

走査型蛍光X線顕微鏡による好酸性光合成細菌Zn分布の100 nm マッピング

渡辺紀生^a, 青木貞雄^a, 松原純一^a, 奥野憲一郎^a, 高野秀和^b, 竹内晃久^b, 鈴木芳生^b
^a筑波大学物理工学系, ^b高輝度光科学研究センター

背景

X線アンジュレーター光源及びゾーンプレートに代表される高分解能光学素子の進歩により、現在では0.1 μm 程度の大きさのX線マイクロビームも利用できるようになってきている¹⁾。BL47XUにおいてもゾーンプレートを集光素子としたマイクロビームの開発が続けられており、それを利用した走査型X線顕微鏡が構築されている²⁾。本研究では、この走査型X線顕微鏡の応用として、好酸性光合成細菌 (*Acidiphilium rubrum*) の光合成中心に含まれるZnの蛍光X線強度分布測定を行った。

従来、光合成に参与するクロロフィルには例外なくMgが含まれると考えられていたが、近年好酸性光合成細菌においてZnバクテリオクロロフィルが発見された³⁾。その後、透過電子顕微鏡による超薄切片観察の結果、この細菌には他の光合成細菌と異なり光合成内膜構造がないことが示された⁴⁾。それでは細胞膜上にのみ存在しているのか、あるいは細胞質中にも存在しているのかという問題に対して、今のところ明確な証拠は見つかっていない。この問題に対して何らかの情報を得ることがこの研究の目的である。細菌は大きさは約1 μm であり、この内部構造を調べるにはサブミクロンの分解能を持った分析顕微鏡が必要となる。BL47XUにおける走査型X線顕微鏡はこの有力な手段となる。

光学系

実験はBL47XUの走査型X線顕微鏡装置において9.7 keV X線を用いて行った。図1に実験のレイアウトを示す。集光素子として、Ta製ゾーンプレートを

用いた。ゾーンプレートの仕様は、直径155 μm 、最外輪帯幅0.1 μm で、回折限界の理論分解能は0.12 μm となる。ゾーンプレート1次光以外の次数の回折光をカットするために直径20 μm のピンホールをOSA (Order Sorting Aperture) として用いた。入射X線及び透過X線モニターはイオンチェンバーで行った。また試料からの蛍光X線測定には、SDD (Silicon Drift Detector) を用いた。

金ワイヤーのエッジスキャンによるスポット径の測定では、水平方向0.26 μm 、垂直方向0.24 μm の半値幅が得られた。また、フルパワーでは約 10^9 Photons/s のフラックスが得られた。図2にタンタルテストパターン (厚さ0.5 μm) の走査型X線顕微鏡による透過像を示す。半値幅から予想されるように、0.2 μm 線幅程度まで分解結像させることができた。

また、今回ゾーンプレートの0次透過光をカットするために、エポキシ樹脂に直径30 μm の金のワイヤーを埋め込んで厚さ20 μm でスライスしたセンターストップを作成した。図1のようにゾーンプレート上流側に挿入して金ワイヤーによるエッジスキャンを行った結果、バックグラウンドを下げる効果が確認できた。細菌のZnマッピング

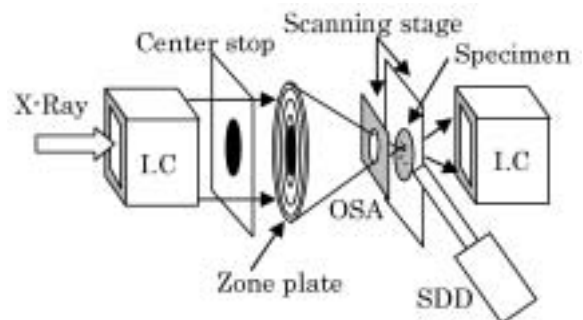


図1 走査型X線顕微鏡のレイアウト

細菌は、培養後凍結保存されていたペースト状の細菌を常温に戻し、2枚のカプトン膜(厚さ $12.5\mu\text{m}$)の間に薄く引き延ばして試料として用いた。エネルギー 9.7 keV のX線を励起光として、試料からのZnの蛍光X線($K\alpha$: 8.63 keV)をSDDでカウントした。細菌は約 $1\mu\text{m}$ 程度の大きさがあるため光学顕微鏡でも確認できたが、X線顕微鏡にセットした状態では光学顕微鏡で場所を特定することができなかった。また、細菌に対するX線の吸収がほとんどないため、イオンチェンバーを用いた透過像でも場所を特定することができなかった。そこで、蛍光X線にて適当にスキャンを繰り返し、Zn蛍光X線の強度が強く出るところを集中的にスキャンした。蛍光X線の強度はおよそ数カウント/秒から強い部分で数10カウント/秒程度だった。

図3に部分的に蛍光X線強度が強く観察された部分の透過像および蛍光X線像を示す。透過像で細菌の輪郭がはっきりしないのでこの分布がZnの細菌中の分布なのかどうかは何とも言えないが、およそ $0.2\mu\text{m}$ 程度の分解能でZnの分布を測定することはできたと言える。

今後の課題

今回の実験では、細菌中のZnの分布を明確にさせるところまでは至らなかった。その理由として、細菌の輪郭をうまく結像させることができなかったことが挙げられる。

高倍率光学顕微鏡を用いれば $0.3\mu\text{m}$ 程度の分解能で細菌の位置を特定できるが、光学顕微鏡とX線顕微鏡を切り替えたときの位置決め精度が同程度必要とされる。透過X線像で細菌の輪郭が十分に結像できるならば、蛍光X線像と重ね合わせることで細菌内元素マッピングが行える。そのためには電子顕微鏡観察と同様に酢酸鉛や酢酸ウラニルによる染色⁴⁾を行う必要がある。これらの方法で細菌の位置を明確にすれば蛍光X線によるZnの分布と細菌の位置を対応付けることが可能となる。

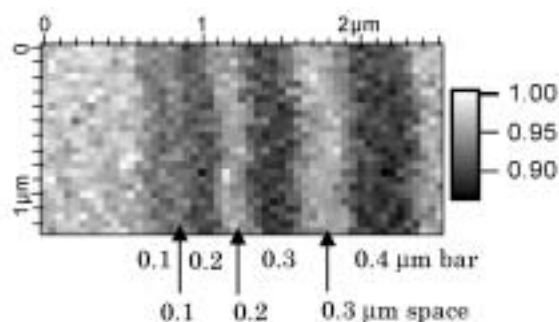


図2 タンタルテストパターンの透過X線像。Dwell time : 0.1s/pixel , 63nm/pixel 。スケールは透過率を示す。

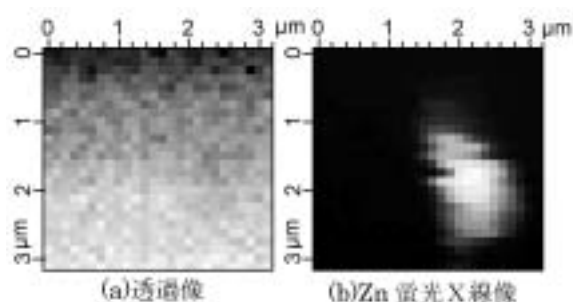


図3 好酸性光合成細菌の (a) 透過X線像と (b) Zn蛍光X線像。 $0.13\mu\text{m/pixel}$ 。

謝辞

本研究において、筑波大学物質工学系、小林正美助教授には、好酸性光合成細菌試料を提供して頂きました。ここに感謝致します。

参考文献

- 1) Hidekazu Takano, Yoshio Suzuki and Akihisa Takeuchi, *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) L132.
- 2) Yoshio Suzuki, Akihisa Takeuchi, Hidekazu Takano, Takuji Ohigashi and Hisataka Takenaka, *Jpn. J. Appl. Phys.* **40** (2001) 1508.
- 3) Norio Wakao, Naoto Yokoi, Naohito Isoyama, Akira Hiraishi, Keizo Shimada, Masami Kobayashi, Hideo Kise, Masayo Iwaki, Shigeru Itoh, Shinichi Takaichi and Yonekichi Sakurai, *Plant Cell Physiol.* **37** (1996) 889.
- 4) Yukiko Matsuzawa, Toshio Kanbe, Jiro Suzuki and Akira Hiraishi, *Current Microbiology* **40** (2000) 398.