriol.* 189, 4485-4493.
- Tono, K., Togashi, T., Inubushi, Y., Sato, T., Katayama, T., Ogawa, K., Ohashi, H., Kimura, H., Takahashi, S., Takeshita, K., Tomizawa, H., Goto, S., Ishikawa, T. and Yabashi, M. (2013) "Beamline, experimental stations and photon beam diagnostics for the hard x-ray free electron laser of SACLA", *New J. Phys.* 15, 083035 (22 pages).
- van der Schot, G., Svenda, M., Maia, F. R. N. C., Hantke, M., DePonte, D. P., Seibert, M. M., Aquila, A., Schulz, J., Kirian, R., Liang, M., Stellato, F., Iwan, B., Andreasson, J., Timneanu, N., Westphal, D., Almeida, F. N., Odic, D., Hasse, D., Carlsson, G. H., Larsson, D. S. D., Barty, A., Martin, A. V., Schorb, S., Bostedt, C., Bozek, J. D., Rolles, D., Rudenko, A., Epp, S., Foucar, L., Rudek, B., Hartmann, R., Kimmel, N., Holl, P., Englert, L., Loh, N.-T. D., Chapman, H. N., Andersson, I., Hajdu, J., and Ekeberg, T. (2015) "Imaging single cells in a beam of live cyanobacteria with an X-ray laser", *Nat. Commun.* 6, 5704 (9 pages).
- van Heel, M., Frank, J. (1981) "Use of multivariate statistics in analyzing the images of biological macromolecules", *Ultramicrosc.* 6, 187-194.
- van Heel, M. and Schatz, M. (2005) "Fourier shell correlation threshold criteria", *J. Struct. Biol.* 151, 250-262.
- van Wijk, K. J. (2004) "Plastid proteomics", *Plant Physiol. Biochem.* 42, 963-977.
- Vermaas, W. F., Timlin, J. A., Jones, H. D., Sinclair, M. B., Nieman, L. T., Hamad, S. W., Melgaard, D. K., and Haaland, D. M. (2007) "In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells", *PNAS* 105, 4050-4055.
- Wäldchen, S., Lehmann, J., Klein, T., van de Linde, S., and Sauer, M. (2015) "Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy", *Sci. Rep.* 5, 15348 (12 pages).
- Watanabe, H., & Kunitake, T. (2007): A Large Freestanding, 20 nm Thick Nanomembrane Based on an Epoxy Resin, *Adv. Mater.* 19, 909-912.
- Watanabe, S., Ohbayashi, R., Shiwa, Y., Noda, A., Kanasaki, Y., Chibazakura, T., and Yoshikawa, H. (2012) "Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes", *Mol. Microbiol.* 83, 856-865.

- William, H. P., Saul, A. T., William, T. V., Brian, P. F. (1996): “Numerical Recipes in Fortran 90, Second Edition”, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge.
- Yabashi, M., Tanaka, H., and Ishikawa, T. (2015) “Overview of the SACLA facility”, *J. Synchrotron Rad.* **22**, 477-484.
- Yamamoto, Y., Kai, S., Ohnishi, A., Ishikawa, T., Hori, H., Morita, N., and Ishikawa Y. (2014) “Quality Control of PSII: Behavior of PSII in the Highly Crowded Grana Thylakoids Under Excessive Light”, *Plant Cell Physiol.* **55**, 1206-1215.
- Yamaga, M., Amselem, A., Furukawa, Y., Hirono, T., Joti, Y., Kameshima, T., Kiyomichi, A., Ohata, T., Sugimoto, T., Tanaka, R. (2012) “Control and Data Acquisition System for X-Ray Free-Electron Laser Experiments at SACLA”, *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference Record*, N23-5 1615-1618.
- Yoon, C. H., Schwander, P., Abergel, C., Andersson, I., Andreasson, J., Aquilla, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M. J., Bostedt, C., Bozek, J., Chapman, H. N., Claverie, J.-M., Coppola, N., DePonte, D. P., Ekeberg, T., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C. Y., Hartmann, A., Hartmann, E., Hartmann, R., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Kassemeyer, S., Kimmel, N., Kiskinova, M., Liang, M., Loh, N.-T. D., Lomb, L., Maia, F. R. N. C., Martin, A. V., Nass, K., Pedersoli, E., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M., Seltzer, V., Shoeman, R. L., Sierra, R. G., Soltau, H., Starodub, D., Steinbrener, J., Stier, G., Strüder, L., Svenda, M., Ullrich, J., Weidenspointner, G., White, T. A., Wunderer, C., and Ourmazd, A. (2011) “Unsupervised classification of single-particle X-ray diffraction snapshots by spectral clustering”, *Opt. Express* **19**, 16542-16549.
- Yoon, C. H., Barthelmess, M., Bean, R. J., Capotondi, F., Kirian, R. A., Kiskinova, M., Pedersoli, E., Raimondi, L., Stellato, F., Wang, F., and Chapman, H. N. (2014) “Conformation sequence recovery of a non-periodic object from a diffraction-before-destruction experiment”, *Opt. Express* **22**, 8085-8093.
- Yoshida, R., Yamashige, H., Miura, M., Kimura, T., Joti, Y., Bessho, Y., Kuramoto, M., Yu, J., Khakurel, K., Tono, K., Yabashi, M., Ishikawa, T., and Nishino, Y.

- (2015) “Extending the potential of x-ray free-electron lasers to industrial applications—an initiatory attempt at coherent diffractive imaging on car-related nanomaterials”, *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **48**, 244008 (5 pages).
- Yoshidome, T., Oroguchi, T., Nakasako, M., and Ikeguchi, M. (2015) “Classification of projection images of proteins with structural polymorphism by manifold: A simulation study for x-ray free-electron laser diffraction imaging”, *Phys. Rev. E* **92**, 032710 (13 pages).
- Yoshioka-Nishimura, M., Nanba, D., Takaki, T., Ohba, C., Tsumura, N., Morita, N., Sakamoto, H., Murata, K., and Yamamoto, Y. (2014) “Quality Control of Photosystem II: Direct Imaging of the Changes in the Thylakoid Structure and Distribution of FtsH Proteases in Spinach Chloroplasts under Light Stress”, *Plant Cell Physiol.* **55**, 1255-1265.
- Yumoto, H., Mimura, H., Koyama, T., Matsuyama, S., Tono, K., Togashi, T., Inubushi, Y., Sato, T., Tanaka, T., Kimura, T., Yokoyama, H., Kim, J., Sano, Y., Hachisu, Y., Yabashi, M., Ohashi, H., Ohmori, H., Ishikawa, T., and Yamauchi, K. (2013) “Focusing of X-ray free-electron laser pulses with reflective optics”, *Nat. Photon.* **7**, 43-47.
- 白倉治郎, (2008) 『よくわかる 生物電子顕微鏡技術プロトコル・ノウハウ・原理』, 共立出版, 東京.
- 大橋治彦、平野馨一編 (2013) 『増補版 放射光ビームライン光学技術入門』, 日本放射光学会, 東京.
- 小林周、高山裕貴、笠口友隆、中迫雅由 (2013) “暗視野位相回復法によるコヒーレント X 線回折パターンからの像再生”, *放射光* **26**, 108-110.
- 関口優希、『大規模データ解析と統計分析を通じた生体粒子の XFEL コヒーレント回折イメージング』, 2016 年度慶應義塾大学大学院理工学研究科 博士論文.
- 霜田光一 (1983) “レーザー物理入門”, 岩波書店, 東京.
- 田中隆次 (2013) “X 線自由電子レーザー理論”, 高エネルギー加速器セミナー OHO'13, (オンライン),
http://accwww2.kek.jp/oho/OHOtxt/OHO-2013/02_tanaka_takashi_1_20130722.pdf,
 (参照 : 2017-09-23).
- 田中均 (2013) “X 線自由電子レーザー概論”, 高エネルギー加速器セミナー OHO'13,

(オンライン),

http://accwww2.kek.jp/oho/OHOtxt/OHO-2013/01_tanaka_hitoshi_20130710.pdf,

(参照 : 2017-09-23).

中迫雅由, 笠口友隆, 関口優希, 小林周, 橋本早紀, 白濱圭也, 山本雅貴, 高山裕貴, 米倉功治, 眞木さおり, 引間孝明, 高橋幸生, 鈴木明大, 松永幸大, 乾弥生, 登野健介, 亀島敬, 城地保昌, 犬伏雄一, 星貴彦 (2014) “X線自由電子レーザーを用いた非結晶粒子のコヒーレント X線回折イメージング”, *日本結晶学会誌* **56**, 27-35.

中迫雅由, 笠口友隆, 高山裕貴, 小林周, 児玉渉, 坂本啓太, 吉留崇, 池口満徳 (2013) “コヒーレント X線回折イメージング構造解析理論の開発と展望”, *放射光*, **26**, 11-25.

宮島司, (2008) “ERL入射部のビーム力学”, 高エネルギー加速器セミナー OHO'08, (オンライン),

<http://accwww2.kek.jp/oho/OHO%20text%20archives%202005-2011/OHO08%20web%20final/04%20miyajima.080822.pdf>, (参照:2017-09-23)