

X線自由電子レーザーによる生きた細胞の ナノイメージング

西野吉則

北海道大学電子科学研究所 〒001-0021 北海道札幌市北区北21条西10丁目

木村隆志

北海道大学電子科学研究所 〒001-0021 北海道札幌市北区北21条西10丁目

城地保昌

(公財)高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

別所義隆

台湾中央研究院物理研究所 128 Sec. 2, Academia Rd., Nankang, Taipei 11529, Taiwan

要旨

X線自由電子レーザー (XFEL) 施設 SACLA で得られる10フェムト秒以下という極めて短い発光時間のコヒーレント X 線を利用して、生きた細胞が放射線による損傷を受ける前の一瞬の姿をナノレベルでイメージングすることに成功した。実験ではパルス状コヒーレント X 線溶液散乱 (PCXSS) 法と名付けた独自に構築したコヒーレント X 線イメージング手法を用いた。PCXSS 法では、溶液試料を独自開発したマイクロ液体封入アレイ (MLEA) チップ中に、環境を制御して保持することが特徴である。シングルショット XFEL でのコヒーレント X 線回折パターンから再構成した細胞の内部には、DNA が高密度で存在することが示唆されるイメージ強度の大きな構造などが定量的に観察された。PCXSS 法は生物試料のみならず、溶液中で機能を発揮する物質材料のナノレベル観察にも極めて有効である。

1. はじめに

放射線損傷は、電子顕微鏡や X 線顕微鏡などで生物試料を高分解能観察する際に、達成可能な分解能を制限する重大な問題である^{1,2)}。従来、放射線損傷を低減するために、試料を極低温に保つ対策がとられてきた。X 線自由電子レーザー (XFEL) は、フェムト秒のパルス幅により、試料を時間的に「凍らせる」ことにより、放射線損傷の問題を根源的に解決する道を切り拓く³⁻⁶⁾。XFEL を用いたコヒーレント回折イメージングは、このため、高分解能バイオイメージングに大きな可能性を秘めている^{7,8)}。コヒーレント回折イメージングは、X 線回折顕微法とも呼ばれ、SPring-8 などの第 3 世代以降の放射光を用いて発展してきた⁹⁻¹¹⁾。試料の結晶化を必要とせず、生物試料を高いイメージコントラストで観察できる有力なイメージング手法である¹²⁻¹⁴⁾。

XFEL のフェムト秒のパルス幅は、従来法では困難であった自然に近い状態での生物試料のナノイメージングも可能にする。我々は、XFEL のこの新たな可能性を示すため、生きた細菌細胞のイメージング実験を世界に先駆けて行った¹⁵⁾。ヒトなどの真核生物の細胞では、球形をした核にゲノム情報が格納されているが、原核生物で

ある細菌のゲノム情報は、一般に不定な形をした核様体に格納されている。核様体はリンを多く含むため、強い X 線散乱を起こすことが期待される。

測定では、*Microbacterium lacticum* (*M. lacticum*) という、牛乳中に生息する熱に強いグラム陽性菌を用いた¹⁶⁾。耐熱菌による生乳の汚染は農業において大きな問題となるが¹⁷⁾、サブミクロンサイズの小さなサイズのため、細胞の内部構造や機能に関する知見はほとんど得られていない。*M. lacticum* は、棒状の形状をした典型的な桿菌^{かんきん}であるが、通常の細菌と比べて極めて小さい。大腸菌と比べると、長さは半分程度で、体積では10分の1程度である。このため、通常の光学顕微鏡で内部構造を観察する事は困難である。

我々は、XFEL 回折を用いて生物試料を自然に近い状態で高分解能イメージする、パルス状コヒーレント X 線溶液散乱 (PCXSS: pulsed coherent X-ray solution scattering) 法の構築を独自に進めている。ちなみに、PCXSS は、「パックス」と発音する。Fig. 1 に PCXSS 法の概念図を示す。

PCXSS 実験の鍵を握る構成要素は、生物試料を自然に近い状態で保持できるマイクロ液体封入アレイ (MLEA: micro-liquid enclosure array) チップである。MLEA チップ

プでは、2枚の窒化ケイ素薄膜の間に溶液試料をサンドイッチして、溶液試料を真空から隔てる。XFELでマイクロ液体封入セル中の溶液試料を照射するが、XFELのシングルショットで窒化ケイ素薄膜が壊れてしまうため、多数のマイクロ液体封入セルを2次元アレイ配置する必要がある。MLEAチップは、北海道大学オープンファシリティーのナノ加工・観察装置群を用いて作製した。同様の構造をした液体封入デバイスは、環境セルとも呼ばれ、走査透過電子顕微鏡¹⁸⁾やコヒーレントX線イメージング¹⁹⁾などで、溶液中の生物試料のイメージングに用いられてきた。XFELを用いることにより、さらに放射線損傷の問題のない溶液中の生物試料の測定が実現する。我々は、MLEAチップ中の*M. lacticum*生細胞に対してPCXSS測定を行い、細胞の内部構造を明らかにすることに成功した。

Fig. 2(a)に、我々が開発したMLEAチップを示す。これは研究初期に使われたもので、10 mm×10 mmの大きさのMLEAチップに、10×10個のマイクロ液体封入セル

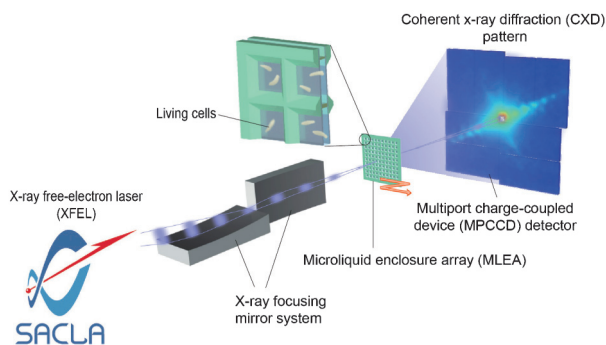


Fig. 1 (Color online) Schematic of PCXSS experiment for live cells.

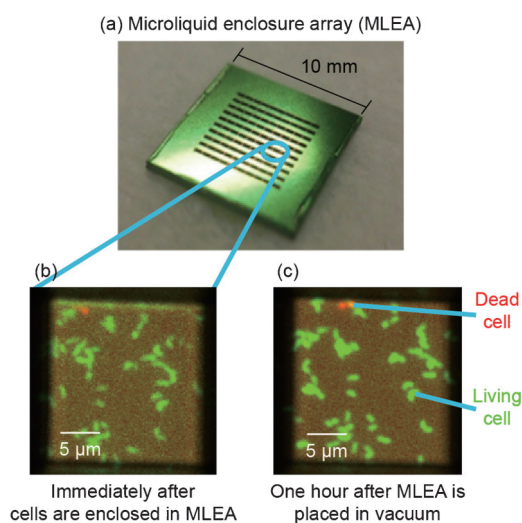


Fig. 2 (Color online) (a) MLEA chip and (b,c) fluorescent microscopy experiment to confirm that MLEA chips can keep live *M. lacticum* cells long enough time to perform PCXSS measurement.

を持っている。現在は、より効率の良い測定が行える、さらに集積度の高いMLEAチップを用いている。

2. MLEAチップへの生細胞の封入実験

我々は、PCXSS実験に先立ち、MLEAチップに生細胞を封入し、保持できることを確認した。細胞の生死を確かめるため、Invitrogen社製のLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kitという蛍光試薬を用いて*M. lacticum*細胞を蛍光顕微鏡観察した。この蛍光試薬を用いると、生細胞は緑色に発色し、死細胞は赤色に発色する。Fig. 2(b), (c)は、MLEAに封入した*M. lacticum*細胞の蛍光顕微鏡像を示す。MLEAチップに生細胞を封入後に、チップを真空中に置き、1時間後に観察しても、99%以上の細胞が生きていることを確認した。なお、PCXSS実験に用いた細胞には、この蛍光試薬による染色は行っていない。また、我々は、MLEAチップにおいて、真空中で一つのマイクロ液体封入セルの窒化ケイ素膜が破損しても、隣のマイクロ液体封入セルに溶液試料を保持できることも確かめている。

3. PCXSS実験

3.1 実験配置

PCXSS実験は、SPring-8 Angstrom Compact Free-Electron Laser (SACLA)のBL3を用いて行った²⁰⁾。SACLAからの、光子エネルギー5.5 keV、パルス幅10 fsほど、繰り返し周波数10 HzのXFELパルスを用いた。アンジュレータ直後のパルスエネルギーは、平均で260 μ Jであった。光学ハッチの一組の全反射平面ミラーで高次光を除去し、実験ハッチに導いた。実験ハッチ3に設置されたKBミラー(1 μ mコヒーレント集光装置)を用いて1.5 μ m×2.0 μ m(半値全幅)のスポットサイズに集光し²¹⁾、汎用コヒーレントイメージング装置(MAXIC: Multiple Application X-ray Imaging Chamber)²²⁾内にマウントしたMLEAチップ内の溶液試料に照射した。MAXIC内には、上流の光学系からの寄生散乱を除去するため、試料上流に2段の4象限スリットを設置した。

シングルショットでのコヒーレントX線回折パターンは、試料の下流2.319 mに設置したmultiport charge-coupled device (MPCCD)²³⁾のオクタルセンサーを用いて計測した。MPCCDは、サイズ50 μ m×50 μ mのピクセルを、合計2048×2048ピクセル持つ。MPCCDのノイズは30°Cにおいて300電子ほどである。これは5.5 keV光子1個が生成する電子の20%ほどに相当し、従って本測定は1光子の感度を有している。

海外では、飛翔した試料ビームを用いているが^{5,6)}、その場合、XFELのパルスとパルス間に反応領域を通過した試料は、測定に用いられず無駄になる。これに対して、

MLEA チップを用いると、XFEL のシングルショット当たりに必要な試料の量は、XFEL の繰り返し周波数に依らないため、微量な溶液試料を有効に測定に用いることができる。

MLEA チップのアライメントは、MLEA チップの照射窓に X 線を当てることなく、光軸方向から試料を観察できるズームレンズカメラを用いて行った。まず、MLEA チップのシリコン部分に XFEL を 1 発照射し、ズームレンズカメラのモニター画面上の照射痕の位置をマークする。次に、このモニター画面上のマークを基準に、マイクロ液体封入セルの座標を決めた。

3.2 MLEA チップによるバックグラウンド散乱抑制効果

コヒーレント X 線回折実験では、試料からの微弱なシグナルを高精度で計測するために、バックグラウンド散乱を抑制することが極めて重要となる。Fig. 3(a) は、試料位置 (XFEL 集光点) に何も置かなかった場合のバックグラウンド散乱を示す。これに対し Fig. 3(b) は、試料位置に生理食塩水を封入した MLEA チップを置いた場合のバックグラウンド散乱を示す。Fig. 3(a) と (b) とを比較すると、試料位置に何も置かない場合と比べて、試料位置に生理食塩水を封入した MLEA チップを置いた方が、バックグラウンド散乱を 9 割ほど抑制できることが分かる。これは、

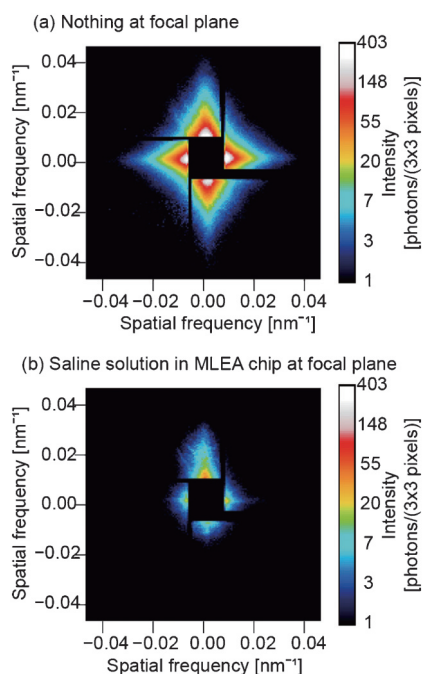


Fig. 3 (Color online) (a) Background scattering pattern when nothing was placed in the focal plane. (b) Background scattering pattern when saline solution in a MLEA chip was placed in the focal plane. The experiment shows that the window frame of each enclosure of MLEA chips acts as a guard slit and helps reduce background scattering.

20 μm 程の開口を持つ個々のマイクロ液体封入セル自身が、試料位置でのガードスリットの役割を果たし、上流の光学系からの寄生散乱を低減するのに役立っていることを示している。なお、生理食塩水を封入した MLEA チップによる X 線の吸収の効果は小さく、光子エネルギー 5.5 keV の X 線に対する透過率は 98% である。このため、バックグラウンド散乱の抑制は、X 線の吸収によるものではない。

XFEL のビームは、マイクロ液体封入セルの 2 枚の窒化ケイ素薄膜に垂直に入射するため、理想的には、様な位相の進みは起こるが、寄生散乱は起こらない。これに対して、試料の導入に液体ジェット方式を用いる場合、液体ジェットの表面が曲率を持つため、強い寄生散乱が起きる。シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析 (SFX) では、ブラッグ点近傍において強い回折が起こるため、試料の導入に液体ジェット方式を用いることができるが、非結晶試料に対するコヒーレント回折イメージングでは、試料からの散乱は極めて微弱なため、液体ジェット方式を用いることは現実的でない。

MLEA チップの溶液層の厚みは、ナノメートルスケールのスペーサーを用いることにより、精密に制御可能である。溶媒からのバックグラウンド散乱を抑えるためには、溶液層の厚みを試料よりやや大きくするのが理想である。我々の実験では、直径およそ 200 nm、長さ 500~1000 nm の桿菌である *M. lacticum* 細胞に合わせて、溶液層の厚みを 500 nm とした。*M. lacticum* 細胞の PCXSS 測定では、さらに、溶媒からの散乱を最小限に抑えるため、培養細胞を生理食塩水 (0.9% (w/v) NaCl) で置換し、1 μm 孔径のガラス繊維メンブレンフィルタを透過させることで栄養培地デブリなどのコンタミネーションを取り除いた。

3.3 生細胞からのコヒーレント X 線回折パターン

我々は、XFEL のシングルショットで、放射線損傷のない生きた *M. lacticum* 細胞からのコヒーレント X 線回折パターンを計測することに成功した。サブミクロンサイズの *M. lacticum* 細胞からの X 線散乱は弱く、その強度は、試料位置に何も置かない場合のバックグラウンド散乱と同程度である。このことは、MLEA チップによるバックグラウンド散乱抑制効果が、*M. lacticum* 細胞からのコヒーレント X 線回折パターンの計測に必須であることを示している。

M. lacticum 細胞からのコヒーレント X 線回折パターンを Fig. 4(a) に示す。Fig. 4(a) では、明瞭な干渉縞が 1 方向に延びている。干渉縞の間隔と方向から、試料の幅は 194 nm で 28° 傾いていることが分かる。この幅は、*M. lacticum* 細胞の典型的な幅と同程度である。また、干渉縞の最大散乱角から、全周期分解能は 28 nm と見積もられる。全周期分解能の見積もりにおけるシグナルのしきい値は、3 \times 3 ピクセル当たり 2 光子とした。ちなみに、干渉縞か

離れた検出器ピクセルでの、平均的なバックグラウンド散乱強度は、 3×3 ピクセル当たり 0.46 ± 0.92 光子である。

測定したコヒーレント回折パターンから見積もると、数%のショットが細胞に当たり、その内10%が一つの細胞に当たった。この低いヒット率の原因として重力による細胞の沈降が考えられる。その対策として、例えば、窒化ケイ素膜の表面をポリリジンでコートして細胞を固定する方法などを検討している^{24,25}。ちなみに、試料がより小さい場合には、重力の効果に比べてブラウン運動による拡散が優性のため、沈降は起こらない。実際、100 nm ほどのサイズの金ナノ粒子集合体の溶液試料に対しては、数十%のヒット率を達成している。

試料位置でのXFELのパルスエネルギーである60 μJ から見積もると、細胞が受けた線量はおよそ100 MGyと見積もられる。極めて放射線耐性のある *Deinococcus radiodurans* でも20 kGyを照射すると全滅してしまうため²⁶、XFELを用いない従来のイメージング法では、今回と同様の測定は不可能であることが分かる。これに対して、XFELのフェムト秒パルスを用いると、損傷が影響を及ぼす前の試料の姿を捕らえることができるようになる。

3.4 コヒーレントX線回折パターンの数値シミュレーション

長方形の物体からのコヒーレントX線回折パターンは、一般に、互いに直交する2方向に延びる干渉縞を持つ。一方、3次元の円柱やカプセル状の物体からのコヒー

レントX線回折パターンを数値シミュレーションにより計算すると、Fig. 4(b), (c)に示すように、典型的に、1方向に延びる干渉縞が得られる。これは、3次元逆空間において干渉縞がエバルト球と交わらなければ、その干渉縞は観測されないためである。実際、適切な方位をもつ円柱やカプセル状の物体に対して数値シミュレーションを行うと、測定したデータと相似したコヒーレントX線回折パターンが得られる。もしX線照射領域に複数の試料がある場合には、干渉縞は複数の方向に延びることが予想される。上の考察より、Fig. 4(a)に示すコヒーレントX線回折パターンが1匹の *M. lacticum* 細胞に由来することが強く示唆される。

さらに、Fig. 4(a)に示すコヒーレントX線回折パターンの干渉縞の鮮明度(ビジビリティ)が低いことは、試料の内部構造と密接な関連があることが数値シミュレーションによって示唆された。Fig. 5に示すように、一様な密度の円柱からのコヒーレントX線回折パターンはほぼ100%の鮮明度を与えるが、円柱の中により密度の高い円柱状の構造がある場合には、鮮明度が大幅に悪化することを確かめた。

上記の数値シミュレーションは、試料構造が単純なモデルでパラメータ化される場合にはシングルショットコヒーレントX線回折パターンから、試料構造を3次元モデリングできる可能性があることを示唆する。

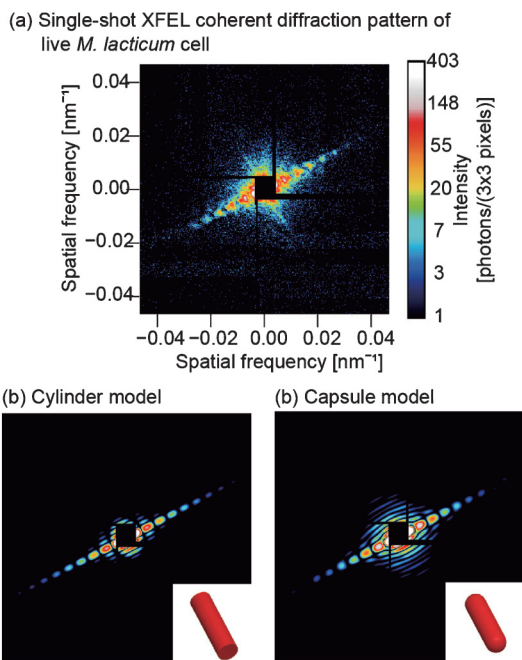
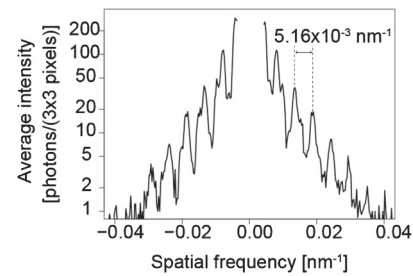


Fig. 4 (Color online) (a) Experimental single-shot XFEL coherent diffraction pattern of a live *M. lacticum* cell. (b), (c) Numerical simulation of coherent diffraction patterns: (b) a cylinder model and (c) capsule model.

(a) Line profile of single-shot XFEL coherent diffraction pattern



(b) Model calculations

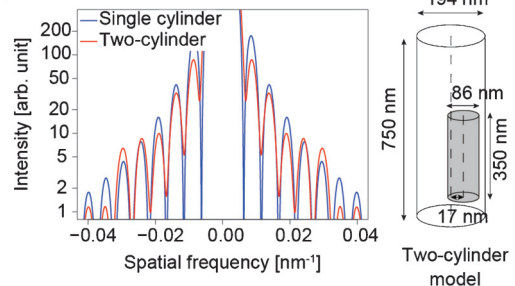


Fig. 5 (Color online) (a) Line profile along the strong fringe of the experimental single-shot XFEL coherent diffraction pattern shown in Fig. 4 (a). (b) Calculated line profiles along the fringes of coherent diffraction patterns using single cylinder and two-cylinder models. The low visibility of the fringe in the experimental data was reproduced by considering internal structure in a cylinder.

3.5 試料像再構成

測定したコヒーレント X 線回折パターンは、散乱角が 0.5° 以下の低角に限られている。低散乱角ではエバルト球の球面性は無視でき、X 線の吸収が無視できる物体に対してはフリーデル則により、コヒーレント X 線回折パターンは中心対称となる。このため、試料像再構成に先立ち、コヒーレント X 線回折パターンを中心対称化した。

XFEL のシングルショットで得られたコヒーレント X 線回折パターンからの試料像再構成は、2 段階のステップで行った。第一ステップは、サポート（アルゴリズム中で溶媒よりも電子密度が大きいと設定する領域）を精密化する過程である。この過程では、shrink-wrap サポート²⁷⁾を用いた relaxed averaged alternating reflections (RAAR) アルゴリズム²⁸⁾を2000反復と、それに続く固定サポートでの noise-tolerant hybrid input-output (HIO)²⁹⁾アルゴリズムを1000反復行った。この過程における初期サポートとして、コヒーレント X 線回折パターンから予測される、幅270 nm、長さ1.2 μm の 28° 傾いた長方形にとった。5000個の異なる初期位相から、上記の計算を行い、再構成エラーが小さな2,891の再構成像を選び、それら再構成像の過半数が満たすサポートを選び出した。こうして選ばれたサポートは、幅およそ225 nm、長さおよそ612 nm であった。

第二段階では、サポートを第一段階で決めたものに固定して、RAAR アルゴリズム1000反復とそれに続く noise-tolerant HIO アルゴリズムを1000反復行った。5000個の

異なる初期位相から上記の計算を行い、相関の高い119個の像（相関係数0.94以上）を平均化して、最終的な再構成像を得た。

Fig. 6(a) に再構成した *M. lacticum* 細胞の像を示す。再構成像は幅およそ194 nm、長さおよそ570 nm のロッド形状で、典型的な *M. lacticum* 細胞のサイズや形状と一致する。試料像再構成の整合性をチェックするため、我々は、2つの異なる初期ランダムシードを使って独立な像再構成を行い、試料像再構成が初期位相にほとんど依らないことを確認した。再構成像の全周期分解能は、位相回復伝達関数 (PRTF: phase retrieval transfer function)³⁰⁾を用いて評価すると、干渉縞方向でおよそ37 nm と見積もられた。

4. 考察

我々は、MLEA チップに封入された生きた *M. lacticum* 細胞に対して、XFEL 施設 SACLA を用いてシングルショットでのコヒーレント X 線回折パターンを計測し、試料像を再構成することに成功した。再構成像において、細胞全体に亘って不均一な内部構造が観察された。細胞の下部のイメージ強度が高い部分はダンベル形をしている。このイメージ強度が高い部分には電子密度の高い DNA などの物質が存在することが示唆される。実際に、仮に、細胞の上部がタンパク質で構成され、細胞の下部が核酸で構成されているとすると、それぞれの部分のイメージ強度の差をほぼ説明することができる。ここで、イメージ強度は、溶媒との密度差を表していることに注意を要する³¹⁾。

Fig. 6(b) には、比較のため、*M. lacticum* 細胞の透過電子顕微鏡 (TEM) 像を示す。今回 XFEL で観察された細胞の像は、この TEM 像と似た特徴を有している。ただし、ここで強調すべきは、XFEL で観察された細胞は重金属等で染色されていない生きた細胞に対するものであるのに対して、この TEM 像は化学固定・脱水・樹脂包埋の後に薄片にして酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色したものである。このため、この TEM 像は、生きた細胞構造を反映しているとは言えず、また定量的な解釈も困難である。

5. 展望

我々の研究により、PCXSS 法による全細胞イメージングが、生きた細胞内部の自然な構造を、重金属等による染色の必要なく、ナノスケールで明らかにできる、未踏の能力を持つことが示された。今後、細胞生物学への応用が期待される。例えば、本研究で達成された光学顕微鏡を遙かに凌ぐ分解能によって、生細胞中の核様体に関する理解が進展すると期待される。また、複数のスナップショット像からは、ゲノム複製やそれに続く細胞分裂など、重要な細胞のダイナミクスに関わる情報が得られると期待される。

PCXSS 法はまた、溶液中の生体分子のイメージングに

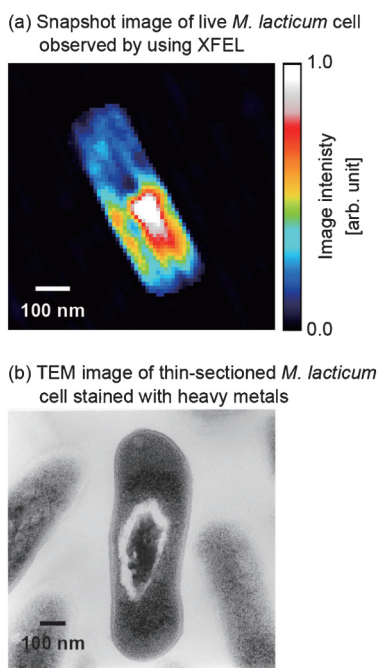


Fig. 6 (Color online) (a) Image of a live *M. lacticum* cell reconstructed from the experimental single-shot XFEL coherent diffraction pattern shown in Fig. 4 (a). (b) TEM image of a thin-sectioned *M. lacticum* cell stained with heavy metals.

も適用できる。重要なテーマとして、結晶化が難しい生体超分子複合体や天然変性タンパク質などのイメージングが挙げられる。これらを実現するためには、コヒーレント X 線回折シグナルの大幅な増強が必要となる。シグナル増強の直接的な方法は、加速器技術や X 線集光技術を開発させ、XFEL のパルスエネルギー密度を増すことである。その他には、溶液中の同じ構造を持った沢山の試料粒子の散乱を利用する方法がある。集光 XFEL で溶液中の少数の粒子を照射すれば、アンサンブル平均も時間平均もなく、スペックル状の散乱パターンが得られる³²⁾。これにより、従来の同心円状の溶液散乱と比べ飛躍的に実験で得られる情報量が増す。少数のコピー粒子からのスペックル状の散乱パターンからの構造取得にはいくつかの方法が考えられる。ひとつは、電子顕微鏡の単粒子解析で行われているように、ランダムな方位の多数の粒子の投影像から 3 次元構造を得る方法である^{33,34)}。別の方法として、少数のコピー粒子からのスペックル状の散乱パターンから、一粒子のコヒーレント X 線回折パターンを得る方法がある³⁵⁻³⁷⁾。溶液中で準安定な構造を明らかにすることにより、従来手法では得られない、タンパク質のダイナミクスに関する知見が得られると期待する。

PCXSS 法は、生物試料のみならず、溶液中でのみ構造を保ち、機能を発揮できる物質材料のナノレベル観察にも大きな可能性を秘めている。PCXSS 法の物質科学への応用に関して、我々は、産業応用も含め、様々なグループとの共同研究も推進している。

謝辞

本研究は、(独)理化学研究所の石川哲也センター長、矢橋牧名グループディレクター、Changyong Song チームリーダー、Sangsoo Kim 博士、(公財)高輝度光科学研究センターの登野健介チームリーダー、共和化工株式会社環境微生物学研究所の大島泰郎所長、森屋利幸博士、東京薬科大学の玉腰雅忠准教授との共同研究である。

PCXSS 測定は、SACLA 課題番号 2012A8034, 2012B8039, 2013A8046 で行われた。PCXSS 測定における、SACLA スタッフの支援に感謝する。MLEA チップ作製における、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業の支援に感謝する。MLEA 組み立てジグは、北海道大学電子科学研究所技術部と共同で開発した。

本研究は、外部資金として、文部科学省 X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題、JST CREST、科研費、物質・デバイス領域共同研究拠点等の支援を受けて実施した。

参考文献

- 1) R. Henderson: *Q. Rev. Biophys.* **28**, 171 (1995).
- 2) J. Kirz, C. Jacobsen, M. Howells: *Q. Rev. Biophys.* **28**, 33 (1995).
- 3) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert, J. Hajdu: *Nature* **406**, 752 (2000).
- 4) H. N. Chapman *et al.*: *Nat. Phys.* **2**, 839 (2006).
- 5) M. M. Seibert *et al.*: *Nature* **470**, 78 (2011).
- 6) H. N. Chapman *et al.*: *Nature* **470**, 73 (2011).
- 7) M. Bergh, G. Hultdt, N. Timneanu, F. R. N. C. Maia, J. Hajdu: *Q. Rev. Biophys.* **41**, 181 (2008).
- 8) M. M. Seibert *et al.*: *J. Phys. B* **43**, 194015 (2010).
- 9) 西野吉則, 石川哲也: *放射光* **19**, 3 (2006).
- 10) J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz, D. Sayre: *Nature* **400**, 342 (1999).
- 11) M. A. Pfeifer, G. J. Williams, I. A. Vartanyants, R. Harder, I. K. Robinson: *Nature* **442**, 63 (2006).
- 12) 西野吉則: *パリティ* **24**, 14 (2009).
- 13) J. Miao, K. O. Hodgson, T. Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros, Y. Nishino: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 110 (2003).
- 14) Y. Nishino, Y. Takahashi, N. Imamoto, T. Ishikawa, K. Maeshima: *Phys. Rev. Lett.* **102**, 018101 (2009).
- 15) T. Kimura *et al.*: *Nat. Commun.* **5**, 3052 (2014).
- 16) K. Suzuki and M. Hamada: *Genus I. Microbacterium Orla-Jensen 1919, 179^{AL} emend. Takeuchi and Hatano 1998b, 744^{VP}*. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 5, 2nd Ed. (eds. Goodfellow, M. *et al.*) 814-852 (Springer, New York, 2012).
- 17) G. Rangaswami and D. J. Bagyaraj: in *Agricultural Microbiology*, 2nd Ed., 330-346 (PHI Learning, New Delhi, 2005).
- 18) N. De Jonge and F. M. Ross: *Nat. Nanotech.* **6**, 695 (2011).
- 19) D. Nam *et al.*: *Phys. Rev. Lett.* **110**, 098103 (2013).
- 20) T. Ishikawa *et al.*: *Nat. Photon.* **6**, 540 (2012).
- 21) H. Yumoto *et al.*: *Nat. Photon.* **7**, 43 (2013).
- 22) C. Song *et al.*: *J. Appl. Cryst.* **47**, 188 (2014).
- 23) T. Kameshima *et al.*: *Rev. Sci. Instrum.* **85**, 033110 (2014).
- 24) A. V. Bolshakova *et al.*: *Ultramicroscopy* **86**, 121 (2001).
- 25) S. Marchesini *et al.*: *Nat. Photon.* **2**, 560 (2008).
- 26) L. J. Rothschild and R. L. Mancinell: *Nature* **409**, 1092 (2001).
- 27) S. Marchesini *et al.*: *Phys. Rev. B* **68**, 140101 (2003).
- 28) D. Russell Luke: *Inverse Problem* **21**, 37 (2005).
- 29) A. V. Martin *et al.*: *Opt. Express* **20**, 16650 (2012).
- 30) H. N. Chapman *et al.*: *J. Opt. Soc. Am. A* **23**, 1179 (2006).
- 31) D. I. Svergun and M. H. J. Koch: *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1735 (2003).
- 32) J. Pérez and Y. Nishino: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 670 (2012).
- 33) M. van Heel *et al.*: *Q. Rev. Biophys.* **33**, 307 (2000).
- 34) T. Oroguchi and M. Nakasako: *Phys. Rev. E* **87**, 022712 (2013).
- 35) Z. Kam: *Macromolecules* **10**, 927 (1977).
- 36) D. K. Saldin *et al.*: *Phys. Rev. Lett.* **106**, 115501 (2011).
- 37) B. Pedrini *et al.*: *Nat. Commun.* **4**, 1647 (2013).

著者紹介



西野吉則

北海道大学電子科学研究所 所長補佐・教授

E-mail: yoshinori.nishino@es.hokudai.ac.jp

専門：X線光学，X線顕微法

【略歴】

1996年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了，博士（理学）取得。高輝度光科学研究センター，DESY HASYLAB・客員研究員，理化学研究所播磨研究所・専任研究員などを経て，2010年より北海道大学電子科学研究所教授。



城地保昌

高輝度光科学研究センター チームリーダー

E-mail: joti@spring8.or.jp

専門：計算生物物理学

【略歴】

2002年京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了，博士（理学）取得。日本原子力研究所博士研究員，東京大学分子細胞生物学研究所助教，理化学研究所研究員などを経て，2013年より高輝度光科学研究センターXFEL利用研究推進室先端計測・解析技術グループ高度データ解析チームチームリーダー。



木村隆志

北海道大学電子科学研究所 助教

E-mail: takashi.kimura@es.hokudai.ac.jp

専門：超精密加工，X線光学

【略歴】

2011年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了，博士（工学）取得。同年より北海道大学電子科学研究所コヒーレントX線工学研究分野助教。



別所義隆

台湾中央研究院物理研究所・客座專家

E-mail: bessho@phys.sinica.edu.tw

専門：分子生物学，生化学，構造生物学

【略歴】

1992年名古屋大学大学院理学研究科博士後期課程中退，同年より同大学大学院理学研究科助手。1997年博士（理学）取得。旧文部省在外研究員（ニューヨーク州立大学），理化学研究所SPRING-8センター・チームリーダーなどを経て，2013年より台湾中央研究院物理研究所・客座專家。

Live cell nano-imaging by using X-ray free-electron laser

- Yoshinori NISHINO** Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University
Kita 21 Nishi 10, Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan
- Takashi KIMURA** Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University
Kita 21 Nishi 10, Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan
- Yasumasa JOTI** Japan Synchrotron Radiation Research Institute/SPRING-8
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan
- Yoshitaka BESSHO** Institute of Physics, Academia Sinica
128 Sec. 2, Academia Rd., Nankang, Taipei 11529, Taiwan

Abstract We succeeded in taking a snapshot image of a living cell at the nano level before suffering from radiation damage by using coherent X-rays with sub-10 fs pulse duration available at X-ray free-electron laser facility, SACLA. In the experiment, we employed the pulsed coherent x-ray solution scattering (PCXSS) method, a form of coherent X-ray imaging, developed by our group. A unique feature of the PCXSS method is to keep solution sample with controlled environment in micro-liquid enclosure array (MLEA) chips we developed. The cell image reconstructed from a coherent diffraction pattern recorded with a single-shot XFEL quantitatively reveals the internal structures, e.g. high image intensity structure indicative of dense DNA. The PCXSS method can also be effectively applied to nano-level imaging of materials functional in solution as well as biological samples.