

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03202

研究課題名（和文）生細胞内で1nmの距離測定精度を実現する超解像蛍光イメージング

研究課題名（英文）Super-resolution imaging with distance measurement at 1 nm accuracy in live cells

研究代表者

松田 厚志（Matsuda, Atsushi）

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所神戸フロンティア研究センター・主任研究員

研究者番号：20585723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：超解像顕微鏡や低温電子顕微鏡の発展により、生体内の微細なオルガネラや、高度な機能を持つタンパク質複合体の詳細な構造が明らかになりつつある。しかし、生きた細胞内で高い精度の分解能を得るためにはまだ多くの技術開発を必要とする。本研究を進める中で、これらの技術を達成するためには、根本的な光学的問題である光学収差を補正する必要があることが明確となった。本研究では、この光学収差を画像取得後に補正できる革新的な手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の計算補償光学は光学的な補償光学と比較してはるかに簡便であり、実用化できれば、様々な高精度の計測が可能になると考えられる。生体深部観察の分解能を飛躍的に向上できるほか、超解像顕微鏡の発展にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Advances in super-resolution and cryo-electron microscopy revealed the detailed structures of minute organelles and highly functional protein complexes in living organisms. However, a great deal of technical development is still needed to achieve high resolution in living cells. In the course of this research, it became clear that in order to achieve these techniques, it is necessary to correct optical aberrations, which are a fundamental optical problem. In this research, we developed an innovative method that can correct optical aberrations after image acquisition.

研究分野：生物物理学

キーワード：顕微鏡 超解像顕微鏡 補償光学 二光子顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超解像顕微鏡や低温電子顕微鏡の発展により、生体内の微細なオルガネラや、高度な機能を持つタンパク質複合体の詳細な構造が明らかになりつつある。しかし、生きた細胞内で高精度の分解能を得るためにはまだ多くの技術開発を必要とする。

### 2. 研究の目的

本研究の開始当初の研究目的は、励起光の照射による生体の毒性を最低限に抑えながら、分子スケールの分解能を達成する新しい蛍光イメージング技術を開発することであった。しかし、研究を進めていく中で、これらの技術を達成するためには、根本的な光学的問題である光学収差を補正する必要があることが明確となり、さらに、本研究を進めた結果、この光学収差を補正できる革新的な手法を開発できる手がかりが得られた。そこで、研究の後半では、本研究において発見した計算機上で光学収差を補正できる新しい「計算補償光学」を拡充させ、距離計測や超解像顕微鏡に適用することによりこれらの顕微鏡技術の精度を向上させることを新しい目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

本研究で用いる方法は、3点の距離を計測することにより、極めて高い精度で距離測定を行う新しい方法である。緑と赤の二色の蛍光で標識した2点の輝点の距離測定の精度は、輝点の明るさと色収差などの色ズレの補正精度により制約され、通常の顕微鏡では約 30nm 程度が限界であるが、もう一点を追加することで、1nm 以下の精度の距離計測を可能とする。この方法を核膜孔複合体 (NPC) のタンパク質の正確な位置の決定に応用する。光学収差補正は、取得済みの3次元画像から光学収差を直接測定し、補正する。具体的には、画像を3次元フーリエ変換し、位相制御を行うことにより補正を行う。

### 4. 研究成果

距離計測に関して、3点計測法を用いて生きた細胞の NPC の複数のタンパク質の距離を計測した。この研究の中では高い精度が得られなかったが、30nm 程度の精度が得られたため結果を発表した (Asakawa et al., 2019)。

また、距離計測に必須となる色収差補正技術に関して、公開しているソフトウェアの補正精度をさらに向上し、その結果をまとめて使用方法と合わせて公開した (Matsuda et al., 2020)。

上記の研究において、距離計測精度をさらに向上するために実データとシミュレーションデータを比較検討した結果、1nm の精度を恒常的に得るためには高精度の光学収差補正を組み込む必要があることが明らかになった。光学収差により引き起こされる光軸方向の倍率の非線形な変化により、見かけの距離が変化するためである。本研究は、異なる色の点の距離を計測することを目的としているが、多色観察時では色収差が存在するため、色ごとに異なる光学収差が生じることは避けられない。通常、これを解決する手法は、光学的に光学収差を補正する補償光学しかないが、この方法を用いるためには現状では多大な労力を必要とする。

一方、超解像顕微鏡の構築を目的として研究を行ったところ、観察光学系に位相板を挿入して通常より小さなスポットを作成することに成功した。しかし、このように得られた3次元画像を3次元フーリエ変換して解析したところ、通常の方法で得られた画像の振幅と比較してほぼ変化がなく、変化があったのは位相に限定的であることが明らかになった。さらに、通常の方法で得られた画像の3次元位相を変化させるだけで、位相板を挿入した結果とほぼ同じ結果を再現できることを発見した。

この発見をさらに推し進めると、通常は光学的に生じる光学収差を、画像取得後に導入できることが明らかになった。また逆に、画像に含まれる光学収差を打ち消す位相を用いて、光学収差を消失できることが明らかになった。以上の発見を基礎に、光学収差を補正する補償光学を計算機上で行う新しい方法 (計算補償光学) を開発した。(特願 2020-120496)。さらに、計算の簡略化を行った結果、10 倍程度の高速化に成功し、その結果を追加して国際出願を行った (PCT/JP2021/026265)。

さらに、計算補償光学を超解像顕微鏡 3D-SIM や二光子顕微鏡へ適用するための研究を行なった。新しい 3D-SIM の再構築プログラムを作成し、計算補償光学を使用したところ、アーティファクトが減少し、光学収差により低下していた分解能を回復させることに成功した。二光子顕微鏡画像に関しても、効果的に計算補償光学を行う方法を開発した。また、この過程で二光子顕微鏡画像を一光子顕微鏡画像に変換する方法を開発し、この方法を応用することにより、二光子顕微鏡画像の SN 比を効果的に向上できるデノイジングやデコンボリューション方法を開発した (特願 2022-132546)。

本研究の計算補償光学は光学的な補償光学と比較してはるかに簡便であり、実用化できれば、当初の目的である 1nm の精度の距離計測の基盤となるほか、様々な高精度の計測が可能になると考えられる。超解像顕微鏡の発展にも貢献すると考えられる。

上記の研究と並行し、光学収差補正を行うための新しい波面センサーの開発も行った(Ashida et al., 2020)。また、顕微鏡画像から直接収差を計測できるホログラフィック顕微鏡を用いて位相計測に成功した(Tahara et al., 2020, Tahara et al., 2021, Rosen et al., 2021, Tahara et al., 2022)。また、超解像顕微鏡を用いて微細な生体構造を明らかにして発表した(Ogi et al., 2019, Murawska et al., 2020, Low et al., 2021, Ding et al., 2021, Rajesh et al., 2021)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Tahara Tatsuki, Zhang Yaping, Rosen Joseph, Anand Vijayakumar, Cao Liangcai, Wu Jiachen, Koujin Takako, Matsuda Atsushi, Ishii Ayumi, Kozawa Yuichi, Okamoto Ryo, Oi Ryutaro, Nobukawa Teruyoshi, Choi Kihong, Imbe Masatoshi, Poon Ting-Chung	4. 巻 128
2. 論文標題 Roadmap of incoherent digital holography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Physics B	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00340-022-07911-x	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 該当する
1. 著者名 Tahara Tatsuki, Kozawa Yuichi, Matsuda Atsushi, Oi Ryutaro	4. 巻 4
2. 論文標題 Quantitative phase imaging with single-path phase-shifting digital holography using a light-emitting diode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OSA Continuum	6. 最初と最後の頁 2918 ~ 2918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OSAC.435949	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 Rosen Joseph, Alford Simon, Anand Vijayakumar, Art Jonathan, Bouchal Petr, Bouchal Zdenek, Erdenebat Munkh-Uchral, Huang Lingling, Ishii Ayumi, Juodkazis Saulius, Kim Nam, Kner Peter, Koujin Takako, Kozawa Yuichi, Liang Dong, Liu Jun, Mann Christopher, Marar Abhijit, Matsuda Atsushi, 他七名	4. 巻 7
2. 論文標題 Roadmap on Recent Progress in FINCH Technology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Imaging	6. 最初と最後の頁 197 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jimaging7100197	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 該当する
1. 著者名 Yadav Rajesh K., Matsuda Atsushi, Lowe Brandon R., Hiraoka Yasushi, Partridge Janet F.	4. 巻 9
2. 論文標題 Subtelomeric Chromatin in the Fission Yeast <i>S. pombe</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1977 ~ 1977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9091977	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 該当する

1. 著者名 Ding Da-Qiao, Matsuda Atsushi, Okamasa Kasumi, Hiraoka Yasushi	4. 巻 2021
2. 論文標題 Linear elements are stable structures along the chromosome axis in fission yeast meiosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chromosoma	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00412-021-00757-w	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 Lowe Brandon R, Yadav Rajesh K, Henry Ryan A, Schreiner Patrick, Matsuda Atsushi, Fernandez Alfonso G, Finkelstein David, Campbell Margaret, Kallappagoudar Satish, Jablonowski Carolyn M, Andrews Andrew J, Hiraoka Yasushi, Partridge Janet F	4. 巻 10
2. 論文標題 Surprising phenotypic diversity of cancer-associated mutations of Gly 34 in the histone H3 tail	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.65369	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 該当する

1. 著者名 Tahara Tatsuki, Koujin Takako, Matsuda Atsushi, Ishii Ayumi, Ito Tomoyoshi, Ichihashi Yasuyuki, Oi Ryutaro	4. 巻 60
2. 論文標題 Incoherent color digital holography with computational coherent superposition for fluorescence imaging [Invited]	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Optics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/AO.406068	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 Ashida Yusuke, Honma Yusuke, Miura Noriaki, Shibuya Takatoshi, Kikuchi Hayao, Tamada Yosuke, Kamei Yasuhiro, Matsuda Atsushi, Hattori Masayuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Imaging performance of microscopy adaptive-optics system using scene-based wavefront sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.25.12.123707	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 Matsuda Atsushi, Koujin Takako, Schermelleh Lothar, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 160
2. 論文標題 High-Accuracy Correction of 3D Chromatic Shifts in the Age of Super-Resolution Biological Imaging Using <em>Chromagnon</em>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/60800	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 該当する

1. 著者名 Murawska Magdalena, Schauer Tamas, Matsuda Atsushi, Wilson Marcus D., Pysik Thomas, Wojcik Felix, Muir Tom W., Hiraoka Yasushi, Straub Tobias, Ladurner Andreas G.	4. 巻 77
2. 論文標題 The Chaperone FACT and Histone H2B Ubiquitination Maintain S. pombe Genome Architecture through Genic and Subtelomeric Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.11.016	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 該当する

1. 著者名 Ogi Sakiko, Matsuda Atsushi, Otsuka Yuna, Liu Ziguang, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 146
2. 論文標題 Syndapin constricts microvillar necks to form a united rhabdomere in Drosophila photoreceptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.169292	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 Asakawa Haruhiko, Kojidani Tomoko, Yang Hui-Ju, Ohtsuki Chizuru, Osakada Hiroko, Matsuda Atsushi, Iwamoto Masaaki, Chikashige Yuji, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Asymmetrical localization of Nup107-160 subcomplex components within the nuclear pore complex in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008061	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 松田厚志
2. 発表標題 生体深部の光の揺らぎを補正する計算補償光学を用いた超解像イメージング
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会2021、シンポジウム「3時現場を伝搬する光の散乱・揺らぎ計算イメージング」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本孝治、福田紀子、岩本政明、松田厚志
2. 発表標題 細胞の前端部に局在する繊毛虫テトラヒメナのタンパク質
3. 学会等名 分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田厚志
2. 発表標題 Post-processing, computational adaptive optics for 3D super-resolution microscopy
3. 学会等名 生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本孝治、福田紀子、近重 裕次、岩本政明、松田厚志
2. 発表標題 細胞の前端部に局在する繊毛虫テトラヒメナのヌクレオポリンMicNup98A
3. 学会等名 原生生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto T, Fukuta N, Iwamoto M, Matsuda A
2. 発表標題 Basal bodies in the anterior region of the Tetrahymena cell are binding sites for nucleoporin MicNup98A
3. 学会等名 Ciliate Molecular Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田厚志
2. 発表標題 3次元超解像顕微鏡における注意点と光学収差の高精度補正
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第76回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsuda A
2. 発表標題 POST-PROCESSING, COMPUTATIONAL ADAPTIVE OPTICS FOR 3D SUPER-RESOLUTION MICROSCOPY
3. 学会等名 Focus on Microscopy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikuchi H, Honma Y, Miura N, Shibuya Y, Tamada Y, Matsuda A, Hattori M
2. 発表標題 Differential sensing technique for correlation-based adaptive optics
3. 学会等名 Adaptive Optics and Wavefront Control for Biological Systems VI (国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 近重 裕次、松田 厚志、荒神 尚子、福田 紀子、佐伯 恵里、岡正 華澄、丁 大橋、森 知栄、原口 徳子、平岡 泰
2. 発表標題 分裂酵母染色体核内配置マップの作成
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asakawa H, Kojidani T, Yang H-J, Ohtsuki C, Osakada Y, Matsuda A, Iwamoto M, Chikashige Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T
2. 発表標題 Asymmetrical localization of Nup107-160 subcomplex components within the nuclear pore complex in fission yeast
3. 学会等名 EMBO The International Fission Yeast Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 光学収差補正プログラム及び光学波面推定プログラム	発明者 松田厚志	権利者 情報通信研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-120496	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 顕微鏡画像補正方法及び顕微鏡画像補正プログラム	発明者 松田厚志・根本知己・大友康平・高橋泰伽	権利者 情報通信研究機構・自然科学研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-132546	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 光学収差補正プログラム及び光学波面推定プログラム	発明者 松田厚志	権利者 情報通信研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/026265	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

生物情報プロジェクト  
<https://www2.nict.go.jp/bio/seibutsu/CellMagic/ResearchMap>  
<https://researchmap.jp/macronucleus>

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
研究分担者	浜崎 淳一  (Hamazaki Jun-ichi)  (80399980)	国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所小金井フロンティア研究センター・主任研究員    (82636)	削除：2022年2月9日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	St. Jude Children's Research Hospital		
ドイツ	Ludwig-Maximilians-University of Munich		
英国	University of Oxford		