

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07322

研究課題名(和文) 超解像蛍光イメージングによるアクチンフィラメントとミオシンの動態解析

研究課題名(英文) Analysis of dynamics of actomyosin by super-resolution fluorescence imaging

研究代表者

和沢 鉄一 (Wazawa, Tetsuichi)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：80359851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来の光学顕微鏡では実現しなかった高い空間分解能の観察を実現する技術である超解像蛍光イメージングでは、生体試料や生体分子試料に対する光ダメージを最小限に抑えながら速いフレームレートで長時間のタイムラプス観察を行うことは困難であった。本研究では、SPoD顕微鏡法を改良することで、光ダメージのより少なくより忠実な超解像画像を得られる超解像顕微鏡技術を開発した。これにより、細胞内のアクチンフィラメントなどの細胞骨格のダイナミクスの高空間分解能観察を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内には、タンパク質や脂質等で構成される微小なナノ構造複合体が複雑に配置されていて、それらが相互に作用することで機能している。本研究では、従来の超解像顕微鏡では困難であった、生体試料に対する光ダメージを最小にしながら、長時間の観察が可能な超解像イメージング技術を開発した。本研究により、タンパク質複合体が細胞中で機能する現場を高分解能で観察することが可能となり、タンパク質複合体が細胞生理機能においてどのように作用するかを解明することに今後貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Super-resolution fluorescence imaging is a technique to achieve observation at a higher spatial resolution than conventional optical microscopy. However, long-term time-lapse super-resolution observation at a fast frame rate still remains challenging. In this study we have developed a super-resolution imaging technique by which realistic super-resolved images are obtained with very low photodamage in live cells and intact biomolecules. By the present technique, we successfully achieve long-term super-resolution observation of cytoskeletons such as actin filaments in live cells.

研究分野：生物物理学

キーワード：超解像イメージング 蛍光偏光 タンパク質複合体 正規化最尤法 モータータンパク質 細胞骨格

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アクチンフィラメントは、筋肉中ではミオシンと共にアクトミオシン複合体を構成して筋収縮を起こし、また真核細胞中では細胞骨格としての役割を果たしている。アクトミオシンは、ATP を加水分解して得られる自由エネルギーを用いて、並進運動を発生するモータータンパク質である。従来、アクトミオシンのモーター機能におけるアクチンフィラメントの役割は、ミオシンが移動するためのトラックやレールといった受動的なものと考えられてきた。しかし、近年、アクチンの動的構造多型性、アクチンへのミオシンの相互作用の協同性、ミオシンとの相互作用に伴うアクチン周囲の水和層の変化、そしてミオシンとの相互作用に伴うアクチンフィラメントの柔らかさの変化などが明らかになってきた。これらは、アクチンフィラメントや微小管は、モータータンパク質の移動のための受動的なトラックではなく、むしろモータータンパク質と共に協同的に作用する可能性があるとして示唆している。

光学顕微鏡による水溶液中で活性のある個々のアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡観察は、柳田らによって 1984 年に実現した。しかし、アクチンフィラメントに含まれる単量体アクチン(G-アクチン)数は約 400 個/ $\mu\text{m}$  であるので、従来の蛍光顕微鏡で測定されたデータは、光の回折限界(約 0.2  $\mu\text{m}$ )の範囲に含まれる 80 個以上もの G-アクチンの平均値である。したがって、アクチンで起こるイベントをより詳細に調べるには、従来よりも可能な限り狭い領域から情報を得られる超解像蛍光イメージング技術による計測・解析技術の確立が有用となると期待される。

近年開発が進められた超解像蛍光顕微鏡法により、光の回折限界以下の分解能で蛍光試料を観察することが可能になっている。特に、我々は、リアルタイムで生物試料の超解像蛍光顕微鏡観察が可能な方法として SPoD(Superresolution by Polarization Demodulation)を開発した。SPoD は、偏光励起照明を使って発生させた蛍光変調と画像解析を巧妙に組み合わせた新しい超解像蛍光顕微鏡法である。我々は、この方法の拡張を行い、光スイッチングタンパク質を使った超解像イメージングに成功している。特に、SPoD は比較的速いフレームレートでの観察が可能であるので、試験管中や細胞中のタンパク質複合体やフィラメント状タンパク質の動態を捉えるのに有用であろうと期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、アクトミオシンが動作するときにアクチンフィラメントにおいて起こるイベントを超解像イメージングの分解能で解析する手法の開発である。具体的な研究目的は以下の通りである：

- 水溶液中で活性のあるアクチンフィラメント観察のための SPoD 超解像蛍光顕微鏡を構築
- SPoD 超解像顕微鏡観察で得られたデータから、効率的に超解像の再構成計算する手法、および色素の蛍光偏光情報を抽出するための手法の開発
- 超解像蛍光顕微鏡による、アクトミオシンの動作に伴うアクチンフィラメントのブラウン運動による動的形状変化のイメージング解析。また蛍光標識アクチンフィラメントにおける、フィラメントに沿った蛍光異方性分布の解析
- フィラメントタンパク質の超解像蛍光顕微鏡による解析

### 3. 研究の方法

本研究課題では、新規の超解像顕微鏡の開発を行い、そしてこれを用いた試験管中や細胞中でのタンパク質複合体の解析を行う。超解像顕微鏡として、高空間分解能で観察するための SPoD(Superresolution by Polarization Demodulation)超解像蛍光顕微鏡を開発する。SPoD 法は、通常の落射蛍光顕微鏡において、励起光を直線偏光とし、かつその偏光面を回転させながら照明することで発生する蛍光変調を含む蛍光像を観察するものである。高空間分解能を実現するために、照明光の偏光比を高く保ちながら偏光面を回転させる照明光学系を製作し、蛍光顕微鏡と組み合わせる。

この超解像顕微鏡によって得られた画像データから画像再構成計算を経て、超解像画像を得る。この手順では、最尤法と位相検波を用いて線形逆問題を解くことによって超解像再構成像を得る。SPoD 法による画像データからの再構成計算法としては、Fast Iterative Shrinkage-Thresholding Algorithm (FISTA) が従来用いられてきたが、FISTA の計算原理では LASSO 正則化が使われてきた。しかし、LASSO 正則化による画像再構成計算では、計算結果に過剰補正によるアーティファクトがしばしば現れる。そこで、本研究では LASSO 正則化以外の手法の検討も行う。

### 4. 研究成果

超解像蛍光観察のため、SPoD (superresolution by polarization demodulation)法をベースとした超解像顕微鏡の製作を行った。SPoD では、直線偏光かつその偏光面を機械的に回転させた励起光を用いて蛍光試料からの蛍光に変調を掛けながらタイムラプス観察を行う。ここで、蛍光変調の変調度の最大化のため、照明光の偏光を維持させるための光学系の検討を行った。蛍光顕微鏡の光学系で用いる反射ミラーでは、s 偏光および p 偏光の入射光に対しては偏光比の維持

は比較的良好であるが、s 偏光と p 偏光の間の偏光角を持つ入射光の反射に対しては、偏光比の低下は著しい。この偏光比の低下については、2 枚の同仕様のミラーのペアを利用することで、補償することに成功した。ただし、このように偏光比を補償しても、対物レンズを通ることで照明光の偏光が攪乱される。対物レンズによる偏光比低下の改善は今後の課題である。また、蛍光変調振幅と空間分解能との関係を調べるために、人工的なパターンを用いて画像再構成のシミュレーションを行ったところ、蛍光変調の振幅の深さが空間分解能に影響し、蛍光変調振幅が深い方が高い空間分解能が得られることが分かった。このことから、照明光の偏光比の空間分解能に対する重要性が明らかになった。

SPoD 超解像顕微鏡によって取得した画像データからは、画像再構成計算によって超解像画像を得る。画像再構成計算については、2 つのアプローチを行った。SPoD 超解像顕微鏡における画像再構成では、FISTA 法による計算に時間が掛かることが問題点の一つであった。この問題を解決するために、従来の Python によるコードを FORTRAN に移植するとともに、計算時間が掛かっていた画像畳み込み計算のルーチンについては並列化コードに書き換えた。これにより、従来のシングルスレッドの FISTA 計算に比較して計算時間は 1/5 程度まで改善することに成功した。一方、LASSO 正則化による過剰補正のアーティファクトについては、最尤計算において LASSO 正則化から  $L_p$  正則化に変更することで解決を試みた。様々なテストパターンや、実際の観察画像でテストを行い、 $L_p$  正則化のアーティファクト低減に対する有効性を実証した。

これまでは、SPoD 超解像観察には蛍光タンパク質である Kohinoor を用いてきた。ところが、本研究の実施中に、より明るい蛍光特性を示す蛍光タンパク質である改良型緑色蛍光タンパク質 (pRSGFP) が開発された。そこで、SPoD 超解像観察に pRSGFP を応用するために、特性確認を行ったところ、Kohinoor に比較して pRSGFP は蛍光強度が高いことを試験管中および細胞中で確認した。さらに、これを SPoD 超解像観察に用い、ほ乳類細胞内のアクチンフィラメントのダイナミクスの超解像観察を試みた。pRSGFP の高い蛍光強度を利点として超解像観察条件を最適化することによって、長時間のタイムラプス観察も可能になった。これにより、ほ乳類細胞において細胞分裂中のアクチンフィラメントの超解像レベルでのダイナミクスを捉えることに成功した。

さらに、本研究から派生した展開研究として、pRSGFP の酸塩基平衡論解析、そして新規蛍光タンパク質を用いた超解像イメージングを行った。pRSGFP の高い蛍光強度特性について、平衡論に基づく pH 依存性のモデル化を行い、数式処理ソフトウェアを用いて正則化最尤法で最適化を行った結果、Kohinoor との比較において脱プロトン化発色団の安定性の違いが示唆された。また、本研究で開発した SPoD 超解像蛍光顕微鏡を改変し、TIRFM タイプの PALM 観察を可能にした。これを用いて新規蛍光タンパク質 rsGamilus の超解像観察を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wazawa, T., Washio, T., Nagai, T.	4. 巻 154
2. 論文標題 Highly-Biocompatible Super-Resolution Imaging: SPoD-OnSPAN	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuromethods	6. 最初と最後の頁 229-244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0532-5_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 和沢鉄一, 鷲尾隆, 永井健治	4. 巻 30
2. 論文標題 回転偏光照明蛍光顕微鏡と光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像イメージング法: SPoD-OnSPAN	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara, S., Chen, W., Washio, T., Wazawa, T., Nagai, T.	4. 巻 101
2. 論文標題 SPoD-Net: Fast recovery of microscopic images using learned ISTA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PMLR	6. 最初と最後の頁 694-709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinoda Hajime, Lu Kai, Nakashima Ryosuke, Wazawa Tetsuichi, Noguchi Kosuke, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 26
2. 論文標題 Acid-Tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging under Acidic Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1469 ~ 1479.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2019.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuichi Wazawa, Yoshiyuki Arai, Yoshinobu Kawahara, Hiroki Takauchi, Takashi Washio, Takeharu Nagai	4. 巻 67
2. 論文標題 Highly biocompatible super-resolution fluorescence imaging using the fast photoswitching fluorescent protein Kohinoor and SPoD-ExPAN with Lp-regularized image reconstruction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 89-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfy004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 和沢鉄一, 新井由之, 永井健治	4. 巻 52
2. 論文標題 SPoD-ExPAN 超解像イメージング	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 77-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, M., Imao, A., Mogami, G., Chishima, R., Watanabe, T., Yamaguchi, T., Morimoto, N., Wazawa, T.	4. 巻 120
2. 論文標題 Strong dependence of hydration state of F-actin on the bound Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ions.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6917-6928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Wazawa, T., Arai, Y., Kawahara, Y., Takauchi, H., Washio, T., Nagai, T.
2. 発表標題 Highly-biocompatible superresolution imaging by SPoD-ExPAN with Lp-regularized image reconstruction
3. 学会等名 日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lu, K., Matsuda, T., Wazawa, T., Fujiwara, S., Nagai, T.
2. 発表標題 Genetically encoded photoswitchable indicators towards super-resolution calcium imaging.
3. 学会等名 日本生物物理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wazawa, T.
2. 発表標題 Biocompatible super-resolution imaging by SPoD-ExPAN and fast photoswitchable fluorescent protein
3. 学会等名 First UK/Japan Super-resolution Bioimaging Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木戸 俊輔, 鷺尾 隆, 和沢 鉄一, 永井 健治
2. 発表標題 Recursive BC を用いた超解像顕微鏡の画像推定手法
3. 学会等名 2018年度人工知能学会全国大会（第32回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和沢鉄一, 新井由之, 河原吉伸, 中野雅裕, 鷺尾隆, 永井健治
2. 発表標題 遺伝子工学的に開発した蛍光プローブによる細胞生理機能超解像イメージング
3. 学会等名 第31回日本人工知能学会全国大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tetsuichi Wazawa, Yoshiyuki Arai, Tomoki Matsuda, Hiroki Takauchi, Yoshinobu Kawahara, Takashi Washio, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Superresolution imaging of live cells by fast photoswitching fluorescent protein and improved SPoD-ExPAN microscopy
3. 学会等名 Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 和沢鉄一, 新井由之
2. 発表標題 新規光スイッチング蛍光タンパク質による超解像イメージング
3. 学会等名 第140回生命機能研究科研究交流会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tetsuichi Wazawa, Yoshiyuki Arai, Tomoki Matsuda, Hiroki Takauchi, Yoshinobu Kawahara, Takashi Washio, and Takeharu Nagai
2. 発表標題 Superresolution imaging of live cells by fast photoswitching fluorescent protein and improved SPoD-ExPAN microscopy
3. 学会等名 The 20th SANKEN International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Wazawa, T., Uto, S., Sugiura, K., Maeda, S., Fujita, K., Washio, T., Nagai, T.
2. 発表標題 Development of a highly-bright positively reversibly photoswitchable fluorescent protein Kohinoor 2.0 for super-resolution microscopy.
3. 学会等名 Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和沢鉄一, 杉浦一徳, 鷺尾 隆, 永井健治
2. 発表標題 回転偏光照明, ポジティブ光スイッチング蛍光タンパク質, そして Lp 正則化画像再構成を用いた超解像イメージング: SPoD-OnSPAN.
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 和沢鉄一, 永井健治	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 235
3. 書名 実験医学増刊: 『生きてるものは全部観る! イメージングの選び方・使い方100+』(42節: 高生体適合性 SPoD-ExPANイメージング)	

1. 著者名 和沢鉄一, 永井健治	4. 発行年 2016年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 242-248, 総308ページ
3. 書名 初めてでもできる! 超解像イメージング: 2.6節 RESOLFT とSPoD の原理と変法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永井 健治  (Nagai Takeharu)		