

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19287

研究課題名(和文)高速原子間力顕微鏡と高度画像解析の融合による近原子分解能AFM画像への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to near atomic resolution AFM image by fusion of high-speed AFM and advanced image analysis

研究代表者

柴田 幹大(Mikihiro, Shibata)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：80631027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体分子のナノ動態を撮影できる高速原子間力顕微鏡(高速AFM)と、単粒子解析法やディープラーニングによる画像解析を融合し、タンパク質部位の揺らぎ・構造変化を定量化できる画像解析システムの構築を目指した。具体的には、高速AFM動画にMotionCor2を適用し、サブナノメートルの精度で約200枚のAFM画像をドリフト補正することに成功し、その積算画像を得た。積算画像では、タンパク質の動きの少ない部位は空間分解能が向上する一方、揺らぎの大きな部位は分解能が下がり、これを利用してタンパク質内のどの部位が、どの程度の揺らぎを持つのかを定量化することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんど全ての生命現象はタンパク質の作用に基づいており、それ故、タンパク質がはたらく仕組みを理解することは、生命科学において非常に重要である。近年の生命科学において、タンパク質の機能発現には、タンパク質部位の“動き”や“揺らぎ”が重要であることが報告され、真にタンパク質の仕組みを理解するには、動きまで含めた動的な構造解析が必須である。本研究は、タンパク質のナノ動態を直接可視化できる高速AFM画像に対し、様々な画像解析を適用するシステムを構築したことにより、高速AFM画像において、これまで見過ごしていたタンパク質の“揺らぎ”に関する情報をより客観的な解析により引き出せるようになった。

研究成果の概要(英文)：High-speed atomic force microscopy (HS-AFM) is a unique technique to capture a nano-dynamics of biomolecules under the near physiological conditions. The purpose of this study is to build the image analysis which is capable to quantify fluctuation and structural changes of proteins by combining with single-particle analysis and deep learning. Specifically, we applied MotionCor2 to HS-AFM movies of proteins. As a result, we succeeded in drift-correcting about 200 AFM images with a sub-nanometer accuracy and obtained the integrated image. In the integrated image, the spatial resolution is improved in the part where the protein has a little fluctuation, while the resolution is decreased in the part where the fluctuation is large. Thus, this new combined method allows us to quantify a fluctuation of proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 バイオイメージング 原子間力顕微鏡 画像解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）は溶液環境にある生体分子の動きをナノメートルスケールの空間分解能と数 100 ミリ秒の時間分解能で動画撮影できる唯一の顕微鏡であり、今後のライフサイエンスの中心となる“動的構造生命科学”を牽引する技術である。ところが、原子レベルの空間分解能をもつ結晶構造解析や、クライオ電子顕微鏡法と比べると、空間分解能が一桁低く、構造解析手法としては不十分である。また、高速 AFM 画像は、観察視野にあるもの全てが画像化されるため、得られた画像は情報が多すぎて、本来捉えているはずの微細な構造変化に気がつかない可能性がある。これまでに、蛍光画像に対する様々な画像解析法を高速 AFM 画像にも適用したが、蛍光画像と比べて複雑な AFM 画像では、そのほとんどが実用的ではなく、人間の目で解析すると検出できるが、ソフトを用いて解析すると、その差が検出できないという事が多々あった。これでは、高速 AFM で得られた情報のほとんどを見逃すことになり、その有用性を発揮できない。そんな中、近年、人工知能、機械学習の分野で大きな成果を上げているディープラーニングは、まさに高速 AFM 画像を解析するのに最適な方法であると考えた。また、近年のクライオ電子顕微鏡法によるタンパク質の近原子分解能解析は、①高精度な検出器の登場による動画撮影の実現②数千枚の電顕画像を処理する単粒子解析法の開発といった2つの技術の融合により達成された。高速 AFM 画像の空間分解能向上に当てはめた場合、動画撮影が可能となった高速 AFM に単粒子解析法を適用すればクライオ電子顕微鏡法と同様の成果が得られる可能性がある。高速 AFM 観察は非結晶中・液中環境・室温にあるタンパク質 1 分子を観察できるので、クライオ電子顕微鏡法により得られる構造とは異なり、より生体内に近い構造情報を与えることが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体分子のダイナミクスを約 1 ナノメートルの空間分解能で動画撮影できる高速 AFM と、単粒子解析法やディープラーニング（深層学習）による画像解析といった計算科学を融合することにより、高速 AFM 画像の空間分解能をオングストロームまで向上させ、タンパク質部位の揺らぎ・構造変化を定量化する高度画像解析システムの構築に挑む。高速 AFM は、応募者が所属する研究グループが世界にさきがけて研究開発をした顕微鏡技術であり、溶液中・非結晶中・室温にあるタンパク質のダイナミクスを動画撮影できる。しかしながら、近年の生命科学では、低分子がタンパク質のどのアミノ酸側鎖に、どのように結合するのかまで明らかにする必要があり、構造解析手法としては、アミノ酸側鎖まで分解できる～0.3 ナノメートル以下の空間分解能が求められている。同時に、タンパク質の静的な構造情報だけでなく、機能発現に関わる“揺らぎ・動き”といった動的な構造情報も求められている。高速 AFM は、タンパク質の動的な構造情報を与えるので、生命科学のニーズに応えられる可能性を秘めるが、現状では、空間分解能の不足、“揺らぎ・動き”を検出しても、現象を観察しただけの定性的な解析しかできないといった理由から、生命科学を大きく発展させるには不十分である。しかしながら、高速 AFM のハード面での改良は、ほぼ限界であり装置開発といった従来のアプローチではさらなる飛躍は望めない。そこで本研究では、計算科学と融合することにより、高速 AFM の性能を飛躍的にアップさせ、真に生命科学の発展に貢献できる構造解析手法の創成に挑む。

### 3. 研究の方法

具体的には、GPU を搭載したサーバーに単粒子解析ソフト Relion3.0 をインストールし、低温電子顕微鏡画像の画像解析で成果を上げた Relion3.0 に実装された様々な解析ソフトを高速 AFM 画像へ適用する。高速 AFM 画像には、カルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) の実験データを用い、以下の示す2つの事柄を達成する。

(1) 高速 AFM 画像の空間分解能の向上：単粒子解析法を高速 AFM 画像に適用し、動画撮影した数千枚の AFM 画像をアライメントし、加算平均することで～0.3 ナノメートルの空間分解能を達成する。

(2) 高速 AFM 画像の高度画像処理：ディープラーニングを用いた画像認識を用いて、今まで定性的にしか議論できなかったタンパク質部位の“揺らぎ・構造変化”を、画像類似度を指標に定量化する。最初に基板に固定したタンパク質の高速 AFM 画像を数百分子×数千フレーム程度取得し、機械学習させる。次に、結晶構造を入力とし、AFM 画像とマッチングすることで、得られた AFM 画像がタンパク質のどの部位に相当するのかを画像類似度によりアサインする。さらに、基板への吸着が弱い場合や、外部刺激を加えた場合等、様々な条件で高速 AFM 観察を行い、得られた AFM 画像を入力し、画像類似度からタンパク質部位の“揺らぎ・構造変化”を機械的に抽出する。

### 4. 研究成果

#### (1) 高速 AFM 画像の空間分解能の向上

初年度は、本研究で用いる高精度な GPU (NVIDIA, GeForce GTX1080Ti) を 3 台搭載したサーバー (リアルコンピューティング, RC GPU Server nami4) を導入し、Relion3.0 をインストールした。その後、CaMKII の高速 AFM 画像を Relion3.0 に取り込み、MotionCor2 を用いて画像解析を行った。MotionCor2 [S. Zheng et al, Nat. Methods, 2016] とは、Relion3.0 に実装されたソフトウェアであり、動画中の全フレームをサブピクセルレベルで正確に補正するアライメントアルゴリ

ズムである。CaMKII の高速 AFM 動画には、多量体の中心に動きが少ないハブドメインと、その周りに揺らぎの大きなキナーゼドメインが観察される。この動画に対して、MotionCor2 を用い、サブナノメートルの精度で約 200 枚の画像をドリフト補正し積算画像を取得した(図 1, 2)。

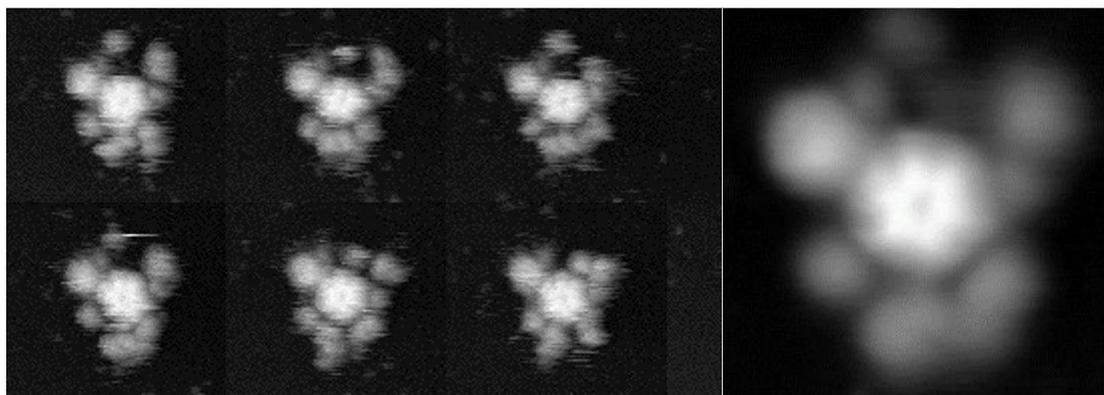


図 1, 10 mM KCl 環境下での CaMKII の高速 AFM 連続画像 (左) と、積算画像 (右)。

比較のため、高速 AFM 観察バッファ中の KCl 濃度を 10, 30, 50, 100, 150 mM で観察した。一般に、高速 AFM 観察バッファ中の KCl 濃度が低いと、基板への吸着が強くなり、タンパク質の動きが制限される。図 1 に、10 mM KCl の観察条件での CaMKII の高速 AFM の連続画像と 200 枚の積算画像を示す。各フレームにおける AFM 画像を見比べると、中心のハブドメインやその周りのキナーゼドメインの位置は変わらず、大きな揺らぎは観察されない。その結果、積算画像を見ると (右図)、ハブドメインやキナーゼドメインの輪郭が明確となった。ハブドメインの中心孔の大きさを測定すると 0.5 nm 程度であったため、画像の積算により、空間分解能は約 0.5 nm に向上したと結論付けた。

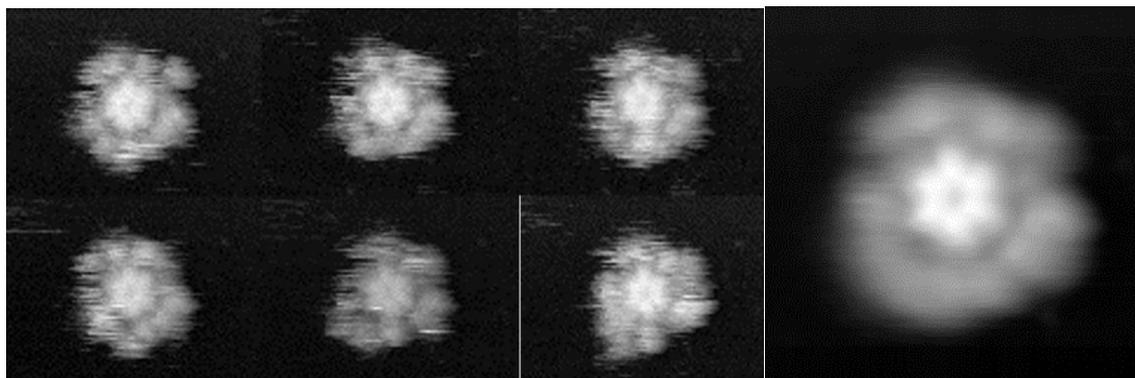


図 2, 100 mM KCl 環境下での CaMKII の高速 AFM 連続画像 (左) と、積算画像 (右)。

次に、100 mM KCl の観察条件での CaMKII の高速 AFM 連続画像と、200 枚の積算画像を図 2 に示す。この場合、10 mM KCl の実験結果と同様に、中心のハブドメインはその輪郭が明確になり、空間分解能の向上が認められる一方、キナーゼドメインの輪郭はぼやけ、個々のキナーゼドメインが区別できない画像となった。これは、100 mM KCl の観察条件では基板への吸着が弱く、キナーゼドメインの揺らぎが大きいため、積算画像ではキナーゼドメインの輪郭がぼやけたと考えられる。これは、タンパク質内の揺らぎの小さい部位と、大きい部位を積算画像により明確に区別できることを意味し、また、タンパク質の揺らぎの小さい部位はさらに空間分解能が上がる一方で、揺らぎの大きな部位は、分解能が下がることを示す。このように、CaMKII はタンパク質内部において、中心のハブドメインは固い構造をとり、その周りのキナーゼドメインは揺らぎの大きな構造を持つことが積算画像により明らかとなった。また、これを利用して、タンパク質内のどの部位が、どの程度の揺らぎを持つのかを定量化した。

## (2) 高速 AFM 画像の高度画像処理

ディープラーニングソフトウェアを用いて、ハブドメインのセグメンテーションと中心座標の取得、及び、各キナーゼドメインの座標を取得し、ハブドメイン集合体の中心との距離を測定することで、多量体内の各キナーゼドメインの運動や連動性を見出した (図3)。本研究では、Trainable Weka Segmentation [I. Arganda-Carreras *et al*, *Bioinformatics*, 2017] を用いた。Trainable Weka Segmentationとは、機械学習アルゴリズムのコレクションと選択された一連の画像機能を

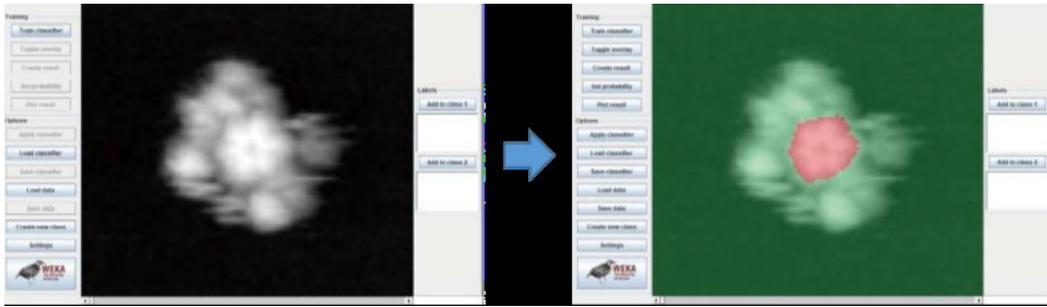


図 3, Trainable Weka Segmentation を CaMKII の高速 AFM 画像に適用したときの図

組み合わせて、ピクセルベースのセグメンテーションを行う ImageJ プラグインである。最初に、ハブドメイン集合体とその周りのキナーゼドメインを区別するため、手動でハブドメイン集合体を指定する。この時、ハブドメイン集合体の大きさや高さ、キナーゼドメインとの境界を機械学習により覚えさせる。次に、ここで学習したハブドメイン集合体の情報を全てのフレームにおいて適用し、約 200 フレームにおけるハブドメイン集合体のセグメンテーションを行った。さらに、ここで学習させたハブドメイン集合体の情報は、そのまま別の高速 AFM 動画にも適用でき、他の観察条件で得た高速 AFM 動画においても、瞬時にハブドメイン集合体とキナーゼドメインのセグメンテーションが可能となった。その後ハブドメイン集合体の中心座標を取得した。

次に、キナーゼドメインの中心座標の取得を試みたが、Trainable weka segmentation を用いても、なお、個々のキナーゼドメインを区別することは難しかった。これは、キナーゼドメインの揺らぎが大きく、あるフレームでは繋がって見え、正確な境界を見出すことができないためであった。本研究の目的は、ディープラーニングを用いて、このような複雑な高速 AFM 画像においても完全に自動で解析することであったが、それに関しては、さらなる条件検討が必要であることが分かった。本研究課題は終了するが、引き続きディープラーニングソフトウェアの検討や、様々な学習条件を試す予定である。結局は、高速 AFM 画像から抽出すべき情報は、AFM 画像上の対象物の位置情報であるので、その位置情報を機械的に取得できる手法を引き続き模索する。

各キナーゼドメインの中心座標は、別の ImageJ プラグインである MtrackJ を用いた。MtrackJ は、手動で対象物の最大輝度の位置情報を取得することができる (図 4)。図 4 に MtrackJ を用いて取得した各キナーゼドメインの中心座標を示す。将来的には、このような画像解析を全て自動で取得可能な画像解析法を確立する。

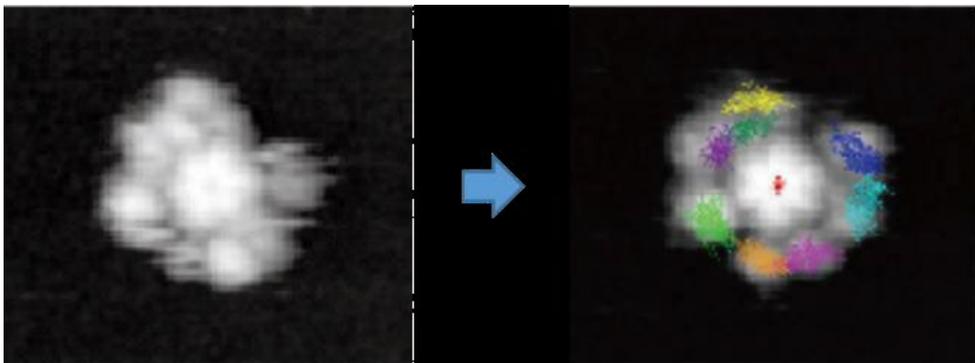


図 4, Mtrack J による CaMKII のキナーゼドメインの中心座標

### (3) まとめ

本研究では、高速 AFM 画像に対して 2 種類の画像解析方法を適用した。単粒子解析法では、タンパク質内部の揺らぎが小さい部分はさらに空間分解能が上がるのが分かり、一方で、揺らぎの大きい部位は空間分解能が下がることが分かった。これを利用して、タンパク質部位の揺らぎを明確に画像化できるシステムを構築した。次に、ディープラーニングによる高速 AFM 画像の高度画像解析においては、高速 AFM 画像のセグメンテーションや中心座標の取得は、揺らぎの小さい部位に関しては、正確に取得することができたが、揺らぎの大きい部位においては、セグメンテーションが難しく、完全に自動でその中心座標を取得することが困難であった。今後も引き続き様々な画像解析手法を適用し、複雑な高速 AFM 画像に対しても機械的に中心座標を取得できる解析手法を確立する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mikihiro Shibata, Keiichi Inoue, Kento Ikeda, Masae Konno, Manish Singh, Chihiro Kataoka, Rei Abe-Yoshizumi, Hideki Kandori, and Takayuki Uchihashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Oligomeric states of microbial rhodopsins determined by high-speed atomic force microscopy and circular dichroic spectroscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8262 (1-11)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26606-y	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 Tomomi Shionoya, Misao Mizuno, Takashi Tsukamoto, Kento Ikeda, Hayato Seki, Keiichi Kojima, Mikihiro Shibata, Izuru Kawamura, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 122
2. 論文標題 High thermal stability of oligomeric assemblies of Thermophilic rhodopsin in a lipid environment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 6945-6953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b04894	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 Katsuya Sakai, Toby Passioura, Hiroki Sato, Kenichiro Ito, Hiroki Furuhashi, Masataka Umitsu, Junichi Takagi, Yukinari Kato, Hidefumi Mukai, Shota Warashina, Maki Zouda, Yasuyoshi Watanabe, Seiji Yano, Mikihiro Shibata, Hiroaki Suga, and Kunio Matsumoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 598-606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0285-7	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 W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, S. Okazaki, T. Izume, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. P. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Beja, T. Uchihashi, H. Kandori and O. Nureki	4. 巻 574
2. 論文標題 Crystal structure of Heliorhodopsin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 132-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1604-6	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による生体分子のナノスケールイメージング
3. 学会等名 2018日本表面真空学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による揺らいだタンパク質構造のナノスケール撮影
3. 学会等名 非共有結合系の分子科学：計測技術から探る生体分子科学の新展開（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 計測系から見た分子集合体の機能計測-高速AFM計測
3. 学会等名 日本化学会第99秋季年会 複雑系のための分子科学 集まって立ち現れる分子機能の理解と設計（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata and Hideji Murakoshi
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy shows conformational dynamics of Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II
3. 学会等名 BPS19 63th Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Nano-scale imaging of biological samples using High-speed Atomic Force Microscopy.
3. 学会等名 LIIF2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるクロマチン動態のナノスケール観察
3. 学会等名 第2回クロマチン潜在能領域会議 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Visualizing flexibility in protein structures by high-speed atomic force microscopy.
3. 学会等名 57th日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy visualization of protein flexibility in action.
3. 学会等名 Joint UBI-NanoLSI workshop TRENDS IN MOLECULAR BIOPHYSICS OF LIVING CELLS (招待講演)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mikihiro Shibata and Hideji Murakoshi
2 . 発表標題 Signal integration mechanism of Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II revealed by High-speed AFM.
3 . 学会等名 BPS2020 64th Annual Meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tetsuya Ueta, Keiichi Kojima, Tomoya Hino, Mikihiro Shibata, Shingo Nagano & Yuki Sudo
2 . 発表標題 Physicochemical properties of the microbial rhodopsin RxR in the membrane-mimicking molecule styrene maleic acid (SMA) copolymer.
3 . 学会等名 第11回日本生物物理学会 中国四国支部大会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, S. Okazaki, T. Izume, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. P.Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Beja, T. Uchihashi, H. Kandori and O. Nureki
2 . 発表標題 Structure and biophysical characterization of the heliorhodopsin.
3 . 学会等名 57th日本生物物理学会年会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shotaro Tsujioka, Hideji Murakoshi, and Mikihiro Shibata
2 . 発表標題 Application of drift elimination method for high-speed AFM images.
3 . 学会等名 57th日本生物物理学会年会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Kitazawa, Linhao Sun, Ayako Housaka, Takahiro Watanabe-Nakayama, Hiroki Konno, Mikihiro Shibata, and Shinji Watanabe
2. 発表標題 Mapping of mechanical property on live cell surface by scanning ion conductance microscope.
3. 学会等名 57th日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----