

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19343

研究課題名(和文)細胞丸ごと高速超解像イメージング

研究課題名(英文) imaging of whole cell by super resolution method

研究代表者

樋口 秀男(Hideo, Higuchi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：90165093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：通常の顕微鏡で撮影した画像に対して超解像度を得る方法の開発を行った。骨格筋ミオシンフィラメントに顕微鏡の分解能以内に位置するミオシン2～3分子に金ナノ粒子(40nm)を結合し、高速カメラで金ナノ粒子をイメージングを行った。分解能以内にある複数の金粒子の位置を解析するために、Multi-Emitters Localization法を用いて、各ミオシン分子の変位に分離することに成功し、アクチンと相互作用時の各分子の動態を0.1msの高時間分解能で計測することができた。各分子はアクチンとの相互作用時において、10nm程度変位することが明らかとなった。また分子間の動きが同調している様子も観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の光の分解能を超える超解像顕微鏡が何種類も販売されている。しかし、従来の超解像法の共通した問題点は、画像取得速度が遅いことである。本研究では、この問題点を克服するために高速で超解像を得る顕微鏡の解析法を開発した。この方法によって通常の顕微鏡で細胞の画像を撮影した後に、超解像イメージング画像に変化できる。したがって、通常の顕微鏡の時間分解能で超解像を得ることができる。生物分野全般だけでなく、顕微鏡(や望遠鏡)を使う多くの分野が本研究課題の成果を利用することができるため、応用分野も広がっていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：Super resolution images were obtained by the new analyzing system for the normal image of optical microscope. A few myosin molecules in myofilaments were labeled with nano-gold, 40 nanometers in a diameter, by avidin-biotin system. The scattering image of nanogolds were captured by a ultrafast camera with 10,000 frames per second. The nanogolds within optical resolution of optical microscope was analyzed by the Multi-Emitters Localization method developed by Ashida and Ueda (2015). The separated nanogolds attached to myosin heads were obtained as super resolution images. Then positions of the separated nanogolds attaching myosin head that interacted with actin filaments were analyzed to understand movement of myosin. The heads sometimes moved by ~10 nm and cooperatively. These indicate that myosin head bounds with optical resolution moved cooperatively with actin sliding.

研究分野：生物物理学

キーワード：超解像度 金コロイド ナノメートル精度 ミオシン 細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、従来の光の分解能(レーリーの分解能)を超える超解像顕微鏡が何種類も現れ、生きた細胞や分子を超高解像で観察が可能となった。この成果が、2014年のノーベル化学賞の対象となったことは記憶に新しい。これまでに開発された超解像顕微鏡を大別すると3つに分けることができ、観察分子近辺の蛍光分子の蛍光を抑制する誘導放出制御法(STED)、蛍光1分子ずつ観察することで位置精度をあげる蛍光分子局在化法(STORMなど)、縞模様の光を照射して得られたモアレパターンを利用した構造化照明法(SIM)である。これら顕微鏡の欠点は、時間分解能が低く1枚の像を0.1~60秒かけて撮影する点と、したがって、画像を得るのに時間を要するため蛍光退色が起こり多くの画像を取得できないことであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これらの問題を克服した、分解能は光学限界の2倍より十分に良く、最高画像速度がこれまでの10倍(1000 frames/s)を超える顕微鏡および超解像解析システムを開発することである。この顕微鏡・超解像解析システムを用いて、分子や細胞丸の蛍光分子の超解像画像を得る。この方法の利点は、取得された画像を解析するので、すでに得られた画像を解析すれば、超解像画像が得られる点である。

3. 研究の方法

蛍光分子から発せられた光は顕微鏡を通じて、カメラ受光面に結像され、結像された像の強度分布は、PSF (point spread function) と呼ばれる関数で表される。いま、原点に位置する蛍光分子とその近くの x の距離に位置する場合の強度分布は、 $PSD(0) + PSD(x)$ で表される。二分子間の距離 x がレーリー分解能以内で、強度分布のピークが1つになったときの強度分布の形は、1分子のPSDに比べて、太くなる。ベイズ推定を導入して、どこに蛍光が位置すれば、観察された蛍光強度分布が得られるかを推定したのが、Multi-Emitters Localization 法の論文の骨子である(蘆田・上田 *Phys. Rev. Lett.* 2015)。いま、 $P(r)$ を r の位置に光子が検出される確率とし、 $P(r|R)$ を蛍光が R に位置するときに光子が r の位置に検出される確率とする。 $P(r|R)$ は、まさにPSFと同じ形を持つので、論文ではPSDをガウス関数で近似している。いま、実験で蛍光が r_1, r_2, \dots の位置で検出されたとき、2つの蛍光が R_1 と R_2 に位置している確率はベイズ推定理論を用いて、 $P(R_1, R_2 | r_1, r_2, r_3, \dots, r_n) = P(r_1 | R_1, R_2) P(r_2 | R_1, R_2) \cdots P(r_n | R_1, R_2) / P(r_1, r_2, r_3, \dots, r_n)$ で表すことができる。左辺の確率が最大となる R_1 と R_2 が蛍光の位置である。

この方法では、通常の顕微鏡で撮影した像を解析することができるので、撮影速度を1000frames/s以上にあげることが可能である。

4. 研究成果

我々はこの方法が生物材料に応用できる事を茅・張らとの実験で示した。DNA おりがみの両端に(計算上の両端間距離 200nm) 蛍光量子ドット(直径 20nm) を結合し 100frames/s で画像を取得した。量子ドット間の距離を Multi-Emitters Localization 法にて計算したところ 202nm となり、予想された距離にほぼ一致した。一方蛍光輝点強度分布から計算される顕微鏡のレーリーの分解能は、360nm であった(蛍光波長 655nm)。さらに高速性と分解能性能を確認するために、距離 128nm の間隔でビオチンタグが挿入された DNA オリガ

ミ上に、アビジン化金ナノ粒子（直径 40nm）を標識し、複数の粒子が結合した DNA オリガミにおいて金ナノ粒子の散乱像を高速カメラで撮影した（10000 フレーム/秒）。この散乱像において超解像イメージング法を用いて粒子の数および位置を推定した。これらの結果から 2 粒子間の距離を計算したとる、平均 123nm となり理論値 128nm に近い値となった。以上の結果から 蘆田らの手法は、光学顕微鏡の分解能の 1/3 であっても利用でき、回折限界内に位置する複数分子の動態を可視化する高速超解像イメージング法可能となった。

骨格筋ミオシンフィラメント（両極性構造なので、半分の長さ 300~400nm）とアクチン線維が相互作用するさい、回折限界以内にあるミオシン複数分子間の共同的な運動が観察されるか否かを実験で確認した。金ナノ粒子（直径 40nm）にアビジンを結合し、一方ミオシン分子のライトチェーンにはピオチンを結合した（茅・張との共同実験）。そして骨格筋ミオシンフィラメントに顕微鏡の分解能以内に位置するミオシン 2 ~ 3 分子に金ナノ粒子を結合し、高速カメラ（10000 frames/s）で、金ナノ粒子を高速でイメージングを行った。分解能以内にある複数の金粒子の位置を Multi-Emitters Localization 法を用いて、各ミオシン分子（粒子）の変位に分離することに成功し、アクチンと相互作用時の各分子の動態を 0.1ms の高時間分解能で計測することができた。各分子はアクチンとの相互作用時において大きく変位することが明らかとなった。また分子間の動きが同調している様子も観察された。

細胞内の蛍光微小管の超解像イメージングを Multi-Emitters Localization 法で行うと、いまのところ解析時間が非常にかかることが分かった。そこで、Image-J に 2017 年に Plug-In された強度ベクトルの向きから蛍光の位置を決定する超解像法を用いて、細胞内の微小管の超解像イメージングの予備的実験を行った。ヒト乳がん細胞 KPL4 に tubulin-GFP を発現した細胞を用いて、微小管の蛍光画像を 1 frame/s（横川スピンドディスクユニットを用いれば、撮影速度を 1000frames/s に挙げることは可能）の速度で、60 枚撮影ごとに、強度ベクトル法を用いて、超解像の解析を行った。その結果、共焦点顕微鏡では、分離不可能な複数本の微小管であっても、分離することができ、分解能がおおよそ 2 倍に改良された。この方法を用いて、微小管上を移動する小胞を検出することができた。微小管上を運動する小胞は、時折別の微小管に乗り換えることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi. | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Numerical method for vesicle movement analysis in a complex cytoskeleton network. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Opt. Express | 6. 最初と最後の頁 16236-16239 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OE.26.016236 | 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 Yoshimi Kinoshita, Taketoshi Kambara, Kaori Nishikawa, Motoshi Kaya and Hideo Higuchi | 4. 巻 16333 |
| 2. 論文標題 Step Sizes and Rate Constants of Single-headed Cytoplasmic Dynein Measured with Optical Tweezers | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sci. Rep | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34549-7 | 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 K. Sasaki, M. Kaya, and H. Higuchi. | 4. 巻 115 |
| 2. 論文標題 A unified walking model for dimeric motor proteins | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biophys. J. | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2018.09.032 | 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 1.Seohyun Lee and Hideo Higuchi | 4. 巻 576702 |
| 2. 論文標題 3D rotational motion of an endocytic vesicle on a complex microtubule network in a living cell | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/576702 | 査読の有無 無 |
| 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 樋口秀男 | 4. 巻 633 |
| 2. 論文標題 ファイマンラチェット-生体分子の運動の理解にむけて- | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 数理科学 | 6. 最初と最後の頁 34-39 |
| 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 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi | 4. 巻 2018 |
| 2. 論文標題 Focus Stabilization by Axial Position Feedback in Biomedical Imaging Microscopy | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 IEEE Sensors Applications Symposium | 6. 最初と最後の頁 309-314 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/SAS.2018.8336767 | 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 3件 / うち国際学会 4件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 S. Shintani, T.Washio, Y. Hwang, M. Kaya and H.Higuchi |
| 2. 発表標題 Molecular mechanism of self-oscillatory contraction of cardiac muscle |
| 3. 学会等名 Internatinal symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 茅元司, 蘆田祐人, 上田正仁, 樋口秀男 |
| 2. 発表標題 回折限界内に位置するミオシン複数分子の動態計測 |
| 3. 学会等名 生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 近藤雄一, 佐々木一夫, 樋口秀男 |
| 2. 発表標題 広い負荷領域におけるキネシン1 分子のステップ運動 |
| 3. 学会等名 ナノ学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Lee Seohyun , 樋口秀男 |
| 2. 発表標題 Three-dimensional vesicle motion in complex cytoskeletal network revealed by numerical analysis method |
| 3. 学会等名 生物物理学 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seohyun Lee, Motoshi Kaya, Kohsuke Gonda, Hideo Higuchi |
| 2. 発表標題 Trafficking of Endocytic Vesicles on Cytoskeleton in LiveCancer Cells |
| 3. 学会等名 A3 Foresight 9th Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yongtae Hwang, Hideo Higuchi.. Motoshi Kaya |
| 2. 発表標題 Property of Cardiac Myosin Assemble Measured by Optical Trapping |
| 3. 学会等名 A3 Foresight 9th Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi |
| 2. 発表標題 Focus Stabilization by Axial Position Feedback in Biomedical Imaging Microscopy |
| 3. 学会等名 IEEE Sensors Applications Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yongtae Hwang , Hideo Higuchi , Motoshi Kaya |
| 2. 発表標題 spontaneous oscillation of cardiac myosins |
| 3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seohyun Lee , Kohsuke Gonda , Motoshi Kaya , Hideo Higuchi |
| 2. 発表標題 Trafficking of endocytic vesicles in live cancer cells |
| 3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Motoshi Kaya , Hideo Higuchi |
| 2. 発表標題 Understanding of cooperative force generation among skeletal myosins based on direct observation of individual myosin dynamics |
| 3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Higuchi Lab Home Page
http://nanobio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/higuchipro/Japanese/jp_publications.html

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|