

## 論文

## ナノイメージングのための新しい顕微鏡技術の開発

金城康人\*<sup>1)</sup> 小山元子\*<sup>1)</sup> 渡部 真\*<sup>2)</sup> H.フィードロヴィッツ\*<sup>3)</sup> 大道博行\*<sup>4)</sup>  
 柳瀬悦也\*<sup>4)</sup> 藤井貞夫\*<sup>5)</sup> 佐藤栄治\*<sup>5)</sup> 伊藤 敦\*<sup>6)</sup> 篠原邦夫\*<sup>7)</sup>

## New Microscopy for Nanoimaging

Yasuhito KINJO, Motoko KOYAMA, Makoto WATANABE, Henryk FIEDOROWICZ Hiroyuki DAIDO,  
 Etsuya YANASE, Sadao FUJII, Eiji SATO, Atsushi ITO and Kunio SHINOHARA

**Abstract** Two types of new microscopy, namely, X-ray contact microscopy (XRCM) in combination with atomic force microscopy (AFM) and X-ray projection microscopy (XRPM) using synchrotron radiation and zone plate optics were used to image the fine structures of human chromosomes. In the XRCM plus AFM system, location of X-ray images on a photoresist has become far easier than that with our previous method using transmission electron microscopy coupled with the replica method. In addition, the images obtained suggested that the conformation of chromatin fiber differs from the current textbook model regarding the architecture of a eukaryotic chromosome. X-ray images with high contrast of the specimens could be obtained with XRPM. The resolution of each microscopy was about 30 and 200-300 nm for XRCM plus AFM and XRPM, respectively.

**Keywords** X-ray contact microscopy, X-ray projection microscopy, Atomic force microscopy, Fine structure, Chromosome

## 1. はじめに

光学顕微鏡の分解能を超え、電子顕微鏡の弱点—電子線や熱による試料ダメージや厚い試料または水を含む試料の観察が不得手—を克服する顕微鏡として期待され、現在もなお世界中で開発が進みつつある X 線顕微鏡は、目的に応じて様々な方式が考案され、電顕では得られなかった画像の取得に関する報告が相次いでいる<sup>1)</sup>。筆者らもかつて、レプリカ法を用いた透過電子顕微鏡 (TEM) を組み合わせた密着顕微法 (以下密着法と略) により、

無固定・無染色で水を含むヒト染色体微細構造の観察に世界に先駆けて成功した<sup>2-3)</sup>。しかしこの方法には、

一旦光顕で着目した X 線像の多くが、レプリカ転写から TEM 観察に至る過程で不可避免的に失われるという問題点があった。

そこでこの問題を回避すべく、フォトレジスト上に得られた X 線像をレプリカ法—TEM 観察によらず、直接原子間力顕微鏡 (AFM) で観察する方法を導入したのでその結果について報告する。また、密着法のように像観察のためのフォトレジストの現像というプロセスが不要で焦点深度が深く、さらにリアルタイム観察も可能という特徴を持つ投影型顕微鏡を、やはりヒト染色体試料の観察に適用したのでその結果についても報告する。

\*<sup>1)</sup> 精密分析技術グループ \*<sup>2)</sup> 日本メンデル協会

\*<sup>3)</sup> ワルシャワ工科大 \*<sup>4)</sup> 原研 \*<sup>5)</sup> 川崎重工 (株)

\*<sup>6)</sup> 東海大 \*<sup>7)</sup> 東大

2. 実験方法

2.1 試料調製

2.1.1 界面展開法<sup>4-5)</sup>

14-16 時間の 0.05 $\mu$ g/ml コルセミド処理により、分裂期の細胞を蓄積した対数増殖期 (3~5 $\times$ 10<sup>5</sup>個/ml) のヒトリンパ球由来細胞を 1000 rpm, 5 分遠心後、蒸留水面上に接触させた。この瞬間に浸透圧ショックで細胞は破壊され、染色体を含む細胞内容物はフィルム状に水面に広がる。このフィルムを直接、フォトリジスト (PMMA) を塗布した 5~7 mm 角のシリコン基板上に接触採取した。

2.1.2 カルノア固定/温酢酸処理法<sup>6)</sup>

同じ細胞を定法 (0.075M-KCl による低張液処理→酢酸/メタノール混液 (カルノア液) による固定) に従って上記電顕試料メッシュ上に調製した。これをさらに 37 $^{\circ}$ C に加温した酢酸で 1 時間処理し、染色体以外の細胞質成分に由来する夾雑物を除去した。

2.2 X線顕微鏡

2.2.1 密着法

界面展開法で調製した染色体試料の載ったレジストを、乾燥試料の場合はそのままレーザープラズマ X 線の照射槽内にセットした。また含水試料の場合は図 1<sup>7)</sup> に示すように、採取時の水を残したまま (a) 1 mm 角の窒化シリコン窓 (厚さ 100 nm) を持つシリコン基板と密着させ (b), さらに両基板の上下からトルクゲージで圧着して水層の厚さを露光ごとに一定に保ち、余分な水を濾紙

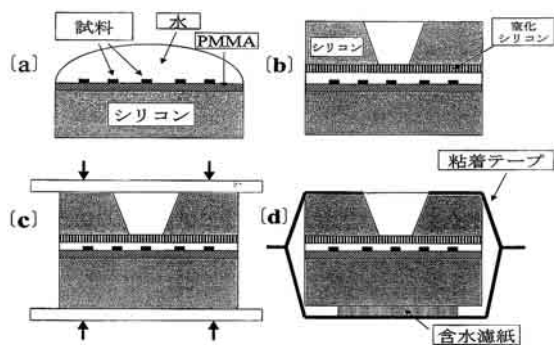


図 1. 試料のウェットチェンバー封入

で吸い取った (c)。次にこの全体を粘着テープ (スコッチテープ #483) で封入した (d) ものをウエット・チェンバーとし、同様に露光槽内にセットした。

X線露光は以下のように行った。まず Nd : YAG レーザーを、露光槽内の試料から 0.9~1 cm の距離にセットしたターゲット (KCl 粉末、厚さ 20  $\mu$ m の Au フォイルまたは噴射アルゴンガス) に照射した<sup>8)</sup>。この瞬間にターゲットはプラズマ化すると同時に、いわゆる水の窓領域の波長 (2.3~4.4 nm) を含む X 線が全方向に発生し、試料の露光は完了した。露光後のレジストは、0.5% の次亜塩素酸ナトリウム処理でその表面から染色体を含むすべての試料を除去した後、メチルイソブチルケトン/イソプロパノール混液で現像 (エッチング) して X 線像 (レリーフマップ) を得た。

2.2.1 投影型顕微鏡

2.1.2 により調製した試料を、シンクロトロン放射光リング (高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設) のビームラインに組み立てた投影型顕微鏡<sup>9)</sup> の光路上にセットした。図 2 にその光学系を示す。分光器で 3.15 nm の波長に単色化した X 線を、ゾーンプレートを用いてピンホールの位置に集光 (スポットサイズ 1 $\mu$ m $\phi$ ) したものを光源とし、その後方にある試料の投影拡大像を冷却 CCD カメラで記録した。

3. 結果と考察

3.1 密着法による X 線像の AFM 観察像

図 3 は乾燥状態の染色体の X 線像である。上が単一の細胞に由来するであろう複数の染色体, 下はその内の 1 本を拡大したものである。先に述べたようにレプリカ法の場合, 特に上のような像を光学顕微鏡下で捉えても, それらを TEM 像として再現することは極めて困難であった。しかし AFM では期待された通り, この問題はほぼ解決した。

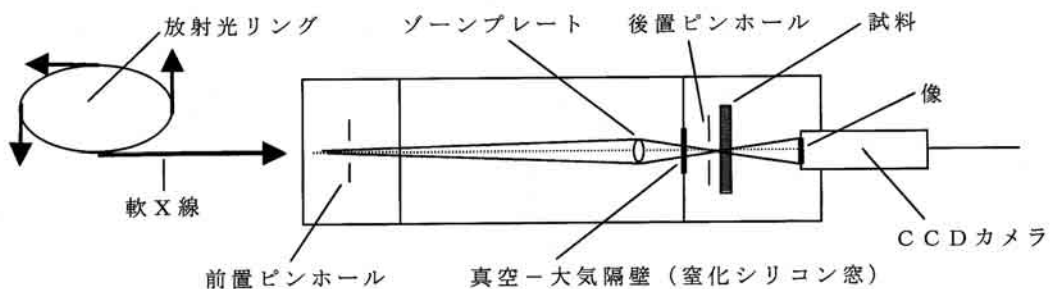


図 2 投影型顕微鏡の光学系

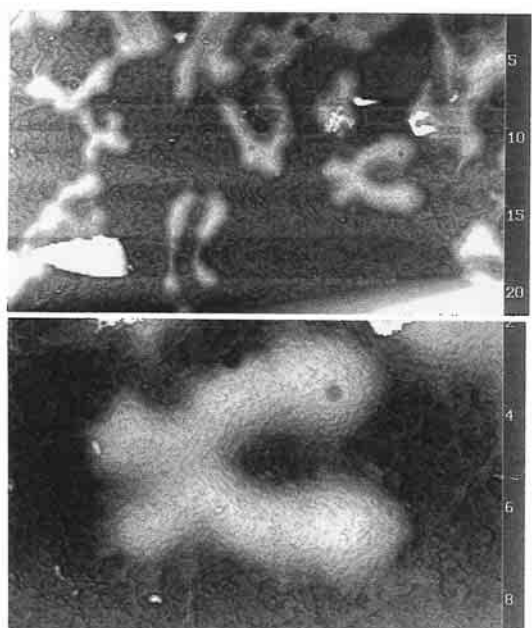


図3. 乾燥状態の分裂中期染色体（密着X線像），スケールは以下の図も含めてすべて $\mu\text{m}$

図4は含水状態の染色体像である。上は分裂中期の1本，下はその一部拡大像である。染色体の下部構造としての繊維（クロマチン）は不均一なサイズ（直径30～120nm）の粒子の連鎖のように見える。

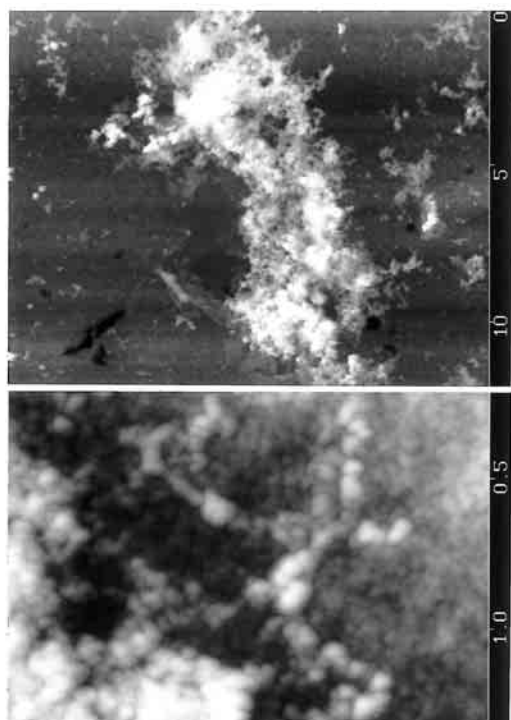


図4. 含水状態の分裂中期染色体（密着X線像）

図5もやはり含水状態の染色体像であるが，こちらは図3，4とは異なり，個々の染色体の形態がやや不明瞭である。恐らくは分裂前期または終期の，繊維がやや弛緩した状態の像であろう。注目したいのは個々の染色体本体を構成する繊維，およびそれらをつなぐ繊維の粒状性の顕著さである。特に引き伸ばされた繊維（下）は明らかにサイズの不均一な粒子の連鎖構造であり，この繊維をクロマチンと同定するならば，その構造は一般的な教科書に採用されているモデルとは明らかに異なる。教科書モデルとはすなわち，直径約10nmの粒子（ヌクレオソーム）が規則的なコイルを巻いて直径の均一（約30nm）なクロマチン繊維を構築する，とするものである<sup>10)</sup>。教科書モデルが，固定・染色・乾燥を経由した電顕観察結果に主として基づいているのに対し，本法による像は無処理の含水試料の情報であることを重視したい。

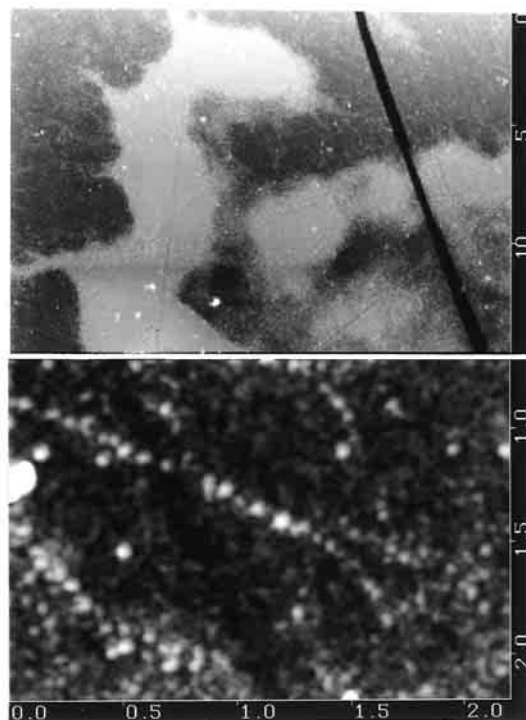


図5. 含水状態の染色体（密着X線像；恐らく前期または終期）

ただ本法は，分解能の厳密な評価という点に問題を残す。よく知られていることであるが，AFM探針の先端曲率半径が観察試料のサイズを上回る場合，その試料は真のサイズよりも大きく計測される<sup>11)</sup>。上記の計測値も実際のところはより小さいものと思われる。この問題を解決するためには，数～100nmのオーダーで，均一なサイズの粒子または線状の，複数の標準試料を用いたサイズ・キャリブレーションが不可欠である。しかし調べた限りではこれまでのところ，この目的に叶う適当な試料

が見つからない。今後の課題である。

### 3.2 投影型顕微鏡によるX線像のCCD観察像

図6は実験方法2.1.2により調製した染色体の光学顕微鏡像(上)および投影拡大X線像(下)で、同一視野のものである。別に行ったテストパターンや電顕試料メッシュのエッジを用いた分解能解析から、この顕微鏡の現段階での到達分解能は200~300nmと見積もられた。このことから、染色体についてもその下部構造の一部が見えることが期待されたが、図に見る通り、その解像度は現状では光顕像にも及ばない。しかし無染色の試料でも本法を用いることにより、十分なコントラストを持った像が得られることは実証された。

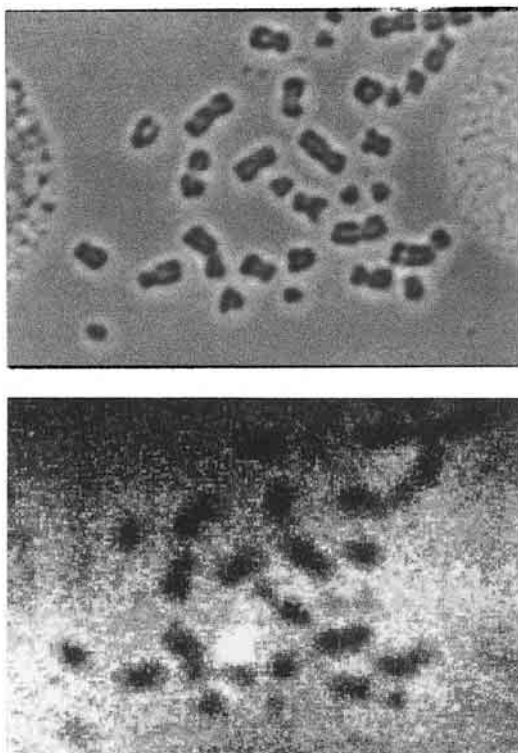


図6. カルノア固定染色体の光顕像(上)と投影X線像

分解能については光源の高輝度化、光源サイズの微小化、あるいはより小さなピンホールの挿入による波長純度の向上などにより、さらに高くなることが期待される。

染色体について言えば、本法は何より生きた細胞内におけるその構造および変化を、リアルタイムかつ深い焦点深度で観察できる可能性を内包した方法である点で、今後の性能の向上に期待したい。

### 4. まとめ

① レーザープラズマX線を用いた密着X線顕微鏡法により得られたヒト染色体のX線像をAFMにより観察し、多様な時期の像を効率よく得る方法を確立した。

- ② 本法による分解能は少なくとも30nmを切ると見積もられたが、その厳密な評価のためには、AFMのチップごとに数~100nmのサイズ既知の試料による、キャリブレーションが不可欠である。
- ③ 得られた像から、染色体を構成する繊維(クロマチン)の構造は、その構築に関する教科書モデルとは異なるものであることが示唆された。
- ④ 投影型X線顕微鏡の導入により、200~300nmの分解能が達成され、また無染色生物試料の高コントラスト観察に成功した。

### 参考文献

- 1) D. Attwood : Soft X-rays and Extreme Ultraviolet Radiation; Principles and Applications, Cambridge University Press (1999).
- 2) K. Shinohara et al., J. Microsc. 158, 335-342, (1990).
- 3) Y. Kinjo et al., J. Microsc. 176, 63-74, (1994).
- 4) J. Gall, Science, 139, 120-121, (1963).
- 5) M. Watanabe and N. Tanaka, Jpn. J. Genet., 47, 1-18, (1972).
- 6) 稲賀すみれ, 医学・生物学領域の走査電子顕微鏡技術 (田中編), pp.155-163, (1992).
- 7) K. Shinohara et al., Proc. SPIE 1741, 386-392, (1992).
- 8) 大道博行, レーザークロス, 121, 1-3, (1998).
- 9) K. Shinohara et al., AIP Conference Proc. 507, pp. 174-177, (2000).
- 10) B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 229-230, (2002).
- 11) M. J. Allen et al., Ultramicroscopy 42-44, 1095-1100, (1992).

(原稿受付 平成14年7月31日)