

2015年7月13日

報道関係者各位

慶應義塾大学
東京理科大学

低温X線回折イメージングによる葉緑体内部構造の非侵襲・高分解能観察に成功

慶應義塾大学工学部物理学科の中迫雅由教授らの共同研究グループは、コヒーレントX線回折イメージングを生体粒子に適用し、光学顕微鏡や電子顕微鏡による観察では困難な、100ナノメートル (nm) 解像度を越える非侵襲イメージング技術を開発してきました。今回、東京理科大学の松永幸大教授らと共同で、この方法をバクテリア葉緑体丸ごとの構造解析に適用し、内部構造を70 nmの解像度で明らかにすることができました。

1. 本研究成果のポイント

- ・小さなものを丸ごと詳しく可視化する技術、コヒーレントX線回折イメージングを生体非結晶粒子の典型である細胞内小器官の構造解析に適用して、高い解像度で内部構造を明らかに。

慶應義塾大学工学部物理学科の中迫雅由教授らの共同研究グループはこれまでに、国家基幹技術であるX線自由電子レーザー(XFEL)利用推進に貢献しながら、利用重点課題に選定され、生体粒子の機能状態の構造を非侵襲で可視化するコヒーレントX線回折イメージング (Coherent X-ray Diffraction Imaging: CXDI) 法を低温下で遂行するための実験装置の開発と解析理論を展開してきました。

本研究では、東京理科大学と共同して、これら開発手法を、原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) から単離した大きさ1マイクロメートル (μm) に満たない葉緑体に適用しました。その結果、解像度約70 nmで明らかにされた内部構造から、チラコイド膜と呼ばれる光合成の足場がどのように葉緑体内で分布するかが明らかになりました。

本研究成果は、慶應義塾大学大学院工学研究科基礎工学専攻物理学専修・博士課程2年の関口優希君、同博士課程を修了した高山裕貴博士 (現理化学研究所放射光科学総合研究センター基礎科学特別研究員)、東京理科大学工学部・博士研究員の乾弥生博士らによるものです。なお本研究は、XFEL重点戦略課題、新学術領域研究、挑戦的萌芽研究若手研究、研究活動スタート支援などの研究助成を受けて実施されました。研究成果の詳細は、科学誌『Plant and Cell Physiology』(Oxford Journal 7月10日出版) に掲載されました。なお、本研究成果は同誌表紙の一部として採用されました。

2. 背景

生命現象の基本単位である細胞や、その要素である細胞内小器官は、数100 nmから数 μm の大きさです。生命現象を理解するため、光学顕微鏡や電子顕微鏡などのイメージング手法が開発され、細胞内の様々な生命活動が明らかにされてきました。その構造と機能をさらに詳しく理解するためには、その内部をnmスケールで観察する必要があります。しかし、光学顕微鏡においては、目的物の蛍光ラベルや分解能の壁があり、また、電子顕微鏡においては、電子の物質透過性の低さから細胞等の内

部構造を眺めるためには、薄切片化と染色が不可欠です。このような困難さを補い、相補的な構造情報を提供可能なイメージング手法としてX線回折イメージング (Coherent X-ray Diffraction Imaging: CXDI) が2000年ごろに提案されました。CXDI法は短波長X線の高い透過性等によって、 μm サイズの生体粒子の内部を機能状態の構造を維持したまま数十 nmの分解能で可視化できると考えられています。また、10フェムト秒以下(1フェムト秒は1000兆分の1秒)と極めて露光時間が短いXFELパルスを利用すると、生体粒子がX線照射による損傷を受ける前の一瞬の構造を投影像として観察することができます。

3. 研究手法と成果

慶應義塾大学理工学部物理学科の中迫研究室が中心となって、低温試料固定照射装置“壽老号”とその周辺装置を開発してきました。この装置では、非結晶粒子を高数密度で散布包埋した水和凍結試料をXFELパルスに合わせてスキャンし、十分なX線照射確率を確保しながら回折パターンを得ます(図1)。

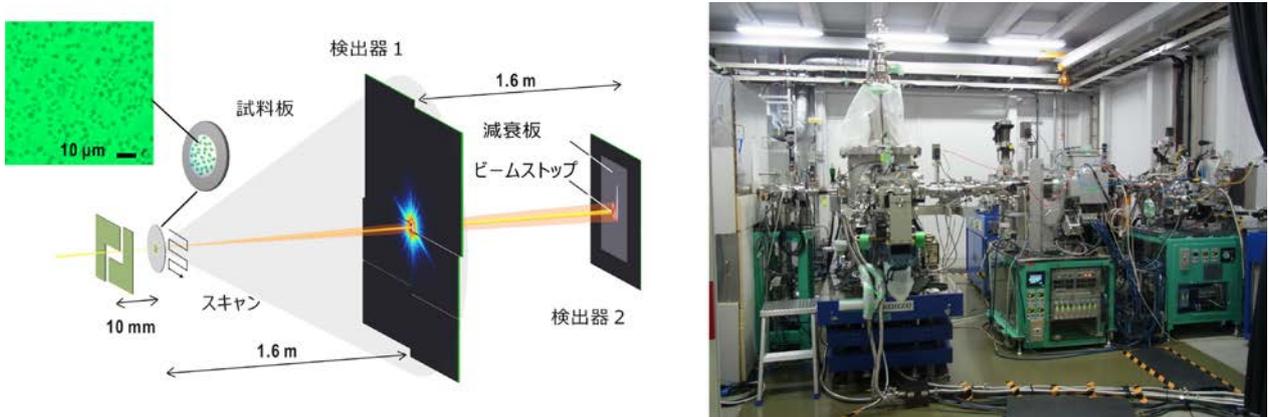


図1 XFEL-低温CXDI実験の概要

(左)非結晶粒子を高数密度で散布包埋した試料をXFELパルスに合わせて動かし、回折パターンを得ます。
(右)実験風景。

今回、東京理科大学と共同で、XFEL施設SACLAでの低温CXDI法により、原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シズン)から単離した大きさ1 μm 弱の葉緑体の内部構造を解像度約70 nmで可視化しました(図2)。

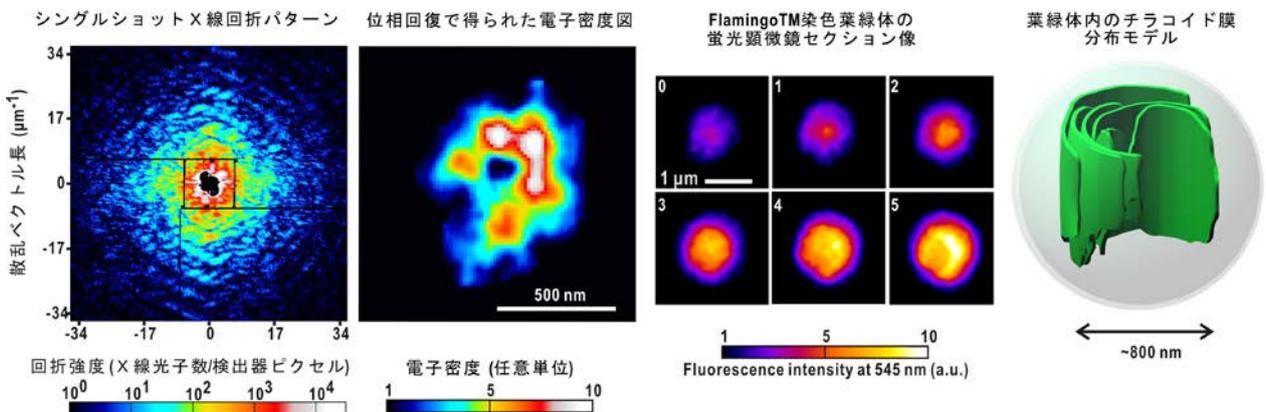


図2 低温CXDI法と蛍光顕微鏡による葉緑体の構造解析

(左端)水和凍結した機能状態の葉緑体1個からのシングルショット回折パターン。(左から2番目)回折パターンから再生された葉緑体の投影電子密度図。(右から2番目)タンパク質を蛍光染色した葉緑体の中央付

近の 0.2 μm 厚ステップでの光学切片像。(右端) CXDI 像と蛍光顕微鏡像から予想される葉緑体構造モデル。

図 2 左端は一個の葉緑体に XFEL を 1 ショット照射して得られた回折パターンで、その形状を反映した干渉縞が観測されています。この回折パターンに慶應義塾大学が独自に開発した新しいアルゴリズムを適用することで、投影像を 70 nm の分解能で再生し (図 2 左から 2 番目)、C 字型に分布した高電子密度領域を見出しました。さらに、CXDI 実験とは独立に、葉緑体内部のタンパク質分布や光合成時に光アンテナとして働くクロロフィル分子の分布を蛍光顕微鏡により可視化すると、同様の C 字型分布を見ることができました (図 2 右から 2 番目)。

これら結果から、高電子密度領域は光合成タンパク質が多く存在するチラコイド膜であることと考えられ、シズンの葉緑体内部ではチラコイド膜が C 字状に積層しながら周縁部に分布していると考えられました (図 2 右端)。シズンは水中で浮遊生活する藻類なので、シズンがどのような向きで漂っても、C 字型チラコイド膜構造により、太陽光のエネルギーを効率よく吸収できると考えられます。また、生物進化の共生説では、真核生物の細胞内小器官は、他のバクテリアが侵入してできたものと考えられています。今回明らかになったチラコイド膜の C 型構造は、最近共同研究チームで解析を開始したシアノバクテリア内のチラコイド膜分布と類似しており、生物進化面からも興味深い構造解析であったと考えられます。

4. 今後の期待

CXDI によって解明すべき重要な課題の一つに、“生命科学や材料科学において発見あるいは創生されてきたものの中で、結晶化が極めて困難な数百ナノメートル～マイクロメートルの粒子、いわゆる非結晶粒子を対象とした構造解析”があります。CXDI 実験・解析をより広範かつ効率的に実施することで、ナノ科学の発展に貢献するものと期待されます。

～本件に関するお問い合わせ～

東京理科大学 研究戦略・産学連携センター (URA センター)

〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

Tel : 03-5876-1530 e-mail : ura@admin.tus.ac.jp